

第 65 回 総会ワークショップ

I. 結核菌検査法の進歩

座長 徳 永 徹 (国立予防衛生研究所)

受付 平成2年7月24日

The 65th Annual Meeting Workshop

I. ADVANCES IN DIAGNOSTIC METHODS FOR MYCOBACTERIA

Chairman : Tohru Tokunaga *

The titles of the papers and the panelists in this workshop together with their co-author were :

- 1) Examination by means of enzyme-linked immunosorbent assay : Hironobu Tasaka (Dept. of Microbiology, Hiroshima Univ., School of Medicine), Masanao Makino (Dept. of Microbiology, Osaka Prefecture Inst. of Public Health) and Eriko Shigetoh (Internal Medicine, National Sanatorium Hiroshima Hospital)
 - 2) Production of a monoclonal antibody specific for *Mycobacterium avium* : Chiyoji Abe (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)
 - 3) Enhanced ELISA which can discriminate the infection of *M. bovis* including BCG from that of *M. tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria : Shinji Haga, Hiroshi Takahashi, Yoshitaka Goto, Masamichi Kinomoto, Masarou Nakagawa, Teturou Kataoka, Tohru Tokunaga and Mituo Honda (National Institute of Health)
 - 4) Rapid diagnostic system for Mycobacteria using DNA probes : Haruaki Tomioka and Hajime Saito (Dept. of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University)
- Add.) Recovery of mycobacteria from clinical specimens using Middlebrook 7H-12 medium : Chiyoji Abe and Sumiko Hosojima (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

(Received for publication July 24, 1990)

During the last four decades, efforts to find better methodology for the identification of various mycobacterial species have been made actively in many countries, using a variety of approaches. An example of the prominent achievements reached was the Niacin-test for *M. tuberculosis* which was established by Konno (1962). Thereafter, however, no such a remarkable development has been reported.

Recently new biotechnologies have been progressed, and tried to be introduced into this study field. The purpose of this workshop is to show examples of such applications.

1) In the first paper, Tasaka and his colleagues tried to diagnose the patients suffering from *M. tuberculosis* or *M. avium* complex using type-specific protein antigens of mycobacteria and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Namely,

* National Institute of Health, 2-10-35 Kamiosaki Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

antibody titers in the sera of 185 healthy persons and 90 mycobacteriosis patients were determined by an ELISA using the alpha-T and the alpha-I antigens, which are homologous to the proteins refined from both *Mycobacterium tuberculosis* and *M. intracellulare*. Gamma-I antigen which is specific for *M. tuberculosis* was also employed. The antibody titers against the anti-alpha-T and -I in the sera of mycobacteriosis patients were less than healthy controls. The anti-alpha titers in the patients suffered from *M. avium* complex were relatively lower than those of *M. tuberculosis* patients. The anti-gamma antibody titers were almost equal to the anti-alpha-T antibody titers. In the healthy controls, the titers of the anti-alpha-I were tended to be greater than the anti-alpha-T antibody. This tendency was observed consistently in the sera obtained from shortly after the birth. It was suggested that inapparent infection with *M. avium* complex was sufficient to cause antibody production, but insufficient to induce delayed type hypersensitivity.

2) Abe reported a new monoclonal antibody specific for *M. avium*. Three hybridomas which secrete antibodies to *Mycobacterium avium* were obtained by the fusion of p3u 1 myeloma cells with spleen cells of mice immunized with *M. avium* culture sonicate. These monoclonal antibodies were characterized by an enzyme immunoassay and immunoblot analysis on 16 mycobacterial species. One antibody, designated Avi-3, reacted only with *M. avium* and not with the reference strains of the other 15 species of mycobacteria tested. Specificity of the antibody was confirmed by assay, using a specific DNA probe of *M. avium* complex in 29 *M. avium* complex isolates. An antigen was purified from *M. avium* culture sonicate on a monoclonal antibody Avi-3 coupled affinity column. The purified antigen gave a single band SDS-PAGE response (MW : 27 kDa). Both *in vivo* results from skin tests and *in vitro* results from lymphocyte proliferation assays with cells from guinea pigs sensitized with *M. avium* showed significant antigen Avi-3 reaction. In addition, when testing guinea pigs immunized with *M. bovis* BCG or *M. intracellulare*, the antigen showed weak *in vivo* and *in vitro* T cell responses. These results suggest that the *M. avium* specific antigen Avi-3 may facilitate the diagnosis of mycobacterial infections.

3) Haga and his colleagues reported a new monoclonal antibody specific for *M. bovis*. It was known that *Mycobacterium bovis* secretes a biologically active substance named as MPB70. They prepared a specific mouse monoclonal antibody to MPB70 and developed a fluorescence sandwich ELISA (FS-ELISA) method that specifically detect MPB70, the detection limit of which was less than 10 pg/ml of heat treated MPB70. By using the MPB70 FS-ELISA, they examined MPB70 possibly secreted from 114 mycobacterial strains. All of the eight BCG substrains including BCG-Tokyo were positive. All of the 28 *M. bovis* strains were also positive. On the other hand, all strains of *M. tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria were negative. Thus, it becomes possible to discriminate *M. bovis* from *M. tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria.

4) Tomioka and his colleagues studied the Gen Probe[®] Rapid Diagnostic System (Gen Probe Inc., San Diego, CA., U.S.A.) using DNA probes specific *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) and *M. avium* complex (MAC) for its usefulness in the identification of MTC and MAC. When 82 mycobacterial strains with the code numbers were subjected to the DNA probe test, 33, 15 and 11 strains were identified as to be MTC, *M. avium* and *M. intracellulare*, respectively, with 100% specificity and 100% sensitivity. Mycobacteria other than MTC or MAC showed no reactivity to DNA probes for MTC and MAC. Cultures incubated for a long period of time, at least for 16 weeks could be used for the DNA probe test. Bacterial suspensions could be stored at 4, -20 and -80°C for 17 weeks without serious loss of reactivity to either of the DNA probes. Bacterial suspensions at concentrations of five times lower as well as higher than that of standard one (McFarland No=1) were suitable

to the testing. Some MAC reference strains belonging to serovars 23, 24 and 28 showed reactivity to neither *M. avium* nor *M. intracellulare* probes.

Add.) To use the techniques described above, rapid and convenient culture techniques are required. Therefore, Abe was asked also to report his test results on the usefulness of Middlebrook 7H-12 medium.

Mycobacteria recovery rate and time from clinical specimens were measured for Middlebrook 7H-12 liquid medium and two conventional media (Middlebrook 7H-11 agar and 3% Ogawa egg) and compared. Of 108 specimens processed, 41 (38.0%) were detected as culture positive by the 7H-12 medium, in comparison with 24 (22.2%) detected as culture positive with the conventional 3% Ogawa method, a significant difference in percentage of positive cultures between the two media. This difference was even more significant with smear negative specimens. The recovery rate of mycobacteria using Middlebrook 7H-11 agar was better than that of 3% Ogawa egg but not as good as 7H-12 liquid. Mycobacteria recovery time was remarkably shorter with the liquid medium: All of 41 culture positive specimens were detected within 3 weeks by the liquid medium, while 4 weeks or longer were required to recover mycobacteria from 90% of culture positive specimens with the conventional methods. Overall bacterial contamination was 0.9% and 6.5% for the liquid and 3% Ogawa media, respectively. These results indicate that Middlebrook 7H-12 liquid medium is efficient for recovery of mycobacteria.

Key words : Mycobacteria, Identification, Monoclonal antibody, DNA probe, ELISA

キーワード : ミコバクテリア, 同定, 単クローン抗体, DNAプローブ, ELISA

パネリスト

1. ELISA 法による検査
田坂博信 (広島大医細菌)
 2. 種特異モノクローナル抗体とその応用
阿部千代治 (結核予防会結研)
 3. BCGを含む *M. bovis* を認識する単クローン抗体を用いた ELISA 法
芳賀伸治 (国立予防衛生研)
 4. DNA プローブによる抗酸菌の迅速同定法
富岡治明 (島根医大微生物・免疫)
- 付. 7H-12 液体培地による患者材料からの結核菌の分離
阿部千代治 (結核予防会結研)

はじめに

結核菌を含む各種抗酸菌の同定と分別の方法を開発・確立するため、種々の菌の染色性、培養性状、生化学的性状、病原性などを比較して、多くの人々が情熱を傾けてきた。それらの中で、今野博士のナイアシンテストは、わが国が生んだ世界的な業績の1つといえよう。しかし研究の進展は、ある時点ではほぼ飽和に達し、たとえばフェージタイピングは、亡くなられた武谷健二、室橋豊穂先生らが手がけられ、筆者もそれに協力したが、遅発育抗酸菌のタイピングに長時間を要し、未だ実用化に至っていない。

近年バイオテクノロジーが目覚ましく発展し、若い研

究者たちによってその技術が抗酸菌同定の領域へと導入された。本ワークショップの4題は、未だ試行段階にあるとはいえ、実用化へ向けての新しいアプローチの顕著な実例といえよう。

田坂氏らの試みは、種特異性が高いと考えられる精製蛋白抗原を用いて、患者抗体価をELISA法で測定し、診断に役立てようとするものである。今日世界的に、多数の抗酸菌蛋白が遺伝子工学的に得られつつあるので、この種の方法の応用範囲はいつそう広がると思われる。

阿部、芳賀両氏は、極めて特異性の高い単クローン抗体を得ることに成功した。阿部氏の Avi-3 は、鳥型菌に特異的であり、芳賀氏の Bov.1 は、牛型菌に特異的である。後者は永井定博士の MPB70 を利用したもので

あり、かつ高感度の蛍光サンドイッチELISA法の確立にも成功しているが、これら抗体は共に実用性が高く、国際的にも注目を集めると思われる。

DNA診断は最も有望なアプローチの1つである。富岡氏らは、いち早く米国より抗酸菌同定キットを入手し、詳細な検討を行い、その有用性と問題点を示した。この方法はその迅速性の故に、実用化へ最短距離にあるもの

といえるだろう。おそらく近い将来、さらに種特異的なDNAプライマーを用い、微量のDNAを増幅させて結核菌等を検出する超高感度の Polymerase Chain Reaction (PCR) 法の導入が試みられることになろう。こうした方法を用いて、喀痰中の結核菌を迅速正確に検出同定する実用上の工夫が次の課題となると思われる。

1. ELISA 法による検査

広島大医細菌 田坂博信
大阪府公衛研 牧野正直
国療広島病院 重藤えり子

ELISA法による結核患者の診断については Danielら¹¹⁻¹⁴⁾をはじめ、多くの報告がある。草野⁵⁾はPPDsと α -T抗原を比較し、陽性率においてほとんど同様な成績を得ている。山本ら⁶⁾はPPDsを用いて診断上有用な方法だと述べている。ELISA法は極めて微量な抗原または抗体を検出できる鋭敏な測定法であり、また2次抗体を使い分けることによってIgGおよびIgM抗体をも測定できる便利な方法である。しかも沈降反応や凝集反応では抗原・抗体反応が起こっていても、それを量的に表すことはできないが、ELISA法では2次抗体に結合した酵素の活性の程度を反応生成物のOD値を測定することによって間接的にはあるが抗原・抗体反応を量的に表現できるという大きな特徴がある。

α 抗原は遅育抗酸菌に広く分布する相同蛋白質である⁷⁻¹¹⁾。*M. tuberculosis* および *M. avium* complex の α 抗原に対する抗体が結核患者および *M. avium* complex 症患者ならびに健常者にどのような分布をしているかをELISA法によって比較・検討した。

実験材料と方法

供試血清：国療広島病院結核病棟に入院中の患者 *M. tuberculosis* 排菌中のもの38例、*M. avium* complex 排菌中のもの14例および現在排菌陰性のもの38例、合計90例、健常者-1：10例（広島大学医学部学生、男性、22歳）、健常者-2：40例（国療広島病院附属看護学校学生、女性、19歳）および健常者-3：135例（大阪市内の0歳児25例、3歳児28例、6歳児27例、9歳児29例、11・12歳児26例）。

供試抗原：*M. tuberculosis* の α 抗原（ α -T抗原）、*M. avium* complex の α 抗原（ α -I抗原）および γ -1抗原¹²⁾。

ELISA法：草野の方法⁵⁾に準拠した。マイクロプレートへ抗原の固定化、抗原液は蛋白量50 μ g/mlに

るよう0.05M Sodium carbonate buffer (pH 9.6)に溶解し、その100 μ lを96穴のマイクロプレートの各wellに加え、4 $^{\circ}$ Cに一昼夜放置する。翌日0.5% Tween 20加0.04M PBS (pH 7.4)で5回洗浄後、3% スキムミルク液を加え、室温に2時間放置後、0.5% Tween 20加0.04M PBS (pH 7.4)で5回洗浄する。ELISA測定は、供試血清を1% BSA-PBS (pH 7.4)で20倍に希釈し、各wellに100 μ l宛てに加え、室温に2時間、放置後、1,000~2,000倍に希釈した alkaline phosphatase 結合抗ヒトIg抗体150 μ lを加え、室温に2時間放置後、0.5% Tween 20加0.04M PBS (pH 7.4)で5回洗浄しさらに蒸留水で3回洗浄した後、酵素基質液としてp-Nitrophenyl phosphate 1mgをDEA buffer Diethanolamine 48mlにMgCl₂·6H₂O 52.4mgを溶解し5N HClでpH 9.8に調製し、蒸留水を加えて50mlとする)に溶解した液150 μ lを各wellに加え、室温に10分間放置後、各wellに1.5N NaOH 25 μ lを加えた後、BIO-RAD社製 Microplater reader 3,550を用いて405nmのOD値を測定する。

統計学的処理：バラツキが大きな医学データの処理に適した方法としてBoxplot（箱ひげ）法が、川西・務中ら¹³⁾によって紹介されているので、この方法を川西・務中らがFORTRAN言語にて作製したプログラムを譲り受けて行った。

成績

ELISA法を行い、測定したOD値をもって抗体量を表現するものとして、Boxplot法により解析し、その結果をFig. 1に示した。中央値で比較を行うと抗酸菌症患者よりも健常者の方が抗 γ -1、抗 α -Tおよび抗 α -I抗体量のいずれも多い傾向がみられた。患者群においては *M. tuberculosis* 排菌者においてわずかに抗体量が多い傾向が認められる程度であった。健常者-1、-2

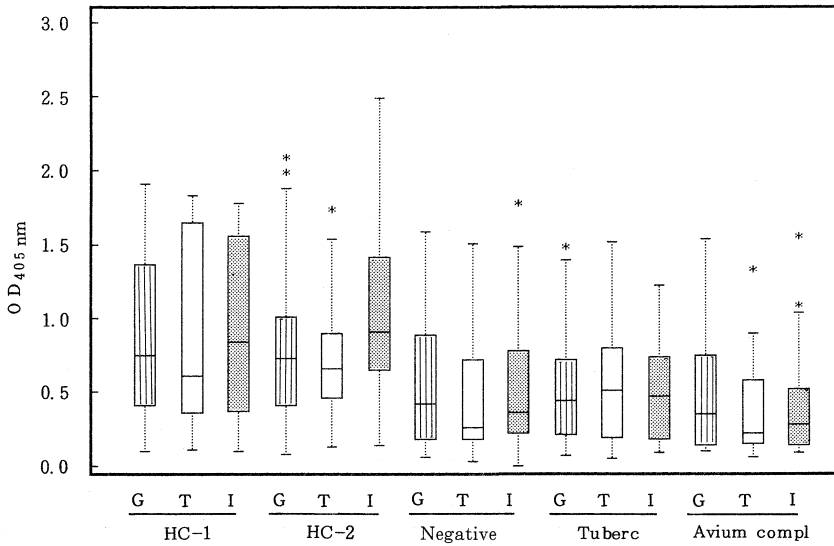


Fig. 1. Comparison of anti alpha and gamma-1 antibody between patients of *M. tuberculosis*, *M. avium-M. intracellulare* and healthy control by ELISA. G : gamma-1 antigen, T : alpha-T antigen, I : alpha-I antigen, HC : healthy control, Negative : culture negative but clinically patients of mycobacteria, Tuberc : *M. tuberculosis*, Avium compl : *M. avium-M. intracellulare*.

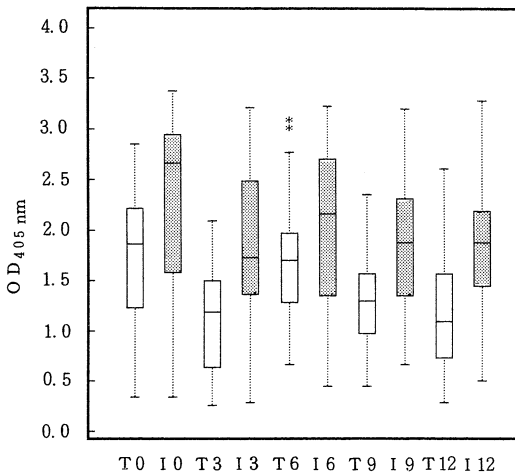


Fig. 2. Comparison of anti alpha antibody with healthy control-3.0 : 0 year old, 12 : 11 and 12 years old.

