

のART開始時期についてはCD4数に応じて推奨されているが、新たな海外臨床試験の結果によりガイドラインはアップデートされるだろう。

謝 辞

シンポジウム演者にご推薦いただきました日本エイズ学会関係者の方々、ならびに口演に関して資料をご提供いただきました国立国際医療研究センター病院エイズ治療・研究開発センター 千葉明生先生（現：東京慈恵会医科大学感染制御科）、照屋勝治先生、がん感染症センター都立駒込病院感染症科 味澤篤先生、村松崇先生（現：東京医大臨床検査医学）、（公財）結核予防会結核研究所 村上邦仁子先生、山田紀男先生、加藤誠也先生に深謝致します。

文 献

- 1) 厚生労働省エイズ動向委員会：2011年エイズ発生動向年報（2011年5月）. 2011.
- 2) Horsburgh CR Jr, Rubin EJ : Latent Tuberculosis Infection

in the United States. N Engl J Med. 2011 ; 364 : 1441-8.

- 3) 村上邦仁子, 山田紀男, 佐々木結花, 他：全国HIV合併結核症例の検討—全国HIV感染合併結核症アンケート調査報告. 日本エイズ学会誌. 2009 ; 11 : 503.
- 4) 村松 崇, 藤田 明, 柳澤如樹, 他：HAART時代のHIV合併結核に関する検討. 日本エイズ学会誌. 2009 ; 11 : 502.
- 5) 千葉明生, 田沼順子, 橋本重希, 他：当センターのHIV感染者における結核症例の検討. 日本エイズ学会誌. 2010 ; 12 : 355.
- 6) DHHS Panel on antiretroviral guidelines for adults and adolescents—A working group of the office of AIDS Research Advisory Council (OARAC) guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. 2011, 116-120.
- 7) Abdool Karim SS, Naidoo K, Grobler A, et al.: Timing of initiation of antiretroviral drugs during tuberculosis therapy: N Engl J Med. 2010 ; 362 : 697-706.
- 8) 藤田 明：HIV感染者からの結核発病予防について. 第84回総会ミニシンポジウム「ハイリスク者の結核発病予防」. 結核. 2010 ; 85 : 54-57.

3. 透析患者における結核の現状と問題点

武蔵野赤十字病院腎臓内科 安藤 亮一

透析患者では、感染症が20.8%と死亡原因の第2位で、近年横ばいである心不全に比べて増加傾向であり、新たに透析を開始した患者の死亡原因としては、感染症は26.4%で第1位である¹⁾。その要因としては、透析患者にもなう免疫能低下、高齢化、糖尿病が原因疾患として多いことなどがあげられる。

なかでも、結核感染については、透析患者は一般人と比べて、報告により差があるが、約2倍～25倍感染のリスクが高いとされる^{2)~5)}。透析患者では、細胞性免疫能が低下しており、初感染より長期間経過後、結核菌が再び活動し発病する内因性感染による肺外結核が全結核の約半数を占めるほど多いこと、免疫能が低下しているため血行性伝播による粟粒結核が多いこと、透析導入1年以内の発症が多いこと、高齢者が多いことなどが特徴である⁵⁾。

また、透析患者の結核診断は、培養検査で陽性にできることが少ないことや、免疫能の低下によりツベルクリン反応の陽性率が低いことなどによりしばしば困難である⁶⁾。最近、BCGの影響を受けないQuantiferON TB-2G (QFT) の結核診断における有用性が注目されている⁷⁾。これは免疫反応を利用した結核の補助診断であるが、免疫能が低下した透析患者でも有用性が報告されている。

Inoueら⁸⁾は、透析患者162例にQFTを施行し、感度100%、特異度89.7%と良好な成績を報告している (Table 1)。

透析施設での結核蔓延の報告は少ないが、2003年アメリカ、ネバダ州で、技工が3カ月間肺結核で、透析スタッフの19%、透析患者の15%でツベルクリン試験が陽性であったと報告され、閉鎖した空間で長期間免疫能の低下した患者が大勢いる透析施設は、結核蔓延のリスクが高いことが示されている⁹⁾。

また、透析患者の結核の予後について、佐々木ら⁵⁾は、肺結核32例中結核死が9.4%、他の原因の死亡が9.4%で、結核菌陽性患者の死亡が30%と高く、肺外結核36例では、結核死が5.6%、他の原因による死亡が13.9%で、特に結核性胸膜炎の結核死が16.7%と高いことを報告している。

Table 1 Results of QFT in hemodialysis patients

	Active TB	Non-TB	Previous TB	Total
Positive QFT	8	10	10	28
Negative QFT	0	87	8	95
Indeterminate	0	34	5	39
Total	8	131	23	162

(sensitivity 100% ; specificity 89.7%)

Inoue T, et al: Nephrol Dial Transpl, 2009.

Table 4 Comparison of specificity between T-SPOT.TB and QFT-3G

		T-SPOT.TB ²			
		Positive	Border	Negative	Total
QFT-3G ¹	Positive	1	0	0	1
	Border	0	0	14	14
	Negative	0	0	96	96
	Total	1	0	110	111

Cut-off:

1. 0.1 IU/ml below: negative, From 0.1 IU/ml to 0.35 IU/ml: border
More than 0.35 IU/ml: positive

2. Less than 4 SFC: negative, 5-7 SFC: border, More than 8 SFC: positive

はQFT検査が不得意とする集団においても診断性能は優れていることが知られていることから、承認されれば結核感染診断がより一層充実するものと考えられる。しかし、一方ではIGRAs検査はツ反と比べると歴史は浅く、その診断特性が十分把握されていない面も多々あると思われる。IGRAsは潜在性結核感染者の診断に威力を発揮するが、感染から陽性になるまでの期間、あるいは年齢や治療が及ぼす影響、免疫抑制者における反応性、乳幼児での反応性等、明確にすべき検討課題も多く残されている。特に、結核感染した個人の免疫応答の強弱により判定が変動する可能性も考えられているが、この点についての解析はほとんどされていないのが現状である。また、QFT-3G検査は採血の時から採血量や採血管の振り方、あるいは採血検体の保管温度等、注意すべきことが多々あるため、採血現場においては決してユーザーフレンドリーな検査法とは言えず、さらなる改善が期待される。

おわりに

IGRAs検査は、今や日本の結核対策にとって必須の診断法として位置付けられているため、正確な検査結果を得られるように利用者側もまた販売会社側もより一層努力する必要があると思われる。また、検査特性の不明な点についても今後さらなる研究の進展が待たれる。

2. HIV感染者やステロイド服用患者等の免疫脆弱宿主においてIGRAs (Interferon- γ Release Assays) をどのように利用するか?

東京都立多摩総合医療センター呼吸器科 藤田 明

はじめに

HIV感染者、人工透析患者、ステロイド等免疫抑制薬服用患者など結核発病のハイリスク患者から発病を防ぐためには、早い時点で結核感染を診断し、潜在性結核感染症 (LTBI) を治療することが有効と考えられる。とく

文 献

- 1) 財団法人結核予防会：改正感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引きとその解説。平成22年改訂版。2010。
- 2) 日本結核病学会予防委員会：医療施設内結核感染対策について。結核。2010；85：477-481。
- 3) Pai M, Zwerling A, Menzies D: Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*. 2008；149：177-184。
- 4) Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A: Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest*. 2010；137：952-968。
- 5) Lange C, Mori T: Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology*. 2010；15：220-240。
- 6) Harada N, Higuchi K, Yoshiyama T, et al.: Comparison of two whole blood interferon- γ assays in tuberculosis patients and healthy controls. *J Infection*. 2008；56：348-353。
- 7) 日本ビーシージー株式会社ホームページ：http://www.bcg.gr.jp/qftgold/index.html
- 8) Schablon A, Harling M, Diel R, et al.: Serial testing with an interferon- γ release assay in German healthcare workers. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*. 2010；5：pii：Doc05。
- 9) Higuchi K, Kawabe Y, Mitarai S, et al.: Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol*. 2009；198：33-37。

に、HIV感染者に対しては、WHOは3つの 'I's戦略の一つとして Isoniazid preventive therapy を提唱している。しかし、免疫脆弱宿主ではLTBI診断のツールである Interferon- γ release assays (IGRAs) は、細胞性免疫機能低下のためにその反応が低下する恐れがある。すなわち、結核菌に感染していても偽陰性や判定不能となる可能性

がある。

免疫脆弱宿主でも結核診断におけるクオンティフェロン (QFT) の有用性は免疫適格宿主と同様であるとする報告があるが⁷⁾、免疫脆弱宿主における研究でも免疫適格宿主も含めた検討でも末梢血リンパ球数減少例では感度が低下すると報告されている²⁾³⁾。また、QFTの測定原理からも細胞性免疫機能はQFTの結果に影響を及ぼすと考えられる。しかし、QFTの診断性能を免疫脆弱宿主の疾患単位や病態との関連から検討した報告は少ない。

研究 1

IGRAs適用に関する米国CDCガイドライン (2010) においては、免疫脆弱宿主におけるデータはまだ限定的と記載されているが、HIV感染者の日和見感染予防治療に関する米国ガイドラインでは、LTBIの診断のためにIGRAsまたはツベルクリン検査を実施することと記載している⁹⁾。

演者らは、HIV感染者107例 (うち結核治療開始前の活動性結核患者は9例) を対象にクオンティフェロン® TB-2G (以下QFT-2G) 検査の診断性能を、とくにCD4陽性リンパ球数 (CD4⁺) に注目して検討した。

詳細は演者らが発表した論文⁵⁾を参照されたいが、CD4⁺50/μL以上の群では結核患者6例中5例でQFT-2G陽性 (ESAT-6またはCFP-10が0.35 IU/mL以上) で感度は83%、特異度99%であった。CD4⁺50未満の群では判定不能例が50/μL以上の群と比較して有意に多かった (p<0.0001)。また、CD4⁺が500未満では陽性コントロールに対するインターフェロンγの反応性はCD4⁺が少ないほどより低下していた (p=0.0001)。HIV感染者においてCD4⁺が50以上ならばQFTの感度・特異度は高いといえるが、それでもHIV感染者においてはインターフェロンγの反応性が低下する点には留意すべきであろう。

なお、活動性結核を合併したHIV感染者におけるQFT-2Gの結果については演者らの報告を含めて国内でこれまで3本の報告 (Table)^{6)~7)}があり、陽性率は56~77%である。

研究 2

2010年にQFT-2Gから移行したクオンティフェロン® TBゴールド (以下QFT-3G) による結核発病患者の診断感度はQFT-2Gの83.0%と比較して92.6%と高いことが報告されている⁸⁾。

研究2では、免疫脆弱宿主を対象にQFT-3Gによる結核の潜在性結核感染症 (LTBI) 発見の可能性について検討するために、臨床的には活動性結核と診断されていない患者に対してQFT-3G検査を行った。ただし、LTBI確定のgold standardはないこと、QFT-3G検査後の観察

Table Results of QuantiFERON®-TB Gold (QFT-2G) among active TB patients with HIV infection in Japan

Study	National survey ⁶⁾ n=19	Fujita ⁵⁾ n=9	Nagai ⁷⁾ n=13
Number of pts.			
Interpretation			
Negative	37%	22%	0%
Doubtful positive	5	11	15
Positive	63	56	77
Indeterminate	5	11	8
CD4 ⁺ <50 of total cases	NA	23	38

