

- 7) 石川信克：矯正施設における結核のリスクと対策の考え方. 第59回日本矯正医学会総会特別講演; 東京, 2012. 矯正医学. 2013 ; 61 : 33-56
- 8) 河津里沙、石川信克：DOTS のエンパワメント効果に関する検討. 第87回日本結核病学会; 広島, 2012. 結核. 2012; 87: 296

水田渉子 東京都多摩府中保健所
 紺野圭太 北海道帯広刑務所医務課
 臼井久美子 東京都多摩立川保健所
 ※所属は協力年度の所属である

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

<研究協力者> (順不同)

河津里沙	結核研究所特別研究員
内村和広	結核研究所臨床疫学部
野内ジンタナ	結核研究所臨床疫学部
佐々木結花	複十字病院 診療主幹
小林典子	結核研究所対策支援部
村上邦仁子	結核研究所国際協力部
永田容子	結核研究所対策支援部
浦川美奈子	結核研究所対策支援部
星野豊	結核研究所対策支援部
平山隆則	結核研究所対策支援部
大角晃弘	結核研究所臨床疫学部
泉清彦	結核研究所臨床疫学部
吉松昌司	結核研究所臨床疫学部
小野崎郁史	WHOストップ結核部
安江鈴子	ホームレス資料センター
西森卓	ホームレス資料センター
澤田貴志	国際保健協力市民の会
コウ奈々子	結核研究所特別研究員
大西彩香	北海道帯広保健所
小林誠	多摩少年院医務課
坂野知子	東京都多摩府中保健所
橋本絵美	葛飾区保健所
深崎美樹	島根県浜田保健所

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

総合研究報告書

地域結核対策における病原体サーベイランスの確立

分担研究者

御手洗聡 結核予防会結核研究所抗酸菌部

研究要旨

結核菌病原体サーベイランスを確立するため、モデル地域における分子疫学解析システムのセットアップと有用性評価を行い、さらにこれまで実施されていない抗酸菌塗抹検査及びPyrazinamide (PZA)薬剤感受性試験の精度保証に関する基礎検討を行った。

モデル地域（富山）における病原体サーベイランスの確立と有用性評価のため、初年度プロトコルを作成した。また検体収集のため富山県内の保健所との連携会議を実施し、協力について了承を得た。富山県内で分離された結核菌 96 株について、JATA (12)及び JATA (15)-VNTR 解析を行った。特定の株がまん延しているという状況は見られなかった。また、分子疫学解析及び集団感染疑い事例において、JATA (12)及び JATA (15)-VNTR が有用である可能性が示された。今後解析株数を増やすことで、富山県において新興型の株が若年層や外国籍の患者から有意に多く分離されるかどうか明らかになると思われた。

結核菌病原体サーベイランスの重要項目である薬剤耐性結核の現状を把握する目的で、検査センターが大量に実施していて、疫学的には全く利用されていない薬剤感受性試験データを二次利用して解析を試みた。現在日本の結核菌薬剤感受性試験の 5～7 割は検査センターで実施されていると推定され、M/XDR-TB の推移を含めて本邦の結核菌薬剤耐性の現状を理解するのに有用と考えられた。このような有用な情報を単に個別の症例にのみ還元するのではなく、精度保証との組み合わせでサーベイランスに利用することは、費用対効果の面からも重要と考えられた。

抗酸菌検査の精度保証に関して、2011 年度に従来法に従って主要 4 薬剤の薬剤感受性試験外部精度評価を行い、ほぼ従来通りの高精度が確認された。また、これまで取り込まれていなかった塗抹検査についても試験的に外部精度評価を実施し、精度上の問題点を指摘可能であることを示した。PZA の感受性試験については細菌学的新知見が得られており、検査精度の向上と外部精度評価実施の際の基礎情報が蓄積された。

今回の研究では地域分子疫学のセットアップ過程と、その有用性が示され、今後同様のシステムの立ち上げを考えている地域の参考になると思われた。また、検査センターでルーチンに産生される感受性試験データが薬剤耐性サーベイランス上も有用であることを示した。さらに検査の精度保証を実施することが信頼できるサーベイランスの根幹であることが示されたと考える。