群ともに抗 γ -1および抗 α -T抗体量よりも抗 α -I抗体量の方が多量を示した。

この傾向がいつから始まるのかを知るために乳幼児期の抗体量を測定したところ、Fig. 2に示したように乳幼児期から抗 α -I抗体量の方が抗 α -T抗体量よりも多量を示した。

抗体中のIgGとIgMを別々に測定したが、患者群においても健常者群においても特徴的な傾向はみられなかった(Fig. 3・4参照)。

先に述べたように健常者-2における血清中の抗体量は抗 α -I抗体量の方が多かったが、ツベルクリン反応ではPPDsの方が反応が強かった(Fig. 5参照)。

考 察

α 抗原の個々の抗原決定基について正確なことは不明であるが、寒天ゲル内沈降反応および吸収試験などの結果から、特異抗原決定基よりも共通抗原決定基の方が多量に思われ、その比は1:3ないし1:4ではないかと推定される。個々の特異抗原決定基の反応性を比較したデータはないが、おおよそ同程度のものと仮定している。免疫原性は宿主体内での増殖力からみて *M. avium* complex よりも *M. tuberculosis* または *M. bovis*

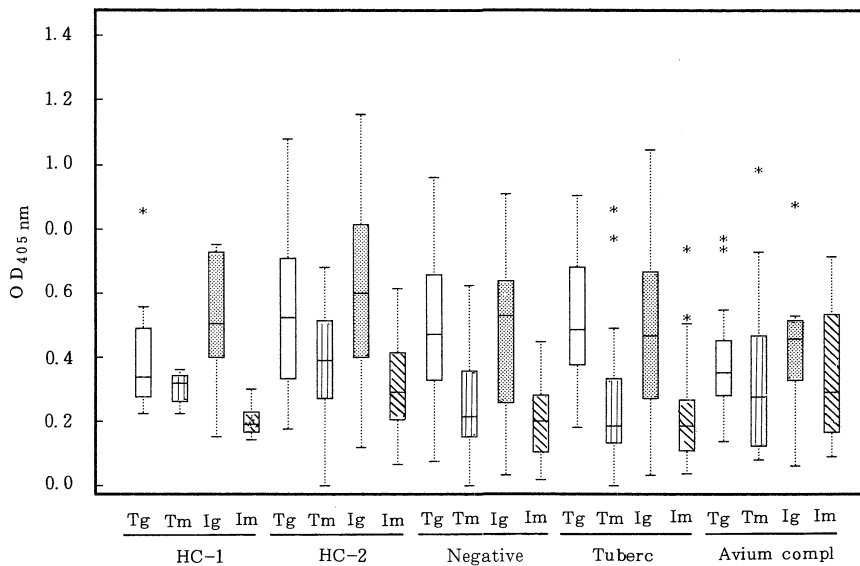


Fig. 3. Comparison of IgG and IgM antibody against alpha antigens between patients of mycobacteria and healthy control. Tg : anti IgG antibody against alpha-T, Im : anti IgM antibody against alpha-I.

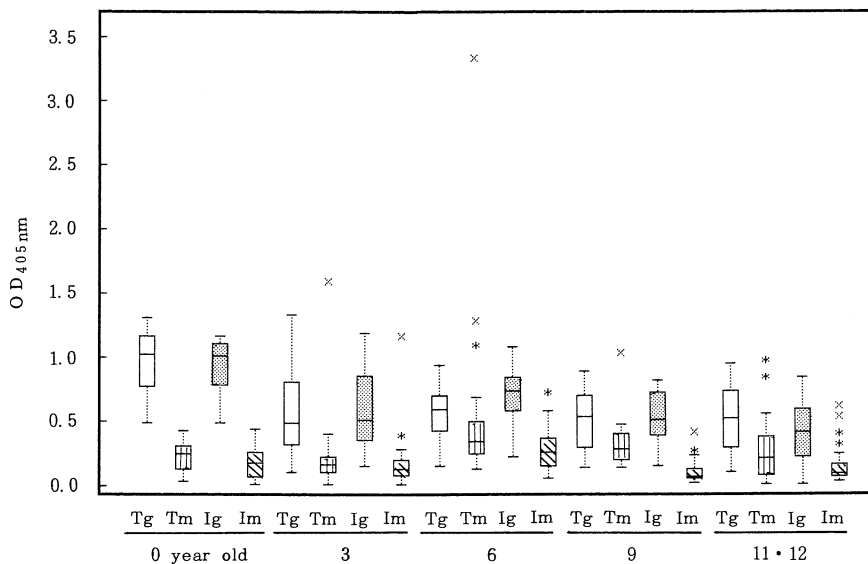


Fig. 4. Comparison of IgG and IgM antibody against alpha antigens of healthy control-3.

BCG 株の方が強いものと思われる。ELISA 法で抗原を固定化し抗原・抗体反応を行った後、反応にあなかった抗体の量を表すのに、沈降反応や凝集反応の場合と同

様に抗体の希釈系列を作って反応の終末点を求める方法で数量化が行われているが、このような方法では抗体量と抗体の親和力との両方をあらわしており、あまり適切

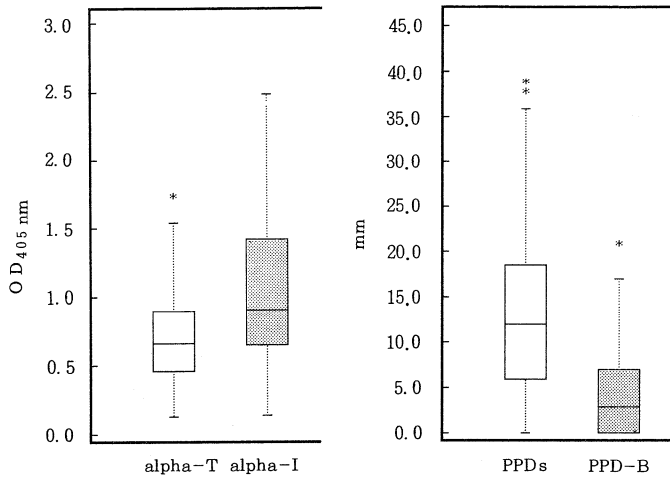


Fig. 5. Comparison of anti alpha antibody and tuberculin reaction of healthy control-2.

ではないように思われる。生体内で抗原と結合し得る抗体の量の方が、むしろ問題なのではないかと考えて、2次抗体に結合している酵素の活性を測定したOD値をもって抗体量として、抗 α -T抗体量と抗 α -I抗体量の比較を試みた。その結果、抗酸菌症患者は健常者よりも抗体産生能が低下しておりその傾向は *M. avium* complex 症患者においていっそう顕著であった。健常者においては生後間もなくより成人にいたるまでBCG接種が行われているにもかかわらず抗 α -I抗体量の方が抗 α -T抗体量よりも多かった。このことは *M. avium* complex による不顕性感染が生後間もなくより日常的に起こっていることを示唆するものと思われる。しかし、*M. avium* complex の不顕性感染はPPD-Bによるツベルクリン反応を陽性にするほどのものではないことが明らかにされた。*M. tuberculosis* による不顕性感染またはBCG接種によりツベルクリン反応が陽転することから、*M. avium* complex による不顕性感染も当然ツベルクリン反応は陽転するものとの考えられがちであるが、現実には *M. avium* complex の不顕性感染菌量は抗体産生を促すには十分であっても、ツベルクリン反応を惹起するには至らないのかもしれない。

結 語

1. 結核患者の抗 α 抗体量は、健常者のそれよりも低値を示した。非定型抗酸菌症患者では、この傾向がいっそう顕著であった。 γ -1抗原は、ほぼ α -T抗原と同程度の抗体量を示した。これは *M. avium* complex の不顕性感染が多いためと思われる、そのためか特異性は明

確ではなかった。

2. 抗 α -I抗体量は生後間もなくより抗 α 抗体量よりも多かった。この現象は *M. avium* complex による不顕性感染が普遍的現象であることを示唆していると思われる。

3. *M. avium* complex の不顕性感染菌数は抗体産生を促すには十分であるようであるが、ツベルクリン反応を惹起するには至らない程度のもと思われる。

文 献

- 1) Benjamin, R. G., Daniel, T. M. : Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5, Am Rev Respir Dis, 126 : 1013-1016, 1982.
- 2) Daniel, T. M., De Murillo, G. L., Sawyer, J. A. et al. : Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis, Am Rev Respir Dis, 134 : 662-665, 1986.
- 3) Ma Y., Wang Y. M., Daniel, T. M. : Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China, Am Rev Respir Dis, 134 : 1273-1275, 1986.
- 4) Daniel, T. M., Debanne, S. N. : The sero-

- diagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay, *Am Rev Respir Dis*, 135 : 1137-1151, 1987.
- 5) 草野展周 : ELISA 法を用いた活動性肺結核患者の血清中の PPD と α 抗原に対する IgG 抗体測定の診断学的有用性の検討, *結核*, 62 : 211-227, 1987.
 - 6) 山本節子, 田端一彦, 戸井田一郎他 : 結核症及び非定型抗酸菌症患者の特異的抗体価の測定, *結核*, 62 : 549-557, 1987.
 - 7) Tasaka, H., Kiyotani, K., Matsuo, Y. : Purification and antigenic specificity of alpha protein (Yoneda and Fukui) from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare*, *Hiroshima J Med Sci*, 32 : 1-8, 1983.
 - 8) Tasaka, H., Matsuo, Y. : Specificity and distribution of alpha antigens of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium marinum*, *Am Rev Respir Dis*, 130 : 647-649, 1984.
 - 9) Tasaka, H., Nomura, T., Matsuo, Y. : Specificity and distribution of alpha antigens of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum* and related species of mycobacteria, *Am Rev Respir Dis*, 132 : 173-174, 1985.
 - 10) 田坂博信 : α 抗原をマーカーとする抗酸菌の血清学的同定法の開発, *結核*, 61 : 663-669, 1986.
 - 11) Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki et al. : Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular α antigen, *J Bacteriol*, 170 : 3847-3854, 1988.
 - 12) 田坂博信, 松尾吉恭, 加藤雅史 : ヒト型結核菌 H37Rv 株由来の混晶性タンパク質, *結核*, 51 : 117-122, 1976.
 - 13) 川西昌弘, 平岡政隆, 中元敦子他 : 医学分野における新しいデータ解析手法の応用 等 1 報. Boxplot の結核集団発生事例への適用, *広島医学*, 42 : 1319-1321, 1989.

2. 種特異モノクローナル抗体とその応用

結核予防会結研 阿部千代治

結核菌由来のタンパクとして精製ツベルクリン (PPD) が知られている。PPD は、電気泳動で 200 本以上のバンドに分離されるタンパク複合体である。それ故結核の診断や予防の目的でこれまで多くの研究者がこれらタンパクの精製を試みてきた。

1975年に Köhler と Milstein により¹⁾、モノクローナル抗体 (MAb) 作成の技術が開発され報告された。その6年後に Coates らにより²⁾、ミコバクテリアで初めて MAb が報告された。その後多くの研究者により MAb の作成が進められ、それらを用いることにより多くの抗原が単離され、それらの性状が明らかにされてきている。私どもは種々のミコバクテリアから生理活性物質を単離することを目的とし、マウスで MAb を作成した。

材料および方法

研究室保存ミコバクテリア 22 株を実験に用いた。ソートン培地で 4~6 週間静置培養した全培養を超音波処理し、その可溶性部の 80% 飽和硫酸画分を抗原としてマウスの免疫および ELISA、プロット法に用いた。ハイブリドーマ細胞の作成は Köhler と Milstein の方法¹⁾に従った。皮内試験および試験管内リンパ球増殖応答試験には、ミコバクテリア死菌感作 28 日目のハート

レー系モルモットを用いた。分離抗原の特異性を調べるために、結核患者血清 78 例、非結核性ミコバクテリア (MOTT) 症患者血清 57 例、健康人血清 150 検体を実験に用いた。

結果および考察

結核菌 H37Rv 免疫マウスの脾細胞の融合で 3 クローン、PPD で 1 クローン、結核菌青山 B 株で 1 クローン、BCG で 4 クローン確立できた。それらの中の 5 クローンにより産生される抗体の ELISA 反応性を Table 1 に示した。MAb Rv-1 は調べたほとんどすべての菌と反応性を示したことから、ミコバクテリア全般に広く分布している抗原を認識していると考えられる。この抗体は 31kD と 33kD タンパクを認識していることが、プロット分析から明らかになった。BCG 免疫マウスの細胞融合で得られた BCG-1 は *M. bovis* BCG とは強く反応したが、その他の菌とは弱い反応性しか示さなかった。青山 B 株免疫マウスの細胞融合で得られた Ao-1 は結核菌群に属する菌株とのみ反応し、MOTT との反応はみられなかった³⁾。この抗体の特異性はプロット分析でも確認された。結核菌群特異抗体、Ao-1 に注目し、抗原の精製を試みた。MAb Ao-1 を結合させたアフィ

Table 1. ELISA Reactivity of Five MAbs with 13 Species of Mycobacteria

Antigen ^{a)}	Reactivity ^{b)} of clone :				
	Rv-1	PPD-1	Ao-1	BCG-1	BCG-2
<i>M. tuberculosis</i>					
H 37 Rv	> 409,600	> 409,600	> 409,600	800	> 409,600
H 37 Ra	> 409,600	> 409,600	> 409,600	400	> 409,600
Aoyama B	> 409,600	> 409,600	> 409,600	12,800	> 409,600
<i>M. bovis</i> BCG	> 409,600	> 409,600	> 409,600	> 409,600	> 409,600
<i>M. kansasii</i>	> 409,600	400	400	400	> 409,600
<i>M. marinum</i>	> 409,600	> 409,600	800	800	> 409,600
<i>M. goodii</i>	> 409,600	200	200	200	800
<i>M. scrofulaceum</i>	> 409,600	200	400	200	800
<i>M. avium</i>	> 409,600	> 409,600	200	800	800
<i>M. intracellulare</i>	> 409,600	> 409,600	400	51,200	> 409,600
<i>M. gastri</i>	> 409,600	> 409,600	800	3,200	> 409,600
<i>M. phlei</i>	102,400	51,200	400	400	800
<i>M. smegmatis</i>	25,600	200	400	200	3,200
<i>M. fortuitum</i>	> 409,600	200	200	800	800
<i>M. chelonae</i>	1,600	> 409,600	400	400	> 409,600

- a) Bacteria were grown in Sauton liquid medium, and the entire mycobacterial culture was sonicated. Microdilution plates were coated with 50 μ l of mycobacterial sonicate containing 100 μ g of protein per ml.
- b) Each value is the highest dilution of mouse ascites fluids that gave an A₄₁₀ of more than 0.2 in the ELISA.

ニティーカラムを用い、超音波処理 BCG 抗原からタンパクを単離した。精製抗原は SDS 電気泳動で 1本のバンドを示し、プロット分析でも MAb Ao-1 で染色された。その分子量は 36kD であった。BCG 死菌免疫モルモットを用いた実験で、この精製タンパクは皮内反応陽性であった。同様の結果は試験管内リンパ球増殖応答試験でも得られた。次に結核および MOTT 患者血清中の抗-PPD、抗-Ao-1 抗体価を ELISA で調べた。抗-PPD 抗体価をみると結核患者では 1:3,200 にピークがみられた。一方 MOTT 患者では 1:800 と 1:6,400 にピークがみられた。対照として用いた健康人血清と比べ患者血清ではその山が明らかに高値にシフトしていた。結核菌群特異抗原、Ao-1 に対する抗体価も抗-PPD 値と同様であった。MOTT 患者でも結核患者と同様に高い抗体価がみられた。これについては今後既往症の有無を含めさらに検討したい。どちらの抗原に対する抗体価も健康人と患者の間には明らかな差がみられた。しかし健康人でも高い抗体価を示す例がみられた。このことについてはほとんどの日本人は BCG 接種を受けていること、環境中に存在するミコバクテリアによる感作を受けていることなどが考えられる。

M. avium と *M. intracellulare* はそれらの示す生

化学的性状が非常に似ており、分別が困難なことから *M. avium* complex として取り扱われてきた。近年この complex に属する菌による感染症が増加し、しかもこれらの菌は抗結核薬に抵抗性を示すものが多く臨床問題になっており早期の診断が望まれている。私どもは *M. avium* の超音波処理抗原免疫マウスの脾細胞を用いた細胞融合実験で 3 種類のクローンを得た。その中で Avi-3 と名付けたクローンにより産生される抗体は Table 2 に示したように *M. avium* とのみ反応し、*M. intracellulare* とは反応しなかったし、*M. avium* complex 以外のミコバクテリア標準株とも反応しなかった⁴⁾。免疫プロット分析からこの MAb は約 27kD の抗原を認識していることが明らかにされた。この抗体と野外および臨床分離 *M. avium* complex との反応性を調べたところ、鳥由来 4 株すべてと患者分離 29 株中 16 株と強い反応性を示したが、13 株とは反応しなかった。それらの結果の一部を Table 3 に示した。Gen-Probe 社の DNA プローブを用いた DNA:RNA ハイブリダイゼーション法でこの抗体の特異性をさらに検討した。Avi-3 抗体と反応性を示した患者分離 16 株は *M. avium* 特異 DNA プローブと陽性反応を示し、13 株は *M. intracellulare* DNA プローブと反応した。

Table 2. ELISA Reactivity of Three MAbs with 15 Species of Mycobacteria

Antigen ^{a)}	Reactivity ^{b)} of clone :		
	Avi-1	Avi-2	Avi-3
<i>M. tuberculosis</i>			
H 37 Rv	> 409,600	> 409,600	400
H 37 Ra	> 409,600	> 409,600	400
<i>M. bovis</i>	> 409,600	> 409,600	400
<i>M. bovis</i> BCG	> 409,600	> 409,600	400
<i>M. kansasii</i>	800	400	400
<i>M. marinum</i>	> 409,600	> 409,600	400
<i>M. gordonae</i>	400	3,200	1,600
<i>M. scrofulaceum</i>	400	800	400
<i>M. avium</i>	> 409,600	> 409,600	> 409,600
<i>M. intracellulare</i>	> 409,600	> 409,600	400
<i>M. malmoense</i>	102,400	> 409,600	800
<i>M. gastri</i>	400	3,200	400
<i>M. lepraemurium</i>	1,600	25,600	400
<i>M. phlei</i>	800	800	400
<i>M. smegmatis</i>	400	3,200	400
<i>M. fortuitum</i>	800	800	800
<i>M. chelonae</i>	> 409,600	> 409,600	400

a) Bacteria were grown in Sauton liquid medium, and the entire mycobacterial culture was sonicated. Microdilution plates were coated with 50 μ l of mycobacterial sonicate containing 100 μ g of protein per ml.

b) Each value is the highest dilution of mouse ascites fluids that gave an A₄₁₀ of more than 0.2 in the ELISA.

