

Table 1 Group 1: Rifampicin-resistant isolates by the line probe assay, despite susceptible by the drug susceptibility testings (6 cases)

Patient No.	Drug susceptibility testing				RFP resistance-conferring mutation	
	MGIT-AST ^a	Wellpack-S ^b	BrothMIC MTB-1 ^c : MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Line probe assay	Amino acid affected : Amino acid change	
1	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow AGC (Ser)
2	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow AGC (Ser)
3	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow AGC (Ser)
4	S	S	R	4	Δ S2	516 : GAC (Asp) \rightarrow TAC (Tyr)
5	S	S	I	1	Δ S1	511 : CTG (Leu) \rightarrow CCG (Pro)
6 ^s	S	S	S	0.03	WT	None : None
6	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow CTC (Leu)

S: Susceptible R: Resistant I: Intermediate WT: wild type

^a Resistant to rifampicin at 1.0 $\mu\text{g/ml}$ by BACTEC MGIT 960 AST^b Resistant to rifampicin at 40 $\mu\text{g/ml}$ by the proportion method on egg-based Ogawa medium^c Resistant to rifampicin at 4.0 $\mu\text{g/ml}$ by the broth micro-dilution method^s Strains from the case 6 during from the first therapy**Table 2** Group 2: Rifampicin-resistant isolates by the line probe assay, whereas the different determinations by the drug susceptibility testings (3 cases)

Patient No.	Strain	Drug susceptibility testing				RFP resistance-conferring mutation		Time span (mo)
		MGIT-AST ^a	Wellpack-S ^b	BrothMIC MTB-1 ^c : MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Line probe assay	Amino acid affected : Amino acid change		
1	1	ND	S	I	0.25	Δ S3	522 : TCG (Ser) \rightarrow TTG (Leu)	0
	2	#*	R	R	4	Δ S3	522 : TCG (Ser) \rightarrow TTG (Leu)	17
2	1	R	S	R	4	Δ S1	509-511 Deletion	0
	2	R	S	R	4	Δ S1	509-511 Deletion	4
3	1	ND	S	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)	0
	2	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)	24
	3	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)	31
	4	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)	34
	5	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)	40

* Not grown ND: Not determined S: Susceptible R: Resistant I: Intermediate

^a Resistant to rifampicin at 1.0 $\mu\text{g/ml}$ by BACTEC MGIT 960 AST^b Resistant to rifampicin at 40 $\mu\text{g/ml}$ by the proportion method on egg-based Ogawa medium^c Resistant to rifampicin at 4.0 $\mu\text{g/ml}$ by the broth micro-dilution method

例6の菌株6は526部位にヒスチジン (His) からロイシン (Leu) への変異を認めた。しかし症例6の前回治療保存菌株6^sについては *rpoB* 遺伝子領域に変異は認められなかった (Table 1)。

グループ2において、症例1は522部位にセリン (Ser) からロイシン (Leu) への変異、症例2は509~511の欠失を認めた。症例3は526部位にヒスチジン (His) からシステイン (Cys) への変異が認められ、菌株間の遺伝子変異に変化は認められなかった (Table 2)。

RFLP法

グループ1の症例1, 2, 3は同じRFLPパターンを示した。症例6の2菌株も互いに同じパターンを示した。グループ2の症例1, 2, 3については治療中に排菌された菌株のRFLPパターンは変化を認めなかった。

考 察

わが国で従来広く用いられている薬剤感受性検査は、長らく小川培地を用いた絶対濃度法であったが、1997年に日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会が提案した比率法が標準となった⁷⁾。しかし操作の煩雑さや試験結果が得られるまで時間がかかることが問題とされている。MDR-TBにおいては時折発育がとて遅い菌が存在する場合があるために正確な判定が困難となることがある。

分子遺伝学的手法の導入により、結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子の研究が進んでいる^{8)~12)}。RFPの場合、RNAポリメラーゼ β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子に変異が見られ、特に hot spot 領域 (69bp) の変異が RFP 耐性結核菌の95%に認められる¹³⁾。ジェノスカラー・Rif TBはこの *rpoB* 遺伝子変異を検出する試薬であり、迅速な RFP 感受性判定が可能である¹⁾²⁾⁴⁾¹⁴⁾。

そこでわれわれは生物学的手法を用いる薬剤感受性検査で起こりうる、臨床経過とRFP感受性検査との間の齟齬が生じる症例や、複数回の感受性結果が変動するためRFP感受性判定が困難な症例を対象として、迅速かつ明確な判定が可能なRFP耐性結核菌検出キットを用いた遺伝子レベルでの感受性判定の有益性の検討を行った。

今回グループ1における6症例は、いずれかの薬剤感受性検査でRFP感受性、もしくは判定保留域と判定された。しかしプロミックMTB-1法で得られたMIC値は比較的高い値(0.25~4 μ g/ml)を示したため、通常の薬剤感受性検査では耐性と判定されない低レベルのRFP耐性と考えられた。症例6の場合、再発時における菌株6のMIC値は初回発病時における菌株の値よりも上昇が認められた(0.03 μ g/mlから0.25 μ g/ml)ことからRFPの耐性化による再燃が考えられた。このような結核菌は通常の薬剤感受性検査では見過ごされやすく、薬剤耐性結核菌の早期発見のうえでもMIC値測定の重要性が示唆された。

グループ2における3症例のうち、症例1の菌株1についてはMGIT-AST法が当センターに導入される前に検出された検体であったため実施されていなかったが、ウエルバック培地S法ではRFP感受性、プロミックMTB-1法ではMIC値0.25 μ g/mlの判定保留域であった。17カ月後に排菌された菌株2においてはMGIT-AST法では菌の発育不良による判定不能となり、他の2法ではRFP耐性と判定されMIC値も4 μ g/mlと上昇していた。初回治療の場合と違って、いったん排菌が停止された後に再度排菌し治療を開始するときには耐性結核の頻度が高いことから¹⁵⁾、薬剤感受性検査を実施することは必須である。またAmerican Thoracic Society (ATS)のガイドラインでも患者が3カ月の治療の後にも培養陽性の喀痰を呈し続ける場合や、培養陰性の後に培養陽性となった場合には薬剤感受性検査を繰り返さなければならないとしている¹⁶⁾。今回のグループ2の検討で長期持続排菌症例にRFPの耐性化が認められたことから、長期持続排菌症例に対しては低レベル耐性結核菌の可能性を考慮し、薬剤感受性検査を繰り返す必要があると考えられた。

ある患者の生体内において感受性菌と耐性菌が混在している場合、薬剤感受性検査で耐性菌の割合が1%を超えると治療効果が乏しいという臨床的根拠からcritical pointを1%として採用している。遺伝子検査ではDNAの割合の優勢なほうがより増幅されるという特徴がある。したがって薬剤感受性検査と遺伝子検査は相関性が良好であると考えられる。稀なケースではあるが、薬剤感受性検査でRFP耐性と判定されたがジェノスカラー・Rif TBでwild typeと判定され、シーケンス解析では感受性菌と耐性菌が混在していた1菌株をHiranoらは報告

している⁹⁾。阿部らは、薬剤感受性検査で耐性と判定されたにもかかわらずジェノスカラー・Rif TBとシーケンス解析でwild typeと判定された4株を報告し、*rpoB*以外の遺伝子がRFP耐性に関与している可能性を述べている¹⁷⁾。今回の検討ではこのような例は含まれていなかったが、遺伝子検査を行ううえでは十分留意すべき点である。

阿部らは230株中1株に低レベルRFP耐性菌があり、通常の薬剤感受性検査で感受性、ジェノスカラー・Rif TBとシーケンス解析で耐性となったとしている¹⁷⁾。この症例は標準化学療法で菌陰性化に成功したが、今回のグループ1の6症例はいずれも臨床的効果が乏しかった。臨床的経過をgold standardと考えるならば、遺伝子解析による感受性判定が生体内での薬剤感受性を正確に反映している可能性が示唆された。しかし薬剤耐性の機序はまだ未解明な面が残されており、薬剤感受性検査と併用することが重要である。薬剤感受性検査においても卵培地上で発育の悪い菌が液体培地上で発育する場合や、その逆の例もある。今回各薬剤感受性検査間で結果に不一致が生じた要因として、低レベルRFP耐性の可能性と同時に菌の発育状況が使用培地によって左右されることも十分考えられる。そのような場合、遺伝子検査結果を参考にすることは非常に有益であろう。

*rpoB*変異領域を5分類したうえで遺伝子変異の起こる頻度について検討したRossauらによると、RFP耐性菌193株中103株(53.4%)にS5領域の変異を認め、ついでS4領域(31.1%)、S2領域(10.4%)の変異と続き、S3領域は3.6%、S1領域は1.6%の割合で変異が認められるとしている¹⁸⁾。今回コントロール対照のRFP耐性株8株中S5領域に変異の認められたのは4株で、ついでS4領域に2株、S3領域とS1領域に各1株認められた。しかし供試菌15株では一番高頻度に変異が認められるS5領域に変異は認められなかった。

MDR-TBは薬剤耐性遺伝子の変異が多重に蓄積された菌株である。薬剤耐性獲得は菌の適応度(フィットネス)を低下させるものであり、適応に払う犠牲(フィットネス・コスト)を最小限に抑えられた菌株が耐性結核として優勢に出現するとも考えられている¹⁹⁾。Cavusogluらは*rpoB*遺伝子変異はコドン531、ついで526、516、511に多く認められたと報告している。そのなかでコドン531(S5領域)ではTCGからTTGへの変異、511(S1領域)ではCTGからCCGへの変異が高率に出現することから、この変異型は菌の生存するうえでの適応度が高い(フィットネス・コストが低い)ために優勢的であるのだろうと推察している²⁰⁾。今回、グループ1の症例5でコドン511に同様の変異を認めた。この菌株はフィットネス・コストが低い可能性が考えられた。続いて