NA: not available

期間が現時点で短いという限定された検討である。

(1) 方法

対象はHIV感染者42例 (男/女: 34例/8例, 平均年齢48±15歳, CD4数の分布は6~1131/μL), 透析患者15例 (男/女: 13例/2例, 平均年齢67±10歳), ステロイド等免疫抑制療法患者27例 (男/女: 9例/18例, 平均年齢61±15歳) の3グループである, 結果は添付文書に従い陽性, 判定保留, 陰性, 判定不可と分類した。

(2) 結果

①HIV感染者: 臨床的には活動性結核と診断されていない患者42例ではQFT-3G検査の結果, 陽性例は2例 (5%), 判定保留 (疑陽性) 例は2例 (5%), 判定不可は2例 (5%) であった。陽性あるいは判定保留の4例うち3例は過去のQFT検査 (QFT-2G) は陰性であった。なお, 肺結核またはLTBIの治療歴を有する例が3例含まれていたが, QFT-3Gはすべて陰性であった。結核発病3例において, QFT-3Gは陽性であった。

②透析患者: 臨床的には活動性結核と診断されていない患者15例にQFT-3G検査を行った結果, 陽性例は3例 (20%), 判定保留 (疑陽性) 例は3例 (20%), 判定不可は0例であった。結核発病3例において, 2例はQFT-3G陽性, 1例は判定保留 (疑陽性) であった。

③免疫抑制療法患者: 疾患別では関節リウマチが最も多く12例 (44%) で, ステロイドは25例 (93%) に投与, 11例 (41%) にメソトレキセートを, 11例 (41%) にその他の免疫抑制剤が投与されていた。

臨床的には活動性結核と診断されていない患者27例にQFT-3G検査を行った結果, 陽性例は2例 (7%), 判定保留 (疑陽性) 例は2例 (7%), 判定不可は4例 (15%) であった。結核発病2例において, 1例はQFT-3G陽性, 1例は判定保留 (疑陽性) であった。

末梢血リンパ球数が500未満では陽性コントロール値もかなり低下していたが (Fig.), リンパ球数と陽性コントロール値が必ずしも相関しない例が存在した。

(3) 考察

①HIV感染者: 今回のQFT-3G検査では, 演者らが

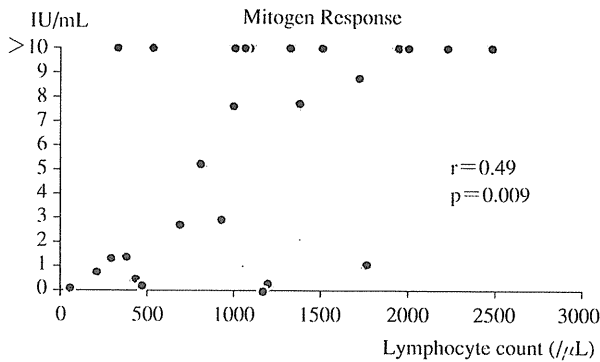


Fig. Relationship between lymphocyte count and mitogen response using QFT-GIT (QFT-3G) in patients on immunosuppressive therapy (n=27)

QFT-2Gを用いて検討した結果と比較して結核非発病例における陽性率が高いようであったが、QFT-3G検査の検討例数は少なく、この2つの検討におけるCD4⁺<50の例の割合に差があるため、さらに多数例による検討が必要である。

②透析患者：このグループでは高齢者が比較的多く、QFT-3G陽性例の中には過去の既感染者も含まれる可能性があるが、LTBI治療を推奨する方向性からは、陽性であれば年齢の影響のみと解釈せずにLTBI治療について検討したほうがよいかもしれない。QFT-2Gによる検討は非上らが活動性結核を含む131例中で24.1%が判定不能、非結核例（既往なし）でも10例が陽性であると報告しており⁹⁾、透析患者の中にはLTBIが少なからず存在する可能性がある。

③免疫抑制療法患者：関節リウマチにおけるQFT-2GによるLTBI診断に関しては、坂野が結核既治療患者の結果から陽性のCut-off値を0.1 IU/mLまで下げても問題ないと考えられたと報告しているが¹⁰⁾、結核既治療患者の成績をもってLTBI診断の値を設定してよいのかについて疑問もあり、今回は添付文書に従って判定した。

判定不能4例中2例はステロイドパルス後、1例はエンドキサンパルス後であり、このような時期にQFTを検査することは避けたほうがよいと思われた。

実地臨床において免疫抑制療法患者に対してIGRAsを検査するタイミングとしては、a) 治療（免疫抑制療法）開始時、b) 生物学的製剤導入時、c) 定期的（年1回?）、d) 結核発病を鑑別診断したい時、などがあげられる。a) b) c) はLTBIのスクリーニングとしての検査である。しかし、IGRAsの感度については、末梢血リンパ球数が少なくなると低下すると報告されている。今回陽性コントロール値でみた場合、リンパ球数が1000以上あってもコントロール値がかなり低い例が存在した。従って、IGRAsの反応性に関してはリンパ球数のみなら

ず、原疾患や治療薬による影響が生じる可能性を考慮する必要がある。

まとめ

(1) 臨床的には結核を疑っていないHIV感染者等の免疫脆弱宿主（結核発病ハイリスク者）にQFT検査を行うことで、潜在性結核感染症（LTBI）をスクリーニングできる可能性が示唆された。

(2) 健常者におけるQFT-3Gの陽性率1.3%（添付文書）と比較して、免疫脆弱宿主における陽性率は高い傾向を示した。検討症例数が少ない解析結果ではあるが、結核発病リスクが高い集団なので、LTBIを発見するため症例背景を考慮しつつQFT-3G検査を行うことは意義があると思われた。

謝辞

本発表にご協力いただいた下記の方々（敬称略）に感謝いたします。

（公財）結核予防会結核研究所 原田登之、樋口一恵、森 亨。がん感染症センター都立駒込病院感染症科 味澤 篤。都立多摩総合医療センター内科 西尾康英、同呼吸器科 畠山修司（東大病院感染症科）、同検査科 佐藤修子、同リウマチ膠原病科 杉井章二。

文献

- 1) 伊藤明広, 多田公英, 大寺 博: 免疫抑制宿主における活動性結核補助診断としてのQuantiFERON®TB-2Gの有用性に関する検討. 結核. 2011; 86: 45-50.
- 2) Kobashi Y, Mouri K, Obase Y, et al.: Clinical evaluation of QuantiFERON TB-2G test for immunocompromised patients. Eur Respir J. 2007; 30: 945-950.
- 3) Komiya K, Ariga H, Nagai H, et al.: Impact of peripheral lymphocyte count on the sensitivity of 2 IFN- γ release assays, QFT-G and ELISPOT, in patients with pulmonary tuberculosis. Inter Med. 2010; 49: 1849-1855.
- 4) Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, et al.: Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents: Recommendations from CDC, NIH, HIV Medicine Association of IDSA; 2009. 58/No. RR-4.
- 5) Fujita A, Ajisawa A, Harada N, et al.: Performance of a whole-blood interferon-gamma release assay with Mycobacterium RD1-specific antigens among HIV-infected persons. Clinical and Developmental Immunology. 2011; pii 325295, 1-6.
- 6) 加藤誠也: 日本におけるHIV合併結核に関する調査. 厚生労働科学新興・再興感染症研究費事業「結核菌に関する研究」平成20年度総括・分担研究報告書. 2009, 191-201.
- 7) 永井英明, 川辺芳子, 有賀晴之, 他: HIV感染症におけ

- る結核感染診断に対してのQuantiFERON®-TB第2世代の有用性についての検討. 結核. 2007 ; 82 : 635-640.
- 8) Harada N, Higuchi K, Yoshiyama T, et al. : Comparison of two whole blood interferon- γ assays in tuberculosis patients and healthy controls. J Infection. 2008 ; 56 : 348-353.
- 9) Inoue T, Nakamura T, Katsuma A, et al. : The value of QuantiFERON TB-Gold in the diagnosis of tuberculosis among dialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2009 ; 24 : 2252-2257.
- 10) 坂野章吾 : クオンティフェロンTB-2Gの関節リウマチにおける潜在性結核診断の有効性と限界. 第84回総会ミニシンポジウム「免疫抑制療法と結核」. 結核. 2010 ; 85 : 40-42.

結核標準治療が行えない症例における levofloxacin の使用状況と治療成績の検討

^{1,2}久能木真喜子 ^{1,3}川辺 芳子 ¹鈴木 純子 ¹島田 昌裕
^{1,4}金子 有吾 ¹松井 芳憲 ¹川島 正裕 ¹大島 信治
¹有賀 晴之 ¹益田 公彦 ¹松井 弘稔 ¹田村 厚久
¹永井 英明 ¹赤川志のぶ ¹長山 直弘 ¹豊田恵美子
^{1,5}町田 和子 ¹中島 由槻

要旨：〔目的〕 当院の結核治療で、レボフロキサシン (LVFX) を抗結核薬として使用した状況、理由、治療成績を検討する。〔対象と方法〕 2005年に当院結核病棟へ入院し結核治療を開始した331例を対象とし、LVFXを使用した48例 (14.5%) の使用理由、使用状況、治療成績を検討する。さらに、初回標準治療開始後の処方変更でLVFXを使用した群とLVFXを使用せず減感作療法や他の抗結核薬を使用した群での菌陰性化率を比較する。〔結果〕 初回治療302例中41例 (13.6%)、再治療29例中7例 (24.1%) でLVFXは使用されていた。LVFXによる副作用で中止になった症例はなかった。初回標準治療で開始した269例中26例が処方変更でLVFXを使用し、その理由は抗結核薬の副作用が23例 (88.5%)、薬剤耐性が3例 (11.5%) であった。標準治療で開始し5カ月間菌陰性化の経過を追えた初回治療例228例のうち、処方変更後にLVFXを使用した22例の菌陰性化率は3カ月目68.2%、4カ月目95.5%、5カ月目100%であった。これは処方変更でLVFXを使用しなかった群と比較し菌陰性化率に差を認めなかった。〔結論〕 初回標準治療が継続できない症例においてLVFXの使用は、LVFXによる顕著な副作用はなく菌陰性化においても有用であった。現在LVFXは抗結核薬として保険適応承認されていないが、結核治療で使用可能な薬剤が制限される際には必須薬剤となる。今後抗結核薬としてLVFXが適切に使用できることが望まれる。

キーワード： 結核, レボフロキサシン, 抗結核薬, 菌陰性化率, 処方変更

はじめに

レボフロキサシン (LVFX) は抗結核薬として保険適応承認されていないが、LVFXを含むニューキノロンの有効性は確認されており^{1)~4)}、日本結核病学会治療委員会は「結核医療の基準」の見直し—2008年において標準治療が行えない状況でのLVFXの使用を推奨している⁵⁾⁶⁾。しかし、標準治療が行えない状況でLVFXを使用した例の治療の現状や治療成績は報告されていない。そこで、今回当院における結核治療でのLVFXの使用状況と、その治療成績について検討した。