Table 3. Reactivity of MAb Avi-3 against *M. avium* Complex Isolates and Differentiation of the Isolates by DNA:RNA Hybridization

Isolate source	ELISA reactivity ^{a)} of MAb Avi-3	% Hybridization of ¹²⁵ I- labeled cDNA probe with :	
		<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
Patients			
1	< 200	4.3	36.0
2	< 200	2.5	39.6
3	< 200	6.0	38.5
4	> 409,600	51.7	1.3
5	> 409,600	44.9	1.3
6	> 409,600	52.3	2.3
Birds			
Maren Cecilie	> 409,600	ND ^{b)}	ND
Kirchberg	> 409,600	ND	ND
Flamingo	> 409,600	ND	ND
E38686	> 409,600	ND	ND

a) Each value is the highest dilution of mouse ascites fluid that gave an A₄₁₀ of more than 0.2 in the ELISA.

b) Not determined.

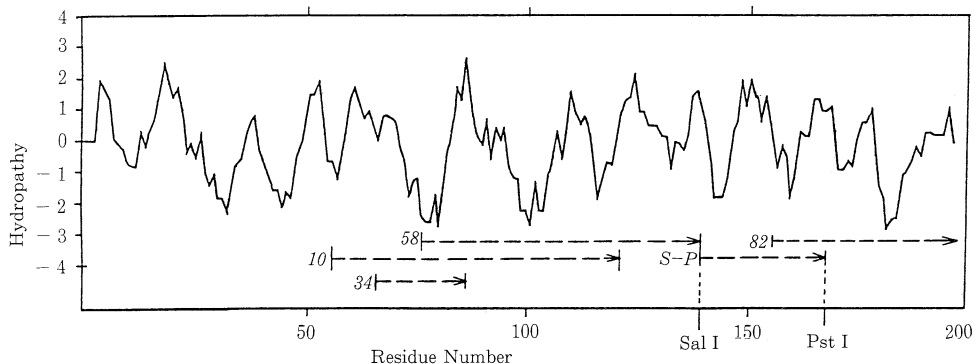


Fig. Hydropathy Profile of an Avi-3 Protein and T-Cell-Epitope-Containing Regions of the Protein

Table 4. *Mycobacterium tuberculosis* Protein Antigens Identified by Monoclonal Antibodies

Molecular size (kDa)	Specificity	Sequence analysis	Related proteins
71	CR-L	Yes	<i>M. leprae</i> 70 kDa <i>E. coli</i> Dnak, Hsp70
65	CR-L	Yes	<i>M. leprae</i> 65 kDa <i>E. coli</i> GroEL
40	CR-L	No	
38	Mt-C	No	
36.2	CR-L	No	
36	Mt-C	No	
33	CR-L	No	
23	CR-B	No	<i>M. leprae</i> 28 kDa
19	CR-L	Yes	
14	Mt-C	Yes	
12	Mt-C	Yes	<i>E. coli</i> GroES

Categories of specificity : Mt-C, *M. tuberculosis* complex ; CR-L, limited cross-reactivity ; CR-B, Broad cross-reactivity.

The MABs were reported by the following investigators : O. Closs, 71 and 19 kDa : J. Ivanyi, 65, 38, 19 and 14 kDa : A. H. J. Kolk, 40, 19 and 14 kDa : J. Bennedsen, 38 and 19 kDa : C. Abe, 36.2, 36 and 33 kDa : T.M. Daniel, 19 kDa : T.M. Buchanan 23 and 65 kDa : P. Minden, 12 kDa.

この *M. avium* 特異 Avi-3 抗体により認識される 27 kD 抗原は *in vitro* と *in vivo* で T 細胞と反応することが示された⁴⁾。さらに Avi-3 タンパクをコードしている遺伝子のクローニングと大腸菌での発現にも成功した⁵⁾。決定された塩基配列から、このタンパクは 194 個のアミノ酸からなり、それから予想される分子量は 21,500 と推定された。種々の制限酵素で Avi-3 遺伝子を切断後、それらのフラグメントを pUR ベクターにつないで β -ガラクトシダーゼ融合タンパクとして大腸菌で発現させ、その菌体抽出液についてリンパ球増殖応答

活性を調べた。Fig. の Avi-3 タンパクの親水性-疎水性プロファイル上に示したように数個の陽性クローンが得られた。54 番目 Pro から 137 番目 Ile の間と 138 番目 Val から C 末までの少なくとも 2 カ所に T 細胞エピートープが存在することが明らかになった。陽性クローンの中でお互いに重複している領域に注目し、この領域を大腸菌で発現させ検討中である。また B 細胞エピートープについても検討中である。これら種特異抗原や B 細胞および T 細胞エピートープを含むタンパク領域はミコバクテリア症の診断において有効な材料となりうると考えられる。

これまでに結核菌タンパクに対する MAb は分子量 12 kD から 71kD の範囲で 11 種報告されている⁶⁾。これら MAb の特異性は ELISA, ドット, ウェスタンブロット, 免疫蛍光法で調べられた。Table 4 に示したように, これらの中で 4 個 (14, 19, 36 と 38kD) は結核菌群特異的である。これらタンパクに対する MAb 以外に *M. avium* complex 特異糖脂質に対する MAb も報告されている⁷⁾⁸⁾。

これらミコバクテリアに対する MAb は, 菌種の同定への利用のみならず親和性クロマトに利用され, 抗原の単離も可能にする。単離された抗原は ELISA, プロット分析用の抗原として利用され, 患者血清中の抗体を調べることで結核の診断にも応用されよう。MAb により認識され, 単離された抗原はすべて T 細胞と反応することが示されており, 種特異抗原は将来 PPD に代わる皮内反応惹起抗原としての使用も考えられる。また MAb は遺伝子工学技術を用いた抗原開発のプロープとしても有用である。このように MAb は, 将来感染症の診断や病原性の研究の道具としていっそう威力を発揮しよう。

文 献

- 1) Köhler, G. and Milstein, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256 : 495-497, 1975.
- 2) Coates, A. R. M., Hewitt, J., Allen, B. W. et al. : Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies, *Lancet* ii : 167-169, 1981.
- 3) 阿部千代治 : 結核菌群特異単クローン抗体の作成とその抗体により認識される抗原の生物学的性状, *結核*, 64 : 270-271, 1989.
- 4) Abe, C., Saito, H., Tomioka, H. et al. : Production of a monoclonal antibody specific for *Mycobacterium avium* and immunological activity of the affinity-purified antigen, *Infect Immun*, 57 : 1095-1099, 1989.
- 5) 山口隆司, 松尾和浩, 山崎晤弘他 : *Mycobacterium avium* 特異蛋白, Avi-3 遺伝子のクローニング, 塩基配列決定, 及び大腸菌での発現, *日細菌誌*, 45 : 393, 1990.
- 6) Engers, H. D. : Letter to the editor. Results of a World Health Organization-sponsored workshop to characterize antigens recognized by mycobacterium-specific monoclonal antibodies, *Infect Immun*, 51 : 718-720, 1986.
- 7) Nishimori, K., Yugi, H., Naiki, M. et al. : Production and characterization of serovar-specific monoclonal antibodies to serovars 4, 8, and 9 of *Mycobacterium intracellulare*, *Infect Immun*, 55 : 711-715, 1987.
- 8) Kolk, A. H., Evers, R. Groothuis, D. G. et al. : Production and characterization of monoclonal antibodies against specific serotypes of *Mycobacterium avium* and the *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*-*Mycobacterium scrofulaceum* complex, *Infect Immun*, 57 : 2514-2521, 1989.

3. BCG を含む *M. bovis* を認識する単クローン抗体を用いた ELISA 法

国立予防衛生研究所 芳賀伸治・高橋宏
後藤義孝・木ノ本雅通
中川雅郎・片岡哲朗
徳永徹・本多三男

最近, 抗酸菌の鑑別・同定に分子遺伝学的手法や免疫学的手法などの新技術が取り入れられ, 検査時間の短縮および検査精度が高められつつある。これらの新技術が, 近い将来臨床の場で診断に利用されようとしている。従来の生物学的性状による同定法¹⁾²⁾では, 長時間の検査時間が必要であった。特に分離後, 継代培養を重ねた BCG を含む *M. bovis* で人工培地に優勢発育を示す菌株では, ナイアシン弱陽性で, 結核菌類似の性状を示すことがある。一方, 結核菌の中にも新分離菌で極めて劣勢

発育を示す場合には, ナイアシンテストの実施が不可能なことがある。

今回報告する新しい方法は, これらの菌株でも確な鑑別・同定が簡便に実施できる方法である。その検出法は, BCG-Tokyo 株に大量に産生される MPB70³⁾

(*M. bovis* に特異的な蛋白)を用いて, まずこの蛋白に対する特異的マウス単クローン抗体を作製し, 次にこの抗体を用いて被検菌の培養上清を抗原として蛍光 ELISA を行う方法である。その際, 被検菌の培養上清

を熱処理することにより含まれている MPB70 の検出をさらに高めることが明らかになり、10 pg/ml の MPB70 の検出が可能となった。したがって、一白金耳菌量の小川分離培地に増殖した菌があれば BCG を含む *M. bovis* にのみ陽性反応を示し、*M. bovis* の同定に極めて有用であることを認めた⁴⁾⁶⁾。

材料と方法

MPB70 に対する単クローン抗体の作製：大阪市立大学永井博士より恵与された MPB70 をマウスに繰り返し免疫し、通常の方法で単クローン抗体を作製した。そのうちの1つを Bov・1 と命名した⁵⁾⁶⁾。MPB70 に対するポリクローナル抗体の作製：MPB70 を oil (FIA) に混ぜてエマルジョンとしモルモットに繰り返し免疫し、得られた抗血清を Protein A カラムにて精製した。

高感度蛍光サンドイッチ ELISA (MPB70 FS-ELISA)：96 穴 ELISA プレートに 1 次抗体 (ポリクローナル抗体) でコーティングし、この抗体に抗原サンプル (後述) を結合後、2 次抗体として、ビオチン化した Bov・1 抗体をサンドイッチ状に結合させる。さらにストレプトアビジン・ β -D-ガラクトシダーゼを結合させる。最後に基質として 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside を加え、生じた 4-メチルウンベリフェロンの蛍光量を、96 穴マイクロプレート用蛍光光度計 (タイターテック®・フルオロスキャン II) にて測定した。成績は数字でプリントアウトされる⁵⁾¹⁰⁾。

抗原サンプルの調製：陽性対照として用いる MPB70 (永井博士恵与のもの) は熱処理 (オートクレーブ・121°C 20 分) したものとしないものを準備した。菌体抗原として、BCG を含む *M. bovis*, *M. tuberculosis*, 非結核抗酸菌など 114 株の培養上清を準備した。その調製法を次に述べる。

① ソートン液体培地からの調製：BCG 亜株 8 株 (Tokyo, Russia, Moreau, Sweden, Pasteur, Copenhagen, Glaxo および Tice 株) をソートン液体培地で 6 週～8 週培養後、その遠心 (12,000 rpm, 50 分) 上清をミリポアフィルターにて濾過した。これを熱処理操作のためにオートクレーブしたものおよびそのままのものを準備し、これらを 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} に希釈して用いた。

② 小川培地からの調製：上述の BCG 亜株 8 株, H37 Rv や臨床分離株などの *M. tuberculosis* 32 株, Ravenel など *M. bovis* 28 株 (BCG 以外の株), *M. africanum* 14 株, *M. microti* 10 株および *M. avium* など非結核抗酸菌 22 株は、小川培地上の菌体 2 白金耳の菌量を PBS-Tween 20 3ml とともに軽くホモジナイズして菌体に付着した MPB70 を洗い出し、それを熱処理操作および滅菌のためにオートクレーブ後、

12,000 rpm, 50 分遠心し菌を分離後上清を得た。その上清を、 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} に希釈して用いた。

成 績

MPB70 に対する単クローン抗体 Bov・1 を用いた高感度蛍光サンドイッチ ELISA (MPB70 FS-ELISA) を開発し、まずこの方法による MPB70 の検出感度と測定時間の検討をした。MPB70 蛋白抗原は、加熱処理したものと非加熱のままのものをを用い、10 μ g/ml から 10 pg/ml まで 10 倍段階希釈を行い、それぞれについて測定した。その結果、非加熱での検出限界は 10 ng/ml～1 ng/ml であったが加熱処理では 10 pg/ml でも十分検出され、熱処理により比活性が高まることがわかった。測定時間の検討は 0 time から 4 時間後まで 30 分間隔でおこなった。その結果、蛍光強度が時間の経過とともに増加し 4 時間でプラトーとなったが、1 時間の測定で十分なことがわかった。

次に、BCG 亜株ソートン培養上清に含まれる MPB70 を FS-ELISA にて測定した。非加熱上清では、Tokyo (Tok) 株はじめ Russia (R), Moreau (M), Sweden (S) 株で陽性であり、これらの株では培養上清の 1,000 倍希釈液でも検出された。しかし、Pasteur (P), Copenhagen (C) 株では培養上清の原液でわずかに陽性を示し、10 倍希釈以下では有意ではなかった。Glaxo (G), Tice (T) 株では 10 倍希釈で陽性で 100 倍希釈以下では有意ではなかった。一方、加熱処理上清は、すべての株で検出感度が高まった。Tok, R, M, S 株では 10,000 倍希釈でも陽性で、P, C 株は 10 倍希釈で、また T, G 株では 1,000 倍希釈で陽性となった。これらの成績から T, G 株および P, C 株でも MPB70 が産生されることが示された。さらに加熱処理培養上清を用いた FS-ELISA 法により、これらの株の MPB70 が的確に検出されることがわかった。

小川培地に発育した菌をすでに述べた方法で調製し、熱処理 MPB70 FS-ELISA 法で MPB70 の検出を行った。*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. tuberculosis*, 非結核抗酸菌を用いて MPB70 の産生能を検討すると、MPB70 は *M. bovis* にのみ認められ、しかもすべての *M. bovis* が MPB70 を産生していた。各々の菌により産生量には差があったが、多量産生株では 1,000 倍希釈液でも陽性を示した。*M. tuberculosis* ではグリセリンによって発育が抑制され、*M. bovis* のような性状を示す 8 株を含むすべての株で陰性であった。なお BCG 亜株について、この方法でテストすると Tokyo 株他 4 株の MPB70 産生量が多い株は *M. bovis* の多量産生株と同様な成績を示したが、Pasteur 株他 4 株の微量産生株では、はっきりした成績が得られなかった。したがって、これらの微量産生株を簡便かつ的確

に同定する方法はこれからの課題である。

わが国では BCG-Tokyo 株がワクチンとして用いられているので、これらの成績から、臨床検体ではソートン培養上清を被検体としなくても小川培地に発育した菌を用いて検査できることがわかった。

考 察

MPB70 に対する単クローン抗体を作製し、それを利用した MPB70 高感度検出法（熱処理 MPB70 FS-ELISA 法）を考案した。単クローン抗体を用いたこの ELISA 法では、BCG-Tokyo 株の他 7 株の BCG 亜株培養上清をはじめ、*M. bovis* の培養上清とよく反応したが、*M. tuberculosis* や、非結核抗酸菌の培養上清とは反応しなかった。

これまでの報告では、BCG 亜株による生菌感作モルモットの MPB70 抗原に対する皮膚反応 (DTH) の成績⁷⁹⁾ は、BCG-Tokyo, Moreau, Russia, Sweden 株 (Russia, Sweden 株の成績は未発表) で陽性であったが、Pasteur 株はじめ Copenhagen, Glaxo, Tice 株では陰性であった。そのため、これら陰性株は *M. bovis* であるにもかかわらず MPB70 を産生しない特殊な株と考えられていた。

これらの陰性株感作モルモットに DTH 皮膚反応が発現しない理由は、次のように考えられる。BCG によるモルモットの防御免疫は BCG 生菌が接種された後、菌の増殖が続きその結果数週間後に成立する。防御免疫が成立すると同時に BCG は増殖を停止することが観察されている。MPB70 は生菌の増殖時に分泌される分泌型蛋白⁸⁰⁾ であるので、MPB70 の産生量が非常に少ない株では、防御免疫成立までの数週間では MPB70 による感作が十分になされず、したがって DTH では陰性を示したと考えられる。このような株でも熱処理 MPB70 FS-ELISA ではっきりと陽性を示した。

以上の成績から MPB70 は *M. bovis* すべてが産生する特異な蛋白であることがわかった。また、熱処理 MPB70 FS-ELISA 法は特異性および感度に優れ、MPB70/*M. bovis* の検出に極めて有用である。加熱処理によって感度が高くなる理由は、熱による MPB70 の凝集の結果二次抗体が多く結合するためである⁸¹⁾。一方、MPB70 を産生しない抗酸菌では、熱処理後も抗体の結合は起こらず、特異性は保たれていた。この加熱処理の利点は、アッセイ感度を高めるだけでなく、検査中の感染事故の可能性を除外することができることであり、熱処理 MPB70 FS-ELISA 法の実質的有用性をさらに高める要因となると考えられる。

ところでわが国では、現在人への牛結核症発症の報告はなく、人から分離される結核菌群は、*M. tuberculosis* か BCG のどちらかであると考えられる。われわれ

の開発したこの方法により、両者の鑑別を容易に行うことができる。従来の生化学的同定法のみならず最近開発された DNA プローブ法を用いても、*M. tuberculosis* と *M. bovis* の鑑別は容易ではない現状である。このようなことから本法は MPB70 の産生、物理化学的特性を解明する上で重要であるだけでなく、臨床的に両者を鑑別するのに極めて優れた方法であると考えられる。

