第77回総会特別講演

結核分子疫学の成果と展望

高橋　光良

キーワーズ：分子疫学，挿入断片*6110*，結核菌

緒　　言

本邦で1970年代終わり頃から見られる結核の減少傾向鈍化は現在まで継続しており，1997年に結核罹患率が43年ぶりに上昇した[1]ことを受けて厚生省は1999年7月に結核緊急事態宣言を発表した。現在も結核は毎年40,000人近い患者と2,500を超える死亡者を出している日本最大の感染症である。このような事態にあたり，分子疫学的技術を用いた院内感染や集団発生事例を含めて感染源追跡は予防内服や接触者検診を行う上で重要である。近年，結核菌ゲノム中にランダムに挿入された挿入断片（IS）*6110*が発見され，これをプローブにしたRestriction fragment length polymorphism（RFLP）analysis（制限酵素断片長多型分析）が可能となった[2]。これを用いて遺伝子レベルで菌の亜分類が可能となった。

結核の分子疫学は遺伝子工学に基づいたいくつかの手法の結集であり，高度な技術を要し，多種の実施方法が提案されている。そこで異なる検査室間の比較を可能にするため以下のように手順が標準化されている[3]。

培養菌からDNAを抽出して制限酵素*Pvu*Ⅱで消化する。次いで，アガロース電気泳動，サザーンブロティングにてナイロンメンブレンに転写，UV固定，さらに，IS*6110*と同一の断片をビオチン標識したIS*6110*由来プローブでハイブリダイゼーション後，アビジンにペルオキシダーゼ（POD）標識した物質を加え，PODの基質を加えて化学発光にてX線フィルム上で検出する。

このような実験室的操作と並行して，分子疫学で重要なことは複数の患者間の疫学的関連（接触状況やその時間的関連など）を解析することである。われわれの研究室では1992年頃にIS*6110*を用いた実験を開始した。当時結核療法研究協議会（療研）の薬剤耐性実態調査で全国から集められた結核菌株を無作為に選び検査した結果，菌株間で類似性の高いパターンが存在する一方，無関係な患者の菌株は明らかに異なるパターンを示していて，この方法を用いた亜分類が可能なことが判明した[4]。

また，それまでわれわれの研究室で薬剤感受性パターンとファージ型を用いて分別[5][6]された集団発生事例の保存株について確認を行った（Fig. 1）。疫学的な状況証拠から同一感染源と考えられた複数の発生患者菌株のパターンは一致したが，中にはグループ4のように異なるパターンを示すケースもあった。さらに，グループ6は同一患者からRFP耐性獲得前後に分離した2株であるが，ともに同一のパターンを示している。実験動物での継代や薬剤耐性の獲得などによりIS*6110*パターンが変化しないと言うSoolingenらの報告と一致した結果であった[2]。

IS*6110*を用いた結核菌の亜分類法は時間がかかることと技術の熟練を要することが最大の欠点である。近年PCR法を基にしたmixed-linker PCR, variable numbers of tandem repeat（VNTR），double repetitive element PCR（DRE-PCR），IS*6110* inverse PCR, IS*6110* ampliprinting, arbitrarily primed PCR（APPCR），polymorphic GC rich sequence（PGRS）およびSpoligotyping法が開発され，それぞれ新たな疫学的マーカーとして提唱され，その分別能力が評価されている[7]~[14]。これらPCRを基にした方法を用いて日本で発生した集団発生事例で評価した結果，結核菌の亜分類能力は極めて低く，ISパターンによるIS*6110*のバンドパターンの差異が最も分別能が高いことが判った。さらに，他のマーカーであるPGRSは50本以上のコピーが検出されるが，レーン上部のバンドの多様性でしか分別できない。これらのことより，AP-PCR法，PGRS

結核予防会結核研究所細菌学科

連絡先：高橋光良，結核予防会結核研究所細菌学科，〒204-8533 東京都清瀬市松山 3-1-24（E-mail: tak@jata.or.jp）
（Received 22 Jul. 2002）

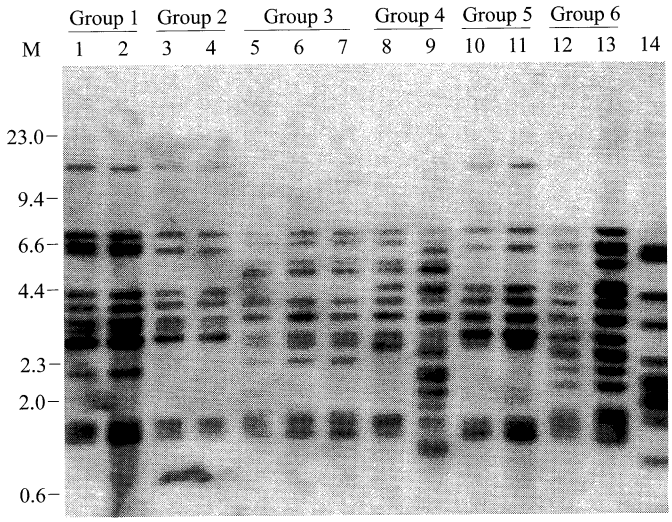

Fig. 1 Various groups with identical IS*6110* banding patterns by DNA fingerprinting of epidemiologically related *M. tuberculosis* from six outbreaks. Groups 1, 4 and 5, outbreaks in the office; groups 2 and 3, the outbreaks in the school; group 6, familial infection; lane 14, *M. tuberculosis* H37Rv, respectively. M, marker at left indicate sizes of lambda *Hind*Ⅲ.

法は日本の株に対しては外国で報告されるよりも分別能力が低いことが示された（高橋，未発表）。このことは同時に日本の結核菌株の遺伝子型に共通性があって，これがマーカー別の分別能力に影響していることを示唆している。

欧米のいくつかの国や地域，本邦の一部ではコンピューターを用いた患者管理への応用としてRFLPパターンを取り入れて患者管理を行っている。すなわちRFLP分析後のクラスター解析から集団感染を予測して結核対策に還元している。特にオランダ（全国）や米国サンフランシスコでの分子疫学による患者管理はすぐれた実績を上げている[21)24)]。ここでは当研究所で得られたこの分野の知見の総括と将来の展望について述べたい。

1. 集団発生事例における感染伝播の証明とその応用

中耳結核という比較的希有な病気が，接種感染という感染様式で起こったと考えられた，きわめて特異で規模も大きい発生例がW県から報告されている。発生した患者の多くは中高齢者であったために，従来の常識では同一感染源からの感染・発病は考えにくいケースであったが，RFLP分析によってそのように断定された。

