

等温キメラプライマー核酸増幅 (ICAN[®]) 法を用いた結核菌群検出キットの従来法との比較検討

¹倉島 篤行 ²町田 和子 ²永井 英明 ²川辺 芳子
²赤川志のぶ ²長山 直弘 ²馬場 基男 ²鈴木 純子
²益田 公彦 ²田村 厚久 ²小松彦太郎 ²四元 秀毅

要旨：われわれは、キメラプライマー等温遺伝子増幅法 (ICAN) を用いて新たに開発された ICAN 結核菌群検出キット (タカラバイオ社) と、コバスアンプリコア (ロシュ社) に関して喀痰検体中の結核菌群 (MTB) の直接検出の性能比較検討を行った。

合計 120 症例から得られた喀痰 142 検体について検討した。核酸プローブ同定検査 (DDH 抗酸菌同定キット) により MTB と同定された検体のうち、MGIT 陽性を基準としたとき、ICAN システムとコバスアンプリコアシステムの感度は各々 88.2% (60/68), 92.6% (63/68) であった。一方、特異性は各々 65.7% (44/67), 62.7% (42/67) であった。また、両法の結果の一致率は 96.3% (135 検体中 130 検体) であった。両測定法から得られた結果には統計学的に有意差は認められなかった。

今回検討した両核酸増幅システムは喀痰検体中の MTB 検出に同等の感度、特異性を有していたが、ICAN システムはアンプリコア[®]システムに比べ、より迅速 (検体採取から 3.5 h) であった。ICAN システムはプログラム・サーモサイクラーといった特殊な増幅装置を必要としない、検査室での迅速な MTB 診断に有用なキットであると考えられた。

キーワード：核酸増幅法, 結核菌群, 等温キメラプライマー核酸増幅法, 塗抹染色, 液体培養

はじめに

肺結核症の集団感染, 院内感染が問題視され, 再興感染症として注目されている。1994 年の米国 CDC 勧告¹⁾, 1999 年 7 月 26 日の厚生省による結核緊急事態宣言の発表, それに続く新結核菌検査指針 2000²⁾により, 近年, 検査の迅速化と精度向上へ向けて, PCR 法などの核酸増幅法, 液体培養法の導入が行われ, 各方面からの取り組みがなされている。しかしながら, MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 法³⁾などの液体培養法においても 2~6 週間を要するのが現状であり, 特殊な増幅装置を用いた迅速 PCR 法による核酸増幅検査⁴⁾でも 6~7 時間を要し, 即日結果報告による迅速対応は難しいとされている。さらに PCR 法での治療効果判定や退院時期の評価への対応は, 死菌由来の核酸検出の可能性から更なる

検討が必要とされている^{5)~7)}。

タカラバイオ社で開発された国産の核酸増幅法である, DNA-RNA キメラプライマーを用いた等温核酸増幅 (ICAN) 法を応用した ICAN 結核菌群検出キットは, 特殊な核酸増幅装置を必要とせず, 3.5 時間と迅速検査が可能とされている⁸⁾。今回, 従来法 (塗抹試験, 培養法, PCR 法) との比較ならびに有用性について検討した。

対象と方法

(1) 対象

当院の入院患者で, 抗結核化学療法を施行前後の活動性肺結核患者を主とする 120 症例 (年齢 26 歳~89 歳, 平均年齢 59 歳, 男性 93 例, 女性 27 例) の喀痰検体 142 検体について検討した。なお, 検体の採取ならびに本検討は当院 IRB の承認のもとに実施された。

¹国立療養所東京病院臨床研究部, ²呼吸器内科

連絡先: 倉島篤行, 国立療養所東京病院臨床研究部, 〒204-8585 東京都清瀬市竹丘 3-1-1 (E-mail: krsn@tokyo.hosp.go.jp) (Received 31 Jan. 2003/Accepted 5 Jun. 2003)

(2) 喀痰前処理

まず、採取した喀痰をNALC-NaOH処理後5分割し、塗抹試験、培養試験(小川培地, MGIT)に供し、また、PCR法ならびにICAN法各々の専用前処理試薬で処理し遺伝子検出に供した。

