

第1回結核地域分子疫学研究会開催

2004年7月23日に結核予防会結核研究所（清瀬市）にて開催された本研究会の概略，
基調講演2題，一般演題14題の中から2題を紹介する。

結核地域分子疫学分野におけるさらなる進展を目指して

結核予防会結核研究所研究部 大角晃弘

近年結核対策における結核菌のDNA指紋法（DNA Fingerprinting Technique of *M. tuberculosis*）の重要性は、ますます高まっている。わが国の結核対策の中で、この技術がさらに有効に活用されるためには、関係者間における情報の共有と協力体制とが必要である。そのため本法にかかわる主な研究機関および検査機関の担当者が集まり、本法を用いた結核の地域分子疫学分野における意見交換を行った。

結核地域分子疫学研究会の開催目的

近年結核菌の遺伝子指紋型分析法を用いた分子疫学的分析は、国内でも多くの施設で実施されるようになり、接触者健診における結核菌伝播の特定などに大きな力となっている。さらに同法を個々の事例に適用することだけでなく、ある地域における結核対策改善のために、その人口集団における感染実態の解析を目指した事業として実施する施設も増えてきている。そのような中、今後この技術を地域の結核対策

にさらに有益なものとするためには、本法を実施している各検査機関の技術面での向上とともに、地域における結核菌のDNA指紋型の情報を含めた関係者間の情報の共有がますます重要となってくる。そのため本研究会は第1回目として、本法を実施している各検査機関関係者の経験を共有し、問題点についての話し合いを行い、今後のわが国における結核の地域分子疫学分野におけるさらなる発展を目指すことを目的として、地方衛生研究所協議会の協力の下に開催された。

第1回結核地域分子疫学研究会の開催概要

本研究会は2004年7月23日に、結核予防会結核研究所にて開催された。参加者は合計47人で、30カ所の研究機関または医療機関関係者の参加であった。研究会は、加藤誠也結核研究所対策支援部長によって進行され、第1部として基調講演の2題が発表された。まず森亨結

表1 一般演題名および発表者一覧

番号	演 題 名	所 属 先	発表者氏名
1	結核菌の RFLP 解析	札幌市衛生研究所	川合常明
2	堺市新規登録患者由来株の分子疫学	大阪府立公衆衛生研究所	田丸亜貴
3	神戸市内分離結核菌における分子疫学的解析	神戸市環境保健研究所	岩本朋忠
4	埼玉県内で分離された結核菌の RFLP 分析の分析結果について	埼玉県衛生研究所	嶋田直美
5	兵庫県内の患者から分離された結核菌の RFLP 分析	兵庫県立健康環境科学研究所	辻 英高
6	大阪市における結核の分子疫学的解析	大阪市立環境科学研究所	長谷 篤
7	北海道北部における結核分子疫学	国立病院機構道北病院	藤内 智
8	岡山県における結核の分子疫学的解析	岡山県環境保健センター	大畠律子
9	結核菌型別検査における RFLP 法と AP PCR 法の比較検討	東京都健康安全研究センター	向川 純
10	オランダの結核菌情報システムについて	結核研究所研究部	内村和広
11	沖縄県結核菌 DNA 分析を用いた地域結核管理改善事業	結核研究所国際協力部	大角晃弘
12	当院で得られた多剤耐性結核菌 143 株を用いた分子疫学解析法 (RFLP, スポリゴタイピング, VNTR) の比較検討 結核菌広域データベース構築を目指して	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター	松本智成
13	大阪市内で分離された結核菌を用いた MIRU VNTR による分子疫学的解析	大阪市立環境科学研究所	和田崇之
14	トリ結核菌の VNTR 法	動物衛生研究所北海道支所	西森 敬

核研究所長が、「結核菌分子疫学の結核対策への応用」の題で講演を行い、結核菌分子疫学がどのように結核対策へ応用されてきたのか、そして今後どのような分野で応用されていくことが期待されているのかについて説明した。続いて「抗酸菌分子疫学の技術革新」の題で、高橋光良結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報科長が講演を行い、結核菌 DNA 指紋法として標準化されている IS 6110 RFLP 法に加えて、近年開発された PCR をベースとした spoligotyping (スポリゴタイピング), Major Polymorphic Tandem Repeats (MPTR) 法, Polymorphic G + C Rich Sequence (PGRS) 法, Mixed Linker PCR 法, Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) 法, その他の方法について、それぞれの長所と欠点とを標準法と比較しつつ説明した。

本研究会第 2 部では、各関連機関における活

動状況を共有し、問題点や疑問点等について自由に討論するために一般演題の時間がもたれた。合計 14 題 (表 1) が発表されて活発な討論がなされた。

第 3 部では総合討議として、今後のわが国における地域分子疫学ネットワーク構築の可能性、それを構築するために解決すべき問題点、本研究会の運営方法等について話し合われた。検査実施機関の間での情報の共有が、高い信頼性を保ちつつより容易にできる体制作りが必要であることは、参加者全員的一致する意見であった。「数ある結核菌 DNA 指紋法のうち、どの方法をどのように使用することをわが国における標準法とすべきか」との問いかけに関しては、MIRU (Mycobacterial Interspersed Repeat Units) VNTR 法と IS 6110 RFLP 法とを組み合わせて用いる方向で大方の参加者の賛同を得たが、より具体的な方法については今後

詳しく検討することとなった。本研究会の今後の運営方法に関しては、結核研究所対策支援部が事務局となって運営することとし、早急に研究会の規約草案を作成するとともに役員および運営委員会を発足させることとなった。

今後、本研究会が定期的に開催されて、わが

国における地域分子疫学ネットワークが関係諸機関の参加の下に構築され、この分野における研究活動に大いに寄与し、わが国の結核対策活動のさらなる改善を促進するものとなることが期待される。

第1回地域結核分子疫学研究会基調講演

地域分子疫学の結核対策への応用

結核予防会結核研究所 森 亨

この10年間にみられた結核対策の世界でのブレイクスルーとして、筆者は次の四つのできごと、潮流の発生・高揚を挙げたい。① DOTSによる結核対策の強化、② HIV/TBの衝撃(疫学・対策)、③ 結核菌 Genomics とその菌検査への応用、④ 結核菌分子疫学の誕生と成長、である。このうち③と④は Genomics という共通項で結ばれるが、対策のうえでは分けておいてよいと思う。今回ハイライトして採り上げるのはもちろん最後の分子疫学である。

「分子疫学」とはなにか。Last JM¹⁾の Dictionary of Epidemiology (第3版)は、以下のように解説している。「疫学研究における分子生物学技術の利用。DNA タイピングのような技術が、正常ないし変異した、あるいは病気や環境への曝露のために傷害された分子構造の違いを見だし確認し、あるいは計測するために用いられる。……(中略)分子疫学の技術は、病原微生物の遺伝子型を精密に同定し、それにより集団内で特定の株がたどった感染経路を追跡するために用いられてきた。ウイルスのDNAは宿主細胞またはそのゲノムの中にあるものを観察することもある。分子的な技術はがんの疫

学において、発がんに伴う分子の変化(生体異物によるDNA付加物、体細胞遺伝子突然変異)、代謝感受性に関連する遺伝性の遺伝子多形、また「がん家族」遺伝子を発見し、特徴を明らかにし、計測するために用いられる。「分子疫学」という用語の使い方については議論がある。つまり、それは実体のある研究内容をもった学問領域というよりは、観察方法の一つの水準にすぎないのではないか。とはいうものの、これは生物医学や臨床科学に対して多くの貴重な貢献をしてきたし、今後にも大きな期待がもてる。

結核の「分子疫学」の曙を開いたパイオニアの一人である Small ら²⁾は、結核の分子疫学について「結核菌の特定株を追跡する分子技術を従来の疫学手法と統合して集団内の結核の分布を探求する科学」と定義している。そして1994年の時点で既に確立された応用分野として、疫学的に疑われる伝播の証明、疫学的には疑いをもたれなかった集団内での伝播の証明、そして検査室での汚染の証明、を挙げている。

その一方で、これからの応用分野として、① 集団観察によるサ-ベイランス、② 結核発病に対する新たな伝播と再燃の意義、③ 多剤薬

剤耐性結核の起源，④再発と新しい感染の鑑別，⑤全地球的な伝播，⑥株特異表現型の解明，⑦DNA多形と分子時計，などを一部予言的に掲げた。これらについては，既にその時代に研究が進行中であったものも含まれ，これまでに多くの実績が上げられていることは周知のとおりである。本稿では，これらの研究・応用の成果を，特に結核対策に反映させる方向での研究やその体制をについて，幾つかの業績を吟味することにしたい。

1. 接触者健診の強化と評価

結核菌 DNA 指紋分析 (RFLP 分析) は，病原体サーベイランスの一要素として，重要性がますます世界的に認識されるようになりつつある。従来のように単に疫学的な関連が疑われる特定の患者 (群) 株の異同の証明にとどまらず，地域で発生する患者すべてに分析を行い，より積極的に地域の結核感染伝播をあぶり出そうという方式が世界的に普及しつつある。この技術のふるさとともいえるべきオランダを始めとして，スイス，ノルウェー，ドイツそれに米国の多くの州や地域でこのプログラムが始まっている。

オランダでは 97 年から 2000 年の症例中 RFLP 分析で得られたクラスター全例について，疫学的な関連が RFLP 分析をして初めて判明した例は 11 % (可能性例を含めると 31 %) になったとされる (表 2)³⁾。オランダは接触者への対応が熱心な伝統があるので，クラスター分析後のメリットはこの程度にとどまっているが，わが国では，また特に地域によっては，地域 RFLP 分析からより大きな感染伝播把握へのメリットが期待される。

先進国の大都市では患者菌株の 28~72 % がクラスターを形成している。このことから 40 % 程度は最近の感染伝播による発病と理解されている。しかし疫学的関連が証明されるのは

表 2 RFLP 結果還元前後の疫学的関連の確認状況 (van Weezenbeek, 2003)

	RFLP 結果還元前の疫学的関連の確認		
	なし (1,744 人)	あり (462 人)	総数 (2,206 人)
関連なし	69 %	5 %	55 %
あり(確認)	11	77	25
可能性のみ	20	18	20

10 % 程度しかないということも多い。近年アムステルダムの 25 年間の研究では 459 人中 47 % が 53 個のクラスターを形成していた。1 個のクラスターが 1 人の初発例からつくられると仮定すると，この観察期間中に起こった感染伝播は 35 % と計算される。そのうち関連が確認されたのは 5.6 % のみであったという (Deutekom⁴⁾)。このようなことから従来の疫学的関連法は接触を確認するのに不十分なのではないかと考えたくなる。しかし，同時にクラスター形成が必ずしも最近の感染とは限らないということも考える必要がある。

この観点からアムステルダムと周辺の患者 481 人の分子情報と強力な足で集めた疫学情報を結合し，さらにそのうちの 155 人 (32.2 %) のクラスター形成患者には再度強力な面接を行い，通常的面接で関連ができる患者，できない患者を検討し，そして接触者対応で発病前に被感染者を見つける可能性について考察した⁵⁾。その結果疫学的関連の証明を以下の 5 項目に分けてその頻度を調べた。なおこの分析では，クラスターは IS 6110 分析と PGRS 分析で確認している。

- ① 明確な疫学的関連あり，RFLP 証明あり (例，初発例と親類，親友と確認) : 24 %
- ② 同様に明確な関連あり，RFLP と再面接で判明。接触者追跡で判明するはずだったが実際には判明できなかった (例，初発例の親友だが，そのように申告されなかったか，保健所が接触者リストからもらしたか，あ

るいは検査を拒否した) : 6 %

- ③当初は疫学的関連不明、RFLP と再接面で関連の見込みが浮上(例、初発例と同じアパートに居住、または同じ線の市電に乗った。あるいはホームレスで初発例が診断される前に同じシェルターを利用したことがあり、その後行方不明になった) : 55 %
- ④疫学的関連は当所予想されなかったが RFLP からはクラスター判明。綿密な再接接からそのような患者は初発例が感染性であった時期に出会う機会はなかったと考えられる(例、同一国からの2人の移民で1人はオランダに10年住んでから98年に肺外結核となり、もう1人は感染性結核だが2000年に入国したときに発見された。偶然の一致) : 14 %
- ⑤チームが予想するのは別のクラスターに属する。 : 1 %

この成績はクラスター形成患者の86%までが最近の感染伝播関係で説明されることを示しており、安直にクラスターの疫学的意義を否定することの危険性を物語っている。しかし同時に、疫学的関連を証明する通常の技術で確認できるのは①の24%のみであったことは、証明の難しさを示唆する。これから計算して、クラスター形成率は24%、最近の感染の割合は全患者の17%になる。

①②③⑤についてみると従来の面接法が通じなかった③は全体の64%を占める。これらは種々雑多な患者だが、リスク集団(薬物使用、HIV感染者など)が多い。これらの結核感染は偶発的に起きた(店や乗り物の中)と考えられるものが多く、それゆえ対策は困難であり、また患者はリスク集団のため追跡が困難な人々でもあり、早期の発見・対応には多くを期待できない。

早期発見された①②は、35%(47人)と比較的少ない。そのうち②は初発患者、接触者および役所の対応が不十分だった者である。①

は本来もっと多いはずである(接触者健診で多く見つかる菌陰性患者がこの研究からは外されている。接触者健診で既感染とされたものには化学予防が行われてしまうので発病しないなど)。

⑤は接触者健診で発見された菌陽性患者が、疫学的に考えられた初発例とクラスターを形成しない例である。サンフランシスコでは、このような例が30%にもなるという⁶⁾。恐らく米国の例では、ハイリスク集団が多いため偶然感染が多いのであろう。オランダでは接触者の初期の面接での取りこぼしの②は大して多くはないということは、先に引用した van Weezenbeek の所見を裏付けている。よって現行の疫学調査をさらに強化して、発見される患者③を増やそうとするのは効率的ではないとしている。そしてオランダの結核をこれ以上減らそうするためには、途上国の援助を強めなければならないという。

2. クラスター形成の解釈に関する基礎的検討

「クラスター形成 = 最近の感染からの発病」は、いちおう DNA 指紋法としての分子疫学の対策応用の大原則であるが、知見の累積から、この原則にはかなりの留保が必要となってきた。Braden らによるアーカンソーの地域結核分子疫学の研究⁷⁾では、33%の患者がクラスター形成していたが、疫学的関連が確認されたのはそのうちの42%にすぎなかった。Burman らは米国の幾つかの地域の患者について分析し、46%が IS 6110 でクラスター形成したが、このうち pTBN 12 による二次分析をしたところ同一パターンであったもののうち41%が異なるパターンであり、二次分析の有用性を確認した⁸⁾。

以下にこの問題に関するその後の基礎的研究を紹介する。

1) IS パターンの安定性と変異に関する観察

最も多用されている IS 6110 の RFLP パターンによるタイピングの基礎となる条件は、その変異の安定性と同時に適当な変異性である。オランダのグループの研究⁹⁾では、544 人の結核患者からさまざまな間隔を置いて 2 回以上分離された菌株間の IS 6110 RFLP バンドパターンの変異（バンドの付加、欠失）を分析した。25 人（4.6%）に変異がみられたが（大部分は 3 カ月以内）、それらの株の分析から、1 本のバンドの変異を起こすまでの平均的期間を「半減期」で示すと、これは 3.2 年（95% 信頼区間 2.1~5.0 年）と推定され（図 1）、筆者らはこの程度の分子時計であれば IS 6110 の RFLP パターンの一致を「最近の感染」の妥当な根拠としうるであろうと判断した。

またこの研究では変異が起こりやすいのは肺外結核をもった患者の株、またクラスターを形成していない患者からの株で、前者は恐らく全身播種、後者は内因性再燃発病にそれぞれ関連しているのではないと思われる。このように菌株によって変異しやすいものとそうでないものがある可能性もあり、これと感染力、発病機序、耐性獲得などとの関連に関して今後の解明が待たれる。

