

神奈川県結核業務支援システム開発について

中澤よう子

要旨：〔目的〕神奈川県では、煩雑な事務を含む結核業務を効率化、および合理化するシステムを開発した。〔方法〕このシステムの開発にあたっては、厚生労働省の結核発生動向調査システムの情報を活用し、結核患者等の情報をすべてコンピューター管理することによって、患者票等の各種帳票をシステムから出力できるように開発した。また、この出力データを管内の結核に関する状況を考察する資料として活用することも想定して、開発を行った。〔結果〕このシステムの活用により、煩雑な結核事務作業が大幅に省力化されて、県内中規模保健福祉事務所の結核担当者は、平均週に1時間の省力化が図られた。また患者および接触者の管理ならびに定期外検診が、確実に出来るようになった。さらに、各種帳票の出力だけでなく、統計資料等作成のための基礎資料としてデータをExcelに出力することもできるようになった。〔考察〕よってこのシステムは、単に事務作業の省力化に資するだけでなく、結核対策を考える際の重要な情報源、資料源となった。

キーワード：結核、情報管理、サーベイランス、省力化

はじめに

結核患者に関する各種の情報は、厚生労働省の所管する結核発生動向調査システム（以下、サーベイランスシステム）によって電子情報として蓄積されている。このシステムにおける結核予防法に基づく結核医療費公費負担関係事務の補助機能はごくわずかであり、ほとんどの帳票類を手書き、あるいは担当者のパソコンに改めて情報を入力し直すなどして作成していた。また、厚生労働省が行う公衆衛生指導監査等の各種統計資料作成に際しては、必要となる基礎資料をサーベイランスシステムから得ることはほとんど不可能であった。このため結核患者登録票をひとつひとつ調べ、手作業で集計していくという、前時代的で非効率的な方法による業務運営が行われていた。

その一方で、結核患者の接触者に関する電子情報の蓄積は、まったく行われていなかった。このため、管内患者の接触者および他保健所から依頼を受ける管内居住接触者の定期外健診のスケジュール管理は困難をきわめた。また、受診漏れを防止するための確認作業に、膨大

な手間と時間が割かれているのが現状だった。

こうした状況から、結核医療費公費負担関係事務および定期外健診業務を効率的かつ確実に運営するため、各保健福祉事務所（以下、保健所）の結核担当者が独自にシステムを作成して運用している実態があった。しかし、担当者の努力によって作成され業務に活用されていたシステムであっても、担当者の異動等の際に確実に引き継がれるとは限らず、一代限りの財産となってしまうことがほとんどであった。また、担当者に現状を聴取したところ、保健所における業務運営方法とその内容にはさまざまな違いがあることが確認された。

これらの諸問題の解決を目標に掲げ、特に今後の結核対策において非常に重要な定期外健診の安定的管理を目指し、また地域の結核対策の基盤整備と強化を図るため、以下の点に目的を絞りシステム開発を行った。

①サーベイランスシステムに入力した結核患者の電子情報を活用することによって二重入力の負担をなくす。さらに付加情報を蓄積することによって、結核医療費公費負担関係事務にかかわる各種帳票の出力等に活用して、事務の効率化を図る。

②定期外健診に関する電子情報を蓄積し、月別対象者リストの出力等に活用して受診漏れを防止する。

③結核患者および接触者の情報管理をシステム化することによって、県域全保健所の業務運営方法等の標準化・合理化を目指す。

開発経緯

神奈川県結核業務支援システム（以下、神奈川システム）の開発は、結核対策特別促進事業実施要綱（平成4年4月28日健医発第557号厚生省保健医療局長通知）による指定を受け、結核患者管理促進事業実施要領（神奈川県衛生部保健予防課）に基づく事業として実施した。システム開発に際しては、神奈川県衛生部地域保健課が推進するEUC〔End User Computing = 日常使い慣れているOAソフトを利用して、ユーザー（担当職員）自身が行う自主的業務改善〕として神奈川県衛生部情報化推進会議に登録し、同課の支援を受けながらMS-Office（Access・Excelほか）を利用して開発を行った。

開発体制に関しては神奈川県衛生部保健予防課が主体となり、各保健所の医師、結核担当保健師、事務職などで構成する開発作業部会を設置して、開発作業を行った。また、県域の全保健所の結核担当で構成される結核患者管理促進事業連絡調整会議において、作業部会による開発作業の進捗状況等を報告しながら神奈川システムの内容を検討し、作業部会に意見を集約する形式で開発を進めた。

開発作業は平成12年度から平成14年度の3年間で行った。平成12年度は、作業部会を発足し、開発スケジュールや神奈川システムの構成の検討など、開発作業の基本方針を決定することが主な作業となった。まず、結核業務実態把握アンケート調査を実施し、各保健所ごとの業務運営方法の実態を把握した。この情報を基に結核業務の現状を分析しながら、神奈川システムの基本機能や入出力項目などを検討した。また、データベース構築作業への着手に先立って作業分担を行う際、使用するOAソフトに関する基礎知識習得の必要性を確認した。よって次年度に研修を行い、知識習得に努めることを予定した。

平成13年度は、前年度の作業内容を踏まえつつ、業務改善をも視野に入れたシステム開発を目指したため、さらに詳細な業務の分析に取り組んだ。このため、定期外健診のスケジュール管理方法等に目的を絞って再度アンケート調査を実施し、その結果明らかになった各所の実態を把握した。また、担当者の要望を取り込んで、システムの機能概要を決定した。一方、知識習得のための研修は運用後のメンテナンス作業を考慮し、メンバー全員がシステムに関して同等の知識を保有することが必要

と再確認した。このため、データベース構築作業を作業部会内の特定のメンバーに限定せず、全員が開発に使用するOAソフトの知識向上のために県情報システム課の「パソコンData Baseシステムの利用（Access）」研修を受講し、開発に当たることとした。

一方、サーベイランスシステムとの二重入力を避けるために、同システムのデータ利用について厚生労働省に確認し、データの取り出しおよび活用についての了解を得た。これによりサーベイランスシステムと神奈川システムを担当者の机上のパソコンにインストールして、所内LANを活用したネットワーク設定によるシステム運用が可能となった。

そして、結核患者および接触者に関する情報のデータベース化と、当該データを利用した「結核診査協議会（以下、結核診査会）諮問一覧表」出力機能や、定期外健診に使用する「家族検診受診券」、「定期外健診保健指導カード（カルテ）」出力機能など神奈川システムの基礎部分を完成させた。こうして平成13年度末に「神奈川システム（Ver 1.0）」として、システム操作マニュアル等とともに各保健所に配布し、運用を開始した。

平成14年度は機能を追加し、実務担当者にとってより使いやすく便利なシステムにすることを目指した。そのため、神奈川システム（Ver 1.0）配布後の活用状況についてアンケート調査を実施し、機能改善および機能追加の方向性を検討した。アンケートの結果、特に要望の強かった「結核診査会諮問一覧表」および「定期外健診保健指導カード」の出力レイアウトの変更を行い、「神奈川システム（Ver 1.3）」として、平成14年10月に配布した。

その後、結核診査会関係では「診査会意見書」および「入所命令解除通知書」の出力機能、結核医療費公費負担事務関係では「患者票」の出力機能を追加した。また、対象時期（期間）を任意に設定して、「公費負担診査結果」、「定期外健診対象者」および「定期外健診実施結果」の検索機能と、検索結果のExcelへの出力機能等各種機能を追加した。さらに、管内患者およびその接触者に関する情報管理機能だけでなく、他保健所から依頼された管内居住接触者の検診情報管理機能をサブシステムとして追加した。

以上のようにパワーアップしたシステムを「神奈川システム（Ver 2.0）」として完成させ、平成14年度末に操作マニュアル改訂版とともに配布し、運用を開始した。現在、県域の全11保健所で稼働中である。

神奈川システムの概要

(1) 神奈川システムのネットワーク設定 (Fig. 1)

担当者の机上のパソコンにサーベイランスシステムと

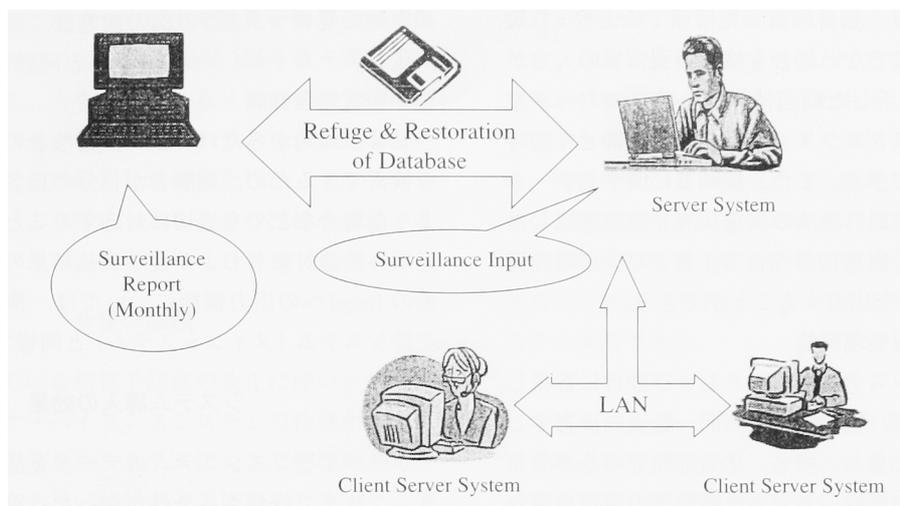


Fig. 1 Establishment of System Network

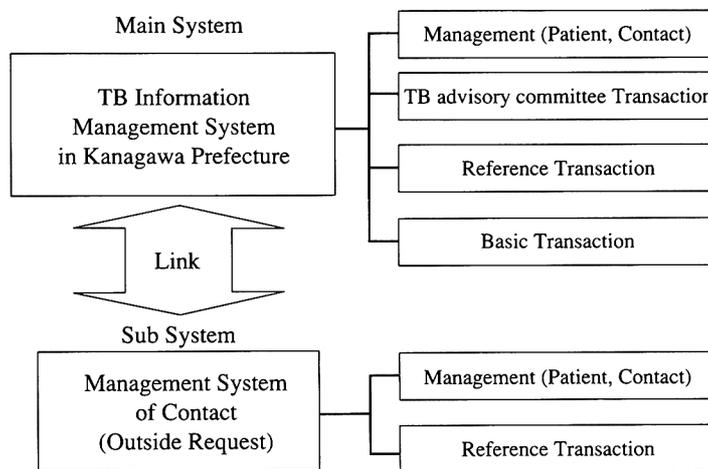


Fig. 2 Component of System

神奈川システムをインストールし、サーベイランスシステムへの入力には机上のパソコンから行う。このパソコンは神奈川システムのサーバー機としても位置付け、データ部分を格納する。他の担当者のパソコンは、サーバー機に対するクライアント機として位置付け、所内LANを通じて神奈川システムへのデータの入出力を行う。サーベイランスシステムの月報報告時には、机上のパソコンのデータをフロッピーディスクに退避し、厚生労働行政総合情報システム「WISH」にデータを復旧し、「WISH」上で、報告作業を行う。

(2) 神奈川システムの構成 (Fig. 2)

厳密には、本システムは管内患者とその接触者を対象とする「神奈川県結核業務支援システム (メインシステム)」と、他保健所からの依頼に基づく管内居住接触者を対象とする「外部依頼接触者管理システム (サブシステム)」で構成されている (本稿では、2つのシステムを

総称して神奈川システムと呼んでいる)。両者にはリンクを設定しており、メインシステムを起動させれば、その画面からサブシステム画面に遷移できるため、ユーザーにとっては、一体化したシステムとして使用することができる。

(3) 神奈川県結核業務支援システム (メインシステム) の機能

業務の効率化を目的としたシステムであり、入力作業が煩雑では本末転倒である。そのため、少ない動作でスムーズに正しく入力できるように設定することを心がけた。また、公衆衛生指導監査等さまざまな条件での集計を求められた場合に柔軟に対応するため、Accessの機能であるレポートなどへの出力 (紙ベース) ではなく、集計・加工等を容易に行える Excel ファイルとして出力する機能を多く追加した。

①患者・接触者情報管理機能

結核診査会年月日、独自の菌所見情報（ガフキー号数の入力や、塗抹陽性でない場合も検体種別情報の入力が可能）、訪問等で入手した経過情報等の独自のデータを蓄積し、サーベイランスシステムのデータと併せて随時に参照することができる。また、接触者に関するデータを新たに蓄積し、定期外健診の実施状況を随時確認したり、必要に応じて「家族検診受診券」および「定期外健診保健指導カード」を出力することができる。

②結核診査会情報処理機能

サーベイランスシステムのデータおよび独自に蓄積したデータを活用して、結核診査会諮問一覧表を出力することが可能である。なお、病名、学会分類等の基本的な情報のほか、発病の経緯、命令入所解除等の情報を同表の備考欄に出力できるようになっている。結核診査会終了後に、サーベイランスシステムに公費負担医療の受給者番号（患者票番号）等を入力し、神奈川システムに診査会意見、自己負担額・入所命令解除年月日等の情報を入力することにより、患者票（34、35条）、入所命令解除通知書、診査会意見書を出力することができる。また、診査会結果の一覧表を出力することもできるため、公費負担申請受付台帳としての活用も可能である。

③検索処理機能

公費負担診査結果、定期外健診対象者および実施結果の検索と、それぞれの検索結果をExcelファイルとして出力することができる。いずれも、任意の時期（期間）を指定して検索する設定となっているため、さまざまな条件で求められる統計等に柔軟に対応できる。

④基本処理機能

各種出力帳票に反映させるため、保健所情報および指定医療機関情報の登録を行う。ここで入力する情報は、各指定医療機関の所在地や診査会の名称など、サーベイランスシステムでは蓄積されていない情報である。

（4）外部依頼接触者管理システム（サブシステム）の機能

他保健所からの依頼に基づく管内居住接触者の管理を目的としたシステムであり、機能もそれに特化している。

①患者・接触者管理機能

接触者検診依頼の発端となった患者の情報を含む他保健所からの依頼内容と、その後の接触者検診に関する情報を入力する。患者の氏名、住所、病名、学会分類などサーベイランスシステムでも入力しているような基本情報を入力するほか、依頼元の保健所名、所在地、担当者名等を入力しておき、依頼元保健所への、問い合わせや検診結果報告の際に参照するなどの活用もできる。なお、管内患者の接触者であるか否かには関係なく同じ対応を取るために、接触者に関するデータの蓄積や「定期外健

診保健指導カード」等の出力機能は、神奈川県結核業務支援システム（メインシステム）と同様である。

②検索処理機能

患者の氏名からだけでなく、接触者の氏名からも情報を検索できるため、接触者が自分の氏名しか名乗らないような場合などでも適切に対応することができる。また、定期外健診対象者および健診実施結果の検索と、検索結果のExcelへの出力機能については、神奈川県結核業務支援システム（メインシステム）と同様である。

システム導入の効果

サーベイランスシステムのデータを活用することにより、これまで行わざるを得なかった二重入力がほとんど不要になったほか、電子データの活用による各種帳票の出力が可能となり、従来の煩雑な業務から解放されたため、患者および接触者への支援と指導に労力を配分できるようになった。また、定期外健診に関する情報も新たに電子データとして蓄積・管理することになったため、仮にカルテが散逸してしまっても、システムによる受診予定者名簿の出力等により受診漏れを防ぐことが可能となり、適切な時期に確実に検診を実施できるようになった。

実際に神奈川県内の中規模保健所（年間新規登録患者40人、定期外健診500人程度）で、神奈川システムを使用した場合としなかった場合の事務時間数を比較したところ、平均週1時間の省力化が図られることがわかった。だが、実際の業務では資料作成時のミス、定期外健診の受診漏れを防ぐための確認作業などの時間数を見込むと、この2～3倍の省力化が図られている。

さらに、県域の全11保健所で神奈川システムという共通のシステムを使用することにより、これまで担当者ごとに異なっていた業務運営方法が標準化・合理化され、ひいては業務内容の平準化にもつながった。

このように、神奈川システムの活用は単に時間や労力の節約に寄与しただけではなく、結核対策の基盤整備と強化につながり、結核患者・接触者管理の精度向上に基づく結核対策の充実に寄与した。

システムの維持と管理

開発した神奈川システムの運用を維持していくためには、職員の異動に影響されることなく、機能の変更や追加等の要請に随時対応できる確実な運用体制を確立する必要がある。そのため、平成15年4月1日付で「『神奈川県結核業務支援システム運用会議』の設置及び運営に関する要領」を施行し、メンテナンス作業を担当する組織として運用会議を設置した。同会議構成メンバーは、現在5カ所ある結核診査会単位に1名以上を選出するこ

ととし、さまざまな視点から幅広く意見を得るということと、システム内容の安定性のため、偏りなく関連各職種から選出される。人事異動によるメンバーの交代に際しては、新メンバーを対象にメンテナンスが可能なレベルまでの技術向上を目的とした研修を行い、メンテナンス不能とならないよう常に一定レベルの技術を確保するものとしている。

今後の課題

今後予定されている結核予防法の改正に伴い、公費負担事務の内容やサーベイランスシステムの仕様が変更となった場合等、開発したシステムに大きな影響があることを想定して、いち早い情報の入手に努め、システム変更等の作業に備えなければならない。

また、今後の結核対策の根幹となっていくコホートや

DOTSを進めていく際に必要な患者情報検索や帳票の出力を、目的に沿った形で可能とするための更なる機能追加等が必要になっていくと思われる。

いずれにしろ、電子データでの情報管理による省力化と、情報分析などの観点からも開発に終了はなく、常に更なる改良と発展が必要である。また結核予防法の改正と結核対策の転換期において、運用会議メンバーによる改良が可能なシステムという点からも、非常に有用なシステム開発である。

本稿の内容は、第62回日本公衆衛生学会総会にて発表した。また、神奈川システムは神奈川県衛生部保健予防課および各保健所の担当職員のチームによる開発であるため、本稿内容もチームで執筆されたことを、ここに記す。

Field Activities

THE DEVELOPMENT OF A TUBERCULOSIS INFORMATIONS MANAGEMENT SYSTEM IN KANAGAWA PREFECTURE

Yoko NAKAZAWA

Abstract This article describes the development of a Tuberculosis Informations Management in Kanagawa Prefecture. Although the informations management was very complicated and troublesome, it saves labor thanks to computerised management of data, and allows the preparation of various documents. This system uses tuberculosis surveillance informations developed by the Ministry of Health, Labour and Welfare. By using this system, it has become possible not only to improve the work efficiency, but we also to deliver timely and appropriate followup care to patients and their contacts. Moreover, access to necessary data and statistical informations, in the form of Excel spreadsheets, was possible in this system. Besides saving labor power, the system provides various in-

formations needed for the evaluation of the tuberculosis situation in jurisdictional area. Thus, this system has become an essential informational tool in the planning of tuberculosis control strategy.

