

第82回総会会長講演

結核院内感染対策とQFT

坂谷 光則

要旨：本邦での結核院内感染の機会は稀ではなく、結核病棟の有無にかかわらず、看護師を筆頭にして病院職員の結核罹患率は依然として高い。これまで、病院職員の結核感染の有無の判定は、ツベルクリン皮内反応の推移ないし反応絶対値で判断してきたが、新しい診断方法であるQFT検査がより特異的であり精度も高いと考えてよい比較試験結果を得た。院外の接触者検診におけるツベルクリン反応検査との比較検討でも、QFT検査結果のほうが、より正確に実勢を反映しているものと考えられた。病院職員の検診にQFT検査を導入することは、結核院内感染対策上で有益な手段になりうると考える。

キーワード：結核院内感染対策，ツベルクリン反応検査，QFT検査

はじめに

本邦における結核罹患率は順調に低下しつつあり、これまでのように一般市民に広く見られる疾病というよりも、ハイリスク集団に注目すべき疾患になりつつある。その集団の一つである、医療従事者における発病事例、院内感染事例は未だ多く、この集団はデンジャークラウドとして蔓延対策上でも重要な位置を占めている。医療従事者の健康管理の一環としての特別検診あるいは一般病棟で患者発生時の接触者検診で、結核感染の有無の判定は、通常はツベルクリン反応で行われているが、新しい検査法のQFT検査の、この領域での有用性について検討した。

病院職員における結核発病

国立病院機構所属の病院146施設にアンケートを実施し、88施設から回答を得た(回収率60.3%)。上記施設職員28431名における、平成17年までの3年間での結核患者発生数は39名であり、罹患率は45.7(対10万人)となる。この罹患率は結核病床を有する施設群では86.4と、より高率の傾向を示した。結核病床をもたない病院では、27.3と低値であったが、本邦での平均罹患率(平成15年で24.8)よりも高値である。

職種別にみると、看護職では73.2と最も高く、次いで検査技師等コメディカル群での35.7であり、医師職では10.4と低値を示した。性別・年齢で患者数をみると、看護職の多い女性例では20歳代に多く、男性例では40歳代が最も多い年齢層であった。発病発見動機は、定期検診と定期外特別検診での胸部エックス線撮影によるものが24例(62%)と最も多く、検診の有用性が認められるものの、症状があつて受診し診断された例も11例(28%)と低率ではない(図1)。

病院職員のツベルクリン反応検査とQFT検査

当院(近畿中央胸部疾患センター)では、職員の健康管理の一手段として、新規採用者に対してツベルクリン

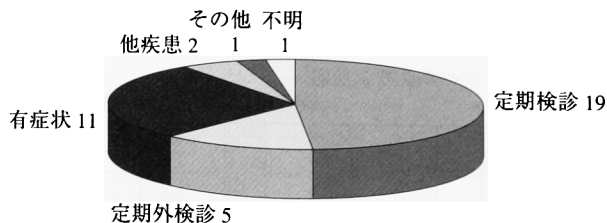


図1 結核発症例の発見動機

反応検査を二段階法で実施し、採用時の基礎値として記録しているが、反応の程度による例数分布は、年度ごとにばらつきが大きい。そこで、平成18年度当初に全職種を対象(259名)にしてツ反測定を実施し、年齢階層

別あるいは職種や結核病棟勤務年数による結核感染率の推測値(同年齢層における本邦での理論値の2倍と推計)と合致するかを検討した。同じ対象者で、結核感染の有無を判断する検査として近年普及が進んでいるQFT検査を、同時に実施した。QFT検査は対象者の新鮮血を検体として使用し、結核菌に特異的な2種の抗原蛋白を加えて培養する。体内に結核菌を有する個体では、血中の免疫担当細胞が抗原に反応し、培養上清中にサイトカインを分泌する。特にガンマ・インターフェロン濃度を測定し、その増加量によって陽性か陰性かを判断する。

ツ反検査は、図2の下段に示すように、年齢が高くなるほど反応が強くなる傾向を見るものの、50歳以上になるとかえって反応が弱くなり、相関に有意差は認められない。対象者全体での強陽性(強反応)者比率は53.3%となり、感染者比率の推計値を大きく上まわっていた。過去のBCG接種によってツベルクリン反応が陽性となっているうえに、職場で結核菌吸入の機会があるのでブースター効果が加わって、強い反応の出る職員が少なくないと推測される。一方、QFT検査の結果(図2上段)では、年齢との相関に有意差を認め、全体での陽性率も13%と妥当な数値に収まった。職種別(図3)の陽性比率、治療歴や予防歴の有無との相関、結核病棟勤務歴との相関(図4)なども、ツ反検査よりもQFT検査のほうが、予測される結果とよく合致していた。ツ反検査結果とQFT検査結果の関連性を図5に示すが、ツベルクリン反応が強いほどQFT検査陽性率は高くなるも

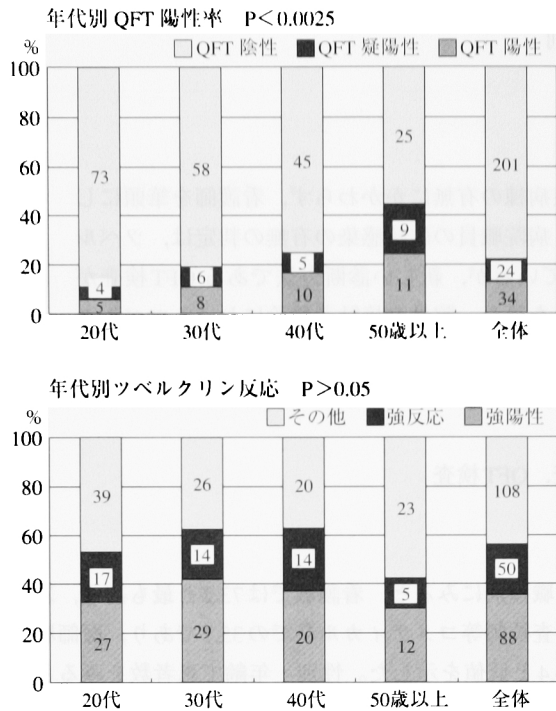


図2 年代別QFT陽性率とツベルクリン反応

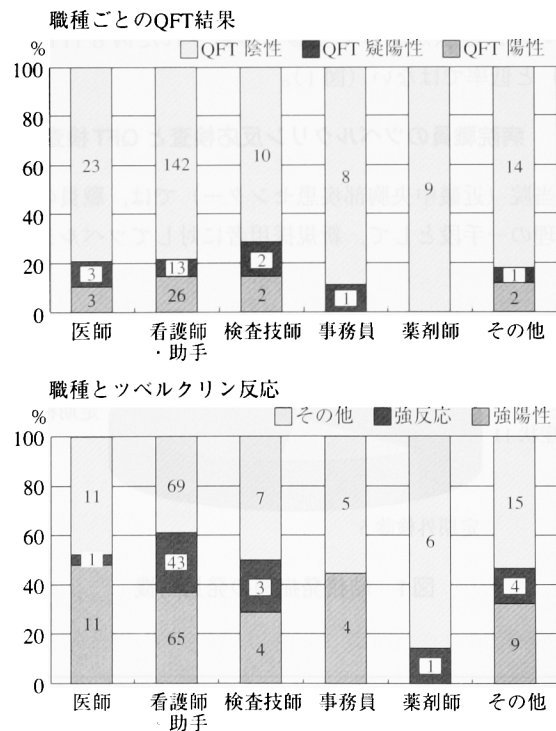


図3 職種別QFT結果とツベルクリン反応

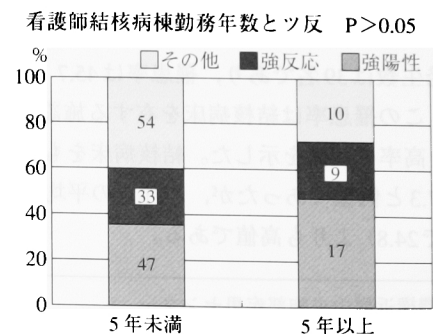
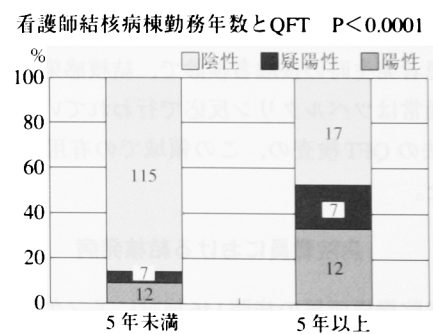


図4 看護師結核病棟勤務年数とQFT, ツ反

の、その相関程度は低く、水疱を形成する強い反応が見られる例において初めて、80%ほどの確率でQFT検査も陽性となり、両検査結果に一致性が見られる程度である。結核感染を確実に判断できる検査方法（ゴールデン・スタンダード）は未だ存在しないが、上記の結果からも、ツ反検査よりはQFT検査のほうが感染有無の実態をより正確に表しているであろうと考えられた。

接触者検診におけるツベルクリン反応検査とQFT検査

神戸市において、結核菌喀痰塗抹陽性患者発生に伴って同市保健所が実施する接触者検診の際に、ツ反検査とQFT検査を同時に行った。事例1は、特別養護老人ホームでの排菌者発生（ガフキー2号×2カ月）で、検診対

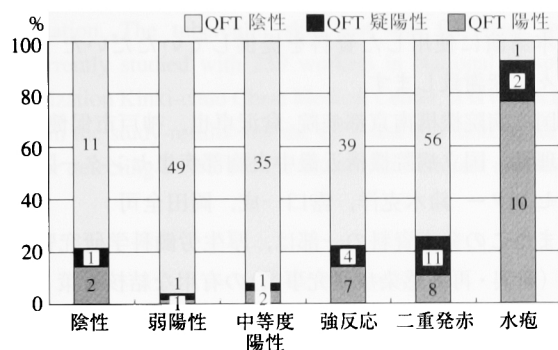


図5 ツ反程度と QFT 結果

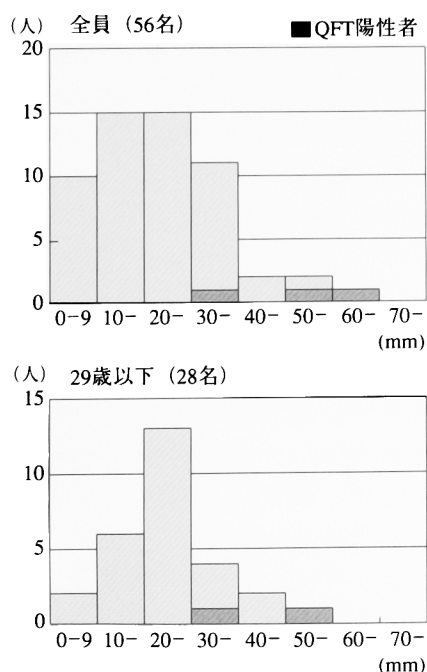


図6 事例1：ツ反発赤径

Index case: 83歳男性, bIII 2PI, ガフキー2号×2カ月
 検診対象者: 特別養護老人ホーム従業員58名 (20~60歳)

象者は56名 (20~60歳)。ツ反検査で径30mm以上の発赤を示した16名 (28%) 中、3名 (5%) がQFT検査陽性であった (図6)。事例2は、警備員の集団における患者発生 (ガフキー6号×6カ月) で、検診対象者は同僚27名 (38~73歳)。ツ反発赤が70mmの1名と、30mm台の5名中2名および29mm以下の21名中6名がQFT検査陽性 (33%) である (図7)。事例3は、塾教師が肺結核 (ガフキー1号×1カ月) を発病し、接触者検診 (小・中学生73名および成人2名) で、ツ反発赤が30mm以上の者が14名 (19%) あったが、QFT検査は全員が陰性であった (図8)。いずれの事例においても、患者の感染危険度から推計される伝染の実態は、ツ反よりもQFT検査結果に、より正確に示されていると考えられた。なお、対象者に対する予防服薬の勧奨は、両検査結果を勘案して行われ、これまでのツ反結果のみを判断基準にした判断よりも、服薬勧奨対象者数は少なくなり、ほぼ確実例のみに絞られたと考えられる。

院内感染対策と QFT 検査

結核に限らず、院内感染対策は、基礎に管理的対策 (システム) を置き、その上に衛生工学的対策 (施設機

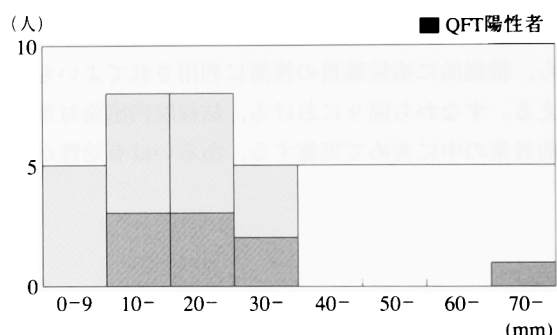


図7 事例2：ツ反発赤径

Index case: 63歳男性, rII 2PI, ガフキー6号×6カ月
 検診対象者: 警備員27名 (38~73歳)