研究協力者

金谷潤一・磯部順子・佐多徹太郎 富山県衛生研究所

玉井清子・柳沢英二 株式会社ミロクメディカルラボラトリー

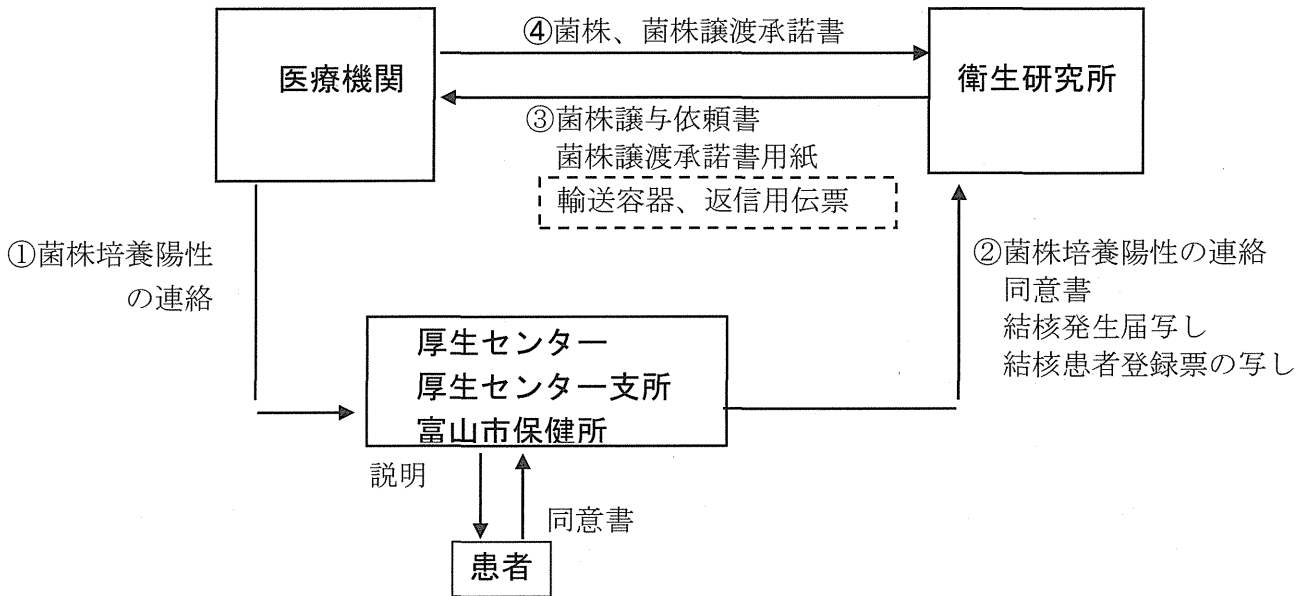
霜島正浩 株式会社 ビー・エム・エル

渋谷俊介 三菱化学メディエンス株式会社

加藤朋子、三浦隆史、村瀬良朗 結核予防会結核研究所抗酸菌部

青野昭夫、近松絹代、山田博之 結核予防会結核研究所抗酸菌部

○医療機関において結核菌を分離、培養した場合



○検査機関において結核菌を分離、培養した場合

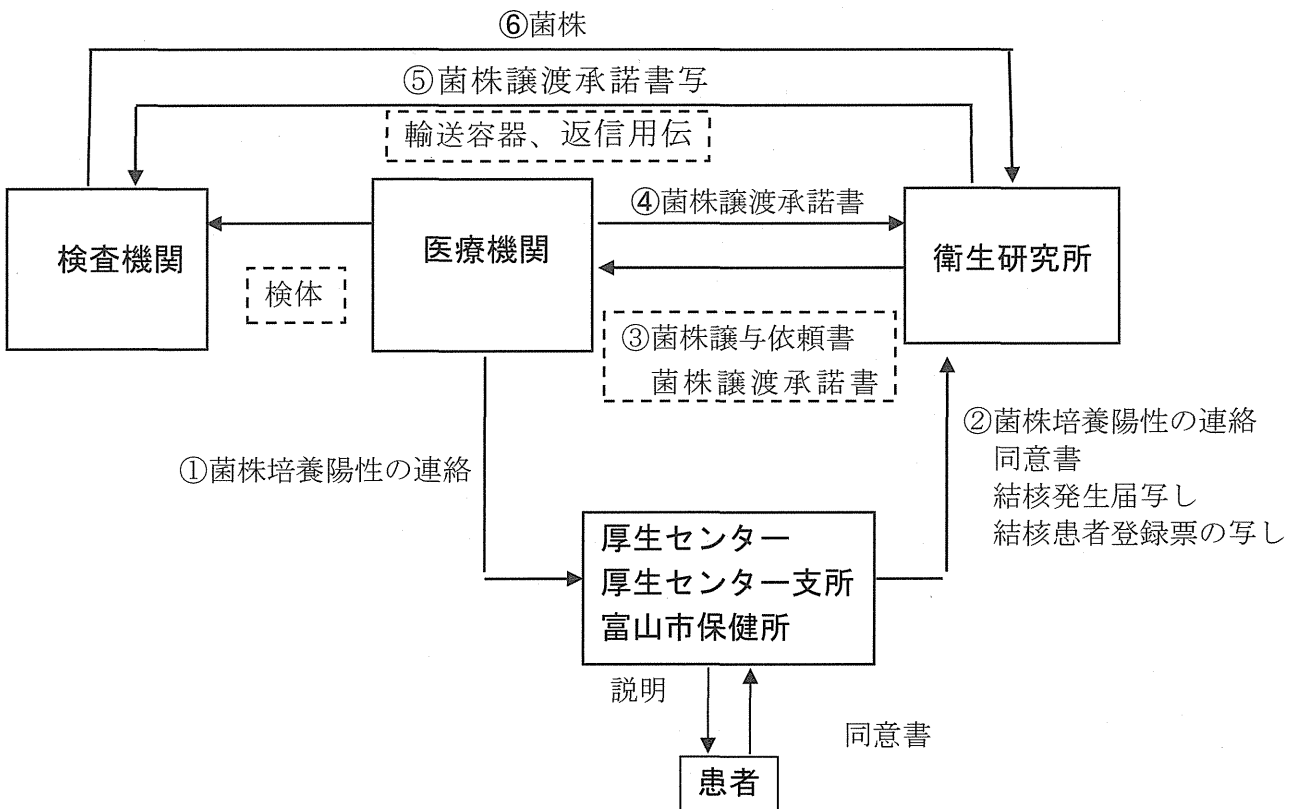


図 1. 結核菌分子疫学調査のフローチャート

A. 研究目的

結核の病原体サーベイランスには、分子疫学解析と薬剤耐性調査の二つの重要な因子が含まれる。しかしながら、日本では確立した病原体サーベイランスシステムが存在しないため、これらの調査・研究は一部地域で散発的に行われているのみであり、必ずしも一般化していない。

これらの状況をふまえ、この研究では地域分子疫学調査システムの確立と評価、薬剤耐性調査とその精度保証に寄与することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

【地域結核病原体サーベイランス】

《富山県内での結核菌分子疫学調査体制の確立》

2012年の日本における結核罹患率は16.7/10万人であり、漸減傾向ではあるが依然として中まん延国である。結核患者の多くは高齢者であることから、過去の高まん延期の感染が強く影響していると思われるが、一方で新たに感染した青年層の罹患も無視できない。富山県の結核罹患率は12.9であり、全国平均(16.7)より低いものの、高まん延地域である東京や愛知、大阪と地理的な距離が均等であり、結核罹患に関して地理的にユニークである。

本研究では、富山県における結核菌のまん延実態とその動向を把握することを目的とし、結核菌の疫学調査のデータとともに Variable Numbers of Tandem Repeat (VNTR) による分子疫学調査を実施する。また本研究において構築されるデータベースが、隠れている集団発生 of 早期探知に有用となる可能性についても検証する。

〔対象患者及び菌株〕

本調査の対象は、富山県内で発生した塗抹陽性患者から分離された結核菌のうち、患者の同意を得られた菌株を研究対象とする(診断時に患者から分離された結核菌株を対象とし、1患者から1株とする)。

〔菌株の分離と輸送〕

結核菌の分離は通常の結核診断の一部として実施されるものとする。分離された結核菌は、結核菌と同定された直後に四種病原体として富山県衛生研究所細菌部職員が医療機関から衛生研究所へ自動車で搬入する。輸送には国連容器を使

用し、三重包装にて搬送する。なお国連容器は研究費より支出する。

結核診療施設が独自の微生物検査室を有していない場合、外注先と事前に連絡し、分離菌株の保管と輸送を依頼する。その際の輸送には国連容器を使用し、四重包装にてゆうパックのシステムを利用して送付する。

〔DNA抽出〕

2%小川培地に発育した結核菌を鈎菌し、100 µl の Instagene Matrix (Bio-Rad Laboratories) に懸濁後 100°C で 10 分加熱し、遠心上清をプレートとして用いた。

〔遺伝子タイピング法〕

VNTR 法を使用する。解析に使用するローカスは、結核研究所が配布した VNTR スターターキット Ver. 2 により、以下のローカスとする。

JATA (12) : VNTRs-0424、0960 (MIRU10)、1955、2074、2163b (QUB11b)、2372、2996 (MIRU26)、3155 (QUB15)、3192 (MIRU31)、3336、4052 (QUB26) および 4156

JATA (15) のための追加プライマー: VNTR-1982 (QUB18)、2163a (QUB11a) および ETR-A

〔検体に付随する臨床情報〕

疫学研究指針に基づいた場合、基本的には個人が特定できないように一部の情報を利用不可とする必要がある。具体的には住所、氏名等がこれに当たると考えられる。したがって、疫学研究指針に基づく場合は、年齢、性別、居住地域(町名まで)、居住年数、過去の結核高まん延地域(東京、大阪、愛知)での居住歴を情報として収集する。

感染症法及び特定感染症予防指針が規定する積極的疫学調査あるいは病原体サーベイランスとして保健所が主体となり、行政調査として実施する場合は疫学研究指針には抵触しないため、接触者健診目的に収集した全ての臨床情報を使用できるものと考えられる。しかしながら、これを公表しようとする場合は、個人情報保護の観点から個人は匿名化されるべきである。

〔遺伝子タイピングと臨床情報の解析〕

結核菌株から得られた遺伝子タイピング情報を患者間で相互比較し、同一の VNTR パターンを示す菌株群をクラスターとする。同一の菌株で発症していると思われる症例については、疫学的な

つながりがあるかどうかを検討する。

[結核菌株の型別]

北京型及び非北京型の分類は、Warren らの方法に従い PCR で行った¹⁾。さらに北京型株については、PCR で祖先型及び新興型に分類した²⁾。

《日本全国で分離された結核菌の遺伝子型解析》

結核の地域分子疫学を理解するためには、その周辺地域を含む広範なエリアでの結核菌の遺伝子型分布状況を知ることも必要である。これまでに国内のさまざまな施設でMIRU-VNTRが実施されてきたが、これらのサンプリングはその施設が所在する地域に限定されていることが多い。日本全体の結核の流行状況を把握するためには、全国から網羅的にサンプリングを行う必要がある。

本研究では、日本全国から収集された987株についてMIRU-VNTR 36 lociの大規模調査を行った。

[対象となる結核菌株]

2010～2011年に株式会社ミロクメディカルラボラトリーにおいて分離され、結核研究所に譲渡された結核菌1,720株のうち1,012株を無作為に抽出した。都道府県あたりの検体数は1～167株であった(10県は検体なし)。2%小川培地上に発育がみられた987株からDNAを抽出し、以降の実験に使用した。

[結核菌遺伝子タイピング (VNTR)]

VNTR 解析は既報にしたがって実施した(Maeda et al. Kekkaku. 2008)。検討した locus は、0154, 0424, 0577, 0580, 0802, 0960, 1612, 1644, 1895, 1955, 1982, 2059, 2074, 2163a, 2163b, 2165, 2347, 2372, 2401, 2461, 2531, 2687, 2996, 3007, 3155, 3171, 3192, 3232, 3239, 3336, 3690, 3820, 4052, 4120, 4156 および 4348 の 36 loci とした。各 PCR 産物は 2%アガロースゲル電気泳動または QIAxcel (QIAGEN) を用いてサイズを同定し、Maeda らの報告にある換算表に基づいてコピー数を決定した。PCR 増幅不良がみられた検体については、アニーリング温度を 63°C から 60°C に下げ、あるいは Type-it microsatellite (QIAGEN) を用いて PCR を行った。最終的に増幅産物が得られなかった検体については増幅不良とした。また、PCR 増幅産物のサイズが 1,000 bp 以上で、サイズの同定が困難な検体については、確実にサイズが同定できるリピート数までを同定し、それ以上のもの

は">15"といった形で処理した。

[VNTR データ解析]

VNTR データの解析には BioNumerics (Applied Math)を用いた。地域別、年代別に MST を作成し、クラスター形成が見られるか検討した。また、MIRUplus を用いて系統の解析を行った。

【広域薬剤耐性調査 (2011 及び 2012 年度)】

全国から結核菌検査を受託している検査センターである株式会社ミロクメディカルラボラトリー (ミロク)、三菱化学メディエンス株式会社 (三菱化学)、及び株式会社ビー・エム・エル (BML) における薬剤感受性試験データを収集し、解析した。なお、薬剤感受性データは基本的に Isoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Streptomycin (SM)及び Ethambutol (EB)について収集することとするが、検査センターが使用する薬剤感受性キットによっては二次抗結核薬が含まれており、そのため一部の検体については Ethionamide (TH)、Kanamycin (KM)、Enviomycin (EVM)、Para-aminosalicylate (PAS)、Cycloserine (CS)及び Levofloxacin (LVFX) のデータの解析も実施した。さらに Multi-drug resistant *M. tuberculosis* (MDR) と Extensively drug-resistant *M. tuberculosis* (XDR)の頻度についても解析した。

【抗酸菌検査精度保証】

I. 抗酸菌塗抹検査外部精度評価 (2011 年度)

[目的]

1. パネルテスト (既知検体による精度試験) により抗酸菌塗抹検査の精度を評価すること。
2. パネルテストの実践性を評価すること。

[参加要件]

1. 実施要項に同意し、定められた期間内に結果を返送可能であること。
2. 参加する施設は、①施設名、②担当者名、③通信用メールアドレスをコーディネーターに連絡する。

[検査検体]