Key words: Tuberculosis, Informations management, Surveillance, Labor saving

Yamato Health and Welfare Center

Correspondence to: Yoko Nakazawa, Yamato Health and Welfare Center, 1-5-26, Chuo, Yamato-shi, Kanagawa 242-0021 Japan. (E-mail: kekkaku.268@pref.kanagawa.jp)

第79回総会教育講演

小 児 結 核

—小児結核対策転換期の課題—

高松 勇

キーワード：小児結核，結核対策，BCG接種，発病予防可能例，接触者検診，化学予防，結核性髄膜炎

はじめに

2002年3月20日，厚生労働省厚生科学審議会・感染症分科会結核部会報告「結核対策の包括的見直しに関する提言」¹⁾が，また，同年6月5日，結核部会・感染症部会の共同調査審議に係る合同委員会報告²⁾が発表され（以下両者を「結核部会の報告」と略す），結核予防法を含めた結核対策の包括的な見直しが提言された。この中で小児科領域では2003年度から「BCG再接種の廃止，学校検診の廃止」が実施され，2005年度からはBCG初回接種において「原則6カ月までの直接接種」が準備されている。まさに，小児結核対策は転換点にあるといえる。

このような時期における本稿の目的は，小児結核対策転換期の課題を明らかにすることであり，具体的には，第1に，「一律的・集団的対応から個別的・重点的対応への転換」の求めに応じた内容とは何か？ 第2に，小児結核の現状，特徴に配慮し，その際に押さえておかなばならない要点は何か？ 第3に，今後の課題を明示することである。

1. わが国の小児結核の現況

わが国の小児結核の減少は著しい。1960年に14歳以下の小児の新登録患者数は63,325名存在し，2002年の全結核患者数（新分類）32,828名をはるかに上回るものであった。しかし，2002年の小児結核患者数は155名で，1960年の0.3%，罹患率で見ると0.4%まで低下している（Table 1）³⁾。

年間の小児結核患者発生件数別の47都道府県数の推

移（Table 2：大森の原表に追加修正）³⁾⁴⁾では，患者数が年間0～1名の県が15～17県存在していた。このような県では小児結核対策は現状で概ねうまくいっていると考えてよいであろう。また，患者数の最頻値は2～4名であり，ここも15県前後存在した。一方で，小児結核患者が減少しているとはいえ，減少が鈍化している地域が存在し，10～20名以上存在する県があり，大阪，東京などの大都市部地域であった。このように大都市部地域では小児結核患者の減少は横ばいであり，小児にとって感染機会が順調に減少しているとはいえ油断はできない状況である。

また，小児結核患者の最近の特徴は，社会経済的に困難を抱える者により患者が偏在してきていることである。当科における患者特徴を示す。結核性髄膜炎患者29例（死亡例7例を含む）の検討では，1970年代に毎年の発生を見た患者数は80年代に入り減少し，90年代にはさらに減少をみているが，死亡例は90年代でも続き，

Table 1 Transition of number of childhood TB patients and incidence rate

Year	No. of new patients	Incidence rate	No. of tuberculous meningitis	Incidence rate
1960	63,325	244.0	—	—
1970	18,197	73.4	—	—
1980	1,893	6.9	22	0.08
1990	518	2.3	9	0.04
2000	220	1.2	7	0.03
2002	155	0.9	2	0.01

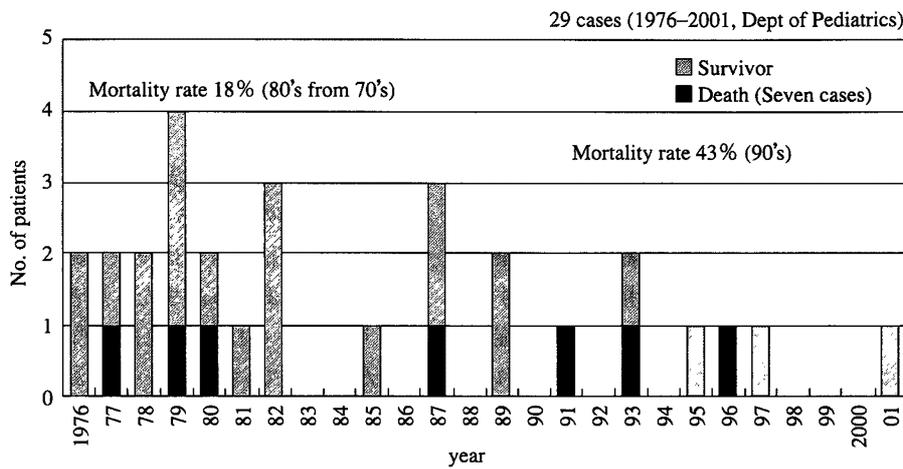
Rate: Population 0-14 years old per 100,000

No. shows Number, TB shows Tuberculosis

Table 2 Transition of the number in 47 prefecture by the no. of childhood tuberculosis patient, 1986–2002

No. of Patients	'86	'87	'88	'89	'90	'91	'92	'93	'94	'95	'96	'97	'98	'99	'00	'01	'02
0	0	0	0	0	0	3	0	2	1	3	5	5	7	2	9	11	15
1	0	1	1	4	3	1	4	6	5	6	6	10	6	11	8	9	8
2–4	6	6	9	10	13	14	16	12	18	14	17	13	17	19	13	16	12
5–10	9	16	12	10	11	12	11	12	9	13	8	11	9	7	10	6	8
10–19	17	12	15	13	9	8	10	7	11	6	7	6	5	3	4	3	2
20≤	15	12	10	10	11	9	6	8	3	5	4	2	3	5	3	2	2

Original table (Masako Omori, Research Institute of Tuberculosis)
Addition correction

**Fig. 1** Transition of the tuberculous meningitis patients**Table 3** Preventable cases
(Dept of Pediatrics, Osaka Prefectural Habikino Hospital)

	95 cases (1985–1992)	86 cases (1993–2001)
Preventable case	29 (31%)	26 (30%)
Insufficiency of family examination	19	13
Leaving children converting to TST positive	4	5
Preventive therapy interruption and irregular	6	5
Diagnosis delay	—	3

Preventable cases: If the health medical treatment (family examination and diagnosis) for infant had done appropriately, many cases would have been able to prevent from developing the diseases.

TST: Tuberculin Skin Test

死亡率はむしろ増加傾向であった (Fig. 1)⁵⁾⁶⁾。これは、発見が大幅に遅れ、昏睡や広範な麻痺で診断される症例が未だ後を絶っていないことを示しており、患者が医療や健康状態に関心を持ち難い社会層に偏在していることを反映している。また、発病予防可能例の検討では、1985年から1992年に当科で診療した95例では29例(31%)が発病予防可能例(予防可能例とは、もし小児に実施された保健医療—家族接触者検診や診断が適切であれば発病を免れていた可能性が存在する症例)であったが、1993年から2001年の86例においても26例(30%)が発病予防可能例であった (Table 3)⁵⁾⁷⁾。厚生省は1992

年に定期外検診ガイドラインを定め家族接触者検診を強化したが、そのガイドライン普及後の症例でも、ガイドライン作成前と同様の割合で発病予防可能例が生じていることに注目すべきである。以上のことは患者が社会的に困難を抱える者で、より対策が届きにくい層に偏在していることを示している^{8)~10)}。従来の集団的一律的対応から、このような困難を抱える社会層・ハイリスク者層にまで効果のおよぶ対応に結核対策を強化しなければならない。

2. 小児結核の特徴

(1) 発病リスクの高さ

小児結核はほとんどが感染に引き続いて発症する一次結核症であり、感染後の発病率が高く、重症化しやすく、さらに感染後発病までの期間が短いという特徴をもつ。また、小児とりわけ乳幼児期に感染を受けた者の発病リスクがきわめて高いことが特徴である。感染者の中での発病率は、ニューヨーク市衛生局の1995年の勧告によると¹¹⁾、乳児期は50%、1～5歳児では25%（感染後1～2年以内）、11～15歳では15%と示されている。一方、健康成人は生涯にわたり約10%といわれている（ニューヨーク市衛生局、小児結核予防専門家研究班勧告）。また、小児肺結核患者の死亡率が高い。1951年Lincolnは622例の無治療初期肺結核症児の予後を調べ¹²⁾、死亡例は149例（24%）にも上り、とりわけ、1年以内に90%が死亡していた。年齢別では、6カ月未満で診断された乳児は50%以上が死亡、1～2歳で診断された者は28%が死亡、4～6歳で診断された者は14%が死亡と報告し、当時の全米の小児科医たちが「小児が無視されており、INHの化学予防導入による発病予防策の強力な実施」を求める契機となった。

このように小児とりわけ乳幼児の感染者は、その発病、重症化リスクの高さから発病を阻止されなければならない。小児は肺結核を発症しても多くは無症状であり、発見が遅れ重症化することが多い。また、小児は化学予防の効果が高く副反応が少なく^{13) 14)}、積極的に化学予防すべきである。成人では患者が早期発見されれば患者本人も治療し周囲への感染防止も可能となるため必ずしも感染者の発病予防は重要視されないところがある。しかし、小児では一度発病すれば重症の髄膜炎や死亡に至ることも少なくなく、感染者である段階で発見し、化学予防で

発病を未然に防ぐことがきわめて重要である。すなわち、「小児結核は予防しなければならない」という原則を確認することが重要である^{13) 15)}。

近年の小児結核の研究においても、「われわれはいったいどれくらいの小児結核を受け入れればいいのか？ すべての小児結核症例は公衆衛生での予防の失敗によるものであり、この問題を解決するのに必要で十分な資金を要求すべき政治的意思の欠落によるものである」¹³⁾や、「小児結核は予防可能であることが明らかになり、1980年から現在までの小児結核の研究から、結核対策がよりよく機能した場合は25%～40%の小児結核症例が予防できる可能性があったことを立証している」¹⁵⁾との評価を再確認すべきである。

(2) 診断上の特徴

小児の肺結核では、ほとんど空洞を形成しないために病巣内の結核菌量が成人と比して少なく、成人なら喀痰を検体材料とすれば容易に結核菌を確認できるものが小児では喀痰が採取しにくく、また、胃液を使用しても菌検出率が悪くなる特徴をもつ。小児結核の診断は成人結核に比して細菌学的もしくは組織学的に確定されることが困難なことが多く、通常感染源の結核患者との接触機会、ツ反による感染の証明、胸部X線などの結核を考えさせる画像所見、喀痰や胃液からの結核菌の証明、BCG接種による獲得免疫の程度や年齢など個体の抵抗性などの疫学的・臨床的情報を総合的に判断して、さらに場合により治療への反応を考慮してはじめて可能になる¹⁶⁾ (Table 4)。

小児結核の発見動機は、第1に、結核患者発見時の接触者検診時であり、全体の約3分の2から4分の3を占める。この際の特徴は、診断は比較的容易だが、感染源との濃厚な接触により感染発病のリスクが高くなることである。第2に、持続する咳、熱などの有症状受診時で

Table 4 Method of diagnosing childhood TB

It is necessary to diagnose the patient overall.

-
- A: Exposure to tubercle bacilli and Infection
 1) Contact with source of infection
 2) Tuberculosis infection confirmed by tuberculin test positivity
- B: Disease
 3) Proof of bacterium: Sputum, gastric juice, pleural effusion, and cerebrospinal fluid, etc. (Histology proof is included.)
 4) Diagnostic imaging: Confirmation of image findings of tuberculosis (It is confirmed that the radiograph image doesn't change for a short term. as a reference.)
 5) Clinical conditions and physical findings (fever, cough, and expectoration, etc.)
 6) Inflammation (number of White Blood Cell, CRP, and Blood Sedimentation Rate)
- C: Consideration of individual protection (consideration of attack risk)
 5) BCG vaccination: Confirmation of vaccination record and scar
 6) Younger age and weakness of immunity
- D: Presence of reaction to treatment
-

の発見や、住民検診時のツ反自然陽転時、他の理由で撮影された胸部 X線が発見のきっかけとなることもあり、全体の4分の1から3分の1を占める。このときには診断は多くは総合的に診断されることが多い。いずれにしても小児結核が減少した現状では小児結核の診断は多くの場合、情報を丁寧に集め総合的に判断するために個別の診療の場でしか実施しえないのが現状であり、学校健診等の集団の場での小児結核の診断は困難であるのが現実である¹⁷⁾。

3. 今回の政策転換の内容と課題

今回の結核部会の報告で指摘された小児における主要な結核対策の変更点は、BCG接種に関して再接種を中止し、乳児期に直接接種を導入し初回接種を徹底し、小学校と中学校での結核定期健康診断—いわゆる学校健診を廃止することである。

本稿では、BCG直接接種導入と学校健診の廃止に関して述べ、BCG初回接種の評価や再接種の廃止問題は第77回総会シンポジウム—結核対策のブレイクスルー「BCG政策」で報告した¹⁸⁾ので参照されたい。

(1) わが国における BCG 直接接種の導入

今まで、ツベルクリン反応（以下、ツ反と略す）をまず行い、結核感染の有無を判定し、感染がない者についてのみ BCG 接種をするという方式が取り入れられてきた。その理由は、①既感染者または有効な BCG 接種を過去に受けた者には BCG 接種（再接種）の必要がないこと、②既感染者に BCG を接種すると比較的強い副反応が現れることがあると考えられたこと、③ツ反結果が附随的に、結核感染の健診としても有効であると考えられたこと²⁾であり、WHO においても 1950 年以降、ツ反と BCG 接種の組み合わせを推奨していた。（しかし、近年、WHO はツ反を先行することは推奨しないとの立場に転じている）^{18) 19)}。わが国では、近年、①若年者の結核感染率が極端に低下したため、初回ツ反時全員が BCG 接種対象者という過言ではない状態に至っていること、②既感染者における BCG 副反応は未感染者に行うときと比してそれほど強いものではないことが WHO などの研究や経験からわかったこと、③患者を発見する手段としてツ反を用いる健診の価値は近時の罹患率低下によって急速に減じて、むしろ、健診によってもたらされるツ反偽陽性者への結果的に必要以上の精密検査や予防投薬による問題の比重が高まるという状況の変化があった。これらにより、ツ反と BCG 接種の組み合わせにとられることなく、ツ反の問題と BCG 接種の問題は分離して論議すべきと考えられるようになった。

乳幼児期の BCG 接種前のツ反を廃止することの利益は、第 1 に、全国で現在初回接種を受けている約 120 万

人の接種者の負担軽減である。接種時の受診回数が 1 回に減じるため、受診する住民側にも、接種機会を提供する行政側にも大きな時間的、財政的、人的資源等の面で負担が軽減され利益が生じる（当然にも節約された利益は小児結核対策の強化に振り向けられるべきである）。第 2 に、ツ反判定時、BCG 接種機会が失われていた者への接種機会が増加することである。すなわち、現在、乳幼児期の BCG 接種前にツ反を実施しているが、1 年間で、ツ反判定時、BCG 接種時に未受診のため漏れる者が約 43,000 人、初回ツ反が陽性で再ツ反に回るため、そこで再ツ反判定や BCG 接種時に漏れる者が約 1,500 人で、合わせて約 44,500 人の乳幼児が接種の機会がなくなっている²⁾。この者たちの中でツ反陽性者は、多くが偽陽性者で、真の結核感染者である自然陽転児は少数である。（自然陽転児数は、BCG 初回接種が乳児期に接種されると仮定すると、年間感染危険率が 0.05% と推定されているため、120 万人の乳児中の自然陽転児は 600 人となる）。したがって、大多数の小児には直接接種が可能であり、現状では小児全体の負担はできるだけ軽くし、ハイリスク者に必要な対策を絞るように配慮がなされるべきであると考ええる。

乳幼児期の BCG 接種前のツ反を廃止することの不利益は、この BCG 接種前ツベルクリン反応で発見されていた自然陽転児が発見機会を失い、自然陽転児の発見が遅れることである。すなわち、直接接種の導入は「自然陽転児の発見機会の消失」と引き替えに実施されるといっても過言ではない。したがって、自然陽転児の発見が遅れ重症化に至ることを防ぐためには、①直接接種はできるだけ早い時期に実施すること、原則 6 カ月までの実施で遅くとも生後 12 カ月までに実施すること（早期に BCG 接種が実施されていれば、その後の結核感染時に

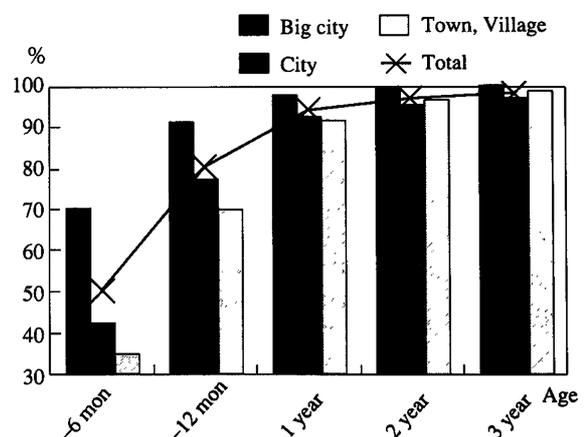


Fig. 2 Age distribution of patients with tuberculin skin test execution rate (tuberculosis urgent investigation of actual conditions in 2000, 1,198,602 peoples)

発病予防効果が期待できるため), ②成人結核患者の早期発見に向けた対策が強化されること, ③BCG直接接種時の問診でBCG接種者の家族周辺の結核患者の有無について問診が実施されることが必要である。

ツ反実施者の年齢分布では, 平成12年結核緊急事態調査²⁰⁾では, 「4歳までの初回ツ反は, ほぼ全員に行われていると推定されたが, 1歳までが80.5%であった」と報告されている (Fig. 2)。内訳は, 都区・大都市 (小児人口413,926人, 自治体数72) では, ツ反実施率が高く (0歳児91%), かつ, ツ反検査設置回数も多く (平均年84.9回), 一方, 町村 (小児人口240,902人, 町村数2,515) では, ツ反実施率が低く (0歳児69.9%), ツ反検査設置回数が少ない (平均年3回) という特徴がある。直接接種導入に際して接種率が高く維持されるよう, 接種方法や接種期間の設定, 未接種者対策など十分な配慮が必要である。

(2) 学校健診の廃止

結核予防法施行令の一部を改正する政令 (施行日: 平成15年4月1日) によって, 小学校1年生, 中学校1年生の定期健康診断 (ツ反とそれとセットになっているBCG接種) は廃止になった。一方で, 学校保健法施行規則の一部改正によって, 学校保健法上は学校健診における結核の有無の検査でツ反が廃止になり, 代わって結核に関する問診項目が加えられ, 検査の実施学年も小1, 中1を含む全学年が対象になった。以上のように現状では学校健診は結核予防法上は廃止, 学校保健法上は存続と2法の間で乖離した状況となっている。