文 献

- 1) 束村道雄, 東海林黎吉, 松田啓子: BCG 接種後に起った結核性淋巴節炎の 2 症例とその淋巴節分離菌の性状-BCG 株を他の *Mycobacterium bovis* 株から区別する方法-, 結核, 59: 289~293, 1984.
- 2) 工藤祐是, 細島澄子: BCG の分離と同定, 結核, 63: 136~137, 1988.
- 3) Nagai, S., Matsumoto, J. and Nagasuga, T.: Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG, Infect Immun, 31: 1152-1160, 1981.
- 4) 芳賀伸治, 高橋 宏, 後藤義孝他: MPB70 に対する単クローン抗体の作製とこれを利用した蛍光サンドイッチ ELISA による MPB70 陽性株の同定とその意義, 結核, 64: 277~278, 1989.
- 5) 芳賀伸治, 高橋 宏, 後藤義孝他: 高感度サンドイッチ ELISA による MPB70 陽性菌株の同定とその意義, 第 12 回臨床抗酸菌研究会講演内容: 17~24, 1990.
- 6) 芳賀伸治, 中川雅郎, 後藤義孝他: MPB70 に対する単クローン抗体の作製とその特性について, 第 60 回実験結核研究会総会講演内容抄録, 印刷中, 1990 (論文準備中)
- 7) Miura, K., Nagai, S., Kinomoto, M. et al.: Comparative studies with various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG on the production of an antigenic protein, MPB 70, Infect Immun, 39: 540-545, 1983.
- 8) Harboe, M. and Nagai, S., : MPB 70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG, Am Rev Respir Dis, 129: 444-452, 1984.
- 9) Tokunaga, T., Miura, K., Haga, S. et al.: Host response to a protein antigen, MPB 70, produced by viable BCG (Tokyo substrain), Seventeenth joint conference on tuberculosis US-Japan Cooperative medical science program: 126-140, 1982.
- 10) Honda, M., Nagao, S., Yamamoto, N. et al.: Fluorescence sandwich enzymelinked immunosorbent assay for detecting human

4. DNAプローブによる抗酸菌の迅速同定法

島根医科大学微生物・免疫 富岡治明・斎藤 肇

緒 言

最近, *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), *M. avium* 並びに *M. intracellulare* の各々よりの ribosomal RNA に相補的な特異 ^{125}I -標識 DNA プローブを利用したこれら抗酸菌の迅速同定キット (Gen Probe[®] Rapid Diagnostic System) が米国の Gen Probe 社より市販され, わが国でも入手可能となった。そこでわれわれは, いち早くこれらの同定キットを入手し, その使用に当たっての条件や有用性について若干の検討を行った。

材料と方法

(1) 供試菌: 教室保存の *M. tuberculosis*, *M. bovis* および *M. africanum* 各 28, 10 および 5 株, コード番号を付して国立予研高橋宏博士より分与を受けた MTC 11 株並びに京大久世文幸教授および国療広島病院井上圭太郎博士より分与を受けた MTC, *M. avium* complex (MAC) その他諸種抗酸菌計 71 株の総計 125 株, Miss A. Y. Tsang (National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine, USA) (NJC), Dr. G. P. Kubica (Centers for Disease Control, USA) (CDC) および Dr. D. J. Dawson (State Health Laboratory, Brisbane, Australia) より分与を受けた MAC 血清型 (1~28) 標準菌株各 51, 21 および 24 株, 並びに MAC 以外の業室非結核性抗酸菌 16 種 30 株。

(2) DNA プローブテスト: 1%小川培地上培養菌をガラスビーズで分散させ, McFarland No.1 の濃度に調整した菌液 0.1ml を “Bacterial Lysinn Reagent” に添加→55~59°C, 15 分間超音波処理→MTC または MAC の “DNA Probe Solution” 1ml を加え 72°C, 60 分静置→ “Separation Suspension” 4ml を添加, 攪拌→72°C, 5 分保温, 攪拌→遠心沈渣を “Wash Solution” 4ml に懸濁, 攪拌→遠心沈渣中の放射活性を Gamma counter で計測, % hybridization 値を算出 (陽性値 $\geq 10\%$)。

結 果

1. DNA プローブテストの特異性と感度

生物学的・生化学的諸性状により同定され, コード番

号を付して分与を受けた抗酸菌計 82 株の 3 種 DNA プローブによる盲検では, 15 株が *M. avium*, 11 株が *M. intracellulare* (% hybridization 値=25~55%), 33 株が MTC (% hybridization 値=24~52%) と同定され, 残りの 23 株はこれら以外の抗酸菌と考えられ, 既命名菌種名との一致率は 100% であった。また, 教室保存の MTC 43 株は, MTC のプローブとのみ反応し, % hybridization 値は TB-4 株 (22%) をのぞいてはいずれも 44~52% と高値を示した。なお供試 MTC のいずれとも *M. avium* あるいは *M. intracellulare* のプローブと反応したものはなく, また Table 1 に示すように *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. goodii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* など MAC 以外の非結核性抗酸菌 (16 菌種 30 株) の中にはいずれも, MTC および MAC のプローブとの反応性を示したものはなかった。

2. DNA プローブテスト実施条件の検討

(1) MTC あるいは MAC のいずれとも菌液濃度は McFarland No.1 の 1/5~5 倍の範囲内においては, 規定濃度 (No.1) における hybridization 値と大差はなかった (Table 2)。

(2) 喀痰より分離された MTC あるいは MAC の 1%小川培地上 3~8 週の菌を用いての DNA プローブテストの成績と培養・生化学性状による同定成績との間にはほとんど差は見いだし得なかった。

(3) MTC あるいは MAC の業室株の 1%小川培地上における集落初発から 16 週間に至る培養菌を用いての DNA プローブテストでは, Table 3 に示すように菌が古くなると % hybridization 値に若干の低下がみられたが, 同定成績に誤りを来すほどのものではなかった。

(4) MTC あるいは MAC の菌液 (McFarland No. 1) を 4°C, -20°C, -80°C で保存した場合, いずれの温度でも保存 4 カ月では % hybridization 値に明らかな低下がみられはしたが, いずれの菌株においても十分な反応性を保持しており (MTC > MAC), 実際の同定には十分に供試可能であるものと思われた (Table 4)。

(5) MTC と MAC の contamination の同定成績に及ぼす影響については, 供試菌の 1/5 量の cocontamination ではそれを誤って同定することはなかったが, MTC, *M. avium* 並びに *M. intracellulare* は各供試菌

Table 1. Reactivities of Various Nontuberculous Mycobacteria
Other than MAC with DNA Probes of MTC and MAC

Strain	% Hybridization		
	Probe		
	MTC	<i>M. avium</i>	<i>M. intra</i> *
<i>M. kansasii</i> P16	1.4	1.1	1.7
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	1.3	1.1	1.6
<i>M. marinum</i> Shimamoto	1.1	1.3	1.3
<i>M. marinum</i> ATCC 927	1.0	0.9	1.2
<i>M. simiae</i> 25	1.1	0.9	1.7
<i>M. simiae</i> ATCC 25275	1.2	2.0	1.6
<i>M. asiaticum</i> 27	1.0	1.1	1.1
<i>M. asiaticum</i> ATCC 25276	1.4	0.7	1.1
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19073	1.0	1.0	1.7
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981	0.9	1.0	1.2
<i>M. gordonae</i> ATCC 23284	1.1	0.9	1.3
<i>M. gordonae</i> ATCC 14470	0.9	1.6	1.1
<i>M. szulgai</i> NCTC 10831	1.1	1.0	2.6
<i>M. malmoense</i> ATCC 29571	0.8	0.9	1.2
<i>M. xenopi</i> ATCC 19276	1.1	0.8	1.6
<i>M. xenopi</i> ATCC 19970	3.6	0.9	1.3
<i>M. gastri</i> W417	1.3	1.1	1.6
<i>M. gastri</i> W465	1.7	0.9	2.1
<i>M. nonchromogen.</i> ATCC 19530**	0.9	1.1	1.7
<i>M. nonchromogen.</i> ATCC 19531	1.2	1.3	1.3
<i>M. terrae</i> ATCC 15755	1.8	1.0	1.4
<i>M. terrae</i> W-511	1.1	0.9	1.3
<i>M. triviale</i> T-435-5	1.1	0.9	1.1
<i>M. triviale</i> ATCC 23290	0.8	0.8	1.2
<i>M. fortuitum</i> 18356	0.9	0.8	1.2
<i>M. fortuitum</i> 18367	1.0	0.8	1.7
<i>M. chelonae</i> (abscessus) R108	0.9	1.0	2.2
<i>M. chelonae</i> (abscessus) ATCC 19977	0.7	0.7	1.3
<i>M. chelonae</i> (chelonae) 19062	0.7	0.9	0.9
<i>M. chelonae</i> (chelonae) NCTC 946	0.8	0.6	1.2

* *M. intracellulare*

** *M. nonchromogenicum*

の約1/100, 1/5 および 1/10 量の contamination によってそれぞれのプローブと陽性反応を示すことが分かった (Table 5)。

(6) MAC の DNA プローブ反応性は hybridization の温度を 72°C から 68°C に下げても変わることはなかった。

3. MAC 血清型と DNA プローブ反応性

DNA プローブテストにより MAC 血清型 1-6, 8-11, 21 各所属菌株は *M. avium* に、また血清型 7, 12-20, 25 各所属菌株は *M. intracellulare* と同定されるが、MAC 特異 α -抗原を有するにもかかわらず、両菌種のプローブに対する % hybridization 値が陽性値 ($\geq 10\%$) 以下であるものが 23, 24 および 28 血清型菌

Table 2. Dependency of % Hybridization Value on Concentration of Test Bacterial Suspension

Strain	Concentration of bacterial suspension (OD ₅₄₀)*	% Hybridization		
		Probe		
		<i>M. avium</i>	<i>M. intra</i>	MTC
<i>M. avium</i> 6194	0.1	30.5	1.8	NT**
	0.25	25.1	2.5	NT
	0.5	33.3	1.4	NT
	1.0	26.2	1.2	NT
	2.5	50.2	1.2	NT
<i>M. intracellulare</i> Yandle	0.1	2.2	25.6	NT
	0.25	1.2	20.2	NT
	0.5	1.0	17.4	NT
	1.0	0.8	34.8	NT
	2.5	1.0	39.7	NT
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	0.1	NT	NT	32.2
	0.25	NT	NT	35.0
	0.5	NT	NT	35.2
	1.0	NT	NT	32.2
	2.5	NT	NT	35.7
<i>M. bovis</i> D-4	0.1	NT	NT	35.0
	0.25	NT	NT	37.5
	0.5	NT	NT	38.8
	1.0	NT	NT	33.6
	2.5	NT	NT	38.2

* OD = 0.5 corresponds to McFarland No. 1.

** Not tested.

Table 3. Change in Reactivity to DNA Probes in the Course of Cultivation of Organisms

Strain	Weeks after appearance of colonies on 7H11 medium	% Hybridization		
		Probe		
		MTC	<i>M. avium</i>	<i>M. intra</i>
<i>M. avium</i> 6194	0	NT*	27.2	1.1
	1	NT	40.4	1.0
	2	NT	32.6	1.9
	4	NT	29.6	1.6
	8	NT	40.0	1.4
	12	NT	34.4	1.7
	16	NT	38.0	1.4
<i>M. intracellulare</i> Yandle	0	NT	1.3	23.7
	1	NT	1.6	26.6
	2	NT	1.1	21.3
	4	NT	1.0	23.2
	8	NT	1.0	22.8
	12	NT	1.0	21.2
	16	NT	1.1	11.1

<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ R _v	0	34.3	NT	NT
	1	41.2	NT	NT
	2	29.9	NT	NT
	4	24.4	NT	NT
	8	28.5	NT	NT
	12	15.3	NT	NT
	16	20.1	NT	NT
<i>M. tuberculosis</i> Metsugi	0	39.0	NT	NT
	1	38.3	NT	NT
	2	31.0	NT	NT
	4	31.9	NT	NT
	8	27.5	NT	NT
	12	27.0	NT	NT
	16	30.9	NT	NT

* Not tested.

Table 4. Change in Reactivity to DNA Probe during Storage

Strain	Temp. (°C)	DNA probe	% Hybridization					
			Weeks of storage					
			0	1	2	4	8	17
<i>M. avium</i> 6194	4	<i>M. avium</i>	41.7	59.8	55.6	48.4	32.7	25.0
	-20	<i>M. avium</i>		55.4	49.3	38.8	33.4	39.8
	-80	<i>M. avium</i>		31.8	28.1	48.7	33.4	35.1
<i>M. intracellulare</i> Yandle	4	<i>M. intra</i>	39.1	45.3	24.5	21.9	20.2	18.9
	-20	<i>M. intra</i>		29.8	30.2	27.0	24.5	29.6
	-80	<i>M. intra</i>		43.1	33.0	30.0	18.0	26.0
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ R _v	4	MTC	46.1	44.2	40.1	40.3	31.7	38.3
	-20	MTC		44.0	37.5	40.2	33.3	41.4
	-80	MTC		43.9	40.1	44.3	34.4	43.6
<i>M. tuberculosis</i> Metsugi	4	MTC	47.1	42.0	37.6	40.1	31.5	34.7
	-20	MTC		44.4	41.8	40.3	31.9	38.2
	-80	MTC		42.1	38.4	40.6	36.5	46.1
<i>M. bovis</i> D-4	4	MTC	48.2	43.5	39.5	42.7	35.9	30.1
	-20	MTC		44.5	40.4	41.3	35.0	38.7
	-80	MTC		44.7	41.5	43.1	35.6	43.0
<i>M. africanum</i> TC-3	4	MTC	39.9	38.6	30.2	33.7	22.1	28.8
	-20	MTC		35.1	31.9	34.9	26.1	37.3
	-80	MTC		34.4	32.3	34.9	32.4	33.1

% Hybridization of MAC 6194 to *M. intra* probe and that of MAC Yandle to *M. avium* probe was lower than 3.8 % throughout the experiment.

Table 5. Influence of Contaminants on Reactivity of MTC and MAC to DNA Probes

Test strain	Contamination		% Hybridization		
			Probe		
	Organism	Ratio*	MTC	<i>M. avium</i>	<i>M. intra</i>
<i>M. tuberculosis</i> Metsugi	<i>M. avium</i>	0	26.0	0.9	NT**
		10 ⁻⁴	30.4	0.7	NT
		10 ⁻³	31.3	1.0	NT
		10 ⁻²	26.5	1.6	NT
		10 ⁻¹	30.0	7.6	NT
		2 × 10 ⁻¹	28.9	17.0	NT
<i>M. tuberculosis</i> Metsugi	<i>M. intracellulare</i>	0	23.7	NT	1.2
		10 ⁻⁴	29.7	NT	1.1
		10 ⁻³	30.2	NT	1.5
		10 ⁻²	29.3	NT	2.9
		10 ⁻¹	24.1	NT	16.9
		2 × 10 ⁻¹	28.4	NT	12.0
<i>M. avium</i> 6194	<i>M. tuberculosis</i>	0	1.1	39.2	NT
		10 ⁻⁴	1.7	41.7	NT
		10 ⁻³	1.9	35.6	NT
		10 ⁻²	11.3	39.9	NT
		10 ⁻¹	21.4	37.2	NT
		2 × 10 ⁻¹	21.1	37.2	NT
<i>M. intracellulare</i> Yandle	<i>M. tuberculosis</i>	0	1.6	NT	22.4
		10 ⁻⁴	1.0	NT	14.1
		10 ⁻³	1.4	NT	26.0
		10 ⁻²	4.5	NT	12.4
		10 ⁻¹	20.3	NT	24.5
		2 × 10 ⁻¹	22.9	NT	19.6

* Contamination ratio = (concn' of contaminated organisms) / (concn' of test organisms ; McFarland No. 1).

Number of CFU of bacterial suspension at McFarland No. 1 was as follows : *M. tuberculosis* Metsugi, 1.5 × 10⁷ / ml ; *M. avium* 6194, 8.9 × 10⁸ ml ; *M. intracellulare* Yandle, 8.7 × 10⁸ / ml.

** Not tested.

Table 6. Reactivity of MAC Strains Belonging to Serovars 22-28 to MAC DNA Probes

Serovar	Strain	Source	% Hybridization*		Biological characteristics and α-antigen
			Probe		
			<i>M. avium</i>	<i>M. intra</i>	
22A	5154 O' Connor	CDC	2.8	3.4	Scro.**
22A	5154	NJC	8.3	2.0	Scro.
22B	10409	CDC	1.1	0.9	Scro.
22B	10409	NJC	0.8	1.0	Scro.
23A	CDC841 B	CDC	2.0	2.3	MAC
23B	23393	CDC	8.1	2.0	MAC
23B	23393	NJC	6.7	2.7	MAC
23	CDC 1214	NJC	6.5	3.4	MAC

24 A	12645	CDC	9.3	4.1	MAC
24 A	12645	NJC	8.4	2.5	MAC
24 B	2154	CDC	1.0	33.9	MAC
26 A	Cox 1944	CDC	0.9	1.0	Scro.
26 B	Mackenzie	NJC	0.7	1.0	Scro.
26	Hillberry 1244	NJC	1.4	35.2	MAC
27 A	Harrison	CDC	0.9	1.1	Scro.
27 A	Harrison	NJC	0.5	0.9	Scro.
27 B	Lane 3081	CDC	0.8	1.2	Scro.
28 A	6845 Koukout	CDC	1.3	22.3	MAC
28 A	6845	NJC	2.2	37.3	MAC
28 B	9055 Matthews	CDC	3.2	1.9	MAC
28 B	9055 Matthews	NJC	10.2	6.7	MAC

* The mean of 2~5 tests except for Harrison NJC (serovar 27 A) and 3081 CDC (serovar 27 B).

