

今村賞受賞記念講演

結核菌 DNA の RFLP 分析を用いた結核分子疫学 の研究と実践

高橋 光良

キーワード：分子疫学，結核菌，RFLP

緒 言

世界的に蔓延していた結核の罹患率は数十年間にわたり減少してきたが、最近全世界的に増加傾向にある。現在、15歳から49歳までの年齢で結核症は細菌の単一感染症によるものとしては最も死亡率が高く、毎年200万人から300万人が結核症によって死亡している¹⁾。また全世界人口の3分の1が結核症の起原菌である *Mycobacterium tuberculosis* に感染していると考えられており、もしこの傾向が続けば、今後20年間で2億人が結核を発症する危険性があると指摘されている。ここに来て、結核対策に関連して2つの主要な問題が浮上しており、1つは結核菌とヒト免疫不全ウイルス (HIV) との重感染で、他は現行の抗結核薬に対する結核菌の耐性獲得が挙げられる。本邦においても、結核の状況は結核高蔓延期であった1920～30年代では結核死亡率は10万対200を超え²⁾、その後60年間で化学療法剤の進歩やBCG接種により10万対2.2と大きく低下した。本邦では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³⁾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うえで重要である。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⁴⁾。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。

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る。①感染源追跡のためのタイピング、②散発的患者発生における病理発生機序、③地域特有の有力株の存在、④菌株の検査室内汚染、⑤IS6110の安定性、⑥結核菌の系統発生、および⑦結核菌と *M. bovis* BCG との鑑別。さらに、世界各地で得られた結核分子疫学の成果と主として著者らが本邦で1992年から2001年までに得た所見を交えて、結核の伝播様式やリスク因子について検討した。

1. 結核菌分子疫学

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⁵⁾。また、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IS6110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が判明した⁶⁾。

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⁷⁾⁸⁾された集団発生事例の

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター

連絡先：高橋光良，結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター，〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24

(E-mail: tak@jata.or.jp)

(Received 18 Jul. 2003)

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 IS6110 パターンが変化しないという Soolingen らの報告と一致した結果であった⁴⁾。

IS6110 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), IS6110 inverse PCR, IS6110 amplifrinting, arbitrarily

primed PCR (AP-PCR), polymorphic GC rich sequence (PGRS) および Spoligotyping 法が開発された。それぞれが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^{9)~16)}。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きわめて低く、IS6110 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 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ること、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^{23) 26)}。

2. 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少な病気が、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^{16) 17)}。

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、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人が次々と

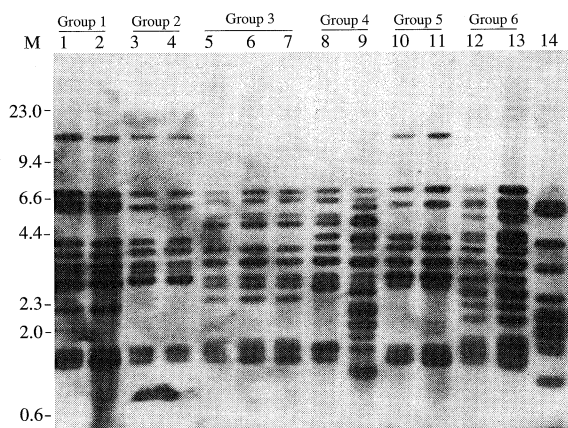


Fig. 1 Various groups with identical IS6110 banding patterns by DNA fingerprinting of epidemiologically related *M. tuberculosis* from six outbreaks. Groups 1, 4 and 5, outbreaks in the office; groups 2 and 3, the outbreaks in the school; group 6, familial infection; lane 14, *M. tuberculosis* H37Rv, respectively. Marker at left indicates sizes of lambda *Hind* III.