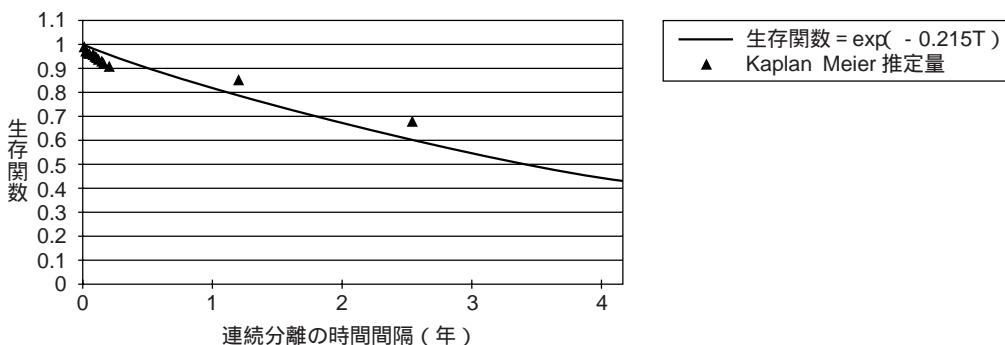
2) 疫学モデルからみた DNA パターンのクラスター形成率の予測

英国の Vynnycky ら¹⁰⁾はオランダのデータをモデルに組み込んで、高まん延状態と低まん延状態とで分子疫学の考え方をどのように変えるべきかについて分析を行った。つまり、低まん延国では IS 6110 によるクラスターは、3 年間にみられた発生患者間で 30~40% と比較的低いが、これは高齢患者の大半は古い感染であり（若年者 > 高齢者）、また 1) に述べられているように DNA パターンの半減期が比較短いためである。結核の年間感染危険率（ARI）があまり変化しない高まん延国では、最近の感染による発病例が多いから年齢差はあまりないのではないかと考えられる。そこで ARI の水準や傾向の影響を考慮することは高まん延国でのクラスターの解釈に重要である。Vynnycky らのモデル分析は以下の手順で行われた。

モデル：これは人口を未感染、既感染（Recent：感染後 5 年未満、Distant：感染後 5 年以上）、再感染、初感染発病、内因性発病、再感染発病等に分け、それらの間の移行を微分方程式で記述する。

ARI の水準と傾向：これについては以下のようなシナリオを想定する。① オランダのように時間とともに低下（40 年の 2% から 79 年の 0.05% まで）、② 低い水準（0.1%）で一定、

図 1 連続的に分離された結核菌の RFLP パターン変異の生存曲線（de Boer ら）



③ 1% で一定, ④ 3% で一定。

クラスター形成：これについては以下のように模擬する。DNA RFLPの半減期は2~5年⁹⁾、潜在感染期間中のIS 6110分子時計もこれと同じと考え、ある集団の最近のクラスター形成率を推定するために、新たなDNA指紋法が(50年頃)導入され、拡散していく状況を模擬する。結核患者は既感染者の中から一定の割合で発生し、それらの患者の一定割合でDNA指紋はその人が感染したときの菌の指紋と異なるものとする。この割合は感染からの期間に依存し、新しい個々の指紋には異なる識別番号を与える。各感染性患者はさまざまな数の人と接触する。その分布はこの時点で感染(再感染を含む)を受ける人の数を与える。これら

から時間tで感染し、その後の期間Tに発病する人の数が求められる。発病する患者の指紋はそれぞれtに患者と接触した人の数の度数分布を用いて決められる。結果として以下のような知見が得られた。

ARIがクラスター形成率に及ぼす影響：まず①~④のシナリオに対して最近の感染と内因性再感染で起こる病気の割合を93~97年までについて求めた。初感染・再感染に続く最近の感染による発病は、その多くが感染後2~3年以内に起こっていた。93~97年の異なる時点で発病する患者の性・年齢別クラスター形成率をシナリオごとに計算した。図2のように、オランダのような状況では最近の感染からの発病の割合は年齢によって非常に違うが、ARIが

図2 オランダおよび感染危険率が0.1%, 1.0%, 3%の一定の状況下で、1993~97年における初感染・再感染に起因する発病の割合(モデル予測, Vynnyckyら)

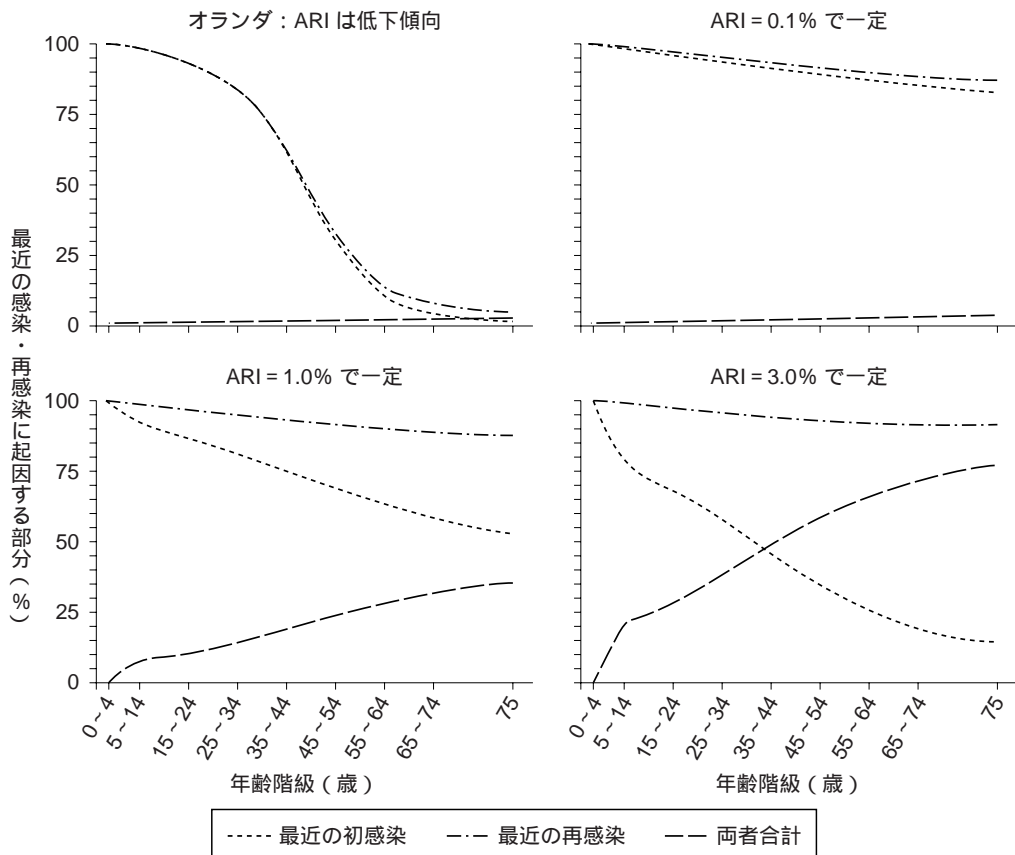
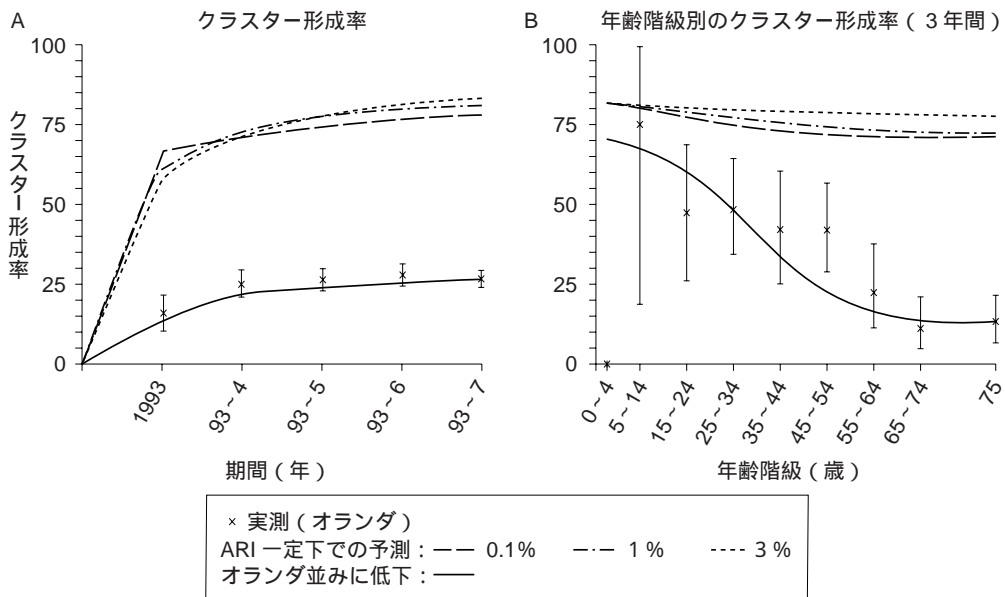


図3 1993～97年の時期別にみた全年齢のクラスター形成率(A), および93～95年の年齢別クラスター形成率(B), オランダおよびARIが0.1%, 1%, 3%で一定としたときの予測, またオランダでの実測値(外国生まれ患者を除く)



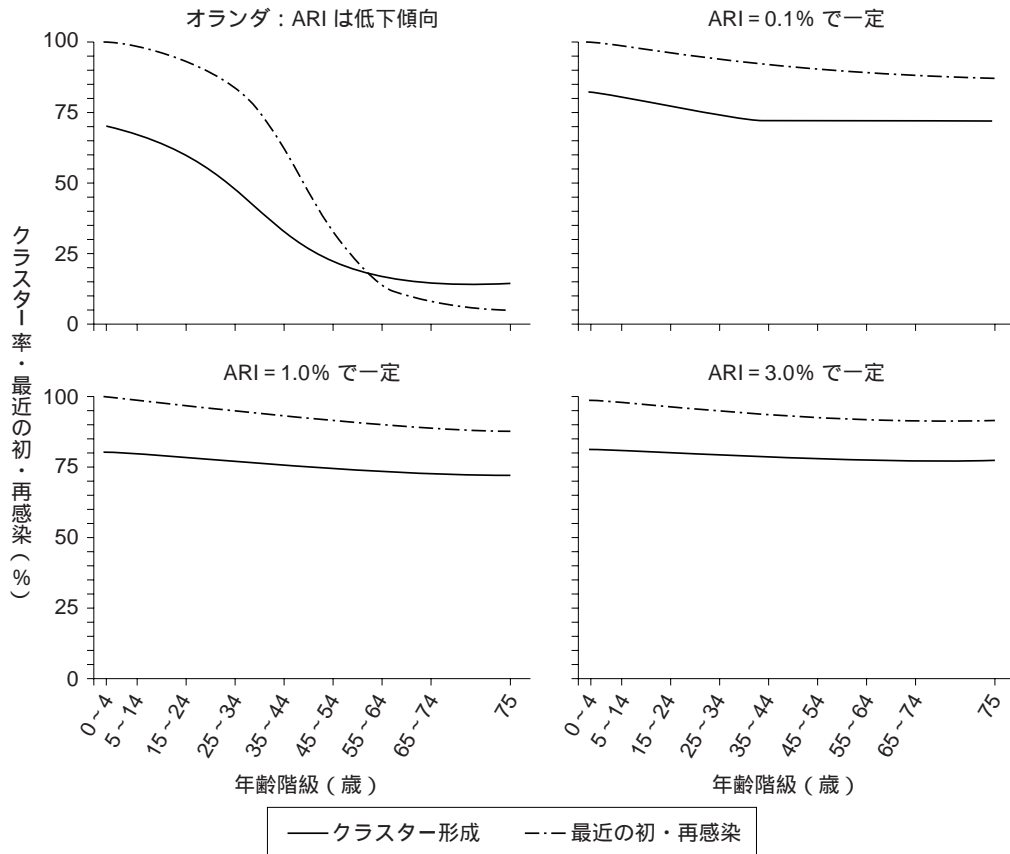
一定の場合にはその水準が違ってても、最近の感染からの発病割合における年齢別の違いはあまりない。図3Aにみるように、全体的クラスター形成率(全年齢での率)は観察期間中上昇する。1年間でのクラスター形成率はオランダでは93年の15%から徐々に25%まで、ARIが一定のとき、傾向はARI水準にかかわらず互いに似ていて60~70%から85%へと上昇する。図3Bでは3年分の観察でみられたクラスター形成率の年齢傾向を示す。

図4で、ARIが一定のときは水準が高くても低くてもクラスター形成率が似ているという所見は一見奇異であるが、これは図3でみたように最近の初感染による発病の割合の低下が、最近の再感染による発病が年齢とともに上昇することによって相殺されるということによる。その結果、全年齢、および年齢別の最近の感染からの発病の割合は似てくるのである。以上より、このような状況でのクラスター形成率は相似する。

最近の感染伝播の指標としてのクラスター形成率の信頼性: 図4にみるようにARIが0.1%で一定のときには90%は最近の初・再感染発病であるが、クラスター形成率は若い年齢で85%、その後は年齢とともに下がって高齢では70%になる。オランダでは若い年齢では初感染発病がクラスターを上回るが、43歳ころからは逆になる。非クラスター患者を考えると、5年以前に感染したと推定される患者の割合は、オランダでは若年者では低く(5%以下)、年齢とともに上昇し55歳以上では100%に近い(図5)。よって55歳以上の非クラスター例は、5年以前の感染からの内因性再燃と考えてよい。他の状況での非クラスター成人患者については、5年以上前の感染割合は20~45%(ARIが3~0.1%に対応して)にすぎない。

この分析からクラスター形成率は、オランダのようにARIが長期的にわたり変化した集団では大きく変化し、ARIの変化がないような状

図4 オランダおよびARIがさまざまなレベルで一定の条件下における年齢階級別にみたクラスター率と最近の初・再感染による患者割合の比較



況とでは所見は大きく異なる。後者のような集団では予想されるクラスター形成率（2年間に）は60%と高く、年齢差はなく、なおかつそれは最近の感染による発病を過小評価している可能性がある。

このモデル分析の結論は幾つか単純化に基づいている。その最たるものがRFLPパターン変化の半減期は活動性結核でも潜在感染でも同じとしたことである。代謝活性の低い後者では半減期がもっと長いと考えるのは自然であろうが、そうだとすればこの分析はクラスター形成率を過小評価している可能性がある。

この分析はクラスターの陽性・陰性的中率を初めて推定し、これらクラスター統計量の性質と解釈はARIの水準と傾向に依存することを

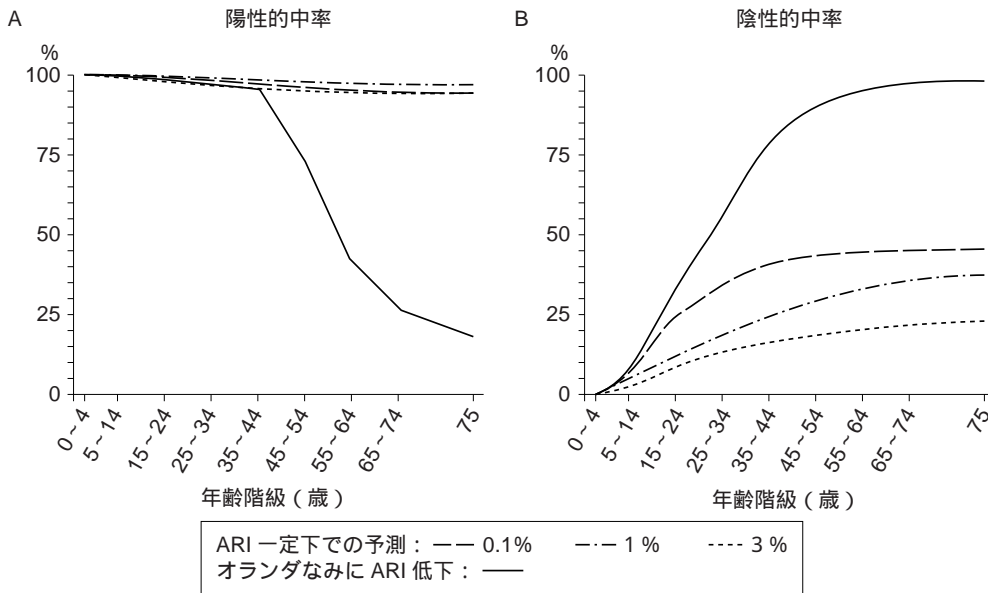
具体的に示した。Vynnyckyら¹¹⁾は同様の分析でオランダの状況についてさらに詳しく検討している。このようにRFLPパターンの変異速度を考慮することによって、Bradenら⁷⁾が提起した疫学的関連のないクラスターが定量的に説明される。