対象と方法

2005年に当院結核病棟へ入院した結核患者は、355例であった。早期死亡、早期転院の早期の定義を入院後1カ月とした。355例のうち早期死亡した12例、早期転院した1例、入院以前より治療を開始されていた11例を除き、新規に治療を開始した331例を今回の対象とした。内訳は初回治療302例、再治療29例であった。最終的に初回治療では41例、再治療では7例にLVFXが使用されており、その使用理由、使用状況、治療成績について検討した。次に、初回標準治療開始後の処方変更の際に

¹独立行政法人国立病院機構東京病院呼吸器科, ²順天堂大学呼吸器内科, ³川辺内科クリニック, ⁴慈恵医科大学付属第3病院, ⁵公害健康被害補償不服審査会

連絡先：久能木真喜子, 順天堂大学呼吸器内科, 〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1 (E-mail: komanogi@juntendo.ac.jp)
 (Received 1 Dec. 2010/Accepted 5 Jul. 2011)

LVFXを使用した群とLVFXを使用せず減感作療法や他の抗結核薬を使用した群で菌陰性化までの治療成績を比較した。

結 果

(1) LVFX使用の経緯と使用頻度

対象331例(男/女:241/90)の背景をTable 1に示す。初回治療例は302例,再治療例は29例であった。初回治療302例で,イソニアジド(INH or H),リファンピシン(RFP or R),ピラジナミド(PZA or Z),エタンブトール(EB or E)またはストレプトマイシン(SM or S)の4剤[HRZE(S)と略す]もしくはHRE(S)3剤での標準治療で開始したものは269例,入院時に合併症などの理由があり標準治療以外で開始したもの(非標準治療)は33例であった。平均年齢(平均±標準偏差)は標準治療57.7±21.9歳,非標準治療は72.4±13.3歳であった。標準治療例の中で肺結核は264例で,菌培養陽性者は253例(95.8%)であった。非標準治療例では,33例全例が肺結核で菌培養陽性者は32例(97.0%)であった。再治療29例では,HRZE(S)もしくはHRE(S)で開始したものは25例(69.4±16.9歳),他の治療方式で開始したものは4例(75.8±6.4歳)であった。

次に対象331例のLVFX使用の経緯をFig. 1に示す。初回治療302例のうち標準治療HRZE(S)もしくはHRE(S)で開始したものは269例であった。HRZE(S)4剤使用は154例であり,そのうち処方変更したものは39例(25.3%)で,処方変更後LVFXを使用したものは39例中13例(33.3%)であった。HRE(S)3剤で開始したものは115例であり,そのうち処方変更したものは43例(37.4%)で,LVFX使用は13例(30.2%)であった。初回治療で非標準治療での開始は33例で,そのうち最初からLVFXを処方したものは14例であった。非標準治療で開始時LVFXを使用していない19例のうち,途中で処方変

更したものは7例であった。そしてその後LVFXを使用したものは7例中1例であった。再治療29例では,標準治療方式で開始したものは25例であった。そのうちHRZE(S)4剤での開始は11例であった。その後の処方変更は4例でそのうちLVFX使用は2例であった。HRE(S)3剤で開始したものは14例であった。処方変更は5例ありそのうち2例でLVFXを使用していた。再治療例で,非標準治療方式で開始したのは4例あり最初からLVFXを使用したのは3例であった。以上より,LVFXの使用は初回治療では302例中41例(13.6%),再治療では29例中7例(24.1%)であり,全体では331例中48例(14.5%)であった。LVFX使用例において,LVFXの副作用により中止になった症例はなかった。

(2) LVFX使用の理由,開始時期,副作用

331例中,治療開始時よりLVFXを使用したのは17例(5.1%)であった。その使用理由をTable 2に示す。初回治療14例において,8例は開始時より眼障害(白内障,緑内障,糖尿病性網膜症)が著しくEBを使用せずLVFXを使用していた。また治療前より肝障害が著明であったためPZAは使わずLVFXを使用している例が6例あった。再治療3例では,全例が耐性の可能性を想定し,LVFXを使用していた。

治療途中で処方変更してLVFXを使用したのは31例(9.4%)で,その薬剤変更理由をTable 3に示す。そのうち初回標準治療開始後に処方変更でLVFXを使用したのは26例で,LVFX使用理由は抗結核薬の副作用によるものが23例(88.5%),薬剤耐性判明によるものが3例(11.5%)であった。副作用の内訳は,肝機能障害10例,次いで皮疹5例が多く,副作用により中止した薬剤に代わって使用されていた。再治療のうち標準治療方式で開始し処方変更でLVFXを使用した4例は皮疹出現による変更が2例,耐性による変更が2例であった。

なお,上記の31例において,①副作用の推定原因薬剤

Table 1 Characteristics of the patients with tuberculosis admitted to Tokyo National Hospital in 2005

	Initial treatment		Retreatment	
	Standard Tx	Non-standard Tx	Standard Tx	Non-standard Tx
Number	269	33	25	4
Mean age±SD	57.7±21.9	72.4±13.3	69.4±16.9	75.8±6.4
Sex (male/female)	195/74	26/7	16/9	4/0
Pulmonary TB	264	33	24	4
Cavity formation (+/-)	148/116	18/15	11/13	3/1
Smear/Culture				
(+/+)	224	29	19	4
(-/+)	29	3	3	0
(+/-)	4	0	1	0
(-/-)	7	1	1	0
Extra pulmonary TB	5	0	1	0

Tx: therapy TB: tuberculosis

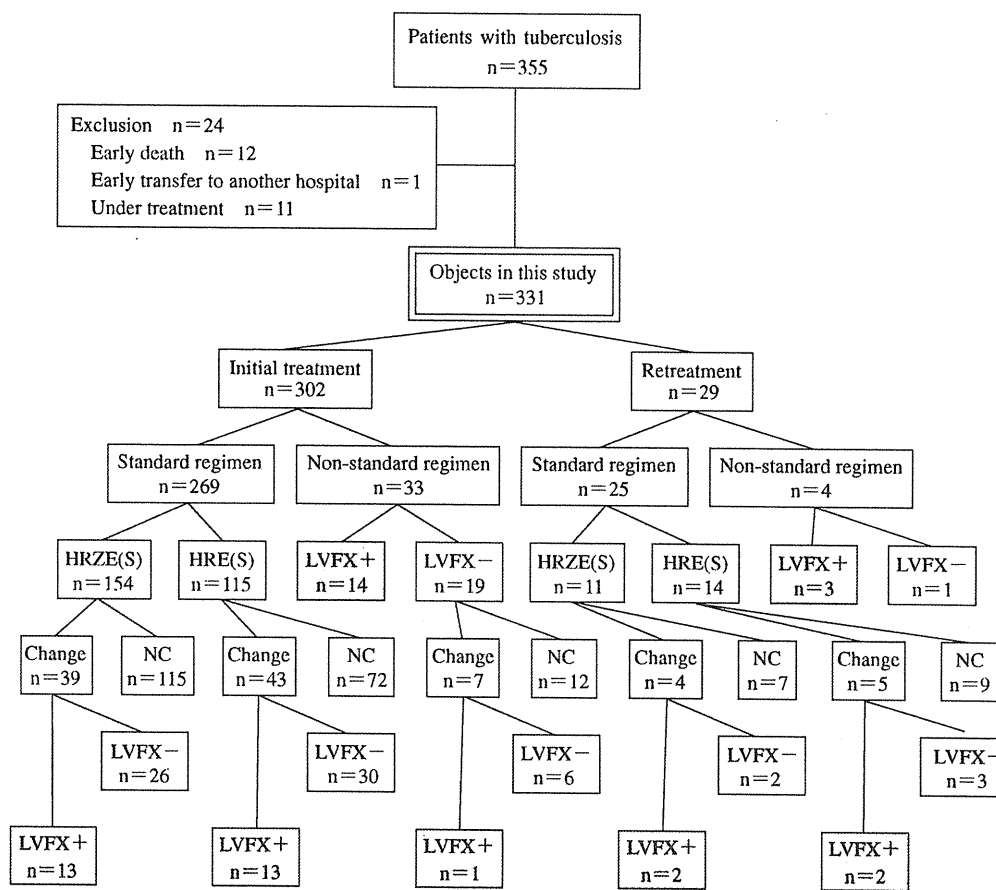


Fig. 1 Course of the treatment for patients with tuberculosis admitted to Tokyo National Hospital in 2005. the patients who were used LVFX. H: isoniazid, R: rifampicin, Z: pyrazinamide, E: ethambutol, S: streptomycin, LVFX: levofloxacin, NC: no change

Table 2 The reason of using LVFX as primary regimen

	Initial treatment n=14	Retreatment n=3
Optic disorder	8 (57.1%)	
Liver function disorder	6 (42.9%)	
Resistance/possibility for resistance		3 (100%)

Table 3 The causes of alteration to the drugs including LVFX from regimen without LVFX

	Initial treatment		Retreatment
	Standard Tx n=26	Non-standard Tx n=1	Standard Tx n=4
Adverse reaction	23 (88.5%)	1 (100%)	2 (50.0%)
Liver function disorder	10	1	
Dermatosis	5		2
Optic disorder	1		
Renal function disorder	2		
Numbness	2		
Fever up	1		
Low number of platelets	1		
Vomiting	1		
Resistance	3 (11.5%)		2 (50.0%)

に対する代替薬としての使用が14例, ②すべての薬剤を中止した後に複数の未使用薬とともに開始が12例, ③薬剤耐性による変更使用は5例であった。耐性とされた5例のうち最終的にINHを含む薬剤耐性は3例で, そのうちINHとRFPの両剤耐性は再治療例の1例であった。他の2例は前医よりINHやEBの薬剤耐性があると報告されたが, 当院での精査で薬剤耐性なしと判明した。

上記の31例でLVFXの開始時期に特徴は見られなかった。LVFXの開始時期は, 初回治療27例では治療開始後2週未満が3例, 2~4週未満が9例, 4~8週未満が7例, 8週以上が8例であった。再治療4例では治療開始後2週未満が1例, 4~8週未満が1例, 8週以上が2例でLVFXが開始されていた (Table 4)。

処方変更後LVFXの副作用のために投与中止になった例はなかった。

(3) 菌培養陰性化率 (菌陰性化率) の比較

標準治療で開始した初回治療269例のうち, 治療開始後5カ月間経過観察できた入院時喀痰培養陽性例228症例でMGITによる培養陰性化率を比較検討した (Fig. 2)。除外例は菌培養陰性例16例, 菌培養陽性のまま死亡した14例, 転院後の詳細不明11例である。標準治療群の菌陰性化率は, HRZE(S) 4剤使用群 (PZA+) では3カ

月目92.4%, 4カ月目98.1%, 5カ月目100%であった。HRE(S) 3剤使用群 (PZA-) では3カ月目92.9%, 4カ月目98.2%, 5カ月目100%であった。処方変更でLVFXを使用し菌の経過が追えたのは22例 [HRZE(S) で開始11例, HRE(S) で開始11例] で, 菌陰性化率は3カ月目68.2%, 4カ月目95.5%, 5カ月目100%であった。標準治療例の陰性化時期と比較して約1カ月遅れたが4カ月目には95%以上が陰性化し, 5カ月目には100%陰性化した。処方変更でLVFXを使用しなかった群45例 (減感作療法を行った39例, その他6例) での菌陰性化率は3カ月目80.0%, 4カ月目97.8%, 5カ月目100%であった。この群では二次薬の使用はなかった。また, 処方変更でLVFXを使用した群22例と処方変更でLVFXを使用しなかった群45例とで1カ月目から5カ月目までそれぞれで陰性化率に有意差は認めなかった (Fisher's test)。さらに, この評価対象の228例において2010年9月現在, 再発症例は認めていない。