Cavusogluらはコドン526と516には多様な変異型が認められ、これらの変異をもつ菌株は高レベルRFP耐性であることから¹⁰⁾²¹⁾、様々な塩基に容易に変化できるため高い薬剤耐性を獲得する能力をもつのであろうとしている²⁰⁾。今回の結果ではコドン516の変異は1株しかなかったが、コドン526では3種類の遺伝子変異を認めた。グループ2の症例3における2塩基変異(CAC→TGC)は他の報告でも見られたが²⁰⁾²²⁾、グループ1の症例1, 2, 3で認めた変異は今までに報告はない。*rpoB*遺伝子変異の多くはpoint mutationであるが、少数ながらコドンの欠失、挿入、2塩基変異などが様々なアミノ酸部位に報告されている²⁾²⁰⁾²¹⁾²³⁾。コドン526の変異の多様性から考えて、今回の変異も十分妥当なものであると考えられる。また耐性を獲得したと考えられるグループ1の症例6においてコドン526の変異を認めたことはこのアミノ酸変異の獲得耐性能力の高さを示唆するものである。

今回グループ2の症例1では、MIC値が上昇していたにもかかわらず*rpoB*遺伝子の変異は522(S3領域)のみで変化がなかった。Cavusogluらは30株に多重なアミノ酸変異を認めており、うち2株はコドン522~525の欠失と、515と533のdouble mutationを認めたが、残り28株は高頻度に表れる変異(531, 526, 516, 511)のいずれかを伴っていた²⁰⁾。またコドン522の変異はpoint mutationがほとんどであり、他の領域の変異を伴うという報告は現在のところ見当たらない^{4)9)18)20)~22)24)}。したがって、今回のコドン522の変異は多重に変異を蓄積しやすいと思われる高頻度変異とは連動せずに、耐性レベル

を上昇させている可能性がうかがえた。

今回の結果ではコドン531変異は見られなかったが、高い耐性獲得能力をもつコドン526, 516変異や、適応能力に優れたコドン511の変異を認めたことから、低レベルRFP耐性菌はRFP治療継続により高レベルのRFP耐性菌へと移行する危険性も考えられた。また今回検体数が少なかったことと、コドン526と531のdouble mutationが現時点で報告されていることから²⁰⁾²²⁾、今後コドン531変異が検出される可能性も考えられる。低レベルRFP耐性結核菌と*rpoB*遺伝子変異が起こる部位に何らかの菌側の遺伝的背景が関連しているかもしれないと考え、今後菌株数を増やして低レベルRFP耐性菌に特徴的な変異部位の詳細な検証を計画中である。

RFLP法による検討では、グループ1における症例1, 2, 3のRFLPパターンが一致し、薬剤感受性検査結果ならびに*rpoB*遺伝子解析結果も一致していた。これらの症例を示した3患者は居住地が近接し発病時期も近かったことから、疫学的にも同一菌株による感染と推測された。

Smallらは薬剤感受性検査とRFLPの比較で、再発した肺結核症17症例のうち6症例にRFLPは不変だったが薬剤感受性検査に変化が見られたことから、内因性再燃による再発と報告している²⁵⁾。グループ1における症例6は初診、再発の菌株間でRFLPパターンが一致し、再治療時における菌株のMIC値が上昇して耐性化していることから同一菌により耐性を獲得し、再燃したという考えがRFLP法から更に示唆された。グループ2におけ

Table 3 Comparison of the results of the line probe assay with three drug susceptibility testings for INH and RFP

Group and patients	Strains	Drug susceptible testings								Line probe assay	
		MGIT-AST		Wellpack-S			BrothMIC MTB-1				
		m-INH	m-RFP	INH0.2	INH1.0	RFP	INH	RFP	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
Group 1	1	R	S	R	S	S	R	I	0.25	Δ S4	
	2	R	S	R	S	S	R	I	0.25	Δ S4	
	3	R	S	R	S	S	I	I	0.25	Δ S4	
	4	R	S	S	S	S	S	R	4	Δ S2	
	5	R	S	R	R	S	R	I	1	Δ S1	
	6 [§]	R	S	R	S	S	R	S	0.03	WT	
	6	R	S	R	S	S	R	I	0.25	Δ S4	
Group 2	1	1	ND	ND	R	R	S	R	I	0.25	Δ S3
		2	#*	#*	R	R	R	R	R	4	Δ S3
	2	1	R	R	R	S	S	R	R	4	Δ S1
		2	R	R	R	S	S	R	R	4	Δ S1
	3	1	ND	ND	R	R	S	R	I	0.5	Δ S4
		2	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4
		3	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4
		4	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4
		5	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4

* Not grown ND: Not determined S: Susceptible R: Resistant I: Intermediate WT: wild type

[§] Strains from the case 6 during the first therapy

る症例1, 2, 3のRFLPパターンは症例ごとに同じで、同一の菌による持続感染と考えられた。

RFP耐性結核菌の多くはイソニアジド (INH) 耐性を併せもつことが報告されており²⁶⁾²⁷⁾、今回、Table 3で示したINHとRFPの薬剤感受性検査結果でも、供試菌15株はすべて3種類の薬剤感受性検査のいずれかでINH耐性と判定されていた。2002年の結核療法研究協議会による全国調査では、初回治療例の0.7%、既治療例の9.8%でMDR-TBが認められたと報告されており²⁸⁾、大多数のMDR-TBは不確実な服薬や中断により耐性を獲得したと考えられている。しかし今回グループ1の6症例のうち5症例は初回治療例であり、*rpoB* 遺伝子変異が存在するけれども、薬剤感受性検査で耐性と判定されないため見逃されている比較的初期のMDR-TBの存在がうかがわれた。このような場合、RFP感受性菌と過小評価されたまま治療が進行され、再発した際にはより深刻なMDR-TBに進行している危険性が少なからず存在すると考えられた。HIV陰性者におけるMDR-TBの外来性再感染事例^{29)~32)}が報告されており、低レベルRFP耐性結核菌を早期に検出することはMDR-TBによる院内感染を防ぐためにも非常に重要である。本キットにより適切な治療法の迅速な選択が可能となり、治療成績を高められる効果が期待できる。

ま と め

RFPに対する通常の薬剤感受性検査結果と臨床効果との間に乖離がある症例や、長期排菌症例で薬剤感受性結果が不安定な場合、低レベルRFP耐性結核菌による感染の可能性がある。その際MIC値の測定やline probe assayによる遺伝子変異の有無の検討が臨床的に有用であることが示唆された。

文 献

- 1) 鈴木定彦, 市原竜生, 田丸亜貴, 他 : DNAチップによる結核菌の耐性診断. *Bio Industry*. 2000 ; 5 : 36-44.
- 2) Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, et al. : Use of the genotype MDRDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2005 ; 43 : 3699-3703.
- 3) Lin SYG, Probert W, Lo M, et al. : Rapid detection of isoniazid and rifampin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex from cultures or smear-positive sputa by use of molecular beacons. *J Clin Microbiol*. 2004 ; 42 : 4204-4208.
- 4) Hirano K, Abe C, Takahashi M : Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. *J Clin Microbiol*. 1999 ; 37 : 2663-2666.
- 5) 阿野裕美, 松本智成, 吉多仁子, 他 : 結核治療中患者から経時的に得られた結核菌株での、薬剤耐性菌と感受性菌の割合の変化. *結核*. 2003 ; 78 : 739-746.
- 6) van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993 ; 31 : 406-409.
- 7) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会 : 「新結核菌検査指針2000」. 結核予防会, 東京, 2000, 95-106.
- 8) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. : The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 1992 ; 358 : 591-593.
- 9) Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al. : Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 ; 38 : 2380-2386.
- 10) Ohno H, Koga H, Kohno S, et al. : Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 ; 40 : 1053-1056.
- 11) Scorpio A, Zhang Y : Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase /nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*. 1996 ; 2 : 662-667.
- 12) Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, et al. : Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 ; 41 : 1677-1681.
- 13) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. : Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993 ; 341 : 647-650.
- 14) 林 浩志, 竹村一男, 兒崎隆純, 他 : マイクロアレイを用いた結核菌の検査. *臨床検査*. 2005 ; 49 : 539-545.
- 15) Abe C, Hirano K, Wada M, et al. : Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001 ; 5 : 46-52.
- 16) American Thoracic Society : Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 ; 161 : 1376-1395.
- 17) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他 : Line Probe Assay (LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核*. 2000 ; 75 : 575-581.
- 18) Rossau R, Traore H, de Beenhouwer H, et al. : Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 ; 41 : 2093-2098.
- 19) Gagneux S, Long CD, Small PM, et al. : The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2006 ; 312 : 1944-1946.
- 20) Cavusoglu C, Hilmioğlu S, Guneri S, et al. : Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol*. 2002 ; 40 : 4435-4438.
- 21) Hwang HY, Chang CY, Chang LL, et al. : Characterization

- of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Med Microbiol.* 2003 ; 52 : 239–245.
- 22) Valim ARM, Rossetti MLR, Ribeiro MO, et al.: Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol.* 2000 ; 38 : 3119–3122.
- 23) Matsiota-Bernard P, Vrioni G, Marinis E: Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 36 : 20–23.
- 24) Morlock GP, Plikaytis BB, Crawford JT: Characterization of spontaneous, in vitro-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 ; 44 : 3298–3301.
- 25) Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, et al.: Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med.* 1993 ; 328 : 1137–1144.
- 26) Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, et al.: Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 36 : 1969–1973.
- 27) Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, et al.: Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet.* 1994 ; 344 : 273–278.
- 28) Tuberculosis Research Committee (Ryoken): Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan : a nationwide survey, 2002. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007 ; 11 : 1129–1135.
- 29) Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, et al.: Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 ; 21 : 596–602.
- 30) 露口一成: 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例について. 複十字. 2003 ; 293 : 8–11.
- 31) Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al.: Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 ; 163 : 717–720.
- 32) Bandera A, Gori A, Catozzi L, et al.: Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2001 ; 39 : 2213–2218.