3) クラスター形成に代わる感染伝播指標としての遺伝子距離

米国のSmall門下のSalamonら¹²⁾はクラスター形成に代わるより精密な感染伝播の指標として「遺伝子距離」(genetic distance)を用いることを検討した。最近の菌の伝播を測定する感染伝播の尺度として、クラスター形成は2)で述べたようにさまざまな問題にかく乱され

図5 モデル予測の要約

A : クラスター形成の陽性的中率 (クラスター内の患者中発病前5年以内に初感染・再感染した人の割合)
 B : クラスター形成の陰性的中率 (非クラスター患者中5年以上前の感染・初感染で発病した人の割合)



る。遺伝的な RFLP の近縁性と伝統的疫学の関連をみることによって、遺伝的な同一性の二分法的な表現よりもより有用な表現を開発できるのではないかという発想から、既に集団遺伝学で用いられている ① 遺伝子距離、② 最短遺伝子距離 (nearest genetic distance) の概念を RFLP に応用することを考えた。

RFLP に即して二つの遺伝子型間の遺伝子距離を定義すると、「両者の共通の先祖型からそれぞれの型に変異するまでの時間の合計」となる。先祖型が n 個のコピーをもっていたとし、個々のコピーが変異するまでの平均的な時間を $1/$ (逆に言えば、単位時間の 1 個のコピーが変異する確率が) とすると、この先祖型に少なくとも 1 本が付加したり、欠失するまでの平均時間は $1/n$ である。このような考えから、対象となる m 個の菌株の間の RFLP パターンを比較することで特定の 1 個の株と他の $(m - 1)$ 個の型の間の遺伝子距離が計算される。 n 個のバンドの株と m 個のバンドの株の

間で k 個が一致していた場合、遺伝子距離は以下の式で計算される ($n > m$ とする)。

n 本のバンドをもつ RFLP パターンが一致 (クラスター形成) する場合は、考え方として距離はゼロではなく、共通先祖から分離してきたが変異がまだ起こっていない状態として、 $1/0.5n$ を与える。

値はサンフランシスコの患者の継続分離株について 1) と同様に観察した結果から 0.00032 を用いた。定義から明らかなように、クラスター形成していてもバンド数が少ない場合よりも多くなるほど距離は小さくなり、疫学的な意味は大きくなる。

さらに Salamon らは疫学的関連を強く疑うためのケースとして、その株が最も小さい遺伝子距離を共有する相手株と 24 カ月以内の間隔で分離されたケースを挙げている (24 カ月至近遺伝子距離)。サンフランシスコの観察ではこの値が 30 以下であれば、疫学的関連はかなり確実という。

この場合にもバンド数が1, 2本の場合にはバンドの変異はバンドが多数ある場合の1, 2本よりもさらに起きにくいと思われるので、を普遍的な値として用いることは単純化しすぎの感もあるなど問題もあるが、「クラスター形成 = 最近の感染」の克服への一つの合理的なアプローチとして意味が大きい。

これを応用した研究として Kulaga ら¹³⁾はモントリオール市内のハイチ生まれ患者の結核菌 RFLP 分析を行い、彼らとカナダ人患者との遺伝子距離は他の国からの患者のそれと同程度であって、彼らの結核の中にもち込み例は少ないとした。

3. 結核対策の評価への応用

地域人口集団の結核分子疫学の治験から、地域における結核対策の評価や新たな対策への洞察を得るという方向での研究成果も発表されている。その例を幾つか掲げる。

1) 結核の多発するスラムを含む地域の

結核菌の分析

96年から2000年までに大阪市内在住患者より分離された結核菌712株についてIS 6110によるRFLP分析を行い、わが国では初めてこのような地域における結核発病や感染伝播に関する分子疫学的な所見が得られた¹⁴⁾。分析された菌株は96~97年分離の107株、99年の312株、2000年の293株である。IS 6110 コピー数は1~17で、10~13コピーの菌株が462株(64.9%)あった。5コピー以下の株を除いた692株において56個のクラスター(171株、クラスター形成率24.7%)がみられた。クラスターの大きさ(構成員数)は2~13で構成員2~3人のクラスターが59.1%を占めていた。構成員4人のクラスターは6個、6人が1個、7人が2個、そして構成員13人のクラスターが2個あった。クラスター形成率は性別にみる

と男性23.9%で女性7.4%に比べて高かった。年齢別には70歳以上9.1%、60歳代9.2%、50歳代18.6%、50歳未満13.1%であり、50歳代あるいはそれ以下が高かった。居住地別では最も罹患率の高い西成区でも18.8%であり、他地域とほとんど変わらなかった。高まん延地域(罹患率200以上、西成区および浪速区)18.6%、中まん延地域(罹患率70~200, 14区)16.4%、そして低まん延地域(罹患率70未満, 8区)20.4%であり、高まん延地域では高くなかった。西成区内の行旅(ホームレス)患者におけるクラスター形成率は21.8%であり、同区内の一般患者(5.9%)と比べると高いが、西成区以外の23区(19.5%)とは明らかな差はなかった。

このようなことから研究担当者らは、市内でのクラスター形成率と地域の罹患率水準の間には相関がなく、高罹患率は最近の感染伝播によるものではなく、古い感染の内因性再燃発病による可能性が高いと考えた。一方、市内でみられた全クラスターのうち26個のクラスター(46.4%)に西成区分離株が含まれることから、西成区内のホームレス患者が他地区で感染を広めている可能性も否定できないとした。この知見ははまだ確定的とは言えないが、わが国の大都市におけるホームレスの多い地域の結核多発の対策と関連患者からの感染防止に示唆を与えるものである。

2) 患者病状別にみた感染力の検討

塗抹陽性患者とは別に塗抹陰性患者が感染源となったケースが新たな感染の17%あった。

Behr ら¹⁵⁾はサンフランシスコの地域分子疫学研究において、クラスター形成によって二次感染と仮定された患者に対する感染源がどの程度の割合で塗抹陽性が培養のみ陽性を検討した。集めた1,359人の患者の株から71個のクラスター(二次感染者数183人)が得られ、うち28個のクラスターにおいて最初に発見され

た患者（同クラスターの他の構成員に対する感染源と仮定）が塗抹陰性培養陽性、またこれらのクラスターの属する二次感染者は最低32人と推定された。これから、すべての感染のうち最低17%（32/183）（95%信頼区間12~24%）が、培養のみ陽性例からの感染であると推定された。また培養のみ陽性の患者の感染性は、塗抹陽性例のそれを1とすると0.22（95%信頼区間0.16~0.32）と推定された。

この研究で「塗抹陰性患者によって感染したとするクラスター内の二次患者数」を最も手堅く推定（可能な最小人数として求める）するためには、以下のような原則を適用する。①塗抹陽性患者が見つかったから確認されたクラスター内の患者は非該当、②クラスター内の全員が塗抹陰性であれば、二次患者は全員塗抹陰性患者から感染したとする、③混合クラスターでは塗抹陽性患者に先行されない二次患者だけを該当とする〔例：1(-) 2(-) 3(+) 4(+)という順で患者がでた場合、1が感染源、2, 3が最少二次感染例とする〕。

従来、接触者健診では、感染源患者として便宜的に「喀痰塗抹陽性患者」を重点的に考えてきたが、それがあくまでも便宜的なものではないことが示されたことになる。

3) 高まん延地域における家族内感染の

相対的重要性

結核罹患率が10万対320にも達するケープタウンの近くの地域で、7年間に発生した1,094人の菌陽性患者中765人について菌株のRFLP分析結果が得られた。全地域内でクラスター形成をし、初発例以外の二次発生患者とされるものは433人あり、2人以上の患者が発生した129世帯内の患者で同様に二次発生とされたものは81人で19%（81/433）であった。RFLP分析が得られなかった症例に対する補正を外挿によって行くと、この割合は最大推定で33%、最小推定12%、中位推定23%となった¹⁶⁾。こ

のことは、逆に低まん延下では家族内感染がより大きな意味をもっていることを示唆している。

4) 感染の起こりやすい要因に関する洞察

Borgdorffらは、RFLP分析の所見に基づき、結核感染の起こり方を、1人の患者からつくりだされる二次患者の数として評価する方法を開発した¹⁷⁾。伝播指数（Transmission index）と呼ばれるこの指標は、感染症の理論疫学で用いる実効再生産指数 R_e の応用で、結核の疫学に併せてこれを感染後間もない発病（初感染発病） R_e^{FAST} とその後の発病（再燃発病） $R_e^{DISTANT}$ とに分け、前者をRFLPのクラスター形成によって推定しようとするものである。患者のある属性（例えば国籍）に着目し、その属性をもつ患者の伝播指数は次のように定義する。

$TI = \text{二次患者数（属性を問わず）} \div (\text{属性をもつ感染源患者数} + \text{非同クラスター患者数})$
またTIは二次患者が生み出す三次患者、そこからでる四次患者……と合計したものと考えられるので、 $TI = (R_e^{FAST})^n$ となり、 $R_e^{FAST} < 1$ あれば、 $TI = R_e^{FAST} / (1 - R_e^{FAST})$ となる。一方、クラスター形成患者はだれか1人が感染源、他が二次患者であるが、これを確実に特定することはできないので、クラスター構成員の個々について、感染源、二次患者になる確率（Pおよび1-P）を推定する。その考え方は、Pはある属性をもつ患者の罹患率とその患者が二次患者をつくる確率とに比例するという仮定に基づく。その数学的な手続きは煩雑であるが、TIと R_e に関する上記の関係などに基づいて逐次計算を行う。

この方法によって、Borgdorffらはオランダの患者について出身国別に伝播指数を比較したところ、指数は国により大きく変動し、スリナム人で1.3、モロッコ人で0.8であった。全体では指数は0.36、 R_e は0.26と計算された¹⁷⁾。

さらに彼らは米国サンフランシスコの患者に

についても同様の分析を行い¹⁸⁾、伝播指数は米国生まれの患者(0.59)で外国生まれの患者(0.21)よりも高く、黒人で最高、特に35歳以下で高かった。黒人患者の高い指数の原因は塗抹陽性率、HIV、病気の進展のしやすさなどでは説明できなかったが、この集団への対策が感染防止上重要であることが考えられた。

わが国では最近、沖縄県の知見に基づいて、内村¹⁹⁾が同様の分析を行った。伝播指数は性別にみると男性0.42、女性0.32で男性が比で1.3と高かった。年齢階級別では30歳未満から10歳階級で80歳以上までとしそれぞれ0.47, 0.23, 0.40, 0.39, 0.61, 0.32, 0.29で、30歳未満の若年層と60歳代にピークがみられた。

このように結核菌の分子疫学はツ反応やX線所見などと並んで結核疫学の基本的な指標を提供する道具となりつつあると言える。

4. 全国的分子疫学サーベイランスに向けて

病原体サーベイランスの中で結核菌分子疫学情報が用いられるようになれば、その分析方法の標準化も重要である。結核研究所抗酸菌レファレンスセンターでは多くの欧米の例と同様に、まずIS 6110による分析を一次的に行い、バンド数が少ないものについてスポリゴタイピングでさらに分別するという方式をとっている²⁰⁾。

これに対して英国 Public Health Laboratory Service (PHLS) では、まずPCRによる rapid PCR based epidemiological typing (RAPET) 法という迅速法を行っておき、続いて正規の方法としてのIS 6110による最終判定を行い、この成績をデータベースに保存するという方式をとっているという²¹⁾。

RAPETは、抽出したDNAをIS 6110のある逆位反復配列を標的としてPCRを行い、制

図6 MIRU VNTR の Website のトップページ



限酵素 *Hae* III で消化してアガロースゲル上で電気泳動にかける。小さくても培養コロニーがあれば所要時間は1~2日で、RFLPの場合の5~6日より迅速化が可能であるという。結果はIS 6110によるRFLPとよく一致する。ただしゲル・パターンは目視による比較はできるが、データベース化には向かない (PHLSではIS 6110に先だって行っている。結果はIS 6110とよく一致するという²²⁾)。

英国の方式は、RFLPの欠点である時間・手間・データ処理上の問題を克服するためのものであるが、世界的には一次分析としてMIRU VNTR法を行い、続いてIS 6110法を行うという方式が有力になりつつある²³⁾。結核菌DNAは多くのMIRUをもっている。MIRUによるタイピングは12個の独立したMIRUにある反復配列の個数と長さに基づく。現状ではその鑑別能はIS 6110と同等ないしやや劣る程度とされる。しかし手技も容易で、DNA精製も不要、臨床検体からの分析も可能、自動化可能で多数株の分析に使いやすく、結果表示も本来的にデジタルなので容易にカタログできるというこの方法は、将来的には特に分析する部位を追加して鑑別能が向上すれば、IS 6110に代わる方法となると期待されている²⁴⁾。世界規模のMIRUデータベースの確立、そして全世界的結核菌サーベイランスへの道を開くべく、フランス・パスツール研究所が中心になってWebsite www.ibl.fr/mirus/mirus.html も開設された(図

6)

米国におけるこの技術の応用の展望については、本誌の Emerging Infectious Diseases 特集号抄録である「米国における全国結核菌 DNA 指紋型情報サーベイランスネットワーク 組織・実績と展望」に掲載されているとおりである。

文 献

- 1) Last JM (ed) A Dictionary of Epidemiology. Oxford 1995 ; 3 nd ed : 107.
- 2) Small PM, van Embden DA, Bloom B, et al. Tuberculosis. Pathogenesis, Protection, and Control. ASM Press 1994.
- 3) Lambregts van Weezenbeek CS, Sebek MM, van Gerven PJ, et al. Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands : 6 years ' experience with nation wide cluster feedback and cluster monitoring. Int J Tuberc Lung Dis 2003 ; 7 (Suppl) : 463 70.
- 4) van Deutekom H, Gerritsen JJJ, van Soolingen D, et al. A molecular approach to studying the transmission of tuberculosis in Amsterdam. Clin Infect Dis 1997 ; 25 : 1071 7.
- 5) Van Deutekom H, Hoiijing SP, de Haas REW, et al. Clustered Tuberculosis Cases. Do they represent recent transmission and can they be detected earlier ? Am J Respir Crit Care Med 2004 ; 169 : 806 810.
- 6) Behr MA, Hopewell PC, Paz EA, et al. Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 158 : 465 9.
- 7) Braden CR, Templeton GL, Cave MD, et al. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. J Infect Dis 1997 ; 175 : 1446 52.
- 8) Burman WJ, Reves RR, Hawkes AP, et al. DNA fingerprinting with two probes decreases clustering of *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 1997 ; 155 : 1140 6.
- 9) de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, et al. Analysis of rate of change of IS 6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. Infect Dis 1999 ; 180 : 1238 44.
- 10) Vynnycky E, Borgdorff MW, van Soolingen D, et al. Annual *Mycobacterium tuberculosis* infection risk and interpretation of clustering statistics. Emerging Infectious Diseases 2003 ; 9 (2) : 176 183.
- 11) Vynnycky E, Nagelkerke N, Borgdorff MW, et al. The effect of age and study duration on the relationship between ' clustering ' of DNA fingerprinting patterns and the proportion of tuberculosis disease attributable to recent transmission. Epidemiol Infect 2001 ; 126 : 43 62.
- 12) Salamon H, Behr MA, Rhee JT, et al. Genetic distance for the study of infectious disease epidemiology. Am J Epidemiol 2000 ; 151, 324 34 .
- 13) Kulaga S, Behr M, Nguyen D, et al. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in an Immigrant Population : Evidence against a Founder Effect. Am J Epidemiol 2004 ; 159 (5) : 507 13 .
- 14) 高鳥毛文雄 . 社会経済弱者における結核対策の強化に関する研究 . 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のための研究(主任研究者 森 亨)平成 14 年度分担研究報告 . 2003 ; 49 : 213 .
- 15) Behr MA, Warren SA, Salamon H, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear negative for acid fast bacilli. Lancet 1999 ; 353 : 444 9.
- 16) Verver S, Warren RM, Munch Z, et al. Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high incidence area. Lancet 2004 ; 363 : 212 4.
- 17) Borgdorff MW, Nagelkerke NJD, van Soolingen D, et al. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993 1995 using DNA fingerprinting. Am J Epidemiol 1998 ; 147 : 187 95.
- 18) Borgdorff MW, Behr MA, Nagelkerke NJD, et al. Transmission of tuberculosis in San Francisco and its association with immigration and ethnicity. Int J Tuberc Lung Dis 2000 ; 4 : 287 94.
- 19) 内村和広・高橋光良・大角晃弘ほか . 沖縄県 RFLP 分析をもとにした性・年齢階級・居住地別 Transmission Index の推定 . 結核 2005 ; 80 : 278 .
- 20) 高橋光良 . 結核菌 DNA の RFLP 分析を用いた結核分子疫学の研究と実践 . 結核 2003 ; 78 : 641 51 .
- 21) Dubroniewski FA, Gibson A, Ruddy M, et al. Evaluation and Utilization as a Public Health Tool of a National Molecular Epidemiological Tuberculosis Outbreak Database within the United Kingdom from 1997 to 2001. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 1861 8.
- 22) Yates MD, Dubroniewski FA, Wilson SM. Evaluation of a rapid PCR based epidemiological typing method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis* . J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 712 4.
- 23) Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. N Engl J Med 2003 ; 349 : 1149 56.
- 24) Supply P, Lesjean S, Savine E, et al. Automated high throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 3563 71.