Fig. 2における処方変更後LVFXを使用した群22例とLVFXを使用しなかった群45例の背景についてTable 5に示す。平均年齢 (平均±標準偏差) は前者22例で56.0±20.5歳, 後者45例で58.5±21.1歳であった。空洞形成は前者で14例 (63.6%), 後者で26例 (57.8%)であった。

Table 4 The interval between the time the patients with tuberculosis started the treatment without LVFX and the time they started to have treatment with LVFX

Interval (weeks)	Initial treatment n=27	Retreatment n=4
~2W	3 (11.1%)	1 (25.0%)
2~4W	9 (33.3)	0 (0)
4~8W	7 (25.9)	1 (25.0)
8W~	8 (29.6)	2 (50.0)

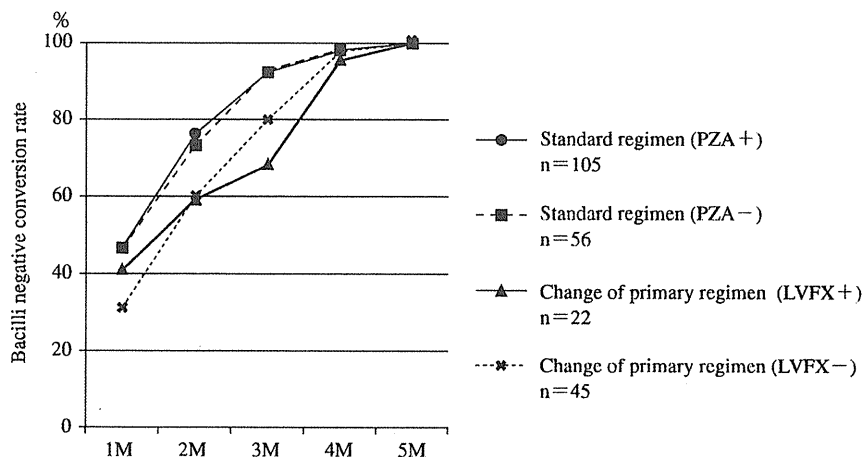


Fig. 2 Negative conversion rates in sputum culture positive tuberculosis patient (n=228) with (n=67) and without (n=161) alteration of standard regimen. PZA: pyrazinamide

Table 5 The background of the tuberculosis patients with alteration of standard regimen in Fig. 2

	LVFX+	LVFX-	P value*
Number	22	45	
Mean age \pm SD	56.0 \pm 20.5	58.5 \pm 21.1	n.s.
Sex (male/female)	16/6	33/12	n.s.
Cavity formation (+/-)	14/8	26/19	n.s.
Smear			
-	1 (4.5%)	5 (11.1%)	n.s.
1+	5 (22.7%)	17 (37.8%)	n.s.
2+	5 (22.7%)	7 (15.6%)	n.s.
3+	11 (50.0%)	16 (35.6%)	n.s.
Key drugs used after changing primary regimen			
H+R	11 (50.0%)	39 (86.7%)	p<0.001
R only	5 (22.7%)	0 (0%)	n.s.
H only	6 (27.3%)	4 (8.9%)	n.s.
Death without using any key drugs		2 (4.4%)	n.s.

*For comparison of the LVFX- group: χ^2 test

入院時の喀痰塗抹検査ではLVFXを使用した群では多量排菌者(2+, 3+)は16例(72.7%), LVFXを使用しなかった群では23例(51.1%)であった。処方変更後LVFXを使用した22例では処方変更後最終的には全例でINHもしくはRFPのkey drugが使用されていた。処方変更後LVFXを使用しなかった群でも薬剤中止のまま死亡した2例を除いた43例は最終的にはINHもしくはRFPが使用されていた。RFP使用はLVFX使用群で16例(72.7%), LVFXを使用していない群では39例(86.7%)であった。処方変更後最終的にINH, RFPの両薬剤が使用できたのはLVFX使用群では11例(50.0%)に対し, LVFXを使用しなかった群のうち39例(86.7%)であった(p<0.001)。

考 察

Fluoroquinolone系薬剤は薬剤耐性結核, とくに多剤耐性結核菌(MDR-TB)の治療において国際的に必須の薬剤となっている^{7,8)}。ATSは, 結核治療に関してfirst-line drugsとしてINH, RFP, PZA, EB, SMを用い, second-line drugsまたはfluoroquinoloneの使用はMDR-TBあるいはfirst-line drugsが使用できない際にのみ使用するよう提案している⁷⁾。わが国でも「結核医療の基準」の見直し—2008年の中で, 標準治療が行えない場合には他の抗結核薬と併用してfluoroquinoloneの使用を推奨している^{5,6)}。実際に臨床の現場でも, MDR-TBの治療の際のみならずfirst-line drugsで結核治療中に副作用が出現した場合の代替薬として使用されている。

Fluoroquinoloneはfirst-line drugであるEBと同等の効果があること³⁾, さらにその安全性について長期投与をしても副作用が少ないという報告がある⁴⁾。これらの報告はfluoroquinoloneを抗結核薬として使用する利点として考えられる。

LVFXの副作用として関節痛が時にあるが, 今回対象の48例では副作用のためにLVFXを中止した例はなかった。また感受性に関しては, 当院での薬剤感受性検査は治療開始時にINH, RFP, SM, EB, PZAの5剤のみを液体培地MGITシステムで行っており, いずれかに耐性が認められた場合のみ, 他の薬剤の感受性検査を施行している。そのため, LVFXへの耐性が当初あったのかどうかは調べていなかった。抗結核薬で1剤以上の耐性が判明もしくは疑われ, 結核治療薬としてLVFXを使用した5例ではLVFX耐性のもは認めなかった。

Fluoroquinoloneにおける結核治療での使用効果の検討も諸施設で行われており, LVFXとオフロキサシン(OFLX)がMDR-TBに対して中心的な役割を果たすというエビデンス^{9,10)}が示された。多田らは, 多剤耐性肺結核の治療におけるOFLXとLVFXの有用性を証明している¹¹⁾。Chanらは, MDR-TBの治療においてfluoroquinoloneの使用は予後に関与する独立因子であると報告している¹²⁾。しかしながら, 抗結核薬としてのfluoroquinoloneの追加効果がないという報告¹³⁾もある。

以上のように, 多剤耐性結核においては様々なfluoroquinoloneの使用の検討がされているが, 初回標準治療開始後の処方変更でfluoroquinoloneを使用した例の検証は, われわれが調べるかぎり存しない。

今回われわれは, 5カ月以上経過を追えた初回標準治療228例で菌陰性化率を検討した。途中で処方変更してLVFXを使用した例の副作用出現時期, 投薬中止期間, LVFX開始時期など患者の背景は様々であった。LVFXを使用するか, 減感作を行うか, 他の抗結核薬を使用するかは副作用の内容, 原因推定薬剤, 症状により判断するが, 今回LVFXへの変更群では減感作を行いやすい発熱は1例のみであった。PZAによる肝機能障害と判断した場合では減感作は行っていない。処方変更してLVFX

を使用した群, LVFXを使用せず減感作療法や他の抗結核薬を使用した群での5カ月の治療期間において菌陰性化率に差は認められなかった。両群の処方変更後の治療薬の内訳としてLVFXを使用した群では22例全例, LVFXを使用せず既存の抗結核薬を使用した群では43例(薬剤中止のまま死亡した2例を除く)とほぼ全例で, 最終的にはINHもしくはRFPのkey drugは使用されていた。LVFXの使用に関しては, 結核患者の年齢分布や空洞形成の有無よりも入院時喀痰塗抹検査の結果が影響していた。処方変更でLVFXを使用した群には多量排菌者(2+, 3+)が多い傾向にあった。排菌量の多い患者で副作用が認められた場合, 早期に喀痰塗抹陰性化させるために主治医が既存の抗結核薬の代替薬や未使用薬としてLVFXを使用していたと考える。以上より, 処方変更後にLVFXを使用した群では, 排菌量が多く重症度が高い傾向にあること, さらに処方変更でLVFXを使用していない群と比較してkey drugであるINHとRFPの両者を使用できた症例が有意に少ないにもかかわらず, 菌陰性化率に差がないことから, 処方変更でのLVFXの使用は有用であることが示唆されたと考えられる。

結核治療での再発率について, PZAを加えた4剤6カ月治療とPZAを加えない9カ月治療終了後の再発率は3年追跡でそれぞれ1.6%と2.0%であったと英国胸部疾患学会(BTS)は報告し¹⁴⁾, 本邦でも和田らがPZAを加えた6カ月治療での再発率は3.2%であった¹⁵⁾と報告している。われわれは, 5カ月以上菌検査の経過を追えた標準治療で開始した初回治療228例において2010年9月現在まで追跡したが, 途中から治療変更でLVFXを使用した22例も含め再発例は1例も認めなかった。

標準治療で開始した初回治療例では, 処方変更例でも4カ月目には標準治療を継続できた例の1カ月遅れで同じ菌陰性化が得られること, また, 処方変更でLVFXを使用した群は処方変更でLVFXを使用せず減感作療法や他の抗結核薬を使用した群と同等に効果があると思われる。さらに治療開始後5年を経過した現在, 再発例も認めていない。現在LVFXは保険適応として承認されていないが, 結核治療でMDR-TBもしくは使用可能な薬剤が限られてしまう際には必須な薬剤である。今後, 日本でも結核治療においてLVFXが必要に応じ適切に使用できるようになることが望まれる。

結 論

結核治療におけるLVFXの使用は初回治療例では302例中41例(13.6%), 再治療例では29例中7例(24.1%)であり, 全体では331例中48例(14.5%)であった。標準治療で開始した初回治療269例中処方変更でLVFXを使用した26例の使用の理由は, 抗結核薬の副作用によ

るものが23例(88.5%), 薬剤耐性によるものが3例(11.5%)であった。そのうち5カ月以上菌検査の経過を追えた228例の菌陰性化率の検討で, 標準治療の継続ができず, 処方変更でLVFXを使用せず減感作療法や他の抗結核薬を使用した群と, 代替および未使用薬としてLVFXを使用した群の菌陰性化率に差は認めなかった。

文 献

- 1) Gillespie SH, Kennedy N: Fluoroquinolones: a new treatment for tuberculosis? *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 265-271.
- 2) Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR: Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3: 432-442.
- 3) Kohno S, Koga H, Kaku M, et al.: Prospective comparative study of ofloxacin or ethambutol for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Chest.* 1992; 102: 1815-1818.
- 4) 河原 伸, 多田敦彦, 永礼 旬, 他: 抗結核薬としてのニューキノロン薬の臨床的評価. *結核.* 1999; 74: 71-75.
- 5) 日本結核病学会治療委員会: 「結核医療の基準」の見直し—2008年. *結核.* 2008; 83: 529-535.
- 6) 日本結核病学会治療委員会: 結核治療におけるレボフロキサシンの使用方法について—「結核医療の基準」の見直し—2008年への追補(2). *結核.* 2010; 85: 7.
- 7) ATS/CDC/IDSA: Treatment of Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 603-662.
- 8) WHO Global Tuberculosis Programme Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. 3rd ed. World Health Organization, Geneva, 2003, 27-38.
- 9) Yew WW, Chan CK, Chau CH, et al.: Outcomes of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis treated with ofloxacin/levofloxacin-containing regimens. *Chest.* 2000; 117: 744-751.
- 10) Yew WW, Chan CK, Leung CC, et al.: Comparative roles of levofloxacin and ofloxacin in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: preliminary results of a retrospective study from Hong Kong. *Chest.* 2003; 124: 1476-1481.
- 11) 多田敦彦, 河田典子, 柴山卓夫, 他: 多剤耐性結核に対するofloxacin, levofloxacinの*in vitro*抗菌活性と臨床効果. *結核.* 2006; 81: 337-344.
- 12) Chan ED, Laurel V, Strand MJ, et al.: Treatment and Outcome Analysis of 205 Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169: 1103-1109.
- 13) El-Sadr WM, Perlman DC, Matts JP, et al.: Evaluation of an intensive intermittent-induction regimen and duration of short-course treatment for human immunodeficiency virus-related pulmonary tuberculosis. Terry Beinr Community Programs for Clinical Research on AIDS (CPCRA) and the AIDS Clinical Trials Group (ACTG). *Clin Infect Dis.* 1998; 26: 1148-1158.
- 14) BTS: A controlled trial of 6 months' chemotherapy in pulmonary tuberculosis. Final report: results during the 36 months after the end of chemotherapy and beyond. *Br J Dis Chest.* 1984; 78: 330-336.