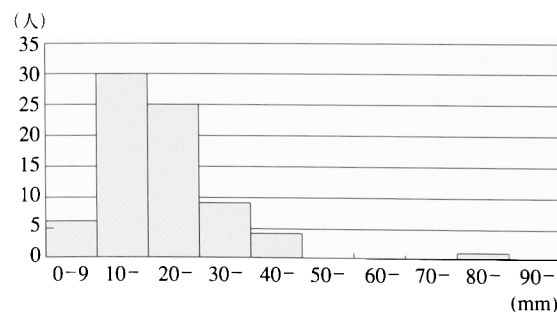


図8 事例3：ツ反発赤径

Index case: 58歳男性, lII 2, ガフキー1号×1カ月
 検診対象者: 小・中学生73名, 成人2名, QFT陽性者なし

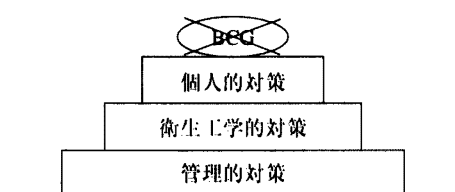


図9 結核院内感染防止策

器整備)と個人的対策(手洗い, 高性能マスク着用)を組み上げて実施される(図9)。結核感染対策の場合, この諸対策の最後に, 結核(特に多剤耐性結核)患者と接触する機会の多い職種に, BCGワクチン接種を加えることもあったが, 本邦のように乳幼児期に既に接種を受けている地域での, 成人に対する追加接種の有効性は否定的である。また上記したように, 患者と接触後の感染の有無を判断するための特別検診におけるツ反検査の判定にバイアスが入り, 明確に判断できなくなってしまうことになる。結核感染判定に使用される新しい検査方法であるQFT検査は, 菌検査陽性で確定診断を受けた患者群においても10%程度の偽陰性者が存在し, 乳幼児や免疫能低下者では偽陰性に傾きやすい, また結核菌が体内から消失した後も陽性反応が長期間継続する例があるなどの問題点は残るが, ツ反検査と比較して, 現時点では感度・特異度ともに優れていると判断されることから, 積極的に病院職員の検診に利用されてよいものとする。すなわち図9における, 結核院内感染対策の管理的対策の中に含めて実施する, あるいは有効性が不確

実な採用時のBCG接種を省き, 定期的なQFT検査に置き換えることは, 院内感染対策上で重要な部分を占める病院職員の結核感染の早期診断と発病を未然に防ぐ効果において, 優れているのではなかろうか。

おわりに

結核院内感染対策面で重要な部分である, 職員における罹患率の実情, また感染者を特定するためのツベルクリン反応検査とQFT検査の有用性比較, 併せて一般的な接触者検診における両検査の比較検討結果などについて報告し, QFT検査を本邦における病院職員検診の中に積極的に取り入れることを提案した。当院職員でのQFT検査の経年的変化に関して, 分析検討を継続する予定である。

謝 辞

本講演に使用した資料を提供していただいた下記の方々に深謝致します。

国立病院機構東京都病院 倉沢卓也, 神戸市保健所 藤山理世, 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 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司

またこの発表資料の一部は, 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)の有用な結核対策(BCG及び結核感染特異的診断に関する費用対効果分析等)に関する研究(坂谷光則班)によって実施されたものである。

————— The 82nd Annual Meeting President Lecture —————

THE QFT-TEST, A NEW TOOL FOR CONTROL OF NOSOCOMIAL
INFECTION OF TUBERCULOSIS

Mitsunori SAKATANI

Abstract In Japan, nosocomial transmission of tuberculosis from patients to hospital workers is not rare yet. The morbidity rate of tuberculosis among workers in national hospitals is higher (45.7 in 2003–2005) than the Japanese average rate (24.8 in 2003). The rate is especially high among nurses, indicating 73.2 in 3 years from 2003 to 2005.

Although the individuals with latent tuberculosis infection (LTBI) are usually detected by tuberculin skin test in contact investigation, determination is not strict in BCG-vaccinated individuals. A novel diagnostic method (QFT-2G; QFT-test) can detect TB infection regardless past history of BCG vaccination. The tuberculin skin test and QFT-test were concurrently studied with 259 workers in National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center. It is conjectured from the study-results that the QFT-test is a more accurate tool for detecting LTBI. Similar studies as 3 contact investiga-

tions in Kobe-city also came to the same inference.

Although QFT-test is still new, and some questions remain to be answered, that is a useful test in medical examination for hospital workers, providing a new tool for control of nosocomial infection of TB.

Key words: Measures against nosocomial transmission of tuberculosis, Tuberculin test, QFT test

National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Mitsunori Sakatani, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591–8555 Japan.
(E-mail: sakatani@kch.hosp.go.jp)

第82回総会教育講演

V. 多剤耐性結核

鈴木 克洋

キーワード：多剤耐性結核，化学療法，院内感染対策

はじめに

結核の克服においてイソニアジド (INH) とリファンピシン (RFP) の果たした役割はきわめて大きい。従って両者に耐性以上の結核を多剤耐性結核 (MDRTB) と呼ぶ。MDRTBが治療しがたいことは説明するまでもない¹⁾²⁾。従来 MDRTBは「作られる」疾患といわれてきた。しかし近年「うつされる」疾患であることも明らかになった。本稿では結核化学療法の基本と MDRTBがどのように「作られる」のかをまず概説し、ついで MDRTBの院内集団感染事例を通して「うつされない」方策を述べる。最後に当院の臨床データの一部を紹介しながら MDRTBの治療・予後について考えてみたい。

結核化学療法の基本と薬剤耐性の誘導

現在の結核化学療法の基本は、1970年代から80年代に多数行われた臨床研究の結果に各種実験の結果と理論的考察を併せて完成された。空洞を有する喀痰塗抹陽性の肺結核であれば、体内に1億から10億の結核菌が存在しその大部分は分裂の盛んな菌である。他に少数のまれに分裂する菌とわずかな休止状態の菌(パーシスター)が存在すると考えられている (Fig. 1)。初期2カ月間は菌量が多くかつ薬剤感受性も不明であるため、INHとRFPを中心に3～4剤投与する。INHは分裂の盛んな菌を殺菌する力が最も強く、化学療法開始2週間で生体内の菌量は100分の1以上に激減し、急速に感染性を失うとともに耐性菌が誘導される危険性も徐々になくなる(後述)。治療2カ月以降では盛んに分裂する菌はほぼ無くなり、まれに分裂する菌が主体となる。RFPはまれに分裂する菌に対する殺菌効果に優れており、以後4～7

カ月間INHとRFPを投与することでまれに分裂する菌が消失し臨床的な治癒となる(二相治療方式)。しかしパーシスターを殺菌する薬剤は現在のところないため、再発を完全に防ぐことはできない。

本来自然界には耐性結核菌は存在せず、単剤治療が行われて初めて出現する。多剤耐性結核は治療の失敗により作られるわけである。1990年代に主要な抗結核薬に対する耐性遺伝子が相次いで発見された (Table)。耐性結核菌はゲノムDNAの突然変異により生じる。幸い各薬剤の耐性遺伝子は独立しているのいきなり多剤耐性結核になることはない。INHは100万回分裂に1回、RFPは1億回分裂に1回突然変異で自然に耐性菌が生じることが知られている。先に述べたように患者体内には10億程度の結核菌が存在する。従って化学療法開始時点では常に極少量ながら単剤耐性菌が存在することになるが、多剤併用療法が行われていれば単剤耐性菌だけが増殖することはない。しかし例えばINHの単剤投与が行われた場合、INH耐性菌以外は急速に殺菌されるため突然変異で生じた少量の耐性菌のみが増殖し、1～2カ月のうちに耐性菌だけとなってしまふ。これが単剤治療による耐性菌の誘導である。最初は単剤耐性菌であるが、同様の失敗を繰り返すことで多剤耐性菌が誘導される。このように治療の途中で耐性になることを獲得耐性と呼ぶ。世の中に獲得耐性による耐性菌が蔓延してくると、最初から耐性結核菌の感染を受ける者が出てくる。これを初回耐性と呼ぶ。実際には初めて結核の治療を受けた際に既に耐性の場合初回耐性と、以前結核の治療歴があり再発・再治療時に耐性になっていた場合獲得耐性と判断する。しかし結核の再感染はまれではなく、再治療例の一部に再感染による初回耐性がまぎれていること

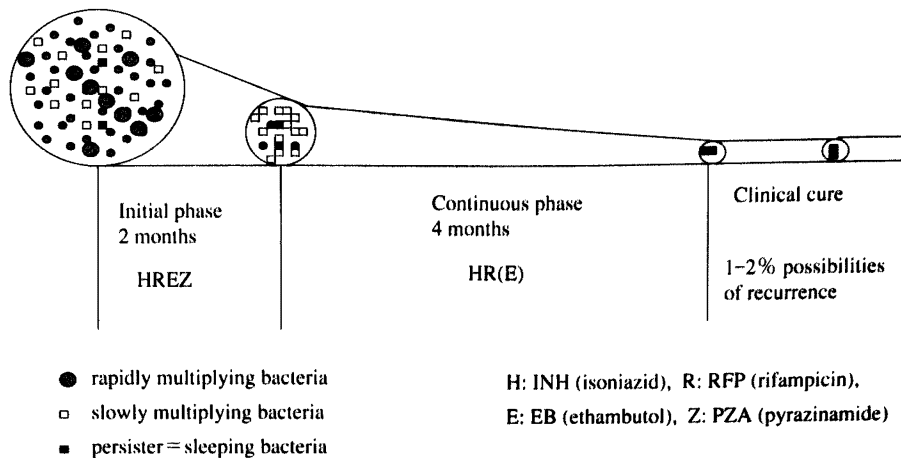


Fig. 1 Two phase therapy of tuberculosis

Table Drug resistant genes of *M. tuberculosis*

Drug	Gene	Function	Rate of resistance
INH	<i>katG</i>	catalase-peroxidase	50%
	<i>inhA</i>	enoyl-acyl reductase	20%
	<i>ahpC</i>	alkyl hydroxyperoxidase	15%
RFP	<i>rpoB</i>	RNA polymerase	95% <
SM	<i>rpsL</i>	ribosomal protein S12	50%
	<i>rrs</i>	16S ribosomal RNA	10%
EB	<i>embB</i>	arabinosyl transferase	47-65%
PZA	<i>pncA</i>	pyrazinamidase	72-97%

SM (streptomycin)

が現在証明されている。

先にも述べたとおり治療初期の菌量が多い時期に薬剤耐性が誘導されやすい。こんな時期に単剤投与することは実際にはありえないと思われるが、薬剤感受性が不明な時期にINH + RFP + ストレプトマイシン (SM) を投与したところ、後にINHとSMの耐性菌であることが判明するという事例は決してまれではない。結果的にRFP単剤投与と同じ状態となっている。われわれはこの状況でRFPに耐性が誘導され、多剤耐性結核となった症例を報告している³⁾。同様の薬剤耐性の誘導は副作用のため薬剤の中止を余儀なくされる状況でも起こりうる。このように結核を単剤で治療することは禁忌であり、常に有効薬が2剤以上投与されるように配慮することが結核化学療法の基本中の基本である。薬剤感受性結果判明までに従来長期間要していたことも耐性菌誘導の一因となってきた。現在液体培地を用いることで1ヵ月以内の感受性結果判明が可能となり、また4薬剤で開始するレジメンをできるだけ選択するため、先述したような事例は減少している。しかし現在のレベルに満足することなく薬剤耐性遺伝子変異を検索することで感受性検査の一層の迅速化を図ることが、院内感染対策の上から

も求められている (後述)。

MDRTBの院内感染

「結核の再感染はない。MDRTBは感染しない」というドグマがわが国では従来支配的であった。これは結核が蔓延していた時代の表面的な観察に基づく感想にすぎない。分子疫学の発展と結核患者の激減が実態を明らかにした。結核の再感染は今や世界的な常識であるし、MDRTBが感染することを否定する人もいない。むしろいつまでも多量に排菌が続くMDRTBは、化学療法を開始すると速やかに感染性を失う通常の結核よりうつりやすいと考える必要がある。われわれは病院内で全剤感受性結核治療中の患者にMDRTBが重感染した事例を報告した⁴⁾。再三記述しているので詳細は引用した文献に譲る。今やMDRTBの院内感染対策の手抜きは許されない時代となった。MDRTB患者は空気管理された個室に収容するのが常識であり、薬剤感受性結果がすべて一致した患者以外は決して同室にしてはならない。MDRTBを中途半端な治療で作らないことはもちろん、MDRTBを院内でうつさない配慮が現在重要な課題となっている。われわれは保存結核菌株に分子疫学的手法を用い、MDRTBと全剤感受性菌のクラスター形成率や北京型の比率に差がないことを報告した⁵⁾。MDRTBが通常の結核と同様にうつることを示唆する間接的な証拠である。