総 説

結核と *M. avium* 感染症の分子疫学の新たな展開

結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンスセンター 高橋光良

1992 年よりわが国でも結核感染の疫学に分離結核菌の RFLP 分析が導入されるようになり、感染源の特定がより確実に行えるようになった¹⁾。一般細菌と同様に結核菌の分子疫学は遺伝子工学に基づいた幾つかの手法の結集で

ある。結核菌の RFLP 分析では、トランスポゾンである転位因子 (Insertion sequence IS 6110) のタイピングが最も早くから普及し、多く使用されている。その他にも多くの方法が開発され、さまざまな使われ方をしている。そ

してその結果の意味づけについてもかなりの進歩がみられている。本稿は IS 6110 を用いる方法と並行して行われる方法として、最近特に重要性を増しているスポリゴタイピング、およびその一つの応用分野である *M. bovis* の同定について検討し、次いで *M. avium* のタイピングに関する近年の知見をレビューするものである。

1. スポリゴタイピング

1.1 IS 6110 の安定性

筆者は IS 6110 の変異と安定性について、結核予防会複十字病院の 96 人の結核患者から少なくとも同じ患者から 2 回以上分離された 188 株について、その前後のパターン変化の発生について検討した¹⁾。その結果平均 90 日間で 24 組 (25%) が 1 本以上の変異を示した。このことは患者同士の疫学調査上接触関係が判明すれば、それらの患者から分離された菌株の間にバンド 1 本程度の違いがあっても同一菌と考えるのが妥当であることを意味している。米国の臨床株でも 90 日間で 29% の変異が確認されている²⁾。IS 6110 のバンドの指数残存分析を用いたオランダの研究では、IS 6110 のバンド変化の半減期は 3.2 年であることが示された³⁾。このことは半数の菌株が 3~4 年で一つのバンドに変化がみられるということを示している。この 3~4 年という時間は、疫学的に関係のある菌株と異なる菌株を区別するのに十分であり、IS 6110 を用いた DNA 指紋法の結核伝播の疫学研究における有用性を支持するものである。しかし、IS 6110 でコピー数が 5 個以下のような株は非常に安定しており、同じパターンが持続することが知られており、株の鑑別には異なる molecular clock となる標識を用いた二次分析が必要とされる。

IS 6110 による結核菌群の DNA 指紋法は最も広く行われている手法であるが、他のタイピ

ング法と比較して幾つかの不都合な点が存在する。例えば、RFLP 解析を行うには 2 µg の DNA が必要である。これだけの量の DNA は臨床材料から増殖させた大量の菌からでなくては得られない。このことは数週間の培養による遅れを意味し、また生菌を必要とする。また RFLP を行うための高度な技術、コストも欠点である。さらに IS 6110 RFLP パターンの正確な分析のためには高度の電算機システムが必要である⁶⁶⁾。

1.2 スポリゴタイピングの技術

近年 PCR を利用したタイピング法が幾つも見出されている⁴⁾⁻¹⁹⁾。その方法の利点は、原則としてより少ない菌量で済まされることである。これらの PCR 法は実施が簡単である。幾つかの PCR 法は、mixed linker PCR 法のように¹⁰⁾¹⁶⁾、鑑別能も再現性も IS 6110 を用いた RFLP に十分匹敵する。しかしながら、簡単であるということから結核菌群の解析にはスポリゴタイピングが最も多用されている²⁰⁾⁻²⁴⁾。スポリゴタイピングは IS 6110 の RFLP においてコピー数が 5 以下の菌株に対する追加的検査にも用いられる²⁰⁾²¹⁾²⁴⁾。スポリゴタイピングの原理は、結核菌群菌株のゲノム DR 領域に複数存在する 36 bp からなる direct repeats (DR) に挟まれたスペーサー配列を可視化するものである⁵⁾。DR 領域に含まれる DR の数は菌株間で異なり、その間にあるスペーサー配列も菌株間で異なる。*M. tuberculosis* の H 37 Rv 株および *M. bovis* BCG P 3 株の DR 領域の解析結果に基づいて、43 の合成オリゴヌクレオチドが DNA メンブレンの上に一列に配置される。未知の結核菌株の DR 領域におけるこれら 43 のスペーサーの存在を調べるためには、この菌株の DR 領域全体を PCR で増幅する。これは DR に対し相補的で互いに逆方向に向いた二つのプライマーを使用して行う。このようなプライマーを用いることにより、隣接する DR との

間のDNAおよびより遠隔のDNAを増幅する⁵⁾。増幅したスペーサー配列をメンブレン上に固相化した43の合成オリゴヌクレオチドの列と逆方向になるように載せる。一方のDRプライマーはあらかじめストレプトアビジンペルオキシダーゼ複合体および基質を用いてビオチンラベルされているので、合成オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションは化学発光で検出することができる。

1.3 スポリゴタイピングの特色

培養菌に対して用いるスポリゴタイピングは、簡単で確実、再現性も高い手法である。さらにその結果を視覚的なイメージでなく数値的に表現でき、さらにワープロ上でコード化できる。しかしながら、IS 6110をRFLPの代用とすることが適切かどうかは疑わしい^{23 25 26)}。IS 6110のパターンで明らかに分離できる*M. tuberculosis*の菌株が、同一のスポリゴタイピングを示すことがある^{16 18)}。同様にスポリゴタイピングの鑑別能は、*M. bovis*の分離株についてもPGRSやDRによるRFLPよりも低い²⁷⁾⁻³³⁾。しかしながらスポリゴタイピングはふるい分けには有用であろう。スポリゴタイピングのパターンが異なっている結核菌株は例外なくIS 6110のパターンも異なる^{24 26)}。ligation mediated PCR^{13 14)}を用いればさらに大規模にふるい分けをスポリゴタイピングそのものよりも効果的に行えると言われている³⁴⁾。

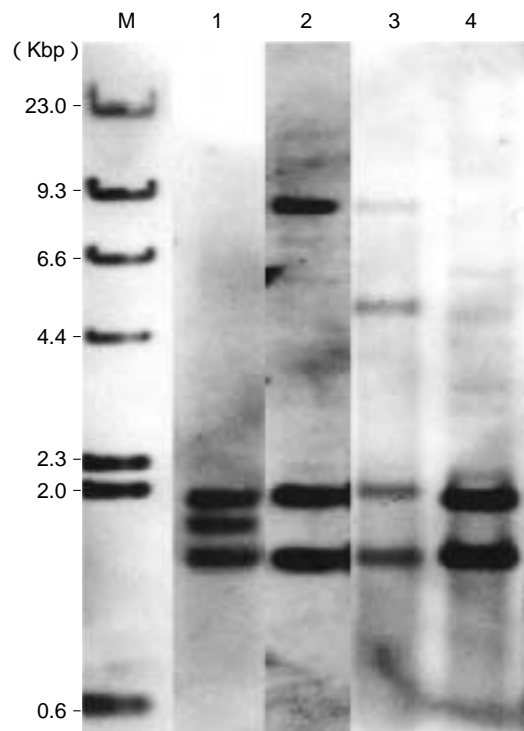
H 37 RvとBCG以外の株から見いだされたスペーサー配列を加えて解析することにより、スポリゴタイピングの鑑別能が向上するのではないかと期待された⁵⁾。しかしながらそうはいかなかった。43のセットにさらに51種のスペーサー配列を追加して検討した最近の研究では、それほど鑑別能は向上しなかった³⁵⁾。

スポリゴタイピングはIS 6110等に比べてより安定な遺伝子情報を解析しているため、結核菌群の菌種やその亜種分類に有効である。例

えばすべての「北京遺伝子型株」の*M. tuberculosis*はスポリゴタイピングの43のスペーサー中、最後の九つにのみ反応する³⁶⁾。さらに大部分の*M. bovis*では、39~43番目のスペーサーが欠落している^{5 20 27 28 37)}。そして大部分の*M. bovis*(すべての*M. bovis* BCGを含む)ではそのほか3, 9, 16番目のスペーサーが欠落している^{5 20)}。*M. microti*もスポリゴタイピングのパターンによりvole typeとlama typeに分けられる。

スポリゴタイピングがIS 6110 RFLPと比べて明らかに有用な点は、原則として一度のアッセイで結核菌群の検出とタイピングが同時

図1 *M. bovis* BCG菌株類似のRFLPパターン。レーンMは分子量マーカ、レーン1, 2はBCG Tokyo株の変異と思われる株(1はBCG膀胱注入療法患者から得られたもの, 2は乳幼児BCG接種後の皮膚病変から分離されたもの), 3は結核患者の喀痰から分離した*M. tuberculosis*, 4は通常のBCG Tokyo株



に行える点である³⁸⁾。さらにスポリゴタイピングは死菌でも実施可能で³⁹⁾、チール・ネールゼン染色に用いたスライドガラスやパラフィン包埋材料を用いても実施できる⁴⁰⁾⁴¹⁾。

スポリゴタイピングを行ううえでの問題点は臨床材料を直接用いた場合、PCR 反応を阻害する物質が存在するために、一致したスポリゴのパターンを得ることが難しいことである。現在スポリゴタイピングに対する臨床材料の前処理法の改善が研究されている。

1.4 *M. bovis* BCG と結核菌の鑑別

これまで結核予防、膀胱がん免疫療法で使用される BCG ワクチンの BCG Tokyo 株は、IS 6110 による RFLP 分析で他の BCG ワクチン株である Pasteur, Glaxo, Tice あるいはウシ型菌 *M. bovis* 野生株と異なり、特徴のある 2 本バンドを示す⁴²⁾。このため BCG と結核菌の鑑別は IS 6110 のみで行われ、なんら不都合は生じなかったが、近年 IS 6110 パターンに関して BCG Tokyo 株に酷似した結核菌株や、BCG Tokyo 株の IS の変異株が確認されるようになった。図 1 において、レーン 1, 2 は BCG 変異株、レーン 3 は結核菌、レーン 4 は通常の BCG 株の IS 6110 パターンである。

このような問題に対処する方法の一つとして MPTR 法⁴³⁾がある。この方法により結核菌群の MPTR 領域内 PCR 産物の長さや変異を示す Sequevar の LONG, MED G, MED C および SHORT と呼ばれる四つのタイプに分別でき、特に LONG (PCR 産物 343 bp) は結核菌と *M. bovis* にみられ、MED G (PCR 産物 328 bp) は結核菌と *M. bovis* の 765 番目の塩基が G であるのに対し、MED C (PCR 産物 328 bp) では *M. bovis* BCG のみで 765 番目が C に置換している。また SHORT (PCR 産物 313 bp) は *M. africanum* で検出される。

結核菌と *M. bovis* BCG を鑑別するためのより確実な方法は塩基配列決定により解析を行う

ことであろう。一方、スポリゴタイピングは *M. bovis* と BCG のみが 39/43 のスベーターを欠落していることを確認する⁵⁾。BCG と結核菌、ウシ型菌野生株などとの鑑別はこれらの併用によって行うべきである。

1.5 その他のタイピング法

① RAPET 法⁴⁴⁾⁴⁵⁾: RAPET 法は英国で開発された方法で、IS 6110 の逆繰り返し配列部分内の (5' GAGTCTCCGGACTCACCGG 3') を PCR 法により増幅し、0.8% アガロースゲル電気泳動後のエチディウムプロマイド染色で可視化して判定する。さらに詳細に検討する場合は、PCR 産物を Hae III で切断して判定する。英国では集団発生等のスクリーニングに、この迅速診断法である RAPET を利用している。本法は再現性に優れており、集団発生時の鑑別能は IS 6110 と同等であると報告されている。

② MIRU VNTR 法⁴⁶⁾⁴⁷⁾: 初めは VNTR⁴⁸⁾を含む exact tandem repeat (ETR) A, ETR B, ETR C, ETR D, ETR E の各遺伝子座を PCR により増幅し、0.8% アガロースゲル電気泳動後、53 bp の tandem copies の数を数値化して鑑別する、しかし、IS 6110 と比較すると鑑別能が低いことから疫学研究には向かなかった。最近になり、ヒトミニサテライト様の構造が結核菌ゲノム上に見いだされた⁴⁹⁾。MIRU と命名された 40-100 bp からなる tandem repeat は結核菌群中に 12 の遺伝子座があることが示された。この 12 遺伝子座と ETR A, ETR B, ETR C の 15 遺伝子座の組み合わせにより IS 6110 と同等の鑑別能があることが示された。MIRU VNTR の変異の比は、スポリゴタイピングと IS 6110 の中間型である。本法は迅速診断が可能であり、安定性があり⁵⁰⁾、株間を比較するための数値化が容易であることが報告されている。さらに、MAC 用のプライマーを使用することにより *M. avium*,

M. intracellulare および *M. paratuberculosis* を分別することができる⁵¹⁾。

③ Mixed linker PCR 法⁹⁾¹⁶⁾ : PCR を基にしたタイピングの間では VNTR タイピング, mixed linker PCR およびスポリゴタイピング法において高い再現性がみられた。IS 6110 RFLP タイピングと mixed linker PCR 法が最も良い亜分類法であった。Mixed linker PCR 法は DNA 指紋型パターンの自動検出が最適化された有望な方法である。Mixed linker PCR は最近タイピングが微量の菌でも 6 5 時間内で行える fast ligation mediated PCR (FliP) に発展した。FliP 法⁵²⁾ は mixed linker PCR と同じ鑑別能力と再現性を示した。

④ PGRS 法⁵³⁾ : 結核菌の PGRS はスポリゴタイピングと同様に二次的マーカーとして最も一般的である。重要な制限となるのは RFLP 分析を行ううえで培養が必要であるということであり, それに費す時間の遅れゆえに対策上の有用性は小さくなる。そこで新たに増幅を基礎としたタイピング手法が望まれ, 徐々に普及しつつある。スポリゴタイピング, Mixed linker PCR および VNTR 法等々である。

2 . *M. avium* の型別

M. avium complex (MAC) に は *M. avium* と *M. intracellulare* が含まれ, 元来 *M. avium* はトりに, *M. intracellulare* はヒトに肺結核類似症を引き起こすとされていたが, その後これら両菌種のいずれかを古典的な方法では区別できない菌株が自然環境からも分離され, MAC あるいは *M. avium intracellulare* complex (MAIC) と総括的に呼ばれることが多い⁵⁴⁾⁵⁵⁾。ただ *M. avium* はエイズ患者に, そして *M. intracellulare* は正常免疫の者に比較的多いとされる。

ところで, 非結核性抗酸菌の亜型分類のために従来からの血清型別法に加えて, パルス

フィールドゲル電気泳動法 pulse field gel electrophoresis (PFGE), IS 型別による菌の亜型分類法などが行われている。*M. avium* については IS 900 ファミリーの RFLP 研究が盛んに行われたが, その後 IS 256 ファミリーに属する 1414 bp の長さをもつ IS 1245 が発見され⁵⁶⁾, この IS は *M. avium* の分子疫学に広く用いられている。ここではこれによる型別, IS 1245 の転位頻度 (安定性), その他最近得られた知見について述べる。