現在の学校健診における患者発見状況は, Fig. 3 (大

森作成による) に示すように患者発見率がきわめて低い³⁾。すなわち, 2000年の学校健診発見率は中学校1年生では, 10万対3.13 (0.00313%) ときわめて低く, 効率の悪い健診となっている。同様に小学校1年生でも発見率は10万対1.03 (0.00103%) と中学校に比べさらに低い。現状ではほとんど偶然に患者を発見しているのが実情といえる。西ドイツは0.04%, イギリスは0.02%以下の発見率になったら結核集団検診は中止するというのが, それぞれの国の委員会が検討を行って到達した結論であるといわれている²¹⁾。また, 実際に学校健診で発見された患者は菌陽性患者をほとんど認めないのが特徴である。すなわち当科の1985年から2001年までの17年間の181例中, 学校健診で発見される患者は12例 (6.6%) 存在したが, 菌陽性者は1例のみであった。このように学校健診発見例は軽症例が多く, 発見が遅れる場合以外は周囲への感染の可能性は小さいと考えられる。

以上から, 年間約十数人の患者を発見するために120万人に定期健診としてツ反を行うことは, 効率的ではなく学校健診は廃止すべきである。学校健診廃止—ツ反の廃止により, ①結核に感染していないにかかわらず, ツ反が強陽性のために行われている必要以上の精密検査や予防投薬の削減, ②人的, および経済的負担の削減が期待される。一方, 少数の学校健診で発見されている患者に対しては, ①主な感染源である成人結核患者の周囲の接触者検診の徹底, ②定期外の集団感染対策の強化, ③有症状で医療機関受診時の結核診断能力の向上, で対処すべきである。この政策転換は, Table 5²¹⁾ に示すように, 患者発見方法において, 全員を対象とした集団的一律的

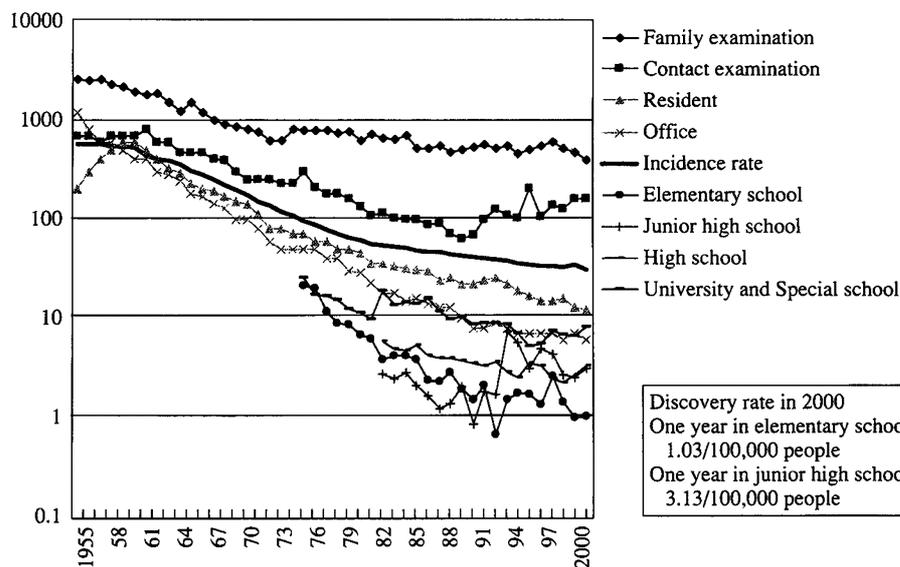


Fig. 3 Transition of discovery rate of school examination (1975–2000)

The original table (Masako Omori, Research Institute of Tuberculosis)

方法からハイリスク群・デインジャー群に対しての個別的重点的方法への転換といえる。

4. 今後の小児結核対策の課題

小児の結核の蔓延状況が改善し小児結核患者数が減少したとはいえ、小児の健康問題は重大な問題であり、今回の改定に際し小児結核対策の後退があってはならない。BCG再接種を廃止し、学校健診を廃止し、集団的一律的に実施されてきた小児結核対策を転換するにあたっては、ハイリスク者に対して一層個別的な重点的な強化策が実施されねばならず、小児に対して十分な安全を確保しなければならないのは言うまでもない。以下に今後の小児結核対策の課題を述べる (Table 6)。

(1) 成人結核患者からの感染機会の減少 (第一義的予防)

小児の結核感染防止は、成人結核患者からの感染機会を減少させることで最もよく実現されるため、成人結核患者を早期に発見し、治療を完了するまで支援することが小児における感染予防の第一義的方法である。最近のDOTS戦略の徹底により感染源になりうる成人結核患者の減少を期待したい。

(2) 迅速で徹底した接触者検診の実施、化学予防の徹底

しかし上記の「小児結核を予防する最良の方法は成人結核の治療と予防である」との考えは、小児を対象とし

て感染と発病を診断し治療するという小児独自対策が重要であるという意見を否定するものではない。実際に当科症例の検討では1985年から1992年に診療した95例では29例 (31%) が発病予防可能例であったが、厚生省が1992年に定期外検診ガイドラインを定め家族接触者検診を強化した後の1993年から2001年の86例においても26例 (30%) が発病予防可能例であった (Table 3)。ガイドライン普及後の症例でも、ガイドライン作成前と同様の割合で発病予防可能例が生じているのが大阪における実態である。また、米国の80～90年代の小児結核患者をまとめたStarke¹⁵⁾やSnider¹³⁾らの成績によれば、小児結核患者の25%～40%が発病予防可能例であり、そこでの問題点は、必要な症例に対する化学予防の未実施や患者の化学予防の中断、接触者検診の不徹底等であったという。わが国で早急に全国の保健所、医療機関で小児に実施されている接触者検診を再点検、再評価し、発病予防可能性の分析を行う必要がある。具体的には、感染源の治療は適切に実施し完了していたか、診断の遅れはなかったか、保健所への報告 (発生時、菌情報把握時) は迅速であったか、接触者検診は迅速に徹底して実施されていたか、必要な症例に対して化学予防が実施されていたか、化学予防の中断がなかったか等に関して地域で検討し、どのタイプの問題がどの程度地域で生じているかを検討することが必要である。また、この発病予防可

Table 5 Method of discovering TB patients

1. Passive patient discovery: Consultation person due to respiratory symptoms
2. Active patient discovery:
i) Selective examination
(1) High risk group examination
Contact examination and Family examination
Medical examination of employee of medical institution and of the having symptom
(2) Danger group examination
Medical examination of school personnel
Medical examination of the facilities staff who accommodates infants
ii) Mass screening intended for all members
Resident medical examination, Office medical examination, and School examination

Table 6 What is power to decrease the number of patients?
Problem of the childhood tuberculosis measures

1. A decrease in infection chance from adult TB case (The first prevention)
2. Execution of early and promptly contact examination
Thoroughness in chemoprophylaxis
Cooperation of medical institution and public health center
3. Improvement of tuberculosis diagnosis ability
4. Thoroughness in BCG first time vaccination
Do not cause a decrease at the direct BCG vaccination rate at the vaccination introduction.
5. Establishment of system of childhood tuberculosis surveillance and original childhood case registration style

能例の検討は、小児患者とその家族に直接利益をもたらすとともに、その地域の公衆衛生的見地からも利益をもたらす。すなわち、地域の結核感染—発病の連鎖を確認させ、その地域の予防対策の質が改善される必要性を示し、地域の結核対策の強化に寄与するのである。

(3) 結核診断能力の向上

当科症例の診断における問題点²²⁾は、慢性の経過をたどる感染症で一般抗生剤に反応がない場合に鑑別診断の1つとして結核が考えられていなかったために髄膜炎や粟粒結核等の重症の結核症に至った症例や、周産期の母親や職員の結核の診断が大きく遅れたために重症化し、かつ集団感染に至った症例が後を絶たないことである²³⁾。たしかに小児結核の診断は成人結核に比して細菌学的もしくは組織学的に確定されることが困難なことが多く、疫学的・臨床的情報を総合的に判断して、はじめて可能になる¹⁶⁾。しかしながら、症状は非特異的であり、ツ反や胸部レントゲン所見は解釈が必ずしも容易でなく、診断には臨床経験に裏打ちされたトレーニングが必要となる。現在の研修システムでは若い小児科医が研修中に小児結核患者を診療する機会が少なく、これではいつまでも臨床医の「結核不得手」はなくなり、診断の遅れもなくなると考える。小児結核患者が存在する大都市部地域の一般病院で小児結核患者を診療できるよう感染症を診療する病棟に結核感染防止用の陰圧換気が可能な病室を整備し、一般の小児感染症の診療の中で結核診療が可能となるよう施設整備し診療体制を強化することが必要である。そのような中で初めて小児結核患者の診療ができる臨床医を広範に育てることが可能となる。

(4) BCG 初回接種の徹底

上述のとおりである。

(5) 小児結核サーベイランス体制の強化

BCG再接種や学校健診を廃止したことにより小児結核の発生が変化しないか、今後の動向に注目した長期間の検証が必要である。今回の改定が発生動向に及ぼす影響を詳しく観察するために、小児結核の全国レベルでの監視(サーベイランス)を強化する必要がある。また、小児結核、とりわけ重症な髄膜炎や粟粒結核児については全例の症例分析を行い、診断や治療の妥当性、発病要因、予防可能性等について継続的な検討が必要である。そのために小児結核症例独自の登録様式の開発が求められる。

5. まとめ

今後の小児結核対策は、従来から実施されてきた集団的一律的対応から個別的的重点的対応—「結核患者が発見されれば、その周辺で接触者検診を徹底し、感染小児を

発見し化学予防で発病を未然に防ぐこと」に重点が移行する。また、医療機関受診時に結核の診断の遅れがないように診断能力の向上が重要である。以上は、1医師や1医療機関の努力では達成不可能なことが多く、国や行政の積極的関与が必要になってくる。結核対策は歴史的にも他の感染症や癌検診などの対策の先進例となってきた歴史が存在し、その上からも科学的根拠に基づき国民に理解される政策転換が求められていると考える。

謝 辞

BCG接種政策や小児結核対策の転換をはじめとし多くの機会にご指導をいただきました結核研究所所長の森亨先生、膨大な結核病学を分かりやすくご教授ご指導下さった結核予防会会長の青木正和先生、小児結核の統計解析やサーベイランスでご指導を頂きました結核研究所の大森正子先生をはじめとした諸先生方、さらに、調査研究の現場において多大なご理解ご協力をいただいた大阪府健康福祉部地域保健福祉室感染症・難病対策課(旧保健衛生部保健予防課)、保健所をはじめとした保健医療関係者の方々に深謝申し上げます。

ここに掲載した調査研究は当科に在籍した豊島協一郎、林田道昭、丹羽久生、井上寿茂、佐野哲也、馬場美子、梶川邦子、笹井康則、村山史秀、松下彰宏、堀本れい子、丹野 仁、佐藤 東、金田一孝、北川浩久、安浪純、吉田之範、西川嘉英、亀田 誠、土居 悟の諸先生方との協力の下で行われた。

文 献

- 1) (厚生労働省) 厚生科学審議会感染症分科会結核部会報告:「結核対策の包括的見直しに関する提言」, 2002年3月20日。
- 2) (厚生労働省厚生科学審議会) 結核部会・感染症部会の共同調査審議に係る合同委員会報告. 2002年6月5日。
- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課監修:「結核の統計2002年版」. 財団法人結核予防会, 東京, 2001。
- 4) 大森正子:小児結核のサーベイランスと今後の発生動向. 小児看護. 1999; 22: 1433-1439。
- 5) 高松 勇:BCG再接種廃止, 学校健診廃止に際して—小児結核対策転換期の課題. 日本小児呼吸器疾患学会雑誌. 2002; 13: 115-130。
- 6) 高松 勇:第77回日本結核病学会総会シンポジウム I, 結核対策のブレイクスルー, BCG接種の方向. 結核. 2002; 77: 190。
- 7) 高松 勇:平成14年度厚生科学研究費補助金新興再興感染症研究事業「再興感染症としての結核対策確立に関する研究」森班 新しい結核対策のあり方に関する総合検討会. 第2グループ「予防接種・化学予防」討議資料による. 2002. 8. 11-12。
- 8) 吉田之範, 西川嘉英, 高松 勇, 他:平成12年に当院

- に入院した小児結核症例の問題点. 第14回近畿小児科学会(2001.3.4.)プログラム・抄録集. p29.
- 9) 永井仁美, 高松 勇: 予防接種, 検診の改変からみた小児結核の予防可能性の検討「大阪地区における小児結核例の検討」. 厚生科学研究, 新興・再興感染症研究事業「再興感染症としての結核対策確立のための研究」. 平成13年度総括・分担研究報告書.
 - 10) 高松 勇, 大森正子, 和田雅子: 大阪小児結核患者調査報告. 結核. 2002; 77: 282.
 - 11) New York City Department of Health Bureau of Tuberculosis Control. Prevention and Control of Pediatric Tuberculosis in New York City: Recommendation of the Expert Advisory Panel. 1995.
 - 12) Lincoln EM: The value of follow-up studies of children with primary tuberculosis. *Am Rev Tuberc.* 1951; 64: 499-507.
 - 13) Bloch AB, Snider DE: How much tuberculosis in children must we accept? *Am J Public Health.* 1986; 76: 14-15.
 - 14) Center for Disease Control: Screening for tuberculosis and tuberculous infection in high risk populations and the use of preventive therapy for tuberculous infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee for Elimination of Tuberculosis, *MMWR* 39 (no. RR-8): 1-12, 1990.
 - 15) Starke JR: Childhood tuberculosis: ending the neglect. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002; 6: 373-374.
 - 16) 高松 勇: 小児結核. 臨床画像. 1998; 14: 28-37.
 - 17) 高松 勇: 第106回日本小児科学会学術総会 小児呼吸器セミナー抄録. 日本小児呼吸器疾患学会雑誌. 2003; 14: 219-224.
 - 18) WHO Technical Report series No. 290, WHO Expert Committee on Tuberculosis, Eighth Report, WHO, Geneva, 1964.
 - 19) WHO Technical Report series No. 552, WHO Expert Committee on Tuberculosis, Ninth Report, WHO, Geneva, 1974.
 - 20) 厚生労働省: ツベルクリン反応検査及びBCG接種に関する調査. 平成12年度結核緊急実態調査報告書.
 - 21) 青木正和: 「結核患者発見方策—結核健康診断の今後のあり方—」. 結核管理技術シリーズ12]. 結核予防会, 1982.
 - 22) 高松 勇: 小児結核の現状と治療. 結核. 1999; 74: 365-375.
 - 23) 高松 勇, 亀田 誠, 井上寿茂, 他: 病院患者間の結核集団感染. 結核. 1999; 74: 397-404.

————— The 79th Annual Meeting Educational Lecture —————

PROBLEM OF CONVERSION PERIOD OF CHILDHOOD TUBERCULOUS MEASURES

Isamu TAKAMATSU

Abstract An inclusive review of the tuberculosis measures including the tuberculosis control law was proposed, and the discontinuation of BCG re-vaccination and school medical examinations was executed in pediatrics area in the year 2003. Moreover, single time vaccination for infants is basic, and the direct BCG vaccination is introduced as a rule. The childhood tuberculosis measures are exactly at a turning point. A group and uniform care which we have executed so far is inefficient. A basic idea of the revision is to introduce an individual and intensive care for high risk and dangerous groups first of all, and to convert to the efficient measures. We have to enhance the contact examinations, administer chemoprophylaxis to patients thoroughly, improve the quality of medical treatments, ask medical institutions to examine symptomatic persons, and

strengthen the system of childhood tuberculosis surveillances.

Key words: Tuberculosis in children, Tuberculosis measures, BCG vaccination, Preventable case, Contact examination, Chemoprophylaxis, Tuberculous meningitis

Department of Pediatrics, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases

Correspondence to: Isamu Takamatsu, Department of Pediatrics, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, 3-7-1, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583-0872 Japan. (E-mail: isamu-t@hbk.pref.osaka.jp)

第79回総会教育講演

世界の結核問題にいかに関わるべきか

—国際協力の課題と実践—

石川 信克

キーワード：世界の結核，国際協力，DOTS，JICA，Stop TB

はじめに

結核は世界で年間200万人近くの死亡，800万人を超える新発生が推定され，HIV/AIDS，マラリアと共にこの先数十年間は，疾病負担 (Burden of Disease) の上位を占めることが推測されている¹⁾²⁾。結核を含む感染症は途上国の死因の半数を占め，人々の苦痛や負担を引き起こすばかりでなく，社会経済的な損失を引き起こし，社会発展を脅かしている。結核はなぜ急速に減らすことができないのであろうか。技術的・理論的には撲滅可能であるのに，様々な障害因子が考えられる。すなわち，①慢性感染症としての特異性，②社会・経済的不安定や貧困，③HIV感染の流行，④不十分な保健基盤，⑤不適切な結核対策などである。この中で最も大きなものが最後の不適切な結核対策である。これに対してWHOはDOTS戦略 (後述) を提唱し，世界的な展開を行っている。

私の原点：バングラデシュ草の根協力
25年の体験より

このDOTSは様々な試行錯誤の歴史の中で生まれてきたもので，決して安易にそして容易に出てきたものではない。DOTS出現前夜も含め，まず私自身の試行錯誤の歴史から述べる。私は1978年，日本の国際保健医療協力の草分けともいえるべきNGO日本キリスト教海外医療協会 (JOCS) ワーカーとしてバングラデシュに派遣された。最初の3年間は語学の研修をはじめ，「限りなく人々の近くに行く (go to the people)」をモットーに巡回診療をしながら草の根の人々の健康問題に取り組んだ³⁾。

次の3年間では，現地結核予防会に出向し，民間組織のアドバイザーとして働くことになった。この頃は岩村昇氏よりプライマリ・ヘルスケア (PHC) の世界的潮流の中で，PHCレベルの結核対策のモデルづくりを遠くない地域でやってみるよう助言された。「もう君自身が村の奥まで行かなくていい，ダッカにいて，地域住民参加型結核対策 (Community based TB Program) のフィールド研究をやってみるよう，そうすれば，人々が君の所に助言を求めてやってくる」と言われた。正直言って何をどうすればいいか分からなかった。

〔マニクガンジ垂郡における結核実態調査〕

たまたま日本の文部省地域研究で来られたK博士の要請により農村地域で結核実態調査を実施した。純農村地帯で，BRAC (バングラデシュ農村開発委員会：NGO) が活動していた人口12万人のマニクガンジ垂郡において有症状者の喀痰検査により有病率の算出をすることになった。細菌検査はK博士が，標本抽出と計算は私が担当した。この結果24人の結核菌 (培養) 陽性が出て，有病率は0.35%と推定された (Table 1)。

〔地域住民参加型結核プログラムの試行〕

この地域には既に200人の保健ボランティアが地域の簡単な治療や保健指導をする仕組みができあがっていたが，結核は手つかずだったので，上記発見患者の治療を彼らに任せながら，それ以降の患者発見も含めたCommunity based TB Programを試行することになった。機会 (チャンス) はねらっていれば向こうからやってくることを体験した。マニクガンジにおけるこのプログラムの試行は，大きな成果を上げた。当時はまだ国全体の結核対策も脆弱で，DOTSなる概念も導入されておらず，一