15) 和田雅子, 青柳昭雄: PZAを加えた6カ月短期化学療法

の評価. 結核. 2001; 76: 221.

Original Article

EVALUATION OF TUBERCULOSIS TREATMENT INCLUDING LEVOFLOXACIN (LVFX) IN CASES WHO COULD NOT CONTINUE STANDARD REGIMEN

^{1,2}Makiko KUNOGI, ^{1,3}Yoshiko KAWABE, ¹Junko SUZUKI, ¹Masahiro SHIMADA,
^{1,4}Yugo KANEKO, ¹Yoshinori MATSUI, ¹Masahiro KAWASHIMA, ¹Nobuharu OHSHIMA,
¹Haruyuki ARIGA, ¹Kimihiko MASUDA, ¹Hironori MATSUI, ¹Atsuhisa TAMURA,
¹Hideaki NAGAI, ¹Shinobu AKAGAWA, ¹Naohiro NAGAYAMA, ¹Emiko TOYOTA,
^{1,4}Kazuko MACHIDA, and ¹Yutsuki NAKAJIMA

Abstract [Objective] The purpose of this study was to evaluate tuberculosis treatment including levofloxacin (LVFX) and to investigate the effectiveness of changing drug regimens at our hospital.

[Subjects and Methods] A retrospective study was conducted on 331 patients with tuberculosis admitted to Tokyo National Hospital in 2005. Out of these 331 patients, LVFX was used in 48 (14.5%), 41 of which were initial-treatment cases. We studied why and how LVFX was used and compared bacteriological negative conversion rates between the initial-treatment cases in which the initial standard regimen was changed to regimens including LVFX, and those in which the initial standard regimen was either maintained throughout or modified with drugs other than LVFX. Sputum cultures were examined with Mycobacteria Growth Indicator Tube System (BACTEC MGIT 960).

[Results] LVFX was used in 41 (13.6%) of 302 initial-treatment cases and in 7 (24.1%) of 29 retreatment cases. Out of the 269 initial-treatment cases starting with the standard regimen, LVFX was later used in 26 cases (9.7%). The reasons for using LVFX were adverse reaction to antituberculosis drugs in 23 cases (88.5%) and resistance to antituberculosis drugs in 3 cases (11.5%).

We investigated the bacteriological conversion rate in 228 patients who could be followed up for more than five months. The conversion rates in 105 cases under the standard regimen including PZA (PZA+) were 92.4% in three months, 98.1% in four months, and 100% in five months. The rates in 56 cases

under the standard regimen without PZA (PZA-) were 92.9%, 98.2% and 100%, respectively. The rates of 22 cases under the initial regimen modified with LVFX (LVFX+) were 68.2%, 95.5% and 100%, respectively. In 45 cases under the initial regimen modified with drugs other than LVFX (LVFX-), the rates were 80.0%, 97.8% and 100%, respectively.

[Conclusion] This study showed that LVFX was an effective drug in terms of the bacteriological conversion rate, without adverse reaction. LVFX is not approved as an antituberculosis drug in Japan, but it is often used in cases of MDR-TB or in situations in which the patients cannot continue treatment with the standard regimen. We hope that LVFX will be approved as an antituberculosis drug as soon as possible in Japan.

Key words: Tuberculosis, Levofloxacin, Antituberculosis drugs, Bacilli negative conversion rate, Change of regimen

¹National Hospital Organization Tokyo National Hospital, ²Department of Respiratory Medicine, Juntendo University School of Medicine, ³KAWABE Clinic, ⁴Department of Pulmonary Medicine, Jikei University School of Medicine, ⁵Pollution-related Health Damage Compensation Grievance Board

Correspondence to: Makiko Kunogi, Department of Respiratory Medicine, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421 Japan. (E-mail: komanogi@juntendo.ac.jp)

結核性胸膜炎の治療中に対側胸水を呈した1例

¹石井 崇史 ¹松井 芳憲 ¹長山 直弘 ¹檜垣 直子
¹戸根 一哉 ¹日下 圭 ¹妹尾 真美 ¹有賀 晴之
¹大島 信治 ¹益田 公彦 ¹松井 弘稔 ¹寺本 信嗣
¹山根 章 ¹田村 厚久 ¹永井 英明 ¹赤川志のぶ
¹豊田恵美子 ¹庄司 俊輔 ²中島 由槻

要旨：症例は55歳女性，発熱・右胸痛にて右側胸水貯留を発見され，胸水は抗酸菌塗抹陰性であったが，リンパ球優位の滲出性でADA 92.7 IU/Lと高値を示し，血液QFT陽性であることから結核性胸膜炎と診断された。胸腔ドレナージ後，抗結核薬4剤（INH, RFP, EB, PZA）による治療を開始され，後に胸水結核菌培養陽性（全感受性菌）と判明した。しかし治療開始18日後に再度発熱し，今度は左胸痛が出現し，左側胸水貯留が認められたため精査入院となった。右側と同様リンパ球優位の滲出性胸水で，局所麻酔下胸腔鏡を施行したところ壁側胸膜に多発性の白色小結節病変を認め，同部の生検組織培養より結核菌が検出された。抗結核薬開始後の初期悪化による対側胸膜炎と判断し，治療継続とした。左胸腔ドレナージ後は胸水貯留を認めず，経過良好である。

キーワード：結核性胸膜炎，初期悪化，対側胸水

緒 言

結核性胸膜炎は結核診療において比較的遭遇する頻度の高い疾患であるが，抗結核薬による治療開始後，対側に結核性胸膜炎をきたす例は稀である。今回われわれは右側の結核性胸膜炎に対し治療開始後，対側に胸水貯留を認め，精査の結果，初期悪化による対側の結核性胸膜炎と診断した1例を経験したため，若干の文献的考察を含めて報告する。

症 例

症 例：55歳，女性。職業：銀行員。

主 訴：発熱，胸痛。

既往歴：掌蹠膿疱症（51歳），左末梢性顔面神経麻痺（52歳），橋本病（54歳）。

家族歴：特記事項なし。

現病歴：平成20年12月健診にて右上肺野結節影を指摘され（Fig. 1a），前医にてclarithromycin 400 mg/day 14日間処方されたが，改善なくその後受診せず。平成22

年5月38℃の発熱と右胸痛が出現し，同医受診したところ，胸膜炎の診断にてlevofloxacin（LVFX）500 mg/dayを内服した。しかし，右胸水がさらに増加したため（Fig. 1b-1）10日後に同医入院した。胸腔ドレナージが施行され，その直後の胸部CT（Fig. 1b-2）では右側胸水と葉間・壁側胸膜の肥厚を認め，また左側にも軽度の葉間胸膜の不整な肥厚が認められた。右胸水は抗酸菌塗抹陰性であったが，リンパ球優位，TP 5.5 mg/dl，LDH 1012 U/lと滲出性，adenosine deaminase（ADA）高値（92.7 IU/L）を示し，血液Quantiferon®-TBゴールド（QFT）陽性であった。結核性胸膜炎の疑いにて6月当院第1回目紹介入院となった。

喀痰なく，胸水はすでに消失しており，胃液検査も抗酸菌陰性であった。前医の検査所見から臨床的に結核性胸膜炎と診断され，抗結核薬4剤isoniazid（INH），rifampicin（RFP），ethambutol（EB），pyrazinamide（PZA）による治療が開始された。有害事象なく，退院となったが，抗結核薬開始後18日より38℃の発熱と左胸痛が出現し，胸部エックス線左側の胸水貯留が認められたため

独立行政法人国立病院機構東京病院呼吸器疾患センター¹内科，²外科

連絡先：石井崇史，独立行政法人国立病院機構東京病院呼吸器内科，〒204-8585 東京都清瀬市竹丘3-1-1
（E-mail: taishii-ky@umin.ac.jp）

（Received 25 Dec. 2010/Accepted 27 Apr. 2011）

(Fig. 1c-1), 当院第2回入院となった。この時点で近医にて施行された右胸水の結核菌培養陽性, 全感受性菌と判明した。

入院時身体所見: 身長163 cm, 体重58 kg, 血圧114/80 mmHg, 脈拍86回/分・整, 呼吸数14回/分, 体温37.3°C, 表在リンパ節は触知せず, 心音は整。呼吸音は左側肺で減弱を認めたが, ラ音は聴取せず。四肢に浮腫なし。

入院時検査成績 (Table): CRP 8.03 mg/dl と炎症反応

の亢進を認めた。

当院第2回入院時CT (平成22年7月, Fig. 1c-2): 左側胸水, 壁側胸膜肥厚, 下葉の索状影を認める。肺野病変は明らかでない。

入院後経過: 左胸腔穿刺施行したところ, 胸水は黄褐色滲出性で ADA 99.6 IU/L と高値, 胸水の QFT は上澄み液 interferon γ (IFN- γ) 10.0 IU/ml, culture filtrate protein 10 (CFP10) 抗原刺激後 IFN- γ 値は 62.4 IU/ml であり,