(3) 塗抹染色法

集菌法でスライドガラスに直接塗抹し、蛍光染色法で抗酸菌の有無を判定した。

(4) 培養法

3%小川培地(極東製薬社)ならびにMGIT(BD社)でそれぞれ最大8週間、6週間培養を実施した。

(5) 核酸(増幅)同定検査

PCR法を用いた自動化システムであるコバスアンプリコア・マイコバクテリウム(ロシュ社)で行った。一部の分離菌からの菌種同定鑑別には、アキュプローブ(極東製薬社)、DDHマイコバクテリア(極東製薬社)を使用した。

(6) ICAN結核菌群検出キット

(6-1) 本キットの特徴と原理

タカラバイオ社で開発されたICAN(Isothermal Chimeric Primer Amplification of Nucleic acids)法を原理とするICAN結核菌群検出キット(タカラバイオ社)を用いた。この新しいICAN法によるキットの特徴は、①等温遺伝子増幅法を採用することにより、PCR法では必須であった秒単位の温度変化をプログラムできるサーモサイクラーという特殊な装置を必要とせず、②PCR法で約6時間かかった測定時間を約半分の3.5時間で迅速測定できるもので、③内部標準を同一チューブ内で同時増幅するため遺伝子増幅の阻害による偽陰性をチェックできる

システムも取り入れていること、とされている。なお、本キットの測定検出原理は結核菌群のみが菌1個当たり平均6個もつIS6110遺伝子上の103塩基対を等温増幅し発光プローブ検出するものである。検出反応は同時増幅されたIS6110遺伝子と内部標準遺伝子おのおのを、ストレプトアビジンが固相化されたマイクロプレート上にトラップし、各増幅遺伝子の一部に特異的なDNAプローブとハイブリダイゼーションを行い、酵素反応による発光をルミノメータで測定し判定する(Fig. 1)。

(6-2) 本キットの操作

NALC-NaOH処理した菌体懸濁液0.1 mlの沈渣を専用の洗浄液0.5 mlで洗浄、遠心後、ICAN溶菌液0.2 mlを加え、37°Cで30分加温した。その後95°Cで5分加熱し、12000 rpmで遠心分離後、その上清25 μ lを検体として使用した。ICAN増幅試薬セットを用い、ビオチン化キメラプライマーならびにexo-Bca DNA Polymerase, RNaseH, dNTPs, 内部標準(IC)が予め含まれたICANミックス試薬25 μ lを専用反応チューブに入れ、上記検体25 μ lを加え、ドライヒートブロックで60°C、1時間ICAN増幅反応させた。反応終了後、反応停止液10 μ lを加え、ICAN結核菌群検出キットを用いて結核菌群遺伝子ならびに内部標準遺伝子を検出した。ストレプトアビジンがコートされた96ウェル白色プレートのウェルに予めハイブリダイゼーション液50 μ lを加え増幅産物10 μ lを添加し、20~25°Cで15分間反応させ増幅産物をウェル上にトラップした。変性液10 μ lを添加し3分間反応し変性後、結核菌群特異FITC標識プローブ(TBプローブ)液100 μ lまたは内部標準特異FITC標識プローブ(ICプローブ)液100 μ lを加え20~30°Cで40分間ハイブリダ