Table 1 TB Prevalence Survey in Manikganj Sub-District (1984)

Area:	Rural area 50 km west to Dhaka
Target Population:	120,000 in 187 villages
Sample Population:	6,936 in 50 villages over 14 years of age
Methods:	Bacteriological examination of the sputum for the TB symptomatics
Results:	Symptomatics 1,405, Sputum examined 835, Culture positive 24 Estimated prevalence of TB 0.35%

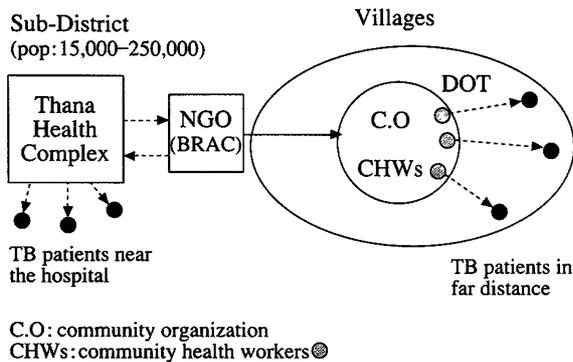


Fig. 1 BRAC Model (Bangladesh)

Table 2 TB in the World (2002)

TB deaths/year	1.8 million (200/h)
New cases/year	8.7 million (141/100,000)
Infected population	2 billion
MDR-TB	3.2% of New cases
HIV+TB	0.38 million

(WHO, 2004)

地域の NGO による試みが国全体にいかなる影響を与えることができるか、分からなかった。しかし後述するように当初の予想を超え、ここで開発されたシステムが BRAC モデルとして国全体の中で大きな役割を果たすことになる。すなわち、地域末端にいる結核患者の発見・治療を村の保健ボランティアを通じて行うシステムである⁴⁾ (Fig. 1)。

WHO による DOTS の開発と展開

1980年代の後半、WHOで新しく結核の責任者になった古知新博士は結核の世界戦略として DOTS (Directly Observed Treatment, Short course) なる概念を開発した⁵⁾。この方式は従来 IUATLD の Styblo 博士等によってアフリカ諸国などで開発されていたものであったが、古知氏が世界戦略の方式として発展させた。すなわち、①政府(トップ)が結核対策を重要政策として位置づける、②有症状者の喀痰検査による患者発見、③短期化学療法による直接服薬確認(DOT)、④患者の登録台帳、検査台帳の整備と定期的なモニタリング、⑤抗結核薬の安定供給で、これらがきちんと展開されれば患者の治療率の向

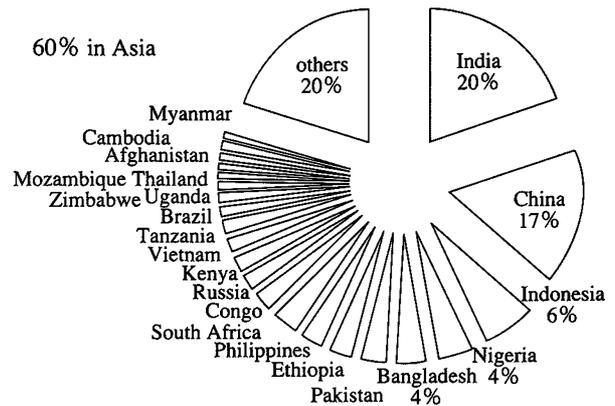


Fig. 2 22 TB High Burden Countries occupy 80% of Global 8.7 million New Cases (WHO, 2004)

上と罹患率の減少が期待される。現在 WHO を中心に様々な国際組織が Stop TB の名の下で世界的な DOTS の展開に努めている。しかし2002年で世界の180カ国、新発見患者の半数、推定患者の30%程度がDOTS下にあるにすぎず、早急なDOTSの拡大が望まれている⁶⁾。一方、DOTSの拡大を阻む脅威も生まれてきている。それは HIV の流行、多剤耐性結核の増加、保健制度改革 (health sector reform) 等である。

世界の結核の現状と課題

世界における2002年の年間結核死亡数は180万人(時間当たり200人)、新発生結核患者870万人、感染者20億人、新患者中の多剤耐性患者3.2%で、結核は働き盛りを襲う最大の成人感染症と言える (Table 2)。国による偏りとしては22カ国が8割を占め、結核高負担国 (high burden countries) と呼ばれる。その6割以上がアジアに、高罹患率国はまずアフリカ、次にアジアに集中している⁶⁾⁷⁾ (Fig. 2)。

HIV の流行により世界の HIV/TB の二重感染者は1200万人と推定され、サハラ以南のアフリカ諸国 (70%)、インド等の南東アジア (20%)、南アメリカ諸国 (5%)、タイ、カンボジア、ミャンマー等の ASEAN 諸国で深刻である。これらの国々 (またはその一部) では結核発病数も年々増加しており (Fig. 3)、DOTS による治療が良好に行われても治療中にエイズで死亡する割合が増加し

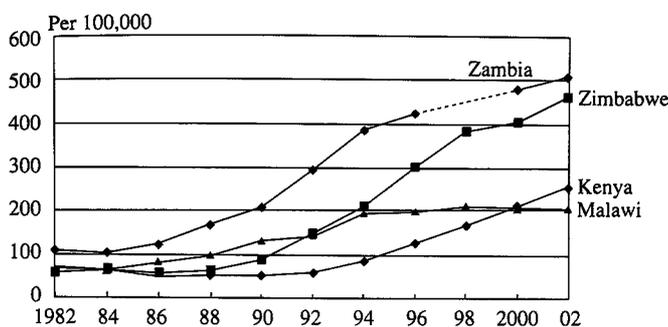


Fig. 3 Trends of TB Incidence in African Countries (WHO, 2004)

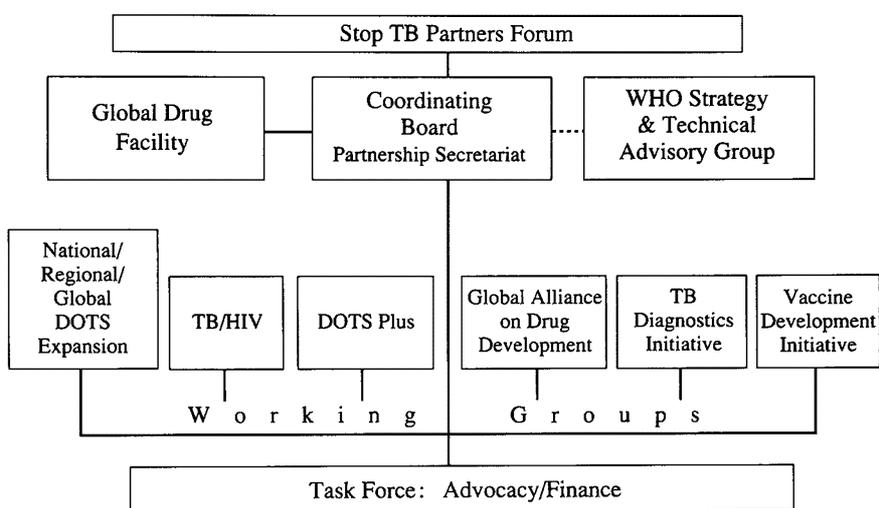


Fig. 4 Stop TB Partnership (WHO, 2004)

ており、結核対策に抗ウイルス剤によるエイズ治療 (ART) を取り入れることが緊急の課題となってきた。逆に DOTS はこのように他の感染症対策や公衆衛生活動の入り口ともなりつつあると言えよう。

多剤耐性結核の増加は DOTS の拡大とその質の低下に伴い、避けて通れない現象でもある。一部の途上国やロシア・旧ソ連諸国では初回治療患者の 5～10% 以上と深刻である⁸⁾。その主要因は結核対策の不備によると考えられ、いたずらに多剤耐性の治療に莫大な費用と労力 (通常患者の 50～100 倍) をかけないで DOTS を推進していくことが WHO の主方針であったが、地域によっては、それでは間に合わないで、DOTS Plus という多剤耐性結核治療の方式が導入されつつある。

未だ達成に遠い結核対策の目標

DOTS が実質的な効果を上げるためには、まず発見患者の 85% を治療させること、推定患者の 70% を発見することが達成されねばならない。2002 年の段階で、世界 210 カ国中、190 カ国が DOTS を国策に取り入れてい

ること、平均治療成功率が 83% に達したのは良いとしても、患者発見率は 37% であり、2005 年までにこれらが達成される見通しは低くなったと言える。しかし早急に 7 割以上の患者を発見せねば対策の効果は期待されない。

そのために WHO を中心に Stop TB Partnership が結成され、世界的な連携が強化され始め、6 つのワーキンググループによる個別の検討がなされている (Fig. 4)。一方、世界的基金 Global Fund の設置により、薬剤供与や開発も含め、世界的な結核や感染症のための支援が強化されつつあり、わが国も多額の拠出が行われるようになった。さらに政治的関心を維持するため、3 月 24 日を世界結核デー (World TB Day) として各国、地域で行事が催されている。2004 年の標語は「呼吸するたび唱えよう、ストップ結核! (Every breath counts – Stop TB Now!)」。結核対策は息の長い取り組みが必要で、このためにはどうしても社会的、政治的関心の喚起 (アドボカシー) が必要で、この部門もワーキンググループの 1 つにされようとしている。これらの動きは WHO, G8,

Table 3 Global Targets for TB Control

<ul style="list-style-type: none"> World Health Assembly 2005 targets (WHO): to detect 70% of smear positive cases to treat successfully 85% of all cases G8 Okinawa Summit 2010 targets (G8): to reduce TB deaths and prevalence of the disease by 50% by 2010 Millennium Development Goals 2015 targets (UN): to have halted by 2015, and begun to reverse, the incidence of priority diseases (including TB)
--

国連などの政治的目標に基づいて進められている (Table 3)。

日本の行う結核支援

日本の結核分野の国際協力の歴史は既に1960年代より始まる⁹⁾。国際研修コースも1963年より40年にわたってなされている (後述)。技術協力では、JICA (国際協力機構) によるプロジェクトが主なもので、過去40年にわたり15カ国以上の国の対策づくりに貢献してきた¹⁰⁾。アラブ連邦共和国 (1960)、タイ (1960~69)、ネパール (1965~84)、アフガニスタン (1975~79)、タンザニア (1974~78)、インドネシア (1980~88)、ソロモン諸島 (1991~96)、現在はネパール、イエメン、フィリピン、カンボジア、ミャンマー、アフガニスタン、パキスタン、ザンビア、中国で支援が行われている。モデル地区に始まり、薬剤の供与なども含め全国的なDOTSの導入と維持の支援がなされている。またWHO等国際機関との緊密な連携のもとに国際的な協力体制もできつつある。また現場での共同研究の推進による現地側人材の能力開発にも貢献しており、その国の人材や体制などの程度に応じた様々な協力が試みられている。ネパール、カンボジア、ザンビアの事例から支援の一部を紹介する。

[ネパール]

日本のネパールに対する結核支援プロジェクトの歴史は長く、世界的にも特異的である。国家対策プロジェクト (1987~2000) は、国立結核センターの建設と機能強化、DOTSのモデル開発と全国展開への支援を行ってきた。DOTSのモデル開発としては、それまで困難と考えられてきた毎日服薬管理 (DOT) を平地のタライ地区において実践してみた。実践の原則は、①平野でアクセスが良いこと (タライ地区は60%の人口が住む)、②10万人の単位 (予測患者100人程度) で行うこと、③施設DOT (薬は患者に渡さない) を徹底すること、④最初は郡病院外来のみで、徐々に末端のヘルスポストに拡大することであった。そのために、プロジェクト対象地域の西部タライ地域の中のナワルパルシ郡の3ヘルスポストを含む約10万人の地域が選ばれた。

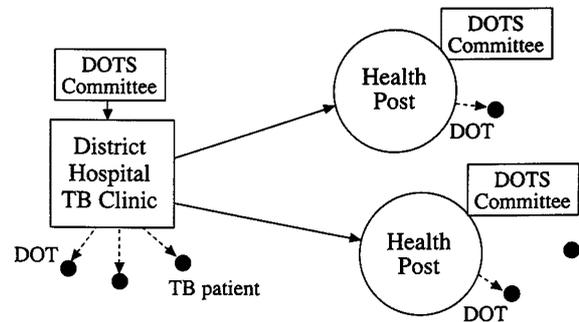


Fig. 5 Nawarparasi Model (Nepal)

この展開において私は「参加型アクションリサーチ (PAR)」を用いた¹¹⁾。これは、ある原則的な方式をフィールドに応用する場合、研究の名の下で、その方式を実践しながら、(a) 現地指導監督者、(b) 末端ワーカー、(c) 外部研究者の3つのグループが、定期的なワークショップを開いて実践上の課題を検討・解決しつつ、その地域に合ったシステムを開発していく手法であり、その過程と結果の記述が研究成果になるとともに、関係者の育成になる。

このPARはバングラデシュでDOTSの開始時に実験して有効性を確認していたので、ネパールに適応した。重要なことは、監督責任の立場にある現地の結核対策課長 (および彼の直属の部下たち) に、これは研究開発であるとして、研究者の立場でも参加してもらい、末端のワークショップに同行してもらうことにより、現場の課題を肌で理解し、解決の方策を現場の人と一緒に考える、という場を提供したことであった。ここでは、徐々に末端のヘルスポストに活動が移行された。地区組織や保健ボランティアの動員も促進され、ヘルスポストレベルでの地域DOTS委員会も形成され、ネパール式 Community based Programme が実現したと言える。JICA支援のナワルパルシのモデルは国の成功例として位置づけられ、関わった人たちが上から下まで力を付け、他の地域から多く視察者が訪れることになり、末端のヘルスポストはしばらくの間トレーニング・センターとなった。年3回のワークショップは定期的評価会 (レビューミーティング) として資金援助を受けて他の地区へも拡大されていった (Fig. 5)。

ナワルパルシ・モデルは地域の行政組織 (村議会に相当) が主体的に関わっていること、国が推進してきた保健ボランティアが活用されたことで、村の組織や末端の保健センターが弱いバングラデシュで、NGOが主体になって進めているマニクガンジ・モデルと異なる。このプロジェクトは2000年より結核と肺の健康プロジェクトとして結核対策の技術を肺の健康に広げる試みが継続

されている。

〔カンボジア〕

JICAによるカンボジアプロジェクトは1999年に開始されたが、中央結核センターの設立とともにDOTSの全国展開の中心的役割を果たしてきた。郡病院までの展開が全国的に確立してから、末端のヘルスセンターでの地域型DOTSが展開されつつある。ここでは結核対策の導入により、末端のPHCが強化されるということが起きている。

〔ザンビア〕

アフリカのザンビアでは、JICAエイズ・結核対策プロジェクトの名称で、HIVに関する検査や研究を中心に大学病院の検査室支援が行われてきた。ザンビアは国家結核対策が弱体化してしまった経緯があり、このプロジェクトに関わるようになった私は、将来のDOTS全国展開を意識して、現地民間組織と共同した地域型結核対策のモデルづくりをもくろむとともに、結核患者の8割もがHIV陽性であることやこのプロジェクトをより地域型にするため、まずDOTSを確立し、地域でエイズが治療できるモデル開発として、Community based DOTS and ARTなるフィールド研究(OR)を始めることに成功した。これが結核とエイズの専門家が共同で仕事をするモデルになることを願っている。

〔人材育成は国際協力の柱〕

結核予防会は2003年に結核研究所による結核国際研修40周年を記念する国際シンポジウムをJICA、WHOと共催で開催した。この40年間に90カ国から1800人以上の研修生を受け入れ、その多くが現在もそれぞれの国や国際機関で活躍している。早くからWHOと連携し、日本人のみでなく国際的第一人者を数名招いて行う真の国際研修で、国際的に高い評価を得てきた。人材育成は、国際協力の柱とも言えるが、それは知識や技術の伝達だけでなく、やる気や動機づけを起こさせてこそ意味がある。それは人が人から学ぶ中で、最もよくなされることを結核研究所の研修は示してきた。

〔私たちが目指しているもの〕

私たちが国際協力で目指しているものは何か。知識や技術の移転、やる気の動機づけは既に述べた。究極的なものとしては、(a)自立への支援、(b)エンパワーメント(Empowerment)、(c)問題発見解決能力の向上支援、(d)人間性向上支援(Human development)、そして最後に、(e)武器によらない平和の推進が挙げられよう¹²⁾。

結核病学会員への期待

日本の技術と経済力は地球レベルに応用する力量があ

るが、その実行は政治的な決断とそれに応募する人材にかかっている。世界的なニーズに対応するための人材は不足している。途上国こそ結核の本場と言え、結核病学会員のさらなる国際事業への参加が求められている。結核病学会国際交流委員会はそのためにも設置されている。また国際協力の基地としての結核予防会結核研究所も大いに利用されたい。関心ある方は、結核研究所(<http://www.jata.or.jp>)や結核病学会(<http://www.kekkaku.gr.jp>)にアクセスすれば情報が得られる。また世界の結核対策の動きは、WHOのホームページ(<http://www.who.int/tb/en/>)でアクセスできる。

文 献

- 1) Dye C, Scheele S, Dolin P, et al.: Global Burden of Tuberculosis. Estimated incidence, Prevalence, and Mortality by Country. JAMA. 1999; 282: 677-686.
- 2) Lopez AD, Murray CJL: The Global Burden of Disease, 1990-2020. Nature Medicine. 1998; 4 (11): 1241-1243.
- 3) 石川信克: Go to the People—人々の中へ。「地球規模で考える健康と環境—国際保健への道」, 土井陸雄編, 恒星社厚生閣, 東京, 1993, 289-360.
- 4) Islam, MA, Nakamura Y, Wonghkomthong S, et al.: Involvement of Community Health Workers in Tuberculosis Control in Bangladesh. Jpn J Trop Med Hyg. 1999; 27 (2): 167-173.
- 5) World Health Organization: What is DOTS? A Guide to Understanding the WHO-recommended TB Control Strategy Known as DOTS. WHO, Geneva, 1999.
- 6) World Health Organization: Global Tuberculosis Control, WHO Report 2004. Geneva.
- 7) 石川信克: グローバルな視点から見た結核対策・国際協力。「結核」, 光山正雄編, 医薬ジャーナル, 東京, 2001, 393-403.
- 8) World Health Organization: Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World, The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. WHO/TB/97.229. WHO, Geneva, 1997.
- 9) 石川信克, 小野崎郁史, 清田明宏, 他: 結核対策分野での国際協力. 結核の世界戦略と日本の役割. 結核. 1994; 69: 31-53.
- 10) 石川信克: 結核対策分野での国際医療協力. 保健医療分野における援助政策立案のための基礎調査. 外務省委託調査報告書(国際開発センター編). 1998.
- 11) 参加型アクションリサーチを用いた結核対策システムの開発: 「小規模社会開発評価」, アーユス NGO プロジェクト評価法研究会編, 国際開発ジャーナル, 東京, 1995, 122-131.
- 12) 石川信克: 国際保健の現代的課題. 「国際保健医療学」日本国際保健医療学会編, 杏林書院, 東京, 2001.