問題は喀痰抗酸菌塗抹陽性の肺結核患者を全員空気管理された個室に収容する余裕がわが国ではないという事情である。本来であれば薬剤感受性が判明するまで全員をMDRTBとして扱うのが理想である。治療が不十分で再治療となった例などMDRTBの危険性が高い少数例はとりあえず陰圧個室に収容しておく。大部分を占める初回治療例ではMDRTBの危険性は高々0.8%⁶⁾程度である。しかし思いもよらない患者が後にMDRTBと判明す

ることが後を絶たない。次善の策は、薬剤耐性遺伝子変異検出キットにより RFP 耐性の有無を可及的速やかに調べ、耐性と判明した場合個室隔離することである。現在ジェノスカラー・RifTB が保険適応となっており利用できる⁷⁾。RFP 耐性者の大部分は MDRTB であるが、後の薬剤感受性結果で MDRTB が否定されれば、個室隔離を解除すればよい。

MDRTB の治療

MDRTB の治療は薬剤感受性結果で有効な薬剤を、ピラジナミド、エタンブトール、ニューキノロン、アミノグリコシド、エチオナミド、サイクロセリン、パスの順から 4～5 剤選択し一気に投入することで行う。最後の治癒のチャンスと患者・主治医ともに覚悟を決め、少々副作用では薬剤を中止しない。空洞が 1 肺葉に局限しているなど、外科の適応がある場合は積極的に外科治療を加える。以上を達成するには初期 2～3 カ月間の入院治療が必須である。経過が良くても外来治療になっても決して治療をゆるめず、喀痰培養が陰性化してから 2 年以上化学療法を続けなければならない。当院で MDRTB 用病棟が整備された初期 40 例の経過と耐性薬剤数の関係を Fig. 2 に表示した。耐性薬剤数が多いほど予後が悪いことは明白である。治療の失敗で MDRTB となった場合は有効薬剤がかなり残っている。この段階で上記した治療を「腹を据えて」行えば十分治癒のチャンスはある。ここでさらに中途半端な治療をするといよいよ治癒の可能性は遠のく。最初から MDRTB に感染・発病した例では、有効薬剤がほとんどない例が多く、むしろ治療に難渋する。MDRTB を院内でうつさないことが大切なゆえんである。

おわりに

結核罹患率が低下すれば MDRTB も減少する。罹患率の低下に気を抜くことなく現在の結核対策を続けられ、少なくともわが国では、MDRTB は大きな問題にはならないと著者自身は考えている。今後は少なからず存在す

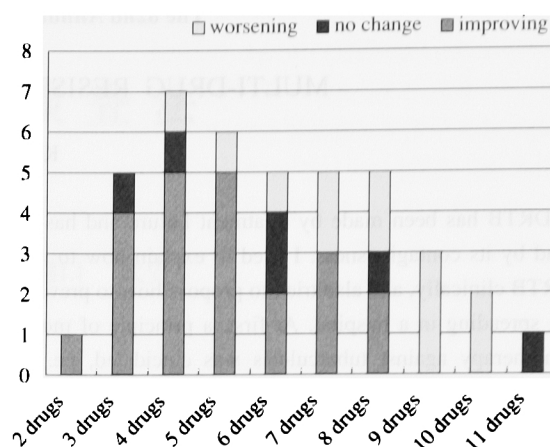


Fig. 2 Number of resistant drugs and therapy outcome

る慢性排菌患者の在宅治療の可能性を議論する必要がある。

文 献

- 1) Goble M, Iseman MD, Mackon LA, et al.: Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N Engl J Med.* 1993; 328: 527-532.
- 2) 吉山 崇, 尾形英雄, 和田雅子: 多剤耐性結核の治療成績. *結核.* 2005; 80: 687-693.
- 3) 鈴木克洋, 久世文幸: 耐性化薬剤の現況—抗結核剤. *臨床と研究.* 1997; 74 (9): 2199-2203.
- 4) 露口一成: 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例について. *複十字.* 2003; 293: 8-12.
- 5) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 他: 結核菌の分子疫学的解析—多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較—. *結核.* 2007; 82: 531-539.
- 6) Abe C, Hirano K, Wada M, et al.: Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001; 5: 46-52.
- 7) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他: Line Probe Assay (LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核.* 2000; 75: 575-581.

The 82nd Annual Meeting Educational Lecture

MULTI-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS (MDRTB)

Katsuhiro SUZUKI

MDRTB has been made by treatment failure and has also spread by its contagiousness. I tried to explain how to make MDRTB clinically, and also tried to propose how to prevent it from spreading in a hospital. At first, a principle of modern chemotherapy against tuberculosis was elucidated, i.e. "bi-phase method of treatment." Danger of mono-therapy, particularly functional one, was warned through a case report. Thus acquired drug-resistance was made, single at first, multi-drug thereafter. According to the increase of patients of acquired MDRTB, primary MDRTB patient has emerged through the direct contagion. We reported nosocomial outbreak cases of MDRTB, including re-infection to patients with pan-sensitive tuberculosis. Therefore, strict isolation of MDRTB with smear-positive sputum must be instituted in a tuberculosis ward. All smear-positive tuberculosis patients should be iso-

lated in a room against air-borne infection just in case of MDRTB. There are, however, not enough isolation rooms in tuberculosis ward in Japan. Rapid detection of rifampicin-resistance through the gene analysis must be done in this situation.

Key words: MDRTB, Chemotherapy, Prevention of nosocomial infection

National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Katsuhiro Suzuki, NHO Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: ksuzuki@kch.hosp.go.jp)

第82回総会シンポジウム

Ⅱ. 抗酸菌検査法

座長 ¹高嶋 哲也 ²樋口 武史

キーワード：迅速検査，精度保証，採痰指導，同定検査，遺伝子検査，感受性検査

シンポジスト：

1. わが国における抗酸菌検査の現状と精度保証
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）
2. 今回の結核菌検査指針改訂のポイント
阿部千代治（日本ベクトン・ディッキンソン（株））
3. 良質な検体とは一喀痰採取の方法等について—
樋口武史（京都大学医学部附属病院検査部）
4. 抗酸菌の培養・同定に関する最新情報
斎藤 肇（広島県環境保健協会）
5. 遺伝子検査の現状と将来展望
長沢光章（東北大学病院診療技術部）
6. 薬剤感受性成績を30日以内に報告するためには
小栗豊子（順天堂大学医学部附属練馬病院臨床検査科）

2000年に本学会抗酸菌検査法検討委員会は、結核菌検査診断技術の目覚ましい進歩と普及に鑑みて、「新結核菌検査指針2000」を刊行した。その後も相次いで、感度・特異度ならびに迅速性の向上を目指した検査法が開発・導入されている。そこで本委員会は、7年ぶりに結核菌検査指針の改訂を行い、現状に即した内容に整理することになった。「結核菌検査指針2007」は、塗抹検査を24時間以内に、結核菌の分離・同定を21日以内に、そして薬剤感受性結果を30日以内に報告することを求めたCDC勧告に沿った迅速検査体制の構築と抗酸菌検査の精度管理の普及に主眼をおいて執筆された。本シンポジウムは、この「結核菌検査指針2007」の改訂の主旨を広く知っていただくことを目的に企画した。

迅速検査体制の柱となる液体培養法や、液体培地を用

いた薬剤感受性検査あるいは遺伝子検査などがどの程度まで普及しているのか。また、近年の高度な手技が要求される抗酸菌検査の精度管理がどの程度まで行われているのか。その現状を知ることは今後の抗酸菌検査の方向性を議論するうえできわめて重要である。これらの点について結核予防会結核研究所の御手洗聡先生から「わが国における抗酸菌検査の現状と精度保証」と題してご講演いただいた。阿部千代治先生から「今回の結核菌検査指針改訂のポイント」と題して抗酸菌検査の意義、安全管理、検査材料、検査の回数などの臨床現場での留意点や、CDC勧告に合致する迅速検査体制など、今回の改訂ポイントを総論的にご講演いただいた。検査感度の向上のために、本指針では検体の品質管理にも力点を置いた。結核の約8割を占める肺結核の喀痰検査の感度向上は治療・診断のみならず感染対策上も重要であり、そのためには検体検査として適切な喀痰を採取することが重要である。この点に関して臨床検査に従事し、現場の課題を熟知している京都大学医学部附属病院の樋口武史先生から「良質な検体とは一喀痰採取の方法等について—」と題して、採痰指導の有用性を中心に講演をいただいた。抗酸菌検査の迅速性と感度の向上の観点から、培養は液体培養法が推奨され、同定は遺伝子検査法から、より迅速・簡便な免疫クロマトグラフィー法へと移行している。広島県環境保健協会の斎藤肇先生から「抗酸菌の培養・同定に関する最新情報」と題して、培養と菌種同定に関する最新の話をご提供いただいた。核酸増幅法に代表される遺伝子検査法は今や結核診療において不可欠であり、培養感度に匹敵する新しい遺伝子検査法も登場している。東北大学病院の長沢光章先生から「遺伝子検査の現状と将来展望」と題して、最新の

¹大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター，²京都大学医学部附属病院検査部

連絡先：樋口武史，京都大学医学部附属病院検査部，〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町54
(E-mail: higuchit@kuhp.kyoto-u.ac.jp)
(Received 12 Nov. 2007)

遺伝子検査法とその留意点についてご講演いただいた。今回の迅速検査体制構築の要である薬剤感受性検査法について、本指針では迅速性に優れる液体培地法を推奨した。順天堂大学医学部附属練馬病院の小栗豊子先生から「薬剤感受性成績を30日以内に報告するためには」と題して、液体培地を用いた迅速薬剤感受性検査の有用性とその課題についてご講演いただいた。結核菌検査は早期診断・早期治療や薬剤感受性検査結果に基づいた適正医

療の普及などの診療上だけでなく、院内感染対策や結核対策のツールとしても必須であり、その精度向上は重要である。そして、現状の入院期間短縮への方向性を鑑みると、わが国においてもCDC勧告に沿った迅速検査体制の構築は急務であり、今回の「結核菌検査指針2007」は時宜を得た改訂といえる。結核菌検査の精度管理の向上と迅速性に向けての本シンポジウムでの議論はわが国の結核医療のさらなる前進に寄与するものと期待する。

1. わが国における抗酸菌検査の現状と精度保証

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

結核を含む抗酸菌感染症の診断において、細菌学的検査が重要であることはよく認識されているが、その精度に関する臨床的関心は決して高いとは言えない。臨床的な関心の低さと実践上の困難性から、抗酸菌検査の精度保証活動は、内部精度管理を含めてあまり実施されていないのが現状と思われる。今回、結核菌検査指針が改訂されるにあたって、あらたに「精度保証」の項が設けられており、システムとしての精度保証が発展することが望まれる。ここでは、まず日本における抗酸菌検査と精度保証の現状について検討した。

わが国における抗酸菌検査は、そのほとんどが旧国立療養所等の院内検査室および衛生検査所（検査センター）で実施されているものと思われた。そこで、結核病床を有している病院および微生物検査実施を届け出ている検査センターを対象とし、抗酸菌塗抹、培養、同定、感受性検査、核酸増幅法にかかる一連の抗酸菌検査実施状況や精度保証活動内容を把握するためのアンケート調査を実施した。具体的には、病院および検査センター用に2種類の調査票を準備し、各設問に対して選択式の回答を得た。また、その際調査の信頼性のため、調査結果については一切匿名化し、施設名は公表しないことを文書にて明示した。2003年時点で結核病床を有している病院390施設および微生物検査実施を届け出ている検査センター397施設を対象として調査依頼を行い、それに

より、最終的に291（74.6%）の病院検査室と288（72.5%）の検査センターから回答を得た。平均は73.6%（579/787）であった。

結果として、病院検査室の99.7%（290/291）が抗酸菌検査を実施していたが、塗抹から培養・同定・薬剤感受性検査および核酸増幅法をすべて自施設で実施していたのは27.1%（79/291）であった。塗抹・培養は80%以上の施設が実施していたが、同定や薬剤感受性検査を実施していたのは半数以下であった。検査センターについては288施設から回答を得たが、そのうち150施設（52.1%）では微生物検査を行っているものの、抗酸菌検査は実施されていなかった。他の138の検査センターでは1施設を除いて塗抹検査を実施しており、培養検査も87.0%（120/138）で実施されていた。しかしながら、薬剤感受性検査は65施設（47.1%）のみで実施されており、核酸増幅検査については47施設（34.1%）でのみ実施されていた（Table 1）。

病院検査室と検査センターの両者を合計すると、2002年の全国の検査実施数は、塗抹検査が143万件、培養が151万件、菌種同定が9.1万件、薬剤感受性検査が7.4万件、核酸増幅法が約60万件であった。アンケート回収率から、これが日本全国のおよそ4分の3を反映していると仮定すると、塗抹・培養検査は年間約200万件実施されていると考えられた。

Table 1 Type of laboratory and examinations performed (multiple answer)