このケースではA耳鼻科の受診中，受診歴のある患者の中から合計13人の中耳結核患者が発生し，このうち10名は耳漏から結核菌が塗抹陽性で証明されている。この患者は全員もともと中耳炎等で耳漏，鼓膜穿孔のあった例である。これらのうち以前に活動性肺結核を発病していた者は知られていなかった。RFLP分析により全員が同一菌株による感染とされ，A医院での感染伝播と推定され，接触者検診が展開された。結果として2,500名以上の接触者検診受診者のうち，A医院の患者から中耳結核15名，A医院の従業員・家族などから肺結核患者4名（A医院長医師がおくれて感染性肺結核を発病し，医院長からの感染で発病したと考えられた），総計で19名の患者が発生し，さらに予防内服を指示された者が17名でた。このようにRFLP分析は患者発生に際して感染経路の特定，感染伝播範囲の決定を正確に行うためにきわめて強力な根拠を与える[15)]。

同様に，N県の特別養護老人施設で起こった入居者を中心とする集団発生事例では，Fig. 2中，レーン1の80歳代の患者が結核を発病したが，提携病院で肺炎と誤診され，2年後にやっと結核と診断されるまで同施設で生活していたために20～90歳代の職員や入所者ら23名が次々と結核を発病，うち9名が死亡した[16)]。いまの日本では年齢が70歳以上であれば大半（70％以上）が結核既感染者であり，事実何名かの患者の胸部X線所見には陳旧性の結核所見が見られる。初感染発病学説によればこのような既感染者への外来性再感染は発病の原因としては何ら問題にならないと考えられている。ところがRFLP分析から菌株の同一性が確認されており，これらの既感染者に再感染発病が起こったと考えるのが自然である。このことから高齢者，とくに80歳，90歳という超高齢者において基礎疾患や全身衰弱のあるような場合

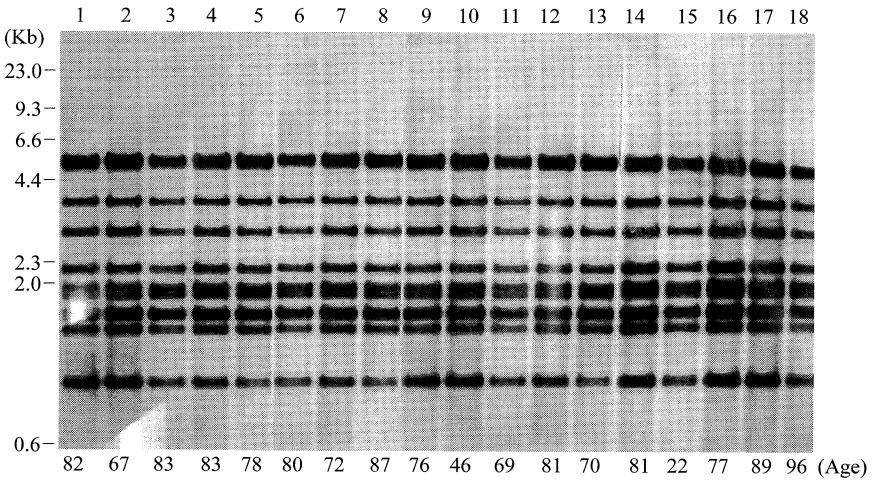

Fig. 2 Outbreak of 18 *M. tuberculosis* isolates from case patients at a nursing home for the elderly in N prefecture, Japan. Molecular size of fingerprinting patterns were shown at left site by lambda *Hind*Ⅲ.

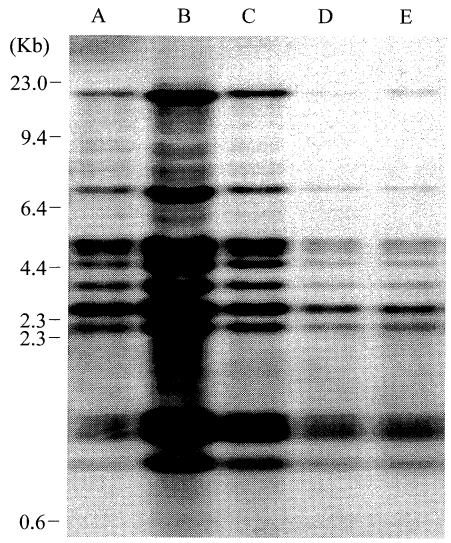

Fig. 3 Laboratory cross-contamination at F hospital. A, index case; B, C, D, and E, patients whose culture yield *M. tuberculosis* in the absence of signs or symptoms of tuberculosis and who subsequently have good clinical outcomes without therapy. Molecular size of fingerprinting patterns were shown at left site by lambda *Hind*Ⅲ.

には，あたかもエイズ患者で示されたように，外来性再感染による発病があり得ることがRFLP分析によって科学的に証明されたのである。

RFLP分析が通常の疫学的手法では確立しえない隠された結核菌の伝播を証明した事例としては東京S地域で発生した路上生活者等の患者多発例の分析がある。相次いで発生するこれらの患者の菌株をRFLP分析したところ，2株，3株からなる同一パターン株のクラスターが確認され，それに基づいて行った疫学調査によって，各クラスターは同地域にあるサウナ施設A, B, C, Dを介する感染伝播であったことが確認された。あるサウナでは従業員も巻き込まれていた。この事例はサウナのような公共の風俗・遊興施設とくに路上生活者のような結核発病リスクの大きい者が多く利用する場が結核感染の場となりうることを明らかにし，大都市の結核問題に一石を投じた[17]。

RFLP分析による感染伝播の証明のさらに特異な例として検査室cross-contaminationの証明がある（Fig. 3）。結核専門のF病院において，いく人かの患者の臨床経過と結核菌所見が一致しないことから，これら患者B～Eが培養陽性とされた時期にやはり陽性となった他の患者のRFLPパターンを比較した結果，B～E株は別の患者Aと一致していることが判明した。このことからこの患者Aの菌株がなんらかの原因で他の患者B～Eの検体を汚染したものと考えられた。このような検査室を介する偽陽性の原因として，伊藤らは一般的に検体の取り違い，検査技師の肺結核による検体内への汚染，試薬の抗酸菌汚染，陽性検体から他検体への汚染が考えられ，とくに「陽性検体からの汚染」が高率に発生すると述べている[18]。

同一患者菌株のRFLPパターンの経過観察は，このような検査室内汚染に加えて，再発と外来性再感染の区別も可能とする[19)20)]。

2. 結核菌の感染様式の検討と流行株の分析

地域人口集団内での結核感染・発病の動態を精密に明らかにするため地域の全患者を対象として地域分子疫学研究がオランダ，ノルウェー（全国），ニューヨーク，サンフランシスコ，アーカンソー州などいくつかの低蔓延