————— Original Article —————

EVALUATION OF THE DISCREPANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS BETWEEN ANY ORDINARY SUSCEPTIBILITY TESTING AND *rpoB* GENE ANALYSIS BY THE LINE PROBE ASSAY

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ²Motohisa TOMITA, ¹Masaji OKADA, and ³Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] Evaluation of rifampicin-resistance by the line probe assay, for rifampicin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains which were classified as rifampicin-resistant by the phenotypic drug susceptibility testings.

[Materials and Methods] A total of 15 clinical isolates from NHO Kinki-chuo Chest Medical Center consisting of 6 rifampicin-resistant strains by the line probe assay despite susceptible result by the drug susceptibility testings, and 9 clinical isolates which showed the fluctuating results on repeated drug susceptibility testings. After we conducted 3 drug susceptibility testings and the line probe assay, we have examined the sequence analysis for confirming mutations in the *rpoB* gene.

[Results] All strains were determined rifampicin-susceptible or intermediate by the drug susceptibility testings with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) which ranged from 0.25 to 4 $\mu\text{g/ml}$ by BrothMIC MTB-1, whereas these isolates indicated rifampicin-resistance by the line probe assay and

revealed mutations in the hot-spot region (69 bp) by the sequence analysis.

[Conclusion] We verified that the line probe assay might be useful for the correct determination of drug susceptibility, especially about the low-level rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains.

Key words : *M. tuberculosis*, Drug susceptibility testing, Resistance-conferring mutation, *rpoB*, MIC

¹Clinical Research Center, ²Department of Clinical Laboratory, ³Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591–8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)

遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2の有用性の検討

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ⁴岩本 朋忠
²富田 元久 ¹岡田 全司 ³坂谷 光則

要旨:〔目的〕遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA法)のわが国における有用性の検討。〔対象〕NHO近畿中央胸部疾患センターにおいて新規に分離された抗酸菌122株。〔方法〕INNO-LiPA法と3種類の同定キット(コバス アンプリコア マイコバクテリウム法, アキュプローブ法とDDH法)との結果を比較検討した。同定不能もしくはデータ間で違う結果を示した株についてはシーケンス解析を行った。〔結果〕122株のうち112株が3種類の同定キットのいずれかとINNO-LiPA法の結果が一致した(91.8%)。相違を認めた10株のうち6株はINNO-LiPA法とシーケンス解析の結果が一致した。しかし2株のうち1株はDDH法の結果と一致し*M. fortuitum*, もう1株はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法とアキュプローブMAC法の結果と一致し*M. intracellulare*と判定された。INNO-LiPA法と3種類の同定キットの結果がともにシーケンス解析結果と異なる株は2株認められた(*M. paraffinicum*, *M. mucogenicum*近縁種)。〔考察〕INNO-LiPA法は正確性, 迅速性に優れており有益性が証明された。培養および生化学的性状試験と併行して実施することにより総合的な抗酸菌同定が可能であると考えられた。

キーワード:抗酸菌, INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2, 同定検査, 16S rRNA 遺伝子, ITS シーケンス解析

はじめに

抗酸菌同定検査において生化学的同定検査を実施するには多大な労力と菌量が必要である。また培養にかかる期間も結核菌だと小川培地で3~8週間は必要であり, 治療方針を決定するうえでも迅速な同定検査は必須である。近年, 遺伝子検査の手法を応用した抗酸菌の迅速同定検査が日常的に用いられるようになり, さまざまな測定原理から開発された菌同定用キットが市販されている。抗酸菌を正確かつ迅速に同定する性能を兼ね備えたこれらのキットは, 先人により高い評価と共に各種問題点も報告されている^{1)~7)}。

コバス アンプリコア マイコバクテリウム法は polymerase chain reaction (PCR) を用いてDNAを増幅後, ハイブリダイゼーションすることで臨床検体や菌株を対象

として*M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*の3菌種が同定できる^{1)~3)}。前倉らによると肺結核患者における塗抹陽性検体の94.4%はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法で陽性であったが, 塗抹陰性検体の場合は70.8%が陽性となった⁴⁾。

アキュプローブ法は検体の16S rRNAをターゲットとして, 菌種特異的DNAプローブとハイブリダイゼーションさせてから, 専用の検出器を用いて化学発光を検出するキットである⁵⁾。結核菌群と*M. avium* complex (MAC), *M. kansasii*, *M. gordonae*の4種類のキットがあり, アキュプローブ陽性となる感度は結核菌群と*M. gordonae*で100%, MAC 95.2%, *M. kansasii* 44.0%という報告⁵⁾や, 結核菌群87.2%, MAC 78.6%, *M. kansasii* 91.7%, *M. gordonae* 85.9%とする報告⁶⁾などがある。

DDH法は核酸の相同性を利用し, ハイブリダイズし

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター, ²研究検査科, ³内科, ⁴神戸市環境保健研究所

連絡先: 吉田志緒美, 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター, 〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
(Received 28 Aug. 2008/Accepted 30 Oct. 2008)

たDNAの比率をバイオチン-アビジン反応を用いてそれぞれの基準DNA株と被検菌DNAのDNA塩基配列の相同性を測定するキットで18菌種の同定を一度に行うことが可能である⁹⁾。同法は「全染色体DNAの類似度(similarity)が70%以上であれば、同じ菌種としてよい」という細菌分類学の菌種同定基準を利用している。そのため相対類似度で算出された数値から供試菌がどの菌種の基準株に最も近いかという結果は得られるが、同定不能となる菌種が多い傾向がある⁸⁾⁹⁾。また「肉眼的に明らかな発色が確認された場合には吸光度を測定せずにウェルの菌種と同定してもよい」としていることも誤判定を生じやすい原因である。

INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA法)は16S-23S internal transcribed spacer (ITS) 領域をターゲットとしPCR法で増幅されたDNAを対象に、ラインプローブアッセイを用いて検出する。一度に15菌種の同定と*Mycobacterium*属に共通の*Mycobacterium* genusのプローブがあることから抗酸菌の確定が可能である¹⁰⁾。

INNO-LiPA法の検討はこれまでにいくつか報告はあるが^{10)~13)}、現時点でわが国における検討報告はなされていない。今回われわれはINNO-LiPA法の迅速性ならびに正確性について上記の先に市販されている同定キットの結果と比較しその有用性を検討した。

方 法

対象

独立行政法人近畿中央胸部疾患センターにおいて新規に分離培養される菌株のうち大半を占める抗酸菌は結核菌群であるが、多くの菌種が存在し、日常検査で判定に苦慮する割合が高いのは非結核性抗酸菌 (NTM) である。今回NTMに対する同定結果の比較に重点をおき、結核菌群の菌株数を絞って検討を試みた。したがって2006年2月1日から6月30日までの期間に分離された結核菌群7株、NTM 115株の合計122株を対象とした。すべての菌株同定は同定検査結果とあわせて小川培地上でのコロニー性状の観察をもって最終判定とした。

検体内に複数の菌が混在する場合に同時に鑑別が可能かどうかを検討するため、臨床検体から複数の菌種が認められた3つの混合培養も検討に加えた。これらはあらかじめ固形培地上で異なるコロニー性状をもつと判定され、おのおの純培養を行って3種類の同定キットにて同定検査を実施、複数菌混在であることを確認した。

同定キット

NHO近畿中央胸部疾患センターにおいて日常検査に使用している遺伝子を用いた同定キットを使用した。

結核菌群の同定には結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット (極東製薬工業) と結核菌群同定試薬

キャピリアTB (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いた。*M. avium*と*M. intracellulare*の同定にはコバス アンプリコア マイコバクテリウム アビウムとコバス アンプリコア マイコバクテリウム イントラセルラー (コバス アンプリコア マイコバクテリウム法:ロシュ・ダイアグノスティクス)、MACの同定にはアキュプローブ マイコバクテリウム アビウム コンプレックス (アキュプローブ MAC法:極東製薬工業) を用いた。*M. kansasii*および*M. gordonae*の同定には、研究用試薬であるアキュプローブ マイコバクテリウム カンサシとアキュプローブ マイコバクテリウム ゴルドネ (共に極東製薬工業) を用いた。上記以外の菌種の同定にはDDH マイコバクテリア '極東' (DDH法:極東製薬工業) を用いた。すべての方法は添付の仕様説明書に準拠して行った。DDH法はDNAの精製が不十分な場合に同定不能の結果が得られることもあるため同定不能の結果が得られた場合には再検査を行った。

DNAの抽出

小川培地発育菌から白金耳で径2~3mmのコロニー2個分の菌量を採取し、1.5 mlマイクロチューブに分注したインスタジーンDNA精製マトリックス (BIO-RAD) 200 μ lに懸濁した。56°C, 15~30分処理後10秒間 vortex し、正確に100°C, 8分間処理した後直ちに氷水中で急冷した。10秒間 vortex し、12000 rpm, 3分遠心した上清をINNO-LiPA法ならびにシークエンス解析法に用いた。

INNO-LiPA法

INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA法: INNOGENETICS) は、発色確認用コントロールと抗酸菌特異的プローブ (MYC genus) および菌種鑑別のための22本のITS遺伝子プローブが固相化されたストリップ状のキットである。プローブは12菌種のプローブに加えて、3種類の subtype が鑑別可能な*M. kansasii* プローブ、4種類のMAIS complex プローブ、*M. abscessus* を含んだ3種類の*M. chelonae* complex プローブが配置されている。同キットの使用説明書に準拠して16S-23S ITS領域の遺伝子のPCR増幅を行い、得られたPCR増幅産物をLiPA検体として使用した。LiPA検体をハイブリダイズさせ、得られた発色パターンによって抗酸菌の同定を行った (Table 1)。