Examination	Number of laboratory (%)	
	Hospital (n=243)	Commercial (n=138)
Smear microscopy	243 (100)	137 (99.3)
Culture	211 (86.8)	120 (87.0)
Species identification	122 (50.2)	77 (55.8)
Drug susceptibility testing	134 (55.1)	65 (47.1)
Nucleic acid amplification	96 (39.5)	47 (34.1)

続いて各検査法について検討した。塗抹検査については、迅速性のために直接法を実施している施設は病院と検査センターでそれぞれ70.8% (172/243) と81.0% (111/137) であった。一方、集菌法実施がそれぞれ40.3% (98/243) と29.9% (41/137) あり、両方を実施している施設もそれぞれ11.1%と10.9%であった。定期的な染色液のチェックは病院では33.0%、検査センターでは69.3%で行われていたが、病院では72.8% (177/243) で検査時染色コントロールを実施していないと回答した。塗抹検査の結果は、病院では97.5% (234/240)、検査センターでは80.3% (110/137) で24時間以内に報告されていた。

培養検査については、回答(複数回答)を得た病院検査室206施設と検査センター118施設の全施設で固型培地を利用しており、病院では43.7% (90/206)、検査センターでも28.0% (33/118) で液体培地も使用されていた。塗抹陽性における培養陽性率が90%以下の施設が病院で49.7% (103/207)、検査センターで33.0% (38/115) あり、雑菌混入率が適正な値といわれている2~5%となっていたのは病院検査室で43.1% (90/209)、検査センターで39.0% (46/118) であった。培養陽性の結果報告までの期間が平均2週間以内であったのは、病院で15.3% (32/209)、検査センターで4.2% (5/118) であった。病院の96.6% (199/206) および検査センターの72.4% (76/105) で培養コントロールが実施されていなかった。

抗酸菌菌種同定検査については遺伝子ベースでの同定が推奨されているが、病院検査室の15.6% (19/122) と検査センターの75.8% (50/66) でいまだにナイアシンテストが実施されていた。これは臨床からの要求によるものと考えられた。

薬剤感受性検査時に標準株をコントロールとして同時に試験していた施設は病院で31.8% (41/129)、検査センターで43.6% (17/39) であった。感受性検査結果の報告は米国CDCの勧奨では1カ月以内となっているが、これを満足したのは、病院では17.3% (23/133)、検査センターでは18.8% (9/48) であった。

核酸増幅法についてみると、この当時多くの施設はアンプリコアを利用しており、陽性・陰性の反応コント

ロールを毎回実施しているのは病院で82.3% (79/96)、検査センターで96.2% (25/26) であった。

外部精度評価の実施について Table 2 に示した。病院検査室の60.0% (145/243)、検査センターの46.7% (64/137) が外部精度評価の実施なしと回答したが、塗抹検査では検査センターの40.9% (56/137) が、核酸増幅法では病院の34.6% (84/243) と検査センターの23.4% (32/137) が参加経験ありと回答した。核酸増幅法で外部精度評価の実施が比較的多かったのは、精度評価を行う研究会の存在と、検体の準備が比較的容易であることによるものと思われた。

精度保証の一環として検査室環境について質問した結果、細菌検査室を分離・独立させている施設は病院で92.6% (225/243)、検査センターで100% (138/138) であった。安全キャビネットの使用率は病院で80.2% (194/242)、検査センターで79.3% (107/135) であったが、薬剤感受性検査を実施する際の安全キャビネット使用はそれぞれ93.3% (125/134) と90.6% (58/64) であった。しかしながら、検査技師の健康診断を実施していないと回答した施設が病院で13.2% (31/235)、検査センターでも9.0% (12/133) あった。抗酸菌検査に関するトレーニングについても、定期的に参加しているのは病院では0% (0/226)、検査センターでも3.2% (4/124) であった。

2003年時点での抗酸菌検査実施状況について調査したところ、集菌法の実施が増加しており、液体培地での培養実施も進んでいた。この傾向は現在も続いていると考えられる。抗酸菌検査精度保証の実態は、内部精度管理・外部精度評価ともに不十分なものであり、特に塗抹、培養、薬剤感受性検査における精度管理用検査コントロールの実施は低率であった。外部精度評価は核酸増幅法では比較的高率に実施されていたが、他の検査については低率であった。これはパネルテスト等に関する具体的な方法が確立されていないことや、実施に必要な経費等の問題によるものと考えられた。また、検体の質の保証、検査コントロールの重要性の認識、トレーニング(初期あるいはリフレッシュ)に対する意欲なども不十分かと思われた。

Table 2 Implementation of external quality assessment (multiple answers)

Examination	Number of laboratory (%)	
	Hospital (n=243)	Commercial (n=137)
Smear microscopy	18 (7.4)	56 (40.9)
Culture	6 (2.5)	18 (13.1)
Species identification	9 (3.7)	14 (10.2)
Drug susceptibility testing	10 (4.1)	24 (17.5)
Nucleic acid amplification	84 (34.6)	32 (23.4)
No external assessment	145 (60.0)	64 (46.7)

精度保証の基本は、再検査やパネルテストによる現状の把握を実施し、その結果に基づいて改善活動を行い、再度テストを行って改善を確認し、これを一つのサイクルとして繰り返すことにある。抗酸菌検査は現在も広範

に実施されており、感染症法の改正にも鑑みて、安全な検査環境と系統的な精度保証システムが必要と考えられた。

2. 今回の結核菌検査指針改訂のポイント

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 阿部千代治

1. 安全管理

結核菌検査にはエアロゾル発生頻度の高い操作が多いこともあり、濃厚な検査材料を毎日取り扱う検査技師の結核発病率は一般の人より数倍高い。結核菌検査に関するバイオセーフティマニュアルにみるように、結核菌群に属する菌はバイオセーフティレベル3、ほとんどの非結核性抗酸菌はレベル2に分類されている。また公布された感染症法では結核菌は4種病原体、多剤耐性結核菌は3種病原体に分類されており、結核菌検査はクラスIIの安全キャビネットを備えたレベル2以上の設備のもとで行わなければならない。検査室内では専用のガウン、N95マスク、ディスポーザブル手袋を着用する。作業に当たってはエアロゾル発生の最も少ない方法を選択する。作業終了後に安全キャビネットや実験台を噴霧消毒し、その後殺菌灯を点灯する。使用後の材料や器具は高圧蒸気滅菌処理をする。またバイオテロを防ぐために分離された結核菌は鍵のかかる部屋または保管庫で保存しなければならない。検査に従事する検査技師は採用時または細菌検査室への配置前に QuantiFERON-TB 検査を受ける。ハイリスクグループでは年2回の定期健診を受ける。

2. 検査の方法

(1) 検査材料および検査回数

提出された喀痰が適切なものかどうかは検査の精度を保持するうえで重要である。第2章「検査材料」の項に「採痰指導」が加えられた。8～24時間間隔で3回喀痰を採取、少なくとも1回は早朝痰を採取する。但し初回の検査で2+以上であれば3回の検査は必要ない。幼児や高齢者などで喀痰の排出が困難な場合に誘導喀痰や胃液の検査をすることは有効である。3回の塗抹検査が陰性の場合に塗抹および培養検査を行った日とは別の日に気管支鏡を用いた検査を保険診療で行うことができる。

(2) 塗抹検査

均等化・遠心集菌材料の塗抹を勧める。本指針では剝離対策のために剝離防止処理したスライドの使用を勧め

ている。「新結核菌検査指針2000」で推奨したことで塗抹検査に蛍光法を取り入れた施設が増加した。蛍光染色として、オーラミンO染色に、新たにアクリジンオレンジ染色法が取り上げられた。オーラミンは菌体周囲の脂質を染色するのに対し、アクリジンオレンジは核酸を染色する違いがある。

(3) 検体の前処理

前処理の目的は検査材料を消化・均等化し、含まれる雑菌を殺し抗酸菌のみを選択的に培養することにある。NALC-NaOH処理のみでは汚染が除去できない検体があること、1つの検体を一般細菌の培養にも使用するケースがあることなどから、セミアルカリプロテアーゼによる消化・均等化が推奨されている。また遠心補助剤を使用した前処理法など新たに開発された前処理法の有効性が証明されており、この改訂書に加えられた。

(4) 培養検査

迅速な検査結果の報告が求められている。発育インジケーター付液体培地として、KRD培地が加えられた。抗酸菌自動培養システムとして、BACTEC MGIT 960、バクテアラート3D、BACTEC 9000自動血液培養システムが取り上げられている。本検査指針では初回分離に液体培地と卵培地(固形培地)を1本ずつ用いることを勧めている。しかし、検査室の受容力や液体培地の価格の問題があることから施設内で検討する。3回の培養に液体培地のみを用いるのではなく、1回は固形培地を用いる。

(5) 分離抗酸菌の鑑別・同定

結核菌と非結核性抗酸菌の早期の鑑別は適切な患者管理と治療のうえで重要である。結核菌群特異抗原をイムノクロマトグラフィーにより検出するキャピリアTBは簡便であり、液体培地と併用することにより迅速かつ簡便に結核菌と非結核性抗酸菌を鑑別でき有用である。液体培地の導入により非結核性抗酸菌の分離頻度が高まった。現在100種以上の抗酸菌種が報告されており、従来からの培養・生化学的性状や市販の遺伝子診断キットでそれらを同定することは不可能である。複数の遺伝子の塩基配列を決定し同定する方法が報告されている。検査

可能な施設に同定を依頼する必要がある(第5章「抗酸菌の同定」を参照)。

(6) 遺伝子検査

初回診断時の3日間の塗抹および培養検査に加え、核酸増幅法による検査を1回保険診療で行うことができる。喀痰塗抹陽性例では患者管理のうえで結核か非結核性抗酸菌かを早急に鑑別する必要があり、検体入手後1~2日で結果が得られる核酸増幅法による検査は有効である。「新結核菌検査指針2000」の出版後に体外診断薬として承認、保険収載されたコバスTaqMan MTB, TRCRapid M.TB, 結核菌群リファンピシン耐性遺伝子同定検査が改訂書に加えられた。“非結核性抗酸菌症の診断において核酸増幅法はあくまで補助的診断であり診断基準に含めない”とする非結核性抗酸菌症対策委員会の見解から、塗抹陰性の場合に*M. avium*または*M. intracellulare*の検査は行わない。

(7) 薬剤感受性検査

日本結核病学会が小川培地を用いる比率法を承認し、標準法として使っている。小川培地を用いる比率法は結核菌ならびに*M. kansasii*の抗結核薬に対する感受性検査法である。*M. kansasii*以外の非結核性抗酸菌について、小川培地を用いる薬剤感受性検査は行わない。これは感受性検査結果と臨床応答との間に関連はみられないからである。

薬剤感受性検査は最も精度管理の難しい検査である。

米国のCLSIは精度を保持するために寒天培地または液体培地の使用を勧めている。わが国でも検査精度に加え迅速性が重視され、液体培地が取り入れられつつある。この改訂書でもBACTEC MGIT 960 AST, マイクロプレートを用いるMIC測定法などが取り上げられた。

(8) 精度保証

検査精度をチェックするために精度管理テストは必須である。日常行う内部精度管理に加え、定期的に外部施設による精度管理も取り入れる必要がある。実施している施設と連絡先が記述された。

3. 今求められている検査

1980年代の中期から1990年代の初期にかけて米国の結核罹患率が急増した。特にHIV感染に伴う結核は診断が難しいうえに病気の進行が速いこともあり、米国のCDCは検査室に迅速な結果報告を求めた。その目標は、塗抹の結果を24時間以内・培養の結果を21日以内・感受性結果を30日以内に担当医に報告するというものである。現在入院期間の短縮が求められている。そのためには感受性結果をできるだけ早く報告する必要がある。

検査結果は患者管理や治療に結びつくことから迅速性に加え高い精度が要求される。精度の善し悪しは新たに耐性菌を作ることにもつながる。定期的な内部精度管理が求められる。

3. 良質な検体とは—喀痰採取の方法等について—

京都大学医学部附属病院検査部 樋口 武史

はじめに

良質な喀痰の採取方法として採痰指導を取り上げ、その有用性について解説する。また「結核菌検査指針2007」の第2章「検査材料」、および第3章「塗抹検査」の変更点についても併せて概説する。

採痰の原理

細気管支などの末梢付近にある喀痰を体外に排出するには、その気管支の奥(肺胞側)に空気を送り込み、腹筋などを利用することにより空気を圧縮して喀痰を気管支のほうへ押し上げて排出する方法と、気管支を拡張させて肺胞まで空気を十分に送り込み、気管支内壁に付着した喀痰を剥ぎ取るようにして排出する方法がある。いずれの方法も、深呼吸によって肺全体の容積を拡張させ十分に空気を取り入れることがポイントである。肺のす

みずみまで十分に空気を取り込まれた状態から腹筋を一気に収縮させ咳嗽させる。このとき、約200 cmH₂Oに高められた気道内圧で気管に生じる気流速度は、約1,000 km/hに達することが知られており、これはジェット気流に匹敵する速度である。この気流を効率よく利用することで、喀痰は気道へと押し上げられ体外に排出される(Fig.)。この原理に基づいた呼吸運動を行わなければ容易に痰を排出することはできない。具体的には痰を排出させる手段としてスクイーピングなどの理学療法を習得することがポイントになる。