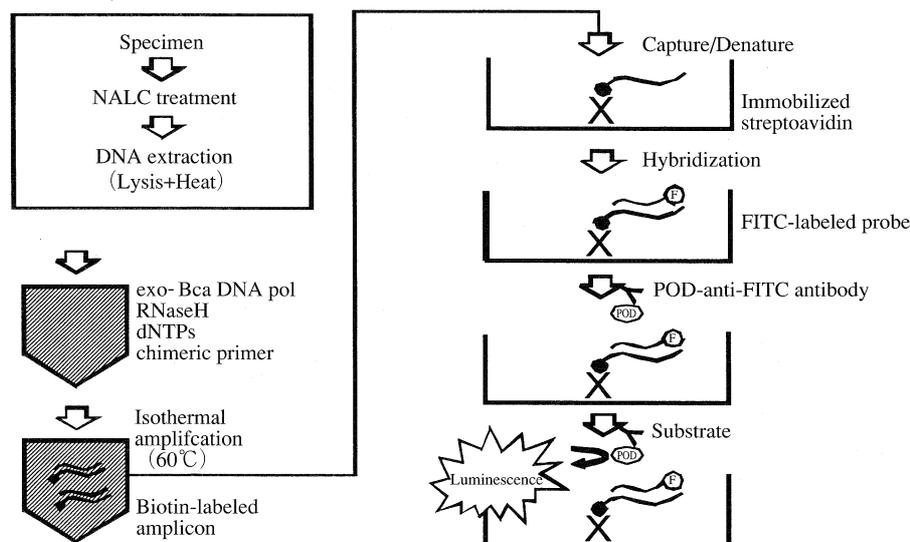


Fig. 1 The Assay Procedure of ICAN MTB Detection System

イゼーションさせた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗 FITC 抗体 (ウサギ) 液 100 μ l を加え 20~30°C で 20 分間 反応させ、洗浄後、発光試薬 100 μ l を加え、発光強度 (RLU) を発光プレートリーダー (Labosystems 社) によって測定した。判定は TB プローブでの RLU 値が 100 以上を陽性と判定した。また、検体と同一チューブ内で増幅された IC 増幅産物を IC プローブにより同時測定することで、増幅阻害による偽陰性をチェックした。なお、TB プローブでの RLU 値が 100 未満で、かつ、IC プローブでの RLU 値が 100 未満の場合は再測定を実施した。

結 果

(1) 各検査法における検出率

合計 142 検体の喀痰を 120 症例の化学療法前後の結核患者ならびに結核症の疑いのある患者から採取し検討した。これらすべての検体は蛍光法による塗抹試験ならびに MGIT 法、小川培地、PCR 法、ICAN 法による試験に供された。その結果、塗抹試験での抗酸菌の検出率は 92 検体 (64.8%)、MGIT 法による抗酸菌の検出率は 75 検体 (52.8%) であった。一方、小川培地での抗酸菌の検出率は 30 検体 (21.1%) であったが、これら検体はすべて MGIT 陽性であった。

MGIT 法陽性検体中、5 検体 (検体番号 466, 479, 553, 608, 938) は最終的に非結核性抗酸菌として同定された。なお、これら非結核性抗酸菌と同定された 5 検体は、PCR 法ならびに ICAN 法による測定結果は共にすべて陰性であった。一方、これら 142 検体でのコバスアンプリコア結核菌群キット (以下、PCR 法と略す) の検出率は 90 検体 (63.4%) であり、ICAN 結核菌群検出キット (以下、ICAN 法と略す) の検出率は 83 検体 (58.4%) であった。

上記結果で PCR 法と ICAN 法で結果の不一致がみられた 7 検体 (検体番号 777, 919, 11, 395, 28, 61, 48) に関しての解析のまとめを以下に示す。検体番号 777 は

他の検査ではすべて陰性で PCR 法のみ陽性であったが、臨床診断ならびに経過観察からは結核症ではなく PCR 法での偽陽性と判断した。検体番号 919, 11, 395 は他の検査ではすべて陽性で ICAN 法のみ陰性であり、ICAN 法での偽陰性と判断された。検体番号 48 は MGIT 法と ICAN 法が陰性となっており、MGIT 法の感度からみて、検出限界付近の低菌量と考えられた。最後に検体番号 28 は ICAN 法と塗抹試験が陰性であったが同一症例の 2 日後に採取された検体では ICAN 法を含むすべての検査が陽性であり、また検体番号 61 は ICAN 法のみ陰性であったが、同一症例の 1 日後ならびに 2 日後に採取された検体では ICAN 法を含むすべての検査が陽性を示し、両検体材料の質に問題があったと判断された。以上の結果を考慮し検体番号 28 と 61 の 2 検体、ならびに非結核性抗酸菌と同定された 5 検体の計 7 検体を除外した後の 135 検体での測定結果を Table 1 に示した。この結果、塗抹試験の検出率は 86 検体 (63.7%)、MGIT 法での検出率は 68 検体 (50.4%)、PCR 法での検出率は 88 検体 (65.2%)、ICAN 法での検出率は 83 検体 (61.5%) であった。また、PCR 法と ICAN 法の一致率は 135 検体中 130 検体 (96.3%) であった。