2.1 *M. avium* の培養と DNA の抽出⁴²⁾⁵⁷⁾

Middlebrook 7H9 液体培地に *M. avium* を接種して 2~3 週間 37 °C で培養する。または送付された小川培地上のコロニーを集菌して用いてもよい。死菌であってもコロニーが 1 エーゼ集菌できれば分析可能である。また, 小川培地上で劣性発育をする菌は, 液体培地で増菌してから分析すると効率的である。菌からの DNA の抽出は, Isoplant, 和光純薬 : Code No. 314-02731⁵⁸⁾ を用いて, 菌の約 0.03 g を小川培地から集菌する。電気泳動は 1xTris Acetate (TAE) 電気泳動溶液 (50 xTAE 電気泳動溶液 : Tris base 242 g, Glacial acetic acid 57.1 ml, 0.5 M EDTA, pH 8.0 100 ml, DW で全量を 1000 ml にして 121 °C で 15 分間オートクレーブする) にて 1 ウエル当たり 5 mA, 100 V で 3.5 時間電気泳動し, Bromophenol blue が 10.5 cm になるまで行う。終了後, サザンブロッティングをしてハイブリダイゼーションする。化学発光による検出法⁵⁹⁾ にてバンドを検出する。終わった後に内部マーカーの検出のためのリプロービング (蒸留水で 2 分間洗浄 0.2 M NaOH 0.1% SDS で 5 分間 2 回洗浄 2 xSSC で 5 分間洗浄) し, メンブレンを乾燥する。内部マーカーのプローブは Lambda Hind III Fragment と Phix 174 RF DNA HaeIII Fragment の各 25 ng/μl を標識してハイブリダイゼーションに用いる。検体のマッチングは

肉眼あるいはコンピュータで行う。

2.2 *M. avium* の分子疫学に用いられる亜型分類法

従来 *M. avium* の疫学的な分類は血清型別により決定していた^{60,61)}。しかし近年になって、遺伝子を用いた型別法が開発され、血清型と遺伝子型が必ずしも一致しないことから、従来の血清型別は菌の型別法としては不相当であることが明らかにされた。遺伝子を用いる亜型分類法は以下の方法が知られている。

① パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE): *M. avium* のゲノム DNA を制限酵素で消化し、パルスにより電流の方向性を変化させて高分子の DNA 断片をアガロース内で分子ふるいして、その電気泳動パターンからタイピングする方法である⁶²⁾。しかし、数種類の制限酵素を使うこと、数 µg 単位の全 DNA を使用することに加え、高度のテクニックを必要とする。

② IS 1110⁶³⁾: *M. avium* のゲノム内に存在する 1468 bp の IS 900 ファミリーの IS であり、0~15 本が検出される。この IS は逆繰り返し配列を欠落しており、*M. avium* 以外の抗酸菌には存在しないが、一般的には転位頻度が高いことから亜型分類や疫学的なマーカーとしては使用されない。

③ IS 901 と IS 902⁶⁴⁾: *M. avium* のゲノムから分離された IS で 1472 bp の長さを保有する。両 IS は DNA レベルでの相同性が 98 % と高いことから、通常は IS 901 が型別に用いられる。検出される IS コピー数は 2~8 本あるが、型の種類は非常に限られている。

④ Oligonucleotide GTGGTGGTGGTGGTG; (GTG)₆⁶⁵⁾: 初め結核菌で使用された。結核菌の 80 座に存在する主多型縦列反復 MPTR は RFLP 分析としては適切な方法ではなかった。その後、PGRS や直接反復配列 DR 構造は IS 6110 の低コピー数株の二次的分別に有効であ

ることが分かった。同様に結核菌群のゲノムドメインの繰り返し構造を認識する (GTG)₆ 配列もまた PGRS と同程度の亜分類が可能であり、疫学的なマーカーとして有効であることが示されている。一方、(GTG)₆ 配列は *M. avium* や *M. intracellulare* および Runyon I 群、II 群、III 群、IV 群に属する他の菌種とも相同性があることが分かり、主要な抗酸菌の疫学マーカーとして利用できる。

⑤ ribotyping (リボタイピング) 法⁶⁶⁾: リボタイピング法とは、細菌 DNA を制限酵素で切断後に電気泳動を行い、分離された断片の中からリボゾーム RNA をコードする遺伝子を含む断片を検出してそのパターン (リボタイプ) を分析する方法で、分子疫学に利用されている。*M. avium* と *M. intracellulare* を分別する方法としては抽出 DNA を *SacI* と *ClaI* で消化後、16S rRNA 遺伝子をプローブとして分析する。

⑥ IS 900⁶⁷⁾: *M. avium* subsp. *paratuberculosis* のゲノム内に発見された 1451 bp の長さの挿入断片であり、IS 901 / IS 902, IS 1110 および *Streptomyces clavuligerus* の IS 116 と高い相同性をもち、*M. avium* subsp. *paratuberculosis* は 15~20 本のコピー数が検出される。しかし、*M. avium* と *M. intracellulare* のタイピングにはパターンが限定されており、亜型分類には向かない⁶⁸⁾。

⑦ IS 1311⁶⁹⁾: この IS は *M. avium* と *M. avium* subsp. *paratuberculosis* の両者に存在しており 1259 bp の長さの IS で、ゲノム内に 7~10 コピー数が検出される。また、IS 1311 と IS 1245 は 85 % の高い相同性を保有している。最近、IS 1311 に反応し IS 1245 には反応しない特異的プライマーを使用して、*M. avium* subsp. *paratuberculosis* の亜型分類が可能になった⁷⁰⁾。

⑧ IS 1245^{56,71)}: *M. avium* のゲノム内に最近発見された新しい挿入断片で、ヒトや動物から

の分離株に1~27の高いコピー数を示す。このISはIS 256に属しPFGEと同程度の分別が可能である。また、IS 1311とDNAレベルで85%の相同性を保有している。IS 1245の安定性は、90日以内に1~2本が転位する程度であることが認められている。

2.3 IS 1245の安定性と標準化分析法

ゲノム内に存在するISをターゲットにする分子疫学的研究において、最も重要な点はISの安定性である。IS遺伝子はトランスポゾンであるため少なからず転位活性を保有する。このため転位頻度の低いISを利用することが望まれる。結核菌のIS 6110は約400代*in vitro*で継代しても転位活性は認められなかったのに対して、*M. avium*のIS 1245は1年間の培地継代で1~2本の転位が確認されている⁷²⁾。IS 1245はIS 1081のtransposase(トランスポゼース)をコードしている塩基配列と64%相同性があり、これはIS 1081も同一程度の転移活性を保有していることを示唆している⁵⁶⁾。実際、IS 1081は同一患者からの分離菌では90日で1本の転位が存在したのに対して、IS 1245は69日と88日で1および2本の転位が認められている。Pestel CaronとArbeit⁷³⁾もISの安定性について同一患者からの分離菌では8例(25%)で1~2本の転位が、5例(16%)で3本以上の転位が認められたが、*in vitro*の継代では安定していたと報告している。これらのことから*M. avium*のIS 1245は結核菌のIS 6110より安定性においては劣るが、感染源追跡のためのマーカーとしては有用であることを示しており、これを用いた標準分析法としてはオランダのvan Soolingenら⁷⁴⁾の提唱した方法が用いられている。

2.4 IS タイピングのこれまでの成績

BauerとAndersen⁷⁵⁾ら(デンマーク)はエイズ患者由来分離株(90株)、HIVに未感染患

者(91株)およびヒト以外の由来株(22株)の*M. avium*のIS 1245を用いて、感染伝播の追跡調査を2年間にわたって行っている。その結果、ヒト由来株ではIS 1245では多コピー数であったのに対して、非ヒト由来株では多コピーと低コピーの両グループが存在した。同一パターンを示した株は、エイズ患者由来株、HIV未感染患者分離株ともに地理学的に広範囲な分布を示し、土壌や家畜由来株の遺伝子型に属する*M. avium*株がヒトからも検出された、などの知見を得ている。Bono⁷⁶⁾らはヒト由来株と動物由来株を分析した結果、トリ由来株のISコピー数はヒトおよびブタ由来株に比べて低く、PFGEとIS 1245両者の多形性の程度も低かったと報告している。Komijinら⁷⁷⁾の8養豚場2,899グループ、総計158,763頭を対象にした検討によれば、154グループ856頭(0.5%)が感染し、そのうち141グループ(91.5%)の各5頭において下顎リンパ腺と腸管膜リンパ腺に病巣がみられた。そして、これらの材料から分離された91株の*M. avium*をIS 1245タイピングしたところ株間に59%の類似性が、また、96年に分離したヒト分離191株の*M. avium*のタイピングの類似性は61%であったが、ヒトとブタの解析では75%の類似性がみられたという。これはヒトとブタが土壌との接触で、*M. avium*に対して容易に曝露されることを意味しているのかもしれない。Pestel CaronとArbeitら⁷³⁾(米国)は、40人のHIV患者からの141臨床分離株と同じ水源から分離した18環境分離株の計159株を分析している。これによれば臨床分離株では141株中40株が型別され、これらの株のコピー数は10本以上25株(63%)、4~9本6株(15%)、1~3本9株(23%)で、ISの安定性については40株中8株(25%)に1~2本、5株(16%)に3本以上の転位が確認されたが、*in vitro*の継代では安定であったという。

わが国では斎藤らが「24時間風呂」の浴水、

スポンジフィルター、濾材より分離した *M. avium*⁷⁸ 26 株、24 時間風呂が感染源と考えられたヒトの皮膚病巣から分離された 9 株とそれらの患者使用の 24 時間風呂から分離された 5 株の血清型と IS 1245 の遺伝子型分析を行っている⁷⁹。24 時間風呂由来株はヒトの肺 *M. avium* 症由来株に比べてコロニーの粘稠性が高く、DNA 抽出時の酵素処理に抵抗性を示したことから DNA の回収率が極端に悪かった。IS 1245 をプローブとした RFLP 分析パターンは 24 時間風呂由来のコピー数は 3~28 本で、低コピー数 (10 本以下のバンド) の株は 26 株中 21 株 (80.8%) も存在し、数本の共通バンドを有した。

一方、ヒト皮膚感染病巣分離の 8 株、肺結核類似症例患者の喀痰から分離した 1 株およびその患者の自宅浴水から分離した 5 株の計 14 株は 10~28 のバンドを有し、また肺結核類似症例患者とその患者自宅の浴水からの分離株⁸⁰ではバンド数は各 12 本と 11 本で相互に 80% の類似性があった。この知見は、ヒトやブタに感染する菌株は高いコピー数を保有すると述べた Bauer と Andersen⁷⁵ や Bono⁷⁶ の知見と一致しており、また IS 1245 の安定性を考慮すると、39 と 40 は同一株と考えるのが妥当であろう。クラスター解析では 4 群に分かれ 1 群は血清型 1 (10/13; 76.9%) と 4 (3/13; 23%)、2 群は血清型 1 (9/14; 64.3%)、8 (2/14; 14.3%) および 9 (1/14; 7%)、3 群は血清型 1 のみ (3 株)、4 群は血清型 4 のみ (10 株) に分類された。

上述したようにオランダでのヒト由来株とブタ由来株のクラスター解析では 75% と高い類似性を示した⁷⁷が、わが国の 24 時間風呂由来分離株とヒト皮膚感染病巣分離株間の類似性指数は 40% 前後と低かった。上記の *in vitro* の継代では IS 1245 の転位は検出されていないこと⁷⁵を考えると、環境中由来菌には複数の型の菌が存在していることも考えられ、単一口

コニーについて分析検討することが必要なのかもしれない。一方、感染したヒトや動物の体内で転位頻度が高くなる可能性もある。

70 年代初めに AccuProbe MAC で陽性を示した *M. avium* 菌株全 28 は血清型 (肺 MAC 症には 28 種類の血清型があることが報告されている。それぞれの血清型で病態が異なる可能性があり、血清型を迅速に測定できる) で 3 群に分けられ、1 群は毒力型 (播種性)、2 群は中間毒力型 (接種部位の病巣、軟組織損傷)、3 群は弱毒型であったことが記載されている⁸¹。トリに毒力が認められた 1 群は血清型 1~3 で PCR タイプ IS 901⁺, IS 1311⁺, IS 1245⁺ であり、*M. avium* のプローブと反応するが、*M. intracellulare* のプローブとは反応しない。この特徴をもつ MAC 株はトリ、ブタ、環境中およびヒトから高頻度に分離される。トリに局所病変型を示す 2 群は血清型 4~6, 8~11 および 21 で PCR タイプ IS 901⁻, IS 1311⁺, IS 1245⁺ であり、*M. avium* のプローブと反応するが、*M. intracellulare* のプローブとは反応しない。これらの特徴を示す株はヒト、ブタおよび環境中から高頻度に分類される。弱毒の 3 群は血清型 7, 12~20, 22~28 で MAC と *M. intracellulare* のプローブに反応するが、*M. avium* のプローブに反応しない PCR タイプ IS 901⁻, IS 1311⁻, IS 1245⁻ の遺伝子型をもつ *M. avium* に分類される。これらの特徴をもつ株の多くは環境中から分離される。

血清型全 28 種類に属する MAC を 3 種類の IS で RFLP 分析した結果も上述の血清型分類の結果と同一であった⁸¹。IS 901 は 1 群のゲノム内にランダムに 4 コピー以上検出され、IS 1245 はトリ型 RFLP 型を意味する不変な 3 コピーのみが検出され、IS 1311 は IS 1245 と高い相同性を示すが、1 群では単一コピーとして検出された。また 2 群の RFLP 分析ではゲノム内にランダムに 3 コピー以上の IS 1245 と IS 1311 が検出されていることを記載している

が、同様に抗酸菌種のみに対応する *dnaJ*⁸²⁾ と IS 901, IS 1311, IS 1245 の PCR 型で分析した Dvorska⁸¹⁾らの報告によると、HIV 陰性患者 6 人の分離培養で各 1 人から 6 個のコロニーを分別し、計 36 株について試験した結果では、血清型、RFLP 型および薬剤感受性の間の相関はなく、むしろポリクローナル感染の存在を推測している。この知見は斎藤⁷⁸⁾らの 24 時間風呂由来分離株とヒト皮膚感染病巣分離株間の類似性指数は 40 % 前後と低かったことと相関があるのかもしれない。分子時計の異なる新たな挿入配列が発見されれば、変異の時間的相関が明確になるであろう。

IS 1245 をプローブとした RFLP 分析は、疫学的に優れたマーカーであり、MAC 症の感染の追跡、予防など臨床的にも公衆衛生上も寄与しうる有用な手段となるであろう。

文 献

- 1) 高橋光良．結核分子疫学の成果と展望．結核 2002 ; 77 : 741 52 .
- 2) Yeh RW, de Leon AP, Agasino CB, et al. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Genotypes. J Infect Dis 1998 ; 171 : 1504 13.
- 3) De Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, et al. Analysis of rate of change of IS 6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. J Infect Dis 1999 ; 180 : 1238 44.
- 4) Goulding JN, Stanley J, Saunders N, et al. Genome sequence based fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 1121 6.
- 5) 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 14.
- 6) Friedman CR, Stoeckle MY, Kreiswirth BN, et al. Transmission of multidrug resistant tuberculosis in a large urban setting. Am J Respir Crit Care Med 1995 ; 152 : 355 9.
- 7) Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson WD Jr, et al. Double repetitive element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 1383 4.
- 8) Frothingham R, Meeker O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology 1998 ; 144 : 1189 96.
- 9) Haas WH, Butler WR, Woodley CL, et al. Mixed linker polymerase chain reaction : a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex . J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 1293 8.
- 10) Otal I, Samper S, Asensio MP, et al. Use of a PCR method based on IS 6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 273 7.
- 11) Palittapongarnpim P, Chomyc S, Fanning A, et al. DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction . J Infect Dis 1993 ; 167 : 975 8.
- 12) Plikaytis BB, Crawford JT, Woodley CL, et al. Rapid, amplification based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen Microbiol 1993 ; 139 : 1537 42.
- 13) Prod'homme G, Guilhot C, Gutierrez MC, et al. Rapid discrimination of *Mycobacte-*