採痰指導の有用性

2000年9月1日から2001年8月31日の1年間に呼吸器内科外来を受診した患者163人(指導無群)と2001年9月1日から2002年8月31日の1年間に同外来を受診した患者161人(指導有群)から採取した喀痰について

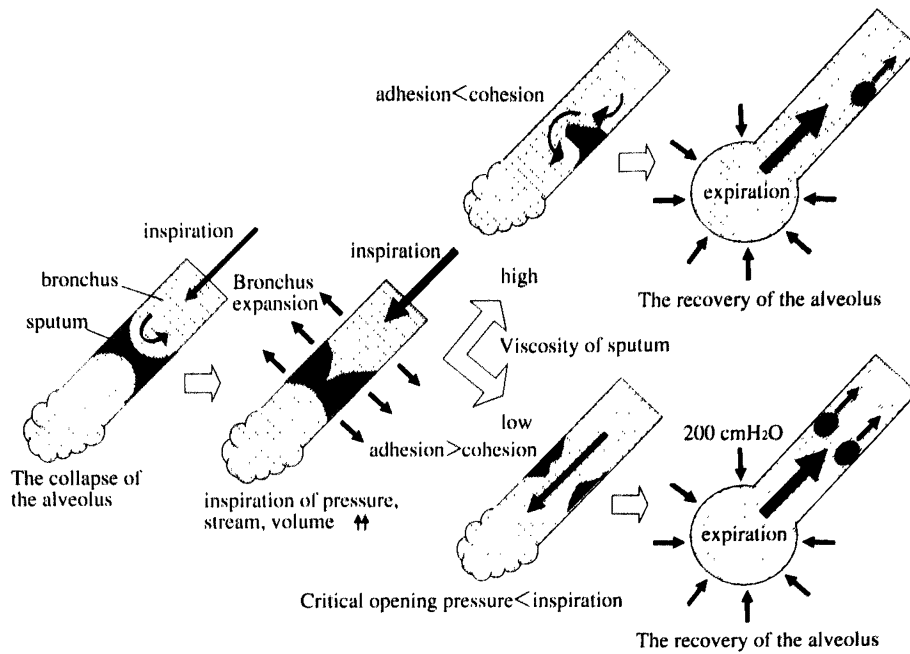


Fig. The mechanism of expectoration

採痰指導の有用性を評価した。その結果、M1 および P1 喀痰は、指導無群では21.5%、21.5%、指導有群では8.1%と36.6%であった。M2、P2、P3 喀痰は両群で大きな差を認めなかった。塗抹陽性率は、指導無群10.4%、指導有群21.1%であった。M2、P1、P2の肉眼的性状別での陽性率は、指導無群で11.1%、11.4%、30.8%で、指導有群では17.6%、28.8%、26.3%であった。これらの塗抹陽性患者（指導無群17名、指導有群34名）での空洞の有無、病巣の拡がりから判定した胸部X線所見で、指導無群は指導有群に比べて空洞型で中～高範囲の病巣を有する重症型を多く含んでいた。この結果から採痰指導有群で見られた喀痰の肉眼的性状や塗抹陽性率の向上は、患者重症度の差に由来する可能性は否定された。採痰指導は、塗抹陽性率を向上させるのに有用であることが証明された。

「結核菌検査指針2007」の変更点

第2章「検査材料」の変更点

検体の品質管理が重要であることを強調し、特に喀痰採取の方法として採痰指導の項目を付記した。検体およ

び菌株の輸送に関する項目を第8章「精度保証」へ移動した。

第3章「塗抹検査」の変更点

塗抹標本の剥離対策として推奨していたタンパク液に替え、MASコートやAPS（シラン）コートなどの剥離防止処理したスライドガラスの使用を推奨した。染色はオーラミンO蛍光染色法を推奨した。ただし、オーラミンOは発癌性物質であるため、試薬の安全性、安定性が優れているアクリジンオレンジ染色法を新たに追加した。塗抹結果の記載法の一部を訂正した。

まとめ

結核の確定診断には、感染病巣から採取された検体を用いて細菌学的に結核菌を証明することが重要である。喀痰は品質管理上最も重要かつ難しい検体であり、医療従事者は患者の病態を反映した検体が採取できるように最大限努力する必要がある。したがって、採痰指導などのいろいろなアプローチを行い、積極的に喀痰採取に関与することが抗酸菌検査の精度向上に大きく関与する。

4. 抗酸菌の培養・同定に関する最新情報

広島県環境保健協会 斎藤 肇

はじめに

抗酸菌の分離培養は、塗抹染色よりも感度が高く菌を検出でき、また分離菌の鑑別・同定や薬剤感受性試験などを行うことができる。以下にこれらのうち、分離培養法ならびに従来法による分離菌の鑑別・同定法について、最新情報をまじえながら述べる。

I. 分離培養法

[A. 前処理法]

喀痰などの汚染検体を消化・均質化し、混在する抗酸菌以外の細菌を殺して (decontamination)、抗酸菌のみを選択的に培養する方法で、NALC-NaOH法が広く用いられてきた。最近では、検体をあらかじめセミアルカリプロテアーゼ (商品名: スプタザイム, プレソルブ) で溶解・均質化し、NALC-NaOH溶液が効率よく作用し、かつ、分離培地の雑菌汚染の低減を図ろうとする方法が推奨されている。分離培養を行うにあたっては、所定濃度の水酸化ナトリウム溶液を用い、かつ検体の処理時間に留意すべきである。

(1) N-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム (NALC-NaOH) 法

NALC-NaOH (終末1~2%) 溶液で喀痰を消化・汚染除去し、リン酸緩衝液で希釈後、3,000×g、20分遠心し、沈渣を少量の同種緩衝液に再浮遊させて、培地へ接種する方法である。NALC-NaOH液に加えてあるクエン酸ナトリウムは喀痰中に存在するであろうNALCの不活化重金属イオンをキレートし、NALCに安定性を与えるものである。本法は米国CDCで開発され、推奨される方法である。

(2) 抗酸菌検出用キット“ニチビー” (ニチビー法)

CC-Eキット (前処理液) と遠心集菌剤 (K-8) よりなる。CC-EキットはCC-E液 (喀痰膨潤剤加2%NaOH) とCC-E助剤 (長期安定型NALC溶液) からなり、喀痰処理時間の短縮と処理能の増強とを図ったものである。処理喀痰をリン酸緩衝液で希釈し、K-8 (塩化ポリアルミニウム) を加えると、陰性荷電の菌体と陽性荷電のK-8とが凝集物を作るため、菌を低速 (1,600×g)、短時間 (5分) で濃縮でき、沈渣をリン酸緩衝液に再浮遊後、培地へ接種する。

われわれが本法およびNALC-NaOH法で処理した喀痰380検体をMGIT 960システムおよび2%小川培地で

培養した際の抗酸菌検出成績は、両検体処理法間に有意差を認めなかった。

(3) 抗酸菌検査用喀痰前処理キット セントラップMB「ニッスイ」

喀痰をA試薬 (NALC-NaOH溶液) で処理後、B試薬 (吸着担体生成試薬) を加え、生じた白濁不溶性沈殿物を2,000×g、10秒間遠心し、沈渣をC試薬 (懸濁試薬) へ再浮遊し、培地へ接種する。

[B. 培地]

わが国で用いられている抗酸菌の分離培地は、固型培地としては小川培地、液体培地としてはMGITが広く用いられているが、マイクロコロニーの早期検出と形態観察、集落形成単位 (CFU) の測定には寒天をベースとした平板培地が有用である。この場合、CO₂ふらん器内での培養が必要である。

われわれは、NALC-NaOH処理喀痰431例についてのKRD培地“ニチビー” (液体培地) による抗酸菌分離培養成績がBACTEC 960 MGITシステムと遜色なく、小川培地よりも有意にすぐれていることを報告している。

初診時における3回連続検痰に用いる培地の組合せは検査施設の事情により異なるが、発育支持能と迅速性にすぐれた液体培地と固型培地 (2%小川培地) との併用が望ましく、以下のような組合せが考えられよう。

① 3回とも液体培地と小川培地の併用、② 2回は液体培地と小川培地の併用・1回は小川培地のみ、③ 1回は液体培地と小川培地の併用・2回は小川培地のみ。他方、液体培地使用困難な施設では小川培地を主軸とし、塗抹陰性であっても結核の疑いが強い場合、あるいは塗抹陽性であっても治療上あるいは疫学上、結核菌を早期に検出・同定することが強く望まれる場合には液体培地を併用することが望ましい。

II. 同定

抗酸菌を迅速に同定することは、患者の治療方針の決定のためのみならず、疫学面からもきわめて重要である。

[A. 抗酸菌種]

承認・提案されている抗酸菌種をヒトに対する起病性別にみるとTable 1に示すようである。

1. *Mycobacterium tuberculosis* complex (結核菌群)

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* に加え、近年 *M. canettii* (van Soolingen D, et al. 1997), *M. pinnipedi*

Table 1 Description of mycobacterial species

Category group	Involvement in human disease				
	Common	Rare		None	
Slowly growing mycobacteria	TB complex <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> * <i>M. africanum</i> *	<i>M. microti</i> <i>M. caprae</i> <i>M. canettii</i>	<i>M. pinnipedii</i>		
	I# <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>			
	II <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> * <i>M. ulcerans</i> *	<i>M. gordonae</i> <i>M. heckeshornense</i> <i>M. intermedium</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. shinshuense</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. bohemicum</i>	<i>M. interjectum</i> <i>M. nebraskense</i> <i>M. palustre</i> <i>M. parascrofulaceum</i> <i>M. parmense</i> <i>M. saskatchewanense</i>	<i>M. botniense</i> <i>M. cookii</i> <i>M. doricum</i> <i>M. farcinogenes</i> <i>M. hiberniae</i> <i>M. kubicae</i> <i>M. tusciae</i>	
	III <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. malmoense</i> *	<i>M. branderi</i> <i>M. celatum</i> <i>M. genavense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. terrae</i>	<i>M. triplex</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. heidelbergense</i> <i>M. lacus</i> <i>M. sherrisii</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> <i>M. gastri</i> <i>M. lepraemurium</i> <i>M. montefiorensis</i> <i>M. shottsii</i> <i>M. triviale</i>	
Rapidly growing mycobacteria	Nontuberculous mycobacteria IV <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> <i>M. goodii</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. boenickei</i> <i>M. brisbanense</i> <i>M. canariensis</i> <i>M. conceptionense</i> <i>M. elephantis</i> <i>M. houstonense</i> <i>M. immunogenum</i> <i>M. manitobense</i> <i>M. massiliense</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. neworleansense</i> <i>M. novocastrense</i> <i>M. parmense</i>	<i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. senegalense</i> <i>M. septicum</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. wolinskyi</i>	<i>M. agri</i> <i>M. aichiense</i> <i>M. album</i> <i>M. alvei</i> <i>M. aurum</i> <i>M. austroafricanum</i> <i>M. brumae</i> <i>M. chitae</i> <i>M. chlorophenicum</i> <i>M. confluentis</i> <i>M. chubuense</i> <i>M. diernhoferi</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. fallax</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. frederiksbergense</i> <i>M. gadium</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. hackensachense</i>	<i>M. hassiacum</i> <i>M. hodleri</i> <i>M. holsaticum</i> <i>M. komossense</i> <i>M. madagascariense</i> <i>M. moriokaense</i> <i>M. murale</i> <i>M. obuense</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. phlei</i> <i>M. poriferae</i> <i>M. pulveris</i> <i>M. rhodesiae</i> <i>M. sphagni</i> <i>M. tokaiense</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. vanbaalenii</i>

(Boldface) Previously reported mycobacteria associated with human diseases in Japan.

*Mycobacteria frequently involved in human disease in some particular counties or areas. *M. leprae* can not be cultured *in vitro*.

"*M. visibilis*" is usually difficult in cultivation.

*Runyon's classification.

(Hajime Saito, 2007).