結核研究所で開発した人工痰あるいは人工痰に不活化した結核菌を混じた検体を塗布したスライドガラス (火炎固定済み) 5 枚を参加施設に送付する。

[検査方法]

上記のスライドをそれぞれの施設で通常使用している抗酸菌染色法にて染色し、鏡検する。結果は結核菌検査指針に従って、簡易法（-, ±, 1+, 2+, 3+）にて記録する。

[結果の返送]

上記の方法で記録した結果を、フォーマットに従ってエクセルファイルに入力し、電子メールにてコーディネーターに送付する。結果の返送は検体受領後1週間以内とする。結果の返送を受けて、標準予定結果を送付する。

[結果の評価]

それぞれのスライドの判定結果について、標準予定結果と比較評価する。結果が一致している場合と陽性度が1段階異なる場合を「一致:Correct」と判定する。陽性の判定であって、陽性度に2段階以上の差がある場合「定量エラー:QE」とする。

陰性検体を「±」と判定した場合は「低偽陽性:LFP」、「±」を陰性と判定した場合は「低偽陰性:LFN」とする。陰性検体を「1+」以上と判定した場合は「高偽陽性:HFP」、「1+」以上の陽性度の検体を陰性と判定した場合は「高偽陰性:HFN」とする。

LFN = low false negative

HFN = high false negative

LFP = low false positive

HFP = high false positive

QE = quantification error

HFN、HFP 及び LFP に 0 点、LFN と QE に 5 点、Correct に 10 点を付与し、合計の点数を評価する。また間違いの起こりやすさの傾向など評価する。

[結果の解析]

全ての参加施設のデータについて、陽性度別一致率等を総合評価する。また、同時に実施する実践性に関する調査についてもまとめて評価する。

II. 結核菌薬剤感受性試験外部精度評価（2011 年度）

[目的]

Proficiency testing（感受性結果既知の結核菌株によって構成されたパネルテスト）により、結核菌の薬剤感受性試験精度を評価する。

[参加要件]

感染症法の要求する施設基準を満たして結核菌薬剤感受性試験を実施している施設全てを対

象とする。基本的には参加は任意であり、外部精度評価への参加依頼を実施プロトコールとともに送付し、諾とした施設のみに検査用の検体を送付する。

[送付する検体（結核菌株）]

結核菌 10 株を 0.5ml の液体培地中に懸濁した状態で送付する。今回送付する菌株は Supra-national Reference Laboratory Network（SRLN・29 施設）で実施された薬剤感受性試験外部精度保証プログラムにおいて、基本的に施設間で 80%以上の判定一致率を示した菌株であり、その一致した評価を感受性・耐性の基準とする。

送付する菌株の中には薬剤耐性株が含まれているが、感染症法の規定により多剤耐性結核菌の運搬が極めて困難であるため、被検菌に多剤耐性結核菌株を使用しない。しかしながら、他の耐性は存在するため、取り扱いには十分なる注意を要する。なお、被験菌は国連容器を用いて三重包装とし、ゆうパックにて郵送する。

[試験薬剤]

検査薬剤は、結果の安定性を考慮して Isoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Ethambutol (EB)および Streptomycin (SM)とする。なお、昨年度より Levofloxacin (LVFX)を評価対象薬剤として追加しているが、LVFX の検査実施は必須ではなく任意とする。

[感受性試験方法]

基本的に各施設で日常実施している方法で感受性試験を行う。調査用紙に感受性試験に関するいくつかの事項を記入し、検査結果とともにコーディネーター宛報告する。

[結果の返送]

薬剤感受性試験のコーディネーターへの報告は被験菌受領から3ヶ月以内とする。やむを得ず3ヶ月を越える場合には前以てコーディネーターへ連絡する。

[結果の評価]

それぞれの菌株の薬剤感受性試験の結果は「耐性」あるいは「感受性」のいずれかとして判定する。尚、報告用紙に記入する際は、感受性には S、耐性には R を用いて表記する。

MIC を用いて試験を行っている施設について、I と判定された場合は R か S かのどちらか各施設にて判定する。さらに測定した MIC の値を併記す

る。複数の方法について評価を希望する場合は、それぞれの結果を別々の用紙に記載する。

[結果の解析]

データについては「感度」、「特異度」、「耐性的中率」、「感受性的中率」、「一致率」及び「 κ 指数」を計算し評価する。ここで感度とは、SRLN で耐性と判定した株を正しく耐性と判定する割合であり、特異度とは同様に SRLN で感受性とした株を正しく感受性と判定する割合である。耐性的中率とはある菌株を「耐性」と判定した時、その判定が正解である確率であり、同様に感受性的中率とはある菌株を「感受性」とした時の正解率である。一致率は SRLN との判定の一致の割合を示す。

解析結果については個々の解析が終了した時点（結果報告直後）で各施設に個別に通知する他、参加全施設の結果を総合した報告書を送付する。また、日本結核病学会において委員会報告/論文として報告する。総合報告書では施設名を匿名化し、個々の施設が特定されないようにする。

[被検菌の処理]

被検菌は各施設にて検査終了後廃棄する。

[その他]

検査の安全性に配慮し、感染症法の定める結核菌取扱基準を満たしている施設のみ参加可能とする。

III. Pyrazinamide 薬剤感受性試験評価方法の検討 (2012～2013 年度)

[目的]

Pyrazinamide (PZA)は主要な抗結核薬のひとつであるが、外部精度評価の方法が確立していない。今回、精度評価を実施する上での基礎的検討を目的とした。

[対象検体]

2002～2007 年の全国調査で収集され、多剤耐性結核菌 (MDR-TB) と判定された 83 株の結核菌を使用した。

[感受性試験方法]

PZA 薬剤感受性試験法 (Phenotype) および *pncA* 遺伝子変異 (Genotype) について比較検討した。Phenotype として BACTECT™ MGIT™ 960 PZA Kit (MGIT PZA AST: 日本ベクトンディッキンソン) 及び PZase 試験 (結核菌検査指針 2007 に準拠) を実施し、Genotype として *pncA* のシーケンス

解析を Sreevatsan らの方法に従って実施した³⁾。

それぞれの方法の結果を相互に比較検討した。

C. 研究結果

【地域結核病原体サーベイランス】

《富山県内での結核菌分子疫学調査体制の確立》

[疫学調査要綱の作成]

本調査を実施するにあたり、個人情報の一部を利用するという観点から、当所で設置している研究倫理審査委員会へ審査を申請した。これら一部の臨床情報の利用には書面で患者の同意を得ることで承認された。

一方、この研究に関しては、集団発生の早期探知のために行政的検査の一環として利用することとした。従って、塗抹陽性患者の同意書は、県の健康課や各厚生センター、富山市保健所と協議し、それぞれ管轄の担当者が患者への聞き取り調査の際に、提出をお願いすることとした。また、医療機関は、自施設で結核菌を分離する施設と、菌分離を外部委託する施設があるので、それぞれの場合に応じた手順を作成した (図 1)。

[医療機関への説明]

富山県内の医療機関で分離された結核菌株を収集するため、平成 24 年 2 月から 3 月にかけて各医療機関に出向き、担当の医師、看護師、臨床検査技師らに本調査の概要を説明した。県内 24 か所の医療機関に菌株の分与を依頼した結果、全てから本調査への協力を得ることができた。複数の医療機関では、本調査に協力するにあたり、それぞれの機関で設置している研究倫理審査委員会での対応を依頼した。

[JATA-VNTR の実施]

平成 26 年 1 月末までに、10 か所の医療機関から 100 株の結核菌を収集し、96 株について JATA (12)及び JATA (15)-VNTR を実施した。95 株は全てのローカスで増幅産物が得られ、型別可能であった。残りの 1 株は 2163b (QUB11b)、2163a (QUB11a)および ETR-A のローカスで増幅産物が得られなかった。JATA (12)では 81 のクラスターに分類され、クラスター形成率は 24.0%、JATA (15)では 86 のクラスターに分類され、クラスター形成率は 19.8%であった (表 1)。

疫学的に関連があると推定された 6 事例について JATA (12)及び JATA (15)-VNTR を実施した結果、

3 事例は 12 か所及び 15 か所全てのローカスで一致した (表 2)。残りの 3 事例は 2 か所及び 3 か所以上のローカスで異なる反復数であった。

一方、疫学的関連のない株が同じクラスターに分類されたものが JATA (12) -VNTR では 23 株 (10 クラスター)、JATA (15)-VNTR では 19 株 (9 クラスター) 検出された。

[結核菌株の型別]

解析した 96 株のうち、65 株 (67.7%) が北京型に分類され、さらにそのうち 55 株が祖先型 (84.6%)、10 株が新興型 (15.4%) に分類された (表 3)。

新興型の株について見ると、過去に東京での居住歴のあった患者の 44.4% (4/9 株)、40 歳未満の 38.5% (5/13 株)、外国籍の 42.9% (3/7 株) を占めた。一方、過去に東京での居住歴がなかった患者の 6.9% (6/87 株)、40 歳以上の 6.0% (5/83 株) および日本国籍の 7.9% (7/89 株) が新興型の株であった。

《日本全国で分離された結核菌の遺伝子型解析》

1,012 株のうち、最終的に非結核性抗酸菌と同等された 7 株、発育不良 13 株、雑菌汚染 5 株を除いた 987 株について VNTR を行った。男性 486 名、女性 298 名、年齢不明 203 名であり、年齢情報がある患者の平均年齢は男性で 65.8 歳 (366 人)、女性で 67.2 歳 (232 人) であった。