- rium tuberculosis* complex strains by ligation mediated PCR fingerprint analysis. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 3331 4.
- 14) Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 486 92.
- 15) Linton CJ, Jalal H, Leeming JP, et al. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol 1994 ; 32 : 2169 74.
- 16) Butler WR, Haas WH, Crawford JT. Automated DNA fingerprinting analysis of *Mycobacterium tuberculosis* using fluorescent detection of PCR products. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 1801 3.
- 17) Kearns AM, Barrett A, Marshall C, et al. Epidemiology and molecular typing of an outbreak of tuberculosis in a hostel for homeless men. J Clin Pathol 2000 ; 53 : 122 4.
- 18) Patel S, Wall S, Saunders NA. Heminested inverse PCR for IS 6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 1686 90.
- 19) Sechi LA, Zanetti S, Dupre I, et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 128 32.
- 20) Bauer J, Andersen AB, Kremer K, et al. Usefulness of spoligotyping To discriminate IS 6110 low copy number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 2602 6.
- 21) Goyal M, Saunders NA, van Embden JD, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS 6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 647 51.
- 22) Sola C, Horgen L, Maisetti J, et al. Spoligotyping followed by double repetitive element PCR as rapid alternative to IS 6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 1122 4.
- 23) Sola C, Devallois A, Horgen L, et al. Tuberculosis in the Caribbean : using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. Emerg Infect Dis 1999 ; 5 : 404 14.
- 24) Goguet de la Salmoniere YO, Li HM, Torrea G, et al. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 2210 4.
- 25) Wilson SM, Goss S, Drobniewski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a Mycobacterium reference unit. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 3385 8.
- 26) Diaz R, Kremer K, de Haas PE, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994 June 1995 : utility of spoligotyping versus IS 6110 restriction fragment length polymorphism. Int J Tuberc Lung Dis 1998 ; 2 : 743 50.
- 27) Cousins DV, Skuce RA, Kazwala RR, et al. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. International Union against Tuberculosis

- culosis and Lung Disease, Tuberculosis in Animals Subsection. Int J Tuberc Lung Dis 1998 ; 2 : 471 8.
- 28) Cousins D, Williams S, Liebana E, et al. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 168 78.
- 29) Roring S, Brittain D, Bunschoten AE, et al. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS 6110 probes. Vet Microbiol 1998 ; 61 : 111 20.
- 30) Aranaz A, Liebana E, Mateos A, et al. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing : a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol 1998 ; 61 : 311 24.
- 31) Collins DM. DNA typing of *Mycobacterium bovis* strains from the Castlepoint area of the Wairarapa. New Zealand Vet J 1999 ; 47 : 207 9.
- 32) Costello E, O'Grady D, Flynn O, et al. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 3217 22.
- 33) Cousins DV, Williams SN, Dawson DJ. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population : DNA typing of isolates, 1970 1994. Int J Tuberc Lung Dis 1999 ; 3 : 722 31.
- 34) Bonora S, Gutierrez MC, Di Perri G, et al. Comparative evaluation of ligation mediated PCR and spoligotyping as screening methods for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 3118 23.
- 35) van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, et al. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. J Bacteriol 2000 ; 182 : 2393 401.
- 36) van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 3234 8.
- 37) Aranaz A, Liebana E, Mateos A, et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals : a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 2734 40.
- 38) Heyderman RS, Goyal M, Roberts P, et al. Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe : analysis by spoligotyping. Thorax 1998 ; 53 : 346 50.
- 39) Driscoll JR, McGarry MA, Taber HW. DNA typing of a nonviable culture of *Mycobacterium tuberculosis* in a homeless shelter outbreak. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 274 5. No abstract available.
- 40) van der Zanden AG, Hoentjen AH, Heilmann FG, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. Mol Pathol 1998 ; 51 : 209 14.
- 41) Qian L, Van Embden JD, Van Der Zanden AG, et al. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 471 4.

- 42) Takahashi M, Kazumi Y, Fukazawa Y, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol Immunol* 1993 ; 37 : 289 94.
- 43) Frothingham R. Differentiation of strains in *Mycobacterium tuberculosis* complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of *M. bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 840 4.
- 44) Yates MD, Drobniewski FA, Wilson SM. Evaluation of a rapid PCR based epidemiological typing method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 712 4.
- 45) Drobniewski FA, Gibson A, Ruddy M, et al. Evaluation and utilization as a public health tool of a national molecular epidemiological tuberculosis outbreak database within the United Kingdom from 1997 to 2001. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41 : 1861 8.
- 46) Sola C, Filliol I, Legrand E, et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs : association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 2003 ; 3 : 125 33 .
- 47) Supply P, Lesjean S, Savine E, et al. Automated high throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001 ; 39 : 3563 71.
- 48) Frothingham R, Meeker O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998 ; 144 : 1189 96.
- 49) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al. Variable human minisatellite like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000 ; 36 : 762 71.
- 50) Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, et al. Stability of variable number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 4561 6.
- 51) Bull TJ, Sidi Boumedine K, McMinn EJ, et al. Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Cell Probes* 2003 ; 17 : 157 64.
- 52) Reising F, Kremer K, Amthor B, et al. Fast ligation mediated PCR typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Abstract of the project Meeting Molecular Epidemiology and Control of tuberculosis, Institute Pasteur, Paris, France, November, 1999.
- 53) Ross BC, Raios K, Jackson K, et al. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 942 6.
- 54) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1982 ; 27 : 994 7.
- 55) 豊田丈夫, 青柳昭雄, 齋藤肇. *Mycobacterium avium* complex 症の現況と将来. *M.avium* と *M. intracellulare* 症. *結核* 1993 ; 68 : 63 9.
- 56) Guerrero C, C Bernasconi, D Burki, et al.

- A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS 1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 304 7.
- 57) 高橋光良 . RFLP 分析を用いた結核菌の分子疫学 . 日本細菌学雑誌 1998 ; 53 : 662 8 .
- 58) Jhingan AK. A novel technology for DNA isolation. Meth Mole Cellu Biol 1992 ; 3 : 15 22.
- 59) Pollard Knight D, Simmonds AC, Schaap AP, et al. Nonradioactive DNA detection on Southern blots by enzymatically triggered chemiluminescence. Anal Biochem 1990 ; 185 : 353 8.
- 60) Schaefer WB. Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. Am Rev Respir Dis 1965 ; 92 : 85 93.
- 61) Saito H, Kubica GP. Serologic studies of avian Group III nonphoto chromogen complex by agglutination test. Am Rev Respir Dis 1967 ; 98 : 47 9.
- 62) Pestel Caron M, G Gabriel, B Gilles, et al. Molecular analysis of *Mycobacterium avium* isolates by using pulsed field gel electrophoresis and PCR. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 2450 5.
- 63) Hernandez MP, NG Fomukong, T Hellyer, et al. Characterization of IS 1110, a highly mobile genetic element from *Mycobacterium avium* . Mol Microbiol 1994 ; 12 : 717 24.
- 64) Kunze ZM, S Wall, R Appelberg, et al. IS 901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium* . Mol Microbiol 1991 ; 5 : 2265 72.
- 65) Cilliers FJ, RM Warren, JH Hauman, et al. Oligonucleotide (GTG) as an epidemiology tool in the study of nontuberculous mycobacteria . J Clinical Microbiol 1997 ; 35 : 1545 9 .
- 66) Peillon R, EB Drouet, S Bruneau, et al. Discrimination of *Mycobacterium avium Mycobacterium intracellulare* strains by genomic DNA fingerprinting with a 16 S rRNA gene probe. FEMS Microbiol Letters 1994 ; 124 : 75 9.
- 67) Tim D, M Tizard, D Millar, et al. IS 900 targets translation initiation signals in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to facilitate expression of its *hed* gene. Microbiology 1997 ; 143 : 547 52.
- 68) Butcher PD, NA Hutchinson, TJ Doran et al. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. J Appl Bacteriol 1996 ; 81 : 53 71.
- 69) Whittington RJ, AF Hope, DJ Marshall, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* : IS 900 restriction fragment length polymorphism and IS 1311 polymorphism analysis of isolates from animals and a human in Australia. J Clinical Microbiol 2000 ; 38 : 3240 8.
- 70) Marsh I, Whittington R, Cousins D. PCR restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS 1311 . Mol Cell Probes 1999 ; 13 : 115 26.
- 71) Garzelli C, N Lari, B Nguon, et al. Comparison of three restriction endonucleases in IS 1245 based RFLP typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* . J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 2450 5.

- bacterium avium*. J Med. Microbiol 1997 ; 46 : 933 9.
- 72) Bauer J, AB Andersen. Stability of insertion sequence IS 1245, a marker for differentiation of *Mycobacterium avium* strains. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 442 4.
- 73) Pestel Caron M, RD Arbeit. Characterization of IS 1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 1859 63.
- 74) van Soolingen D, J Bauer, V Ritacco, et al. IS 1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates : proposal for standardization. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 3051 4.
- 75) Bauer J, AB Andersen, D Askgaard, et al. Typing of clinical *Mycobacterium avium* complex strains cultured during a 2 year period in Denmark by using IS 1245. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 600 5.
- 76) Bono M, T Jemmi, C Bernasconi, et al. Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. Appl Environ Microbiol 1995 ; 61 : 371 3.
- 77) Komijn RE, PEW de Haas, MME Scheider, et al. Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in the Netherlands and comparison of IS 1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 1254 9.
- 78) 斎藤肇, 村上和保, 石井則久, ほか. 「24時間風呂」からの *Mycobacterium avium* の検出. 結核 2000 ; 75 : 19 25.
- 79) Saito H, Takahashi M, Sato A. Serotyping and IS 1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolated from the “24 hour bath” in Japan. 101st General Meeting, ASM, U 12, May, 2001, Orlando.
- 80) Watando A, Toyota E, Mori N, et al. Pulmonary *Mycobacterium avium* infection in an immunocompetent young adult related to use of home bath with a circulating water system. Jpn J Dis 2001 ; 54 : 151 2.
- 81) Dvorska L, Bartos M, Ostadal O, et al. IS 1311 and IS 1245 restriction fragment length polymorphism analysis, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium* complex isolates obtained from a human immunodeficiency virus negative patient. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 3712 9.
- 82) Nagai R, Tatewaki S, Wada A, et al. Development of rapid detection method for mycobacteria with PCR. J Med Technol 1990 ; 28 : 1247 52.

オランダの結核菌情報システムについて

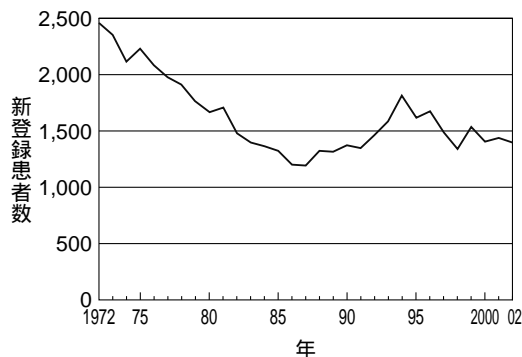
結核予防会結核研究所研究部 内村和広

はじめに

1990年にオランダ国立公衆衛生環境研究所(RIVM)のHermansら¹⁾が、結核菌由来IS6110をプローブとした制限酵素断片長多型分析(RFLP分析)が結核菌の疫学や診断のための手段に利用できることを報告して以来、オランダは米国と並ぶ結核菌分子疫学の先進国として、研究分野のみならず結核対策への応用としても世界の先端を進み続けている。これを可能としているのは、オランダ結核予防財団(KNCV)、RIVMそして各地方自治体の保健センターを中心として組織された分子疫学ネットワークとその背後を支える結核菌情報システムである。

本稿では筆者が2004年の1月から3カ月間オランダKNCVに共同研究として滞在したおりに収集した情報を基に、オランダの結核菌情報システムと結核菌分子疫学の結核対策への応用を概説し、オランダでの分子疫学研究のトピックの一つを紹介する。

図1 オランダにおける結核新登録患者数の推移(1972~2002年)



オランダの結核疫学状況

オランダの国土面積は約4万平方キロでわが国の九州とほぼ同じであり、人口は約1,600万人である。人口構成は約80%がゲルマン系オランダ人で、その他にはインドネシア、トルコ、スリナム、モロッコなどからの移民が多い。

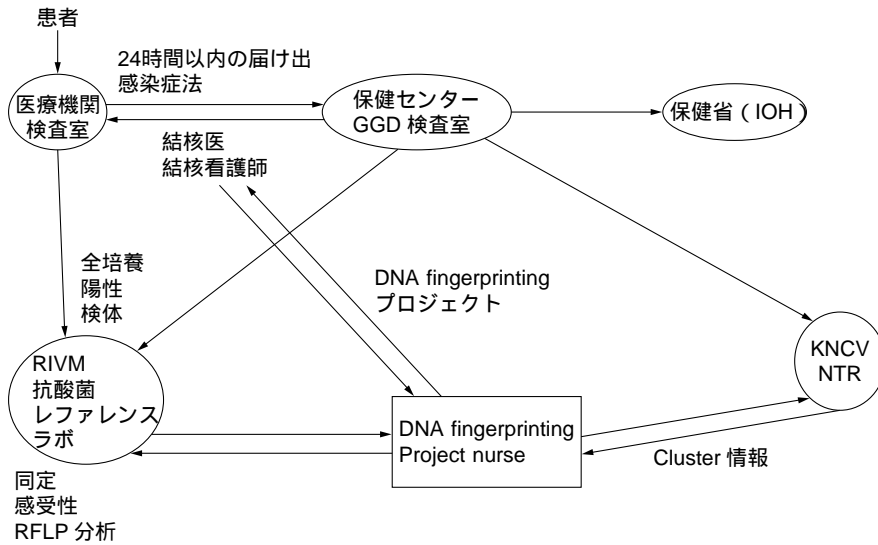
結核罹患率は87年までは順調な減少を遂げ、人口10万人対率で8.2まで減少したが、88年以降は他の先進国と同じく外国生まれの患者の増加が主な原因となり増加に転じ94年には罹患率11.4に達した。その後移民入国者への結核特別プログラムの実施を始めとする対策を講じ再び減少傾向を取り戻したが、近年は罹患率9程度で推移している(図1)。最新の2002年結核統計による新登録患者数は1,401人で、罹患率は8.7、そのうち外国生まれの患者は62%を占めている²⁾。

結核菌情報システムの中心的役割を果たす三つの組織

1. 各地方自治体の保健センター(GGD)

実際の結核患者の診断・治療・管理は、オランダ国内の40自治体にそれぞれあるGGDがその役割を担う。結核対策活動は結核医、結核保健師そして技師によるTB Unitと呼ばれるチームで行われる。オランダ国内で結核医は30人、結核保健師は60人配置されている。結核の診断・治療はもとより患者治療支援、ハイリスクグループへの健診、接触者健診を行っている。また、各地方自治体の検査施設におい

図2 オランダにおける結核菌情報システムの流れ



て、患者検体の塗抹培養検査を行っている。

2. オランダ結核予防財団 (KNCV)

国内結核対策のみならず、途上国への協力支援活動、各国と共同した研究活動も活発に行っており、世界の結核対策のイニシアチブをとっている。

国内結核対策の面では、国家結核対策プログラムの技術アドバイザーとして政府に対し結核対策の意見答申や勧告を行っており、国家結核対策の中心的役割を担っている。さらに大きな任務として、オランダの結核サーベイランスを行っている。結核サーベイランスは、新発生患者の登録およびその後の治療成績を含めた発生動向サーベイランス、薬剤耐性結核サーベイランス、そして結核菌 DNA 指紋法サーベイランスが行われている。また発生動向サーベイランスのデータは全国結核患者登録 National Tuberculosis Register (NTR) として KNCV にて運用管理されている。

3. オランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM)

公衆衛生および環境に関する研究・検査を行

う国立の施設である。活動内容は基礎部門から疫学部門など多岐にわたり、またオランダ国内のみならず西ヨーロッパでの関連分野での中心的役割を成しており、総職員数も 2,000 人を超える巨大機関である。