The 79th Annual Meeting Educational Lecture

HOW TO COMBAT AGAINST GLOBAL TUBERCULOSIS BURDEN

— Experiences and Perspectives for Japan's International Cooperation —

Nobukatsu ISHIKAWA

Abstract Tuberculosis is a global burden disease, most possibly ranking high among diseases over the coming several decades, with 2 million deaths and over 8 million new cases annually. How can TB be controlled and eradicated quickly in the world? A major answer will be the wider application of the most effective control programme, i.e. DOTS recommended by WHO. But it has been developed in the long try and error efforts, including the ones by Dr. K. Styblo of IUATLD in African countries. The key components of successful TB programme are summarised as follows, which Dr. Kochi of WHO adopted as a global policy package. They are; 1) political commitment, 2) case finding by sputum microscopy, 3) use of short course chemotherapy under supervision, 4) a secured supply of anti-TB drugs, and 5) a standardised recording, reporting and monitoring system. The targets by 2005 are set 85% cure rate and 70% detection rate. By 2002, however, only half the targets have been achieved, and global expansion of DOTS with other strategies need to be strengthened. Emerging threats are HIV epidemic, MDR-TB increase and health sector reform taking place in the world. Stop TB partnership with its office in WHO has been formed to strengthen a global capacity, mobilizing various technical and financial partners.

Japan's contribution to the global TB problem started in early 1960s. In the last 40 years, technical cooperation in national TB programme (NTP) has been made through JICA in over 15 countries, including United Arab Emirates, Thailand, Nepal, Afghanistan, Tanzania, Indonesia, Solomon Islands, Yemen, Philippines, Cambodia, Myanmar, Pakistan, Zambia, and China (TB project is on-going in underlined countries). In these projects, capacity strengthening of NTP has been given priority, including construction of national TB center, a model area development, nationwide DOTS expansion in collaboration with WHO or others, supply of anti-TB drugs, TB laboratory network with QA, collaborative operational research. An operational research for community based

DOTS and ART is newly started in Zambia under JICA project. Besides, over 1800 doctors and technologists from 90 countries have been trained at Research Institute of Tuberculosis (RIT) through its international training courses in the last 40 years. These courses are organised collaboratively with WHO or other agencies, inviting globally renowned lecturers and ex-participants, and have been reputed widely. We aim not only to teach skills and knowledge but also to motivate them to do something new. This becomes possible only through human relationship in the course.

I may need to mention about my personal commitment: First, I have worked to develop a community based TB programme model utilising village health volunteers in Bangladesh in 1980s. This system has now covered over 70% of the total patients in the country through BRAC, local NGO. Secondly, the application of participatory action research (PAR) method in introducing or expanding DOTS in Bangladesh and other countries. Staff members of NTP and local/peripheral workers participate in the trials and discuss actively in the workshops periodically. This PAR approach empowers both NTP managers and peripheral staff.

Through the international cooperation, we aim ultimately at 1) support for self-reliance, 2) empowerment (capacity building for problem finding and solution) of the people concerned, and 3) promotion of global peace without arms.

Key words: Global TB burden, DOTS, Japan's contribution, JICA, Stop TB partnership

Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

Correspondence to: Nobukatsu Ishikawa, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: ishikawa@jata.or.jp)

第79回総会シンポジウム

Ⅲ. 抗酸菌検査法の臨床への応用

座長¹一山 智²鈴木 克洋

キーワード：抗酸菌，塗抹検査，培養検査，薬剤感受性検査，核酸増幅法，血清診断，分子疫学

シンポジスト：

1. 菌塗抹法と液体培地

露口一成（独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター）

2. 液体培地や遺伝子を用いた新しい薬剤感受性試験

御手洗聡（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科）

3. 核酸増幅法と新しい同定法

高倉俊二（京都大学医学研究科臨床病態検査学）

4. 肺 *Mycobacterium avium* complex 症の血清診断

北田清悟（独立行政法人国立病院機構刀根山病院内科）

5. Molecular epidemiologic tools for tuberculosis: IS6110 RFLP, Spoligotyping, and VNTR

*松本智成，阿野裕美，高嶋哲也，露口泉夫（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター）

1980年代後半の抗酸菌同定用 DNA プローブキットの開発を皮切りに，抗酸菌の臨床細菌学はここ10年余りの間に大きく進歩した。その最大の原動力は核酸増幅法による結核菌迅速検出法の普及である。現在わが国だけで世界の核酸増幅法キットの90%を消費するまでになっている。臨床医の多くが塗抹と核酸増幅法は必要だが培養は不要との誤った認識を持っている由々しき現実もある。しかし核酸増幅法が細菌検査室に与えた影響は甚大であった。特に前処理にNALC-NaOH法を用い集菌することは，引き続き集菌塗抹法や液体培地の導入を容易にした。また各種分子生物学的手法への習熟は，薬

剤耐性遺伝子の検出や分子疫学の日常的な利用への道を開きつつある。一方血液中の抗体の存在から抗酸菌症を診断する方法も本邦を中心に研究され，現在既にLAMやTDM等の糖脂質に対する抗体を検出する2キットが保険収載されている。しかしこのような各種検査法の進歩に臨床サイドが対応しきれていないのがわが国の実情と思われる。

本シンポジウムではこのような状況を打破する一助として，塗抹・培養，薬剤感受性，核酸増幅法，血清診断，分子疫学の最新情報を，それぞれの分野に造詣の深い5人の若手臨床医に概説していただいた。露口一成氏（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター）には，抗酸菌検査の基本である塗抹・培養の最新の方法とその成績をまとめていただいた。御手洗聡氏（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター）には，液体培地や遺伝子を用いた薬剤感受性検査につき概説いただいた。高倉俊二氏（京都大学臨床病態検査学）には，核酸増幅法の最新の情報と今後の課題を講演していただいた。北田清悟氏（国立病院機構刀根山病院）には，抗酸菌の抗体診断，特に北田氏らが独自に開発した *M. avium* complex GPL core に対する抗体検出法の臨床的有用性につき詳述していただいた。松本智成氏（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター）には，IS6110 RFLP, spoligotyping, MIRU-VNTRの3法による分子疫学の臨床応用成績を詳述していただいた。

本シンポジウムにより臨床医の新しい検査法への習熟度が増加し，ひいてはわが国の抗酸菌臨床が進展するなら，座長として望外の喜びである。

¹京都大学大学院医学研究科医学部臨床生体統御医学・臨床病態検査学，²独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

連絡先：一山 智，京都大学大学院医学研究科医学部臨床生体統御医学・臨床病態検査学，〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町54（E-mail: sichiyam@kuhp.kyoto-u.ac.jp）

（Received 11 Jan. 2005）

1. 菌塗抹法と液体培地

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター 露口 一成

はじめに

近年、抗酸菌症の診断において、核酸増幅法、血清診断法などの新たな診断法が開発され、広く臨床の場で使われるようになってきている。しかし、感染症としての診断の確実性、同定・薬剤感受性検査の施行などを考えると、今なお菌の塗抹・培養法がもっとも重要な検査法であることに変わりはなく、前述の新たな診断法も、塗抹・培養法との併用のうえで使用することが原則となっている。従来わが国では直接塗抹法と、小川法による抗酸菌培養法が基本であり、感度や迅速性等の面で満足のいくものではなかったが、最近では集菌塗抹法と液体培地の導入により進歩がみられている。本シンポジウムでは、これらの新旧の検査法の比較を行い、その使い分けにつき考えてみたい。

塗抹検査法

塗抹検査は、臨床検体を塗抹して抗酸性染色を行い鏡検するもので、最も迅速な抗酸菌検査法といえる。直接塗抹法は検体をそのままスライドグラスに塗り付けて染色する方法であり、その簡便さゆえにこれまで広く用いられてきた。しかし、臨床検体は不均一であり採取部位により結果にばらつきを生じることがある。このため、再現性をよくするためにNALC-NaOH処理により検体を均一化し遠心操作を行う集菌塗抹法が用いられるようになってきた。同時にこれにより微量排菌でも検出できるようになり、塗抹法の欠点である検出感度についても改善がみられるようになった。当院での検討では¹⁾、喀痰194検体について直接法と集菌法による塗抹検査成績

を比較検討したところ、陽性率はそれぞれ34.5%、47.4%と集菌法のほうが優れていた。また、同一検体につき直接塗抹標本と集菌塗抹標本をそれぞれ10枚ずつ作製して染色を行ったところ、表に示すように、M1-M2、P1-P3の検体いずれにおいても集菌塗抹法では安定した陽性結果が得られGaffky号数のレンジの平均も少なく、再現性に優れていることが示された。集菌塗抹法は直接塗抹法に比べて手間がかかるのが欠点であるが、近年液体培地の導入に伴い、検体の前処理・集菌操作を行う必要性が生じた結果次第に広く行われるようになってきつつある。

培養検査法

従来わが国では、卵培地である小川培地による抗酸菌培養法が広く用いられてきたが、発育に時間がかかること、検出率が低いことが問題であった。液体培地はこれらの点で卵培地に比べて優れている。現在わが国では7H9液体培地を用い蛍光で発育を検出するMGIT (Mycobacteria growth indicator tube) 法が広く普及し使われるに至っている。小川法とMGIT法を比較したわれわれの成績では²⁾、両培養法のいずれかで陽性となった検体全体に対するそれぞれの培養法の検出率は、結核菌で小川法83.5%、MGIT法93.7%、*M. avium* complex (MAC) で小川法71.4%、MGIT法97.6%、*M. kansasii*で小川法66.7%、MGIT法100%と、いずれの菌種でもMGIT法が優れていた。その差は、特に塗抹陰性検体において顕著であった。また、迅速性についても、培養陽性までの平均所要日数は、結核菌で小川法20.2日、MGIT法10.4日、MACで小川法18.3日、MGIT法4.9日、*M. kansasii*で小川法11.3日、MGIT法7.3日と、やはりMGIT法が優れていた。

ただし、検体によってはMGIT法では検出できず小川法のみで検出できることもある。たとえば、小川法では培地が汚染しても場合によっては抗酸菌コロニーのみを分離することも可能であるが、MGIT法ではまず不可能である。また、前処理の違いによる影響かもしれないがMGIT法では発育せず小川法でのみ発育する検体もある。そのため当院では初期診断では両培養法を併用して検出率を上げるようにしている。

その他のMGIT法の欠点として、菌量の定量が不可能であることがあげられる。われわれは、MGIT法による菌量定量化の可能性につき探るために、小川法での菌量とMGIT法での発育所要日数の間の相関につき検討し

表 同一検体での直接法と集菌法の比較

	M1-M2	P1-P3	Total
直接法			
陽性数	50/100	88/100	138/200
Gaffky号数の平均	1.2	4.7	2.9
レンジの平均	3.1	2.6	2.9
集菌法			
陽性数	95/100	100/100	195/200
Gaffky号数の平均	3.4	6.8	5.1
レンジの平均	1.2	0.8	1.0

M1-M2, P1-P3の喀痰検体それぞれ10検体を対象とし、1検体につき直接塗抹標本と集菌塗抹標本をそれぞれ10枚ずつ作製して染色を行った。(文献1より作成)

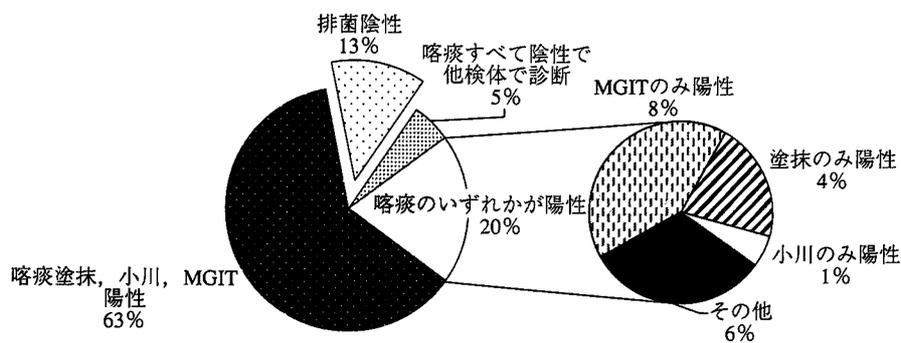


図 全入院結核患者中の排菌陽性率
(国立療養所近畿中央病院, 2003年)

た²⁾。その結果、塗抹陰性検体に比して菌量が多いと考えられる塗抹陽性検体においてMGIT法での発育所要日数は有意に短いこと、また、結核菌において小川法での菌量とMGIT法での発育所要日数の間に有意な負の相関があることを見出している。Epsteinらは、液体培地での発育所要日数が治療に伴って延長してゆくことが治療への良好な反応を予測するマーカーとなり得ると報告している³⁾。MGITにおける発育所要日数が、菌量の推定や治療効果判定のマーカーとなり得る可能性がある。

ま と め

感染症の診断の基本は病原体を直接証明することであり、抗酸菌症の診断においても塗抹・培養法の重要性は今後も揺らぐことはないと考えられる。従来は感度・迅速性の面で不満足なものであったが、上述したように近年集菌塗抹法とMGIT法の導入により成績の向上が得られている。さらに、喀痰検査で検出できない場合、可能なかぎり胃液や気管支鏡検査を行って菌を検出することも重要である。これにより当院では図に示すように、入院患者の8割以上で排菌を証明できており、従来であれば排菌陰性であったと思われる例でもより確実に診断したうえで治療を行えるようになっている。また、培養の感度が向上したことにより、より多くの例で薬剤感受性を確認できるようになり、耐性を有する例でも早期に適

切な治療を行えるようになっている。集菌塗抹法・MGIT法は今後さらに普及すべき抗酸菌検査法であると考えられる。

謝 辞

本シンポジウムの発表内容は次の方々との共同研究によるものである。

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター 吉田志緒美、鈴木克洋／検査科新田忠善、富田元久、入江章子、北市正則

独立行政法人国立病院機構国立大阪南病院検査科 木下幸保

文 献

- 1) 木下幸保, 竹野 華, 富田元久, 他: 抗酸菌塗抹検査における集菌法の有用性. 喀痰の肉眼的品質分類との関連. 医学検査. 2001; 50: 1182-1187.
- 2) 露口一成, 池田雄史, 中谷光一, 他: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 法による臨床検体からの抗酸菌培養成績の検討—MGITでの菌量定量の可能性について—. 結核. 2003; 78: 389-393.
- 3) Epstein MD, Schluger NW, Davidow AL, et al.: Time to detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum culture correlates with outcome in patients receiving treatment for pulmonary tuberculosis. Chest. 1998; 113: 379-386.

2. 液体培地や遺伝子を用いた新しい薬剤感受性試験

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科 御手洗 聡

はじめに

結核菌に対する抗結核薬の感受性試験については、2000年の結核菌検査指針改訂以降、1%小川培地を用い

た比率法が標準試験法とされている。しかしながら、小川培地による標準法では分離(増菌)、接種、判定と2~3カ月の時間を必要とし、臨床的には迅速性の点で難点がある。特に耐性が疑われる重症例等に対処する際

ど不満の残る方法であり、米国 CDC も薬剤感受性試験結果を30日以内に報告することを勧告しており、従来の固形培地による標準法以外の迅速な薬剤感受性試験法が求められている。

近年培養法あるいは分子生物学的な技術の進歩により、高感度検出システムを組み合わせた液体培地による感受性試験や、薬剤耐性遺伝子変異を検出する方法が臨床応用されている。今回はこれらの新しい感受性検査法の基礎的背景や臨床の評価について検討した。

新しい薬剤感受性試験法

Phenotypeとしての薬剤感受性試験結果を迅速に得るための方法として、①液体培地を用いる、②発育(増殖)を高感度に検知する、等が考えられる^{1)~3)}。具体的に現在市販されている製品をみると、BACTEC MGIT 960(日本ベクトンデッキンソン)はMiddlebrook 7H9を基礎とする液体培地を用いており、菌の発育を酸素消費から検出する機構を持っており、Isoniazid (INH), Rifampicin (RFP), Ethambutol (EB), Streptomycin (SM), Pyrazinamide (PZA)の5薬剤について3~9日で感受性試験結果を得ることができる⁴⁾。またプロスミック MTB-I(極東製薬)は96穴のマイクロプレートを用いて結核菌の最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)を7~10日で判定可能である⁵⁾。さらにルシミック MTB-SR(極東製薬)は発育の検出にATPによる生物発光を利用しており、5日で結果を判定可能となっている⁶⁾。

実際に一般の病院検査室での液体培地による薬剤感受性試験の実施状況を見ると、結核病床を有する291施設に対するアンケート結果(対象390施設、回答率75%)では、自施設で薬剤感受性試験を実施していたのは134施設で、うち24施設がプロスミック MTB-Iを、13施設がBACTEC MGIT 960を利用していた⁷⁾。

臨床での評価

液体培地による感受性試験が一般化するためには、標

準法との一致が前提条件である。結核予防会複十字病院では、結果の迅速性の観点から、まずMGITにて感受性試験を実施している。しかしながら、前述の被験5薬剤の1剤にでも耐性を認めた場合は1%小川培地による標準法を実施し、感受性を確認している。これまで2000年1月から2003年6月までの間にMGITにて何らかの耐性が認められた菌株が191株認められており、これらのうち26株にINH, RFP, EB, SMのいずれかの薬剤について結果の齟齬が認められた。

1%小川培地による標準法は、基本的に対数増殖期にあると思われる若い培養菌を用いて一定濃度の菌液を作製し、これを100倍および10,000倍希釈して対照培地および薬剤含有培地に接種し、コロニー数を比較して耐性を判定する。各々の薬剤に対する濃度は、INHについては0.2 $\mu\text{g/ml}$ を基準として1.0 $\mu\text{g/ml}$ との2濃度、RFPについては40 $\mu\text{g/ml}$, SMについては10 $\mu\text{g/ml}$, EBについては2.5 $\mu\text{g/ml}$ を基準濃度としている。これに対してBACTEC MGIT 960では、MGIT陽性の検体あるいは固体培地にて陽性となった検体から菌液を調整し、サプリメントと薬剤を加えた培地に0.5 mlずつ菌液を接種する。コントロールについては滅菌生食にて100倍希釈液を作製し、やはり0.5 mlを接種してMGIT 960へセットする。MGIT内部のアルゴリズムにより薬剤含有培地での発育がコントロールのそれを越えていると判断されると、耐性と判定される。現在用いられている薬剤濃度はINHについては0.1 $\mu\text{g/ml}$, RFPとSMについては1.0 $\mu\text{g/ml}$, EBについては5.0 $\mu\text{g/ml}$ である。

1%小川培地標準法とMGITによる感受性試験の結果についてTable 1に示した。INHについてみると、MGIT 0.1 $\mu\text{g/ml}$ および小川標準法0.2 $\mu\text{g/ml}$ で判定が一致した株が167株あったが、MGIT耐性で小川感受性とされた株が24株認められた。耐性および感受性を合わせた判定一致率をみると87.4%であり、不一致が12.6%認められた。