地域別のサンプル数を図 3 に示した。地域 の定義は以下の通りとした。

1. 北海道・東北: 北海道, 青森, 岩手, 秋田, 宮城, 山形, 福島
2. 関東: 新潟, 茨城, 栃木, 群馬, 埼玉, 千葉, 東京, 神奈川, 山梨
3. 中部: 富山, 石川, 福井, 長野, 岐阜, 静岡, 愛知
4. 近畿: 三重, 滋賀, 京都, 大阪, 兵庫, 奈良, 和歌山
5. 中国・四国: 鳥取, 島根, 岡山, 広島, 山口, 徳島, 香川, 高知, 愛媛
6. 九州・沖縄: 福岡, 佐賀, 長崎, 大分, 熊本, 宮崎, 鹿児島, 沖縄

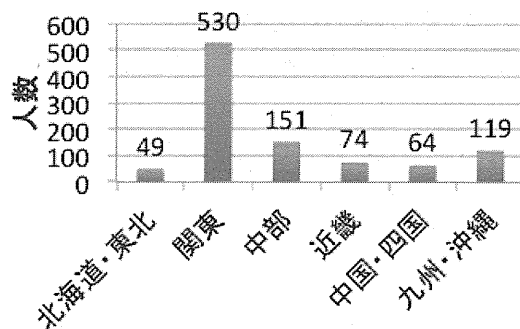
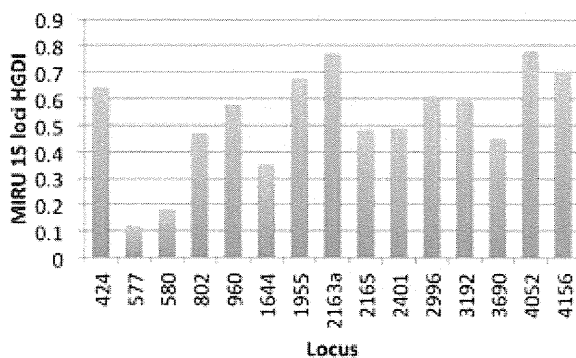
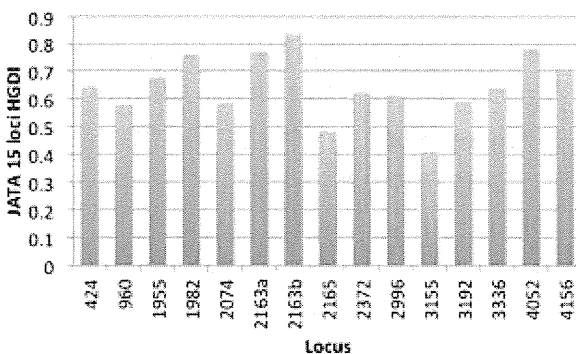


図 3 地域別サンプル数

36 loci の分解能 (HGDI) を図 3 に示した。36 loci のうちもっとも分解能が高かったのは 4120 で 0.901、最も低かったのは 1612 で 0.022 であった。これらのローカスのうち、MIRU 15-loci および JATA 15-loci の組み合わせを図 4 に示した。MIRU 15-loci の HGDI は 0.120~0.783 に分布しており、平均で 0.528 であった。一方、JATA 12-loci の HGDI は 0.410~0.836 に分布し、平均で 0.648 と MIRU 15-loci と比べて高い分解能を示した。



A; MIRU 15-loci



B; JATA 15-loci

図 4 MIRU 15-loci (A) および JATA 15-loci (B) の各ローカスでの分解能 (HGDI 値)

2163a および 2163b は分解能が高いが、それぞれ 4.9% および 4.5% で増幅不良となった。3336 も分解能が比較的高いが 2.6% で増幅不良が認められた。2163a と 2163b で増幅不良だった検体のうち 33 検体が同一であった。

MST を作成し、いくつかのクラスターが認められたが、いずれのクラスターにおいても、地域ごとの偏りは見られなかった。また年齢別に見ても VNTR 遺伝子型に偏りは認められなかった。

【広域薬剤耐性調査 (2011 及び 2012 年度)】

2011 年にミロク、三菱化学及び BML にて実施された薬剤感受性試験結果を提供して頂いた。検査数はそれぞれ 1,717 件、352 件、8,524 件であり、総数として 10,593 件となった。検体番号等から同一患者由来と思われる結果の重複を削除し、さらに 2010 年の結核発生動向調査の結果を基に地域間の検体数の重み付けを行い、最終的に 3,184 件の結果を解析した。

3,184 件のうち、男性は 1,812 (56.9%) 例、女性は 1,000 (31.4%) 例であり、性別不明の検体が 421 (13.2%) 認められた。また平均年齢は 68.2±19.4 歳であり年齢不明が 967 (30.4%) 例あった。日本全国を 6 ブロック (北海道東北、関東甲信、中部北陸、近畿、中国四国、九州) に分割し、それぞれの罹患数から検体の分布を調整した結果、それぞれの地域の検査件数は 251、1,102、513、680、257、381 となった。

各薬剤の全体の耐性率は以下の通りであった : INH; 4.8%, RFP; 1.0%, SM; 6.6%, EB; 0.9%, TH; 0.5%, KM; 0.4%, EVM; 0.5%, PAS; 0.9%, CS; 0.3%, LVFX; 2.0%, MDR; 1.0%, XDR; 0.3%

今回のデータでは INH、RFP、SM 及び EB に関する Any resistance が 9.9% という結果であった。これは 2011 年の 9.3% と比較して有意差のない結果であった (Chi square test; $p=0.405$)。

2012 年中にはミロク及び BML にて実施された薬剤感受性試験結果を提供して頂いた。検査数はそれぞれ 1,490 件及び 1,630 件であり、総数として 3,120 件となった。2011 年度と同様に検体番号等から同一患者由来と思われる結果の重複を削除し、さらに 2011 年の結核発生動向調査の結果を基に地域間の検体数の重み付けを行い、最終的に 1,651 件の結果を解析した。

1,651 件のうち、男性は 939 (63.0%) 例、女性は 552 (37.0%) 例であり、性別不明の検体が 210 (14.1%) 認められた。また平均年齢は 67.7±20.4 歳であり年齢不明が 360 (24.1%) 例あった。日本全国を 6 ブロック (北海道東北、関東甲信、中部北陸、近畿、中国四国、九州) に分割し、2011 年のそれぞれの罹患数から検体の分布を調整した結果、それぞれの地域の検査件数は 120、583、259、353、139、197 となった。

各薬剤の全体の耐性率は INH; 5.15%, RFP; 0.91%, SM; 5.15%, EB; 0.61%, TH; 0.30%, KM; 0.36%, EVM; 0.73%, PAS; 0.61%, CS; 0.06%, LVFX; 2.18%, MDR; 0.97%, XDR; 0.36% であった。MDR は 15 株同定されており (地域補正前)、INH/RFP 以外の薬剤に対する耐性率は以下の様になった : SM; 53.3%, EB; 40.0%, TH; 26.7%, KM; 20.0%, EVM; 6.7%, PAS; 26.7%, CS; 6.7%, LVFX; 33.3%, XDR; 6.7%。

2012 年のデータでは INH、RFP、SM 及び EB に関する Any resistance が 9.87% という結果であった。これは 2011 年の 9.9% と比較して有意差のない結果であった。

2009~2012 年の耐性率の変化 (INH、RFP、SM、EB、LVFX のみ) をみると、基本的に LVFX 以外の薬剤耐性率は低下傾向であった (Armitage 傾向性解析にて $p<0.01$ 。LVFX のみ傾向性なし)。

【抗酸菌検査精度保証】

I. 抗酸菌塗抹検査外部精度評価 (2011 年度)

結核研究所にて開発した人工痰を使用した抗酸菌塗抹パネルテストスライドによる抗酸菌塗抹検査外部精度評価を試行した。今回研究に参加したのは病院検査室 (83 施設) 及び検査センター (病院内ブランチラボを含む・4 施設) の計 87 施設であった。

塗抹検査に使用された染色法はチール・ネールゼン (Z-N) 染色が 56 施設、蛍光法 (オーラミン O 染色、オーラミン・ローダミン染色、アクリジンオレンジ染色) が 31 施設であった。少なくとも 2 施設が蛍光法と Z-N 法の両方を使用したことを報告している。一部の施設からスライド番号が読みづらいとの指摘があったが、最終的には全ての番号が予定番号と一致し、評価が可能であった。また送付に関連して検体の破損や紛失は報告さ

れていないが、一部の地域で遅配があった可能性がある。

送付した検体は陽性度-、±、1+、2+、3+各1枚の計5枚であった。全体では判定一致405枚(93.1%)、低偽陰性26枚(6.0%)、低偽陽性2枚(0.5%)、高偽陽性・陰性各1枚(各0.2%)という結果であった。評価点数をみると50点が59施設(67.8%)、45点が25施設(28.7%)、40/35/30点がそれぞれ1施設(各1.1%)であった。平均点は 48.0 ± 3.4 (30-50)であった。また±を陰性(-)と判定した施設が26施設(同陽性度の29.9%)認められた。