(Cousins DV, et al. 2003), *M. caprae* (Proding WM, et al. 2005) が報告されている。いずれもヒトに対して病原性を有する。

2. Nontuberculous mycobacteria (非結核性抗酸菌)

主として、肺結核類似症の原因菌として、稀に分離される抗酸菌について、自験例を中心に簡単に述べる。

(1) I 群菌

新種として *M. intermedium* (Meier A, et al. 1993) が報告されているが、集落は光発色性ではなく、暗発色性で、II 群菌である。著者らもその 1 例を報告している。

(2) II 群菌

① *M. lentiflavum* (Springer B, et al. 1996) : 脊椎椎間板

炎病巣から分離・命名された。岩本・著者らは肺疾患患者の喀痰・気管支洗浄液から分離された 8 株を本菌と同定し、これらを 3 遺伝子型に分類した。

② *M. heckeshornense* (Roth A, et al. 2000) : *M. xenopi* にきわめて近似した表現型性状を有し、また DDH テストでは *M. xenopi* と同定される。著者らは、わが国で分離・保存されている *M. xenopi* 12 株中 6 株を *M. heckeshornense* と同定した。両菌種はアシルスルファターゼテスト (3 日法)、16S rDNA 配列決定により鑑別可能である。

③ *M. ulcerans* (MacCallum P, et al. 1948) と *M. shinshuense* (Tsukamura M, Mikoshiba H, 1982) : *M. shinshuense* と *M. ulcerans* の異同性については未だ明らかでない。共に毒

性脂質マイコラクトンを産生し、ヒトの進行性皮膚潰瘍をおこす。両者は、地理的分布、若干の生化学的・分子遺伝学的性状を異にする。*M. shinshuense* 感染症は日本（4例、うち1例はNHO東広島医療センター症例）および中国（1例）からの報告例がある。

(3) III群菌

① *M. avium* complex: MACには *M. avium* (subsp. *avium*, subsp. *paratuberculosis*, subsp. *silvaticum*, subsp. *hominissuis*), *M. intracellulare* および *M. chimaera* (Tortoli E, et al. 2004) が含まれる。*M. avium* 肺感染症は東・北日本に、*M. intracellulare* 肺感染症は西日本に多いことを著者ら（1989年）がはじめて明らかにし、諸家により追認されてきたが、佐藤（名古屋市大）が2001年および2007年の2回にわたり行った全国アンケート調査で、西日本でも *M. avium* 感染症の増加が認められている。

最近、岩本・著者らにより、MACのうち、MACプローブ反応性・兩種特異プローブ非反応性菌株の分類学的研究が進められており、興味ある知見が得られている。

② *M. malmoense* (Schröder KH, Juhlin I, 1997): 自験例は、発育至適温度30℃、*M. malmoense* 基準株 ATCC 29571と100%一致した16S rDNA配列、*M. malmoense* のミコール酸のHPLCパターンを示した。

③ *M. celatum* (Butler WR, et al. 1993): 自験3症例からの分離菌は、いずれも、S型、25～45℃で発育、ミコール酸のHPLCパターンは *M. celatum* に近似、16S rDNA配列は *M. celatum* N224（臨床分離株、2型）と99.8%、同 ATCC51131（基準株、1型）と97.3%の相同性を示し、

M. celatum 2型と同定された。

④ *M. triplex* (Floyd MM, et al. 1996): 自験2例よりの分離菌は、ともにS型、25～37℃で発育、ミコール酸のHPLC分析では *M. simiae* に近似パターンを示したが、16S rDNA配列は *M. triplex* ATCC700071と100%の相同性を示した。

⑤ *M. genavense* (Böttger EC, et al. 1993): 低免疫グロブリン血症、全身リンパ節腫大を有する患者の頸部リンパ節の生検で、無数の抗酸菌を認めたが、2%小川培地には発育せず、MGITに発育した。諸種液体培地ならびにマイコバクチン加 Middlebrook 7H11寒天（微小集落）に継代可能であった。*M. genavense* Wee 0268/96の16S rDNA配列と100%の一致をみた。

⑥ *Mycobacterium* sp. わが国で12例の肺疾患患者喀痰より分離され、培養・生化学的性状、ミコール酸のHPLC分析、16S rDNA配列決定などの諸成績より、未だ記載をみない抗酸菌と決定した。

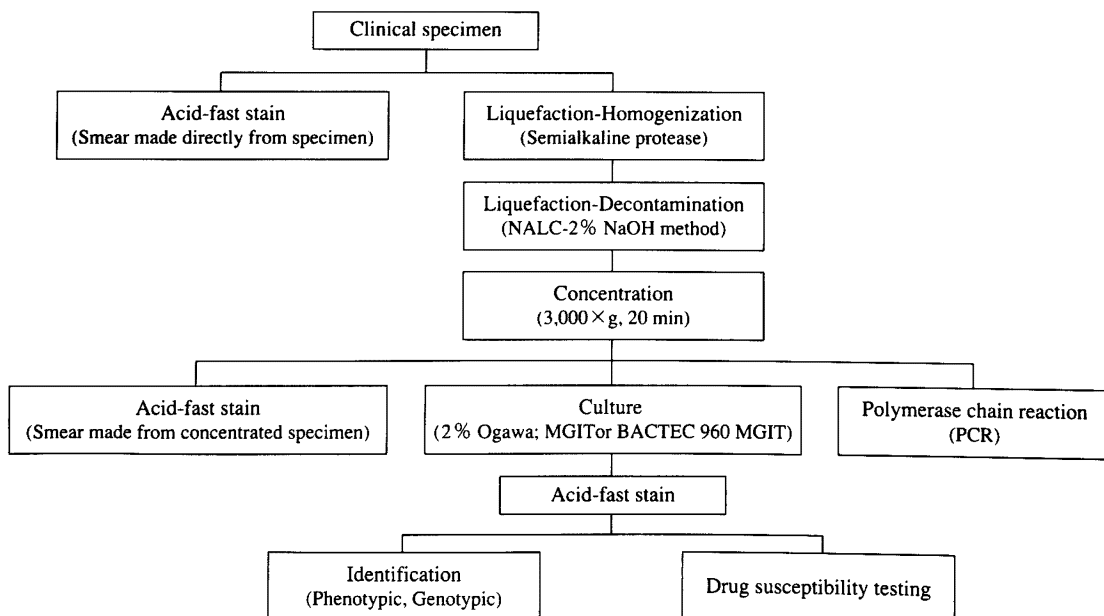
(4) IV群菌

M. mageritense (Domenech P, et al. 1997): 膿胸の患者喀痰から分離された、S型、非光発色性、25～42℃で発育する迅速発育菌で、生化学的・分子遺伝学的諸性状より *M. mageritense* と同定した。

[B. 非結核性抗酸菌の鑑別上有用な培養・生化学的性状]

①発育速度、②集落形態、③色素産生、④光発色性、⑤発育温度、⑥Tween 80水解、⑦ウレアーゼ、⑧硝酸塩還元、⑨半定量カタラーゼ、⑩68℃耐熱性カタラー

Table 2 A flow chart of laboratory diagnosis of mycobacteria



ゼ, ⑪アリルスルファターゼ(3日法), ⑫サプリメント(ヘミン, マイコバクチンJなど)要求性, ⑬キャピリアTBテスト, など。

〔C. 抗酸菌検査のフローチャート〕

Table 2に示した。

文 献

- 1) Kent PT, Kubica GP: Identification test techniques; Culture examination and identification. In: Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory. U.S. Department of Health and Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, 1985, 71-157.
- 2) 工藤祐是, 斎藤 肇, 高橋 宏:「結核菌微生物検査必

携 細菌・真菌検査」, 第3版, 厚生省監修, 日本公衆衛生協会, 東京, 1987, F90-F133.

- 3) Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost KC Jr, et al.: *Mycobacterium*: Phenotypic and genotypic identification. 8th ed., In: Manual of Clinical Microbiology, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. (ed), American Society for Microbiology, Washington DC, 2003, 560-584.
- 4) Della-Latta P: Mycobacteriology and antimycobacterial susceptibility testing. 2nd ed. Isenberg HD (ed), Clinical Microbiology Procedures Handbook, American Society for Microbiology, Washington DC, 2004, 7.1.2.1-7.5.3.
- 5) 斎藤 肇: 分離培養法, 抗酸菌の同定, 「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, 結核予防会, 東京, 2000, 27-77.

5. 遺伝子検査の現状と将来展望

東北大学病院診療技術部 長沢 光章

はじめに

現在, 抗酸菌用の遺伝子検出試薬には対象菌種や原理の違いのほか, 臨床検体直接検出用(核酸増幅法)や分離菌同定用など種々の方法がある。したがって, 「新結核菌検査指針2000」では核酸増幅法として扱っていたが, 本指針では第6章「遺伝子検査法」として掲載することにした。遺伝子検査法には, 研究レベルのものまで含めると多くの種類や方法があるが, 本章ではわが国で体外診断薬として承認・市販され, 診療保険点数が認められているキットについて記述した。

今回, 「結核菌検査指針2007」における改訂の概要と遺伝子検査の現状, 将来展望について報告する。

1. 種類と用途

現在, 市販されている抗酸菌用遺伝子検出キットを表1に示した。なお, 指針であることから詳細な原理等は文献および各キットに添付の文書を参照していただくことにした。核酸増幅法は, コバスアンプリコアマイコバクテリウム(PCR法:表2), コバスTaqMan MTB(リアルタイムPCR法), DNAプローブ「FR」-MTD(TMA法)およびTRCRapid M.TB(TRC法)について記載した。また, 分離菌株の同定用であるDDHマイコバクテリア「極東」(DNA-DNAハイブリダイゼーション法:表3), アキュプローブ結核菌群同定(HPA法)について記載した。その他に, 結核菌群リファンピシン耐性遺伝子の検出が可能なフィノスLiPA/Rif TB(PCR法+LiPA法)も記載した。

また, 現在開発中または発売予定の遺伝子増幅法を表4に示した。

2. 核酸増幅法検査の依頼と検体採取・保存

現在, 遺伝子検査は大規模病院を除き多くの施設が臨床検査センターへ外部委託を行っている。これら外部委託時の注意事項を含む検査の依頼, 採取, 保存について記載した。

核酸増幅法検査の依頼は, 日本結核病学会の提言・勧告である①診断時に1回行う, ②核酸増幅法を治療中の患者の経過判定には使用しない, ③検体中の菌量を知ることにはできないので, 非結核性抗酸菌症の診断基準との関連を考えたときに塗抹陰性検体への*M. avium*および*M. intracellulare*用の核酸増幅法検査の使用は留意することなどを考慮し, 原則として, ①塗抹陽性の場合, ②塗抹陰性であるが臨床的に結核を強く疑う場合, ③塗抹陰性で結核を否定する場合とした。

また, 検査材料の採取・保存法として, ①検体は十分量採取し, コンタミネーションのないよう注意する, ②喀痰では, 唾液の混入を避け, 膿性部分を採取する, ③胸水などはフィブリンの析出により採取後に凝固することが多いため, クエン酸ナトリウムまたはEDTAを添加した容器を使用する, ④ヘパリンは阻害物質のため使用しない, ⑤血液は阻害物質となるため, 混入はできるかぎり避ける, ⑥検査室で指定された滅菌容器に採取し, 乾燥を避け, 冷蔵保存を行い, 特に検体が外部に漏れないように完全に密封することを記載した。

外部委託時の注意事項として, ①塗抹検査は院内検

表1 遺伝子検出試薬キット一覧(抗酸菌)

平成18年12月現在

対象菌種	診療保険点数の名称	製品名	販売(製造)会社	原理*1	対象	
					臨床検体(直接検出)	分離菌同定
<i>Mycobacterium</i> (結核菌群を含む抗酸菌18菌種)	抗酸菌群核酸同定精密検査	DDHマイコバクテリア'極東'	極東製薬工業	DDH	-	○
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (結核菌群)	結核菌群核酸増幅同定検査	アキュプローブ結核菌群同定	極東製薬工業(Gen-Probe)	HPA	-	○
		(コバス) アンプリコア マイコバクテリアム ツベルクローシス	ロシュ・ダイアグノスティクス	PCR	○	○
		コバス TaqMan MTB	ロシュ・ダイアグノスティクス	TaqMan PCR	○	○
		DNAプローブ「FR」-MTD	富士レビオ(Gen-Probe)	TMA & HPA	○	-
		結核菌群 rRNA 検出試薬 TRCRapid M.TB	東ソー	TRC	○	○
<i>Mycobacterium avium</i> complex	マイコバクテリアムアビウム・イントラセルラー核酸同定精密検査	アキュプローブマイコバクテリアムアビウムコンプレックス	極東製薬工業(Gen-Probe)	HPA	-	○
		DNAプローブ「FR」-MACダイレクト	富士レビオ(Gen-Probe)	TMA & HPA	○	
<i>Mycobacterium avium</i>	マイコバクテリアムアビウム・イントラセルラー核酸同定精密検査	(コバス) アンプリコア マイコバクテリアム アビウム	ロシュ・ダイアグノスティクス	PCR	○	○
<i>Mycobacterium intracellulare</i>		(コバス) アンプリコア マイコバクテリアム イントラセルラー			○	○
結核菌群 RFP 耐性遺伝子	結核菌群リファンピシジン耐性遺伝子同定検査	フィノス LiPA/Rif TB	ニプロ(Innogenetics N.V.)	LiPA	-	○
		ジェノスカラー・Rif TB		PCR & LiPA	○	○

*1DDH: DNA-DNA Hybridization, HPA: Hybridization Protection Assay, PCR: Polymerase Chain Reaction, TMA: Transcription Mediated Amplification, TRC: Transcription Reverse Transcription Concerted Reaction, LiPA: Line Probe Assay

査, 遺伝子検査は外部委託の場合, 塗抹検査で抗酸菌陽性の場合には必ず情報を提供すること, ②輸送時に検体容器の破損がないように指定の容器に採取し, 担当者に依頼する, また, 菌株の同定依頼時には培地にパラフィルムを巻き, ビニール袋に入れ, 検体輸送用容器に入れて提出する, などがある。