Table 2 は 135 検体における PCR 法と ICAN 法の陽性率を比較したものである。MGIT 陽性を基準とし PCR 法ならびに ICAN 法の感度を検討した結果、PCR 法では 92.6% (63/68)、ICAN 法では 88.2% (60/68) と有意差はなく同等であった。また、MGIT 陰性を基準とした時の特異性は、PCR 法で 62.7% (42/67)、ICAN 法で 65.7% (44/67) と有意差なく同等であった。一方、MGIT 陽性かつ塗抹陽性を基準とし PCR 法ならびに ICAN 法の感度を検討した結果、PCR 法では 95.2% (59/62)、ICAN 法では 90.3% (56/62) と有意差はなく同等であった。また、塗抹陰性かつ MGIT 陰性を基準とした時の特異性は、PCR 法で 83.7% (36/43)、ICAN 法で 86.0% (37/43) と有意差なく同等であった。

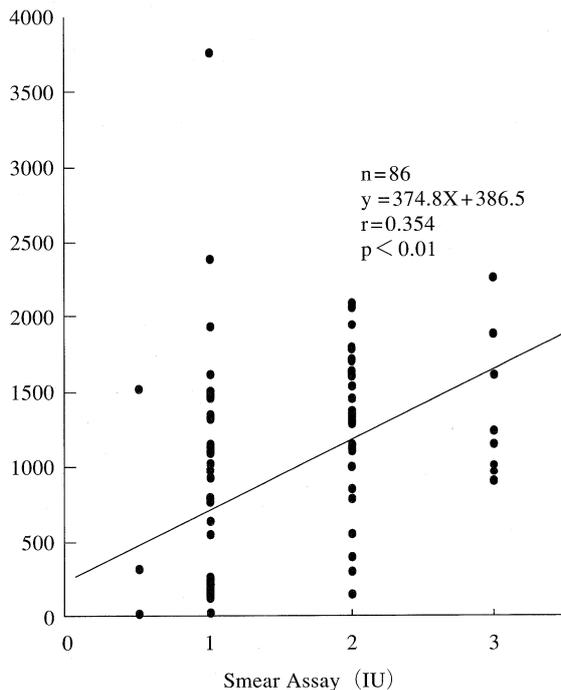
Table 1 Detection of MTB in sputum samples with ICAN MTB, COBAS Amplicor, MGIT and smear test

		MGIT						Total
		Sample No. of MGIT Positive			Sample No. of MGIT Negative			
		Smear Test		Total	Smear Test		Total	
		Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total	
PCR	Positive	59	4	63	18	7	25	88
	Negative	3	2	5	6	36	42	47
	Total	62	6	68	24	43	67	135
ICAN	Positive	56	4	60	17	6	23	83
	Negative	6	2	8	7	37	44	52
	Total	62	6	68	24	43	67	135

Table 2 Evaluation of ICAN MTB and COBAS Amplicor for direct detection of MTB in sputum specimens

Smear Test and/or MGIT	Sample No.	ICAN Positive	Amplicor Positive	p*
Smear Positive	86	73 (84.9)	77 (89.5)	NS
Smear Negative	49	10 (20.4)	11 (22.4)	NS
MGIT Positive	68	60 (88.2)	63 (92.6)	NS
Smear Positive and MGIT Positive	62	56 (90.3)	59 (95.2)	NS
MGIT Negative	67	23 (34.3)	25 (37.3)	NS
Smear Negative and MGIT Negative	43	6 (14.0)	7 (16.3)	NS

() Positive rate (%) *p<0.5 NS (not significant)

**Fig. 2** Comparison between RLU value of ICAN MTB Assay and International Units of Smear Assay

(2) 塗抹試験と核酸増幅法との相関性

PCR法での実測値は吸光度として表示され、ICAN法での実測値は発光強度 (RLU) として表示される。本検討において、PCR法の吸光度に比べ、ICAN法でのRLU値は中程度から高値まで様々な値を示した。そこで、これら実測値と塗抹試験における国際単位の相関性について検討した。Fig. 2に示すように、ICAN法のRLU値と塗抹試験における国際単位との間に弱いながら有意な正の相関が認められた。この結果は検体中に存在する菌体量がICAN実測値にある程度反映されていることを示すものと考えられた。一方、PCR法では吸光度の値が測定限界以上の検体が約半数あり、OD値として把握できず相関関係は認められなかった。