RFPでは、MGITと小川双方で耐性の株が79株あり、双方とも感受性の株が112株で、判定に齟齬をきたした

Table 1 Anti-tuberculosis drug susceptibility testing results by MGIT and standard method

INH		1% Ogawa (0.2)		RFP		1% Ogawa (40)	
		Resistant	Susceptible			Resistant	Susceptible
MGIT (0.1)	Resistant	130	24	MGIT (1.0)	Resistant	79	0
	Susceptible	0	37		Susceptible	0	112
EB		1% Ogawa (2.5)		SM		1% Ogawa (10)	
		Resistant	Susceptible			Resistant	Susceptible
MGIT (5.0)	Resistant	65	0	MGIT (1.0)	Resistant	89	5
	Susceptible	0	126		Susceptible	0	97

Table 2 Minimum Inhibitory Concentrations of MGIT resistant/1% Ogawa susceptible strains ($\mu\text{g/ml}$)

ID	INH	RFP	EB	SM	ID	INH	RFP	EB	SM
67	1.0	0.03	1.0	0.5	160	0.25	0.03	1.0	0.5
73	0.25	0.03	2.0	0.5	169	1.0	32	1.0	2.0
103	2.0	16.0	16.0	8.0	174	0.125	0.03	2.0	0.5
118	1.0	0.03	1.0	0.5	175	1.0	0.03	1.0	128
119	2.0	0.03	2.0	2.0	177	2.0	0.03	2.0	2.0
128	2.0	0.03	2.0	2.0	178	0.25	4.0	4.0	1.0
134	2.0	16	2.0	0.25	182	1.0	0.03	1.0	0.5
137	2.0	0.03	2.0	1.0	184	1.0	0.03	1.0	2.0
145	1.0	0.03	1.0	128	188	2.0	0.03	1.0	2.0
153	2.0	0.03	2.0	2.0	189	0.5	0.03	1.0	0.5
154	2.0	0.03	1.0	2.0	191	1.0	0.125	1.0	16
155	1.0	0.03	1.0	0.5					

株はみられなかった。また、EBについても RFPと同様に MGITと小川にて齟齬をきたした株は認められず、双方耐性の株が65株、双方感受性の株が126株で判定一致率は100%であった。

SMでは MGITにて耐性と判定され、小川標準法でも耐性と判定された株が89株、ともに感受性とされた株が97株であった。しかし MGIT耐性で小川感受性とされた株が5株認められており、判定一致率は97.4%となった。WHO/IUATLDの結核対策サブグループでは判定一致率を Efficiencyとして評価しているが、90%を一応のブレイクポイントとしており、その意味では十分な結果と考えられた。

INHに関して MGITと小川標準法で結果の齟齬をきたした24株のうち、解析可能であった23株について、最小発育阻止濃度を測定したところ、INHの MICは0.13~2.0 $\mu\text{g/ml}$ に分布しており (Table 2), 1~2 $\mu\text{g/ml}$ をブロスミックにおける判定保留域とすると、23株中18株が判定保留となった。全体的にやや高い MICであったことが齟齬の原因と思われた。

これらの株について、さらに耐性遺伝子に変異が認められるかを解析した。INHの耐性に関与する代表的な遺伝子は *katG*⁸⁾ および *inhA* であり⁹⁾, *katG*については codon 315の変異が最も多いといわれているが、今回の株には codon 315の変異はみられなかった。耐性とは直接関連しないが、codon 463の多型性についてみると、23株中17株が CTGであり Argではなく Leuとなっていた。*inhA*については *mab-inhA*のプロモーター領域の-15の位置に C→T substitutionが起こっている株が4株認められ、いわゆる低濃度耐性に寄与している可能性があった。なお、これらの4変異株のうち3株は初回治療患者に認められている¹⁰⁾。

これらの株が分離された23名の患者の臨床経過をみると、年齢は再治療群でやや若い傾向があったが、病型は共に II型あるいは III型で、拡がりにも大きな差異は認

められなかった。初期の菌量はさまざまであるが、死亡あるいは転院の症例を除いて、いずれの症例においても治療開始後4カ月目までには培養陰性となっていた。治療内容を含めた臨床経過をみると、MGITにてINH耐性と判定された場合の対応は、INHを中止して他の薬剤と置き換えている場合もあるが、MGITと小川標準法との齟齬が明確となって以降は、標準法の結果が出るまでINH投与を継続し、標準治療の見直しにも沿う形でフルオロキノロン等を追加している場合が多かった。治療開始から最大700日程度経過を観察しているが、これまでのところ悪化や再発は認められていない。

MGITと標準法による結果の齟齬については臨床的に対応可能であるが、以前から齟齬を認める報告があり¹¹⁾¹²⁾, 何らかの解決策が必要と思われる。

遺伝子による薬剤感受性試験

結核菌の薬剤感受性試験結果を迅速に得るためのもう1つの手段は、耐性遺伝子変異の検出により表現型としての耐性を推定する方法である。多くの報告を総合すると、INHについては *katG*と *inhA*の変異で80%程度^{13)~15)}, RFPについては *rpoB*で90~95%の耐性を推定可能と思われる^{15)~19)}。

実際に遺伝子検査キットとして保険収載されている Line Probe Assay (INNO-フィノス LiPA・Rif TB, NIPRO) について、感度あるいは特異度について比較的被験菌数が多い報告を Table 3にまとめた^{20)~25)}。このシステムでは、*rpoB*の変異のうちほとんどの耐性変異が集中する Rifampicin Resistance Determining Region (RRDR) について、変異特異的な固相化オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより変異を検出する。RRDR領域には81bpsの塩基配列が含まれ、codon 531あるいは codon 526といった位置にアミノ酸置換が多く認められている。Line Probe Assayではこの領域に発生するほとんどの変異を検出可能であるが、逆に領域外の変異は検

Table 3 Laboratory evaluation of INNO-LiPA RifTB

Reporter	No. of strains	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Efficiency (%)
Abe, et al.	333	96.1	99.6	98.5
Bartfai, et al.	36	79.3	100	83.3
De Oliveira, et al.	128	97.3	100	97.7
Traore, et al.	411	98.5	100	99.0
Rossau, et al.	107	98.0	100	98.5
Hirano, et al.	116	92.2	100	94.0

出できない。silent mutationを誤って耐性と判定した例も稀ながら報告されている²¹⁾。

まとめ

結核菌の薬剤感受性結果を迅速に得るため、液体培地等の新しい検査法が臨床応用されている。MGITによる迅速薬剤感受性試験は臨床的に有用であるが、INHに関して小川培地による標準法との間に結果の差異が12.6%認められた。このMGITと小川培地との結果の差異は、それぞれに採用されている薬剤濃度の差異や菌株側の比較的高いMICによるものと考えられた。臨床的にはINHについてMGIT耐性が報告されたとしても、他の薬剤が感受性であればすぐに投与を中止することなく、標準治療に沿う形でフルオロキノロン等の薬剤を追加して標準法の結果を待つことが実際のことであり、現時点で特に臨床的な問題はないと思われた。耐性責任遺伝子を利用した薬剤耐性の検出については、感度および特異度の点でRFPの耐性遺伝子検査は臨床的に有用性が高いと考えられた。他の薬剤に関しては感度が未だ不十分と思われるが、重症例で至急薬剤感受性を知りたい場合には、耐性遺伝子変異をみることである程度感受性の推定が可能であり、臨床的に有用であろうと考えられた。

文 献

- 1) Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, et al.: Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3578-3582.
- 2) Yew WW, Tong SC, Lui KS, et al.: Comparison of MB/BacT system and agar proportion method in drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001; 39: 229-232.
- 3) 斉藤 宏, 宮城知佳, 山根誠久: 抗酸菌分離用2相培地, マイコアシッドの性能評価—MGIT及び複数種類の卵培地との性能比較. *臨床と微生物.* 2001; 28: 561-566.
- 4) 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重: BACTEC MGIT960システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験: 固形培地を用いる比率法との比較. *結核.* 2001; 76: 657-662.
- 5) 山根誠久, 一山 智, 河原 伸, 他: Middlebrook合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験(第3報): 微量液体希釈法を原理とするBrothMIC MTBの多施設評価—施設間再現性とAgar Proportion法との判定互換性の解析. *臨床病理.* 1999; 47: 754-766.
- 6) 山崎利夫, 佐藤直樹, 山下研也, 他: 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法(第IV報): 改良したATP法と参照法との比較. *臨床病理.* 2003; 51: 194-200.
- 7) 御手洗聡: 結核菌検査とくに薬剤感受性検査の精度管理に関する研究. 厚生労働科学研究補助金・新興再興感染症研究事業平成15年度報告書. 2004: 164-190.
- 8) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al.: The catalase-peroxydase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature.* 1992; 358: 591-593.
- 9) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al.: *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *SCIENCE.* 1994; 263: 227-230.
- 10) Madison M, Salman I, Siddiqi H, et al.: Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* strain with stable, low-level resistance to isoniazid. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1294-1295.
- 11) Ardito F, Posteraro B, Sanguinetti M, et al.: Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) automated system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 4440-4444.
- 12) Avendano D, Lopez B, Simboli N, et al.: The Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) is useful for anticipating the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin but not to isoniazid. *Rev Argent Microbiol.* 2001; 33: 197-202.
- 13) Rouse DA, Li Z, Bai GH, et al.: Characterization of the *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1995; 39: 2472-2477.
- 14) Musser JM, Kapur V, Williams DL, et al.: Characterization of the catalase-peroxydase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis.* 1996; 173: 196-202.
- 15) Siddiqi N, Shamim M, Hussain S, et al.: Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in North India. *Antimicrob*

- Agents Chemother. 2002 ; 46 : 443-450.
- 16) Heep M, Brandstatter B, Rieger V, et al.: Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 107-110.
- 17) Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, et al.: Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 2987-2990.
- 18) Garcia L, Alonso-Sanz M, Rebollo MJ, et al.: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 1813-1818.
- 19) Yuen LK, Leslie D, Coloe PJ.: Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. J Clin Microbiol. 1999 ; 37 : 3844-3850.
- 20) Abe C, Ogata H, Kawata K, et al.: Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by line probe assay (LiPA). Kekkaku. 2000 ; 75 : 575-581.
- 21) Bartfai Z, Somoskovi A, Kodmon C, et al.: Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 3736-3739.
- 22) De Oliveira, MM, da Silva Rocha A, Cardoso Oelemann M, et al.: Rapid detection of resistance against rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Brazilian patients using a reverse-phase hybridization assay. J Microbiol Methods. 2003 ; 53 : 335-342.
- 23) Traore H, Fissette K, Bastian I, et al.: Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance. Int J Tuberc Lung Dis. 2000 ; 4 : 481-484.
- 24) Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, et al.: Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother. 1997 ; 41 : 2093-2098.
- 25) Hirano K, Abe C, Takahashi M: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J Clin Microbiol. 1999 ; 37 : 2663-2666.

3. 核酸増幅法と新しい同定法

京都大学医学研究科臨床病態検査学 高倉 俊二

はじめに

核酸増幅法が迅速診断法として応用され、臨床の現場に広く普及するようになって10年を経たが、その間の結核非常事態宣言、医療費削減の要請、院内感染に対する厳しい世論といった、結核医療を取り巻く社会環境は変化を続けている。また、遺伝子工学の進歩によって新しい反応原理による核酸増幅法の開発も続いている。したがって、核酸増幅法によって結核を診断するということの価値をどこにおくべきかを常に問い直し、最も合理的な方法および臨床適用を考える必要があるのではないだろうか。実際、この10年間の核酸増幅法の普及はわが国における結核発症患者数の減少にはつながっていないのである。

本稿では、核酸増幅法の現状と問題点と、将来的な核酸増幅法の応用可能性について、自験データを交えて考察したい。

結核を迅速診断する意義

一般に、迅速診断の真の意義とは、それが迅速な治療開始を通して予後の改善につながるか否か、それによって不要な検査や治療を削減し、要する入院期間を短縮で

きるか否か、にある。その意味においては、結核患者の予後を悪化させる原因としての診断の遅れのほとんどは、数週から数カ月にもおよぶ、結核を疑うまでの遅れ (doctor's delay) であって¹⁾²⁾、検査そのものの迅速性もつインパクトは大きいものではない。しかし、結核が他の疾患と異なるのは、患者が感染源となって新たな感染者を発生させる可能性が高い感染症であるという点である。つまり、核酸増幅法による結核迅速診断の最大の利点は、周囲への感染源になる患者か否かを迅速に判定できることだといえるだろう。

現状における核酸増幅法の性能

現在の核酸増幅法検査の性能を確認する目的で、京都大学医学部附属病院で2001年～2002年の2年間にPCR検査(コバスアンプリコア MTB, ロシュ)を行った1308検体の結果について調査した (Table 1)。比較した抗酸菌培養法は BACTEC MGIT 960 システム (日本ベクトン・ディッキンソン) である。塗抹陽性培養陽性54検体はすべてPCR陽性で、感度100%であった。培養陰性PCR陽性となった検体は塗抹陽性、陰性合わせて14検体あったが、それらの内訳は、前後7日以内の近接日検体で培養陽性 (7検体)、抗結核治療中 (2検体)、生検組織診

Table Comparison of the results of *Mycobacterium tuberculosis* PCR (COBAS Amplicor MTB) with the results of conventional smear of acid-fast bacilli and culture of *M. tuberculosis* in 1308 clinical samples.

Smear results of acid-fast bacilli	Culture results of <i>M. tuberculosis</i>	PCR results of <i>M. tuberculosis</i> complex	
		Positive	Negative
Positive	Positive	54	0
	Negative	4	46
Negative	Positive	51	25
	Negative	10	1118

による診断例 (1検体), 治療経過から結核に合致する症例 (3検体), 計13検体は死菌やその他の原因による培養陰性で, PCR陽性は真の陽性であったと考えられた。したがって, 全体としての特異度は >99%であった。一方, 塗抹陰性培養陽性検体における感度は76検体中51検体 (67.1%) であった。

抗酸菌培養感度が高い液体培地を対照としたこともあり, PCRの感度は培養法に劣ることは明白であった。ただし, 塗抹陽性検体での感度・特異度がともにほぼ100%であったということは, 現状のPCR法は感染源として高リスクな塗抹陽性結核患者を迅速に同定することが十分可能であることを示している。さらには, 塗抹陽性時に核酸増幅法が陰性の場合に結核を否定できるためには, 増幅反応阻害物質の混入による偽陰性を除外できなければならない。アンプリコアでは内部陽性標準を搭載することでこの問題を解決しているが, これはすべての核酸増幅診断法に求められるべきものである。

種々の核酸増幅法, その限界

迅速診断法としての核酸増幅法は, 初期にPCR (polymerase chain reaction), TMA (transcription-mediated amplification), LCR (ligase chain reaction) 法が商品化されたが, その後も「反応時間短縮」, 「一定増幅温度」, 「増幅効率の向上」, 「定量可能」等の特徴をもつ新しい遺伝子増幅法が開発され, 各々結核の迅速診断への応用が試みられてきている。それらには, SDA (Strand Displacement Amplification), NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids), LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), TRC (Transcription Reverse-transcription Concerted reaction), 等がある。臨床検体を用いた試験においてPCR, TMAに匹敵ないしこれらを上回る感度と特異性をもつことが示され, 一部は実用化されている³⁾⁴⁾。各々の報告では, 臨床検体について培養結果を標準としての感度・特異度・一致率を評価しているが, これらの値を方法間で直接比較することはできない。その理由は, 性能の差が, 増幅反応原理に伴う増幅

効率, 標的とする核酸配列の特性 (DNAかRNAか, 菌体の保有するコピー数, プライマーやプローブの配列), 増幅産物の検出アルゴリズム, という方法に内包される違いだけではなく, 現実的に各研究報告結果には, 核酸抽出法 (抽出効率, 阻害因子除去効率), 培養検査の前処理法や比較した培養法 (培養法の感度の低いほど核酸増幅法は高感度となる), 検体の内訳 (少菌量と予測される検体の比率) などの違いも影響するからである。したがって, 少なくとも異なる報告から得られた値を直接比較する意味は少ない。ただし, いずれの方法においても塗抹陽性培養陽性の検体における感度は100%に近い。内部陽性標準搭載などで増幅法偽陰性の可能性が確認されるものであれば, 塗抹陽性患者が結核か否かを判定する能力は十分であるといえる。一方, 塗抹陰性培養陽性検体での感度は60~90%とさまざまであり, 現状においては核酸増幅法の感度は少なくとも培養法には劣るといわざるを得ない⁵⁾⁶⁾。

また, 新たな核酸増幅法では増幅反応時間が30分~1.5時間と短縮されていることが特徴のひとつである。しかし, 検査の現実を考えると, 検体の採取から検査結果判明までに要する全時間のなかに占める増幅反応時間の割合は決して高いものではなく, 検体の運搬, 前処理等を含めると朝に提出された検体の結果が午後に判明する, という点で差は少ないといえるだろう。

核酸増幅法の将来

結核菌の存在診断としての核酸増幅法の向上の余地は, 塗抹陰性培養陽性検体における感度をも100%に近づけるといふ部分が, わずかに残されているのみである。培養を越える感度を持つかは証明不可能であるから, 30~50%にも及ぶとされる, 排菌なしで結核と診断される症例には無力と言わざるを得ない。したがって, 核酸増幅法の将来としては存在診断以上の情報を加えることができるかにあると考えられる。以下にいくつかの候補を挙げる。

(1) 薬剤感受性

耐性遺伝子を標的とする核酸増幅を行い, 配列の変異

の有無を hybridization によって検出するキット (line probe assay や DNA microarray) が発売されており、1 日以内に薬剤感受性が推定できる。塗抹陽性検体からは直接 *rpoB* 遺伝子を増幅させてリファンピシン耐性に関わる変異の有無を検出できるという報告もなされている⁷⁾。特にリファンピシン耐性結核菌は多剤耐性菌である可能性が高いため、迅速にリファンピシン感受性が判定できるメリットはきわめて大きい。

(2) 定量性および菌の生菌活性

新しい核酸増幅法のひとつである TRC 法は、標的とする RNA を増幅し定量的に検出する手法である。結核菌特異的蛋白である *Pab* の mRNA を標的とすることで結核菌の生菌数の推定が理論上可能である⁸⁾。われわれが薬剤感受性検査に応用した結果を Fig. に示す。15 株の *Mycobacterium tuberculosis* 臨床分離株につき、ウエルバック培地 (日本ビーシージー) を用いて抗結核薬感受性を確認した。各株はマイコプロス (極東) 5 本に McFarland 標準 0.5 の 1/100 希釈菌液 0.1 ml を接種し、4 本にはそれぞれ抗結核薬をリファンピシン 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、イソニアジド 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、エタンブトール 10 $\mu\text{g/ml}$ 、ストレプトマイシン 2.0 $\mu\text{g/ml}$ の最終濃度となるように添加した。37°C で 48 時間培養後に培養液 1 ml から核酸を抽出し TRC 法にて *Pab* mRNA を定量、薬剤不含有対照の定量値を基準としたパーセントを算出することで抗結核薬感受性が *Pab* mRNA の 90% 以上の相対的減少によって推定できるか否かを検討した。ウエルバック法の結果と比較すると、リファンピシン、イソニアジドの 2 剤については良好に一致する結果が得られた。また、少数の患者での検討であるが、喀痰中の *Pab* mRNA が感受性結核

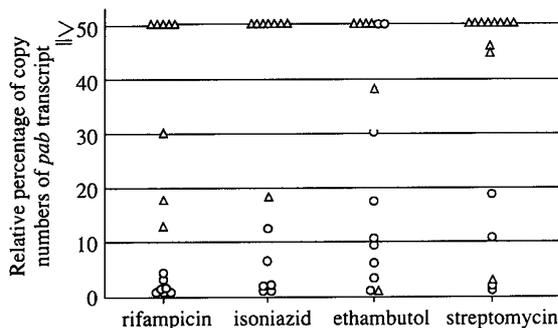


Fig. Relative percentages of the *pab* transcript copy numbers of 15 *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains determined with the TRC (transcription and reverse-transcription concerted reaction) method after incubation with one of four antituberculous drugs. Relative percentages of susceptible strains by the conventional antituberculous susceptibility method are shown by open circles (O), and those of resistant strains are indicated by open triangles (Δ).