検査方法をZ-N法と蛍光法に分けて解析した。Z-N法による結果は56施設(280枚)分であり、蛍光法は31施設(155枚)分である。

チール・ネールゼン染色による結果を見ると、判定一致253枚(90.4%)、低偽陰性23枚(8.2%)、低偽陽性2枚(0.7%)、高偽陽性・陰性各1枚(各0.4%)という結果であった。評価点数をみると50点が31施設(55.4%)、45点が22施設(39.3%)、40/35/30点がそれぞれ1施設(各1.8%)であった。平均点は 47.2 ± 3.9 (30-50)であった。また±を陰性(-)と判定した施設が23施設(同陽性度の41.1%)認められた。

これに対して、蛍光染色による鏡検を実施した施設は31施設あり、判定一致152枚(98.1%)と低偽陰性3枚(1.9%)という結果であった。評価点数をみると50点が28施設(90.3%)、45点が3施設(9.7%)であった。平均点は 49.5 ± 1.5 (45-50)であった。また±を陰性(-)と判定した施設は3施設(同陽性度の9.7%)認められた。Z-N法と蛍光法で低偽陰性(±を陰性と判定する誤り)率を比較したところ $p=0.007$ (カイ2乗検定・Yates補正值)であり、統計的に有意差を認めた。陽性・陰性の判定だけで比較したところ、Z-N法の感度(陽性検出率)は65.6%(147/224)であり、蛍光法の感度は72.6%(90/124)であった。

II. 結核菌薬剤感受性試験外部精度評価(2011年度)

計89施設(病院検査室59施設、検査センター25施設、地方衛生研究所5施設)の参加を得た。平成24年2月28日現在で全施設から回答を受領した(回収率100%)。

89施設に対して全部で結核菌890株を送付したが、1施設について1株(XV-3412)が発育不良であった。その他の検査室では発育不良菌は報告されていない。また今回使用した結核菌10株のIsoniazid(INH)、Rifampicin(RFP)、Streptomycin(SM)、Ethambutol(EB)、Levofloxacin(LVFX)に関するパネル内耐性率は、それぞれ40%、30%、40%、30%、30%であった。

今回のパネルテストでは、INH、RFP、SM及びEBについては全ての施設が回答し、LVFXについては78施設(87.6%)から回答を受領した。参加施設間で一致率が80%を下回る株は認められず、最低でもLVFXで89.7%であった。相対的に最も一致率の低かったXV-24とXV-752株のLVFX感受性についてみると、MICが0.5 µg/mlでありLVFXの基準濃度に近かった。

薬剤別にはINHの感度、特異度、一致率、κ指数の平均がそれぞれ $99.7 \pm 2.6\%$ 、 $99.4 \pm 3.0\%$ 、 $99.6 \pm 0.6\%$ 及び 0.991 ± 0.053 であった。同様にRFPでは感度 $98.9 \pm 6.0\%$ 、特異度 $99.7 \pm 2.1\%$ 、一致率 $99.4 \pm 2.8\%$ 、κ指数 0.987 ± 0.067 であり、SMでは感度 $99.4 \pm 3.7\%$ 、特異度 $99.4 \pm 3.0\%$ 、一致率 $99.4 \pm 2.3\%$ 、κ指数 0.988 ± 0.048 であった。EBでは感度 $95.9 \pm 13.1\%$ 、特異度 $95.2 \pm 12.9\%$ 、一致率 $95.4 \pm 9.7\%$ 、κ指数 0.892 ± 0.193 であり、感受性株を耐性と判定した例が30件であったのに対して、耐性菌を感受性と判定した例が11例認められた。LVFX(78施設)では感度 $99.6 \pm 3.8\%$ 、特異度 $96.7 \pm 8.6\%$ 、一致率 $97.6 \pm 6.1\%$ 、κ指数 0.943 ± 0.124 であり、EBと同様に感受性株を耐性と判定した例が18件であるのに対して、耐性菌を感受性と判定したのは1件のみであった。

施設属性別にみた結果では、地方衛生研究所(5施設)が全ての薬剤に対して100%の精度を示した。検査センター(25施設)ではINH及びRFPに対する精度は全ての指標で100%であったが、SMで特異度が平均98.7%(83.3-100)であった。またEBの感度が平均98.7%(66.7-100)、特異度が平均97.1%(42.9-100)であった。病院検査室(59施設)でのINHの感度は平均99.6%(75.0-100)であり、RFPでは平均感度98.3%(66.7-100)であった。SMの感度は平均99.2%(75.0-100)であったが、EBの精度は感度、特異度、一致率、κ指数それぞれで平均94.4%(33.3-100)、93.9%(42.9-100)、

94.1% (60.0–100)及び0.862 (0.310–1.000)であった。

今回のデータセットについて世界保健機関の合格基準(INH及びRFPで感度・特異度95%以上、全ての薬剤で一致率90%以上)を適応すると、75施設(84.2%)が基準に達した。またINH、RFP、SM及びEBの4剤について全て一致した施設は60施設(67.4%)であった。

III. Pyrazinamide 薬剤感受性試験評価方法の検討 (2012～2013年度)

対象83株のうち、雑菌混入を理由に3株を除外し、計80株について結果を得た(表4)。

MGIT ASTでPZA感受性と判定されたのは31株(38.8%)、耐性と判定されたのは49株(61.2%)であった。MGIT PZA AST感受性の31株はすべてPZase試験陽性・*pncA*変異陰性であった。耐性を示した49株のうち、*pncA*変異陽性・PZase試験陰性の株が39株(79.6%)、*pncA*変異陰性・PZase試験陽性を示した株が6株(12.2%)、*pncA*に変異を認めたもののPZase試験陽性を示したものが1株(2%)認められた。

*pncA*を標的とするPCRで増幅産物が得られなかった3株(6.1%)で、*pncA*の上流側および下流側へ、増幅産物が得られる領域の検索を実施した。菌株33はRv2040とRv2047で、菌株47はRv2041とRv2045で、菌株61はRv2031とRv2046でPCR増幅産物を得ることができた。次にそれぞれの株において増幅が確認できた上流側のforward primerと下流側のreverse primerを用いてPCRおよびダイレクトシーケンスの結果から、これら3株において*pncA*を含む広い領域での遺伝子の欠損を認めた。すなわち菌株33ではRv2041からRv2046までの4,475bpの欠損を、菌株47ではRv2042からRv2044までの1,565bpの欠損を認め、さらに菌株61ではRv2037からRv2045までの6,258bpの欠損を認めた。

D. 考察

【地域結核病原体サーベイランス】

《富山県内での結核菌分子疫学調査体制の確立》

収集した結核菌96株を用いて、JATA(12)及びJATA(15)-VNTRの評価を行った。クラスター形成率は、過去に全国の収集株で行われたJATA(12)-VNTRの結果(12.6%)より高かったが、RFLP

の結果(18.5%)と同等であった⁴⁾。ある一定の地域で解析するとクラスター形成率が高くなることが報告されており、東京都の収集株のクラスター形成率はJATA(12)-VNTRで45.9%、JATA(15)-VNTRで36.3%である⁵⁾。これは他の地域でも同様の傾向であり、ある一定の地域内での分子疫学解析にはJATA(15)-VNTRあるいはそれ以上の追加領域の解析が必要である。今回の我々の結果は、東京都のクラスター形成率よりも低く、JATA(15)-VNTRにおいては全国の株で行ったRFLPの結果と同等であった。また、今回の解析で1つのクラスターに含まれた最大の菌株数はJATA(15)-VNTRで3株という結果で、ある特定のクラスターの株が多く検出される状況は認められなかった。従って、JATA(15)-VNTRは富山県内の分子疫学解析に有用である可能性が示された。

疫学的に関連があると推定された6事例においてJATA-VNTRを行った結果、3事例はJATA(12)及びJATA(15)-VNTRのすべてのローカスで一致したため、それぞれ同一由来の株による感染と判断した。残りの3事例はJATA(12)-VNTRで2か所以上、JATA(15)-VNTRで3か所以上のローカスの反復数が異なっていたことから、異なる由来の株による感染であると判断した。今回の調査から、集団感染疑い事例の際は、JATA(12)及びJATA(15)-VNTRどちらでも判断できると考えられた。ただし、疫学的関連のない株が同じクラスターを形成する可能性があるため、JATA-VNTRは菌株の異同を判断する方法の1つではあるが、同一感染源由来の判定には疫学調査と合わせた判断が重要であると考えられた。

また1事例については、居住地が同じ地区である一定の時期に患者が3名発生したため、VNTRを実施した。菌株を収集・解析する体制が構築されていたため、すばやく解析し、結果を返すことができた。このように、VNTR解析は集団感染疑い事例の際に有用であるため、菌株を収集・解析する体制の構築は非常に重要であると思われた。

富山県で分離された結核菌は、北京型が65/96株(67.7%)を占め、そのうち祖先型が55/65株(85.7%)、新興型が10/55株(14.3%)であった。この結果は、岩本が報告した日本全国における割合(北京型73.8%、祖先型81.7%及び新興型18.3%)と同様であった⁶⁾。この報告によると、新興型は

若年層の患者から有意に多く分離されている。富山県においても、40歳未満の患者から分離された13株のうち5株(38.5%)は新興型であった。新興型は祖先型に比べ伝播や発病等の毒性が強い可能性があることから⁷⁾、富山県内において新興型を監視していくことは重要である。また、外国籍の患者から分離された3/7株(42.9%)、過去に東京での居住歴のあった患者から分離された4/9株(44.4%)は新興型であった。今後解析株数を増やすことで、富山県において新興型が若年層や外国籍の患者から有意に多く分離されるかどうか明らかになると思われる。また、新興型が東京から伝播してきたかどうかを解析するためには、全国的なデータベース構築による情報の共有が必要である。