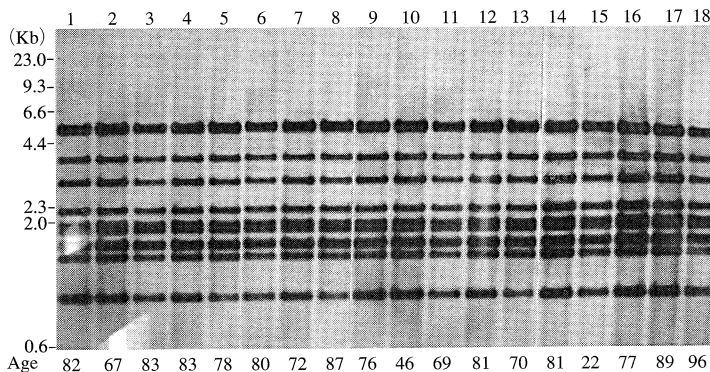


Fig. 2 Outbreak of 18 *M. tuberculosis* isolates from case patients at a nursing home for the elderly in N prefecture, Japan. Molecular size of fingerprinting patterns was shown at left site by lambda *Hind* III.

結核を発病，うち9名が死亡した¹⁸⁾。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えることがRFLP分析によって科学的に証明された事例がある。

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地区で発生した路上生活者等の患者多発例の分析がある¹⁹⁾。

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²⁰⁾。

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²¹⁾²²⁾。

3. 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^{23)~27)}。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年で人口十萬対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IS6110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，全分析患者の35.5%)発見された。また，non-clusteringを示した株は494(64.5%)であった。

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。

IS6110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²⁸⁾。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Spoligotyping¹⁶⁾を行っている。

IS6110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3項，4項に述べる北京遺伝子型で，37~43スパ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者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。

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たおり、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^{29) 25) 26) 23)}、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²⁷⁾。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。

4. 結核菌遺伝子型の解析

薬剤耐性獲得や一部の酵素の活性による点突然変異を除き、遺伝子型が同一であれば表現系も類似すると考えられる。地域の有力株として Endemic な結核菌株の遺伝子型も流行を維持するリスク因子の1つとして興味を持たれている。その1つが北京遺伝子型で、感染伝播が強く、結核病態も重症である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 IS6110、*dnaA-dnaN* 部位の IS6110 挿入の有無³⁰⁾、あるいは Spoligotyping がある^{2) 28) 14)}。遺伝子種々遺伝子型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 characterization³¹⁾の中で注目されている。そのうちの遺伝子型の1つが北京ファミリー(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静菌作用に対して有意な高頻度の抵抗性であることが示されている^{32)~34)}。この遺伝子型は1990年代初頭の北アメリカに

おける多くの多剤耐性結核の院内・施設内感染を引き起こした W 株とよく一致している。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 IS6110 のパターンは類似点を持ち IS6110 を A1 (3.36 Kbp) と B2 (1.14 Kbp) 領域内に保有している³⁰⁾。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ことが知られている¹⁶⁾。

国際比較の検討は結核蔓延国での発生頻度が高いことから、そこで発生する多剤耐性結核菌の伝播をグローバルレベルで解析することは重要である。最近の知見では、薬剤耐性菌による伝播が原因となる初回耐性は集団での INH 耐性株に限られた RFLP パターンを伴うことからクラスター分析と INH 感受性パターンの相関関係もまた初回耐性と獲得耐性を検査する INH 耐性菌のモニタリングに重要な応用であると述べられている³⁵⁾。

各国で分析された IS6110 のコピー数は 0 から 23 本の分布が確認され^{4) 36) 37)}、同時に高蔓延国や中蔓延国のアフリカ、アジアなどでは IS6110 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³⁸⁾。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があるとすればそれはこのためと考えられ、一般に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³⁹⁾。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. 3)。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⁴⁰⁾、オランダでのソマリア移民⁴¹⁾、米国でのアジア、ヒスパニック、メキシカンの移民の解析^{42) 43)}での一致と関連していた。

5. 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1つと考えられる。SoolingenらはIS6110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1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⁴⁴⁾（ただし北京遺伝子型のすべての菌株においてIS6110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⁴⁴⁾。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。

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⁴⁵⁾。

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) 46)}。しかし、*M. africanum*に関する報告は、まだなされていない。