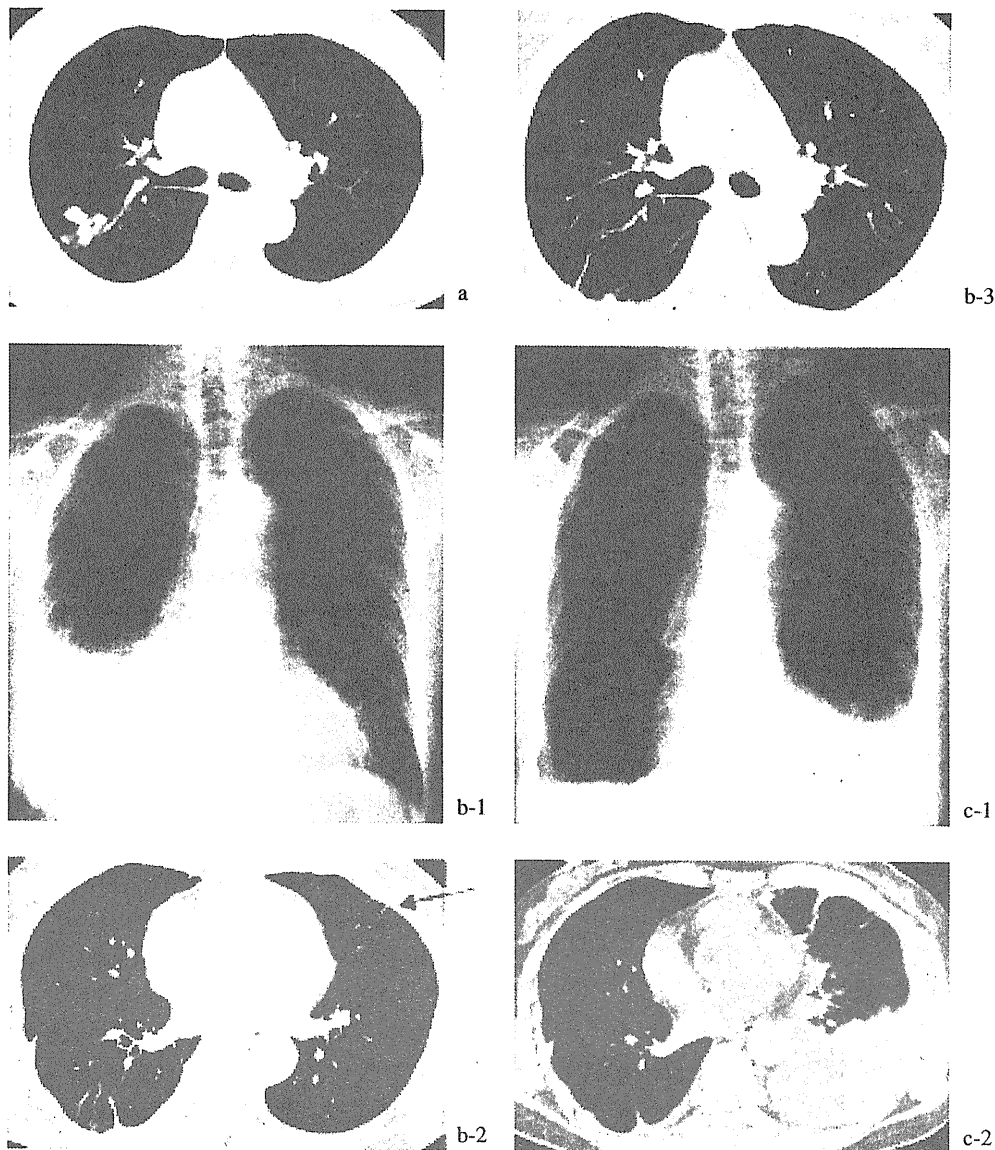


Fig. 1 (a) Chest CT on 2008 showed multiple small nodular shadows in the upper lobe of the right lung. (b) Chest X-ray (b-1) on admission to another hospital (May 2010) showed right pleural effusion. Chest CT (b-2) showed the same findings. In addition, left pleura was slightly thickened, indicating the beginning of inflammation on the left pleura (\leftarrow). Multiple small nodular shadows that were found in the chest CT on 2008 changed into subpleural linear shadow. (b-3) (c) Chest X-ray (c-1) on second admission to our hospital (July 2010) showed left pleural effusion. Right pleural effusion was steadily decreased. Chest CT (c-2) at the same time showed left pleural effusion and that pleural thickening progressed. No new lesion of lung field was detected.

当院基準によれば陽性であったが、胸水抗酸菌塗抹検査・結核菌PCR・培養はすべて陰性であった (Table)。結核性胸膜炎が強く疑われたが、確定診断のため第3病日に局所麻酔下胸腔鏡を施行した (左第7肋間中腋窩線上よりアプローチ)。左下葉は壁側胸膜と一部癒着、壁側胸膜は全般的に発赤調で一部に白色隆起性病変を認めた (Fig. 2)。胸水を1100 ml排液し、胸腔ドレーンを留置した。白色隆起性病変からの生検検体を摩滅して抗酸菌検査施行したところ、塗抹 (±)、結核菌PCR陽性、培養陽性であった。以上より、左側も結核性胸膜炎と診断したが、抗結核薬開始約2週後の対側胸膜炎であり、機

序として初期悪化が考えられたため、治療は継続とした。第8病日に胸腔ドレーン抜去し、その後胸水再貯留は認めなかった。一方、入院時より38℃前後の発熱を認め、薬剤熱の可能性も否定できなかったため、第14病日に抗結核薬をすべて中止したところ解熱した。INH, LVFXにて再開し、RFP, EBの順に追加し、最終的にINH, RFP, EB内服として第28病日に退院となった。PZAが被疑薬として考えられたが、薬剤リンパ球刺激試験 (DLST) は陰性であった。以降、外来において3剤治療を継続しているが、経過良好である。

Table Laboratory findings on second admission

Hematology		Blood Chemistry		Thoracentesis (left effusion)	
WBC (/μl)	4400	TP (g/dl)	7.6	Gravity	1.038
Neu (%)	75	Alb (g/dl)	4.0	Protein (g/dl)	5.7
Mon (%)	6.9	AST (IU/l)	24	LDH (IU/l)	669
Lym (%)	15.8	ALT (IU/l)	16	CEA (ng/ml)	1.8
Eos (%)	2.3	LDH (IU/l)	198	ADA (IU/L)	99.6
Hb (g/dl)	13.0	CK (IU/l)	95	Cells	
Plt (/μl)	32.9×10 ⁴	ALP (IU/l)	232	RBC	(1+)
ESR (mm/hr)	57	γ-GTP (IU/l)	35	Neu	(±)
		T-Bil (mg/dl)	0.67	Lym	(2+)
		BUN (mg/dl)	13.6	His	(1+)
		Cre (mg/dl)	0.63	QFT TB-3G	(+)
		Na (mEq/l)	136	TB (smear)	(-)
		K (mEq/l)	4.0	TB (culture)	(-)
		BNP (pg/ml)	8.4	TB (PCR)	(-)
				Pleural biopsy, left	
				TB (smear)	(+)
				TB (culture)	(+)
				TB (PCR)	(+)

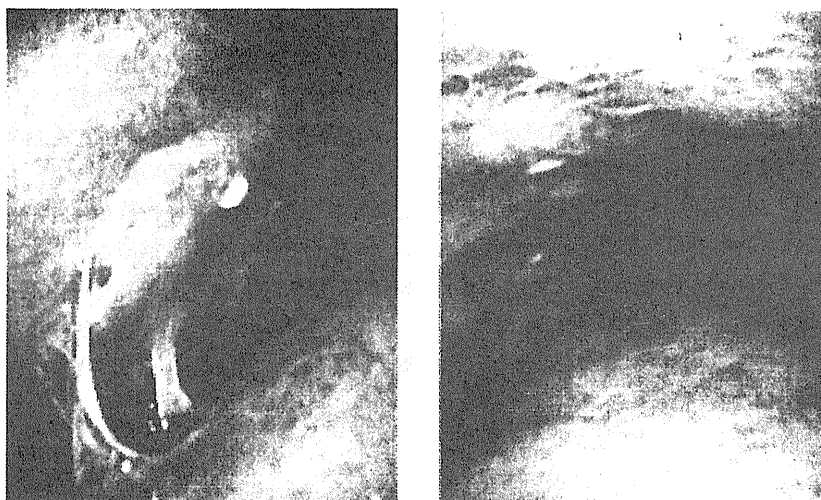


Fig. 2 Medical thoracoscopy was performed on the third admission day. White, eminent lesions were observed diffusely on the left parietal pleura. The smear and culture of biopsy sample from that lesion were positive for tuberculosis.

考 察

結核性胸膜炎は比較的よく見られる疾患であり、肺外結核の20%以上を占めるといわれる²⁾が、両側性は比較的稀であり、結核性胸膜炎全体の1.8～4.6%程度と報告されている^{3)~5)}。一方、抗結核薬開始後に胸水の増加を見ることは少なくないが、本症例のように対側に胸水をきたす例はきわめて稀である。

結核性胸膜炎の機序としては、①初感染に引き続いて起こるもの（一次結核症）、②初感染後の内因性再燃によるもの、③肺結核に随伴して起こるもの、④抗結核薬治療開始後の初期悪化によるもの、が考えられる⁴⁾。経路としては、胸膜直下病変の胸腔内穿破や初感染巣からの血行性ないしリンパ行性の胸膜への散布が想定されている⁴⁾。画像上は肺実質・胸膜直下病変を認めないことが多いが、結核性胸膜炎患者の肺切除標本ではほぼすべての症例で胸膜直下の病変が認められている⁶⁾。本例の右胸膜炎については、平成20年より右上葉胸膜直下に結核に矛盾しない肺病変を認めており、それに随伴した結核性胸膜炎と考えられた。一方、左胸膜炎は抗結核薬開始18病日に急性発症しており、機序としていわゆる初期悪化を起こしたものと推測された。

初期悪化とは、適切な抗結核薬開始後、喀痰中の結核菌は減少または陰性化しているにもかかわらず、既存病変の増大や新規病変の出現が起こることとされ、具体的には肺浸潤影の増悪やリンパ節病変の増大、胸水貯留等を起こす⁷⁾。機序としては、RFPのような強力な抗結核薬により短期間に多量の結核菌が死滅し、それにより引き出される大量の抗原に対する生体のアレルギー反応が想定されている⁷⁾。結核性胸膜炎においては、Yoら¹⁰⁾は141例中16名(11.3%)に初期悪化を観察し、Al-Majedら¹¹⁾は61例中10例(16.4%)に初期悪化と思われる胸膜炎の増悪を認めたと報告しており、いずれも抗結核薬開始後1週～1カ月程度で発症している。結核性胸膜炎の初期悪化はほとんどが同側であり、対側の悪化はきわめて稀である¹²⁾。本例において初期悪化を示唆する根拠としては、①治療開始前のCT画像では左肺葉間胸膜の不整な肥厚を認めたが、胸水は認められなかったこと、②抗結核薬開始後約2週では解熱しており画像上も胸水増加は認めなかったが、その4日後で左胸水貯留を認め、一方で明らかな他の肺野病変出現は認めていなかったこと、③抗結核薬は内服されており、薬剤耐性試験も全感受性であったこと、が挙げられる。また、胸腔鏡で左壁側胸膜にまばらながらも結核性病変が認められ結核菌も培養されていることから、右側結核病変より左胸膜の微小結核病変が形成され、それを基点に初期悪化が発生したものと推測される。その経路として、経気道性・リン

パ行性・血行性いずれも考えられるが、平成22年5月CT所見上肺野病変を認めなかったが小葉間隔壁の肥厚が認められ、左側胸水貯留時CTでは同所見が進行していたことから、リンパ行性が中でも可能性が高いと考えられた。その後、治療開始によりその病変に対しリンパ球の集簇と大量のサイトカインが分泌され¹³⁾、結核性胸膜炎を発症したと考えるのが妥当と判断した。初期悪化は抗結核薬の継続で改善するとされており、本例も胸水ドレナージと抗結核薬の継続のみで改善した。