国・地域で展開されている[21)~25)]。日本ではわれわれが沖縄県との共同研究として同様の観察を1996年4月から行ってきた。このプロジェクトは県内で発生する菌陽性結核患者の菌株をできるだけ多く結核研究所にてRFLP分析し，そのパターンを相互比較し，感染伝播が疑われる患者の組み合わせについては保健所が綿密な聞き取り調査を行い，これによってより正確な接触者対応を行えるようにすることを目的としている。

沖縄県は戦後まもなく保健所を中心とした確固たる結核対策を確立し，復帰を経たのち今日に至るまでとくに保健所保健師を核とした患者管理のすぐれたシステムの運営が行われている。県の人口は約130万，結核罹患率は2000年で人口10万対28と全国よりも低い水準を達成している（復帰当時は全国106.7に対して県142.4〔1974年〕であった）。年間新発生培養陽性患者数も200前後と手ごろであり，入院治療施設も8病院と比較的限定されている点も有利である。RFLP分析は1996年4月～2000年1月に新登録となった患者990名に対し766名（77.4%）に対して行われた。

RFLP分析の結果，結核ゲノム内のIS *6110*コピー数の分布を見ると，1本から23本にばらついている。この知見は先に述べた療研の全国的サンプル株の分析でみられた1本から19本の間のばらつきを示したことと類似していた。実際に沖縄県の分離株と療研分離株とのコンピューターによるクラスター分析によっても類似性が確認された。また，偶然と思われる同一パターンを示した菌株も確認された（未発表）。このことは，1960年代の結核蔓延時代に日本全国に流行した有力株あるいは最近の感染による偶発的伝播の影響を受けているのかもしれない。コピー数1本，12本，14本という株が比較的多く，コピー数の分布曲線でピークを形成していた。同一パターンのクラスターが64群（所属する患者の総数272人，全分析対象患者の35.5%）発見された。Fig. 4は検出されたパターンの一部である。

クラスター5はある地域から得られた患者18人からなる一大クラスターであるが，その成員の間の相互接触関係は証明されていない者が多く，幾世代か前のこの株の流行を反映するendemicな有力株であることと推定された。

IS*6110*で1～5本のバンドを保有する株においては，バンドの出現部位が比較的固定しており（これらのバンドに相当するIS配列の存在部位がHot-spot regionにあるため安定性が高いためとされる），そのために個体識別上の疫学的な有効性が低い[26)]。そのためこのような菌株に対しては，別のマーカーを使用することが有効であるとされている。当所ではこれに対してSpoligotyping[14)]を行っている。

IS*6110*による分析で検出されたコピー数が5本以下の株で構成された18群のクラスターに属する菌株をSpoligotypingしたところ，2つのグループに大別された。沖縄県でクラスター形成をした株の70%が次項に述べる北京遺伝子型で，37～43スペーサーを欠損したパターンとして検出される株であった。

また，沖縄県で分離された結核菌をランダムに抽出した標本では303株中216株（71.3%）が北京遺伝子型であった。

2つの菌株間のバンド（個数と部位）の類似性を類似性指数で表現し，この値が100%（完全一致）となる菌株の群をクラスターというが，それ以下の類似性のもの同士も類似性の水準ごとにまとめる分析（クラスター分析）を行い，その結果をデンドログラムとしてまとめて解析した。上述のように完全一致のクラスターが64群例発見され，そのうちの42%がサイズ（構成員数）2の小さいものであり，ついでサイズ3が20%，サイズ4が

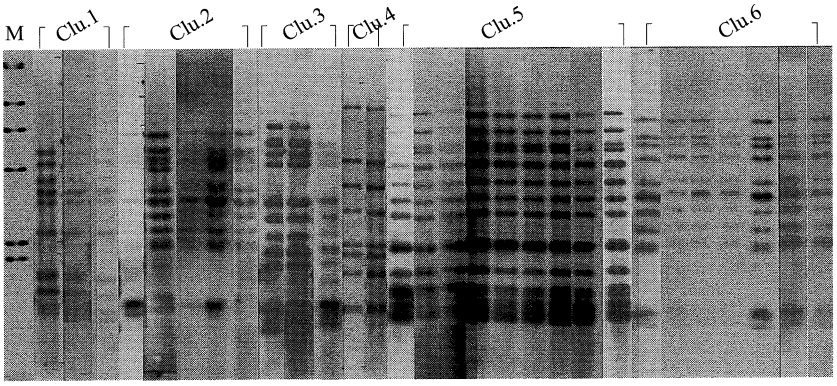

Fig. 4 A part of RFLP analysis of *M. tuberculosis* in Okinawa prefecture between 1996 and 2001. Clu: Number of the cluster. Molecular size of fingerprinting patterns were shown at left site by lambda *Hind*Ⅲ.

11％含まれていた。年齢階級別に見たクラスター形成の割合は10～19歳が57％，20～29歳が43％で70歳以上34％であり，このことより若年者層ではクラスター形成がやや高い傾向が検定でみとめられ，このことは最近の感染による発病が若年者に多いことを反映すると考えられた（Table 1）。

最近まで結核低蔓延地域では内因性再燃が主な結核の発病の原因と見なされていたが，デンマーク，ニューヨーク，サンフランシスコ，オランダにおいて行われた人口集団を基にした研究から平均43％の結核患者から分離された菌がクラスターに含まれており，このことは低蔓延国でも最近の感染が発病に重要な役割を果たしている可能性のあることを示唆するもので[21)23)24)27)]，本知見と一致した結果となっている。

しかし，われわれの観察では，クラスター形成61群（272人）中の10クラスターに所属する21名（9％）で疫学的検討による伝播が証明されたにすぎない。この中には直接の接触はないが事業所の集団発生で同僚から感染発病した親からその子供に伝播したような事例も確認されている。伝播の疫学的関連が確認できなかった多くのクラスターにおいては，構成員が高齢者同士のことが多く，疫学的接点の証明が困難であった。米国アーカンソー州で行った高齢者を対象とした疫学調査においても，強力な追求にもかかわらず10％しか接触が確認されなかったと報告されている[25)]。このことは，おそらく過去（場合によっては親あるいはそれより前の代に）に起きた有力流行株のいわば垂直伝播による発病を示唆するが，最近の患者間の偶発的な伝播も完全には否定できない。また現在の接触関係の確認は1保健所管内の患者同士については可能だが，2保健所以上にわたる場合にはプライバシー保護の上からも困難になる。しかしこのようなところに今後の感染源追求，接触者対応の重要性があり，このような問題を克服するための保健所の奮起が望まれる。

Table 1 Clustering rates according to age groups, Okinawa prefecture, 1996 and 2001.