INNO-LiPA法においてはPCRの後、すべてのPCR産物を電気泳動し得られたバンドから増幅の確認を行った。またDDH法と同様にMYC genusにしか発色が見られない場合、再検査を行った。

16S rRNA 遺伝子、ITS領域のシークエンス解析

3種類の同定キットとINNO-LiPA法により同定不能であった株、ならびに結果の乖離が認められた株に対し

Table 1 Interpretation of *Mycobacterium* species by using the INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2

Line	Probe	Taxa reacting with the probe
1	Conjugate Control	
2	MYC genus	Presence of <i>Mycobacterium</i> in the test sample
3	MTB	<i>M. tuberculosis</i> complex: <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. africanum</i>
4	MKA-1	<i>M. kansasii</i> (group I)*
5	MKA-2	<i>M. kansasii</i> (group II)*
6	MKA-3	<i>M. kansasii</i> (group III, V, VI)*, <i>M. gastri</i>
7	MXE	<i>M. xenopi</i>
8	MGO	<i>M. gordonae</i>
9	MGV	<i>M. genavense</i>
10	MSI	<i>M. simiae</i>
11	MMU	<i>M. marinum</i> + <i>M. ulcerans</i>
12	MCE	<i>M. celatum</i>
13	MAIS	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , MAC, <i>M. malmoeense</i>
14	MAV	<i>M. avium</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>M. silvaticum</i>
15	MIN-1	<i>M. intracellulare</i> (sqv. Min-A, -B, -C, and -D)
16	MIN-2	<i>M. intracellulare</i> (sqv. Mac-A)
17	MSC	<i>M. scrofulaceum</i>
18	MML	<i>M. malmoeense</i>
19	MHP	<i>M. haemophilum</i>
20	MCH-1	<i>M. chelonae</i> complex (group I, II, III, IV, <i>M. abscessus</i>)*
21	MCH-2	<i>M. chelonae</i> complex (group III, <i>M. abscessus</i>)*
22	MCH-3	<i>M. chelonae</i> complex (group I)*
23	MFO	<i>M. fortuitum</i> – <i>M. peregrinum</i> complex
24	MSM	<i>M. smegmatis</i>

*group is based on sequevar derived from 16S–23S nucleotide sequences. sqv., sequevar

て、データベースが豊富な16S rRNA 遺伝子のシーケンスを、さらに16S rRNA 遺伝子の相同性解析で同定が困難な菌株に対してはITSシーケンス解析を追加し菌種を決定した。PCR反応は岩本らの方法¹⁴⁾に準じ、Takara Ex Taq (タカラバイオ)を用いて、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 1分を35サイクル行った。16S rRNA 遺伝子の超可変部AとBを含む領域をプライマー285F [5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3']と264R [5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3']を用いてPCR増幅産物を得た。ITS領域全長の増幅にはITS1 [5'-GAT TGG GAC GAA GTC GTA AC-3']とITS2 [5'-AGC CTC CCA CGT CCT TCA TC-3']を用いた。PCR産物を精製した後BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan)を用いて16S rRNA 遺伝子の部分配列とITS全長の塩基配列を得た。得られた塩基配列は、Ribosomal Differentiation of Microorganisms: RIDOMを用いて相同性検索を行い、99%以上の塩基配列一致をもって同一菌種と決定した。

結 果

供試菌122株のうち112株においてINNO-LiPA法と3種類の同定キットの結果が一致した。対象菌株のうち結核菌群の7株はすべて、結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット、キャピリアTBとINNO-LiPA法の結果が一致した。NTM 115株のうちアキュプローブ

MAC法でMACと同定され、コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により*M. avium*と同定された24株はINNO-LiPA法ではMAISとMAVプローブのバンドを認めた。一方アキュプローブMAC法でMAC、コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により*M. intracellulare*と同定された7株がMAISとMIN-1プローブに反応していたが、菌株23のみMIN-1に反応を示さず結果に乖離が見られた。DDH法を実施した83株のうち再検査を実施しても同定不能となった株は6株認められた。これら6株のうち3株はINNO-LiPA法でもMYC genusにしか反応が見られなかった。一方DDH法で菌種同定ができたがINNO-LiPA法との間に結果の食い違いが見られた株は3株認められた。したがって3種類の同定キットのいずれかとINNO-LiPA法との間で同定不能や結果が異なった10株に対してシーケンス解析を行った。

6株(菌株2, 19, 14, 22, 7, 6)はシーケンス解析結果とINNO-LiPA法の結果が一致した。菌株2と19はINNO-LiPA法でMKA-3の反応を認め*M. kansasii* 3と判定され、シーケンス解析からそれぞれアキュプローブカンサシで陰性となる*M. kansasii* sqv. IIIとVIと判定された。菌株14はINNO-LiPA法、シーケンス解析ともに*M. gordonae*と判定された。一方、菌株5と23の2株は同定キットの結果とシーケンス解析結果が一致した。菌株5は、INNO-LiPA法でMYC genusに反応が認

Table 2 Discrepant and unidentified results in identification of *Mycobacterium* species, including 9 isolates of *M. lentiflavum*.

Isolate No.	Cobas Amplicor system	AccuProbe	DDH	INNO-LiPA	16S rRNA gene		Identity (%)
					ITS	Identity (%)	
9 isolates	Negative	Negative	Unidentified**	MYC genus	<i>M. lentiflavum</i> DSM4418T	429/429 (100)	
2	Negative	Negative	Unidentified**	<i>M. kansasii</i> 3	<i>M. kansasii</i> Borste 8875/99, sqv. VI-3	441/441 (100)	<i>M. kansasii</i> , MkaF 277/277 (100)
19	Negative	Negative	Unidentified**	<i>M. kansasii</i> 3	<i>M. kansasii</i> Borste 539/99, sqv. III	440/440 (100)	<i>M. kansasii</i> , MkaC 279/279 (100)
14	Negative	NT	Unidentified**	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> Borste 11340/99, sqv. III	440/440 (100)	<i>M. gordonae</i> , MgoC 270/270 (100)
22	Negative	NT	Unidentified**	MYC genus	<i>M. interjectum</i> ATCC51457T	430/430 (100)	
7	Negative	NT	Unidentified***	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> or <i>M. chelonae</i> (<i>M. abscessus</i> by ITS)	428/428 (100)	<i>M. abscessus</i> DSM44196 294/294 (100)
6	Negative	NT	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i> or <i>M. chelonae</i> (<i>M. chelonae</i> by ITS)	428/428 (100)	<i>M. chelonae</i> Mche B 293/294 (99.7)
5	Negative	NT	<i>M. fortuitum</i>	MYC genus	<i>M. fortuitum</i> DSM46621T	428/428 (100)	
23	<i>M. intracellulare</i> MAC*	MAC*	NT	MAIS	<i>M. intracellulare</i> ATCC35770 sqv. III	442/442 (100)	
13	Negative	NT	Unidentified***	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mucogenicum</i> ATCC49650T	423/428 (98.8)	
18	Negative	NT	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. intracellulare</i> 2	<i>M. paraffinicum</i> DSM44181T	439/439 (100)	

M. avium* complex **slow growers *rapid growers NT: not tested T, Type strain sqv., sequovar

められたが菌種の特定には至らず、DDH法とシーケンス解析では *M. fortuitum* と同定された。菌株23はコバスアンプリコア マイコバクテリア法で *M. intracellulare*, アキュプローブ MAC法で MAC, INNO-LiPA法で MAIS と判定され、シーケンス解析で *M. intracellulare* ATCC 35770 sqv. III (Mac-D) と100%相同と判定された。

シーケンス解析結果といずれかの方法の結果が異なった株(菌株13, 18)は各々 *M. mucogenicum* 近縁種と *M. paraffinicum* と同定された。

小川培地上で遅発育菌と観察され、コバス アンプリコア マイコバクテリア法, アキュプローブ法, DDH法でも同定不能となり、INNO-LiPA法で MYC genus にしかバンドの発色が見られなかったがシーケンス解析で *M. lentiflavum* と同定された株が9株認められた (Table 2)。

複数菌種が混在していた3混合培養は INNO-LiPA法でも複数のバンドパターンが認められた (*M. tuberculosis* + *M. gordonae*, *M. avium* + *M. fortuitum*, *M. kansasii* + *M. gordonae*)。

考 察

分子遺伝学的に近縁な菌種であり16S rRNA遺伝子に違いが見られない場合、ITS領域のほうが進化速度は速いため、より多様性のある配列結果が得られる。ITS領域をターゲットとした INNO-LiPA法はITS領域で高い多型性が知られているMACに対して4種類の亜型プローブを使って亜型判定を可能としている。菌株23はアキュプローブMAC法でMAC, コバス アンプリコア マイコバクテリア法で *M. intracellulare*, シークエンス解析で *M. intracellulare* ATCC 35770 sqv. III (Mac-D) と判定された。INNO-LiPA法では同タイプに対応する亜型プローブは設計されていないためにMAISプローブのみの反応となった。LebrunらもATCC 35770の検討で同じくMAISプローブにのみ発色が認められたと報告している¹³⁾。したがって、ITS領域において菌種内多型性を示す菌種に対しては、シーケンス解析で相同性を確認することが重要となってくる。

シーケンス解析といずれの方法とも結果が食い違った2株のうち菌株18はアキュプローブMAC法陰性、DDH法で *M. scrofulaceum* となり、INNO-LiPA法でMAISとMIN-2に発色が見られ *M. intracellulare* sqv. Mac-Aと判定された。遅発育菌である同菌株は16S rRNA解析では100%の相同性で *M. paraffinicum* DSM 44181と判定され、同じく *M. scrofulaceum* DSM 43992とは99%の相同性が見られた。Tortoliらも *M. paraffinicum* はMAISとMIN-2に発色が見られたがアキュプローブMAC法は陰性であったと報告している¹⁰⁾。一方Lebrunらはアキュロー