一般に結核性胸膜炎では胸水抗酸菌塗抹・培養検査は陰性であることが多いため、胸水のリンパ球優位・ADA高値で診断される場合が少なくない。鈴木ら⁹⁾は、結核性胸膜炎が強く疑われた症例の44.7%では胸水をはじめとする諸検体で施行した結核菌培養がすべて陰性であったと報告している。本例では右胸膜炎は胸水の抗酸菌塗抹陰性であったが、後に結核菌培養陽性と判明した。左側胸膜炎も当初は抗酸菌塗抹陰性であったが、局所麻酔下胸腔鏡によって結核性病変と思われる白色隆起性病変を確認でき(Fig. 2)、その部の胸膜生検検体の培養より結核菌培養陽性が得られた。このように胸腔鏡は、直接病変部を確認でき十分量の検体を得られるので、その組織培養が意味のある抗酸菌検査結果を導きうるメリットがある¹⁴⁾。また、血液と異なり、胸水のQFT検査は一般的でなく標準的測定法もないが、当院の有賀らは、①胸水上澄み液のIFN- γ 濃度が0.9 IU/ml以上、かつAIM-Vmediaを用いた抗原刺激での反応が0.4 IU/ml以上であること、②胸水上澄み液のIFN- γ 濃度が0.9 IU/ml以上、かつ抗原刺激でELISPOT 6個以上のSPOTを認める、の2つを組み合わせて結核性胸膜炎の診断を行っており、胸水ADA値・血液QFT値より感度・特異度に優れると報告している¹⁾。本例においても胸水のQFTは陽性であり、結核性胸膜炎の補助診断法として有用と思われた。

結核性胸膜炎の治療中に対側胸水を呈した1例を経験した。胸腔鏡検査により、対側にも結核菌の存在を証明することができた。対側の胸膜炎は、もともと左胸膜に存在していた結核病巣が、抗結核薬開始後に初期悪化をきたして発症したものと推測され、胸水ドレナージと抗結核薬内服継続により改善した。結核性胸膜炎の経過中に対側胸水が出現した場合、他疾患との鑑別のためにも胸腔鏡を含め積極的に精査すべきと考えられる。

文 献

- 1) Ariga H, Kawabe K, Nagai H, et al.: Diagnosis of active tuberculous serositis by antigen-specific interferon- γ response of cavity fluid cells. *Clinical Infectious Diseases*. 2007; 45: 1559-1567.
- 2) H. Simon S, Alimuddin Z, et al.: TUBERCULOSIS. 2009,

- 342-347.
- 3) Valdes L, Alvarez D, Valle JM, et al.: The etiology of pleural effusions in an area with high incidence of tuberculosis. *Chest*. 1996; 109: 158-162.
 - 4) 国立療養所結核研究会・中村栄一, 芳賀敏彦: 国立療養所における結核性胸膜炎の現況. *結核*. 1990; 65: 205-221.
 - 5) Aktogu S, Yorgancioglu A, Cirak K, et al.: Clinical spectrum of pulmonary and pleural tuberculosis: a report of 5480 cases. *Eur Respir J*. 1996; 9: 2031-2035.
 - 6) Stead WW, Eichenholz A, Strauss HK: Operative and pathologic findings in twenty-four patients with syndrome of idiopathic pleurisy with effusion, presumably tuberculous. *Am Rev Respir Dis*. 1955; 30: 473-502.
 - 7) 日本結核病学会用語委員会: 「新しい結核用語辞典」. 南江堂, 東京, 2008, 64-65.
 - 8) Smith H: Paradoxical responses during the chemotherapy of tuberculosis. *J Inf*. 1987; 15: 1-3.
 - 9) 鈴木恒雄, 豊田恵美子, 可部順三郎: 当院における過去3年間の胸膜結核腫の臨床的検討. *結核*. 1994; 69: 345-350.
 - 10) Yo WC, Seok CJ, Heung SS, et al.: Tuberculous pleural effusion: new pulmonary lesions during treatment. *Radiology*. 2002; 224: 493-502.
 - 11) Al-Majed SA: Study of paradoxical response to chemotherapy in tuberculous pleural effusion. *Respir Med*. 1996; 90: 211-214.
 - 12) Vialseca J, Lopez-Vivancos J, Arnau J, et al.: Contralateral pleural effusion during chemotherapy for tuberculous pleurisy. *Tubercle*. 1984; 65: 209-210.
 - 13) Marshall BG, Chambers MA: Central nervous system tuberculosis: the paradox of the host immune system response. *J Infect*. 1998; 36: 3-4.
 - 14) 三木 誠, 益田公彦, 伊藤邦彦: 肺外結核の診断と治療. *結核*. 2008; 83: 741-749.

————— Case Report —————

A CASE OF TUBERCULOUS PLEURISY DEVELOPING CONTRALATERAL EFFUSION DURING ANTI-TUBERCULOSIS CHEMOTHERAPY

¹Takashi ISHII, ¹Yoshinori MATSUI, ¹Naohiro NAGAYAMA, ¹Naoko HIGAKI,
¹Kazuya TONE, ¹Kei KUSAKA, ¹Mami SENOO, ¹Haruyuki ARIGA
¹Nobuharu OHSHIMA, ¹Kimihiko MASUDA, ¹Hirotohi MATSUI, ¹Shinji TERAMOTO,
¹Akira YAMANE, ¹Atsuhisa TAMURA, ¹Hideaki NAGAI, ¹Shinobu AKAGAWA,
¹Emiko TOYOTA, ¹Shunsuke SHOJI, and ²Yutsuki NAKAJIMA

Abstract A 55-year-old woman was admitted to our hospital because of chest pain, fever, and right pleural effusion that was exudative and lymphocyte-dominant with a high level of adenosine deaminase (ADA). Since her blood QuantiFERON-TB[®]3G test (QFT) was positive, she was diagnosed with tuberculous pleurisy. After initiation of anti-tuberculosis chemotherapy with isoniazid, rifampicin, ethambutol, and pyrazinamide, her symptoms improved. Later, liquid culture of the pleural effusion turned positive for *Mycobacterium tuberculosis*. On the 18th day of treatment, her chest X-ray and computed tomography exhibited pleural effusion in a moderate amount in the left thorax, with subsiding pleural effusion in the right thorax. Thoracentesis demonstrated that the left thorax effusion was also exudative and lymphocyte-dominant, with elevated QFT response and high ADA concentration, suggesting tuberculous pleurisy. *Mycobacterium tuberculosis* was detected in the culture of a left pleural biopsy specimen obtained by thoracoscopy. We assumed that the left pleural effusion was due to paradoxical worsening because (1) on admission no effusion or lung parenchymal lesion was detected in the left hemithorax, (2) on the 14th day of treatment she was

afebrile without pleural effusion on both sides, and (3) the bacilli were sensitive to the drugs she had been taking regularly. We performed drainage of the left effusion and continued the same anti-tuberculosis drugs, which led to the elimination of all her symptoms and of the pleural effusion on both sides. In conclusion, paradoxical worsening should be included in the differential diagnosis when contralateral pleural effusion is detected during the treatment of tuberculosis.

Key words: Tuberculous pleurisy, Paradoxical worsening, Contralateral pleural effusion

¹Department of Respiratory Medicine, ²Department of Respiratory Surgery, Center for Pulmonary Diseases, National Hospital Organization Tokyo National Hospital

Correspondence to: Takashi Ishii, Department of Respiratory Medicine, Center for Pulmonary Diseases, NHO Tokyo National Hospital, 3-1-1, Takeoka, Kiyose-shi, Tokyo 204-8585 Japan. (E-mail: taishii-ky@umin.ac.jp)

Distinct Clinical Features in Nontuberculous Mycobacterial Disease with or without Latent Tuberculosis Infection

Umme Ruman Siddiqi,¹ Haorile Chagan-Yasutan,¹ Chie Nakajima,² Hiroki Saitoh,¹
Yugo Ashino,¹ Osamu Usami,¹ Beata Shiratori,¹ Motoki Usuzawa,¹
Yasuhiko Suzuki² and Toshio Hattori¹

¹Division of Emerging Infectious Diseases, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai, Japan

²Department of Global Epidemiology, Research Centre for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Japan

Nontuberculous mycobacteria (NTM) diseases are in the face of a progressive increase even in immune-competent subjects, and the clinical features of NTM diseases are heterogenous. The decision to institute treatment of the patients should be made after a period of follow up, because therapy is often prolonged, and frequently ineffective. The reasons why some patients develop severe NTM diseases are not clear. Here we observed the involvement of latent tuberculosis infection (LTBI) in clinical and laboratory features of NTM diseases. We evaluated various tuberculosis-related inflammatory markers including osteopontin (OPN), pentraxin-3 (PTX-3), and soluble IL-2 receptor (sIL-2R) in NTM infected patients with or without LTBI. Eight NTM and 5 tuberculosis (TB) patients, and 5 healthy subjects were enrolled. Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis confirmed the absence of tuberculosis specific gene (RD1 region), among clinical isolates from NTM patients. Interferon- γ (IFN- γ) release assay (IGRA) using Early Secreted Antigenic Target-6 (ESAT-6) and CFP-10, the RD1-encoded protein, was employed for determining LTBI. IGRA was positive in 4/8 NTM (NTM with LTBI, 50%) and 5/5 TB patients. Only 2 of 4 NTM with LTBI were under chemotherapy among all NTM patients, and others were followed up. The plasma levels of OPN, PTX3 and sIL-2R were significantly higher in NTM patients with LTBI than in those without LTBI ($P < 0.05$). The two patients under therapy showed the highest OPN levels that persisted after treatment. The increased inflammatory levels in NTM patients with LTBI indicate enhanced inflammatory reaction. Extensive therapy may be necessary in such patients.

Keywords: interferon- γ release assay; nontuberculous mycobacterial disease; latent tuberculosis infection; osteopontin; pentraxin-3

Tohoku J. Exp. Med., 2012, 226 (4), 000-000. © 2012 Tohoku University Medical Press

Infection caused by nontuberculous mycobacterium (NTM), especially by *Mycobacterium avium complex* (MAC), has been increasing in both immunocompromised and immunocompetent individuals in Japan and worldwide (Prince et al. 1989). MAC may cause progressive lung diseases leading to morbidity and mortality in previously healthy patients as well as in patients with pre-existing lung diseases and immunodeficiency (Griffith et al. 2007). Recently, it was reported that progressive lung disease due to MAC is associated with specific variable number of tandem repeat (VNTR) genotypes (Kikuchi et al. 2009) or with the clinical features of cavity formation (Ito et al. 2012). Lung disease due to NTM occurs commonly in structural lung diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), bronchiectasis, cystic fibrosis, pneumoconiosis, prior tuberculosis, pulmonary alveolar proteinosis, and

esophageal motility disorders (Griffith et al. 2007). The detection of both *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and NTM by PCR in a patient was reported in Japan (Takeda et al. 2008) and most patients with MTB and MAC co-infection reported in USA were foreigners (Khan et al. 2010). NTM infection in Japan is frequently observed in elderly people, and elderly people are more frequently latently infected with MTB (LTBI) than young people in Japan and the Philippines (Siddiqi et al. in press), as confirmed by IFN- γ release assay (IGRA) and in Thailand, as confirmed by anti-tuberculous glycolipid (TBGL) assay (Siddiqi et al. 2012). Recently, several studies in different countries showed that the incidence of TB infections examined by IGRA (in most of the cases IGRA ELISA was used) was very low in NTM patients in MTB non-endemic countries (Van Leeuwen et al. 2007; Adams et al. 2008). In contrast,

Received February 23, 2012; revision accepted for publication March 26, 2012. doi: 10.1620/tjem.226.000

Correspondence: Toshio Hattori, Division of Emerging Infectious Diseases, Graduate School of Medicine, Tohoku University, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan.
e-mail: toshatto@med.tohoku.ac.jp

significant percentages of NTM were positive by IGRA in Taiwan and Korea (Wang et al. 2007; Ra et al. 2011). Given the variety of clinical courses of NTM, the effect of LTBI on the clinical and/or laboratory features of NTM should be evaluated.