(3) ICAN法における判定基準の妥当性

ICANキットの説明書では結果判定基準として、RLU

が100以上を陽性、100未満を陰性と設定されている。今回測定した142検体から非結核性抗酸菌を除いた137検体のRLUの分布図をFig. 3に示した。その結果、RLU 100のところで大きく2群に分かれ、有意に区別でき上記判定基準は妥当と判断された。

考 察

今日、結核菌群の迅速・高感度な検出・同定検査法の確立が、治療のみならず集団感染ならびに院内感染防止の観点からも要求されている。現在、塗抹試験、小川培地、液体培養法が広く用いられているが、液体培養に関してはより迅速・高感度化を可能にしたMGIT法などが導入されつつある。一方、PCR法に代表される核酸増幅検出法は1日で結核菌群の検出・同定が可能な高感度・迅速検査法として広く使用されるようになった。しかし、PCR法は特殊な核酸増幅装置を必要とし、その測定時間も6~7時間と即日結果報告を可能にするまでには至っていない。今回、タカラバイオ社から3.5時間で特殊な増幅装置を用いず等温で結核菌群に特異的であり、菌体当たり平均6コピー存在するとされるIS6110遺伝子を増幅し、プレート上でプローブハイブリ後発光検出する、ICAN結核菌群検出キットが開発された⁸⁾。本キットは従来のTMA法を用いたDNAプローブ「中外」-MTBキットのように95℃15分、42℃5分の増幅液との反応後、増幅酵素を添加し42℃30分反応するといった煩雑な温度変化や操作を必要とせず、60℃という一定温度のみで反応可能な点も特徴である。また、本キットは増幅産物を検出する際、ハイブリダイゼーションや酵素標識抗体との反応が室温(20~30℃)で操作でき利便性に富んでいた。さらに本キットは内部標準(IC)も同一チューブ内で同時増幅し、ICプローブにより検出できるように設計されており、検体由来の阻害物質による偽陰性をチェックできる仕組みになっている。また、陽性判定基準はTBプローブでのRLU値が100以上、また陰性コントロールのRLU値は30以下とされているが今回の検討ではRLU 30~100の値を示した検体は検体番号28以外には陰性判定された検体中にはなく、陰性判定された

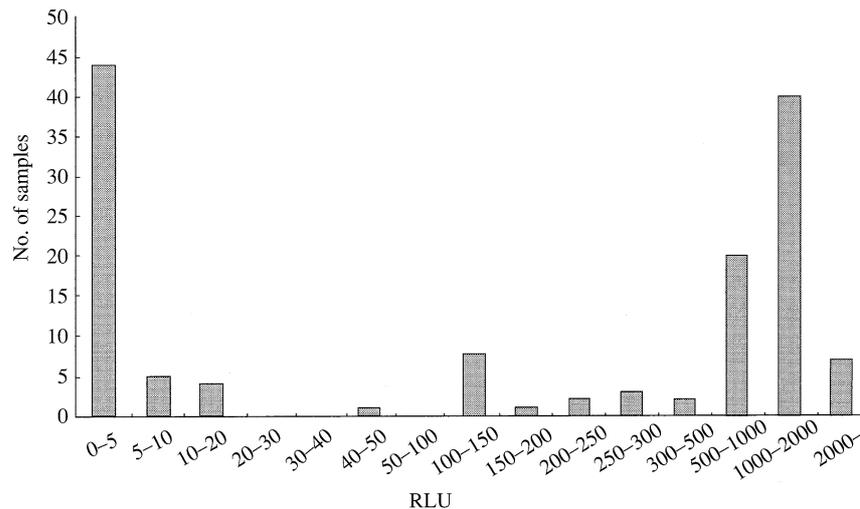


Fig. 3 Frequency distribution of ICAN MTB assay results (n=137)

56検体中その53検体は10以下の値であり、この判定基準は妥当と考えられた。しかし今回、統計解析から除外した検体番号28は、RLU値が49.5であり、PCR法陽性かつMGIT法陽性の検体であった。また、同症例の2日後採取の検体では、ICAN法を含むすべての検査結果は陽性であった。従って、本キットにおいてRLU値30以上100未満の検体については判定保留という判定基準を追加し、同一検体での再測定または検体を再度採取しての再測定を実施することが必要と考えられた。今回の検討では、統計処理からは除外したが検体番号28、61のように喀痰検体の質も踏まえ、他の検査項目とあわせ総合的な診断が必要な場合もあった。

