

[短 報]

MGIT 培養液検体から全自動遺伝子解析装置 GeneXpert システム専用試薬 Xpert MTB/RIF を
使用することで得られた効果と有用性

百田堯史¹⁾・猪坂英里奈¹⁾・安藤ほなみ¹⁾・本橋亜耶乃¹⁾・大木 仁¹⁾・田村沙枝子¹⁾
守屋 任¹⁾・原田崇浩¹⁾・日崎和久¹⁾・莊司 路¹⁾・大曲貴夫²⁾

¹⁾ 国立国際医療研究センター中央検査部門

²⁾ 国立国際医療研究センター総合感染症科

(令和 2 年 4 月 3 日受付, 令和 2 年 6 月 7 日受理)

Xpert MTB/RIF (ベックマン・コールター) はその有用性や *rpoB* 遺伝子の変異がリファンピシン (RFP) 薬剤感受性結果と相関が高いことが報告されている。しかし, 排菌量が少ない場合, Mycobacterium Growth Indicator Tube (日本ベクトン・ディッキンソン) 培養検査のみ陽性となる患者が存在する。これらの患者検体の培養液から Xpert MTB/RIF にて検査を実施し有用性を検討した。2017 年 1 月～2018 年 1 月の間に培養検査のみ陽性となった患者検体 30 例を対象とし, コバス TaqmanMTB (Taqman 法, ロシュ・ダイアグノスティックス社) との結核菌群検出比較およびビットスペクトル-SR (極東製薬) を使用した RFP 薬剤感受性結果との比較を行った。Xpert MTB/RIF と Taqman 法との結核菌群検出一致率は 100% であり, RFP 薬剤感受性試験結果の一致率は 96.7% であった。培養法をベースとした薬剤感受性検査結果を待たずに治療薬を選択できることは治療方針決定や感染管理対策の両面から有益と考える。

Key words: MGIT, RFP 耐性遺伝子, 多剤耐性結核, GeneXpert MTB/RIF, Taqman 法

序 文

結核は結核菌群による飛沫核によって感染し, 肺をはじめ様々な臓器に病巣を形成する疾患である。現在イソニアジド (INH) やリファンピシン (RFP) など 3 剤から 4 剤の薬剤の組み合わせによる化学療法が確立され, わが国の結核罹患率は漸減しているが, 欧米諸国と比較すると未だ高い¹⁾。平成 30 年結核登録情報調査年報集計結果では新登録結核患者のうち 80 歳以上が 40% 近くを占めており, 依然高齢者が多い特徴にあるものの減少傾向²⁾にある。一方で若年層の結核罹患率は低いが増加傾向²⁾にある。その要因として労働者層の外国人増加が挙げられ, 平成 30 年の統計では外国生まれ新規結核患者割合が全体の 10.7%, 年齢別に見ると 20 歳代では 70.4% に上る²⁾。また, 近年 INH, RFP 両薬剤に耐性の結核菌は 2018 年新登録肺結核培養陽性結核患者のうち 0.6% と近年で増加している訳ではないが, そのうち 52.7% が外国出生患者²⁾であり, 来日外国人の増加による多剤耐性結核の増加が危惧される。特に都心部では新登録結核患者における外国出生患者の増加が顕著³⁾である。都心部かつ, 外国人症例では, 特に結核菌群の感受性検査結果を迅速に報告することが求められる。Xpert MTB/RIF (ベックマン・コールター) はその有用性⁴⁾や, *rpoB* 遺伝子の変異が RFP 薬剤

感受性結果と相関が高いこと⁵⁾が報告されており, RFP 感受性に関しては迅速に結果を報告することができる。2002 年から 2006 年の世界の薬剤耐性結核頻度⁶⁾では, RFP 耐性結核は 3%, 多剤耐性結核は 2.2% であり, RFP 耐性結核の 73% が多剤耐性結核であるため, RFP 耐性結核である場合は多剤耐性結核である可能性を考慮する必要がある。早期に RFP 耐性遺伝子結果を報告することは臨床において重要なことといえる。当院でも 2016 年 11 月より N-acetyl-L-cysteine (NALC)-NaOH 処理済み検体を使用した Xpert MTB/RIF 検査導入により治療や感染管理において効果を得ている。しかし, 排菌量が少ない場合において, Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT, 日本ベクトン・ディッキンソン) 培養検査のみ陽性となる患者が存在する。Xpert MTB/RIF の保険適応は喀痰または NALC-NaOH 処理済みの喀痰のみが対象であるが, これらの微量排菌症例の治療や感染管理に役立てるため, MGIT 培養液検体から Xpert MTB/RIF を行った結果とコバス TaqmanMTB (Taqman 法, ロシュ・ダイアグノスティックス社) との結核菌群検出比較およびビットスペクトル-SR (極東製薬) を使用した RFP 薬剤感受性結果との比較を行い, その有用性について検討した。