今後も県内で分離された結核菌についてVNTRを行い、解析株数を増やすことで、結核の伝播状況やその動向が解明される可能性がある。また、早期に集団感染事例の探知を行うことで、感染拡大防止にも貢献できると考えられる。

《日本全国で分離された結核菌の遺伝子型解析》

地域における結核菌の分子疫学を理解するため、日本全国で分離された結核菌株を大規模に、最近の分離株を用いて解析し、VNTRプロフィールのスナップショットを作製した。

今回解析した結核菌株に地域的な偏りはないと考えられた。年齢情報が得られなかった検体が多かったため、正確な判断はできないものの、年齢が判明している検体の分布は近年の新規結核患者の罹患数に相似しており、年齢分布においても近年の結核罹患状況を反映しているものと考えられた。

対象とした結核菌のVNTR解析において、Maedaらによって決定されたJATA12/15はいずれも高い分解能を示した。しかしながら、本研究の結果で最も分解能の高かった4120が含まれておらず、さらに一部のローカスで標的遺伝子が増幅されない例が比較的多く認められた。Maedaらの研究が実施されたのは2002年頃の分離株を対象としており、今回の分離株とは約10年の差がある。分離年の違いによる結核菌株のポピュレーションの違いが原因である可能性が考えられ、今回のデータを元に新たなVNTR解析のためのロー

カス選定を行う必要が考えられた。

VNTR 遺伝子型のスナップショットと同様に、他の地域からの結核の流入等を考慮するため、北京型における新興・祖先型の鑑別も必要と考えられる。また、最近の流行が報告されているM株についても解析するため、引き続いてそれらのデータを追加する予定である。

【広域薬剤耐性調査(2011及び2012年度)】

検査センターが日常的に受託検査している結核菌の薬剤感受性試験結果を利用し、日本全国の薬剤耐性状況に関する調査を行った。患者の治療歴が入手できないため、未治療と既治療を併せたいわゆるCombined resistanceであるが、全体の状況が把握できる数字が得られたものと考えられた。特に2012年の多剤耐性結核の有病率が1%以下であり、2011年(1.0%)も同様の数字が得られていることから、耐性率の推移についてもある程度現状を知る上で有用と考えられた。2009年以降4年間のデータを比較すると、主要4剤(INH, RFP, SM, EB)については引き続き耐性率の低下傾向が続いていることが示されたが、LVFXについては明確な傾向性が示されず、横ばいあるいは増加の様子が観察された。日本ではフルオロキノロン剤が臨床の現場で多用される状況があるため、多剤耐性結核の治療等を考慮した場合、注視すべき状況と考えられた。一方で多剤耐性結核におけるXDR(超多剤耐性結核菌)の率は6.7%であり、2007年の療研調査(15.4%)よりも低値となっていた。明らかなXDRの増加はこの期間中には発生していないものと考えられた。

検査センターが日常的に「産生」する膨大な薬剤感受性試験データがサーベイランス上有用であることが明確化された。無用なコストの重複を避けるためにも、これらのデータを系統的に利用することを考えるべきである。

【抗酸菌検査精度保証】

I. 抗酸菌塗抹検査外部精度評価

総合的な結果として、Z-N法(1,000倍鏡検)が蛍光法(200倍鏡検)に対して陽性検出感度がやや低い傾向が認められた。これは特に土の検体について明確であり、Z-N法と蛍光法の間には統計的に有意な差が認められた。これは倍率による観

察面積の差に由来するものと考えられた。1,000倍での実視野面積は視野数26.5の場合の1視野で0.0552 mm²であり、同様に200倍ではその25倍の1.3789 mm²となる。今回の検体は2 x 3 cmサイズで作製しているため、全体の面積は471.2389 mm²となり、1,000倍および200倍でそれぞれ300及び30視野観察を行うと、観察範囲は1,000倍・300視野観察で全体の3.5%、200倍・30視野観察で全体の8.8%となる。つまり蛍光法で鏡検した場合、Z-N法のおよそ2倍の面積を検査していることになり、検査感度は上昇する。もしも1 x 2 cmサイズで塗抹を作製すれば、1,000倍・300視野でも全体の10.5%を観察することが可能と考えられる。検体作製の際に考慮すべき要件と考えられた。

また今回蛍光法で1+を2+と判定した施設が14施設あったが、これは作製したパネルテストスライドの濃度(1+: 約1 x 10⁵ cfu/ml)が日本の基準では2+にオーバーラップするためであると考えられ、実際には定量の間違い(QE)ではないと思われた。

今回大きな間違いは殆ど認めなかったものの、Z-N法で検査された検体で偽陽性3件と偽陰性1件が認められた。現在検体を結核研究所に再送付してもらい原因を調べているが、はっきりした理由は不明である。一般的な可能性として染色液の汚染や夾雑物の誤認識が考えられるが、引き続きフォローアップが必要と考えられた。

本邦では初めての抗酸菌塗抹検査外部精度評価を試行した。パネルテストの属性として、ルーチン検体でなく試験であることがわかっていることから最大能力評価であると考えられている。今回のパネルテストがそれぞれの施設でどのような状況で実施されたか情報を収集していないため不明であるが、比較的短期のうちに回答を求めたことから、比較的通常の検査を反映しているのではないと思われる。限定的な情報ではあるが、抗酸菌塗抹検査の質が高精度に維持されており、さらにその状況を比較的容易に評価できることが示された。継続的・拡大的实施が必要と思われた。

II. 結核菌薬剤感受性試験外部精度評価

本邦で第9回となる抗結核薬感受性試験外部精度評価を実施した。各薬剤に対する検査精度をみ

ると、例年と同様にINH、RFP及びSMに関する感度、特異度、一致率、κ指数は全て0.95を越えており、極めて高い精度が維持されていると考えられた。LVFXについても基本的に高精度が維持されていたが、INHあるいはRFPと比較すると精度のばらつきが大きいと思われた。しかしながら、第8回(2010年度)の結果と比較すると感度が改善しており(0.986 vs 0.996)、κ指数も改善していた(0.937 vs 0.943)。

施設別にみると衛生研究所、検査センター、病院検査室の順で全体としての平均精度が維持されていると考えられたが、同時に同じ順序で参加施設数が多くなっていることから、多施設間での精度の維持の困難性が示唆された。

EBとLVFXで相対的に精度が低かったのは、主に感受性菌を耐性と誤判定したことによると考えられた。特にLVFXではその傾向が強かった。以前の外部精度評価でEBについてMGIT AST(EB濃度5.0 µg/ml)の感度が他に比べて低かったことを報告しているが、現行の固形培地を用いた比率法におけるEB濃度(2.5 µg/ml)の設定に問題がある可能性も示唆される。現在世界保健機関が比率法による薬剤感受性試験の基準薬剤濃度の見直しを行っており、今後注意が必要である。EBの精度があらゆる指標において比較的low値であることは文献的にも報告されており、今回の結果も再現性を含めて同様であった。MICとCritical Concentrationが近接していることや薬剤が静菌的であることが主に影響していると考えられるが、キットの保存状態や培養環境も結果に影響している可能性が考えられた。比率法を使用する限りにおいてEBのような静菌的薬剤の精度を高度に維持することは原理的に困難であるが、その限界点を考慮すれば今回のパネルテストの結果は十分に良好であると考えられた。

III. Pyrazinamide 薬剤感受性試験評価方法の検討(2012~2013年度)

日本国内で近年分離された多剤耐性結核菌を使用し、PZAの感受性試験に関してMGIT PZA AST、*pncA* 遺伝子変異、PZase試験を相対評価した。これにより、それぞれの方法に過剰あるいは過小評価がどの程度あるのか明確となった。また、この評価を実施する過程で多剤耐性菌以外の

PZA 耐性菌を同定できており、今後 PZA 感受性試験の外部精度評価を実施する際に利用可能と思われた。すでにプロトコールを作成し、PZA 感受性試験の外部精度評価の準備を進めている。

これまでに報告された *pncA* 遺伝子の変異が Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database に登録されているが、今回の研究により新たにアミノ酸変異で 3 種類、塩基の挿入が 4 種類、塩基の欠損が 6 種類検出・同定された。特に *pncA* の PCR で増幅産物が得られなかった 3 株では *pncA* (Rv2043) 全体が欠損していた。3 株とも MIC 値は 1,600 µg/ml 以上と高い値を示していた。一般的に *pncA* 遺伝子を目的とした PCR で増幅産物が得られない場合、菌の PZA に対する感受性か耐性かの判断において、遺伝子学的手法での推測は不可能である。しかし今回の結果から *pncA* を含む広い範囲で、遺伝子の欠落を有する結核菌の存在が明らかとなったことで、*pncA* 遺伝子の PCR で増幅産物が得られなかった場合、PZA に耐性である可能性を念頭に置く必要があることが示された。

また Y34D のアミノ酸変異を示した株が 4 株認められ、これらの MIC 値は 2 株が 1,600 µg/ml 以上、1 株が 1,600 µg/ml、1 株が 400 µg/ml と同一のアミノ酸変異でありながら MIC 値に差を認めた。これらのことから、*pncA* 以外の耐性機序の存在が示唆された。今後、これらの株の全ゲノムシーケンシングを行い、新たな耐性機序の解析を実施する予定である。