Age	Clustered cases (%)	Unique cases	Total
0–9	—	—	—
10–19	4 (57)	3	7
20–29	20 (43)	27	47
30–39	19 (37)	33	52
40–49	38 (42)	53	91
50–59	40 (47)	45	85
60–69	47 (36)	83	130
≧70	71 (34)	139	210
Unknown	3 (14)	19	22
Total	242 (38)	402	644

Chi-square value for slope＝2.56 ($p>0.05$)

3. 結核菌遺伝子型の解析

薬剤耐性獲得や一部の酵素活性の変異に関する点突然変異は別として，IS*6110*のような遺伝子型の変異が表現型の変異に関連することもあり得るらしい。上の沖縄県の一大クラスターのような地域の有力株の存在は結核菌株の特定IS遺伝子型が流行を維持する要因となりうることを示唆する。そうしたものの1つが後に述べる北京遺伝子型で，これをもった菌株は感染伝播力が強く，臨床的にも重症になりやすいことが示されている。また，他の遺伝子型を解析する方法としてIS*6110*, *dnaA-dnaN*部位のIS*6110*挿入の有無，あるいはspoligotypingがある[2)14)28)]。

人口集団による遺伝子型の分布については世界的な結核菌株の遺伝子型の比較研究プロジェクトであるGlobal characterization[29)]の中で注目されている。そうした遺伝子型のひとつがアジア地域に広汎に分布する北京ファミリー（北京遺伝子型）と呼ばれるものである。北京遺伝子型の結核菌は抗結核薬の作用に対して有意な高頻度で抵抗性であることが示されている[30)~32)]。このIS遺伝子型は1990年代初頭の米国における大規模な多剤耐性結核の院内・施設内感染を引き起こしたW株とよく類似している。このW株は北京ファミリーの進化的な分枝といえるものであり，北京遺伝子型と比較するとIS*6110*のパターンは類似点を持ちIS*6110*をA1，B1，B2，C1，C2領域内に保有している[28)]。さらに，Spoligotypingパターンは特徴のあるスペーサー配列35-43のみを保有するパターンを示す点で北京ファミリーと共通であることが知られている[14)]。各国で分析されたIS*6110*のコピー数は0から23本の分布が確認され[4)33)34)]，同時に高蔓延国や中蔓延国のアフリカ，アジアなどではIS*6110*のRFLPのパターンは低蔓延地域に比べてしばしば有意に多様性が低く，特定のパターンの優勢な菌株の存在が知られている。例えば，チュニジアでは62％の分離株が65％以上の類似性を有する3つのファミリーに属しており，エチオピアでは52％の分離株が4つのファミリーに属している[35)]。低蔓延国のそれは集団発生や院内感染事例が多く，特定パターンの株の多発はこのためと考えられ，一般にパターンは多様性が高いとされている。しかし対照的に，Warrenらは南アフリカのケープタウンでは結核蔓延地域であるにもかかわらず，RFLPのパターンは多様性が高いことを報告している[36)]。われわれが行った国別の結核菌株の解析でも，国に特異的なISパターンが存在することが判った。韓国，インド，インドネシア，イエメン，ネパール，タイ，ボリビア，モンゴル，上海株のパターンを示した（Fig. 5）。アジア大陸に沿った国々では類似性の高いパターンを示したが，イエメン，イン

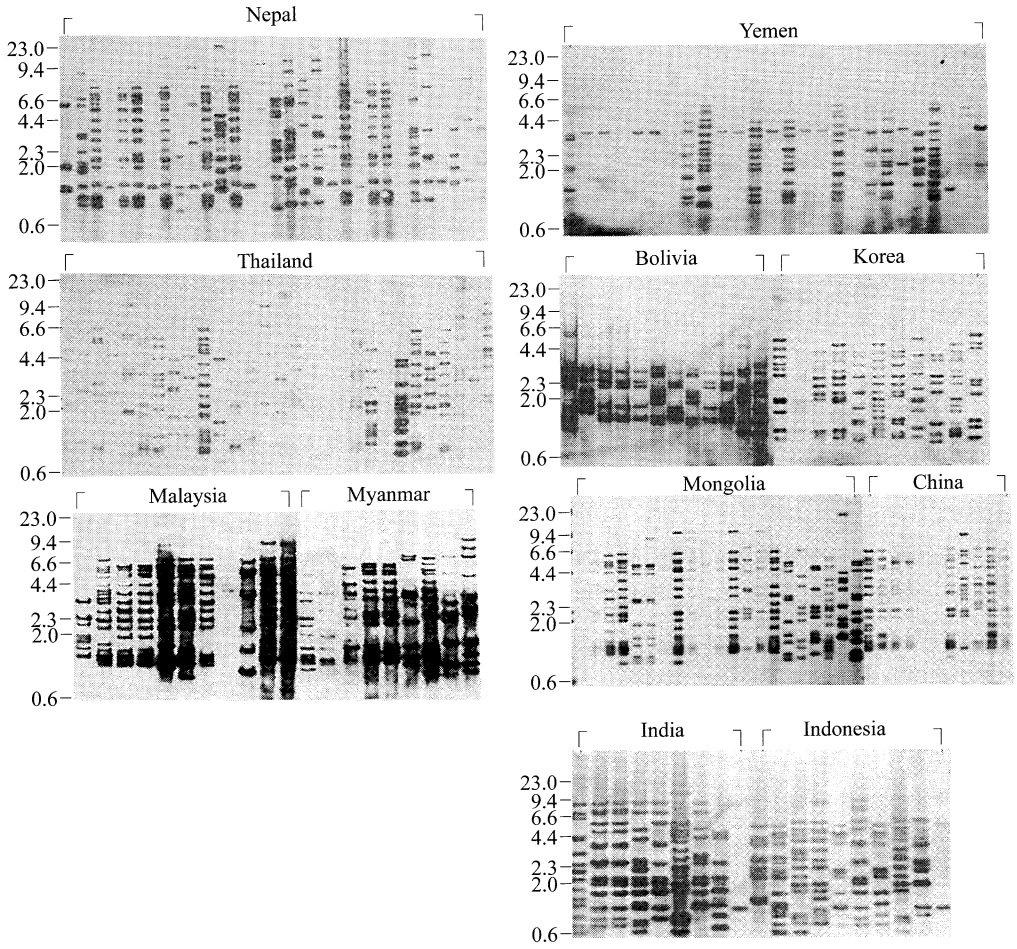

Fig. 5 Specific RFLP patterns of epidemiologically unrelated *M. tuberculosis* among various countries.