ブ MAC法陰性、INNO-LiPA法ではMAISのみにバンドに発色があり、シーケンス解析で *M. paraffinicum* と判定されたが同時に *M. scrofulaceum* DSM 43992と98.9%の相同性があったと報告している¹³⁾。今回アキュプローブMAC法でMAC、コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により *M. avium* と同定された菌株はすべてINNO-LiPA法で明確にMAVに発色が見られ、アキュプローブMAC法でMAC、コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により *M. intracellulare* と判定された菌株も上記の菌株23以外はMIN-1に発色が見られた。したがって唯一MIN-2にバンドを示した菌株18は *M. intracellulare* sqv. Mac-Aとかなり相同性が高い近縁菌種と考えられた。

菌株13は16S rRNAシーケンス解析で *M. mucogenicum* ATCC 49650Tと5bpの違い(98.8%の相同性)が見られ *M. mucogenicum* の近縁種と推定された。小川培地上で迅速に発育しDDH法で同定不能、INNO-LiPA法で *M. fortuitum* と判定されており、結果に乖離が見られた。*M. mucogenicum* は古くは *M. chelonae*-likeとして知られていたが、16S rRNA遺伝子では *M. chelonae* よりも *M. fortuitum* に近い系統に位置しており¹⁵⁾、現在では *M. chelonae-abscessus* グループと *M. fortuitum* グループに近縁の迅速発育菌として独立したグループと定義されている。Ballardらは同じくATCC 49650Tと5 bp違いでなおかつATCC 49649と1 bp違いの *M. mucogenicum* N248を解析しており、新しい subspecies の可能性があると報告している¹⁶⁾。迅速発育菌は多様性に富んでおり、菌株13も *M. mucogenicum* の variant type の可能性が考えられた。

同じく迅速発育菌であった菌株5はINNO-LiPA法ではMYC genusのみ発色が見られ、DDH法で *M. fortuitum*、シーケンス解析で *M. fortuitum* DSM46621とDSM44220に100%の相同性が認められた。PadillaらはINNO-LiPA法で同じタイプのDSM46621株は *M. fortuitum* と同定されたと報告している¹²⁾。われわれの検討では同菌種のDSM44220株 (*M. fortuitum* subspecies *acetamidolyticum*) はDDH法とINNO-LiPA法で *M. fortuitum* と同定できた(データ未掲載)。*M. fortuitum* はITSシーケンス解析でsqv. I~IVが認められており高い多型性を示すため¹⁷⁾、迅速発育菌の詳細な亜型解析にはシーケンス解析が重要であると思われた。

遺伝子を用いた同定キットによる判定と併行して従来法やコロニー性状から菌種を鑑別することは非常に重要である。菌株22はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法、アキュプローブ法、DDH法で同定不能となった遅発育菌である。INNO-LiPA法ではMYC genusの反応が見られたが、シーケンス解析では *M. interjectum* と判定された。*M. interjectum* は非光発色性の遅発育菌でかつ16S rDNA配列が特異的であり、遺伝子を用いた同

定キットによる菌種同定は困難である¹⁸⁾。INNO-LiPA法においても該当プローブが固相化されていないため同菌種の同定はできず、培養でのコロニー性状の観察や生化学的性状試験が鑑別上重要になってくる。同様に菌株2と19は、3種類のプローブで *M. kansasii* の亜型を判別可能であるINNO-LiPA法でMKA-3に発色した。16S rRNA遺伝子のシーケンス解析から *M. kansasii* sqv. IIIとVIとに判定されたが研究用試薬アキュプローブ カンサシで陰性となるため *M. kansasii* と判定されなかった。日常検査では光発色試験に及んでいなかったが、改めて実施した結果 *M. kansasii* と同定できた。

コロニーの光発色試験での光発色菌、暗発色菌、非光発色菌の鑑別は純培養を用いるため可変的、主観的であり、熟練を要する。*M. szulgai* は37℃で暗発色性、25℃培養で光発色性になる。*M. simiae* の光発色性の出現は通常1時間の照射のところで6~24時間の照射が必要であり注意を要する。培養時のコロニー性状の観察において、S型、R型、その移行型(SR型、RS型)の性状が継代を重ねることで変化してくることがある。また発育速度の観察は、遅発育菌でも大量の菌を接種すれば7日ぐらいで発育は見られる場合はあるし、迅速発育菌での分離培養の時にはコロニーの発生までに時間がかかる場合もある。したがって培養条件により変化する菌の性状を十分考慮して、なるべく初代分離菌について詳細に観察することが望ましい。

INNO-LiPA法の製造元であるINNOGENETICS社の本社がベルギーに位置するため、欧米のAIDS患者から分離された *M. genavense*¹⁹⁾ や、イギリス、スコットランド、ウェールズ、スウェーデン、フランスで分離が増えている *M. malmoense*²⁰⁾ といった菌種に対する同定が可能となっている。わが国では現時点でのこれらの菌種による感染症の報告は非常にまれであるため、今後これら稀少菌種の同定の際には大きな威力を発揮すると思われる。一方、最近わが国で分離の報告が増加している遅発育菌の *M. lentiflavum*¹⁴⁾ が今回シーケンス解析により9株確認されたが、対応プローブが配置されていないINNO-LiPA法ではMYC genusにしかバンドの発色が見られず同定に至らなかった。臨床での有用性をより高めるために、わが国の抗酸菌分離状況にあわせたINNO-LiPA法の仕様改良を切望したい。

今回有用性が認められたINNO-LiPA法は手技面でもPCR増幅後約3時間で判定可能であり、迅速性が証明された。ハイブリダイゼーションから洗浄、発色までを行う自動化ハイブリダイゼーション装置Auto-LiPAを利用すれば労力の軽減が可能であると思われる。またINNO-LiPA法はストリップ上に得られるバンドの有無で判定するため、DDH法のような読み取り時の測定誤差は少

なくなると考えられる。複数菌混合培養における複数菌種同定も可能であることから、単一分離培養に要する時間や手間が省かれ、迅速に同定結果が得られることが明らかとなった。

抗酸菌における遺伝子検査の進歩は特に目覚ましく、今回用いた検査法も含めて多様な検査キットが市販されている。各種キットの特徴を熟知したうえでそれぞれの施設に適した検査法を選択し、各キット間に生じる結果の乖離や同定不能な株が存在する場合を考慮して菌種同定を行うことが望まれる。またこれらキットは定性用検査であり、検体内の菌量を反映できないため、塗抹・培養検査の結果と同定結果とを鑑みて治療方針を決定することが重要である。特にNTMを分離した場合には非結核性抗酸菌症の診断基準²¹⁾²²⁾と合わせて総合的に判断するべきである。

文 献

- 1) Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al.: Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and Roche PCR-microwell plate hybridization method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for direct detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 130-133.
- 2) Abe C, Hirano K, Wada M, et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 3270-3274.
- 3) Wobeser WL, Krajden M, Conly J, et al.: Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 134-139.
- 4) 前倉亮治, 横田総一郎, 小倉 剛: 抗酸菌感染症診断の進歩. *分子呼吸病.* 1998; 2: 346-352.
- 5) Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, et al.: Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2476-2478.
- 6) Reischer BS, Gatson AM, Woods GL: Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 2995-2998.
- 7) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al.: Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 1596-1603.
- 8) 山崎利雄, 高橋 宏, 中村玲子: マイクロプレートハイブリダイゼーション法による抗酸菌同定法の検討. *結核.* 1993; 68: 5-11.
- 9) 齊藤 宏, 長友雅彦, 中島雅信, 他: DNA-DNA Hybridizationを原理とする「DDHマイコバクテリア「極東」」を用いた抗酸菌同定とその同定精度の検討. *JARMAM.* 1994; 6: 23-28.
- 10) Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G: Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4418-4420.
- 11) Miller N, Infante S, Cleary T: Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1915-1919.
- 12) Padilla E, González V, Manterola JM, et al.: Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and GenoType Mycobacterium assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 3083-3088.
- 13) Lebrun L, Weill FX, Lafendi L, et al.: Use of the INNO-LiPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*-*Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2567-2574.
- 14) 岩本朋忠, 中永和枝, 石井則久, 他: *Mycobacterium lentiflavum* の菌種内塩基配列変異に関する研究. *結核.* 2008; 83: 417-422.
- 15) Springer B, Böttger EC, Kirschner P, et al.: Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45: 262-267.
- 16) Ballard J, Turenne CY, Wolfe JN, et al.: Molecular characterization of nontuberculous mycobacteria isolated from human cases of disseminated disease in the USA, Thailand, Malawi, and Tanzania. *J Gen Appl Microbiol.* 2007; 53: 153-157.
- 17) Richter E, Niemann S, Rüsche-Gerdes S, et al.: Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (Accu Probe) and molecular techniques. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 964-970.
- 18) Tortoli E: Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16: 319-354.
- 19) Bogdan C, Kern P, Richter E, et al.: Systemic infection with *Mycobacterium genavense* following immunosuppressive therapy in a patient who was seronegative for human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 1997; 24: 1245-1247.
- 20) The Research Committee of the British Thoracic Society: Pulmonary disease caused by *M. malmoense* in HIV negative patients: 5-yr follow-up of patients receiving standardised treatment. *Eur Respir J.* 2003; 21: 478-482.
- 21) Griffith DE, Aksmit T, Brown-Elliott BA, et al., on behalf of the ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee: An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 367-416.
- 22) 日本結核病学会非結核性抗酸菌症対策委員会, 日本呼吸器学会感染症・結核学術部会: 肺非結核性抗酸菌症診断に関する指針—2008年. *結核.* 2008; 83: 525-526.