患者では速やかに減少するが、多剤耐性結核患者では高値が遷延するという結果も得ている。これらは、TRC 法による結核菌特異的 mRNA 定量値の測定によって、検体中の生菌の数や生菌活性ないしそれらの総和が推定可能であることを示唆しており、治療効果や感染源としてのリスクという情報を付与できる検査法として期待がもてる。

(3) 遺伝子型タイピング

結核が外来性再感染による発症が稀ではないことが判明した現在、治療中ないし治療後の再排菌は同一菌による再燃とはいえない。MIRU (Mycobacterial Interspersed Repeat Units) の長さの多様性による遺伝子型タイピング法は PCR 増幅産物の長さによってタイピングする方法であることから、検体から直接のタイピングができる。外来性再感染と再燃の鑑別、集団感染や院内感染であるか否かの判定が 1 日以内に可能となる。

まとめ

核酸増幅法がその価値を発揮するためには、結核における迅速診断の意義とは何かという認識が必要であることを強調したい。単なる存在診断としての核酸増幅法は現在のもので現実的要求をみたしていると考えられる。したがって、新しい検査法においては、薬剤感受性、定量、菌の生菌活性、遺伝子型などの付加情報を与えられるもののみが選別されるはずである。それらの付加情報が結核医療の新たな局面を開拓し、患者の予後改善や新規患者の減少という具体的成果につながることを期待したい。

文献

- 1) 佐々木結花, 山岸文雄, 八木毅典, 他: 有症状受診にて発見された肺結核症例の発見の遅れの研究—特に診断の遅れについて—. 結核. 2000; 75: 527-532.
- 2) Greenaway C, Menzies D, Fanning A, et al.: Delay in Diagnosis among Hospitalized Patients with Active Tuberculosis—Predictors and Outcomes. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 165: 927-933.
- 3) Piersimoni C, Scarparo C: Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. J Clin Microbiol. 2003; 41: 5355-5365.
- 4) Iinuma Y, Senda K, Fujihara N, et al.: Comparison of the BDProbeTec ET system with the Cobas Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003; 22: 368-371.
- 5) 伊藤邦彦, 吉山 崇, 中園智昭, 他: 塗抹陰性肺結核の診断における核酸増幅法検査の限界. 結核. 2000; 75: 691-697.

- 6) Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, et al.: Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 3233-3240.
- 7) De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, et al.: Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay.

Tuber Lung Dis. 1995 ; 76 : 425-430.

- 8) Ishiguro T, Saitoh J, Horie R, et al.: Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel. *Anal Biochem.* 2003 ; 314 : 77-86.

4. 肺 *Mycobacterium avium* complex 症の血清診断

独立行政法人国立病院機構刀根山病院内科 北田 清悟

はじめに

結核をはじめとする抗酸菌感染症の確定診断は病原体の検出である。しかし実際の臨床現場では病原体の検出が必ずしも得られるわけではなく種々の診断方法を総合して感染症の診断は行われる。結核に対しては補助診断の1つとして血清診断が種々考案され実用化されている¹⁾²⁾。しかしながらこれら血清診断に使用されている抗原は抗酸菌に共通の成分であるため、これらの血清診断で肺結核と非結核性抗酸菌感染症との鑑別は不可能である。非結核性抗酸菌特異的な血清診断の報告はほとんどなく実用化されているものは皆無である。

近年、肺結核は減少の傾向にあるが、非結核性抗酸菌症は増加が目立っている。その原因菌として *M. avium*, *M. intracellulare* 等の *Mycobacterium avium* complex (MAC), *M. kansasii*, *M. szulgai* 等の遅発発育性抗酸菌や *M. fortuitum*, *M. chelonae* などの迅速発育性抗酸菌が報告されている。なかでも MAC が約 70~80% を占め、日本および欧米でも増加傾向にある。MAC 症は human immunodeficiency virus (HIV) 感染などの高度な免疫不全患者に合併する播種性 MAC 症、もしくは肺結核後遺症や慢性閉塞性肺疾患などの肺基礎疾患をもつ患者に合併してくる二次性の肺 MAC 症が広く認知されてきた。近年、基礎疾患を有さない中高年非喫煙女性に多く認められる一次型肺 MAC 症が報告され³⁾、このタイプの患者数が増加している。肺 MAC 症は常に臨床的に類似した点が多い肺結核との鑑別が問題となる。肺結核とは感染防御や化学療法を選択するという観点からも臨床的対応が異なり、肺 MAC 症と肺結核との鑑別は重要であると考えられる。

MAC は環境常在菌であり、土壌、水などから検出される⁴⁾。そのため MAC 菌が気道系の検体から検出されることは時々認められ、このことが菌の検出が感染症を意味するのか、単なる汚染 (contamination/colonization)

を意味するのか解釈に混乱を生じさせている。そのため MAC 症の診断には臨床診断基準が用いられる。1997 年に米国胸部疾患学会から非結核性抗酸菌症の診断と治療が発表され⁵⁾、日本でも 2003 年にこの診断基準に基づいて、日本の実状に合う形で「肺非結核性抗酸菌症診断に関する見解」が発表された⁶⁾。これらの診断基準は臨床的基準、細菌学的基準、画像基準の 3 項目からなり、3 項目すべて満足した場合非結核性抗酸菌感染症と診断可能としている。しかしながらこの診断基準は内容が非常に細かく専門家でない一般の臨床医が使用するには、より簡便なまとめ方が必要であると思われる。特に細菌学的基準は複数回の菌の検出または気管支鏡検査での相当量の菌の検出を必要としており、診断基準を満足するまでには長期間の経過観察または侵襲的検査が必要となってくる。

肺 MAC 症の血清診断

肺 MAC 症の増加、診断の困難さをふまえて、われわれは肺結核との鑑別も可能な肺 MAC 症特異的な新規血清診断を開発し、その診断における役割、有用性を検討し報告してきた⁷⁾。今回さらに抗原を改良を加え臨床的有用性を検討したのでその内容を以下に紹介する。

MAC 細胞壁にはペプチド鎖を有する糖脂質 glycopeptidolipid (GPL) が存在する。GPL は食菌促進能や食胞融合 (phagosome-lysosome fusion, P-L fusion) の抑制作用などを有し、MAC 菌の細胞内での殺菌を抑制することにより菌の発育を維持し病原性を示す病原因子として働くのではないかと考えられている⁸⁾。MAC 菌は血清凝集反応によって少なくとも 28 種類の血清型に分類されているが、GPL はその抗原物質であることが後の研究で明らかになった⁹⁾。GPL は GPL core と alloThr 残基に結合する糖鎖部分から構成される。GPL core は 4 つのペプチドと長鎖脂肪酸、糖から構成され、各血清型共通の構造物である。糖鎖部分は MAC 血清型によって特異な構

造をとり、現在のところ14種類の構造が決定されている。糖鎖部分の抗原性は血清凝集反応からも明らかであったが、GPL coreに対する抗原性は今回初めて明らかにされた。またGPLはMAC以外にも*M. scrofulaceum*, 迅速発育菌である*M. fortuitum*, *M. chelonae*などにも存在するが¹⁰, これらの菌による肺感染症の頻度は低い。またGPLは肺感染症の頻度が高い*M. tuberculosis* complex, *M. kansasii*には存在せず肺感染症においてはGPLはMAC特異的物質であると考えられた。当初われわれはMAC特異的血清診断の抗原として11種類の血清型GPL混合抗原を使用した⁷, GPL coreの抗原性を明らかにし、各血清型共通部分であるGPL coreを抗原として用いた。GPL coreの調製を以下に記す。MAC標準菌株を37°C Middlebrook 7H9で3週間培養した後、乾燥させchloroform/methanolで抽出、アルカリで処理しアルカリ安定脂質を得た。アルカリ安定脂質をシリカゲルカラムによって精製しGPLを得た。GPLは薄層クロマトグラフィーに展開し、単一なスポットになるまで繰り返し精製した。 β eliminationによって糖鎖部分を切断して得られたGPL coreは2次元薄層クロマトグラフィーおよび質量分析で確認した。2次元薄層クロマトグラフィーではいずれの血清型標準菌株から抽出したGPL coreも同一部位に単一のスポットとして検出されその同一性が示唆された。また質量分析ではfast atom bombardment-mass spectrometry から得られた値と既知の構造式から得られた分子量は一致していた。

臨床的有用性

このGPL core抗原を用い、Enzyme Immunoassay法によって対象患者中血清中抗GPL core抗体の測定を行い臨床的有用性を検討した。対象は米国胸部疾患学会の診断基準⁹をみたす肺MAC症患者106名、MACの単なる気道へのcolonizationと考えられるもの(MAC colonization)11名、肺結核患者77名、肺*M. kansasii*症患者30名、健常人126名であった。すべての対象者はHIV感染などの明らかな免疫不全を合併していなかった。

血清中抗GPL core抗体価はMAC患者群で他の疾患群や健常人に比べてIgG, IgA, IgMともに有意($p < 0.0001$)に上昇をみとめた(mean OD \pm SD: MAC disease; IgG 0.281 \pm 0.346, IgA 0.435 \pm 0.385, IgM 0.714 \pm 0.492, MAC colonization; IgG 0.026 \pm 0.027, IgA 0.021 \pm 0.049, IgM 0.164 \pm 0.115, *M. kansasii* disease; IgG 0.039 \pm 0.015, IgA 0.043 \pm 0.054, IgM 0.159 \pm 0.131, TB; IgG 0.047 \pm 0.031, IgA 0.030 \pm 0.018, IgM 0.156 \pm 0.113, Healthy subjects; IgG 0.040 \pm 0.028, IgA 0.031 \pm 0.042, IgM 0.164 \pm 0.092)。cut off値をROC曲線から決定し、それぞれの感度特異度を検討すると以下ようになった。IgG; 感

度72.6%, 特異度92.2%, IgA; 感度92.5%, 特異度95.1%, IgM; 感度78.3%, 特異度91.0%。IgAでもっともよい成績が得られた。以上の成績より、抗体価の測定はMAC菌のcolonizationを除外できるだけでなく肺結核、肺*M. kansasii*感染症との鑑別にも有用であることがわかった。さらに治療によってMAC菌排菌が停止したMAC症患者治療成功群と、排菌の停止が得られなかったMAC症患者治療失敗群の抗体価の治療前後の変化の検討も行った。前者は有意に抗体価の低下をみとめたにもかかわらず、後者では抗体価の変化がみとめられず抗GPL core抗体価は疾患活動性の指標になる可能性も示唆された。

現行の診断基準とこの血清診断を併用することによって、かなりの患者は1~2回の受診で肺MAC症の診断が可能となる。これまでは臨床画像学的基準を満たすが細菌学的基準を満たさない場合、さらに経過観察を行い細菌学的基準を満たしてくるかどうかをみていく必要があった。このような症例に血清診断を実施しこれが陽性である場合はMAC感染症と診断してよいとするのである。また画像的に抗酸菌の感染を疑う所見がなく、臨床症状もみとめないが、MAC菌が検出されてくることがある。この場合は感染症なのかcolonizationなのか判断に迷うことになり、長い経過観察の後ようやく結論に達することがある。このような時にも血清診断を実施し、これが陰性であればその時点でcolonizationと判断することができる。なぜならば明らかなMAC症患者では血清診断は陽性となり、colonizationでは陰性となるからである。また疾患活動性を反映する可能性があることから、化学療法終了時期等の判定に使用することも可能かもしれない。しかしこのことを明らかにするためにはさらなる検討が必要であり、現在検討を進めている。なお血清診断には偽陽性、偽陰性の問題もあるため結局診断には総合的判断が必要となり、補助診断としての役割を理解して使用する必要があると思われる。現在のところ肺MAC症に対する絶対的に有効な治療法は確立されていない。しかし、早期に診断することは外科治療適応の判断に有用であり、より早期の化学療法の開始を可能にする。気管支拡張や空洞病変を認めない時期に化学療法を開始することで治療成績の改善が期待される。血清診断が肺MAC症の早期診断の有力なツールとなれば幸いである。

まとめ

MAC特異的GPL coreを抗原としたEIA法によるMAC症に対する血清診断を開発した。現行の診断基準にこの血清診断を追加することによって、より簡便、早期に肺MAC症診断が可能となる。

文 献

- 1) Maekura R, Okuda Y, Nakagawa M, et al.: Clinical evaluation of anti-tuberculous glycolipid immunoglobulin G antibody assay for rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3603-3608.
- 2) Okuda Y, Maekura R, Hirofumi A, et al.: Rapid serodiagnosis of active pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by analysis of results from multiple antigen-specific tests. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1136-1141.
- 3) Prince DS, Peterson DD, Steiner RM, et al.: Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *N Engl J Med.* 1989; 321: 863-868.
- 4) Falkinham JO, III: Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews.* 1996; 9: 177-215.
- 5) American Thoracic Society: Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: S1-S25.
- 6) 日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会: 肺非結核性抗酸菌症診断に関する見解—2003年. *結核.* 2003; 78: 569-572.
- 7) Kitada S, Maekura R, Toyoshima N, et al.: Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 1328-1335.
- 8) Yano I: Biochemistry and bioactivities of mycobacterial components. *Nippon Rinsho.* 1998; 56: 3008-3016.
- 9) Chatterjee D, Khoo KH: The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58: 2018-2042.
- 10) Brennan PJ, Nikaido H: The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64: 29-63.

5. Molecular epidemiologic tools for tuberculosis: IS6110 RFLP, Spoligotyping, and VNTR

大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 松本 智成, 阿野 裕美, 高嶋 哲也,
露口 泉夫

IS6110 RFLP解析は、制限酵素 *Pvu*-IIによって切断された結核菌遺伝子を southern blottingし IS6110プローブでハイブリダイゼーションを行い、目的とする結核菌の遺伝子中に何個の IS6110 elementがどのように挿入されているかで結核菌をタイピングする方法である¹⁾。

われわれは、2001年から大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター（旧称、大阪府立羽曳野病院）において培養陽性となった約1300の結核菌株の IS6110 RFLP解析を行った。これは大阪南部の大部分の結核菌株を占めることになる。この結果によると全結核菌1356株のクラスター形成率は27.9%であった。一方、多剤耐性結核菌株（124株）内のクラスター形成率は、24.3%であった（Fig. 1）。この結果により多剤耐性結核菌は感受性結核菌とほぼ同じクラスター形成率であることが明らかとなった。従来、多剤耐性結核菌株は感受性株よりも感染性が劣ると証明されているが²⁾、クラスター形成率が同等なことより大阪においてはある種の多剤耐性結核菌株は感受性菌株とほぼ同等の感染力をもつということができる。

IS6110 RFLP解析を用いると、結核の再発が、再燃か再感染かを明らかにすることができる。IS6110 RFLP解析にて van Rieは結核の高蔓延地域である南アフリカ共和国における再感染率が75%であると報告した³⁾。さら

に中蔓延国であるスペインにて44%⁴⁾、低蔓延国であるイタリアでは16%⁵⁾であると相次いで報告された。そこで大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにおいても、再発結核患者で再燃か再感染かを検討してみた。1996年から2003年1月にかけて、治療記録があり培養陽性になった3685結核患者のうち、67患者に再発が認められた（再発約1.8%）。初回、再発時に培養陽性になったのは21患者であり、その患者由来の結核菌株を IS6110 RFLP解析を行ってみると、2患者（9.5%、2名/21名）の初回治療時と、再発治療時の結核菌株 IS6110 RFLPバンドパターンが異なっていることが明らかになった。当院での再発患者の9.5%が再感染であり、これは今までの上記報告に比べ低い値である。なぜ、大阪では再発患者の約90%が再燃で、再感染率が低いかという理由は、大阪における行政、保健所の対結核活動が優れているからと考えている。つまり新規排菌結核患者が見つかって加療を受け、もはや感染性がなくなり病院を退院する頃には、保健所が接触者検診を行い該当地域の他の排菌結核患者を見つけ入院させるので、患者が加療を受け排菌陰性化し退院する頃には、その地域はもはや活動性結核の人はいない。こうして退院後の患者は他の種類の結核菌の暴露、感染を受けないと考察している。

このように IS6110 RFLPタイピングは有用であるが欠

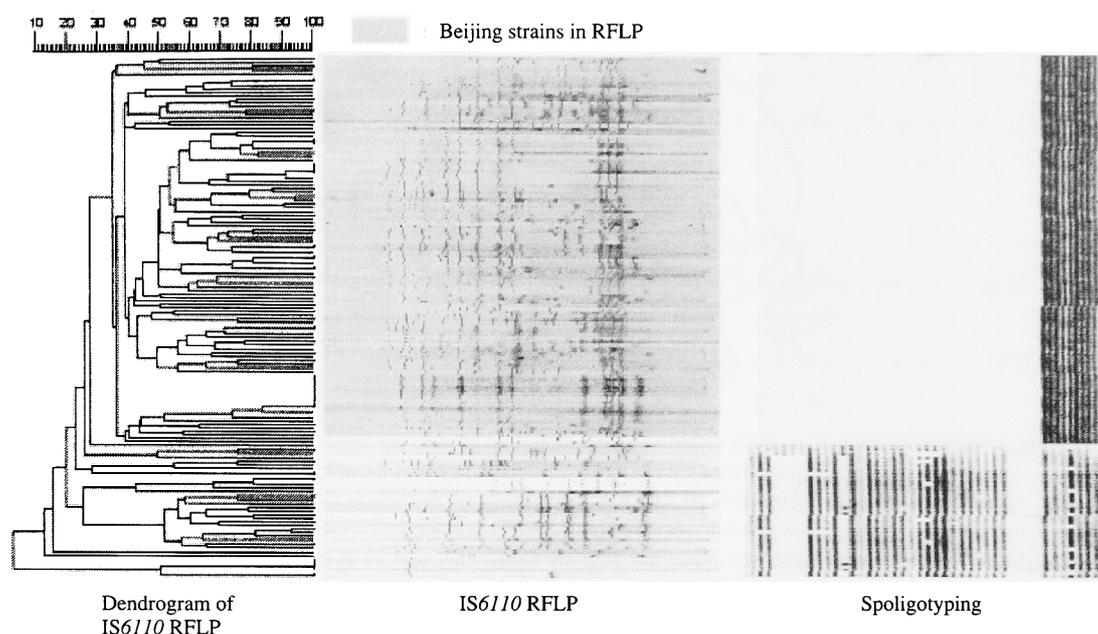


Fig. 1 The IS6110 RFLP fingerprinting and Spoligotyping of MDR tuberculosis (142 strains) in Osaka

The left column is the dendrogram of IS6110 RFLP. The middle is IS6110 RFLP of MDR tuberculosis strains around Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases. The right is spoligotyping patterns corresponding to the middle column.