3. 測定方法

各測定・試薬キットの添付文書を熟読し, 操作マニュアル(手順書)を作成しておくことが必要である。本指針にはPCR法(コバスアンプリコア)とDDH法の喀痰検体の一般的な測定法を掲載した。

4. 施設設備およびバイオハザード対策

核酸増幅法による遺伝子検査を行う場合は, 試薬調整, 前処理および増幅検出区域を別々にし, 使用する器材も区域専用とする。また, 結核菌などを扱う場合は空気感染予防策を実行し, クラスII以上の安全キャビネット, 安全装置付きの遠心器は必ず整備する必要がある, 使い捨て手袋やN95マスクの装着などをして十分に熟練した臨床検査技師が行う必要がある。特に, ピペット操作時におけるエアロゾルの発生には注意する。検体や

表2 塗抹検査, 培養検査とPCR法の比較

	n=372例	塗抹	
		-	+
アンプリコア™ マイコバクテリアム	- +	168 77	9 118

青木ら(1994), 竹内ら(1996), 清水ら(1999)のデータを集計

(2)		例数	PCR陽性例数(%)
塗抹	培養		
+	+	36	34 (94.4)
-	+	24	17 (70.8)
-	-	54	9 (16.7)

前倉ら(肺結核患者:1998)

増幅産物は0.5%次亜塩素酸に浸潤後に廃棄する。また, 実験台や器具の日常清掃や汚染時にも0.5%次亜塩素酸でよく拭き取り, 紫外線照射を十分に行う。

また, 本学会, 日本臨床微生物学会および日本臨床衛生検査技師会の3学会で作成した「結核菌検査に関するバイオセーフティマニュアル2005」を参照すること。

5. 内部・外部精度管理

内部精度管理として, 機器や器材の点検や核酸増幅法

表3 生化学的同定法と DDH 法の相関

生化学的同定法	検討株数	一致株数	不一致株数	DDH法での同定菌種(株数)
<i>M. tuberculosis</i>	122	122	0	
<i>M. kansasii</i>	45	45	0	
<i>M. marinum</i>	6	6	0	
<i>M. simiae</i>	6	6	0	
<i>M. scrofulaceum</i>	47	28	19	<i>M. gordonae</i> (9), 同定不能 (5), <i>M. avium</i> (4), <i>M. fortuitum</i> (1)
<i>M. gordonae</i>	24	23	1	<i>M. avium</i> (1)
<i>M. szulgai</i>	4	4	0	
<i>M. avium</i> complex	142	135	7	同定不能 (4), <i>M. kansasii</i> (1), <i>M. szulgai</i> (1), <i>M. chelonae</i> (1)
<i>M. gastri</i>	5	5	0	
<i>M. xenopi</i>	7	7	0	
<i>M. nonchromogenicum</i>	31	15	16	<i>M. terrae</i> (8), 同定不能 (6), <i>M. triviale</i> (2)
<i>M. terrae</i>	2	2	0	
<i>M. triviale</i>	4	3	1	<i>M. fortuitum</i> (1)
<i>M. fortuitum</i>	60	35	25	<i>M. peregrinum</i> (11), 同定不能 (5), <i>M. abscessus</i> (3) <i>M. chelonae</i> (3), <i>M. intracellulare</i> (2), <i>M. avium</i> (1)
<i>M. chelonae</i>	22	17	5	<i>M. abscessus</i> (2), 同定不能 (2), <i>M. fortuitum</i> (1)
<i>M. abscessus</i>	18	17	1	<i>M. chelonae</i> (1)
<i>M. peregrinum</i>	3	3	0	
同定不能	20	18	2	<i>M. gastri</i> (1), <i>M. xenopi</i> (1)

表4 開発中または発売予定の遺伝子増幅法(細菌関連)

1. LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法 / 栄研化学: 結核菌群, 他
2. BDプローブテック ET (SDA法) / 日本ベクトン・ディッキンソン: 結核菌群
3. リアルタイム NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) 法
/ 日本ビオメリュー: 抗酸菌, 呼吸器感染症パネル, 院内感染症パネル
4. ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法
/ 宝酒造: 結核菌群, 淋菌, 他

表5 遺伝子検査, 塗抹鏡検および培養検査の結果から考えられる解釈

臨床材料からの核酸増幅法(結核菌群)	塗抹鏡検(抗酸菌染色)	培養(液体培地, 小川培地)	分離菌からの遺伝子検査(結核菌群)	検査結果の解釈
陰性	陰性	陰性	—	結核菌群陰性
陰性	陰性	陽性	陰性	結核菌群以外の抗酸菌(非結核性抗酸菌)
陰性	陽性	陽性	陰性	結核菌群以外の抗酸菌(非結核性抗酸菌)
陰性	陰性	陽性	陽性	結核菌群陽性(菌量少数)
陽性	陰性	陽性	陽性	結核菌群陽性
陽性	陽性	陽性	陽性	結核菌群陽性
陽性	陽性	陽性	陰性	結核菌群(菌量少数)と非結核性抗酸菌が混在の可能性あり
陽性	陽性	陰性	—	死菌(結核菌群)の可能性あり
陽性	陰性	陰性	—	死菌(結核菌群)の可能性または菌量少数またはコンタミネーション

における陽性および陰性コントロール, インターナルコントロール(PCR法のみ)の使用など, 精度管理の重要性の認識を高める必要がある。また, 外部精度管理にも積極的に参加すべきである。

PCR感染症検査研究会の2004年度調査(367施設)では, コントロールの使用方法は33のパターンに分類され, すべてのコントロールをすべての項目で使用している施設は76施設(20.7%)で, コントロールをまったく

使用しない8施設(2.2%), 陰性コントロールを使用しない10施設(2.7%)があり, 精度管理の重要性の認識を高める必要がある。

6. 遺伝子検査による結果の解釈

核酸増幅法には, 反応系を阻害する物質(ヘパリン, 血液など)の存在や不適切な検体などによる偽陰性, コンタミネーションによる偽陽性などの問題がある。また,

死菌やBCG株でも陽性結果になることを念頭に入れ、臨床症状、X線検査、塗抹・培養検査、ツベルクリン反応またはQuantiFERON-TB検査結果などを総合的に判断して確定診断を行うことが重要である。遺伝子検査、塗抹鏡検および培養検査の結果から考えられる解釈を表5に示した。

すべての遺伝子検査において、結核菌は結核菌群として同定され、結核菌とは断定できない。ただし、統計学的には95%以上が結核菌であり、胸部X線像、既往歴など臨床所見と併せて判断する。また、核酸増幅法でも、菌量が少ない場合や検査材料の質、菌の局在などにより

検出できないことがある。さらに、阻害物質により検出できない場合がある。

結 語

遺伝子検査法は、感染症領域における診断・治療に大きく貢献し重要な検査法であるが、様々な課題があることも認識し、臨床側との十分な連携の下に検査を行うことが大切である。そして、塗抹・培養検査および免疫学的検査法なども含め、それぞれの施設に合った感染症検査システムを構築・運用することが必要である。

6. 薬剤感受性成績を30日以内に報告するためには

順天堂大学医学部附属練馬病院臨床検査科 小栗 豊子

はじめに

抗酸菌の薬剤感受性検査は長期の日数を要するため、検査結果を初期治療に役立てることは不可能であった。1994年、CDCは結核菌検査の迅速化を具体的な目標で示し、検査関連施設に改革を勧告した¹⁾。薬剤感受性検査では「15～30日以内の報告」が目標とされ、これを契機に検査法の改良・開発はめざましい発展を遂げ、現在ではこの目標達成に十分対応できる検査法が開発され普及している。

一方、わが国では2000年に「新結核菌検査指針」が出版され、臨床検査室に大きな反響を呼び起こし、抗酸菌検査の刷新と施設間差の是正が図られた²⁾。これに続く今回の改訂で最も重点を置いたことは「迅速化」である。初期治療に役立てるためには迅速報告が不可欠である。また、検査対象の抗酸菌も広く取り上げることは見送り、アウトブレイクや多剤耐性菌の問題で最も深刻な「結核菌」に限定した。薬剤感受性測定法の標準法は以前の指針に採用された1%小川培地を用いる比率法を踏襲し、日常検査法としては迅速に成績が得られる液体培地を用いる方法を推奨することになった。本稿では薬剤感受性検査が不可欠とされる所以である耐性菌の現状に触れたのち、標準法、ならびに日常検査法として推奨される方法の特徴や注意点について述べる。

1. 結核菌の薬剤耐性菌の現状

結核療法研究協議会の2004年の調査報告³⁾によると、結核菌での主要4薬剤の耐性率は、既治療患者由来株では、初回あるいは治療4週以内(以下、初回治療)の患者に由来する株の2～11倍高率であったことが報告され

ている(図1)。また、主要4種の薬剤(INH: isoniazid, RFP: rifampicin, SM: streptomycin, EB: ethambutol)のいずれかに耐性の頻度も既治療例では初回治療例の約3倍と高率であり、さらに、多剤耐性結核菌は、初回治療例では0.7%であったのが、既治療例ではその約13倍の9.8%と高率であった(図2)。耐性菌出現の背景には医

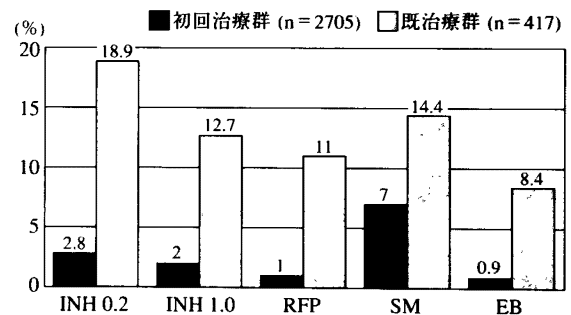


図1 初回治療群と既治療群における耐性菌出現率の比較(結核療法研究協議会, 2004年調査報告)
INH: isoniazid, RFP: rifampicin, SM: streptomycin, EB: ethambutol

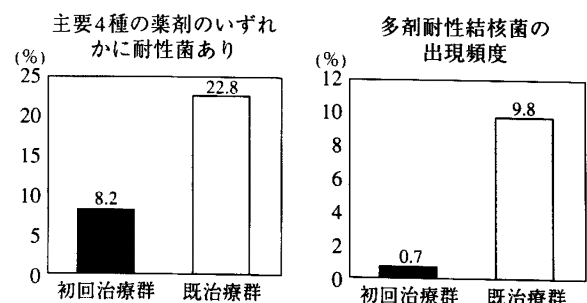


図2 薬剤耐性菌の出現頻度

師の不適切な薬剤処方、結核患者の不規則な抗結核薬の服用、治療の脱落などのほか、輸入感染症としての発症例があげられる。また、検査側の要因として薬剤感受性結果報告の遅延も関係していると思われる。

多剤耐性結核菌とはINHとRFPの両剤に耐性を示す株であり、これらの耐性菌による結核の治療は困難をきわめ、また、経済的負担も大きい^{4)・6)}。多剤耐性結核では感受性検査の有用性がきわめて高いとされている。耐性株増加を阻むためにも患者分離株を用いた迅速な薬剤感受性検査結果の報告が不可欠である。特に既治療例では耐性株が多いことから迅速報告が要求される。

2. 薬剤感受性検査法

現在、わが国で用いられている結核菌の薬剤感受性測定法の概要を表1に示した。

1. 測定法の種類

(1) 標準法：標準法は種々の簡易法開発の基準として用いられている。この方法の欠点は判定までに約4週間

(28日)を要し、分離培地からの継代菌株を用いる場合はさらに2～3週を要することから、トータルで6～7週(42～49日)を要することになり、先のCDCの勧告を満たすことはできない。さらに、小川培地は鶏卵を含むため、一部の抗結核薬では薬剤の培地への吸着が起り、薬剤の添加濃度と実際の抗菌活性を有する薬剤濃度とに差を生じるなどの問題点がある。このほかにも培地に添加する鶏卵やマラカイト緑は培地品質のバラツキの原因となる。アメリカ臨床検査標準委員会(NCCLS、現在はCLSI)の比率法では寒天培地(Middlebrook 7H10 agar)が用いられている。しかし、わが国での寒天培地を用いた検討は不十分であることから、現在も1%小川培地(試験管)を用いた方法が標準法である。

(2) 液体培地を用いる方法：BACTEC MGIT 960結核菌薬剤感受性検査用システム(Becton Dickinson)はMiddlebrook 7H9培地を用い、自動検出器を使用するので、検査の所要時間が著しく短縮(4～12日)される^{7)・9)}。この方法は迅速性に優れているが、判定に専用の機械を