** *M. scrofulaceum*.

Table 7. Reactivity of MAC Strains Obtained from Dr. Dawson Belonging to Serovars 22~28 to MAC DNA Probes

Serovar	Strain	% Hybridization	
		Probe	
		<i>M. avium</i>	<i>M. intra</i>
22	S88/142	1.1	31.6
22	S88/233	2.2	2.4
22	S88/239	2.1	2.7
22	S88/381	1.1	23.9
23	S88/420	1.1	1.5
24	S88/87	2.1	2.3
24	S88/294	2.4	2.1
24	S88/543	2.0	1.8
25	S88/21	1.1	27.5
25	S88/55	1.4	27.3
25	S88/90	1.1	30.9
25	S88/204	1.4	33.1
25	S88/259	1.6	32.6
25	S88/334	1.2	29.3
25	S88/425	1.3	27.4
25	S88/465	1.2	30.2
26	S87/210	6.7	1.8
26	S88/155	1.4	2.8
26	S88/175	1.5	1.9
27	S88/59	1.7	1.8
27	S88/234	1.3	1.5
27	S88/237	1.4	2.0
28	S87/69	1.2	29.7
28	S88/101	1.5	1.2

にみられ、また 22 および 27 血清型菌は *M. scrofulaceum* (% hybridization 値 < 10 %) である (Table 6)¹⁾²⁾。今回は、Dr. D. J. Dawson (Australia) より分与を受けた 22~28 血清型菌について DNA プロブテストを行ったところ、先の報告と同様の成績が得られた (Table 7)。

考 察

以上の成績から、(1) MTC, *M. avium* 並びに *M. intracellulare* の DNA プロブによるこれら菌株の迅速同定法は十分な精度をもって、迅速かつ容易に行い得ること、(2) 現行の標準テスト法の反応条件にはなお検討の余地が残されていること、(3) 特殊な MAC 血清型菌の中には *M. avium* あるいは *M. intracellulare* のいずれのプロブとも反応しない菌株があることなどが明らかになったが、これらについては今後の詳細な検討がなされる。

文 献

- 1) Saito, H., Tomioka, H., Sato, K. et al. : Identification and some characterizations of *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* isolated in Japan. *J Clin Microbiol*, 27 : 994-997, 1989.
- 2) Saito, H., Tomioka, H., Sato, K. et al. : Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare*. *J Clin Microbiol*, 28 : 1694-1697, 1990 (in press).

付. 7H-12 液体培地による患者材料からの結核菌の分離

結核予防会結研 阿部 千代治・細島 澄子

Löwenstein-Jensen に代表される卵培地が、ミコバクテリアの培養に長い間使われてきた。1958年に Middlebrook ら¹⁾は、生きたミコバクテリアをより早く検出するために寒天培地を開発した。しかし、依然として臨床材料からミコバクテリアを検出するのにまだ平均3週間を要した。

結核菌は伝染性があるので、他のミコバクテリアと分別することは非常に重要である。迅速な判定は医師にとって患者やその接触者を管理する上で重要である。検査室ではいろいろの生化学テストが行われており、特にナイアシンテストが確認に使われている。

患者を効果的に治療するために分離されたミコバクテリアの薬剤感受性についての情報も必要である。卵培地は濃厚であるため、ある種の薬剤では加えられた薬剤の効力が保存中に失効することが認められているが、Middlebrook 7H-10 寒天培地を使うことによりその限界が一部克服された。さらに2-10%炭酸ガス条件下で培養することによりミコバクテリアの増殖を助け、カゼイン水解物を加えることにより結核菌のなかでも多剤耐性菌の増殖が促された²⁾³⁾。

1969年に DeLand と Wagner⁴⁾は結核菌が培地中の¹⁴Cをラベルした基質を脱カルボキシル化する際に遊離する¹⁴CO₂を測定して、バクテリアの代謝を自動検出する技術を開発した。Cummings ら⁵⁾は1975年に同じ原理が結核菌の増殖の測定にも応用できることを示した。Middlebrookはこの技術をさらに改良し、ミコバクテリアの増殖を促す¹⁴Cラベル基質を含む7H-12液体培地を発表した⁶⁾。

今回、患者材料からの結核菌の分離率に、この液体培地と従来の方法との間に差があるかどうか調べた。

材料および方法

実験に用いた培地は、Middlebrook 7H-12 液体培地でその組成を Table 1 に示した。Middlebrook 7H-9 を基礎培地とし、他にカゼイン水解物、牛血清アルブミン、カタラーゼを含んでいる。カゼイン水解物とアルブミンは多剤耐性菌の増殖を促すことが知られているし、カタラーゼの添加はINH耐性菌の分離に効果的と報告されている。また Tween 60 相当品であるポリオキエチレンステアレートが治療を受けた慢性の患者からの菌でゆっくりしか増殖しない菌の増殖を促すことが Siddiqi ら⁷⁾により報告されていることから0.1 mg/ml の濃度にこの試薬を加えた。酸やアルカリによる汚

染除去操作後も生き残っているミコバクテリア以外の菌の増殖を抑制する抗菌補助剤の添加は液体培地においては重要である。Table 2 に示したポリミキシンB、アンフォテリシンB、ナリジキシン酸、トリメソプリム、アズロシリンからなるPANTAが優れていることが認められている⁸⁾ことからこの補助剤を実験に用いた。

材料として複十字病院を訪れた外来患者および入院患者からの喀痰を用いた。喀痰に等量の4% NaOHを加え、ボルテックスミキサーで十分混和後、ときどき手で振りながら室温で15~20分間処理した。処理材料の0.1 mlを中和せずに3%小川培地に接種した。残りの材料は50 ml プラスチック遠心チューブに移し、それに約10倍量の10 mM 磷酸緩衝液(pH 7.2)を加え、希釈後4°C、4,000回転で20分間遠心した。注意深く上清を捨て、沈渣を約1 mlの緩衝液に懸濁し、その0.1 mlずつを1%小川卵培地、Middlebrook 7H-11 寒天と7H-12 液体培地に接種した。7H-11 寒天と7H-12 液体培地は5% CO₂ インキューベーターで培養した。液体培地中の菌の増殖は塗抹染色と寒天培地への接種により判定した。

結果および考察

喀痰材料108例を培養した中で7H-12 液体培地で41検体、38%からミコバクテリアが回収された(Table 3)。7H-11 寒天では36検体から菌が回収でき、液体培地に近い検出率であったが、従来法、すなわち3%小川法では24検体、22.2%からであり、液体培地の検出率の約

Table 1. Middlebrook 7H-12 Medium(liter)

Middlebrook 7H-9	4.7 g
Casein hydrolysate	1.0 g
Bovine serum albumin	5.0 g
Catalase	48,000 U

Table 2. "PANTA" Antimicrobial Mixture

Drug	Final concentration in 7H-12 medium
Polymyxin B	50 U/ml
Amphotericin B	5 µg/ml
Nalidixic acid	20 µg/ml
Trimethoprim	5 µg/ml
Azlocillin	10 µg/ml

Table 3. Isolation of Mycobacteria from 108 Specimens in Different Media

Medium	No. of positive culture	%
7H-12	41	38.0
7H-11	36	33.3
1% Ogawa	26	24.1
3% Ogawa	24	22.2

半分であった。

次に塗抹陽性と塗抹陰性例に分けて、各培地による分離率を比較した。塗抹陽性 30 検体中 25 検体からはいずれかの培地で菌が回収できた。液体培地では 23 例が陽性であり、これは塗抹陽性でミコバクテリア培養陽性を示した総検体の 92% に相当する (Table 4)。3% 小川では 18 検体、72% が陽性であった。一方、塗抹陰性例をみると 2 つの培地の間に検出率に大きな差が認められた。7H-12 液体で 18 検体、85.7% が陽性であったのに対し、3% 小川では 6 検体のみで液体培地の検出率の 1/3 であった。すなわち塗抹陽性検体からは 3% 小川でもある程度高い割合で菌が回収できるが、材料中に菌量の少ない塗抹陰性例では液体培地に比べ 3% 小川は極端に劣ることをこれらの結果は示している。

結核菌群と結核菌群以外のミコバクテリア (MOTT) に分けて分離率に差があるかどうかをナイアシントテストの済んだ検体で比べてみた。結果は Table 5 に示した。結核菌については分離率のいちばん低い 3% 小川法でも 83.3% であり、培地間に大きな差がみられなかったが

MOTT の分離率には大きな差が認められた。7H-12 液体培地では 11 例、100% であったのに対し、3% 小川では 6 例で液体培地の約半分であった。多くの MOTT に属する菌はアルカリに弱いことから、ここで得られた結果の一部は NaOH 処理による死滅を反映しているものと考えられる。

ミコバクテリアの検出に要する日数で比べてみると、Table 6 に示したように 7H-12 液体培地で検出された菌のすべては 3 週以内で判定できた。括弧内には塗抹陽性で培養陽性を示した検体数を示したが 3 週目で判定できた 16 例のうち 13 例は塗抹陰性例であり、材料中に含まれる菌量が少ない場合でも約 3 週で判定できることを示している。また塗抹陽性例に限ってみれば、大多数は 2 週以内で判定できることを示している。これに対し、7H-11 寒天、小川培地では 5 週、6 週目で初めてコロニーを検出できた検体もあり、検出に要する日数でも液体培地が優れていることが明らかにされた。

7H-12 液体培地はミコバクテリアの増殖を促すことから、当然患者材料中に含まれるミコバクテリア以外の微生物の増殖促進も考えられる。Table 7 に汚染検体数を示した。1% 小川法と 3% 小川法では斜面全面に汚染が広がり観察ができなかった検体数のみを示してあり、部分汚染例は除いてある。抗菌補助剤 PANTA を加えた 7H-12 液体培地では 108 検体培養して 1 例に汚染がみられただけであった。抗菌補助剤を加えていない寒天では 7 例、6.5% に汚染がみられたが補助剤を加えた寒天では 1 例も汚染がみられなかった。1% 小川では全面汚染例はみられなかったが、3% 小川では 7 例、6.5% に全面汚染がみられた。表には示さなかったが、部分汚

Table 4. Isolation of Mycobacteria from 108 Smear Positive and Negative Specimens

	No. of positive specimens (%)			
	7H-12	7H-11	1% Ogawa	3% Ogawa
Smear positive (25)*	23 (92)	21 (84)	18 (72)	18 (72)
Smear negative (21)	18 (85.7)	15 (71.4)	8 (38.1)	6 (28.6)
Total (46)	41 (89.1)	36 (78.3)	26 (56.5)	24 (52.2)

* No. of positive culture

Table 5. Primary Isolation of Mycobacteria in Different Media

	No. of positive culture (%)			
	7H-12	7H-11	1% Ogawa	3% Ogawa
TB (18*)	17 (94.4)	17 (94.4)	16 (88.9)	15 (83.3)
MOTT (11)	11 (100)	10 (90.9)	8 (72.7)	6 (54.5)

* No. of positive culture

Table 6. Primary Isolation of Mycobacteria

Time required (week)	No. of positive culture			
	7H-12	7H-11	1% Ogawa	3% Ogawa
1	19 (14*)	4 (3)	1 (1)	0
2	6 (6)	14 (8)	11 (8)	13 (10)
3	16 (3)	12 (7)	6 (5)	5 (4)
4	0	5 (3)	4 (3)	3 (2)
5	0	1 (0)	2 (1)	1 (1)
6	0	0	2 (0)	2 (1)

* No. of smear positive specimens showed positive culture

Table 7. Incidence of Discarded Cultures Due to Contamination

Medium	No. of contaminated culture	%
7H-12 with PANTA	1	0.9
7H-11 with PANTA	0	0
7H-11 without PANTA	7	6.5
1% Ogawa*	0	0
3% Ogawa*	7	6.5

* Contamination in the conventional system was considered when all places of solid media were lost.

染が1%小川で1例、3%小川で4例にみられた。これらの結果は抗菌補助剤PANTAの選択性が優れていることを示すものである。

NAP (p-nitro- α -acetylaminob- β -hydroxypropionophenone) はクロラムフェニコール合成の中間産物であり、5 μ g/ml の濃度で結核菌群に属する菌の増殖をほとんど完全に抑制し⁹⁾¹⁰⁾、他のミコバクテリアはほとんどまたはまったく抑制しない。¹⁴Cラベル基質を含む7H-12培地 (BACTECシステム) で検出した72株についての東堤ら¹¹⁾のNAPテストとナイアシンテストの比較検討で陽性一致率96%、陰性一致率100%、全体の一致率97.2%と2テスト間に高い一致率を認めている。NAPテストでは2~5日間で結核菌群の同定が可能であり迅速性に富んでいるのに対し、ナイアシンテストの場合ある量の菌を必要とするため最低3週間待たねばならない。

液体培地を使つてのミコバクテリアの薬剤感受性試験を行うための手順 (BACTEC) は従来の方法と同じ基本原理に基づいており、相違点は約3週後にコロニーを数える代わりに放射活性を測定することにより4~5日以内で判定できることにある。結核菌17、MOTT 3の計20株についての東堤ら¹¹⁾の成績はBACTEC法と従来の法とのそれがよく相関することを示した。また5~7日

で判定でき、迅速法としてその有用性が認められた。卵培地や寒天培地などの固型培地では保存中に含まれている薬剤の失効が問題にされている。特にRFP、ETH、CSなどではそれが顕著でCPM、KM、EBでも失活がみられる。液体培地では菌接種直前に薬剤を添加するためその心配は除かれる。今後国内でこの方法を取り入れるためには国内で分離された菌株の種々の薬剤に対するMICを測定し、テスト薬剤の濃度を決定せねばならない。

文 献

- 1) Middlebrook, G. and Cohn, M. L. : Bacteriology of tuberculosis ; Laboratory methods, Am J Publ Health, 48 : 844-853, 1958.
- 2) Cohn, M. L., Waggoner, R. F., McClatchy, K. et al. : The 7H-11 medium for the cultivation of mycobacteria, Am Rev Respir Dis, 98 : 295-296, 1968.
- 3) Mitchison, D. A., Allen, B. W., Carrol, L. et al. : A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli, J Med Microbiol 5 : 165-175, 1972.
- 4) DeLand, F. H. and Wagner, H. N. : Early detection of bacterial growth with carbon-14 labelled glucose, Radiology, 92 : 154-155, 1969.
- 5) Cummings, D. M., Ristroph, D., Camargo, E. E. et al. : Radiometric detection of the metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*, J Nucl Med, 16 : 1189-1191, 1975.
- 6) Middlebrook, G., Reggiardo, Z., Tigertt, W. D. et al. : Automatable radiometric detection of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media, Am Rev Respir Dis, 115 : 1066-1069, 1977.
- 7) Siddiqi, S. H., Hawkins, J. E. and Laszlo,

- A. : Studies to further enhance mycobacterial growth in radiometric 7H-12 medium, Abstract U46, A. S. M. Annual Meeting, 1985.
- 8) Siddiqi, S. H. and Hwangbo, C. C. : A new antimicrobial mixture (polymixin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim and azlocillin) for effective suppression of non-mycobacterial contamination during primary isolation of mycobacteria, Abstract U35, A. S. M. Annual Meeting, 1986.
- 9) Siddiqi, S. H., Hwangbo, C. C., Silcox, V. et al. : Rapid radiometric methods to detect and differentiate *Mycobacterium tuberculosis* /*M. bovis* from other mycobacterial species, Am Rev Respir Dis, 130 : 634-640, 1984.
- 10) Rastogi, N., Goh., K. S. and David, H. L. : Selective inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by p-nitro- α -acetyl-amino- β -hydroxypropiofenone (NAP) and p-nitrobenzoic acid (PNB) used in 7H-11 agar medium, Institut Pasteur Res Microbiol, 140 : 419-423, 1989.
- 11) 東堤 稔 : 抗酸菌迅速検出機器 BACTEC TB 460 システムの評価, 第9回近畿地区臨床検査大会抄録, 1989.

第 65 回 総会ワークショップ

II. ハイリスクからの結核

座長 山 岸 文 雄 (国立療養所千葉東病院)

受付 平成 2 年 7 月 24 日

The 65th Annual Meeting Workshop

II. TUBERCULOSIS IN HIGH RISK GROUPS

Chairman : Fumio YAMAGISHI *

Panelists:

1. Pulmonary Tuberculosis in the Compromised Hosts—Report of the 30 th B Series of Controlled Clinical Trials in the Cooperative Study Tuberculosis Chemotherapy of the National Sanatoria in Japan (Chairman : Toshihiko HAGA) : Eiro TSUBURA and Ryo KIMURA (National Toneyama Hospital)
2. Tuberculosis in the Urban Poor : Wataru YAMAGUCHI (Osaka Prefectural Nursing College)
3. Tuberculosis in Family Contacts : Yoshiko KAWABE, Tohru KATAYAMA and Toshihiko HAGA (National Tokyo Hospital)
4. Tuberculosis in Hospital Workers : Kiminori SUZUKI, Yuka NIIJIMA, Jun-ichi YASUDA, Fumio YAMAGISHI, Shohichi IHARA (National Chiba-Higashi Hospital) and Akimitsu SHIMURA (Chiba Anti-tuberculosis Association)
5. Tuberculosis in Asian Students in Japanese Language Schools in Toshima Ward : Kazuko ITO (Ikebukuro Health Center)

Additional Speaker :

Results of the Mass Health Examination for the Foreign Students in Japanese Language Schools in Tokyo : Hideo MAEDA (Bureau of Public Health, Tokyo Metropolitan Government)

Received for publication July 24, 1990)

In Japan, the incidence of tuberculosis is being concentrated more in high risk groups. But the countermeasures for each high risk groups, especially in the social high risk groups had not been worked out enough. In this workshops therefore discussions was made to clarify the present situations and problems of tuberculosis in each high risk group.

Dr. Kimura reported that the major underlying diseases in the compromised hosts were diabetes mellitus and malignancies. And the predominant risk factors for developing tuberculosis in them were malnutrition, longterm use of steroids and anticancer agents.

Among the dead cases, the more the disease was advanced on admission, the less

* From the Division of Thoracic Disease, the National Chiba-Higashi Hospital, Chiba 280 Japan.

improvement on chest X-ray was seen. Malnutrition was found to be a causative factor for poor prognosis.