ドネシア，ネパール，南米ボリビア株は国ごとに特徴あるパターンが見られた。このことは在日外国人結核の日本への影響のモニタリングにRFLP分析が応用できる可能性を示唆する。実際に在日外国人の菌株のRFLP解析では低蔓延国からの外国人結核患者株は日本で検出される菌株に似ており，結核高蔓延国からの外国人結核患者株は在日5年以内のものではそれぞれその国に特有のパターンを示した。これらの知見はデンマークでのエスキモー移民からの影響[37]，オランダでのソマリア移民[38]，米国でのアジア，ヒスパニック，メキシコ系移民[39)40)]等の所見と一致する。これらのようにRFLPパターンの国際比較は結核菌伝播のサーベイランスとの関連においても意義がある。

4. 結核菌流行株の解析

RFLP分析を用いた結核の流行株の解析はその国や地域でとくに多く伝播している結核菌株，あるいはそのような群を把握することを可能にする。さきに述べた北京遺伝子型もその一つと考えられる。Soolingenらは IS*6110*やPGRSを用いてISパターンが類似する菌株が中国をはじめアジア諸地域に多いことに気づき，これをひとつのファミリー（菌族）としてまとめ，北京遺伝子型としたのである[41]（ただし北京遺伝子型のすべての菌株においてIS*6110*のパターンが完全に一致してはいるわけではない）。また，この北京遺伝子型はspoligotyping法でスペーサー配列37-43のみを共有することが知られている[41]。いずれにせよ，この菌株は他の菌株に比べて，感染・発病に関連して優位に選択されているのであろう。

さて，ここでSpoligotypingの原理を簡単に説明すると，spoligotypingは結核菌群菌株のDR領域に複数存在する36 bpからなるdirect repeats（DR）に挟まれた配列（スペーサー配列）を増幅して比較する方法である。DRの数は菌株間で異なり，スペーサー配列も菌株間で異なる。*M. tuberculosis* のH37Rv株および*M. bovis* BCG P3株のDR領域の解析を行い，43の合成オリゴヌクレオチドが設計されている。実際にspoligotypingを行うには，DRに対し相補的なプライマーを使用し，隣接するDRとの間に存在するスペーサー配列を増幅する。増幅

したスペーサー配列をメンブレンに固相化した43の合成オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせ，個々のスペーサー配列の有無を解析する。一方のプライマーはあらかじめビオチンで標識されているので，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化学発光で検出することができる。

Spoligotyping のような PCR を基本とした本法はより少ない試料での解析が可能である。手法的にもより簡単である。このため，IS を補うための結核菌群の二次的解析には spoligotyping が最も広く利用されている。ただし，日本のように結核菌の RFLP 分析で70％近くが北京遺伝子型を保有しているような場合には，spoligotyping を一次分析のスクリーニングに用いることは有効性がない[42]。

さらに spoligotyping 法を利用して結核菌群のなかの結核菌，*M.microti*, BCG を含む *M. bovis* を分別できる[14)43)]。しかし，*M. africanum* に関しての報告は，まだなされていない。

IS*6110* で分析したアジア近隣の株を spoligotyping した結果，IS*6110* と同様にやはり国別に特異的なパターンが存在していることが判明した。韓国，上海，日本には北京遺伝子型の株が高頻度に存在していたが，インド，インドネシア，フィリピン，マレーシア，ミャンマー，タイ，ソロモン，イエメン，南米ボリビアではそれぞれの国に特異的な遺伝子型が存在していた（Table 2）。国別の特異的なパターンは Table 2 のごとく明確に分別でき，グローバルな結核伝播の解析に応用可能であると思われる。一方，spoligotyping で北京遺伝子型に一致しても，IS *6110* パターンは国別に保存された型が存在していることも重要である。両者を利用すればグローバルな菌型の分布の解析をさらに精緻化できよう。既にオランダで発生した *M. bovis* による多剤耐性菌の院内感染事例[44)]，スペイン旅行中に加療入院した病院での多剤耐性 *M.bovis* による院内感染事例[45)]の感染源追跡に利用されている。

dnaA-dnaN 部分変異を用いた解析もまた結核菌流行株の解析の一法である。*dnaA-dnaN* 部分変異から詳細な遺伝子型の解析が可能であることが報告された。これは Fig. 6 のごとく A1, B1, B2, C1, C2 部位を PCR でそれぞれ増幅して，その間にある IS*6110* 断片の有無で遺伝子型を決定する方法で，W 株について詳細に検討された。その結果，W 株は A1（3.36 Kbp），B1（1.96 Kbp），B2（1.14 Kbp），C1（2.25 Kbp），C2（6.46 Kbp）領域に IS*6110* の遺伝子断片を 5 つ保有する点で北京遺伝子型結核菌株と一致していることが解明された[28)]。もちろん北京型のみならず他の遺伝子型についても IS*6110* で解析後，フィルター上のバンドの距離や PCR 後の塩基配列から解析可能である。

ここで興味ある知見は，W 株の薬剤感受性変異体（IS *6110* による RFLP 分析で W 株と同一 IS パターンを保有する）の B1 部位中における IS*6110* の断片が欠如しているが，多剤耐性 W 株ではそれが存在することである[28)]。また，B2 部位が欠失している N ファミリーも報告されている。これら 5 つの部位を詳細に検討すれば結核菌の遺伝子型の解析が可能となろう。

5. IS*6110* の安定性

IS*6110* の変異と安定性を検討するため，結核予防会複十字病院で結核症と診断された結核患者96名からくり返し分離された合計192株を対象として分析した。その結果24組（25％）が 1 本のバンド付加の変異を示した。

Table 2 Distribution of a specific spoligotypes among isolates of *M. tuberculosis* from various countries.

Origin	Spoligotypes							Total
	Spt-1 (B.F)	Spt-2	Spt-3	Spt-4	Spt-5	*M. bovis*	other	
Okinawa	216 (71.3)	15 (5.0)	—	9 (3.0)	—	2 (0.7)	61 (20.1)	303
Korea	7 (63.7)	3 (27.2)	1 (0.9)	—	—	—	—	11
Nepal	13 (20.6)	1 (1.6)	11 (17.5)	23 (37.7)	—	—	15 (26.3)	63
Bangladesh	2 (28.6)	—	—	3 (42.8)	—	—	2 (28.6)	7
India	1 (11.1)	1 (11.1)	6 (66.7)	—	—	1 (11.1)	—	9
SriLanka	1 (20)	—	—	—	—	1 (20)	3 (6)	5
Malaysia	27 (30.7)	6 (6.8)	—	27 (30.7)	—	4 (4.6)	24 (27.3)	88
Myanmar	21 (29.2)	1 (1.3)	—	16 (22.2)	—	1 (1.4)	33 (45.8)	72
Indonesia	4 (44.4)	2 (22.2)	1 (11.1)	—	—	—	2 (22.2)	9
Thailand	3 (11.5)	—	—	14 (53.8)	—	1 (3.9)	8 (30.8)	26
Philippines	2 (14.3)	—	—	—	12 (85.7)	—	—	14
Solomon	—	17 (27.0)	—	1 (1.6)	—	1 (1.6)	44 (69.8)	63
Yemen	1 (5.3)	10 (52.6)	6 (31.6)	—	—	—	2 (10.5)	19
Bolivia	—	16 (100)	—	—	—	—	—	16