表1 結核菌の抗結核薬感受性検査法ならびに耐性遺伝子検出法

検査法	製造所	使用培地	検査所要日数	抗結核薬	方法の概要
結核菌感受性1濃度培地	極東製薬	小川培地	約4週間	SM, INH, EB, RFP, TH, KM, EVM, CS, PAS	結核菌を対象、小川培地を使用、36±1℃で培養
バクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズストレプトマイシン、イソニアジド、リファンピシン、エタンブトール	ベクトン・ディッキンソン	Middlebrook 7H9	4～12日	SM, INH, EB, RFP	結核菌を対象、Middlebrook 7H9を用いた試験管法で、自動検出機を用いた方法
ウエルバック培地S	日本ビーシー	STC加工藤PD培地	3～4週間	SM, INH, EB, RFP, TH, KM, EVM, CS, PAS, LVFX, PZA	結核菌を対象、特殊マイクロトレイを用いたSTC呈色による判定法、集落の算定可能
結核菌感受性ビットスペクトル-SR	極東製薬	STC加小川培地	2～3週間	SM, INH, EB, RFP, TH, KM, EVM, CS, PAS, LVFX	結核菌を対象、特殊マイクロトレイを用いたSTC呈色による判定法、集落の算定は不可能
結核菌感受性PZA液体培地	極東製薬	Middlebrook 7H9	7日	PZA	結核菌を対象、PZAを含む液体培地で検査する試験管培地法
バクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズピラジナミド	ベクトン・ディッキンソン	Middlebrook 7H9	4～12日	PZA	結核菌を対象、Middlebrook 7H9を用いた試験管法で、自動検出機を用いた方法
プロスミックMTB-I	極東製薬	Middlebrook 7H9	7日	SM, INH, EB, RFP, KM, LVFX, SPFX, CPFX	結核菌を対象とした微量液体希釈法
ルシミックMTR-SR	極東製薬	Middlebrook 7H9	5日	SM, INH, EB, RFP, KM	結核菌を対象、菌体内のATP量を測定、専用ルミノメーター
フィノスLiPA・RifTB	ニプロ		2時間		結核菌を対象、ラインプローブ法、喀痰または分離菌株を用いる、結核菌群リファンピシン耐性遺伝子(<i>rpoB</i>)検出、前処理に約4時間、遺伝子検出に2時間を要する

TH: ethionamide, KM: kanamycin, EVM: enviomycin, CS: cycloserine, PAS: para-aminosalicylic acid, LVFX: levofloxacin, PZA: pyrazinamide, SPFX: sparfloxacin, CPFX: ciprofloxacin

必要とし、試薬も高価である。しかし、薬剤耐性結核の場合は、治療開始後1カ月以内に薬剤感受性結果の報告を受けて適切な治療方式へ変更することが治療成否の要であり、その点で本法の迅速性はきわめて有用である。

マイクロプレートを用いたMIC測定法はMiddlebrook 7H9培地を用いた微量液体希釈法によるMIC測定法であり、市販品(プロスミック MTB-I, 極東製薬)が利用できる^{10)~12)}。菌を接種後、密閉容器に入れ、7日間炭酸ガス培養を行い、判定する。本法は迅速に成績が得られるが、作業に空気感染の危険性を伴う工程があるので、取扱いには細心の注意が必要である。

(3) 結核菌群リファンピシン耐性遺伝子検査：RFP耐性株の約95%以上は1つの遺伝子上の限られた領域に変異がみられることから耐性遺伝子検査が耐性菌同定に利用可能となった^{13)~15)}。市販品にはフィノス LiPA・Rif TB (ニプロ)があり、喀痰から直接に、または分離菌株を用いて検査できる。検査の所要時間は、本キットを用いる前に行われる検体の前処理や被検菌株からのDNAの抽出、および *rpoB* 遺伝子の増幅に要する時間を含めると約数時間が必要である。RFP耐性株の80%以上は複数の薬剤に耐性であることから、本キットによりこれらの耐性菌を迅速に検出し、適切な治療により治療期間の短縮や治療の成功率の上昇を図ることができる。

(4) その他の方法：従来からの簡易法であるウエルバック培地 S (日本ビーシージー)、結核菌感受性ビットスペクトル-SR (極東製薬) などがあり、概要は表1を参照されたい。

2. 実施上の注意点

結核菌の薬剤感受性検査で最も重要な点は接種菌液を均一に調製する点である。菌液の調製法は、①固形培地(小川培地など)の集落を用いて調製する方法と、②液体培地に増菌培養した菌液を用いる方法がある。①は操作が煩雑であり、危険度が高く、また、菌塊が混入しやすいなどの問題点がある。これに対し、②は操作が簡単で、より安全性が高く、菌塊の混入を避けやすいなどの

点で優れている。均一の濃度の菌液を用いることは正確な結果を得るうえで重要なことから、詳細な規定が要求される。また、培養は注意深く観察し、最適の時期に判定すること、耐性菌が検出された場合のチェックポイント(表2)などにも注意が必要である。

3. その他

薬剤感受性検査には直接法と間接法がある。直接法は結果が早く得られることや耐性菌と感受性菌との構成比が判定できるなどの利点があるが、一方、正確な濃度の菌液調製が困難であること、材料の前処理操作が薬剤に影響する可能性があること、正確な成績が得難いことから本指針では推奨しないことに決定した。

まとめ

薬剤感受性検査に関する今回の改訂では、①検査の対象を結核菌に絞ったこと、②標準法は1%小川培地を用いた比率法としたこと、③結果の迅速報告のため、最も迅速に成績が得られ、かつ、国内、国外で十分検討された液体培地を用いた方法を推奨したこと、④接種菌液の調製法を具体的に記述したこと、⑤RFPの耐性遺伝子検出法を加えたこと、をあげることができる。

文 献

- Center for Disease Control and Prevention: CDC guidelines for tuberculosis control in health care facilities. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 1994; 43: 1-13.
- 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編:「新 結核菌検査指針2000」. 結核予防会. 2000, 95-106.
- 結核療法研究協議会: 入院時薬剤耐性に関する研究. 平成16年度療研研究報告書, 2004.
- 森 亨: 多剤薬剤耐性結核. *臨床と微生物*. 1998; 25: 131-135.
- 河合 健: 多剤耐性結核への対応. *治療学*. 1996; 30: 777-781.
- 吉山 崇, 尾形英雄, 和田雅子: 多剤耐性結核の治療成績. *結核*. 2005; 80: 687-693.
- 日本ベクトン・ディッキンソン: バクテック®MGIT™ 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ. ストレプトマイシン, イソニアジド, リファンピシン, エタンブトール. 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京, 2002年8月.
- 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重: BACTEC MGIT 960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.
- NCCLS: Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; approved standard. (M24-A). NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003, 1-60.
- 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

表2 薬剤感受性検査の注意点

検 査	①安全装備と正しい手技 ②新鮮な培養菌 ③接種用菌液一菌塊の混入を避ける ④判定のタイミング
耐性菌 検出	①雑菌混入がないか ②菌種の同定ミスはないか ③培地や試薬の期限切れはないか ④検査過程に問題はないか ⑤過去のデータはどうであったか ⑥主治医に連絡

- 釈法を原理とする BrothMIC MTB の多施設評価—節
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.
- 11) 比嘉美也子, 齊藤 宏, 山根誠久, 他: 結核菌薬剤感
受性試験に関する小川培地を用いた比率法と微量液体
希釈法, BrothMIC MTB の判定互換性. 結核. 2002; 77:
61-66.
- 12) 極東製薬工業株式会社: 薬剤感受性(抗酸菌)キッ
トプロミック MTB-I. 極東製薬工業株式会社, 東京,
2006年1月.
- 13) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of
rifampicin-resistance mutants in *Mycobacterium tubercu-
losis*. Lancet. 1993; 341: 647-650.
- 14) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他: Line Probe Assay
(LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出. 結核.
2000; 75: 575-581.
- 15) ニプロ株式会社: 結核菌 *rpoB* 遺伝子の変異検出用試薬
フィノス LiPA・Rif TB. ニプロ株式会社, 大阪, 2002
年10月.

———— The 82nd Annual Meeting Symposium ————

MYCOBACTERIAL TESTS

Chairpersons: ¹Tetsuya TAKASHIMA and ²Takeshi HIGUCHI

Abstract Tuberculosis is a bacterial disease caused by organisms of the *M. tuberculosis* complex, which is transmitted primarily by airborne droplet nuclei. Rapid and accurate detection of the bacilli is crucial for breaking the chain of transmission. Therefore, mycobacteriology laboratories have a major role to play in it. In this year, "the guideline for testing of *M. tuberculosis*, 2007" has been published. Here, it is emphasized that mycobacteriology laboratories must optimize their procedures for reporting results on the basis of current CDC recommendation: (i) reports of acid-fast examination of specimens within 24 hours of specimen collection, (ii) identification of *M. tuberculosis* within 21 days of specimen collection, and (iii) reports of drug susceptibility tests within 30 days of specimen collection. However, rapid mycobacteriology practices using liquid culture medium have many aerosol-generating handlings. Safety procedures, using a class II biological safety cabinet and so on, must be enforced for protecting laboratory personnel. As the improved technology available for use in mycobacteriology laboratories, such as nucleic acid amplification tests and others, are quite complicated, quality control is much more important than before.

In this symposium, the 6 writers of "the guideline for testing of *M. tuberculosis*, 2007" have described the revised points of each chapters. We, as the chairpersons of this symposium, hope that this symposium would move a step forward toward rapid and accurate mycobacteriology practices in Japan.

1. Mycobacterial examinations and quality assurance: Satoshi MITARAI

It is well recognized that the mycobacterial examinations require careful quality assurances to perform highly reliable and safe laboratory examinations. As of 2003, a questionnaire survey was conducted to investigate the real state of laboratory examinations for mycobacterium. A total of 579 laboratories

(291 of 390 hospitals and 288 of 397 private commercial laboratories) sent the replies, and the results were analysed from the points of quality assurance. Many laboratories adopted the sample concentration method and liquid culture methods. Meanwhile, the quality assurance activities for all examinations were not good enough to keep the quality and reliability. An effective quality assurance system should be necessary to maintain the good laboratory performances.

2. Revised "The guideline for testing of *M. tuberculosis*, 2007": Chiyoji ABE

Rapid detection, species identification, and testing for drug resistance are necessary to control tuberculosis among patients and populations. Tuberculosis control officials and clinicians need access to prompt and reliable tuberculosis laboratory services.

3. The value of proper sputum collection instruction in detection of acid-fast bacillus: Takeshi HIGUCHI

Modern techniques including molecular biology have been applied to routine laboratory works for rapid detection, identification, and drug susceptibility testing of mycobacteria. Even in using such techniques, however, poor quality specimens yield only poor results. To get a high quality specimen, particularly sputum samples, is very important. Therefore, laboratory technicians in our hospital have directly taught each patient how to expectorate good quality sputa since 2001. The teaching of patients has improved the rate of P1 samples from 21.5% to 36.6% by Miller and Jones visual score of sputum. The teaching has also improved the rate of smear positive P1 samples from 11.4% to 28.8%. To teach patient how to get good sputa seems for useful for keeping the laboratory quality high.

4. The latest information for culture and the identification of

acid-fast bacillus: Hajime SAITOH

Culture methods are much more sensitive than smear ones to detect mycobacteria in the specimens. However, the duration of isolation by solid mediums is considerably long. Contemporary liquid culture methods allow for the rapid detection of *M. tuberculosis* complex, especially in smear positive samples. Therefore, in "the guideline for testing of *M. tuberculosis*, 2007", we recommend the routine use of liquid medium such as MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) or KRD in clinical laboratories. We also recommend the use of a simple immunochromatographic assay, Capilia TB, for rapid confirmation of the *M. tuberculosis* complex in liquid cultures.

5. The present condition of molecular detection and identification, and a future view: Mitsuaki NAGASAWA

"The guideline for testing of *M. tuberculosis*, 2007" and the present condition of genetic screening, and a future view were described. It described about the kind of molecular detection and identification kit of Mycobacteria, results, an inspection request and extraction of a sample, preservation, and the measure against a biohazard. Moreover, it described also about quality assurance and the interpretation of a result.

6. Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: Toyoko OGURI

Included below is a summary in susceptibility testing. The

9 methods that are used in the susceptibility test of *Mycobacterium* are in Table 1. The Committee for Mycobacterial Examination considered that a susceptibility test was attached great importance to rapidly reporting. (1) The target of organism for susceptibility test is *Mycobacterium tuberculosis* complex only. (2) The standard method is proportion methods using ogawa medium. (3) The inoculum suspension is recommended subculture growth in broth. (4) Rapid broth methods for susceptibility testing of *M. tuberculosis* are recommended susceptibility results for *M. tuberculosis* complex could be reported within 28 days of receipt of the specimen in the laboratory. (5) The detection of *rpoB* gene is added to the new method.

Key words: Rapid detection, Quality assurances, Sputum collection instruction, Identification, Molecular detection, Susceptibility test

¹Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, ²Department of Clinical Laboratory, Kyoto University Hospital

Correspondence to: Takeshi Higuchi, Department of Clinical Laboratory, Kyoto University Hospital, 54 Kawaramachi, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8507 Japan.
(E-mail: higuchit@kuhp.kyoto-u.ac.jp)