It is well known that CD4 cells and Th1-mediated signaling molecules and their pathways are important in the defense against NTM infection (Griffith et al. 2007). Recently, it was found that osteopontin (OPN), a pro-inflammatory cytokine secreted by a wide variety of cells including T cells and macrophages and elevated in tuberculosis, is linked with CD4 T helper (Th1) cell lineage stimulation and was reported to regulate *Mycobacterium avium* in cattle (Karcher et al. 2008). It was also claimed that OPN expression correlates with effective immune and inflammatory responses in MAC-infected individuals (Nau et al. 2000). We also measured pentraxin-3 (PTX-3), which is associated with the acute-phase response and involved in innate immunity. PTX-3 is produced from mononuclear phagocytes, dendritic cells, and endothelial cells in response to inflammatory signals. PTX3 binds with high affinity to the complement and activates the classical pathway of complement and facilitates pathogen recognition by macrophages. (Garlanda et al. 2005; Inforzato et al. 2012). The plasma PTX-3 level, which was reported to reflect the degree of inflammation in MTB infection (Azzuri et al. 2005), can be highly expressed *in vitro* on human PBMCs and monocytes stimulated with lipoarabinomannan (LAM) (Vouret-Craviari et al. 1997).

The current study was designed to compare various serological markers that are associated with TB, including OPN, PTX-3, leptin and soluble IL-2 receptor (sIL-2R), in NTM patients with or without LTBI to characterize their status.

Materials and Methods

Study population

All the patients that participated in this study were receiving care at Tohoku University Hospital between January 2008 and July 2010. We enrolled 9 patients (N1-9) who met the 2007 American Thoracic Society (ATS) microbiological criteria for pulmonary NTM diseases (Griffith et al. 2007). Six patients diagnosed as active TB (T1-6) were served as disease controls (Table 1). Among them, 2 patients (N7, T3) were withdrawn themselves from the study. NTM and MTB were confirmed from the site of infection by culture. In addition to culture, we repeatedly tested the samples from patients by PCR (Roche amplicon), and MTB was never detected in the NTM group. All the patients were assessed for clinical features, medical history including prior tuberculosis disease, treatment history and chest CT scan finding. Individuals with HIV/AIDS infection or who were receiving immunosuppressive therapy were excluded from the study. Five healthy volunteers who were without any symptoms relevant to active tuberculosis were enrolled as negative controls. The study was approved by the Ethics Committee of Tohoku University Hospital (2007-136; 2007-257). We obtained written informed consent from all the participants. All work was conducted in accordance with the Helsinki declaration. Plasma was obtained from EDTA-containing blood by centrifugation and was aliquoted to cryotubes and stored at -80°C for future use. Simultaneously, PBMCs were isolated over Ficoll-Paque Plus gradient and suspended in RPMI 1,640 supplemented with 2 mM L-glutamine, penicillin (100 U/ml), gentamycin (5 $\mu\text{g/ml}$) and 10% heat-inactivated FCS (Sigma) for further assay.

All the laboratory data including blood cell counts, erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP) and sIL-2R were measured at Tohoku University Hospital.

RDI PCR analysis

Mycobacterial isolates from 6 NTM patients were kindly provided by the central research laboratory of TUH. DNA was extracted from the clinical isolates as described previously (Nakajima et al.

Table 1. Patients profile and result of IFN- γ release assay (IGRA).

Patients ID	Gender	Age (yr)	Diagnosis	Mycobacteria	Duration of illness	IGRA
N1	M	79	NTM	<i>M. avium</i>	5 yrs	negative
N2	F	76	NTM	<i>M. avium</i>	5 yrs	positive
N3	F	62	NTM	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. fortuitum</i>	6 months	negative
N4	F	83	NTM	<i>M. avium</i>	7 years	negative
N5	F	68	NTM	<i>M. avium</i>	7 yrs	positive
N6	M	43	NTM	<i>M. abscessus</i>	6 months	positive
N8	M	61	NTM	<i>M. avium</i>	13 yrs	negative
N9	F	76	NTM	<i>M. intracellulare</i>	3 yrs	positive
T1	F	78	ETB	<i>M. tuberculosis</i>	2 months	positive
T2	F	71	ETB	<i>M. tuberculosis</i>	1 month	positive
T4	M	65	ETB	<i>M. tuberculosis</i>	1 month	positive
T5	F	32	ETB	<i>M. tuberculosis</i>	1 month	positive
T6	F	57	PTB	<i>M. tuberculosis</i>	1 month	positive

NTM, non-tuberculosis mycobacterium; ETB, extra-pulmonary tuberculosis; PTB, pulmonary tuberculosis.

2010). Briefly, glass beads (0.1 mm), the mycobacteria sample (500 μ l in TE buffer) and 500 μ l Chloroform were put in a 2 ml microcentrifuge tube for and oscillated by a minibeadbeater, at 4,800 rpm for 2 min. The aqueous phase was collected immediately upon centrifugation. DNA was isolated by 80% ethanol precipitation, dissolved in 50- μ l sterile distilled water and stored in -20°C until assay. DNA samples were amplified for the RD1 region (150 bp) by PCR analysis using the same primers described previously (Parsons et al. 2002). DNA from the H37RV strain of *M. tuberculosis* was used as a positive control. PCR was performed with 5 μ l DNA samples in a total volume of 50 μ l of PCR mix, 5 μ l $10\times$ buffer, 4 μ l of 2.5 nM dNTP, 1 μ l of Taq DNA polymerase and 0.2 μ l of each primer (50 pmol/ μ l). The mixture was denatured at 95°C for 5 min and cycled for 45 times at 94°C for 30 s than 62°C for 45 s and 68°C for 45 s followed by a final 10-min extension at 68°C . The PCR product was visualized by UV transillumination of ethidium bromide staining after separation by 2% gel electrophoresis.

IFN- γ release assay (IGRA)

The assay was performed as described previously (Guio et al. 2010). Freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (2.5×10^5 per well) were cultured on plates precoated with antibody against IFN- γ (IGRA ELISPOT, Oxford Immunotech, Oxford UK). After 16 hours stimulation of the cells with Early Secreted Antigenic Target-6 (ESAT-6) and CFP-10, the spots were developed according to the manufacturer's instructions. Spot-forming units (SFUs) were counted with an automated ELISPOT reader (KS ELISPOT Carl Zeiss MicroImaging-Germany). Only when the negative control well contained 5 SFUs or less, we subtracted this value from the SFUs counted in the wells of cells stimulated with MTB-specific antigens. Wells containing 5 SFUs or more were taken as positive as previously described.

Inflammatory markers

Anti-TBGL antibody which recognizes glycolipid (mainly trehalose 6,6'-dimycolate) of MTB and NTMs was measured as described (Mizusawa et al. 2008). The plasma OPN concentrations were determined using Human OPN Elisa kit (Immuno-Biological Laboratories, Takasaki, Japan) as described (Chagan-Yasutan et al. 2009), and the

plasma PTX-3 levels were measured in special reference laboratory (SRL, Hachioji, Japan) (Peri et al. 2000). Values were expressed as ng/ml. Plasma levels of leptin were measured as described (Siddiqi et al. 2012).

Statistical analysis

Data were entered into a Microsoft Excel spreadsheet and then copied into Statcel2 software (OMS, Tokyo, Japan) for statistical analysis. Continuous data were compared between groups by Mann Whitney *U* test and significance was considered a *p* value < 0.05 .

Results

Subjects

Profiles of the patients are listed in Table 1. The NTM patients (43 to 83 years old (y.o.)) were infected predominantly by *M. avium complex* (Table 1) and mostly had pulmonary involvement except N6, who had extra-pulmonary involvement (nasal granulomatosis). The duration of illness was variable, ranging from 2 to 148 months. None of them were infected with *M. marinum*, *M. szulgai* or *M. kansasii*, which are known to possess the RD1 region. All the TB patients included in this study (32 to 78 y.o.) had extra-pulmonary disease except T6 (pulmonary TB). All 5 healthy volunteers (25 to 60 y.o.) were apparently healthy without any TB-related symptoms.

Verification of absence of RD1 region and *M. tuberculosis* strains

Absence of the RD1 region in the DNA samples from the clinical strains of the 6 NTM patients (N1-N6) was confirmed by PCR analysis. No positive band was observed at the 150 bp position for the RD1 region in any of the clinical isolates (Fig. 1).

IGRA and association with the clinical condition

All healthy controls except one were negative for IGRA. Four of 8 NTM patients and all TB patients were

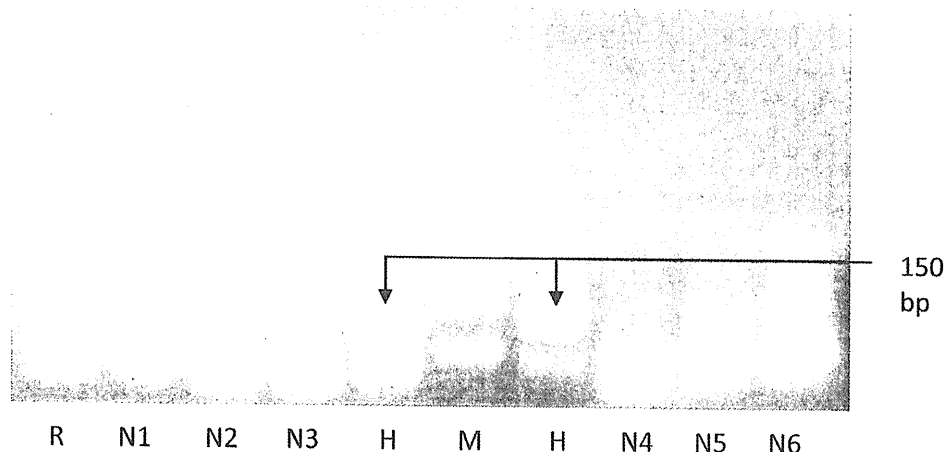


Fig. 1. PCR amplification of RD1 region using DNA obtained from mycobacteria isolated from NTM patients. Arrows indicate the positive bands at 150 bp. N1 to N6, (DNA from 6 NTM patients); H, DNA from *Mycobacterium tuberculosis* (H37RV); M, Marker; R, reagent only.