われわれは、ICAN法が肺結核の検査法として、どの程度有効であるか従来法〔塗抹染色法、培養法（小川、MGIT）、PCR法〕と比較し、その評価を試みた。

今回の成績からMGIT陽性を基準とした場合、ICAN法の感度は88.2%、PCR法では92.6%であった。MGIT陽性かつ塗抹陽性を基準とした場合、ICAN法の感度は90.3%、PCR法では95.2%であった。PCR法の感度に関しては液体培養を基準としたこれまでの評価報告では82~95%という値が報告されており^{9)~11)}、今回のICAN法ならびにPCR法の成績はこれら報告から妥当と考えられた。PCR法には今回自動化システム（コバスアンプリコア）を用いていることもありICAN法の感度は若干PCR法より低い値を示したが、有意差は認められず同等なものであった。

一方、MGIT法陰性を基準とした場合、ICAN法の特異性は65.7%、PCR法の特異性は62.7%で有意差はなく、MGIT法陰性かつ塗抹染色法陰性を基準とした場合では、ICAN法の特異性は86.0%、PCR法の特異性は83.7%

で有意差はなかったが、ICAN法が若干PCR法より高い値を示した。従来報告ではPCR法の特異性は96~100%とされ^{9)~11)}、今回の成績は低い結果となったが、これら報告は臨床診断に対してのもので、肺結核以外の患者数を多く含む検討であり、かつ今回の著者らの検討では化学療法中の肺結核患者が多く、死菌由来の核酸を検出したためと考えられる。今後結核症以外の検体を多く含めた検討が必要と考えられた。

また、実際の迅速診断において問題となる、塗抹陰性検体での陽性率はICAN法が20.4%、PCR法が22.4%と有意差なく同等であり、既報のPCR法での報告とも同等であり⁴⁾¹²⁾、かつMGIT法での陽性率14%よりは高率であった。

以上の結果より、ICAN法の感度・特異性、さらに臨床応用上重要となる塗抹陰性検体での陽性率についてもPCR法と同等と考えられた。

結核菌群検出の迅速化・高感度化として核酸増幅法が広く普及してきたが、問題点として臨床検体では死菌も検出する可能性があり、生菌の検出や菌量の評価では、培養検査、塗抹検査が有用なのが現状である。

今回の成績で、PCR法には認められなかったが、ICAN法の測定値である発光強度RLUは、塗抹試験結果の国際単位との間に弱いながらも有意な正の相関が認められた。これはPCR法とICAN法の核酸増幅機構が異なること、またICAN法キットでは測定レンジの広い発光検出法を用いていることによると考えられる。今後経時的な追跡検査を実施することで、このICAN法と排菌量との相関性についてさらに検討が望まれる。

結 語

1. ICAN法で核酸増幅し、マイクロタイタープレート上でプローブ検出・同定する ICAN結核菌群検出キット(タカラバイオ社)の従来法との比較試験研究を行った。
2. 結核症ならびに同疑い例に関して、その喀痰検体142検体、120症例について、塗抹試験、小川培地、MGIT法、コバスアンプリコア法、ならびに本キットでの検出を行った結果、感度、特異性、さらに塗抹陰性検体での陽性率ともにコバスアンプリコア法と同等であることが確認できた。
3. 本キットによる結核菌群の検出同定は、特殊な核酸増幅装置を必要とせず、検体採取から判定まで3.5時間で完了でき、即日結果報告を可能にするもので、結核菌群の診断に有用であると考えられた。