E. 結論

【地域結核病原体サーベイランス】

地域における病原体サーベイランスの確立と有用性評価のため、プロトコールを作成した。また検体収集のため富山県内の保健所との連携会議を実施し、協力について了承を得た。富山県内で分離された結核菌 96 株について、JATA (12) 及び JATA (15)-VNTR 解析を行った。特定の株がまん延しているという状況は見られなかった。また、分子疫学解析及び集団感染疑い事例において、JATA (12) 及び JATA (15)-VNTR が有用である可能性が示された。今後解析株数を増やすことで、富山県において新興型の株が若年層や外国籍の患者から有意に多く分離されるかどうか明らかになると思われた。

【広域薬剤耐性調査】

結核菌病原体サーベイランスの重要項目である薬剤耐性結核の現状をおおまかに把握する目的で、検査センターが大量に実施している疫学的には全く利用されていない薬剤感受性試験データを二次利用して解析を試みた。現在日本の結核菌薬剤感受性試験の 5~7 割は検査センターで実施されていると推定され、M/XDR-TB の推移を含めて本邦の結核菌薬剤耐性の現状を理解するのに有用と考えられた。このような有用な情報を単に個別の症例にのみ還元するのではなく、精度保証との組み合わせでサーベイランスに利用することは、費用対効果の面からも重要と考えられた。

【抗酸菌検査の精度保証】

抗酸菌検査の精度保証に関して、従来法に従って主要 4 薬剤の薬剤感受性試験外部精度評価を行い、ほぼ従来通りの高精度が確認された。また、これまで取り組まれていなかった塗抹検査についても試験的に外部精度評価を実施し、精度上の問題点を指摘可能であることを示した。PZA の感受性試験については細菌学的新知見が得られており、検査精度の向上と外部精度評価実施の際の基礎情報が蓄積された。

検査の精度保証は信頼できるサーベイランスの根幹であるが、日本では法的整備が遅れており、そのほとんどを個々の精度管理のみに依存している。抗酸菌検査のみならず、あらゆる検査の精度評価を法的に義務化すべきである。

F. 健康危機情報

多剤耐性菌を含む結核菌の取扱に関してバイオハザード上の危険があるが、GMT を基礎とした適切な実験・検査施設 (BSL3) を用いて研究を実施しており、危険は最小限と考えられる。

G. 研究発表

(学会発表)

1. 御手洗聡, 近松絹代, 青野昭男, 山田博之, 菅本鉄広. 結核菌薬剤感受性試験外部精度評価の方法と効果: 2004~2009 年での結果から. 第 86 回日本結核病学会総会 東京 2011 年 6 月 2-3 日
2. 御手洗聡, 玉井清子, 柳沢英二, 霜島正浩,

- 渋谷俊介, 近松絹代, 青野昭男, 山田博之, 菅本鉄広. 衛生検査所に集積された薬剤感受性データによる結核菌耐性調査. 第 86 回日本結核病学会総会 東京 2011 年 6 月 2-3 日
3. 御手洗聡. MGIT 960 PZA AST キットによる感受性試験の精度 第 59 回日本化学療法学会東日本支部総会抄録集 p281. 東京 2012 年 10 月 10-12 日
 4. 近松絹代, 青野昭男, 山田博之, 村田正太, 結城 篤, 三澤成毅, 小栗豊子, 御手洗聡. 抗酸菌塗抹検査外部精度評価の試み 日本臨床微生物学会雑誌 2012; 22: 140. 第 24 回日本臨床微生物学会総会 横浜 2013 年 2 月 2-3 日
 5. 青野昭男, 近松絹代, 山田博之, 御手洗聡. PZA 薬剤感受性試験法の評価 日本臨床微生物学会雑誌 2012; 22: 142. 第 24 回日本臨床微生物学会総会 横浜 2013 年 2 月 2-3 日 (論文発表)
 1. 青野昭男, 近松絹代, 山田博之, 村田正太, 結城 篤, 三澤成毅, 小栗豊子, 御手洗聡. 抗酸菌塗抹検査外部精度評価の試み 臨床微生物学会雑誌 2012; 22: 279-283.
 2. Ueyama M, Chikamatsu K, Aono A, Murase Y, Kuse N, Morimoto K, Okumura M, Yoshiyama T, Ogata H, Yoshimori K, Kudoh S, Azuma A, Gemma A, Mitarai S. Sub-speciation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from tuberculosis patients in Japan. Tuberculosis (Edinb). 2014 Jan; 94(1): 15-9.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
- I. 参考文献
- 1) Warren et al. 2004. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. Am J Respir Crit Care Med. 169:610-614.
 - 2) Wada et al. 2009. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. FEMS Microbiol Lett. 291:35-43.
 - 3) Sreevatsan, S., X. Pan, Y. Zhang, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser. 1997. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 636-640.
 - 4) Maeda et al. 2008. 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム. 結核. 83:673-678.
 - 5) Maeda et al. 2009. 結核菌の反復配列多型 (VNTR) 標準分析法の確立と型別情報データベースの構築. 結核. 84:784-786.
 - 6) Iwamoto et al. 2009. 結核菌北京型ファミリーの集団遺伝学的解析から推察される日本国内定着型遺伝系統群の存在と遺伝系統別薬剤耐性化傾向の違い. 結核. 84:755-759.
 - 7) Hanekom et al. 2007. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. J Clin Microbiol. 45:1483-1490.
- <研究協力者>
<地域結核病原体サーベイランス>
金谷潤一, 磯部順子, 佐多徹太郎
富山県衛生研究所
加藤朋子, 三浦隆史, 村瀬良朗
結核予防会結核研究所抗酸菌部
- <広域薬剤耐性調査>
玉井清子・柳沢英二
株式会社ミロクメディカルラボラトリー
霜島正浩
株式会社 ビー・エム・エル
渋谷俊介
三菱化学メディエンス株式会社
- <抗酸菌検査精度保証>
青野昭男, 近松絹代, 山田博之
結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科

表 1. JATA (12)及び JATA (15)-VNTR における型別能

方法	VNTR パターンの数	クラスター数	クラスター 形成率 (%)	1つのクラスターに 含まれた最大の菌株数
JATA (12)-VNTR	81	10	24.0	4
JATA (15)-VNTR	86	9	19.8	3

表 2. 接触調査事例における JATA (12)及び JATA (15)-VNTR

事例数	JATA (12)-VNTR	JATA (15)-VNTR
3 事例	12 か所のローカスが一致	15 か所のローカスが一致
3 事例	2 か所以上のローカスが異なる	3 か所以上のローカスが異なる

表 3. 臨床情報と北京型株及び非北京型株の分離数

	東京での居住歴		40 歳		国籍		計
	あり	なし	未満	以上	外国	日本	
北京型 (祖先型)	3 (33.3%)	52 (59.8%)	5 (38.5%)	50 (60.2%)	1 (14.3%)	54 (60.7%)	55 (57.3%)
北京型 (新興型)	4 (44.4%)	6 (6.9%)	5 (38.5%)	5 (6.0%)	3 (42.9%)	7 (7.9%)	10 (10.4%)
非北京型	2 (22.2%)	29 (33.3%)	3 (23.1%)	28 (26.7%)	3 (42.9%)	28 (31.5%)	31 (32.3%)
計	9 (100%)	87 (100%)	13 (100%)	83 (100%)	7 (100%)	89 (100%)	96 (100%)

表 4 PZA の MIC, *pncA* 変異及び PZase 試験結果

No. of strains	MGIT PZA MIC (µg/ml)	<i>pncA</i> mutation		PZase
		Nucleotide	Amino acid	
31	≤100	None		Positive
2	200	None		Positive
2	400	None		Positive
1	400	T→G at 100	Y34D	Negative
1	800	None		Positive
2	800	C→A at 185	P62Q	Negative
3	1600	C→A at 8	A3E	Negative
1	1600	T→G at 26	V9G	Negative
1	1600	T→G at 100	Y34D	Negative
1	1600	C→A at 102	Y34STOP	Negative
1	1600	C→A at 153	H51Q	Negative
1	1600	T→C at 175	S59P	Negative
1	1600	C→T at 211	H71Y	Negative
1	1600	G→A at 290	G97D	Negative
3	1600	AC insertion at 261		Negative
1	1600	CG deletion at 129		Negative
1	>1600	None		Positive
2	>1600	T→C at -7, A→G at 340	T114A	Negative
1	>1600	C→A at 8	A3E	Negative
2	>1600	A→C at 29	Q10P	Negative
2	>1600	T→G at 100	Y34D	Negative
2	>1600	C→T at 161	P54 L	Negative
1	>1600	A→G at 212	H71R	Negative
1	>1600	A→C at 286	K96Q	Negative
1	>1600	A→C at 410	H137P	Negative
1	>1600	A→C at 422	Q141P	Negative
1	>1600	AC insertion at 261		Negative
1	>1600	GTGCGGCA insertion at 366		Negative
1	>1600	G insertion at 392		Positive
2	>1600	GG insertion at 392		Negative
1	>1600	G insertion at 522		Negative
2	>1600	C deletion at 59		Negative
1	>1600	AG deletion at 94 & GA deletion at 97		Negative
1	>1600	16 bp (TCGATGAGGTCGATGT) deletion at 374		Negative
3	>1600	PCR (-)		Negative