材料と方法
対象

当院にて 2017 年 1 月から 2018 年 1 月の期間に NALC-NaOH 処理済みの喀痰で Xpert MTB/RIF を実施した 1,130 件のうち, Xpert MTB/RIF では結核菌群陰性であり, 培養検査でのみ結核菌群陽性となった 30 名を対象とした。(表 1)

著者連絡先: (〒162-8655) 東京都新宿区戸山 1-21-1
国立国際医療研究センター病院中央検査部門
百田堯史
TEL: 03-3202-7181(内線 3340)
FAX: 03-5273-5266
E-mail: nouselessknowledge@gmail.com

方法

(1) MGIT 培養液を用いた Xpert MTB/RIF 測定

Xpert MTB/RIF 測定時に検体 0.5 mL を使用することから、MGIT 培養液をボルテックスし、菌液を混和した後 0.5 mL を別容器に分注し実施した。別容器に分注した MGIT 培養液 0.5 mL を Xpert MTB/RIF 付属の SR ソリユーション 1.5 mL と混和後 15 分静置、途中数回激しく上下に振った。15 分後カートリッジに 2 mL 分注し、測定装置「GeneXpert システム GX-IV」(セフィエド) に装填、測定した。本測定方法について、既知の結核菌培養株を使用し、MGIT に再培養した後、本手順で検出できることを事前に確認している。

(2) MGIT 培養液を用いたコバス Taqman MTB (Taqman 法、ロシュ・ダイアグノスティックス社)

ロシュ・ダイアグノスティックス社推奨のプロトコルに従い、生理食塩水 1 mL に MGIT 培養液を 40 μ L 入れボルテックスしたものを検査材料として用いた。核酸抽出にアンプリコマイコバクテリウム検体処理試薬セット II (ロシュ・ダイアグノスティックス社) の溶菌試薬「RL」と中和試薬「RN」にタックマンマイコ用検体前処理試薬添加セット「SOL-M」(島津製作所) を使用し、添付文書⁷⁾ に従い核酸抽出を行った。核酸抽出後、「コバス Taqman48」(ロシュ・ダイアグノスティックス社) を添付文書⁸⁾ に従い核酸増幅検出を行った。

(3) ビットスペクトル-SR (極東製薬)

培養陽性となった MGIT 培養液より 3 mL を別容器に移し、3000 \times G で 15 分間冷却遠心した後、上清を捨て、沈査をマイコプロス (極東製薬工業) に入れ、マックファーランド 0.5 程度まで 37 $^{\circ}$ C で培養した。その後抗酸菌複数菌種陽性またはコンタミネーションの確認をするため、7H11-C 寒天培地 (極東製薬) へ接種し、ビットスペクトル-SR 添付文書⁹⁾ に従い薬剤感受性検査を行った。

(検討 1) Xpert MTB/RIF と TaqMan 法を同じ培養液で実施し、結核菌群核酸増幅同定検査の結果が得られるかどうか比較検討した。

(検討 2) Xpert MTB/RIF の RFP 耐性遺伝子検査結果とビットスペクトル-SR による RFP 薬剤感受性結果を比較検討した。

また、当院で検出された耐性結核のリスクを評価するため患者背景を調査した。

結 果

①培養液を用いた結核菌群遺伝子検査の比較結果

培養液で実施した Xpert MTB/RIF の結果は TaqMan 法と 100% (30/30) の一致を示した。

②RFP 耐性遺伝子変異とビットスペクトル-SR の比較結果 (表 2)

ビットスペクトル-SR と比較して Xpert MTB/RIF の RFP 耐性遺伝子変異の結果は 96.7% (29/30) の一致を示した。不一致となった 1 例は *M. tuberculosis* と *M. intracellulare* の混合感染であり、当院では前処理検体から固形培地にて培養を行っていないため *M. tuberculosis* の単独コロニーを分離することが難しく、薬剤感受性試験は実施できなかった症例であった。