ここ RIVM 内に van Soolingen 博士を長とする抗酸菌レファレンスラボがあり、オランダ国内で発生した結核患者で培養陽性者のすべての培養検体を送られ、結核菌同定検査、薬剤耐性検査そして RFLP 分析を始めとする結核菌タイピングが行われている。またヨーロッパ各国の抗酸菌ラボとの共同によるヨーロッパ結核菌分子疫学ネットワークを組織しており、主に多剤耐性結核菌に焦点を当てた広域結核菌データベースの構築を進めている。

結核菌情報システム

結核菌情報システムの流れは大きく三つの部分に分かれ、それらが相互にリンクされ一つの結核菌情報システムを成している (図2)。

1. 結核患者登録情報

オランダでは、感染症法に基づいて結核患者を診断した医師は、24時間以内に各地方自治体のGGDに患者の届け出をしなければならない。各GGDは中央の保健省へ定期的に患者報告を行うが、感染症法の規定ではこれらごく基本的な6項目のみに限られており結核対策へのフィードバックに耐えるものではない。そこで、これまでのオランダ国内での結核対策における歴史的背景もありKNCVが主体となって結核患者発生動向サーベイランスを行い、各GGDは結核患者登録票を記入した後KNCVに定期的に送付を行う。したがってこれはGGDとKNCV間のボランティアベースの登録システムであるが、報告状況は極めて良く感染症法による保健省への報告数とKNCVへの報告数との差は年間で数件以内に収まっている。登録票は診断時報告票と登録から約1年後に送付する治療成績を含めた患者追跡票から成っている。各GGDから送付された登録票は、電子ファイル化された後KNCVの研究部門にある結核サーベイランス担当によりNTRとして管理される。NTRは集計分析が行われた後、毎年「Tuberculosis Index」として報告書が作成されGGDを始めとする結核対策・研究関連機関に送付される。

2. 結核菌データベース

オランダ国内で抗酸菌検査を行っている検査施設の正確な数は不明であるが、報告によると³44~46の施設で年間平均1,700検体(100未満から10,000検体の施設まで)の検査を行っている。各検査施設で培養陽性となった検体のすべてはRIVMの抗酸菌レファレンスラボに送られ同定・感受性試験が行われる。

93年よりRIVM抗酸菌レファレンスラボにおいて、オランダ国内培養陽性結核患者の全分離株に対するIS6110をプローブとしたRFLP分析の実施とRFLPパターンのデータベース

化が開始された。また97年からはRFLP分析の結果、バンド数が5本未満の分離株に対してはPGRSを行っている。RIVMの結核菌データベースに登録されているのは、菌情報と元の送付施設等簡単な背景情報のみであり患者個人情報に含まれていない。RIVMスタッフへのインタビューによると、菌到着から同定・感受性試験そしてRFLP分析結果のデータベース化まで約1カ月とのことであった。結核菌データベースはRIVMのサーバ上でApplied Math社のBioNumerics(同社GelComparの上位版)によって構築されており、オランダ国内のみならずヨーロッパ結核菌分子疫学ネットワークの中央データベースとなっている。

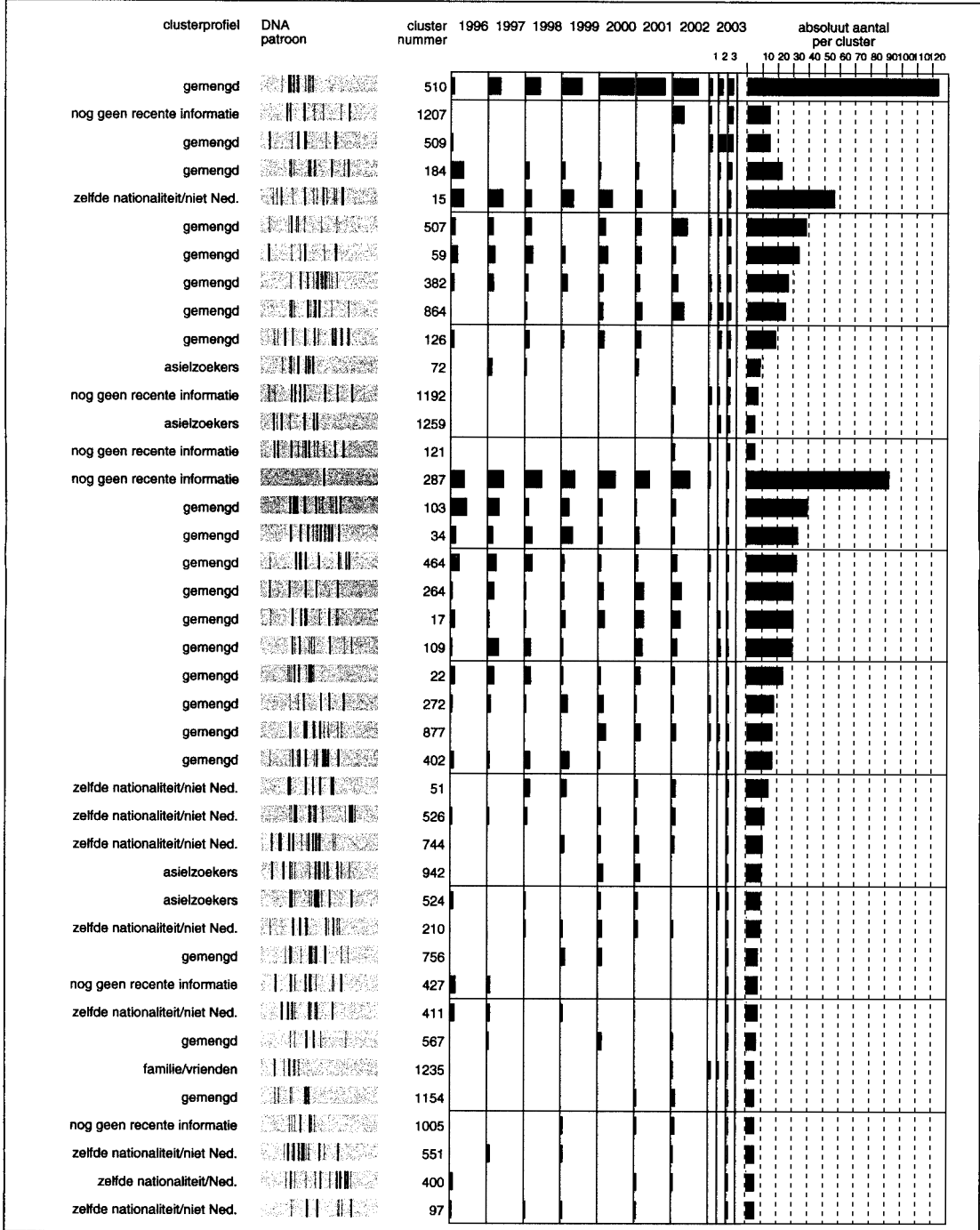
3. 結核菌DNA指紋法

サーベイランスプロジェクト

RFLP分析による同一結核菌株による感染者群の同定結果(クラスター分析)の結核対策現場へのフィードバック(クラスターフィードバック)と評価を目的として、95年国家結核菌DNA指紋法サーベイランスプロジェクトが開始された。これはクラスターが判明した患者に対し、疫学的関連の有無を調査分析するものである。プロジェクトには専任のプロジェクトナース(PN)が任命され(KNCV国内部門のMs. Sebek)、PNはKNCVのNTRとRIVMの結核菌データベースとの照合を行う。個人情報保護のためこの照合を行うのはPNに限られており保健センター等からの照合はできない。照合の結果クラスター判明患者については、他の同クラスター患者の情報とともに患者登録地区の保健センター所属の結核保健師に情報を伝達する。情報を受けた保健師は各患者について再調査を行う。再調査の方法は標準化されており、その結果からクラスター内の患者間について疫学的関連の有無を「確認」、「推定」、「未確認」の3段階で判定する。調査結果は再びPNに戻され分析・報告が行われる。国内約60人

図3 結核菌流行状況四半期報

Tuberculose: surveillance van actieve transmissie in Nederland 1996-2003
 DNA fingerprint clusters met groei in 3^e kwartaal 2003 en totale cluster grootte ≥ 5



Bron: DNA surveillance project

図4 Concerted Action on the Molecular Epidemiology of Tuberculosis (CAonTB) のウェブサイト



図5 ウェブ上での結核菌データベースの照合



の結核保健師はPNを中心として密なネットワークを形成しており、四半期に一度プロジェクトミーティングが行われている。

以上を要約すると、KNCVの患者データとRIVMの結核菌データをDNA指紋法サーベイランスプロジェクトにより相互連結して一つのシステムを構成しているということになる。

結核菌情報システムと分子疫学の成果と応用

結核患者登録から菌検体検査とRFLP分析

図6 年齢階級別 Transmission index の推定結果

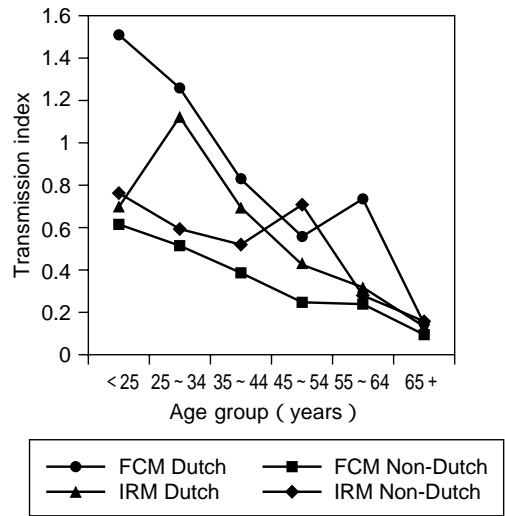
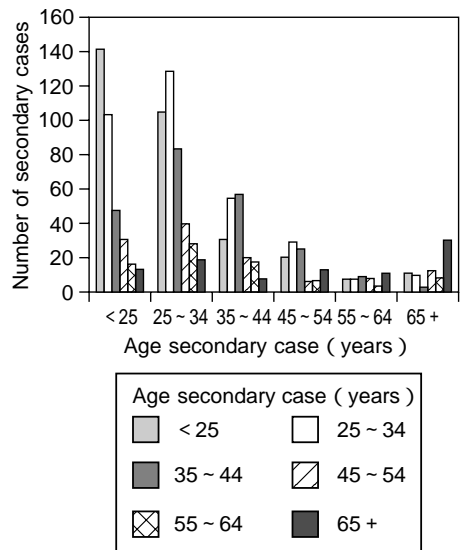


図7 年齢階級感染源別二次患者数



を始めとする結核菌遺伝子タイピングとデータベース化という一連のシステムの成果としては、前述の結核菌DNA指紋法サーベイランスプロジェクトによるクラスターフィードバックがまず挙げられる。従来の接触者健診では見落とされていた疫学的関連が新たにRFLP分析結果により判明し、そこからさらなる接触者対策が行われる。実際にどれくらいの「隠れた疫

学的関連」が判明したかについては、Lambregts van Weezenbeekら⁴⁾によるとクラスターフィードバック前に疫学的関連未判明者1,744人中「確認」が193人、「推定」が347人と併せて31%に対して新たな疫学的関連が判明している。一方、接触者健診などで判明した関連のうちRFLP分析では5%に関連なしの結果となった。

また患者情報とRFLP分析が相互連結されることでクラスターを形成する患者の背景要因分析が可能となった。KNCVとRIVMは共同で結核菌DNA指紋法サーベイランスプロジェクトを組織し、結核菌の「流行状況」をモニタリングしている。図3はプロジェクトが発表する結核菌流行状況四半期報で、右から順に累積のクラスター患者数、期別患者数、クラスター番号、RFLPパターン画像、そしてクラスター患者の主な背景となっている。患者背景は主にオランダ生まれか外国生まれ、同一居住地域、家族/親しい知人、亡命希望者か、などが記入されている。図中の一番上にあるクラスターがオランダ国内で最大のもので累積患者数が120人を超えるクラスターであり、オランダ生まれと外国生まれの両者が含まれるが主に違法薬物使用患者が多数を占める。

RIVMではオランダ国内のみではなくヨーロッパ広域にわたる結核菌データベースの構築と分子疫学ネットワークの組織作りを進めている。これは「Concerted Action on the Molecular Epidemiology of Tuberculosis (CAonTB)」として進められており(図4)、例えばデータベース構築に関しては、ヨーロッパ参加国の各抗酸菌ラボ間をインターネットにより結んだ分散型データベース構築とヨーロッパ共通のクラスター番号の設定を行っている。またインターネットを使って結核菌データベースへの照合をウェブベースで行うシステムも作製中である(図5)。

分子疫学の研究的応用も広く行われている

が、その一つであるKNCVの研究部門長Borgdorff教授の研究を紹介する⁵⁾。教授はRFLP分析の結果からクラスターを形成した患者に対しクラスター内の感染源患者の推定を数学モデルを用いて行い、どのような背景をもつ患者がより他の患者へと感染を引き起こしているかを特に年齢階級別や出生国別に調べた。図6は年齢階級別の引き起こしやすさ(Transmission Index)を推定した結果で、若年層で高く高齢になるにつれ低くなっていく傾向をみることが出来る。また図7は感染源の年齢階級とそこから引き起こされた被感染者の年齢階級別数である。44歳までの階級では同じ年齢階級間で、45~54歳では若年層への感染が起こっていることが示されている。

まとめ

オランダの結核菌情報システムは、その質、規模ともに世界の先端を進むものである。3カ月間のオランダ滞在中で実感したことは、それらを支えているのは研究成果に裏打ちされた技術的バックボーンとともに、効率的に役割分担された組織作りであり、それら組織を有機的につなげ運用していく有能なコーディネーターの存在、さらにコーディネーターを中心として現場を結ぶ人的ネットワークであるということである。

技術的な面においてもさらに改良前進している。オランダ結核患者発生動向サーベイランスは数年後にウェブ上から登録を行う新システムに移行予定である。またCAonTBはRFLPに続く新たな結核菌遺伝子タイピングの方法の開発と標準化に向けて着々と進めている。

わが国の状況を考えると、新発生結核患者数にしてもオランダの状況との差は大きく、すぐにオランダのようなシステムの構築を行うことは難しい点が多くあると考えられるが、良き手本としてKNCVやRIVMとの共同研究を通

じ、日本式の結核菌情報システムの構築は可能であると考えている。

文 献

- 1) Hermans PWM, van Soolingen, D Dale, et al. Insertion element IS 986 from *Mycobacterium tuberculosis* : a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1990 ; 28 : 2051 8.
- 2) Index Tuberculosis 2001 2002. The Netherlands. KNCV Tuberculosis Foundation, 2004.
- 3) Review of the Netherlands Tuberculosis Control Programme, 2003. KNCV Tuberculosis Foundation, 2003.
- 4) CSB Lambregts van Weezenbeek , MMGG Sebek, et al. Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands : 6 years' experience with nation wide cluster feedback and cluster monitoring. Int J Tuberc Lung Dis 2003 ; 7 (12) : 463 70.
- 5) MW Borgdorff, NJD Nagelkerke, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Depending on the Age and Sex of Source Cases. Am J Epidemiology 2001 ; 154 (10) : 934 43.