総合研究報告書

医療現場における結核発病の実態解明と対策

研究分担者 岡田全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター長

研究要旨

1. 調査票「医療現場における職員結核発病の実態解明と対策」を、国立病院機構結核入院施設 52 施設を含む 260 施設の全国結核診療施設に送付。
2. 結核診療施設への調査票。回答 260 施設中 49.2%
 - (1) 病院職員の結核発病 74 例。（2007 年～2011 年）
 - (2) 20～30 才台に多し。
 - (3) 職種では看護師が多く 73.0%。ついで医師。
 - (4) MDR は 1 例。
 - (5) ハイリスク要因として抗リウマチ薬。
 - (6) 結核病床数 1～9 の施設に医師の結核発病多し。
 - (7) 結核病床数が多い（100 以上）施設では、看護師の結核発病多し。
 - (8) 検査室の空調設備や、殺菌灯の有無との相関はなし。
3. 調査票（結核診療施設ではない）国立病院機構 92 施設中回答 46 施設（50.0%）
 - (1) 職員結核発症施設 4 施設。一方、結核診療施設 33 施設に比べ結核診療施設でない方が職員結核発症施設率低い
 - (2) 結核診療施設でない方が職員結核発症率低い
 - (3) 職種では看護師 6 例（75%）、医師 1 例
4. 職員の結核発症の報告のあった施設に
 - (1) 病院の部署と QFT 実施率、N-95 マスクや予防衣着用と結核発症の相関
 - (2) 発見の遅れの理由。
 - (3) 潜在性結核の職員に対する治療について調査票を送付・集計・解析した。
その結果、
 - ① QFT 検査なしの施設及び N-95 マスクなしの施設で、職員結核多い。
 - ② 一般病棟勤務者の方が、結核病棟勤務者より職員結核多い。
 - ③ 発見の遅れの原因として、定期健康診断未受診、抗結核菌検査オーダーの遅れ、胸部 X-P 読影の遅れ、が多い。
 - ④ 潜在性結核の治療は INH 投与 16%、治療せず 8%、個々の職員で判断 68%。
を明らかにした。

A. 研究目的

国立病院機構のネットワークを利用し、病院職員における結核発病の実態を解明する。また、国立病院機構以外の全国結核診療施設に調査票を送付し、結核発病の実態を把握する。これを踏まえて有効な対策指針を提示する。医療現場における結核発病の実態解明と対策を目的とした

B. 研究方法

1. 調査票「医療現場における職員結核発病の実態解明と対策」を作成し、IRBの承認を得た後、国立病院機構結核患者入院施設 52 施設を含む 260 施設の全国結核診療施設に調査票を送付した。(表 1、2)

コントロールとして結核診療施設でない病院(国立病院機構 92 施設)に同じ調査票を送付した。

2. 具体的には過去 5 年間の職員結核発症についての調査

1.結核病床数 2.個室病床数 3.陰圧モデル病床数 4.職種 5.診断方法 6.QFT 診断 7.ツ反 8.PCR 診断 9.結核菌培養陽性 10.液体培地か固形培地か 11.病型分類 12.肺結核・肺外結核 13.薬剤感受性検査 14.MDRの有無 15.結核ハイリスク要因の有無 について調査した。(表 1)

また、

- ・医療施設内結核感染予防の体制整備：委員会の設置
- ・健康管理：①健康診断：QFT 検査・胸部エックス線検査
②事後措置：潜在性結核感染の治療・BCG 接種の有無
- ・環境上の感染防止
- ・個人の感染防止：安全マスク (N-95) の着用・予防衣の着用
- ・職員の衛生教育
- ・結核患者発生時の対応

について調査。(表 2)

3. 職員の結核発症の報告のあった施設に調査票を送付・集計・解析した。

- (1) 病院の部署と QFT 実施率、N-95 マスクや予防衣着用と結核発症の相関
- (2) 発見の遅れの理由。
- (3) 潜在性結核の職員に対する治療 (表 3)

(倫理面への配慮)

国立病院機構近畿中央胸部疾患センターの IRB (臨床試験審査委員会) で「医療現場における職員結核発病の実態解明と対策」調査票の倫理審査を行い、承認された後に全国結核診療施設及び結核診療施設でない病院 (国立病院機構 92 施設) に送付した。

表 1

[B] 事例についてお答えください。(当てはまるものに○をつけて下さい。)

1. 職種	2. 診断方法 (複数回答)	3. 結核菌培養	4. 使用培地	5. 病型分類			6. 肺・肺外	7. 感受性検査	実施の場合、 薬剤耐性の種類 (複数回答)		9. 多剤耐性	10. ハイリスク要因	有の場合、 具体的なハイリスク名 (複数回答)
1 ①医師 ②看護師 ③検査技師 ④薬剤師 ⑤事務職 ⑥病理解剖従事者 ⑦リハビリ ⑧その他	①QFT ②ツ反 ③胸部X線 ④PCR診断 ⑤結核菌培養 ⑥血清中抗体	①陽性 ②陰性 ③不明 ④未実施	①液体 ②固形	①b ②r ③i	①0 ②I ③II ④III ⑤IV	①1 ②2 ③3	①肺結核 ②肺外結核	①実施 ②未実施	①INH ②RFP ③PZA ④SM ⑤EB ⑥LVFX ⑦CS ⑧KM ⑨TH ⑩その他 ()	①有 ②無 ③不明	①有 ②無 ③不明	①HIV/AIDS ②糖尿病 ③珪肺 ④免疫抑制剤 ⑤抗癌剤 ⑥抗リウマチ薬 ⑦腎疾患 ⑧胃切除 ⑨その他 ()	
2 ①医師 ②看護師 ③検査技師 ④薬剤師 ⑤事務職 ⑥病理解剖従事者 ⑦リハビリ ⑧その他	①QFT ②ツ反 ③胸部X線 ④PCR診断 ⑤結核菌培養 ⑥血清中抗体	①陽性 ②陰性 ③不明 ④未実施	①液体 ②固形	①b ②r ③i	①0 ②I ③II ④III ⑤IV	①1 ②2 ③3	①肺結核 ②肺外結核	①実施 ②未実施	①INH ②RFP ③PZA ④SM ⑤EB ⑥LVFX ⑦CS ⑧KM ⑨TH ⑩その他 ()	①有 ②無 ③不明	①有 ②無 ③不明	①HIV/AIDS ②糖尿病 ③珪肺 ④免疫抑制剤 ⑤抗癌剤 ⑥抗リウマチ薬 ⑦腎疾患 ⑧胃切除 ⑨その他 ()	
3 ①医師 ②看護師 ③検査技師 ④薬剤師 ⑤事務職 ⑥病理解剖従事者 ⑦リハビリ ⑧その他	①QFT ②ツ反 ③胸部X線 ④PCR診断 ⑤結核菌培養 ⑥血清中抗体	①陽性 ②陰性 ③不明 ④未実施	①液体 ②固形	①b ②r ③i	①0 ②I ③II ④III ⑤IV	①1 ②2 ③3	①肺結核 ②肺外結核	①実施 ②未実施	①INH ②RFP ③PZA ④SM ⑤EB ⑥LVFX ⑦CS ⑧KM ⑨TH ⑩その他 ()	①有 ②無 ③不明	①有 ②無 ③不明	①HIV/AIDS ②糖尿病 ③珪肺 ④免疫抑制剤 ⑤抗癌剤 ⑥抗リウマチ薬 ⑦腎疾患 ⑧胃切除 ⑨その他 ()	
4 ①医師 ②看護師 ③検査技師 ④薬剤師 ⑤事務職 ⑥病理解剖従事者 ⑦リハビリ ⑧その他	①QFT ②ツ反 ③胸部X線 ④PCR診断 ⑤結核菌培養 ⑥血清中抗体	①陽性 ②陰性 ③不明 ④未実施	①液体 ②固形	①b ②r ③i	①0 ②I ③II ④III ⑤IV	①1 ②2 ③3	①肺結核 ②肺外結核	①実施 ②未実施	①INH ②RFP ③PZA ④SM ⑤EB ⑥LVFX ⑦CS ⑧KM ⑨TH ⑩その他 ()	①有 ②無 ③不明	①有 ②無 ③不明	①HIV/AIDS ②糖尿病 ③珪肺 ④免疫抑制剤 ⑤抗癌剤 ⑥抗リウマチ薬 ⑦腎疾患 ⑧胃切除 ⑨その他 ()	
5 ①医師 ②看護師 ③検査技師 ④薬剤師 ⑤事務職 ⑥病理解剖従事者 ⑦リハビリ ⑧その他	①QFT ②ツ反 ③胸部X線 ④PCR診断 ⑤結核菌培養 ⑥血清中抗体	①陽性 ②陰性 ③不明 ④未実施	①液体 ②固形	①b ②r ③i	①0 ②I ③II ④III ⑤IV	①1 ②2 ③3	①肺結核 ②肺外結核	①実施 ②未実施	①INH ②RFP ③PZA ④SM ⑤EB ⑥LVFX ⑦CS ⑧KM ⑨TH ⑩その他 ()	①有 ②無 ③不明	①有 ②無 ③不明	①HIV/AIDS ②糖尿病 ③珪肺 ④免疫抑制剤 ⑤抗癌剤 ⑥抗リウマチ薬 ⑦腎疾患 ⑧胃切除 ⑨その他 ()	