Spt., spoligotype ( ), percentage B.F, Beijing family

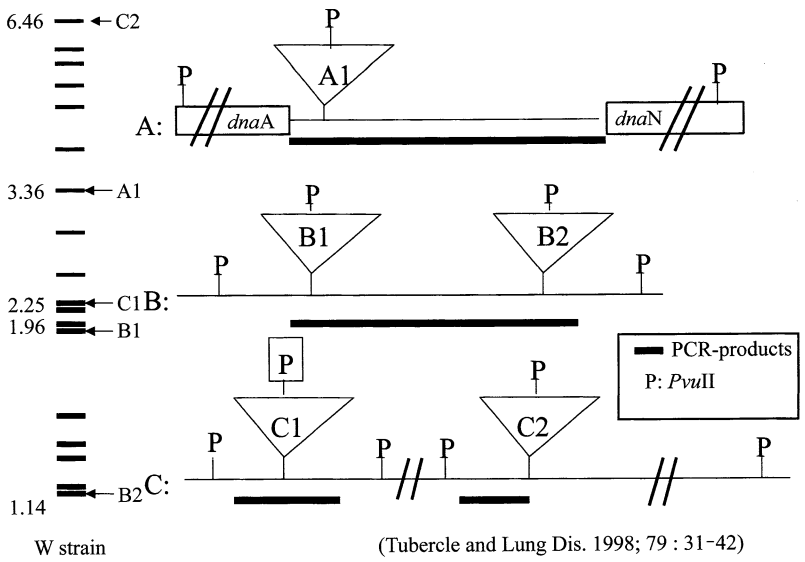

Fig. 6 Physical map of the *dnaA-dnaN* region of *M. tuberculosis* containing the IS*6110*. Arrows indicate the bands corresponding to the IS*6110* insertions 5 chromosomal regions.

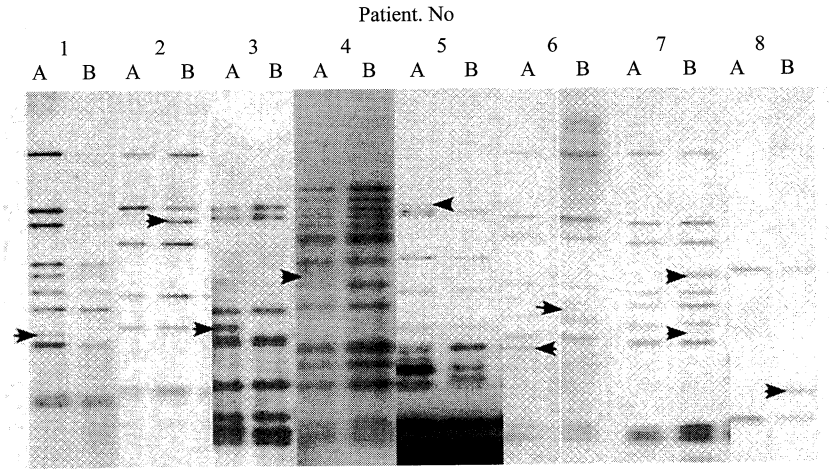

Fig. 7 Stability of RFLP patterns by *M. tuberculosis* clinical isolates from identical patterns. Lanes show RFLP patterns from paired isolates separated by 3 days to 90 days taken from a part of patients.

このことは，2名の患者の菌株間にバンド1本くらいの違いがあっても，疫学調査上接触が判明すれば2株は同一菌株由来と考えられることもあることを意味している。Fig. 7は同一患者間でISが転位（欠損および付加を含む）した株の一部を示す。また，米国の臨床株に関する観察でも90日間で29%の株に何らかの変異が確認されている[46]。一方，オランダのグループは，長期間排菌された結核菌で分析した結果，IS*6110*の安定性は計算上3.2年に1本のバンドに変異が起こる程度のものであることを解明した[47]。半数の菌株において3～4年で1つのバンドに変化が見られたが，この3～4年という時間は，感染から発病までの時間経過からみても，疫学的に関係のある菌株と異なる菌株を区別し，必要な対応をとるのに十分であり IS*6110*を用いたDNA fingerprintingの結核伝播の疫学研究や対策に対する有用性を支持するものである。しかし，前述したように低コピー数のバンドを保有する株はhot-spots領域に保存され非常に安定性が持続することが知られており，spoligotypingや別の挿入配列のような異なる遺伝子マーカーでの分析が必要とされる。

6. *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 あるいは牛型菌 *M. bovis* 野生株と異なり，特徴のある 2 本バンドを示す[4]。このため BCG と結核菌の鑑別は IS *6110* のみで行われ，何ら不都合は生じなかったが，近年，BCG Tokyo 株に酷似した結核菌株や BCG Tokyo 株の IS の変異株が発見されるようになった。特に結核菌の場合，アガロース電気泳動時の制限酵素断片の BCG 変異株と類似したパターンで 5 Kbp 付近に 1 本バンドを保有するものがあり，サザンブロット時に寒天の種類や転写条件の差異によりフィルターに転写し難いこともあると考えられ，そのためバンドが全くなくなることもあるので注意を要する。

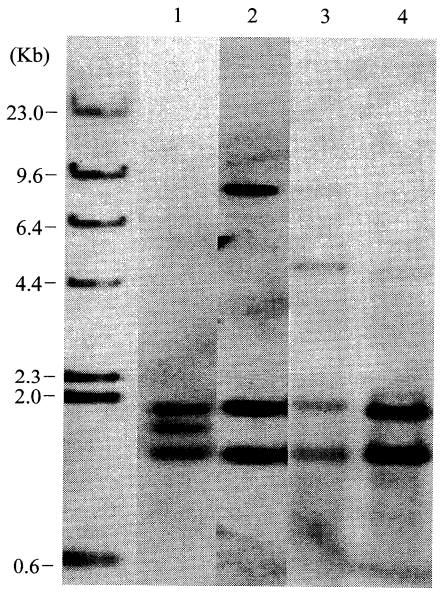

Fig. 8 DNA fingerprinting of *M. bovis* BCG-like clinical isolates. Lane 1, isolate from a bladder cancer patients with BCG Tokyo instillation therapy: Lane 2, isolate from a abscesses of skin on the chest after BCG Tokyo vaccination; Lane 3, isolate from sputum specimen; Lane 4, *M. bovis* BCG Tokyo. Molecular size maker at left side of lambda *HInd*Ⅲ.