文 献

- 1) Centers for Disease Control and Prevention: CDC guidelines for tuberculosis control in health care facilities. MMWR. 1994; 43: 1-13.
- 2) 阿部千代治(監):「新結核菌検査指針2000」. 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編, 2000.
- 3) 齊藤 肇, 柏原嘉子, 佐藤紘二, 他: MGITによる抗酸菌の迅速検出法. 結核. 1996; 71: 399-405.
- 4) 青木正和, 片山 透, 山岸文雄, 他: PCR法を利用した抗酸菌 DNA 検出キットによる臨床検体からの抗酸菌迅速検出. 結核. 1994; 69: 594-605.
- 5) 日本結核病学会予防・治療合同委員会: 核酸増幅法による結核菌検査の臨床での利用について. 結核. 1995; 70: 711-712.
- 6) 竹内悦男, 高井元彦, 北川正春, 他: PCR法による喀痰中の結核菌の検出. 臨床検査. 1996; 40: 747-750.
- 7) American thoracic society workshop: Rapid diagnostic tests for tuberculosis: What is the appropriate use? Am J Respir Crit Care Med. 1997; 155: 1804-1814.
- 8) 寫田雅光, 日野文嗣, 佐川裕章, 他: ICAN法による結核菌群の迅速検出法の開発. 臨床病理. 2002; 50: 528-532.
- 9) Vourinen P, Miettinen A, Vuent R, et al.: Direct detection of *M. tuberculosis* complex in respiratory specimens by Gen-Probe AMTD and Roche Amplicor MT test. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1856-1859.
- 10) Piersimoni C, Callegaro A, Nista D, et al.: Comparative evaluation of two commercial amplification assays for direct detection of *M. tuberculosis* complex in respiratory specimens. J Clin Microbiol. 1997; 35: 193-196.
- 11) Carpentier E, Droudillard E, Dailloux M, et al.: Diagnosis of tuberculosis by Amplicor *M. tuberculosis* test. J Clin Microbiol. 1995; 33: 3106-3110.
- 12) 奥田 勲, 田中 司, 緑川清江, 他: 肺結核症例における血中抗 TBGL 抗体の検出意義. 臨床病理. 2001; 45: 673-676.

Original Article

COMPARATIVE EVALUATION OF THE ISOTHERMAL AND CHIMERIC PRIMER-INITIATED AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS (ICAN[®]) AND ROCHE AMPLICOR[®] PCR AND CULTURE FOR DETECTING *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX IN SPUTUM SAMPLES

¹Atsuyuki KURASHIMA, ²Kazuko MACHIDA, ²Hideaki NAGAI, ²Yoshiko KAWABE,
²Shinobu AKAGAWA, ²Naohiro NAGAYAMA, ²Motoo BABA, ²Junko SUZUKI,
²Kimihiko MASUDA, ²Atsuhisa TAMURA, ²Hikotarou KOMATSU, and ²Hideki YOTSUMOTO

Abstract We compared the ability of the newly developed ICAN[®] MTB Detection Kit (TaKaRa Bio Inc.), which uses the Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acid (ICAN), with that of COBAS Amplicor PCR System (Roche Diagnostics) to directly detect *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) in sputum samples.

A total of 142 sputum samples from 120 patients were examined in this study. The results were compared with those of acid-fast staining and MGIT liquid culture system (BD) following identification by the probe test (DDH Mycobacteria Kit). A total of 68 specimens were MGIT[®] positive for MTB. In addition, 62 specimens were positive by the combination of staining and MGIT assay for MTB. When compared with that for MGIT, the sensitivity of each assay system was 88.2% for ICAN and 92.6% for COBAS Amplicor, respectively. The specificity of each assay system was 65.7% for ICAN and 62.7% for COBAS Amplicor, respectively.

Coincidence between ICAN and COBAS Amplicor assay results was 96.3% (130 of 135 samples). No significant difference was observed between the results of the two assay methods.

It is concluded that although both nucleic acid amplification methods are sensitive and specific for the detection of MTB in the respiratory specimens, ICAN system appeared to be more rapid (within 3.5 h from the specimen collection) than Ampli-cor system. The ICAN system will be useful in clinical laboratories for the rapid detection of MTB without specially programmed thermo-cycler.

Key words : Nucleic Acid Amplification, *Mycobacterium tuberculosis* complex, Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic Acid, Acid-fast staining, Liquid culture

¹Division of Clinical Research, ²Department of Respiratory Medicine, National Tokyo Hospital

Correspondence to: Atsuyuki Kurashima, Division of Clinical Research, National Tokyo Hospital, 3-1-1, Takeoka, Kiyose-shi, Tokyo 204-8585 Japan.
(E-mail: krsn@tokyo.hosp.go.jp)