Dr. Yamaguchi reported that the laborers in Airin area in Osaka were found to be a high risk group based on their age structure, and the results of the health survey by MMR for them. The socioeconomic survey for them clearly showed that their economic and mental conditions were very low, especially among the elderly and the sick groups. It is strongly indicated that these poor socioeconomic condition and stresses contribute to the high incidence of tuberculosis in this area which is 35 times higher than the national average.

Dr. Kawabe reported based on the survey for 104 family contacts of 45 bacillary positive index cases that 59 contacts developed the disease but only 21 (49%) were detected by the contact examination, while 43 (73%) had undergone contact examination.

The incidence of tuberculosis among the family contacts was considered to be 1 to 2%.

Dr. Suzuki reported that the incidence of tuberculosis among the hospital employees in Chiba Prefecture increased in 3 years for 1986 to 1988. The highest incidence was observed in medical laboratory workers and nurses.

It was advised that medical institutions should make more efforts for carrying out tuberculosis screening examinations including tuberculin test on employment but also for health care for the employees.

Dr. Itoh reported that 62 Asian students were detected to have pulmonary tuberculosis requiring urgent treatment by a mass examination of 8959 foreign students of Japanese language schools in Toshima ward, Tokyo, during a period from 1988 to 1989.

It was very difficult to keep them under treatment. The cause of these difficulties lies in their poor knowledge on tuberculosis and its treatment, illegal works for long hours and poor mutual understanding due to the language barriers, etc.

Dr. Maeda reported that Tokyo Metropolitan Government conducted a survey on tuberculosis for foreign students from developing countries in Japanese language schools in 1988. Among 13,117 students who were examined, 57 cases of pulmonary tuberculosis were found by X-ray examination. Only 2 cases were bacillary positive.

46 cases were put on the treatment with short course chemotherapy. But, 8 cases however returned home country, and 3 cases rejected the treatment.

Among 57 cases, 52 were found within 1 year from their entries. It was stressed that a new system and strategy should be established to control tuberculosis among foreigners in Japan.

Key words: Tuberculosis in the compromised host, Tuberculosis in the urban poor, Tuberculosis among family contacts, Tuberculosis in hospital workers, Tuberculosis among foreign students in Japanese language schools

キーワード: コンプロマイズドホストからの結核, 貧困者からの結核, 家族結核, 医療従事者からの結核, 日本語学校就学生の結核

パネリスト

1. Compromised host における肺結核—国療化研第30次B研究報告—
(国立療養所化学療法研究会会長：芳賀敏彦)
螺良英郎・木村 亮(国立療養所刀根山病院)
 2. 貧困者からの結核
山口 亘(大阪府立看護短大)
 3. 家族結核
川辺芳子・片山 透・芳賀敏彦(国立療養所東京病院)
 4. 医療従事者からの結核
鈴木公典・新島結花・安田順一・山岸文雄・庵原昭一(国立療養所千葉東病院)
志村昭光(結核予防会千葉県支部)
 5. 外国人就学生からの結核
伊藤和子(豊島区池袋保健所)
- (追加発言)
日本語学校就学生の結核検診について
前田秀雄(東京都衛生局防疫結核課)

結核の蔓延状況の改善された今日、今後の結核発病はますますハイリスク・グループに集中するものと考えられる。しかし各ハイリスク・グループ、特に社会的なハイリスク・グループについては、十分な対策や対応が行われているとは思われない。そこでこのワークショップでは、各ハイリスク・グループの現状および問題点を明らかにすることを目的とした。

木村氏は、国療化研の成績より、コンプロマイズドホストにおける肺結核の発病の基礎疾患としては糖尿病、悪性疾患が多く、そのリスク因子には低栄養、ステロイド長期使用、抗癌剤使用が重要であり、低栄養は結核の予後不良因子であると述べ、また死亡例にあっては、入院時結核が重症であるほど、胸部X線像の改善が悪いと報告された。

山口氏は、あいりん地区内の労働者群は、その年齢構成と検診結果からハイリスク集団と考え、その生活実態を調査した結果、特に高齢者と病弱者にあっては経済的・精神的貧困は明らかであると述べた。また地区内での結核患者の発生状況が全国平均の35倍と高率であることから、結核の発症には精神的ストレスと社会的経済的要因が関与している可能性を示された。

川辺氏は、45家族104例の家族結核について調査し、感染源の93%は空洞を有し、全例が非菌陽性であり、被感染者は若年者が多かった。家族検診は73%が受診

しているが、家族検診での患者発見率は50%弱であった。家族結核の頻度は1~2%であるが、若年者では家族より感染したと考えられる症例が多いとの報告であった。

鈴木氏は、千葉県の昭和61年から3年間における医療従事者の結核の発病、定期検診、採用時検診について検討し、医療従事者からの発病は、年々増加傾向にあり、職種別罹患率では検査技師と看護婦で高いと報告し、医療機関は新採用時のツ反応検査等、結核に関する検査の実施や、感染防止および健康管理にいっそう努力すべきであると述べた。

伊藤氏は、1988・1989年度に豊島区内の日本語学校就学生8,959名に実施した結核検診により、要医療の62名の肺結核患者を発見したが、結核に対する理解力の欠如、長時間のアルバイト、言語の相違による不理解などの理由により、受診させるまで、また治療を継続させるのに多くの障害を伴ったと報告した。

前田氏は、1988年度に東京都は日本語学校就学生13,117名に対する結核検診を実施し、57名の患者を発見したが、8名は帰国し、3名は治療を拒否し、治療を受けたのは46名であり、うち菌陽性は2名であったと述べた。また、57名中52名は1年以内の入国であり、外国人の結核予防のための新たなシステムと戦略を構築する必要性を強調した。

1. Compromised host における肺結核

—国療化研第30次B研究報告—

国立療養所化学療法研究会
(会長:芳賀敏彦)

国立療養所刀根山病院 螺良英郎
木村亮

参加施設(国立療養所病院名):北海道第一,札幌南,山形,宮城,福島,晴嵐荘,西新潟佐渡,西群馬,足利,宇都宮,東埼玉,千葉東,南横浜,東京,中野,村山,東長野,中部,岐阜,東名古屋,明星,金沢若松,北潟,南京都,青野原,近畿中央,広島,柳井,松江,愛媛,西香川,南福岡,大牟田,東佐賀,長崎,西別府,熊本南,再春荘,三角,宮崎,宮崎東,日南,刀根山

目 的

免疫機能を含む生体の感染抵抗力が低下した,種々の基礎疾患を有する患者,いわゆる compromised host に発生した肺結核について,そのリスク因子および治療効果・予後を調査し,compromised host での肺結核の問題点とその臨床的対策について検討を行うことを目的とした。

調査対象と方法

国療化研第30次B研究の参加施設において1985年1月より88年12月までに入院した患者の中で,compromised host と判断された状態下に肺結核に罹患した445例を対象とした。調査方法はアンケート調査方式でretrospective に解析した。

調査結果

登録患者の背景を表1に示す。男性336例,女性109例で平均年齢60歳であったが,60歳以上の高齢者に多い。肺結核の既往歴のある者は約10%で,これらは,

表1 登録患者背景

年 齢	男性	女性	合計 (%)
39歳以下	26	13	39 (8.8)
40~49歳	44	12	56 (12.6)
50~59	88	19	107 (24.0)
60~69	80	28	108 (24.3)
70~79	67	27	94 (21.1)
80歳以上	27	9	36 (8.1)

(未記入5例)

宿主の感染抵抗力の低下によりいったん治癒した結核病巣から再燃したと考えられる。基礎疾患別には多いものからあげると,糖尿病,悪性腫瘍,肝臓疾患,膠原病,脳血管障害,腎臓疾患の順であった。このような基礎疾患を有する患者で肺結核が発病する場合のリスク因子を表2に示す。糖尿病,低栄養状態,貧血などの順であった。症例数の多かった悪性腫瘍が基礎疾患にある場合,低栄養,ステロイドの使用,白血球減少,放射線治療がリスク因子として高頻度に認められた。

一方,全症例の転帰は結核死15例,基礎疾患による死亡80例,軽快例272例などであった。次に,結核死について検討を加えた(表3)。結果,入院時血清アルブミン値の低い低栄養患者群において有意に結核死が多いことが判明した。また,悪性腫瘍患者群で種々の治療

表2 リスク因子

リスク因子	男性	女性	合 計
糖 尿 病	130	36	166
低 栄 養 状 態	109	32	141
貧 血	86	30	116
肝 機 能 異 常	94	13	107
手 術	73	23	96
低 肺 機 能	56	20	76
ステロイド使用	33	36	69
腎 機 能 異 常	29	7	36
混 合 感 染	22	13	35
抗 癌 剤 使 用	23	5	28
意 識 障 害	15	8	23
白 血 球 減 少	13	6	19
放 射 線 治 療	9	5	14

(一部の症例は2個以上のリスク因子を有する)

表3 結核死についての検討

考 察

1) 入院時栄養状態よりの予後			
低栄養 (+)	141 例	うち結核死 12 例	P < 0.01
低栄養 (-)	232 例	うち結核死 3 例	
2) 悪性腫瘍の治療による予後			
抗癌剤 (+)	42 例	うち結核死 3 例	P < 0.01
抗癌剤 (-)	75 例	うち結核死 0 例	
放射線 (+)	72 例	うち結核死 3 例	N. S.
放射線 (-)	13 例	うち結核死 0 例	

表4 胸部X線改善度

	入院時空洞あり	終了時空洞なし	最終X線改善例
生存例 n = 29	16 (55%)	9 (31%)	18 (64%)
死亡例 n = 24	20 (83%)	13 (54%)	7 (29%)

と結核死についての関係を調べた結果、抗癌剤使用群で結核死が有意に多かった (P < 0.05)。以上の結果から悪性腫瘍群では種々の治療に伴って発生する免疫能の低下、主要臓器の機能障害などにより宿主が易感染性となり肺結核が合併したものと推定しうる。

次に、胸部X線写真で入院後の経過を観察し得た53例について、治療効果、予後について調査した。対象は、悪性腫瘍37例、肝臓疾患14例などであった。転帰は生存29例、死亡24例で、基礎疾患による差異は認められなかった。生存例は手術例にみられたが、死亡例では低栄養が多く認められた。

予後よりみた胸部X線像改善度を表4に示す。入院時、両群ともX線上空洞を有する重症肺結核が過半数以上を占めているが、死亡群ではより多く認められた。また、抗癌剤治療にもかかわらず死亡群では終了時に空洞残存症例が多くみられた。最終的なX線像で病変の広がり改善、陰影の硬化傾向などの認められた改善例は生存群に有意に多いことが示されている。以上の結果は、重症肺結核例において、X線像の改善がみられず死亡にいたった症例が多いことを意味している。

compromised host での肺結核についてはいろいろの問題と対策上考慮すべき点が多くあるが、それらの中から今回の成績をもとにして以下のことが指摘できよう。問題点としては、compromised host での肺結核合併のリスク因子をすべて明らかにしえたわけではないが、ハイリスクグループとしては、種々の基礎疾患を有する患者また免疫抑制状態にある患者があてはまる。これは、近年の医療技術の進歩などによりこれらの患者の増加の傾向にあり、その集団よりの肺結核の発生が問題となる。初感染はまれでほとんどが宿主状態に基づく日和見感染といえる。これらのことを悪性腫瘍患者の治療に当たって十分考慮に入れるべきであろう。

低栄養は肺結核の予後不良となる重要因子である。今回の調査結果でも、種々の基礎疾患の進行とともに宿主の栄養状態が悪化して compromised host になる症例を多く認めたので、低栄養患者群の管理、対策が重要である。

従来より、高齢化とともに免疫機能を含む宿主抵抗力が低下することが報告されている¹⁾。高齢者における悪性腫瘍の発生率の高いことや、種々の感染症に罹患しやすいのは免疫能低下ともいえるが、その臨床的解析は今後ますます大切となろう。医原的免疫抑制、特にステロイドの長期服用患者における結核発生が多かった。米国では、現在、抗結核剤の予防内服は、その肝障害や耐性菌の出現の問題等より行われなくなっている²⁾が、わが国では胸部X線上結核の非活動性病変や治癒所見や硬化像が認められた場合で、医原的免疫抑制剤を用いるに当たっては抗結核剤の予防内服が行われているがその必要性を再認識した。

かかる症例の対策に当たって留意すべき点は、以下のごとくである。

(1) 結核死は全死亡95例中15例(約14%)と比較的低かったが、その多数が低栄養であったことから、IVHなどの積極的な栄養改善が compromised host での結核感染予防に必要と考えられる。また、ステロイド服用患者にあっては、画一的な予防内服よりむしろ頻回のX線検査や喀痰検査等のきめの細かい観察が必要といえる。

(2) 高齢者での結核感染予防管理に当たっても、特に陳旧性結核病巣を有する症例はハイリスクグループと考えられるので、詳しい結核に関する経過観察が必要である。いずれにしても、compromised host での結核早期発見のためには、結核の合併を常に念頭において診療することが望ましい。

ま と め

(1) compromised host での肺結核発症の基礎疾患としては、糖尿病、悪性腫瘍等が多い。

(2) そのリスク因子としては、低栄養、ステロイド使用、抗癌剤投与などが重要である。

(3) 結核死 15 例中 11 例は入院時低栄養状態であり、低栄養は予後不良因子と考えられる。

(4) 基礎疾患を問わず入院時、結核が重症であるほどX線像の改善が悪い傾向にある。

(5) 死亡例でX線改善が乏しく、また、リスク因子に低栄養が多く認められた。

文 献

- 1) 岸本 進：免疫不全と老化，医学のあゆみ，135：811～816，1985.
- 2) 武藤 真，桜井信男，山本孝吉：副腎皮質ステロイド薬治療に伴い発症した肺結核症の臨床的検討，結核，60：421～428，1985.

2. 貧 困 者 か ら の 結 核

大阪府立看護短期大学 山 口 亘

は じ め に

成人結核の発症要因として、54回日本結核病学会総会で青木が、また56回同総会では三上らが社会的経済的因子の存在を示唆する報告をしている。そこで、わが国最大の結核蔓延地域である大阪市「あいりん地区」の結核の現状と、地区内単身日雇労働者群の生活実態等を調査し、社会的経済的因子の結核発症への影響を検討することとした。

「あいりん地区」の結核の現状

1. 罹患率

地区内の結核罹患率の推移は表1のごとくで、昭和63年では1,533にのぼり、全国平均の35倍という高率であった。55年が18倍、60年が20倍であったことから全国平均の推移と逆行しており、結核蔓延の地域偏在化傾向を如実に示すものであった。

2. 結核検診結果

63年度の受診者実人員は1,175人（労働者推計人口の6%）で、うち50歳代が43%、40歳代が33%、60

歳以上が12%であった。患者発見率は6.3%で、55年度の6.6%、59年度の6.0%とほぼ同様の高率を示し、病型ではⅡ型51%、Ⅲ型41%、Ⅰ型7%の順であった。また不活動性有所見率は18%で、60歳以上では32%、50歳代で19%、40歳代で16%と高率を示した。

3. 有症状者の受診状況

西成保健所分室で面接調査のできた初回治療例104人における症状出現から受診までの期間は、1カ月以内が17%（63年全国平均72%）と極端に低率であり、6カ月以上が29%（全国4%）であった。受診の遅れの理由としては、仕事が何とかできる間は就労していた、保険がないから、たとえ保険があっても一部負担金が払えないから等があげられた。

4. 受療状況

地区内労働者の受療状況を端的に示すものは、彼らの命令入所解除状況である。63年度の事故退院は解除例の43%にのぼり、これらのほぼ全員は直後から治療中断となっている。事故退院例中飲酒によるものは9%に過ぎず、自己判断によるものが87%を占めていることは、受け入れ側の患者指導にもかなり問題があるよう

表1 結核罹患率の年次推移

(10万対率)

地域 \ 年次	50年	55年	60年	63年
全 国	96.6	60.7	48.4	44.3
大 阪 市 (あいりん除く)	188.2	123.0	95.7	89.9
あいりん	2,122.0	1,119.0	984.2	1,533.3*

* 地区内日雇労働者のみでは2,184.2

表2 結核死亡率の年次推移

(10万対率)

地域 \ 年次	50年	55年	60年	63年
全 国	9.5	5.5	3.9	3.2
大 阪 市	12.0	9.7	6.1	5.4
西 成 区	29.5	29.2	25.6	18.7*

* 地域内日雇労働者のみでは136.8

あった。

5. 結核死亡率

当地区を含む西成区の結核死亡率の年次推移は表2のごとくで、改善傾向をみるものの63年にはなお18.7と高率を示し、全国平均の5.4倍であった。63年については地区内労働者からの死亡者数が26人と明らかことから、地区の死亡率を算定すると86.7、地区内労働者のみでは136.8という驚異的な高率であった。

地区内労働者の生活実態

1. 収入と支出の現状

主として土木建築工事に従事しており、63年調査時の労働賃金は技能の有無、作業内容により1日20,000円から7,500円と格差がみられた。表3のごとく、求職者給付金(アプレ手当)受給条件の月最低14日の就労ができれば月収は200,000円程度になるはずであるが、高齢化してきた地区内労働者の多くは、はるかにこれに及ばず、宿泊費と食費の最低支出が月100,000円前後となる地区内の実情からみて、彼らの経済的困窮は想像に難くない。

2. 居住状況

地区内宿泊施設は近年著しく改善されてきたが、表4のごとく今なお簡易宿所が全軒数の40%を占め、労働

者の70%以上がそこに居住している。簡易宿所の1室の広さは畳数3帖以下が86%、2帖以下が24%であり、長期居住者にとって劣悪な環境であることに変わりない。

3. 飲酒状況

初回治療例101人の面接調査の結果では、毎日の飲酒量(日本酒換算)が3合以上の者が全体の60%、5合以上の者が32%に認められた。大量の飲酒者は地区内居住歴の長い者ほど高率であり、高齢化してきた単身者が、社会からの疎外感や今後の生活への不安等からアルコールに逃避することは容易に想像される。