耐性結核のリスク評価のための患者背景調査では、表 3 に示すように今回検討した期間に RFP 耐性遺伝子陽性例となった 3 症例のうち 2 症例が外国出生患者であった。

考 察

当院は結核病棟を有しており、入院時に全症例 Xpert MTB/RIF を実施し、RFP 耐性遺伝子の結果をもって隔離病棟の中でも個室管理をするか大部屋に入院するか判断している。しかし、前医で結核感染が確定している患者や臨床的に強く結核が疑われる患者が入院する際に行う Xpert MTB/RIF で結核菌群陰性となった場合は RFP 耐性結核であるか判断できず個室管理の解除には患者背景を基にした推定に頼らざるを得ない状況になりうる。特に多剤耐性結核菌の場合は発育の遅い傾向があり¹⁰⁾、薬剤感受性検査結果が出るまでに長期間を要してしまうため、陰圧室大部屋で一緒に入っているその他の結核患者にとっても多剤耐性結核の曝露リスクとなりうる。当院は都心部に立地していることや、渡航感染症を専門とした感染症外来があることなどから、外国

表 2. ビットスペクトル-SR の RFP 感受性結果と XpertMTB/RIF の RFP 耐性遺伝子の比較結果

表 1. Xpert MTB/RIF 実施検体の結果				ビットスペクトル-SR RFP 感受性検査結果				
結核菌群		MGIT 培養検査		Xpert MTB/RIF RFP 耐性遺伝子	陽性 陰性	耐性 (R)	感受性 (S)	判定不可
		陽性	陰性					
Xpert MTB/RIF	陽性	189	0	RFP 耐性遺伝子	陽性	2	0	1
	陰性	30	911		陰性	0	27	
一致率		1100/1130 (97.3%)		一致率		29/30 (96.6%)		

表 3. 当院にて RFP 耐性遺伝子陽性となった症例

患者	国籍	既往歴	耐性薬剤	培養
45 才 女性	ベトナム	結核性胸膜炎	MDRTB (SM, RFP, INH, RBT)	19 日
35 才 男性	日本	結核再々燃	MDRTB (RFP, INH, RBT, EB, PAS) SM (I), CPFX (I)	25 日
24 才 男性	ベトナム	なし	<i>M. intracellulare</i> 混合感染のため、薬剤感受性検査不能	25 日

ストレプトマイシン (SM), リファブチン (RBT), エタンブトール (EB), パラアミノサリチル酸 (PAS), シプロフロキサシン (CPFX)

表 4. 当院における薬剤耐性結核の頻度と全国※における多剤耐性結核菌群の耐性頻度

		2015	2016	2017	2018	2019
当院	件数	212	176	182	203	166
	INH	4.3%	5.6%	7.6%	5.4%	9.7%
	SM	5.9%	8.9%	12.1%	6.8%	11.5%
	EB	4.3%	5.1%	3.1%	2.0%	2.4%
	RFP	0.8%	1.4%	2.2%	2.0%	3.0%
	MDR	0.8%	1.4%	2.2%	1.5%	2.4%
全国※	MDR	0.5%	0.5%	0.5%	0.6%	

※厚生労働省平成 30 年結核登録者情報調査年報結果⁴⁾を改変引用

人の結核患者が多いため、表 4 に示すように 2019 年の多剤耐性結核が 2.4% と高く²⁾、院内感染対策上、薬剤感受性の迅速な報告が求められる。そこで、保険収載がされておらず参考値となる検査であるが、MGIT 培養液での Xpert MTB/RIF の実施により患者治療、また感染管理において有用な結果が得られるかどうか検討した。

培養液で実施する今回のプロトコルは、Taqman 法と同等の結果を得ることができ、MGIT 培養液を用いての Xpert MTB/RIF での結核菌群核酸増幅同定は問題なく行うことができると考えられる。RFP 耐性遺伝子検出についてもビットスペクトル-SR 薬剤感受性結果と 96.7% と高い一致率を認め、問題なく RFP 耐性遺伝子を検出することができた。さらに、MGIT 培養液を用いた Xpert MTB/RIF を行うことで、薬剤感受性試験に要する約 2~3 週間より早い時期に RFP 感受性結果を報告可能となり、これにより多剤耐性結核であるかどうか推定することができる¹¹⁾。また、多剤耐性結核の場合は発育が遅い傾向にあるため、より報告日数短縮による臨床的有用性が高くなると考えられる。また、非結核性抗酸菌との混合症例において、固形培地を用いた培養検査を行っていない施設では、培養陽性まで日数がかかることから元の検体が残っていないことも多く、結核菌の単独コロニーを拾うことは困難であり、結核菌の薬剤感受性は実施不可能な場合が多い。これに対し、Xpert MTB/RIF を MGIT 培養液で実施することで、一般的な培養法による薬剤感受性