Original Article

EVALUATION OF THE INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2
FOR MYCOBACTERIAL IDENTIFICATION

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ⁴Tomotada IWAMOTO,
²Motohisa TOMITA, ¹Masaji OKADA, and ³Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] Evaluation of the INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (the INNO-LiPA assay) for mycobacterial identification.

[Materials and Methods] The laboratory identifications consisting of Cobas Amplicor systems, AccuProbe, and DDH, are commonly used to identify mycobacterial isolates in Japan. We compared the results between the INNO-LiPA assay and the common methods. A total of 122 clinical isolates from NHO Kinki-chuo Chest Medical Center from 1 February to 30 June 2006 were tested.

[Results] There was agreement between the INNO-LiPA assay and the common methods for 112 mycobacterium isolates. The six discordant isolates have showed same results between sequencings and the INNO-LiPA assay. The one *M. fortuitum* isolates was indicated correctness by DDH and the one *M. intracellulare* isolates was recognized by Cobas Amplicor systems and as MAC by AccuProbe MAC. Moreover, discrepant results between sequencings and mycobacterial identifications including the INNO-LiPA assay

were 2 isolates (*M. paraffinicum*, *M. mucogenicum* variant type).

[Conclusion] The INNO-LiPA assay could provide rapid and correct identification results with clear-cut and easy interpretation.

Key words: Mycobacteria, INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2, Identification, 16S rRNA gene, ITS sequencing

¹Clinical Research Center, ²Department of Clinical Laboratory, ³Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization (NHO) Kinki-chuo Chest Medical Center, ⁴Kobe Institute of Health

Correspondence to: Shiomi Yoshida: Clinical Research Center, NHO Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan.
(E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)

罹患構造の変化に対応した結核の患者発見・予防対策の提案

研究分担者

阿彦 忠之 山形県衛生研究所長

研究要旨

将来の結核低蔓延状況を想定した効果的な患者発見方策等の提案をめざして、国内の低蔓延地域（山形県）をモデルとして、2007～09年新登録肺結核患者の詳細な分析を行った。低蔓延地域では、80歳以上の高齢者及び結核発病の高危険因子を有する者へ結核の偏在化が顕著であり、慢性疾患等で受療中または介護保険施設等に入所中の高齢者については、かかりつけ医療機関や施設等での定期的及び有症時の胸部X線検査（過去のX線写真との比較読影）が、より効果的な患者発見方策となりうる。一般病院や介護保険施設等に入院・入所中に結核と診断された高齢患者については、結核病床を有する指定医療機関に転院するよりも、診断時の病院・施設で合併症を含めた治療やケア等を継続したほうがよい事例が多くなっており、結核患者の入院治療を結核病床以外でも可能とするような関係法令の見直しが必要である。結核低蔓延に向けて充実強化が求められる接触者健康診断については、その技術指針（手引き）の改訂版として2008年に「第3版」、2010年に「第4版」を作成し公表した。

A. 研究目的

わが国の結核罹患率（人口10万対）は2007年に初めて20を下回り、2009年には19.0まで低下した。

その一方で、患者数の減少に伴って結核に対する国民（特に医療従事者）の関心は低下しており、患者発見の遅れを原因とする結核の集団感染や院内・施設内感染等の増加が懸念されている。このように罹患構造が変化する過渡期は非常に難しい時期であり、将来の低蔓延状況下における対策面の課題を予測し、その後の根絶（elimination）をも視野に入れた効果的な対策を提案し準備する必要がある。

しかしながら、わが国の結核が低蔓延状況となった場合の疫学的特徴等の推定に関する研究成果は乏しい。そこで本研究では、国内で既に低蔓延国の水準に近似する罹患率となった山形県（2007～09年罹患率=11.9～

12.3）をモデル地域として、低蔓延下での結核の疫学的特徴や患者の発見方法等に関する課題を明らかにすること、及び今後の効果的な対策を具体的に提案することを目的として調査を実施した。

また、結核の低蔓延化が進めば進むほど、定期健康診断（特定の人口集団等に広く実施）の患者発見効率は低下するが、結核発病の最も身近なハイリスク者である「患者の接触者」の健康診断（以下、接触者健診）の意義はますます高まると推定される。そこで本研究では、接触者健診の技術指針として全国的に活用されている「感染症法に基づく接触者健診の手引き（2007年7月：第2版）」について、最近の研究成果や全国の保健所等からの意見等を踏まえて改訂を重ねることとし、そのための検討を行った。

B. 研究方法

1. 山形県の新登録結核患者の調査

本研究は、山形県における2007年から2009年までの3年間の菌陽性肺結核新登録患者全員を対象とした。ただし、「菌陽性肺結核」とは、次のア、イの両方を満たす場合とした。

- ア. 診断名が「肺結核」の者。この場合、肺結核と肺外結核の合併例も含めた。厚生労働省の結核登録者情報調査（結核サーベイランス）では、粟粒結核は肺病変を伴う場合でも肺外結核のみに分類されているが、本研究では、明らかな肺病変（喀痰等から結核菌検出）を伴う粟粒結核については「肺結核」に含めることとした。
- イ. 患者の喀痰、胃液、気管支洗浄液、その他の検体の検査によって結核菌群陽性であることが確認された者

調査項目は、対象患者の発病の背景因子（結核発病の高危険因子の有無、感染経路等を含む）、発見方法（診断までの経緯）、及び発見の遅れの要因などである。これらの中には、国の結核登録者情報調査では把握されていない項目が数多く含まれており、県内4保健所の全面的な協力を得て実施した。

ただし、本研究では患者情報を用いたため、山形県個人情報保護条例に基づく利用制限の適用除外規定に該当し、かつ、「疫学研究に関する倫理指針」の対象外となる方法で実施する必要があるため、山形県庁の結核対策主管課（健康福祉部保健薬務課）と協議し、以下の方法で調査した。

- 1) 法律（感染症法第53条の12）に基づき各保健所が作成した結核患者の「登録票」の情報を用いた。
- 2) 解析のためのデータベースの作成にあたっては、登録票情報の中から患者の個人識別情報（氏名、住所等）を削除したうえで電子化した。
- 3) 本研究は、感染症法第3条で地方公共団体の責務として規定された「感染症に関する情報の収集、整理、分析及び提供」に関連する研究と位置づけた。また、感

染症法第10条に基づく予防計画の一つである「山形県結核予防計画」の中に、県は「保健所と連携を図りつつ、計画的に調査及び研究の推進に取り組む」と明記されていることを受けて、各保健所の協力のもとに本研究分担者が県の結核担当職員を代表して調査研究を実施するという形態をとった。

調査結果の分析にあたっては、過年度の研究として本研究分担者が山形県の2005年と2006年の新登録患者を対象に調査した結果との比較を行った。また、「結核発病の背景因子」については、山形県の2002年から2004年まで3年間の新登録患者を対象に実施した同様の調査結果との比較も行った。

さらに、2009年新登録患者については、保健所が感染症法第15条に基づく調査の一環として（可能な限り）結核菌の譲渡を受け、山形県衛生研究所に依頼して分子疫学調査（VNTR分析）を実施したので、その有用性などの検討を行った。

2. 接触者健診の技術的事項に関する検討

接触者健診の「手引き」の内容に関する質問や修正意見を収集するため、「第2版」に対する修正意見については2008年に、「第3版」に対する修正意見については2009年に、各都道府県・政令市・特別区の感染症担当課、及び全国の保健所（全国保健所長会の協力による）から意見募集を行った。

全国から寄せられた修正意見等の情報をもとに、研究分担者及び結核対策に精通する研究者、臨床医並びに公衆衛生医師等の研究協力者を構成員としてワークショップを開催し、手引きの改訂版（第3版、第4版）の作成に向けた検討を行った。

C. 結果

1. 山形県の新登録結核患者の調査

(1) 患者の基本属性（性・年齢・菌所見）

2007年から2009年までの3年間の菌陽性肺結核新登録患者は、県全体で298人であっ

た。性別にみると、2005～06年に比べて、女性患者の割合がやや高くなっていた（表1）。

患者の年齢構成をみると（表2）、2007～09年は70歳以上の高齢患者の割合が68.1%（男66.7%、女70.6%）を占めていた。とりわけ80歳以上の超高齢患者が多く、全体の41.9%（男34.4%、女55.0%）に達していた。2005～06年と比較すると、70歳以上の割合は同程度で推移し、40～69歳の年齢層の患者割合が低下していたのに対して、39歳以下の若年層の患者割合が上昇していた。

表1 性別・年次別対象者数
（山形県：菌陽性肺結核新登録患者）

性別	2005～06年	2007～09年
男	163 (69.1)	189 (63.4)
女	73 (30.9)	109 (36.6)
全体	236 (100%)	298 (100%)

表2 菌陽性肺結核患者の年齢分布

	2005～06年	2007～09年
29歳以下	10 (4.2)	22 (7.4)
30～39歳	11 (4.7)	21 (7.0)
40～49歳	12 (5.1)	12 (4.0)
50～59歳	17 (7.2)	20 (6.7)
60～69歳	25 (10.6)	20 (6.7)
70～79歳	57 (24.2)	78 (26.2)
80歳以上	104 (44.1)	125 (41.9)
全体	236 (100%)	298 (100%)

表3 菌陽性肺結核患者の菌所見

菌所見	2005～06年	2007～09年
喀痰塗抹(+)	130 (55.1)	166 (55.7)
喀痰塗抹(-) 培養(+)	77 (32.6)	103 (34.6)
その他菌陽性	29 (12.3)	29 (9.7)
全体	236 (100%)	298 (100%)

患者の菌所見をみると（表3）、全体では「喀痰塗抹陽性」が55.7%、「喀痰塗抹陰性・培養陽性」が34.6%、「その他菌陽性（気管支鏡検査検体等から結核菌群を検出）」が9.7%であった。菌所見については2005～06年の患者とほぼ同様であった。