We could see the cluster in the dendrogram. The cluster formation ratio of the multi-drug resistant (MDR) tuberculosis strains (total 124 strains) was 24.3%. The cluster formation ratio of all the tuberculosis strains (total 1356 strains) around our institution was 27.9%.

Beijing strains made up 75% of tuberculosis clinical isolates around our institution. The same percentage was seen in the corresponding non-MDR tuberculosis strains.

点もあり、増殖の遅い結核菌を培養する必要があること、解析に熟練と技術を要することが問題となる。また RFLP解析は、時に再現性が低く、他施設間のデータの比較が難しい。実際に Bradenらは、IS6110 RFLPのバンド数が増えるほど、施設間での再現性が低くなると報告している⁶⁾。従って、IS6110 RFLPは広域結核菌データベース構築には不向きである。さらに、RFLP5本バンド以下の結核菌においても、解像度が低くなり疫学解析に不向きである。

ではいったい、なぜ再現性が低くなるのであろうか。われわれは以下のように考えている。個々のコロニーに分離した結核菌の IS6110 RFLP解析を行うとおのおの少しずつ異なった RFLPパターンをもつ結核菌が存在するということ (Fig. 2)。そして菌株全体の IS6110 RFLPパターンは、個々の IS6110 RFLPパターンの合成像であるということ (Fig. 2)。つまり臨床菌株の IS6110 RFLPパターンは、その中に含まれる個々の結核菌の RFLPパターンの重なりである (Fig. 2)。バンドが濃い場合は、そのバンドを持つ結核菌の数が多ことを表す [Fig. 2の (A)]。実際のフィルターをよく見てみると薄いバンドが存在していることがある [Fig. 2の (B)]。このバン

ドが薄い場合、(この場合特に low intensity band と呼ぶが) そのバンドを持つ結核菌の数が少ないことを表すことが多い。従って、IS6110 RFLPパターンの再現性は、その時に解析した結核菌集団内の特定の IS6110 RFLPバンドパターンを持つ結核菌の割合に依存する [Fig. 2の (a), (b), (c)]。

上述の IS6110 RFLPの問題点を解決するために、PCRを利用した方法を含めて、いくつかの新しい結核菌タイピング法が開発されている。それらの多くが、再現性が低いか、もしくは分離能が低いという問題を含んでいる。最近、よく使用される方法としてスポリゴタイピングと Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) がある (MIRU-VNTRを含む)。

スポリゴタイピング

スポリゴタイピングは、結核菌遺伝子内にある Direct Repeats (DRs) 領域内にある DRによって分けられた挿入配列の多型性により結核菌をタイピングする方法である⁷⁾。

スポリゴタイピングは6本以下の IS6110 RFLPバンドをもつ結核菌のタイピングや、北京株の検出に有用であ

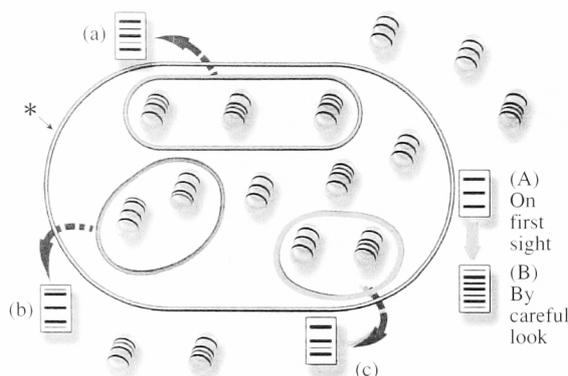


Fig. 2 According to the *IS6110* RFLP analysis of individually separated clones; the *IS6110* RFLP fingerprinting was a summation of the individual *IS6110* pattern of each clone, which had slightly different bands. (* circle)

The rectangle with black bands represents *IS6110* RFLP fingerprinting of the whole clinical isolate. The thick bands represent the basic pattern, and the thin represent the low intensity bands.

The elliptical cylinder represents a tuberculous bacillus with its bands that are its *IS6110* RFLP fingerprinting pattern. Black band represents the pattern of *IS6110* RFLP from the whole clinical isolate.

Singly separated *IS6110* RFLP showed that there were sometimes tuberculous bacilli with variously changed fingerprints, although the whole band pattern seemed to consist of bacilli with all the same fingerprint pattern (A). A second look confirmed that there were some low intensity bands on the filter (B). The low intensity bands were reflected in the low population of bacilli with different fingerprints. The intensity of low intensity bands resulted from this population.

Thus, the reproducibility of *IS6110* RFLP fingerprinting depended on the selection of the cohort.

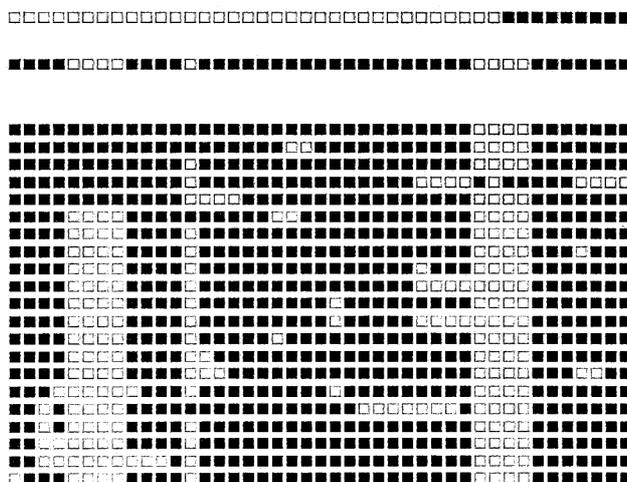


Fig. 3 Spoligotyping descriptions of the tuberculosis strains around Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases.

(a) Beijing strains made up 75% of the entire clinical isolates (1,350 clinical isolates).

(b) The characteristic Spoligotyping platform, which was not described in SpoIDBIII, was seen from the clinical isolates with less than 6 copies of *IS6110* RFLP. We designated this spoligotyping platform as Osaka Type.

(c) Spoligotyping descriptions of the tuberculosis strains with less than 6 copies of *IS6110* RFLP around our institution. The descriptions in gray belonged to Osaka type. The Osaka type made up about 80% of strains with less than 6 copies of *IS6110* RFLP.

る。われわれの解析では大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター周囲の結核菌株の約75%が北京株に属し、同じスポリゴタイプパターンを有する (Fig. 3)。

スポリゴタイプは6本以下の *IS6110* RFLP バンドを有する結核菌のセカンドタイプとして推奨されている。しかし6本以下の *IS6110* RFLP バンドの結核菌株

の場合でもスポリゴタイプの分離能はさほど高くない⁸⁾。またわれわれの解析では、大阪における6本以下の *IS6110* RFLP バンドをもつ結核菌株の80%は大阪ファミリーに属する。この大阪ファミリーは SpoIDBIII 未記載のスポリゴタイプパターンである⁹⁾。従って、6本以下の *IS6110* RFLP バンドを有する結核菌のセカンドタイ

ピングとしてスポリゴタイピングが推奨されているが、大阪ファミリーが大部分を占めるためスポリゴタイピングの解像度はさらに落ちる。6本以下のIS6110 RFLP解析とスポリゴタイピングの解像度は他の一般的な論文で記載されているよりも高くはない。

VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats), MIRU-VNTR を含む

もう1つのPCRを利用したタイピング法、Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) は、結核菌遺伝子配列が発表された1998年に Frothingham and O'Connell によって報告された¹⁰⁾。この方法は、Exact Tandem Repeats 領域をタイピング部位に使用しているため、時に ETR-VNTR と呼ばれることがある。VNTR に引き続き、Supplyらは、他の反復領域、Mycobacterium Interspersed Repetitive Units (MIRU) を用いた、もう1つのPCRを利用したタイピング方法、MIRU-VNTR を発表した¹¹⁾。基本的には、VNTR と MIRU-VNTR は、タイピング領域が異なるだけで基本原理は同じ方法である。2003年に、西森敬は、ETR 領域と MIRU 領域を組み合わせた16種類の多型反復領域を使った VNTR を導入した。

われわれは、16種類の多型反復領域を用いた VNTR は IS6110 RFLP とほぼ同等の分別能を有し、IS6110 RFLP にて検出されたクラスターを検出できることを示した。また、われわれは結核菌 PCR 陽性となった喀痰からの直接 VNTR タイピングができることを示し、さらに大阪において16多型反復領域を用いた VNTR は有用であることも示した。IS6110 RFLP の結果は画像データであるが、VNTR の結果は、数値データである。VNTR データベースを作成することにより、喀痰からの直接 VNTR によりリアルタイムの結核菌発生をモニターすることが将来的に可能である。

喀痰からの直接 VNTR タイピングの実例を示す。患者は16歳の男児。父、母、叔母が当院にて結核加療歴有り。父、母が液体感受性試験にてストレプトマイシン耐性、イスコチン判定保留域の結核に感染したということが判明している。男児は保健所にて定期的に検診を受けていた。2003年、両肺尖に浸潤影が出現したので、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターに紹介になった。問題となったのは、少年の結核が両親と同じ菌によって発症しINH耐性であるのかどうかであった。当初、喀痰塗抹陰性が続き、喀痰結核菌PCRも陰性であったが、胃液の結核菌PCRが陽性となった。翌日胃液検体から直接VNTR解析の結果が判明した。その結果、VNTRパターンは父親、母親由来の結核菌株と一致し、家族内感染が明らかとなった。男児は、ストレプトマイシン耐性、イスコチン液体感受性にて判定保留域の結核

感染であろうということで注意深く加療された。約1カ月後、少年からの結核菌の液体感受性試験の結果が判明、父親、母親と同様にストレプトマイシン耐性、イスコチン液体感受性にて判定保留域であること、ならびにIS6110 RFLPパターンにて両親と同じパターンであることが明らかになった。

VNTRは結核菌PCR陽性検体から直接に解析でき、解析を16多型反復領域に増やして解析を行うことによりIS6110 RFLPと解像度がほぼ等しくなった。既にタイピングしてある多剤耐性結核患者と接触歴がある結核患者が排菌し、結核菌PCRが陽性となった場合、多剤耐性結核菌の発病か否かが数日で判明できる。VNTRの結果は数値データなので、容易にVNTRデータベースを構築することができ、直接結核菌PCR陽性検体を解析することにより結核菌発生をリアルタイムで監視することができる。データベースと発生したVNTRタイプを比較することにより毒性の強い、もしくは感染力の強い結核菌を見いだすことができる。VNTRデータベースと、OligoArray®のようなDNA chipにより解析した薬剤耐性遺伝子変異データベースとMICデータベースを組み合わせることで、将来的には、VNTRと薬剤耐性遺伝子変異情報によりある程度の薬剤感受性を数日で予想することができるであろう。結核感染対策ならびに公衆衛生の道具としてVNTRと薬剤耐性遺伝子変異解析を利用すると、結核菌感染経路をより精細に解析することが可能となる。

結 論

分子生物学の応用により、さまざまな結核菌の分子疫学解析法が可能となった。それぞれのタイピング法には利点と欠点があり、それらを有効に利用するにあたって各方法の特徴を熟知したうえで利用すべきである。分子疫学解析法が発達し利用可能になったとしても、接触者検診をおろそかにしてはならない。

文 献

- 1) van Soolingen D: Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med.* 2001; 249: 1-26.
- 2) van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PE, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis.* 1999; 180: 726-736.
- 3) van Rie A, Warren R, Richardson M, et al.: Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med.* 1999; 341: 1174-1179.
- 4) Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al.: Exogenous reinfection with tuberculosis on a European

- island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 ; 163 : 717-720.
- 5) Bandera A, Gori A, Catozzi L, et al. : Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2001 ; 39 : 2213-2218.
 - 6) Braden CR, Crawford JT, Schable BA : Quality assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping in a large laboratory network. *Emerg Infect Dis.* 2002 ; 8 : 1210-1215.
 - 7) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. : Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997 ; 35 : 907-914.
 - 8) Dale JW, Al-Ghusein H, Al-Hashmi et al. : Evolutionary relationships among strains of *Mycobacterium tuberculosis* with few copies of IS6110. *J Bacteriol* 2003 ; 185 : 2555-2562.
 - 9) Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, et al. : Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002 ; 8 : 1347-1349.
 - 10) Frothingham R, Meeker-O'Connell WA : Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 1998 ; 144 (Pt 5) : 1189-1196.
 - 11) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al. : Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000 ; 36 : 762-771.

————— The 79th Annual Meeting Symposium —————

CLINICAL APPLICATION OF TESTING METHODS ON ACID-FAST BACTERIA

Chairpersons : ¹Satoshi ICHIYAMA and ²Katsuhiko SUZUKI

Abstract Clinical bacteriology pertaining to acid-fast bacteria has made marked advances over the past decade, initiated by the development of a DNA probe kit for identification of acid-fast bacteria. Wide-spread use of nucleic acid amplification for rapid detection of tubercle bacillus contributed more greatly than any other factor to such advances in this field. At present, 90% of all kits used for nucleic acid amplification in the world are consumed in Japan. Unfortunately, not a few clinicians in Japan have a false idea that the smear method and nucleic acid amplification are necessary but culture is not. In any event nucleic acid amplification has exerted significant impacts on the routine works at bacteriology laboratories. Among others, collecting bacteria by pretreatment with NALC-NaOH has simplified the introduction of the collective mode smear method and liquid media. Furthermore, as clinicians have become increasingly more experienced with various methods of molecular biology, it now seems possible to apply these techniques for detection of genes encoding drug resistance and for utilization of molecular epidemiology in routine laboratory works. Meanwhile, attempts to diagnose acid-fast bacteriosis by checking blood for antibody have also been made, primarily in Japan. At present, two kits for detecting antibodies to glycolipids (LAM, TDM, etc.) are covered by national health insurance in Japan. We have an impression that in Japan clinicians do not have adequate knowledge and skill to make full use of these new testing methods clinically.

We, as the chairmen of this symposium, hope that this symposium will help clinicians increase their skill related to new testing methods, eventually leading to stimulation of advances in clinical practices related to acid-fast bacteria in Japan.

1. Smear microscopy by concentration method and broth culture system : Kazunari TSUYUGUCHI (Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center)

Smear microscopy and culture still remain the cornerstone to diagnose tuberculosis. However, the classical methods in Japan using direct microscopy and Ogawa solid media were not sufficient for clinical use. In recent years substantial advance has been made in these fields. Concentration of clinical samples by centrifugation improves the sensitivity of smear microscopy with excellent reproducibility. The *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) system using liquid media yields high sensitivity and rapidity. Using these methods, more and more tuberculosis cases would be correctly diagnosed and treated adequately based on drug susceptibility testing.

2. New technologies for anti-tuberculosis drug susceptibility testing : Satoshi MITARAI (Bacteriology Division, Reference Centre for *Mycobacterium*, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

Several new technologies have been developed to obtain anti-tuberculosis drug susceptibility testing (AST) results rapidly, utilising liquid culture and molecular technologies. *Mycobacterium* Growth Indicator Tube (MGIT), as a popular liquid culturing and AST system, was evaluated for its accuracy and usefulness. As for isoniazid, MGIT showed 12.6% of discordant result comparing with standard method. These MGIT resistant and Ogawa susceptible strains had relatively high MICs ranging 0.13 to 2.0 μ g/ml. The molecular detection of resistant gene mutation is also a useful method to estimate drug resistance rapidly. The *rpoB* mutation detection

is reliable with high sensitivity and specificity.

3. Nucleic acid amplification and novel diagnostic methods: Shunji TAKAKURA (Department of Clinical Laboratory Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine)

Sensitivities of nucleic acid amplification tests (NAATs) for the diagnosis of tuberculosis meet clinical requirement that patients with high-risk of transmission should be identified within a day. Comparison of the performance of various NAATs is difficult because of the difference in sample processing and in samples tested among methods and reports. Considering the limitations of NAATs (low sensitivity compared with culture, inability to differentiate dead bacilli from the living), further advances would be expected when novel technologies could confer additional information, such as drug susceptibility, quantity, viability, and genotype.

4. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex lung disease: Seigo KITADA (Department of Internal Medicine, National Hospital Organization Toneyama National Hospital)

Mycobacterium avium complex (MAC) organisms are ubiquitous in environment and a contamination in respiratory tracts is sometimes observed, and that complex the diagnosis. We developed a serodiagnostic method for MAC disease using an enzyme immunoassay with the MAC-specific glycopeptidolipid (GPL) core as antigen. A significant increase in GPL core antibodies was detected in sera of patients with MAC pulmonary diseases compared to patients who were colonized with MAC, patients with *M. kansasii* disease and tuberculosis and healthy subjects. The serodiagnosis is useful for diagnosis of MAC lung disease.

5. Molecular epidemiologic tools for tuberculosis: IS6110 RFLP, Spoligotyping, and VNTR: Tomoshige MATSUMOTO, Hiromi ANO, Tetsuya TAKASHIMA, Izuo TSUYUGUCHI (Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases)

We have performed molecular typing on about 1,300 culture positive clinical isolates that made up the majority of tuberculosis strains in part of southeast Osaka since 2001 until now. By spoligotyping, about 75% of entire strains belonged to the Beijing strain. Particular spoligotyping descriptions, which were not described in SpolDBIII, were found in the strains with lower than 6 copies of IS6110 RFLP. We described them as Osaka type. We could also show that direct typing from Tb PCR positive sputum of patients with tuberculosis was possible by VNTR and that VNTR with 16 loci was useful in tuberculosis typing in Osaka.

Key words: Acid-fast bacilli, Direct smear examination, Culture examination, Susceptibility testing, Nucleic acid amplification method, Serological testing, Molecular epidemiology

¹Department of Clinical Laboratory Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, ²National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Satoshi Ichiyama, Department of Clinical Laboratory Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8507 Japan.

(E-mail: sichiyam@kuhp.kyoto-u.ac.jp)