Fig. 8 において，レーン 1 は BCG 変異株，レーン 2，3 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ひとつとして MPTR 法[48]がある。これは結核菌群のゲノム内に存在する Major polymorphic tandem repeat の 300 bp の一部を PCR で増幅後，*Ban*I で消化し，アガロース電気泳動で断片の分子量を測定する。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 4 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* に見られ，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）は *M. bovis* BCG のみ 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（Fig. 9A）。一方，spoligotyping では *M. bovis* と BCG のみが 39–43 のスペーサーを欠如していることから結核菌との鑑別が可能である（Fig. 9B）。

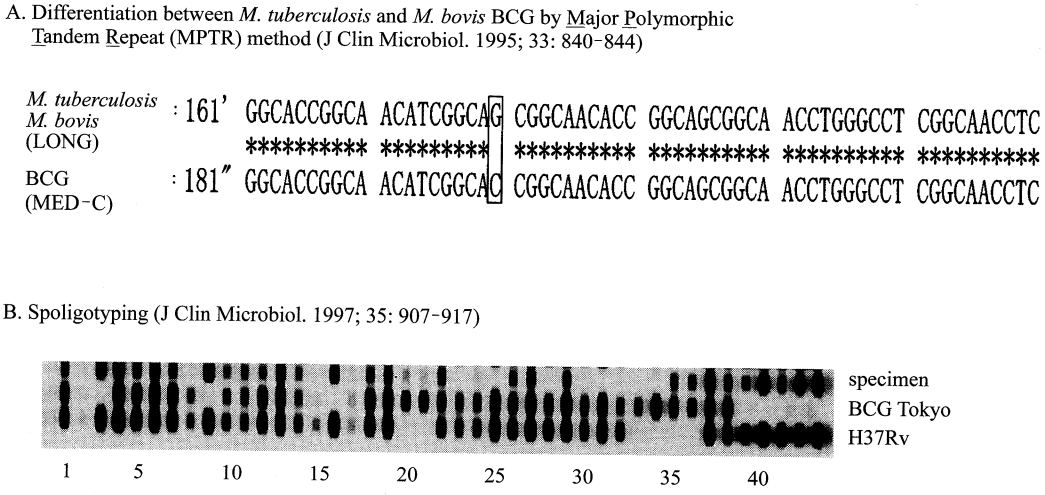

Fig. 9 Evidence of differentiation between *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG Tokyo by using MPTR and Spoligotyping methods. MPTR was performed with sequencing analysis after Big-dye terminator by ABI 377. Spoligotyping was examined with hybridization by denatured biotinylated PCR products, and detection used streptoavindin conjugated peroxidase and ECL (substrat of peroxidase, Amasham Pharmacia biotech).

これらの併用によってBCGと結核菌，牛型菌野生株などとの鑑別をすべきである。

7. 結核菌遺伝子型ライブラリーとその対策への応用

結核患者の菌株が全国的に高率に収集でき，そのタイピング結果を共有するためのライブラリーが確立されれば，その利用は今後の結核対策および結核研究に益するところが大きいと思われる。

日本は近隣に結核高蔓延国をもち，とくにその中には多剤耐性結核の蔓延地も含まれる。このような国との交流の結果，菌が日本に持ち込まれる機会は多くなるはずである。このようなことも結核菌タイピングの国特異パターンが確立されれば，「輸入結核感染」のモニタリングが可能になる。

このように，発生する患者の菌を広く収集して適切な方法で分子タイピングを行い，そのパターンを解析することは，結核対策や対策方針の立案のためにも，そしてもちろん結核菌の系統発生といったアカデミックな目的にも非常に重要な課題である。それは単に地域レベルではなく，全国，さらに国際的レベルで行うことによっていっそう有効なものになると考えられる。このようなことから結核研究所では全国の結核患者結核菌DNAデータバンクシステムを想定した大容量の電算機を用いたシステムを構築している。データ通信のハード面の進化によって今後このような活動は大いに進展するものと期待される。

結核感染は人から人への空気感染であるというものの，感染と発病の時間的関係が不定なため，患者発生に際しての感染経路の確定はこれまで困難であった。また菌の表現型の変異が極めて乏しく，菌種以下のレベルでの菌の分別はこれまでは不可能であった。RFLP分析によってこのようなことが可能になった現在，これを用いた結核疫学・細菌学の研究は新たな時代に入ったといえよう。ここでは具体的にその一部分を紹介したが，その可能性はさらに広がるものと考えられる。

折から結核対策の分野では先進国，途上国を問わずDOTSを軸としたあらたな対策戦略が活発に展開され，西暦2010年以降には地球上の結核が人類史上初めて減少し始めることが期待されている。この対策を側面から支援するために，結核の診断，治療，患者管理，公衆衛生の新たな技術の開発が求められている。結核菌の全ゲノム分析も完了した現在，そのような新技術の開発のなかで分子疫学の技術は多くの分野の中心的な手段として活用されることが期待されている。

謝　辞

このような機会を与えていただきました第77回日本結核病学会会長の森亨先生，座長の労をお取り下さいました渡辺彰先生に心から深謝いたします。また，実験に際し多くの助言および材料を下さいました当所阿部千代治先生，結核病学会会員の諸先生方，また，地域人口集団内での結核感染・発病の事業では沖縄県結核サーベランス検討委員会の保健所・病院等のご担当皆様方の多大なるご協力でなしえたことであり，ここに厚く御礼申し上げます。さらに，沖縄県での疫学的接触のデータ解析および解釈で共同研究者として協力下さいました当所大角晃弘先生，森亨先生，阿部千代治先生，浜崎園望女史，平野和重女史，佐藤奈津江女史また，菌株保存管理担当の鹿住祐子女史に深謝いたします。

文　献

1）罹患率増加：厚生省保健医療局感染症課監修：「結核の統計1999」，結核予防会，東京，2000.

2）van Soolingen D, Hermans PWM, de Hass PEW, et al.: Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2578–2586.

3）Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al.: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993; 31: 406–409.

4）Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, et al.: Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Microbiol Immunol. 1993; 37: 289–294.

5）Gruft H, Johnson R, Claflin R, et al.: Phage-typing and drug-resistance patterns as tools in mycobacterial epidemiology. Am Rev Respir Dis. 1984; 130(1): 96–97.

6）Snider DE Jr, Jones WD, Good RC: The usefulness of phage typing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Am Rev Respir Dis. 1984; 130: 1095–1099.

7）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: 1293–1298.

8）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: 1122–1124.

9）Frothingham R, Meeker-O'Connell WA: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. 1998; 144(Pt 5): 1189–1196.

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: 273–277.