(2) 発見方法及び発見の遅れ

結核患者の発見方法（発見契機）をみると、2007～09年の患者全体では有症状医療機関受診が55.4%、各種健診（定期、接触者、個別）が17.4%であった（表4）。2005～06年との比較では、発見方法が「その他」、すなわち各種健診でも有症状医療機関受診でもない事例の割合が高まり、全体の27.2%を占めていた。これらは、咳、喀痰、発熱等の症状を主訴に医療機関受診により結核が発見されたのではなく、他の傷病や合併症等の診療（通院、入院）の経過の中で、肺結核が（一部は偶然に）発見された事例である。

年齢階級別には大きな差異があり、各種健診による発見割合は、年齢が若いほど高い傾向がみられ、39歳以下の44.2%に対して、80歳以上では7.2%を占めるに過ぎなかった。一方、60歳以上では年齢が上がるにつれて「その他」の発見方法の割合が高まり、80歳以上では36.8%に及んでいた（図1）。

表4 結核患者の発見方法（発見契機）
（山形県：菌陽性肺結核患者）

	2005-06年	2007-09年
各種健診	50 (21.2)	52 (17.4)
有症状 医療機関受診	142 (60.2)	165 (55.4)
その他	44 (18.6)	81 (27.2)
合計	236 (100%)	298 (100%)

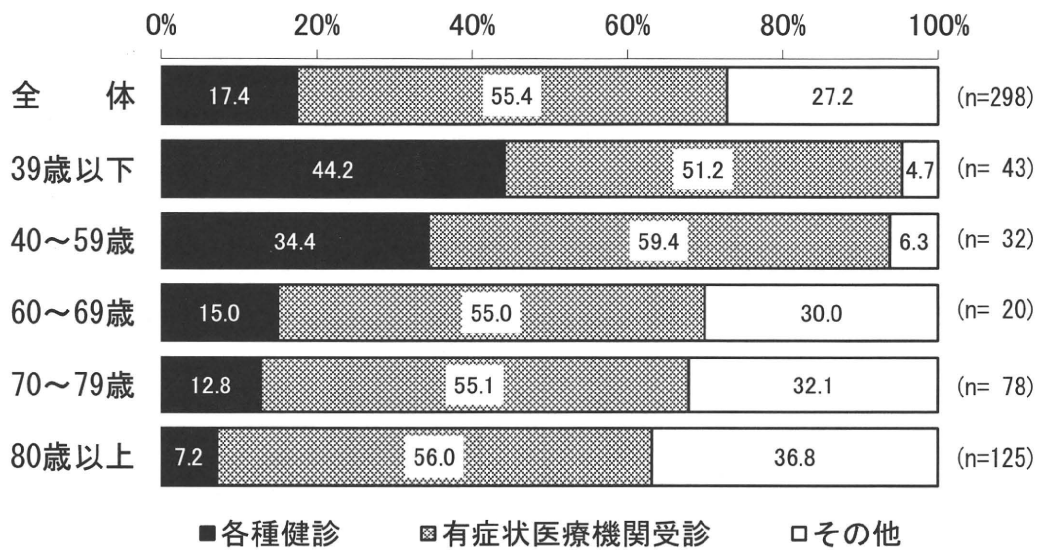


図1 菌陽性肺結核患者の発見方法（発見契機）
（山形県：2007～2009年）

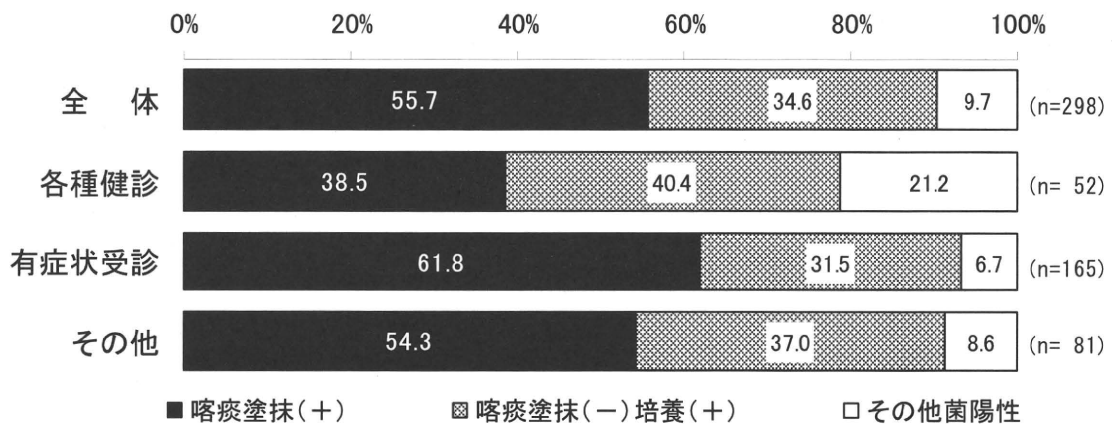


図2 発見方法別にみた肺結核患者の菌所見（山形県：2007～2009年）

各種健診による発見例（2007～09年＝52人）の健診内訳をみると（表5）、定期健診が全体の4分の3、接触者健診が4分の1を占めていた。定期健診の中では、事業所（職場）の健診による発見例が最も多かった。

発見方法別の菌所見をみると（図2）、有症状受診発見例では喀痰塗抹陽性が61.8%を占めたのに対して、各種健診発見例では喀痰塗抹陽性（38.5%）よりも塗抹陰性・培養陽性（40.4%）の方が多かった。

	2005～06年	2007～09年
定期(市町村)	11	13
定期(事業所)	14	17
定期(施設等)	4	—
個別健診	11	9
接触者健診	10	13
合計	50	52

表5 各種健診発見例の健診種類（内訳）
有症状医療機関受診を契機に結核が発見された者について、患者発見の遅れを分析した結果、いわゆる“Total Delay”（症状出現から結核診断までの期間）は若い年齢層で遅れが大きい傾向がみられ（図3）、59歳以下では「3ヶ月以上」が43.9%に及んでいた。これを「受診の遅れ」（症状出現から医療機関初診までの期間）及び「診断の遅れ」（初診から結核診断までの期間）に分けて解析すると、59歳以下では「受診の遅れ」の大きいことが“Total delay”を大きくしている要因と推定された（図4）。これに対して「診断の遅れ」については、59歳以下の場合、2

週間以内の早期診断例の割合が46.3%と高い一方で、2ヶ月以上かかった事例の割合も26.8%と高かった（図5）。

肺結核患者の菌所見別に「診断の遅れ」を分析した結果（図6）、喀痰塗抹陽性例では、初診から2週間以内に診断された者の割合が、喀痰塗抹陰性・培養陽性例（培養のみ陽性例）に比べて明らかに高かった。培養のみ陽性例は、肺結核の病状自体は軽症の場合が多いものの、培養結果判明までの期間等も影響して、「診断の遅れ1ヶ月以上」の者が約半数に及んでいた。

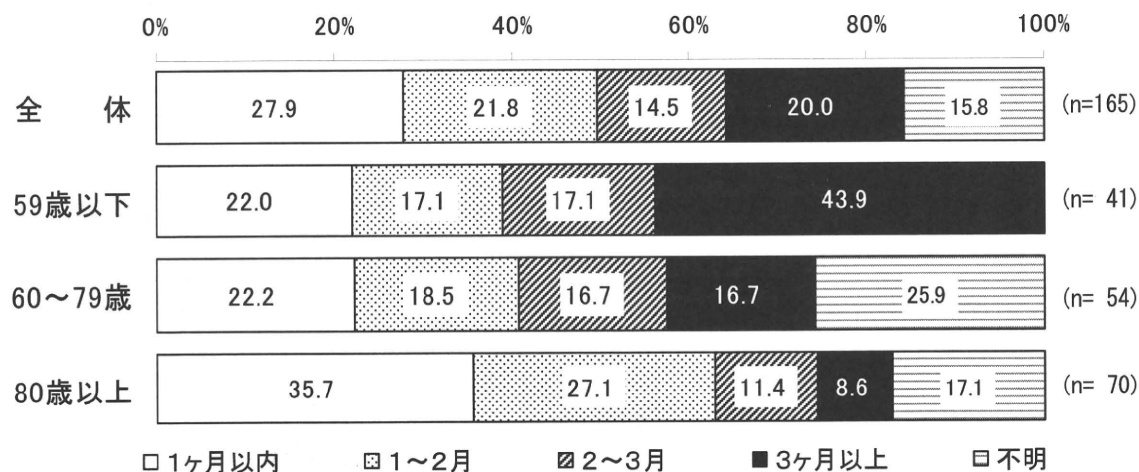


図3 肺結核患者の「発見の遅れ」（年齢階級別の Total Delay）
（分析対象＝有症状医療機関受診による発見例：山形県 2007～2009年）

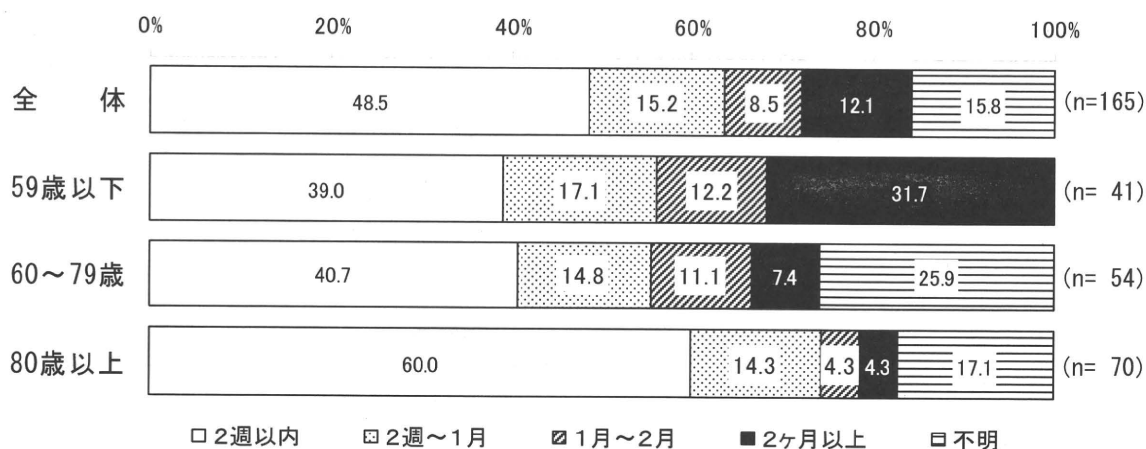


図4 肺結核患者の「受診の遅れ」(年齢階級別の Patient's Delay)
(分析対象=有症状医療機関受診による発見例: 山形県 2007~2009年)