結核菌 DNA 指紋法を用いた結核対策改善事業成績

(1996 年 4 月 ~ 2004 年 5 月の概略)

結核予防会結核研究所 大角晃弘・高橋光良・内村和広・森 亨
沖縄県福祉保健部健康増進課 新垣さと子・仲宗根正

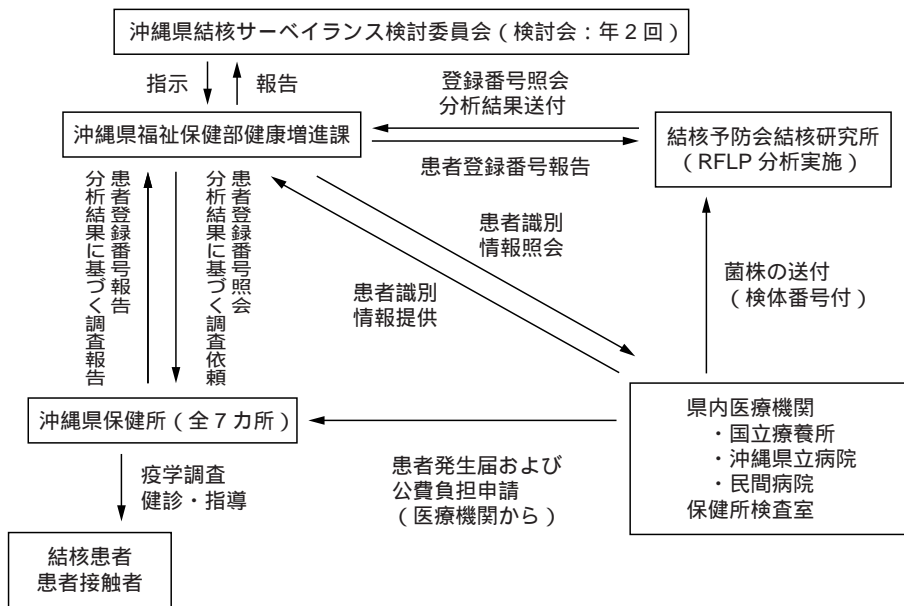
本稿は、2004年7月23日に結核予防会結核研究所で開催された第1回結核地域分子疫学研究会において、筆者が一般演題の一つとして発表した内容をまとめたものである。

本事業は、沖縄県の結核患者管理で実施されている接触者疫学調査や、結核発生動向調査事業（サーベイランス）の質的向上のために、標準的結核菌 DNA 指紋法（IS 6110 RFLP 法）を応用することの有用性について検討することを目的として、96年から実施されている。ここでは、本事業開始後2004年5月までに得られた主な知見について概説する（本事業の運営状況、96年4月から97年9月までに得られた知見等については、文献¹参照）。

沖縄県では結核予防会結核研究所と協力して、96年4月以降、沖縄県内で新たに登録された結核患者から分離培養された結核菌に標準法に基づく IS 6110 RFLP 分析²を実施している。2人以上の患者から得られた結核菌 DNA 指紋型が一致していることが判明した場合、それらの患者が登録されている保健所で、通常実施されている接触者疫学調査内容とその一環として実施した再調査内容について検討し、患者間の疫学的な関連の有無・程度に関して分析・検討を行った（検体の送付患者情報等の受け渡しなどについては図1参照）。

沖縄県で結核患者を診断している主な病院と、県保健所検査室で分離培養された結核菌を、結核研究所に送付して IS 6110 RFLP 分

図1 沖縄県の結核菌 DNA 指紋法を用いた地域結核患者管理向上事業の仕組み



注：患者識別情報とは氏名，性，生年月日，居住地等，患者発生届け出に用いる情報に限定

析を実施した。沖縄県と保健所は、この分析の結果に基づいて疫学調査を実施した。本事業の成績に関しては、沖縄県結核サーベイランス検討委員会によって総合的に検討された。期間中に菌陽性患者として登録された患者のうち、約7割の患者から得られた結核菌株が結核研究所に送付された。

96年4月以降2004年5月までに行われた沖縄県における結核菌 DNA の IS 6110 RFLP 分析の結果は、次のとおりであった。この間に登録された結核菌陽性結核患者は1,645人（97年以前のこの数には非結核性抗酸菌陽性例を含む）であり、そのうち70%の1,152人（1,152/1,645）について IS 6110 RFLP 分析を実施した。なおこの数は、2004年5月現在の検査済み者の実人数であり、登録対象外（県外登録者や新登録者以外の例など）が少数含まれているが、同一人物が複数回検査された分は除外されている。同様に結核研究所に菌が送付されていても非結核性抗酸菌であると確認されたもの

なども除外されている。延べ検査件数は1,305件に達した。保健所、年次、性、年齢階級別にみた分析件数は表1、表2のとおりである。

IS 6110 RFLP 法によるバンド型が全く一致した2株以上の菌株の群（クラスター：IS 6110 RFLP 法によるバンドのコピー数が5本以下の場合には、スポリゴタイプング³⁾による分析を行った）は、合計78個であった。IS 6110 RFLP で分析された1,152人中、延べ419人（36%）がなんらかのクラスターに属していた。仮に各クラスターの1人がそのクラスター内の他の構成員に対する直接あるいは間接の感染源になったと仮定すると、30%[(419-78)/1,152]が最近の感染によって発病したことになる。ただし以前から知られている幾つかの大きなクラスターのように、構成員患者間の菌の伝播が疫学的に説明できないようなクラスターもあること、また検査室内交差汚染を始めクラスターそのもの、あるいはクラスターの一部の患者には疫学的な関連がないようなケースが有りうるこ

表1 保健所・年次別にみた被検査者数

	北 部	石 川	コ ザ	中 央	南 部	宮 古	八重山	他・不明	総 計
1996年	8	27	46	33	30	6	14	0	164
97	6	26	22	20	30	11	15	0	130
98	13	22	30	35	26	6	7	6	145
99	15	20	36	41	32	6	8	4	162
2000	19	25	24	42	13	13	5	1	142
01	10	17	39	38	26	10	8	2	150
02	9	0	34	36	24	6	4	0	113
03	8	0	26	40	21	5	9	1	110
04	4	0	9	13	8	0	0	2	36
総 数	92	137	266	298	210	63	70	16	1,152

表2 性・年齢階級別にみた分析件数(実人数)・クラスター形成件数再掲

	実 人 数			クラスター形成件数 ^{*1}			クラスター 形 成 率 ^{*2}
	男	女	総 計	男	女	総 数	
0～19歳	4	7	11	2	4	6	55%
20～29	37	35	72	15	17	32	44
30～39	63	32	95	16	12	28	30
40～49	131	36	167	55	13	68	41
50～59	123	41	164	51	13	64	39
60～69	169	52	221	61	21	82	37
70～79	149	68	217	57	28	85	39
80～	122	83	205	27	27	54	26
総 数	798	354	1,152	284	135	419	36
クラスター形成率 ^{*2}				0.36	0.38		

*1 同一人物が複数回検査し、別のクラスターを形成する場合(1件)を含む

*2 感染源も含む

と、逆に同一菌株から発生した患者からの菌が、菌の変異のためクラスターを形成しないこともありうることなどに留意する必要がある。このことは後でみるように、クラスター形成率が年齢とはっきりと相関していないことにも現れている。

表2は、性・年齢階級別のクラスター形成の頻度を示している。0～19歳、20～29歳でクラスター形成率はそれぞれ55%、44%で全体の

それ(36%)より高いが、統計学的有意に達しない。また性別によるクラスター形成率には、明らかな差はなかった。

表3は、他の幾つかの要因についてクラスター形成の頻度をみたものである。結核治療の既往の有無別には、有意の差はみられない。「既往あり」中33%でクラスター形成がみられるということは、外来性再感染発病の存在をほのめかすものとも考えられるが、クラスター

表3 幾つかの要因とクラスター形成

	総数*	クラスター形成件数	クラスター形成率
総数	1,153	419	36%
性別			
男	799	284	36
女	354	135	38
年齢階級			
0～19歳	11	6	55
20～29	72	32	44
30～39	95	28	30
40～49	167	68	41
50～59	164	64	39
60～69	222	82	37
70～79	217	85	39
80～	205	54	26
結核の既往（既往歴不明26件を除く）			
既往なし	1,036	374	37
既往あり	91	30	33
検体採取年次			
1996年	164	68	42
97	130	48	37
98	146	59	40
99	162	64	40
2000	142	47	33
01	150	56	37
02	113	20	18
03	110	45	41
04	36	12	33
登録保健所			
北部	92	26	28
石川	137	49	36
コザ	266	92	35
中央	298	105	35
南部	211	85	40
宮古	63	22	35
八重山	70	31	44
不明	16	9	57

* 同一人物が複数回検査し、別のクラスターを形成する場合（1件）を含む

形成が必ずしも最近の感染を意味しないということについて注意深い検討を要する。

検体採取年次とクラスター形成率については、年次ごとに多少の変動が認められるが明らかな傾向は認めない。保健所別では北部保健所が最も低く（28%）、石川保健所（36%）、南部保健所（40%）、八重山保健所（44%）が比較的高い傾向がある。

図2は、クラスターの大きさ（構成員数）の分布をみたものである。構成員2人のクラスターが最も多く（25個）、クラスター構成員数が大きくなるとともに頻度は徐々に減っている。最大は構成員27人のクラスター011で、続いて21人のクラスター006、18人のクラスター005で、いずれも一見疫学的にはすべての感染伝播関連を説明できないクラスターである。クラスター番号006や同011は、以前から大きかったものに、さらに新たに構成員が加わってますます大きくなった。これらの患者は地域別にみても、多くの保健所にまたがっており、疫学的な関連は明らかではなかった（表4）。

いずれかのクラスターを形成した419例のうち、初回疫学調査および結核菌DNA指紋法の結果に基づいて実施された再疫学調査によって疫学的関連が明らかとなった例は25人で、クラスター内の疫学的関連判明率は6%（25/419）であった。クラスター内で疫学的関連が明らかとなった例の主な内訳を以下に示す。

1. 初回疫学調査で強く疑われていた結核菌伝播経路がRFLP分析結果によって明らかとされた例としては、夫婦間の感染が明らかとされた事例、親子間の感染が明らかとされた事例、1本鎖が異なるが、姉と弟とで同一の結核菌株であることが考えられた事例等があった。
2. クラスター003では、通常行われる初回疫学調査では判明していなかった結核菌の伝播経路が、RFLP分析結果に基づく再疫学調査

図2 クラスターの大きさ分布

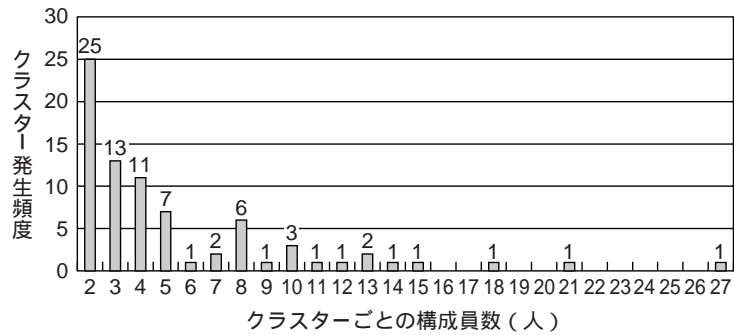


表4 クラスター番号および構成員数

クラスター番号	構成員数	クラスター番号	構成員数	クラスター番号	構成員数
001	8	021 b	7	070	4
002	9	022	8	071	2
003	13	023	3	074	4
004	13	024	12	076	3
005	18	025	2	078	4
006	21	026	10	079	4
007	8	028	2	080	4
008	5	029	3	081	2
008 a	2	034	3	088	2
009	3	036	5	089	5
011	27	036 a	4	093	2
011 a	5	037	11	098	2
012	3	038	2	099	4
013	2	039	4	099 a	3
015	5	040	5	100	3
016	10	045	2	103	2
018	7	046	8	104	3
018 ?	14	047	4	105	2
018 ? ad	2	048	2	108	2
018 A	6	049	8	109	3
018 B	2	050	2	110	2
019	15	056	4	111	2
020	10	058	2	113	2
020 d	2	059	3	114	2
021	4	067	3	合 計	419
021 a	3	068	2		

図3 クラスタ-003において推定された結核菌伝播経路

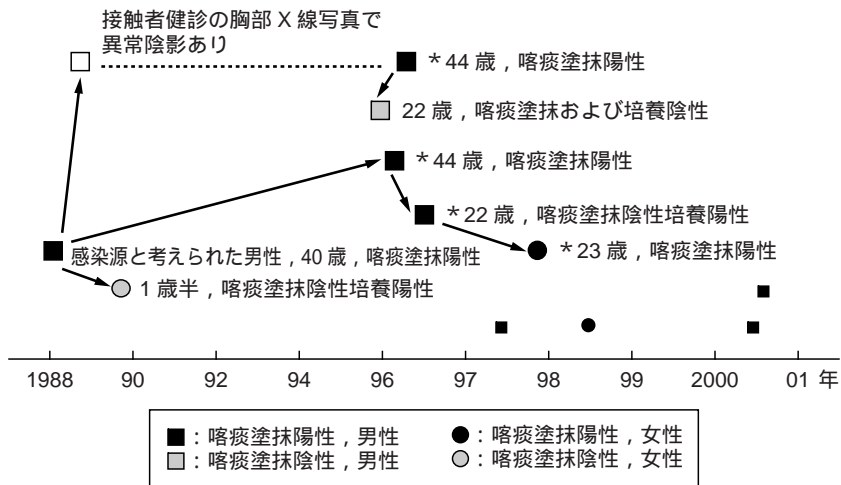
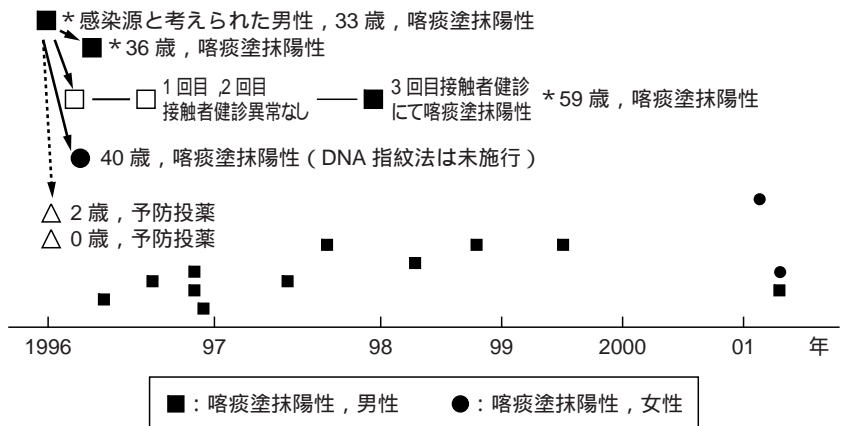


図4 クラスタ-005で推定された結核菌伝播経路



によって、感染源からの伝播経路が推定された事例を含んでいた（図3で*が付いている患者が、RFLP分析の結果同じクラスターに所属していることが判明したもの）。

3. クラスタ-005は、八重山における地域内流行型結核菌の存在が強く疑われるRFLP型である。このクラスターに所属するすべての患者は、石垣市在住か過去に八重山に滞在していたことがある人であった。患者間において接触歴の判明している場合もあるが（図

4で*がついている患者が、RFLP分析の結果同じクラスターに所属していることが判明したもの）、多くの場合は疫学的な関連は不明であった。このクラスターの年齢分布は、70歳で過去結核既往歴のある老人から10歳の小児まで広い範囲に及んでいた。

4. 接触者疫学調査等によってある患者間の感染が疑われたが、RFLP分析の結果クラスターが別であったために、患者間での感染は否定的と考えられた事例があった。同時期に

同じ職場から複数の結核患者が登録されたために職場における接触による感染が疑われたが、RFLP 分析結果によって否定された事例や、あるクラスターを形成している複数の結核患者と同じ病院に入院中であった患者が、RFLP 分析結果によって他のクラスターに属していることが判明したために、接触者疫学調査によって疑われていた結核菌伝播経路が否定された事例が認められた。

5. 院内感染に関連する例としては、精神科病棟内における院内感染事例や、気管支鏡の操作または管理に関連する感染が、RFLP 分析結果によって強く疑われた事例が認められた。

沖縄県における本事業により期待される結果としては、次のようなことが考えられる。

1) 結核菌 DNA 分析結果を地域の結核対策活動に用いることが、保健所保健師による疫学調査内容や接触者健診対象者範囲の設定を評価し改善されること、2) 地域における結核患者管理改善のための基本的な情報として、地域や病院等の施設内における結核菌伝播状況や共通感染源の存在を明らかにすること、3) 沖縄県

における結核疫学状況が記述されて、結核対策活動改善のための基礎資料となること(例えば、患者がクラスターに含まれるための危険因子、八重山にみられるような地域内流行型結核菌の分布状況等)などである。

文 献

- 1) 沖縄県結核サーベイランス検討委員会．沖縄県の結核患者管理における結核菌遺伝子型同定の有用性．日本公衛誌 2003；50：339-48．
- 2) Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting : Recommendations for a Standard Methodology. J of Clin Microbiol 1993；31：406-9.
- 3) Goyal M, Saunders NA, Van Embden JDA, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Spoligotyping and IS 6110 Restriction Fragment Length Polymorphism. J of Clin Microbiol 1997；35：647-51．