11) Plikaytis BB, Crawford JT, Woodley CL, et al.: Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen Microbiol. 1993 ; 139 : 1537−1542.
12) 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 : 975−978.
13) 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 : 942−946.
14) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997 ; 35 : 907−914.
15) 和歌山県保健環境部：有田地方（湯浅保健所）における結核集団発生報告書. 和歌山県保健環境部. 1995 ; 3 : 8.
16) 近藤有好，桶谷典弘，桑原克弘，他：老健施設における結核の外来性再感染と思われる集団発生について. 結核. 2002 ; 77 : 401−408.
17) 中西好子，大山　雄，高橋光良，他：サウナでの結核多発の分子疫学的解明—大都市のホームレスの結核問題に関連して—. 日公衛誌. 1997 ; 44 : 769−777.
18) 伊藤邦彦，高橋光良，吉山　崇，他：病院検査室における結核菌培養の Cross-contamination. 結核. 1999 ; 74 : 777−788.
19) Lillebaek T, Dirksen A, Baess I, et al.: Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. J Infect Dis. 2002 ; 185: 401−404.
20) Bandera A, Gori A, Catozzi L, et al.: Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 2213−2218.
21) van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PE, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. J Infect Dis. 1999 ; 180 : 726−736.
22) Dahle UR, Sandven P, Heldal E, et al.: Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway. J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 1802−1807.
23) Casper C, Singh SP, Rave S, et al.: The transcontinental transmission of tuberculosis: A molecular epidemiological assessment. Am J Public Health. 1996 ; 86 : 551−553.
24) Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al.: The epidemiology of Tuberculosis in San Francisco —A population-based study using conventional and molecular methods—. N Engl J Med. 1994 ; 330 : 1703−1709.
25) Stead WW, Lofgren JP, Warren E, et al.: Tuberculosis as an endemic and nosocomial infection among the elderly in nursing homes. N Engl J Med. 1985 ; 312 : 1483−1487.
26) 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 : 1140−1146.
27) Bauer J, Kok-Jensen A, Faurschou P, et al.: A prospective evaluation of the clinical value of nation-wide DNA fingerprinting of tuberculosis isolates in Denmark. Int J Tuberc Lung Dis. 2000 ; 4 : 295−299.
28) Kurepina NE, Sreevatsan S, Plikaytis BB, et al.: Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS*6110* elements in *Mycobacterium tuberculosis*: non-random integration in the *dnaA-dnaN* region. Tubercle and Lung Disease. 1998 ; 79 : 31−42.
29) Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al.: Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. Am J Respir Crit Care Med. 2001 ; 164 : 1165−1170.
30) 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 : 743−750.
31) Marttila HJ, Soini H, Eerola E, et al.: A Ser315Thr substitution in *KatG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. Antimicrob Agents Chemother. 1998 ; 42 : 2443−2445.
32) Niemann S, Rusch-Gerdes S, Richter E: IS*6110* fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. J Clin Microbiol. 1997 ; 35 : 3015−3020.
33) Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, et al.: Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of Tuberculosis. J Clin Microbiol. 1993 ; 31 : 2446−2450.
34) Park Y, Bai G, Kim S: Restriction fragment length polymorphisum analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the western pacific region. J Clin Microbiol. 2000 ; 38 : 191−197.
35) Hermans PW, Messadi F, Guebrexabher H, et al.: Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. J Infect Dis. 1995 ; 171 : 1504−1513.
36) Warren R, Hauman J, Beyers N, et al.: Unexpectedly high strain diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. S Afr Med J. 1996 Jan ; 86 : 45−49.
37) Yang ZH, de Hass PEW, van Soolingen D, et al.: Restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992. Evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. J Clin Microbiol. 1994 ; 32 : 3018−3025.
38) Lillebaek T, Andersen AB, Bauer J, et al.: Risk of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in a low-incidence country due to immigration from high-incidence areas. J

Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 855–861.
39) El Sahly HM, Adams GJ, Soini H, et al.: Epidemiologic differences between United States- and foreign-born tuberculosis patients in Houston, Texas. J Infect Dis. 2001 ; 183 : 461–468.
40) Jasmer RM, Ponce de Leon A, Hopewell PC, et al.: Tuberculosis in Mexican-born persons in San Francisco: reactivation, acquired infection and transmission. Int J Tuberc Lung Dis. 1997 ; 1 : 536–541.
41) van Soolingen D, Qian L, de Hass PEW, et al.: Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. J Clin Miclobiol. 1995 ; 33 : 3234–3238.
42) 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 : 2602–2606.
43) Kremer K, van Soolingen D, van Embden J, et al.: *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. J Clin Microbiol. 1998 ; 36 : 2793–2794.
44) Bouvet E, Casalino E, Mendoza-Sassi G, et al.: A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. A case-control study. AIDS. 1993 ; 7 : 1453–1460.
45) Guerrero A, Cobo J, Fortun J, et al.: Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. Lancet. 1997 ; 350(9093) : 1738–1742.
46) Yeh RW, de Leon AP, Agasino CB, et al.: Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Genotypes. J Infect Dis. 1998 ; 171 : 1504–1513.
47) 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 : 1238–1244.
48) 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 : 840–844.

The 77th Annual Meeting Special Lecture

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: ITS ACCOMPLISHMENT AND FUTURE PERSPECTIVE

Mitsuyoshi TAKAHASHI

Abstract In the traditional study of tuberculosis epidemiology, information about social contact of persons and patient's illness history used to be an only relevant basis for elucidating transmission of tuberculosis infection. Therefore, it was very difficult to give a clear conclusion of whether isolates from different patients derived from a common source of infection or not. Recently, the subspecies typing of *M. tuberculosis* strains has become possible, based on the visualization of multiple loci of an insertion sequence (IS*6110*) that is a relatively stable gene fragment existing in a specific region of the genome. The variability of the number of copies and locations of this IS*6110* in a genome is the basis that enables this technique to be used for the above purpose, which is a unique tool applicable to the analysis of *M. tuberculosis*. Generally, this technique, i.e., restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, depends on the diversity of pattern of any polymorphic marker found in a genome of a strain. Among various markers so far developed and examined, IS*6110* has been proved most appropriate for the purpose of typing strains of *M. tuberculosis* complex, especially in such circumstances as in Japan where isolated strains' RFLP patterns are similar each with others so that finer subtyping is needed.

In this lecture, I would like to review the following topics based on the world literature of molecular epidemiology and the findings of our own that we have achieved during 1992 through 2001 in our Institute; 1) typing of the isolates for the identification of the infection source, 2) pathogenesis of tuberculosis under low incidence situation, 3) predominance of certain genotypes endemic in an area, 4) cross-contamination of isolates in the laboratory, 5) the stability of IS*6110* patterns, 6) phylogeny of *M. tuberculosis* complex, and 7) differentiation between *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG.

Key words: Molecular epidemiology, IS*6110*, *M. tuberculosis*

Department of Bacteriology, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to : Mitsuyoshi Takahashi, Department of Bacteriology, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3–1–24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204–8533 Japan. (E-mail: tak@jata.or.jp)