発症要因の検討

1. ハイ・リスク集団

地区内労働者の大半は結核事情の悪い西日本の出身者で占められており、平均年齢が49歳で、50歳以上の者が40%を超えることから、他地域に比べ既感染者の占める比率は著しく高いと考えられる。また結核検診の結果から不活動性有所見者が多数にのぼること、初回治療例の面接調査からアルコール依存の合併率が高いこと等を併せて考えて、地区内労働者群はハイ・リスク集団である。

2. 社会的経済的背景

長期にわたって簡易宿所や木造アパートに居住する高

表3 あいりん地区労働者の月平均収支(推計)

区分	算出基準	計
収入	9,500円(最低賃金)×14日 :133,000円	195,000円
	6,200円(求職者給付金)×10日(平均) :62,000円	
支出	1,500円(宿泊費1日平均)×30日 :45,000円	105,000円
	2,000円(食費1日平均)×30日 :60,000円	
残*	195,000円 - 105,000円	90,000円

* その他の諸経費

表4 あいりん地区宿泊施設と宿泊状況

(63年7月~10月, 1日平均)

類別	簡易* 宿所	準簡易 宿所	月払い アパート	日払い アパート	旅館	マンション	計
軒数	198 (39.5)	46 (9.2)	218 (43.5)	4 (0.8)	15 (3.0)	20 (4.0)	501
宿泊人員	14,326 (73.2)	1,625 (8.3)	2,727 (13.9)	70 (0.4)	127 (0.6)	686 (3.5)	19,561

* 畳数: 3帖以下86%, 2帖以下24%

齢化してきた労働者には、好況の現在にあってもさほど増収は望めず、まして体調を崩して数日間無収入が続くようだと食費に事欠く者すらみかけるとというのが現状である。彼らの多くはまた、経済的な面のみならず、生き甲斐すら失いかけた社会的弱者の集団といっても過言ではなく、一般地域での心労とか貧困とはおよそ比較にならない苛酷な生活実態であることは確かである。

当地区内の結核罹患率はいかにハイ・リスク集団からとはいえ異常に高率であり、不安に満ちた孤独な日々の生活の中での精神的ストレスと彼らをめぐる社会的経済的背景が、結核の発症に深く関わっているものと考えざるをえない。

3. 家族結核

国立療養所東京病院 川 辺 芳 子
片 山 透
芳 賀 敏 彦

結核の発病が減少したとはいえ、若年者では横ばいであり、昨年予防内服の年齢が引き上げられた。1988年の結核の統計によると、一般の健康診断での結核の発見率0.016%に対し、定期外検診では0.136%、そのうち家族検診では0.47%であり、一般の29倍である。患者家族は最大のハイリスクグループといえる。

今回家族結核の報告にあたり、東京病院で最近9年間に経験した家族結核の分析と、都内8カ所の保健所の協力を得て家族検診の調査を行った。その中で家族結核の頻度と背景を明らかにし、家族検診（以下家検と略す）のあり方を考えてみたい。

I. 東京病院での最近9年間の調査

1. 対 象 (表1)

45家族104例である。感染源は40代、50代に多く平均43歳、男37例、女8例、被感染者は10代、20代に多く平均28歳、男22例、女37例であった。同一家族で3人以上発病が9組あった。親子が37例、夫婦が13例、その他9例である。

2. 発見方法 (表2)

感染源は自覚症状が38例(84%)であるが、家検による感染源発見が3例あった。被感染者は30例(51%)が自覚症状により、家検により発見されたのは21例(35.6%)である。

3. 検査所見 (表3)

感染源はI型・II型で93%、全例が排菌陽性で、しかも塗抹号数V号以上が87%と大量排菌者が大半である。被感染者はII型31例、III型26例、胸膜炎5例であ

ま と め

1. あいりん地区内の労働者群は、その年齢構成とこれまでの検診結果からハイ・リスク集団と考えられた。

2. これら労働者の生活実態を調査した結果、特に高齢者と病弱者にあつては、経済的精神的貧困は明らかであった。

3. ハイ・リスク集団からとはいえ、地区内での結核患者の発生状況が全国平均の35倍と高率であることから、結核の発症には精神的ストレスと社会的経済的要因が関与していると思われる。

り、菌陽性は37例(63%)である。V号以上が13例(22%)あった。

表1 対象：45家族，104症例

年齢構成

	感 染 源	被 感 染 者	計
10 代	3	25	28
20 代	8	16	24
30 代	6	4	10
40 代	13	7	20
50 代	10	4	14
60 ~	5	3	8
計	45	59	104

平均 43.4 ± 15.2 歳 28.5 ± 14.7 歳
 男性 37 男性 22
 女性 8 女性 37

表2 発見方法

	感 染 源	被 感 染 者
自 覚 症 状	38	30
家 族 検 診	3	21
定 期 検 診	4	7
他 疾 患 入 院 中	0	1
計	45	59

表3 検査所見

1. 胸部レ線

	I	II	III	PI合併	気管支結核合併
感染源	4	38	3	1	1
被感染者	0	31	26	5	2

2. 結核菌

	塗抹+ 培養+	塗抹- 培養+	塗抹- 培養-	計
感染源	42	3	0	45
被感染者	18	19	22	59

結核菌塗抹検査 蛍光号数

	0	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
感染源	●●●	●	●●			●●●●	●	●●●●	●●●●●	●●	●●●●●●●●
被感染者	●●●●●●●●●●		●	●	●●	●●●●		●●●●	●	●	●●

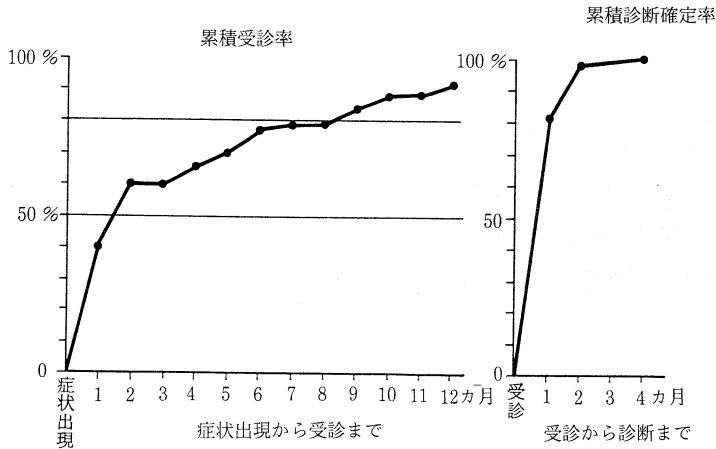


図 感染源の治療の遅れ (43例)

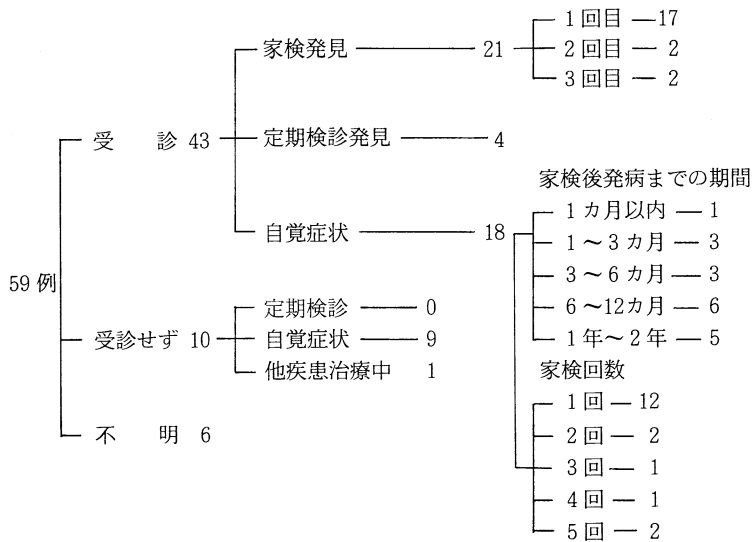
4. 感染源の治療の遅れ (図)

症状出現から受診までの累積受診率であるが、60%受診が2カ月、80%受診は8カ月であり、受診の遅れが目立つ。診断確定率は80%診断率が1カ月であった。

5. 家族検診と発見方法 (表4)

家検受診は59例中43例(73%)であった。そのうち家検で発見されたのは21例(49%)にすぎない。1回目の家検での発見は17例(40%)である。検診後発病して定期検診で発見されたのが4例、自覚症状で受診したのが18例である。感染源診断から被感染者診断ま

表 4 家族検診と発見方法



感染源診断—被感染者診断期間
東京病院

	例数	累積割合 (%)
1 カ月以内	17	29.3
1 ~ 3 カ月	7	41.4
3 ~ 6 カ月	6	51.7
6 ~ 12 カ月	11	70.1
1 年 ~ 2 年	4	77.6
2 年 ~ 3 年	6	87.9
3 年 ~ 5 年	4	94.8
5 年 以上	3	100
合計	58	

をを全体でみると、3カ月以内が41%、6カ月以内52%、1年以内70%、2年以内で78%である。

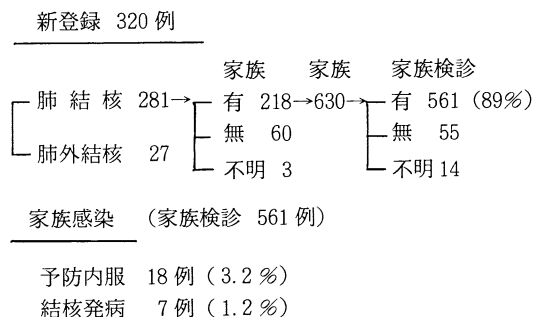
II. 保健所新登録患者調査 (表5)

都内8カ所の保健所の協力を得て、1986年新登録患者の家族検診の調査をした。肺結核281例の家族は630人であり、家族検診は(定期健診の記載も含めて)561人(89%)が受診している。2年間の間に予防内服18例(3.2%)結核発病7例(1.2%)であった。排菌陽性患者は281例中167例であり、菌陽性の家族についてみると家族269人中発病6例(2.2%)であった。

III. 家族内感染の頻度について

(1) 当院5年間の肺結核新入院は1,470例である。そのうち家族からの感染の明らかなものは53例であった(3.6%)。10代では44例中13例(29.5%)、20代

表 5 保健所新登録患者 (1986)
(都内8カ所保健所調査)



では202例中21例(10.4%)である。

(2) 保健所の調査からは前述のとおり、家族561人中7例(1.2%)、菌陽性者家族269人中6例(2.2%)である。

(3) 統計よりみると、1988年の家族検診での発見は0.47%である。今回の当院での調査で被感染発病者のうち家検による発見は35.6%だったので、家族発生は1.32%と推定される。

IV. 予防内服について

今回の調査では予防内服により発病予防できたという検討はできない。予防内服後に発病した例が2例あった。

V. 結 論

1) 感染源となる患者背景は、有空洞、大量排菌、受診の遅れが主な因子である。

2) 家族結核の頻度は1~2%であるが、入院例についてみると、家族より感染した例は3.6%であり、10代では29.5%、20代では10.4%と高率である。

3) 家族検診1回めで発見されるのは40%である。

4) 家族検診は2年めまで必要であり、できれば3年めまでが望ましい。

5) 家族に対し有症受診の指導が重要である。

6) 若年者には予防内服を行うことが今後の課題である。

今回の調査に御協力をいただいた各保健所に深謝いたします。

4. 医療従事者からの結核

国立療養所千葉東病院呼吸器科 鈴木公典・新島結花
安田順一・山岸文雄
庵原昭一
結核予防会千葉県支部 志村昭光

はじめに

結核の蔓延状況の改善に伴い、わが国では結核未感染者が増加の一途をたどっている。また、最近学校などからの集団感染事例が続発し注目されてきている。こういったなかで結核患者と接する機会の多い医療従事者、なかでも若年層はより高いリスクを抱えており、感染防止や健康管理が今後なおいっそう大切になると思われる。そこで今回、医療従事者からの結核発病の実態について調査し、現状の問題点について検討した。

対象および方法

千葉県内の精神病院を除く病院を対象として、無記名のアンケート調査を実施し、昭和61年1月から昭和63年12月までの3年間における医療従事者の結核の発病、定期健康診断、新採用時検診について検討した。

結 果

1. 調査対象病院272のうち回答病院は165で、回答率は60.7%。回答病院165のうち発病有りの病院が16(9.7%)、発病無しの病院が149(50.3%)であった。

公的病院ほど、病床数の多いほど、発病有りの病院が多いようであった。

2. 医療従事者の年次別発病者数は、昭和61年4名、昭和62年7名、昭和63年11名、男6名、女16名の計22名で、年々増加の傾向にあった(表)。

3. 職種別発病者数は、看護婦12名、検査技師4名、

表 年次別発病者数

	男	女	計
昭和61年	1	3	4
62	0	7	7
63	5	6	11
計	6	16	22

医師・その他医療職・医療職助手・看護学生各1名、その他2名で看護婦が最も多く約半数(54.5%)、ついで検査技師(18.2%)であった。

4. 発病者の年齢では、20~29歳は男1名、女6名の計7名、30~39歳は男3名、女5名の計8名、40~49歳は男1名、女4名の計5名、50~59歳は男女各1名の計2名。29歳以下の若年層は約3分の1を占め、平均年齢は35.4歳(男38.0歳、女34.2歳)であった。

5. 診断名では、肺結核は20名、肺外結核は肺門リンパ節結核1名、頸部リンパ節結核1名の計2名で、診断名はほとんど肺結核であった。

6. 発見動機は、健康診断12名、有症状受診9名、その他不明1名であった。一般の人々と比べると健康診断受診で発見される割合が多く認められた。

7. 診断時の菌成績では、塗抹陽性6名、培養のみ陽性4名、塗抹・培養とも陰性8名、その他(未検・不明)4名で、菌陽性率は45.5%であった。

8. 保健所の届出については21名(95.5%)が実施、

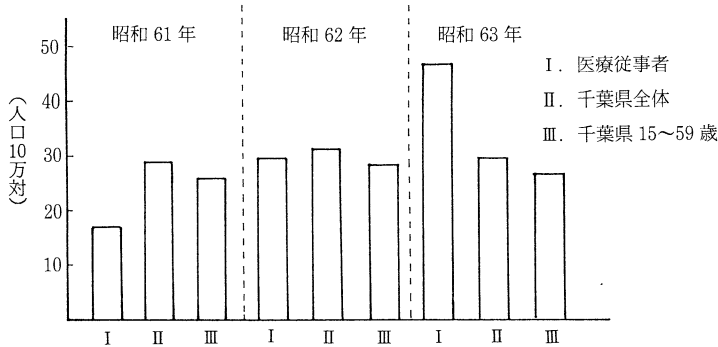


図1 年次別罹患率

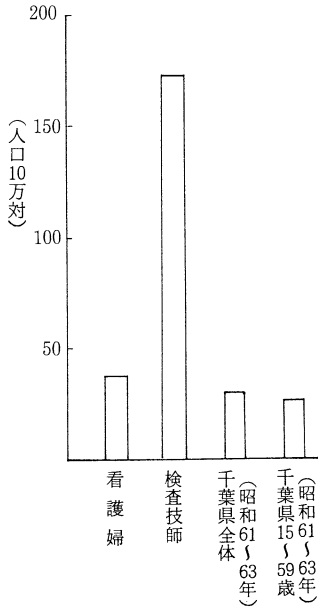


図2 職種別罹患率

不明が1名であった。

9. 医療方法については、自病院入院8名、自病院外来8名、他病院入院5名、不明1名で、自病院で治療を行うことが最も多かった。

10. 罹患率については、回答のあった病院の全職員数は23,622名で3年間の医療従事者からの結核の発病は22名で、罹患率は人口10万対31.0であった。年次別罹患率では、医療従事者の罹患率は年々増加していた(図1)。

職種別罹患率について昭和61年から63年までの3年の平均罹患率でみると、検査技師173.4、看護婦41.1であった。なお、千葉県全体30.0、千葉県の15~59歳

の年齢層26.8であった(図2)。

11. 定期健康診断は、アンケートに回答のあった165病院のうち、実施が163病院、不明・無記入が2病院でほぼ全病院(98.8%)が実施していた。医療従事者からの発病があった16病院もすべて実施していた。

定期健康診断の検査内容では、定期健康診断を実施した163病院のうち、検査内容が不明・無記入の2病院を除いた161病院はすべてX線検査を行っていた。また、「X線のみ」の検査か「X線と血沈」を組み合わせた検査が多く、最も一般的に行われていた。

12. 新採用時検診では、実施147病院、未実施17病院、不明1病院で、未実施が10.9%もあった。

その検査内容では、「X線のみ」、「X線と血沈」の検査が定期健康診断の時と同様に多く、「X線、血沈、ツ反応」の組合せの検査が新採用時検診では増えている。

ツベルクリン反応を実施しているのは13病院(8.9%)のみで、その実施年齢層は種々である。

ツベルクリン反応陰性者に対するBCG接種の有無については、「無」が多かった。

考 察

職場の性・年齢構成が不明であり、高低を論ずることは困難だが、今回回答のあった病院において、医療従事者の結核罹患率は、千葉県の罹患率と比較するとやや高い傾向が認められた。また、年々医療従事者からの結核発病は増加の傾向にある点と、職種別では検査技師および看護婦の罹患率が高い点は注目に値する。

医療従事者からの結核発病については同様な報告¹⁾²⁾があり、特にまだ診断のついていない結核患者や検体に無防備で曝露される従事者が危険とされている³⁾。

新採用時検診では、新採用者はほとんど29歳以下の若年者と思われ、ツ反応、BCG接種の取扱いについては難しいことと考えられる。しかし、少なくとも結核病

棟を有する病院で、29歳以下の新採用の看護婦、検査技師については、ツ反陰性者にはBCG接種をした方がよいと思われる。

今回の調査から、医療機関は、医療従事者がデンジャー・グループの一員であることおよび結核患者に接する機会の多い医療従事者はハイリスク・グループであることを改めて認識し、結核病床の有無にかかわらず新採用時のツ反応検査等、結核に関する検査の実施や、感染防止および健康管理によりいっそう努力すべきである。

まとめ

1. 千葉県内の病院を対象として調査し、医療従事者の結核の発病、定期健康診断、新採用時検診について検討した。

2. 医療従事者からの発病は、年々増加の傾向にあり、職種別罹患率は検査技師と看護婦で高かった。

新採用時検診のツ反実施は少なかった。

3. 医療機関は、新採用時のツ反応検査等、結核に関する検査の実施や、感染防止および健康管理によりいっそう努力すべきである。

本研究の一部は、山岸文雄が授与された「財団法人柏戸記念財団」の助成金による。

文献

- 1) 五十里明：結核患者の実情と問題点，結核，60：549～554，1985.
- 2) 結核療法研究協議会：結核病院職員の結核罹患状況，昭和62年度療研研究報告書，3，1988.
- 3) Minoru Sugita, Yutaka Tsutsumi, Masashi Suchi et al. : Pulmonary tuberculosis. An Occupational hazard for pathologists and pathology technicians in Japan, Acta Pathol Jpl, 40 : 116-127, 1990.