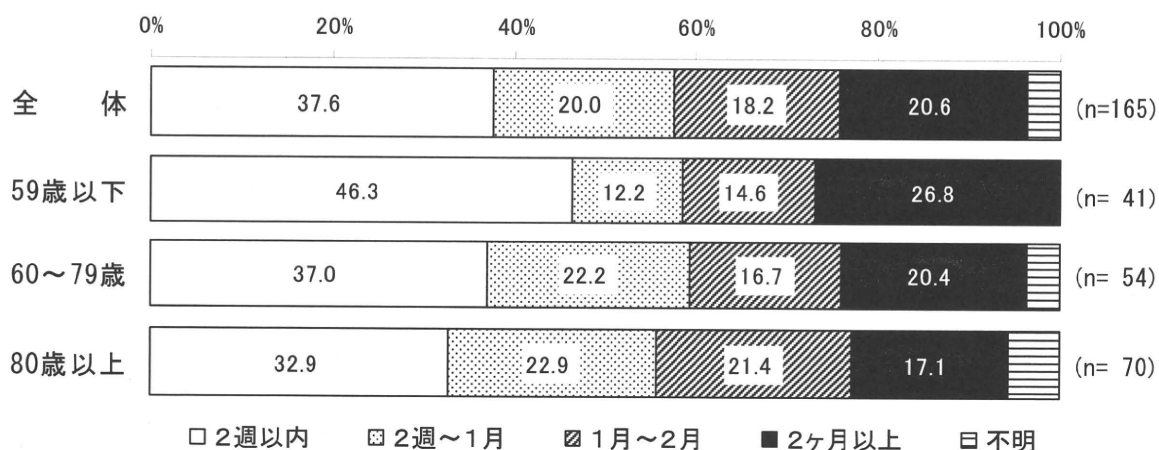


図5 肺結核患者の「診断の遅れ」(年齢階級別の Doctor's Delay)
(分析対象=有症状医療機関受診による発見例: 山形県 2007~2009年)

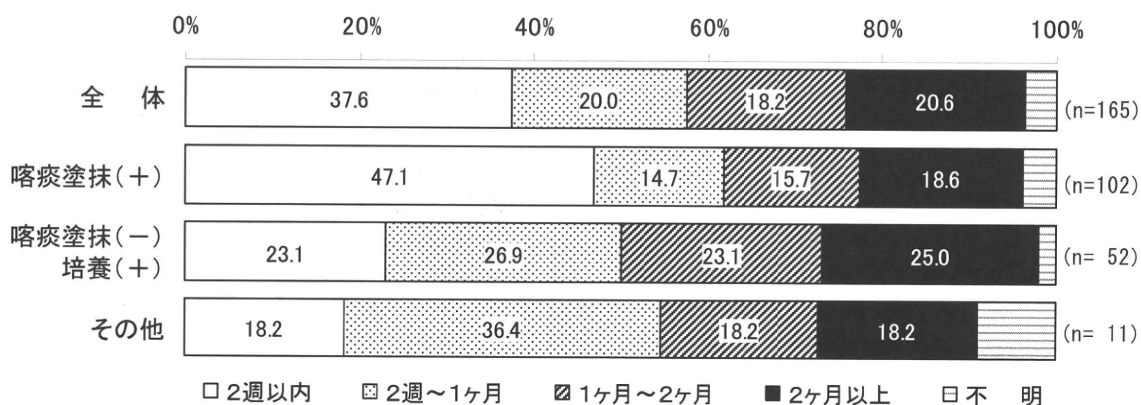
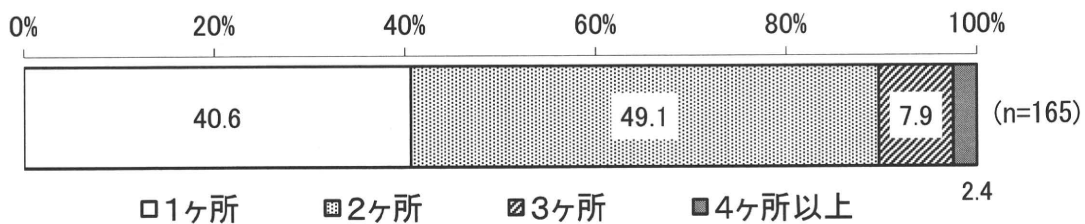


図6 肺結核患者の菌所見別に見た「診断の遅れ」(Doctor's Delay)

(分析対象＝有症状医療機関受診による発見例：山形県 2007～2009年)



(分析対象＝有症状医療機関受診による発見例：山形県 2007～2009年)

図7 肺結核と診断されるまでに受診した医療機関数
(何ヶ所目の医療機関で肺結核と診断されたか?)

「診断の遅れ」に関連して、有症状医療機関受診により発見された結核患者については、「症状出現後、結核と診断されるまでに医療機関を何ヶ所受診していたか？」についても、患者登録票に記載された保健師の訪問面接記録等をもとに分析した。その結果、咳等の症状出現後最初に受診した医療機関で結核と診断された者は全体の40.6%にとどまり(図7)、医療機関を3ヶ所以上受診して初めて結核と診断された者の割合が10.3%に上った。

(3) 病院・施設に入院・入所中又は介護保険サービス利用中の結核診断例

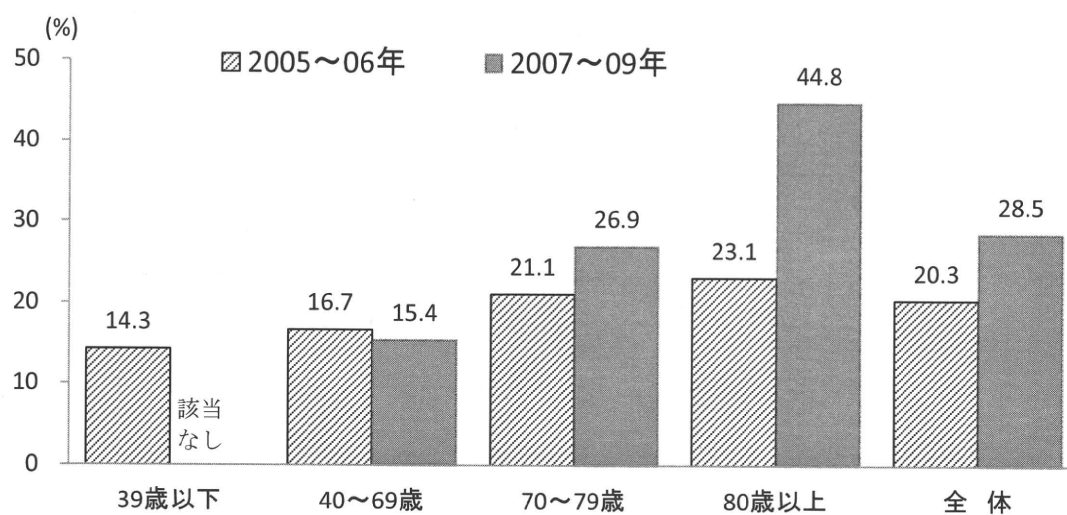
結核の院内・施設内感染対策や介護保険サービス現場での結核対策の重要性を検討する観点から、各患者が結核と診断される前の入院・入所状況や介護保険サービスの利用状況について分析した。その結果、結核を疑って検査を実施する前から病院や介護保険施設(例：介護老人福祉施設、介護老人保健施設)などに入院・入所中だった者が、2007～09年は全体の28.5%を占め、2005～06年に比べて高率であった(図8)。特に80歳以上では、入院・入所中の結核診断例の割合が最

近になって明らかに高まっており、2007～09年は44.8%に達していた。

介護保険サービス(例：入所サービス、訪問介護、ショートステイ、デイサービス)を利用中に結核が発症し診断された者は、2007～09年の患者全体の21.1%を占めていた(図9)。この割合は高齢者ほど高く、80歳以上の患者の36.8%は介護保険サービス利用中の結核診断例であった。この割合は、2005～06年とほぼ同様であった。

介護保険施設の中でも医師が常勤し、医療法上の医療提供施設として規定されている「介護老人保健施設」では、入所中に咳や発熱等の症状が出現し、施設内で医師が診察・治療を行った経過があり、症状悪化等を理由に病院に紹介あるいは救急入院して結核と診断された事例が、2008年だけでも5例認められた。この5例の結核診断までの経緯について「表6」に整理した。

また、菌陽性肺結核患者のうち、他疾患等で一般病院(結核病床なし)や施設等に入院・入所中に結核が発見された事例の中から8例を抜粋し、「表6」に各患者の結核診断までの経緯を整理した。



※注) 結核を疑って検査を実施する前から病院や介護保険施設等に入院・入所中であり、かつ、入院・入所中に結核と診断された者の割合

図8 病院・施設等に入院・入所中の結核診断例の割合