試験では検査が困難な混合症例においても RFP 耐性遺伝子を検出することが可能となる。

本検討結果より、MGIT 培養液から直接 Xpert MTB/RIF を実施することで、通常の薬剤感受性結果を待たずに標準治療または耐性結核治療の選択ができる事は治療方針決定や感染管理対策の両面から有益といえる。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 財団法人結核予防会. 2019. 結核の統計 2019 年版, 財団法人結核予防会, 東京.
- 2) 厚生労働省. 平成 30 年 (2019 年) 結核登録者情報調査年報集計結果.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00002.html 2020 年 3 月 2 日現在.
- 3) 東京感染症情報センター. 感染症発生動向調査.
<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/> 2020 年 3 月 2 日現在.
- 4) Catharina, C. B, P Nabeta, Doris H, et al. 2010. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. N Engl J Med 363: 1005-1015.
- 5) Telenti, A, P Imboden, F Marchesi, et al. 1993. Detection of rifampicin resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. Lancet 341: 647-650.
- 6) 阿部千代治. 2008. 世界の薬剤耐性結核の現状と迅速結核菌検査. モダンメディア 54 (8): 223-232.
- 7) タックマンマイコ用検体前処理試薬添加セット「SOL-M」添付文書, 島津製作所.
- 8) コバス Taqman MTB・MAI 添付文書, ロシュ・ダイアグノスティックス社.
- 9) 結核菌感受性ビットスペクトル-SR 添付文書, 極東製薬工業株式会社.
- 10) Levin, B. R., M. Lipsitch, V. Perrot, et al. 1997. The population genetics of antibiotic resistance. Clinical Infectious Diseases 24: S9-S16.
- 11) 日本結核病学会治療委員会・社会保険委員会・抗酸菌検査法検討委員会. 2011. 薬剤耐性結核の医療に関する提言. Kekaku 86 (5): 523-528.

Evaluation of Xpert MTB/RIF using MGIT culture solution

Takashi Momoda¹⁾, Erina Isaka¹⁾, Honami Ando¹⁾, Ayano Motohashi¹⁾, Hitoshi Oki¹⁾, Saeko Tamura¹⁾,
Ataru Moriya¹⁾, Takahiro Harada¹⁾, Kazuhisa Mezaki¹⁾, Michi Syoji¹⁾, Norio Omagari²⁾

¹⁾Laboratory Testing Department, National Center for Global Health and Medicine, NCGM

²⁾Department of Infectious Diseases, National Center for Global Health and Medicine, NCGM

In NCGM, Xpert MTB/RIF using sputum processed with N-acetyl-L-cysteine (NALC)-NaOH has helped in infection control and treatment. However, some results would be Nucleic acid amplification tests (NAAT)-Negative and MGIT culture solution-Positive in the cases of tests used a few numbers of bacteria. Though Japanese insurance covers only Xpert MTB/RIF with sputum or sputum processed with NALC-NaOH, we evaluated whether Xpert MTB/RIF using MGIT culture solution would be useful for infection control and treatment. The objects were 30 samples that was NAAT-Negative and MGIT-Positive between January 2017 and January 2018. We compared the result of detection test of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) by-Xpert MTB/RIF with the Cobas TaqMan MTB test (Roche), and the RFP resistance gene by Xpert MTB/RIF with Antimicrobial Susceptibility testing of REF by BiteSpectrum-SR (Kyokuto). MTB detection concordance rate between Xpert MTB/RIF and Taqman was 100%, and between Xpert MTB / RIF and BiteSpectrum-SR was 96.7%. One sample that did not match between Xpert MTB/RIF and BiteSpectrum-SR was a case mixed infection of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculosis *Mycobacteria*. Therefore, Antimicrobial Susceptibility Testing was not feasible. From the above, Xpert MTB/RIF using MGIT culture solution would be beneficial for infection control and treatment.