5. 外国人就学生からの結核

豊島区池袋保健所 伊藤和子

はじめに

豊島区では最近4年間に外国人登録人口が2.5倍にふえた。それとともに区内でも当保健所管内に集中して日本語学校が開校、1988年7月では34校在校生8,000人を超えた。この就学生に2年間の結核検診を行い、高率

に肺結核を発見した。

一方、外来受診者の中にも外国人で結核あり、結核新登録者中に占める外国人の率も26.5%に増加した。彼らは就業の制約の恐れや、症状がほとんどないことから逃避し、住所移動、一時帰国、住民登録なく数人同居等連絡困難が多い。このため一部を除いて受診や治療徹底

表1 受診状況

年度	対象数	受診数	受診率	要精検	要精検率	異常なし
1988	7,961人	5,729人	72%	239人	4.17%	5,590
1989	5,186人	3,230人	62.3%	167人	5%	3,069

表2 病型別・有所見者数

年度	病型 受診数 拡がり	要 医 療				要 観 察 IV	治癒所見 V
		II		III			
		1	2	1	2		
1988	5,729人	4	4	20	5	16	71
1989	3,230人	1		25	3	33	22
計	8,959人	5 4 45 8				49	93
		62 (0.69%)				(0.55%)	(1.0%)

表3 国籍別・病型別

病型 \ 国籍	中国	韓国	バングラ デシュ	台湾	香港	フィリピン	計
Ⅱ ₁	1	3	1				5
Ⅱ ₂	2	1	1				4
Ⅲ ₁	26	11	2	3	1	2	45
Ⅲ ₂	3	1	1	1	2		8
計	32	16	5	4	3	2	62
率(%)	53.2	25.8	8	6.6	3.3	3.3	100%

表4 病型別・発見までの滞日期間

病型 \ 期間	<1カ月	<2カ月	<3カ月	<6カ月	<9カ月	<1年	<1.5年	<2年	計
Ⅱ ₁	1		2		1				4
Ⅱ ₂		1		1					2
bⅡ ₁			1						1
bⅡ ₂				1		1			2
Ⅲ ₁	1	2	9	15	4	6	3	3	43
Ⅲ ₂			1	1					2
bⅢ ₁						2			2
bⅢ ₂		1	1	2	1	1			6
計	2	4	14	20	6	10	3	3	62

表5 病型別・年齢別・性別

年齢 \ 病型	性	Ⅱ ₁	Ⅱ ₂	bⅡ ₁	bⅡ ₂	Ⅲ ₁	Ⅲ ₂	bⅢ ₁	bⅢ ₂	計
~20歳	女					2				2
	男					1				1
21~25	女					3	1	1	3	8
	男	1				7			2	10
26~30	女	1			1	9			1	12
	男	1	2	1	1	11	1			17
31~35	女	1				2				3
	男					7		1		8
36~40	女									
	男					1				1
計		4	2	1	2	43	2	2	6	62

表6 服薬中断例(16名)

1990年3月

症例	病型	発見 →治療	Tb菌	症 状	ツ 反	服用期間	使 用 薬	住 居	他
1	r III ₁	20 日	0	な し	$\frac{35}{35}$ (++)	2 カ月	H.R.	台東区	退学 外人登録無
2	r III ₁	28 日	0	〃	$\frac{20}{20}$ (++)	2 カ月	H.R.	中野区	一時帰国 中断2回
3	r III ₁	2 カ月	0	咳・痰	$\frac{24}{24}$ (46) (++)	3 カ月弱	H.R.	区内→葛飾区へ	帰国
4	r III ₁	40 日	0	な し	$\frac{22}{22}$ (30) (++)	5 カ月	H.R.E.	区内→新宿区へ	帰国(入管確認)
5	r III ₁	6 カ月	0	〃	$\frac{19}{26}$ (++)	1 カ月半	H.R.	区内	連絡とれず
6	r III ₁	1 カ月	0	〃		28 日	H.R.	下肢発疹, 痒み	船橋市
7	r III ₁	1 カ月	0	〃	$\frac{25}{33}$ (++)	7 日	H.R.	区内	連絡とれず
8	r III ₁	1 カ月	0	咳		4 カ月 5 日	H.R.E.	北区	ビザ切帰国
9	l III ₁	45 日	0	〃	$\frac{33}{33}$ (++)	14 日	H.R.	区内	連絡とれず
10	r II ₁	36 日	0	倦怠 咳1カ月		2 カ月	H.R.E.	神奈川→千葉	入院34日以後不明
11	r II ₁	35 日	0	咳		3 カ月	H.R.E.	区内	中断2回 近医肺炎と診断
12	r II ₂	10 日	0	咳・痰		3 カ月 20 日	H.R.	中野区→荒川区	入院要→拒否
13	b III ₁	60 日	不明	な し		1 カ月	H.R.	足立区	他医肺炎 一時帰国
14	b III ₂	1 カ月	0	不 明		6 カ月	H.R.	越谷市	帰国
15	b III ₂	20 日	0	な し		7 日	H.R.E.	新宿区	香港へ 一時帰国
16	b III ₂	7 カ月	0	血 痰		50 日	H.R.	区内	r IV ₁ →6カ月後 発症, 中断帰国

全例, 化療歴なし *悪化例

を図るのが容易でない状態である。外国人労働者受入をすすめてゆく国策であれば, 今後の結核予防管理上問題として提起し検討した。

対象と方法

1988年度34校中24校5,729人, 1989年度36校中22校3,230人に結核検診を実施した。受診者の国籍は中国

64.4%, 台湾12.4%, 韓国6.2%, 香港, ミャンマー, フィリピン, バングラディッシュ, タイ等である。1次は出張または保健所駐車場でX線検診車胸部間接撮影と問診票により, 2次精検は所内で直接撮影をし, ツ反は判定に來所する確実性がなく, 採痰は自覚症軽く共に検査できなかったため, 結核予防会渋谷診療所のご報告を参考にさせていただいた。

表7 要医療で未受診者の状況 (14名)

症例	国	性	年齢	入国 →発見	病型	Tb菌	症状	化療歴	住居	受診を勧めた後
1	韓	女	26	3カ月	b II ₂	不検	咳・痰 喘鳴 1年位	5年前 1年間	足立区	厚壁空洞。同国人 医師肺炎と。両親咳
2	韓	女	32	4カ月	r II ₁	〃	浸潤中 空洞	2年前 1年間	中野区	波診(要療)→D医(不要) →N医(不要)→転居不明
3	韓	男	31	4カ月	r III ₁	〃			中央区	連絡とれず
4	中	女	26	6カ月	b III ₂	排菌 可能大	空洞 疑有		中野区	帰国, 3カ月入院治療 (中国) X _p 所見軽減
5	中	女	27	1年 11カ月	l III ₁	不検	倦怠 痩せ	不明	豊島区 → 世田谷区	紹介状, フィルム持った ままシンガポールへ。 再入国→転居→転学
6	中	男	29	4カ月	l III ₁	排菌 可能大			葛飾区	紹介状とフィルム持って 退学。外人登録なし
7	中	男	33	1年 2カ月	r III ₁	不検			荒川区	中国へ一時帰国 受診拒否
8	中	男	22	2カ月 24日	r III ₁	〃			区内	連絡とれず
9	中	男	30	4カ月 10日	r III ₁	〃			台東区	連絡とれず アルバイト・コーヒー店
10	中	女	34	6カ月	r III ₁	〃			足立区	紹介外の医師でX _p と。 フィルムを借り持ち
11	バン グ	男	19	4カ月	l III ₁	〃			藤市	帰国
12	バン グ	男	32	1年	l III ₁	〃		1年前 9カ月 H.R.	新宿区	本国から, 本人が化療状 況とよりせ中
13	フピ イ リン	女	26	7カ月	l III ₁	0			横浜市	母死去で4カ月帰国。 再入国。治療済と。
14	中	女	23	11カ月	l III ₁	不検			区内	受診拒否

検診にあたって、学生たちは並んで待たず、階段でも通路でも座り込む、他人の名前でも返事してくる、なかなか上衣を脱がないなど混乱があった。判定にあたって予防会診療所医師に精査を依頼し、結果説明は同じ医師と通訳と保健婦とで対応した。

成 績

受診者は2年間で8,959人、受診率は平均67%、要精検率は平均4.64%であった(表1)。要医療62名0.69%、要観察は49名0.55%、治癒所見93名1.0%であった(表2)。要医療をさらにみると、国籍別では

中国53.2%、韓国25.8%、バングラデシュ8%、台湾6.6%、香港、フィリピン3.3%で、受診者の割合からみると、韓国とバングラデシュにやや多く発見された(表3)。

化療歴のある者は1989年のみでは23人でⅢ型29人から3人10.7%、Ⅳ型33人中16人48%、Ⅴ型22人中4人18%でⅡ型の者にはなく、Ⅲ型の者は少なかった。初回の化療期は15~17歳頃4人、19~21歳頃7人、25~26歳6人、30歳代3人、不明3人で、若くして罹患していることが考えられた。

病型別、発見までの滞り期間では40人(63.5%)が

入国6カ月以内に発見されており、Ⅱ型は9人中7人が6カ月以内にある。Ⅲ型は53人中33人が6カ月以内にある(表4)。これから考えるに、本国からすでに病巣ができていたと思う。

問診によれば入国以来体重が5kg減った人が数人いた。アルバイト時間は6～7時間、ホテルの掃除、飲食店の給仕、皿洗い、パチンコ店、夜の街の客呼び込み、製本屋等であった。食事は朝食抜きが目立ち、また即席麺、カレーなど粗食が多く、栄養面での指導で体重が回復した者もいた。年齢では26～30歳に要医療が多みられた(表5)。

表6～7では治療状況の差による問題を調べた。中断例と未受診者では区外あるいは都外に住む者が多い。服薬終了例は発見から治療まで比較的短く通院も順調で、国民性よりも個人差によると思われる。医療機関により

肺炎とされたり、3病院次々と受診して治療不要といわれたところで住所不明になった例がある。紹介状とX線フィルムを持ったまま連絡がとれない者、検診と別に感染性活動性で入院中に不法入国が判明し強制国外退去の2例も経験した。

考察とまとめ

- (1) 国民保険加入も無理な者には別の医療援助。
- (2) 結核予防法の趣旨を守って治療に協力できる診療機関を日本学校に近い街に配置する。
- (3) 日本学校に健康管理の責任体制を義務づける。
- (4) 入国時検診を行い、医療を要する者は病巣改善まで専門の宿泊施設で栄養と服薬管理する。等が効果的感染予防の一案としたい。

追加発言：日本語学校就学生の結核検診について

東京都衛生局防疫結核課 前田 秀雄

はじめに

最近、途上国より来日している日本語学校就学生からの結核発生が散見されていた。しかしながら、多くの日本語学校は設置者に検診実施義務がなく、また就学生は検診受診機会が少ないため、その実態が不明であった。このため、東京都および特別区では、1988年度にこれらの人々を対象に結核検診を実施し、その実態の把握を図った。

対象および方法

今回の検診は、結核対策特別促進事業の一環として、東京都と特別区の協力のもとに無料で実施された。まず外国人就学生受入協議会に加盟している都内の日本語学校129校のうち、専修学校として検診義務のある13校を除く116校に対して検診実施を勧奨した。その結果検診を希望した92校に所属する就学生20,186人を対象とした。1次検診は保健所またはエックス線検診車で間接撮影を行い、2次検診はすべて保健所で直接撮影によって実施した。

結 果

検診実施校92校、対象者20,600名中1次検診受診者13,117名(受診率63.6%)で、精密検診が必要とされた者は561名であった。このうち、精密検診受診者は535名(精検受診率95.4%)で、要医療者57名(患者発見率0.43%)であった。要医療者の概要は表に示す。

表 要医療者の概要

総 数	: 57人 (男30人、女27人)
年 齢	: 10歳代2名, 20歳代40人, 30歳代15人
国 籍	: 中国24人, 韓国14人, フィリピン8人, 台湾5人, バングラデシュ3人, ミャンマ(旧ビルマ)2人, インド1人
病 型	: Ⅱ型12人, Ⅲ型45人
排菌状況	: 菌検査を行った者44人中, 塗抹陽性1人, 培養陽性1人
治療状況	: 治療中46人(入院2人, 外来44人) 未治療3人, 帰国8人
公費負担	: 35条2人, 34条43人, 本人の希望による自費治療中1人
健康保険	: 国民健康保険加入43人, 社会保険加入1人 いずれの保険にも加入していない者1人。

考 察

今回の検診における患者発見率は、東京都の学校検診における患者発見率である0.01%のおよそ43倍であった。一方、菌陽性者は約13,000名中2名(0.015%)で、東京都の学校検診における菌陽性率0.0018%の約8倍だった。しかしながら、要医療者57名のうち43名はⅢ₁型であり、就学生に受診機会が少ない現状を考慮すると、この検診結果は、り患率ではなく有病率としてとらえるべきではないかとも考えられる。

次に、国籍別内訳については、就学目的の入国者の国

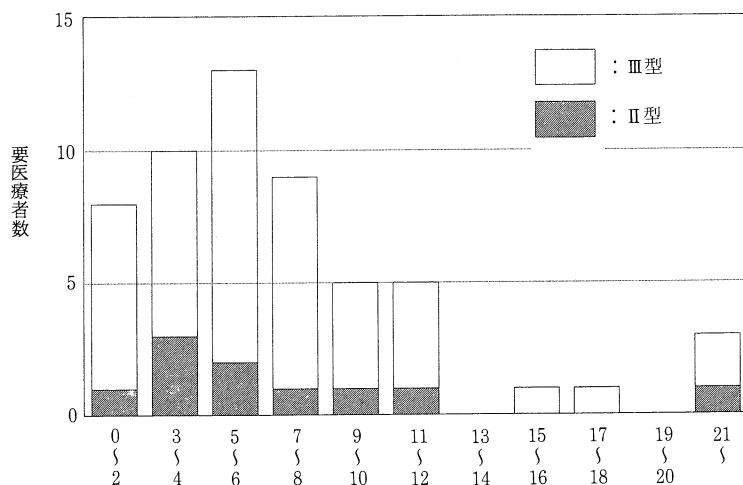


図 要医療者——入国から検診までの期間 (単位: 月)

籍別内訳 (出入国管理局発表) とほぼ一致しており、必ずしも各国の本国での結核蔓延状況を反映していないと推定される。

また、この 57 人について入国から検診までの期間を見ると、52 人 (91.2%) は入国後 1 年以内に、また 33 人 (57.9%) は半年以内に発見されており、入国後間もない時期に、積極的に対策をとる必要があるといえる (図)。

一方、検診時には前述のとおり軽症例が大半であるにもかかわらず、医療機関からは途上国出身の重症結核患者が少なからず報告されている。今回の検診では要観察者 (Ⅳ型またはⅤ型) も 88 人と多く発見されていることから、単に集団検診で発見された要医療者を治療につなげるだけでなく、要観察者等に化学予防を行うなどの新たな予防対策を検討する必要があると考えられる。

さらに、要医療者の約 20% に当たる人々が帰国または治療拒否などで治療を受けておらず、短期の滞在であることも考え合わせると、いったん治療につながった人についても治療が完了することは必ずしも容易でない。このため、さらに短期の治療法の導入や、母国語で対応できるなど患者が安心して受診できる医療機関の整備など治療面での新たな対応も必要になってくると考えられる。

くわえて、精密検査受診率は 95% と高率で、現場で

の担当職員の方々のご協力の賜物と拝察されるが、やはり言葉の壁は厚く、実際の検診などの場面では、しばしば対応に苦慮されたところのご報告を受けている。このため、今後各国語による有症状受診の促進を中心とした健康教育・広報の方法の開発や、現場での対応のマニュアル等の作成なども早急に検討する必要があると思われる。

ま と め

1. 東京都衛生局および特別区は、1988 年度に日本語学校就学生 13,117 人に対して結核検診を実施した。発見された要医療者は 57 人で、患者発見率は 0.43% と東京都における学校検診での発見率 0.01% の 43 倍であった。

2. 要医療者 57 人中、52 人 (91.2%) は入国 1 年以内に、33 人 (57.9%) は半年以内に発見された。

3. 発見した要医療者のうち数名は治療を拒否し、また数名は帰国した。さらに医療機関を受診した者の中にも治療中断中の者が数名おり、発見した患者をいかに治療完了させるかが今後の課題となる。

4. 今後は、引続き検診による実態把握に努めるとともに、各国語による健康教育・広報の方法の開発や、医療機関・医療保険などでの外国人の受入態勢の強化など国際化に対応した保健医療体制の整備を行う必要がある。