IS6110で分析したアジア近隣の株を spoligotypingした

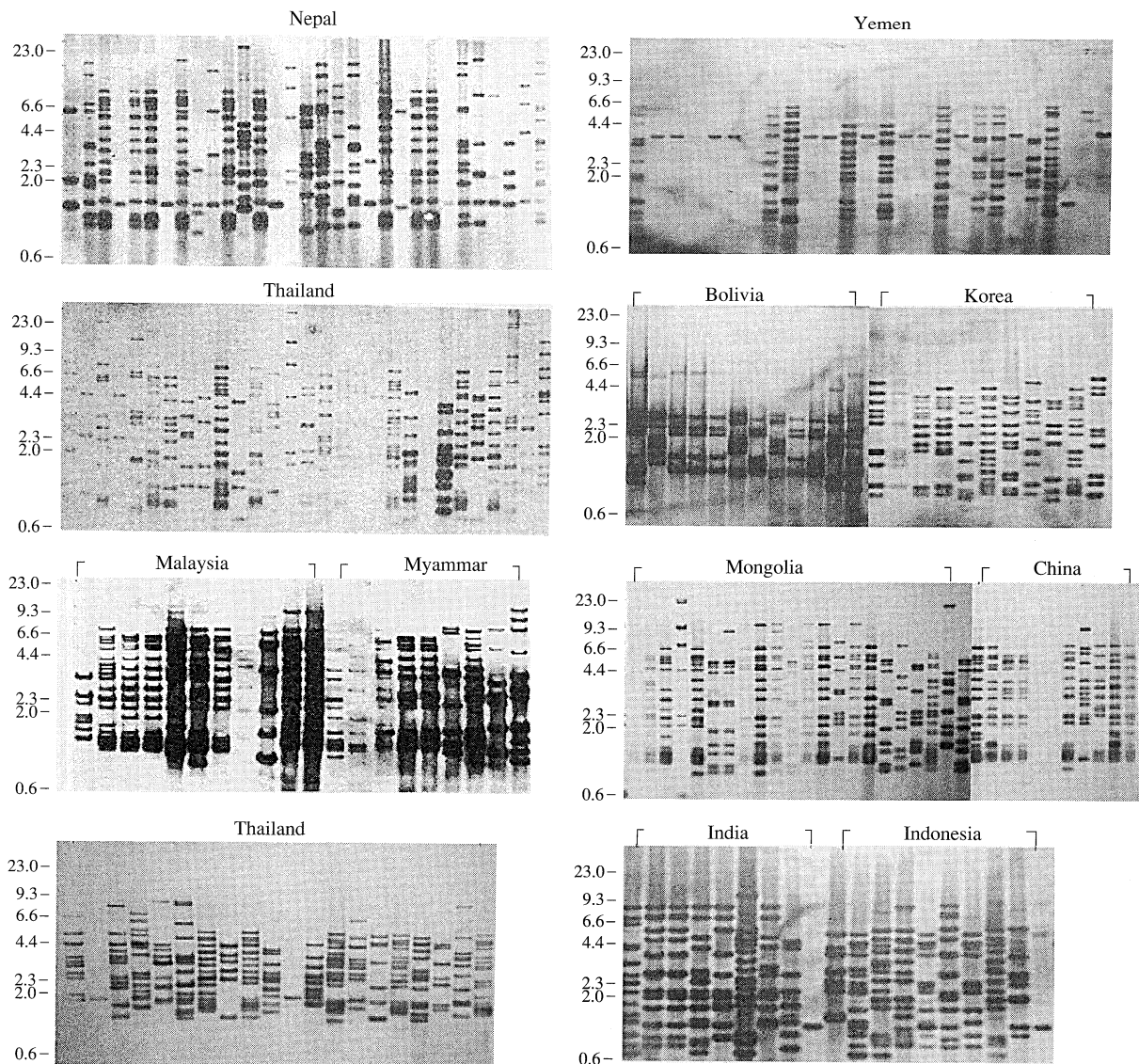


Fig. 3 Specific RFLP patterns of *M. tuberculosis* among various countries

結果, IS6110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 (Fig. 3)。モンゴル, 韓国, 上海, 日本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より遺伝子型が存在していた (未発表)。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, IS6110タイプングとの相関では spoligotypes で北京遺伝子型であっても, 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伝播の解析をさらに精緻化できよう。実際の試みはオランダで発生した *M. bovis* による多剤耐性菌とスペイン旅行中に加療入院した病院での多剤耐性 *M. bovis* による院内感染の感染源追跡に利用された^{47) 48)}。

6. IS6110の安定性

IS6110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人から繰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。このことは, 2人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. 4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⁴⁹⁾。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, IS6110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⁵⁰⁾。半数の菌株が3~4年で1つのバンドに変化が見られ, 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

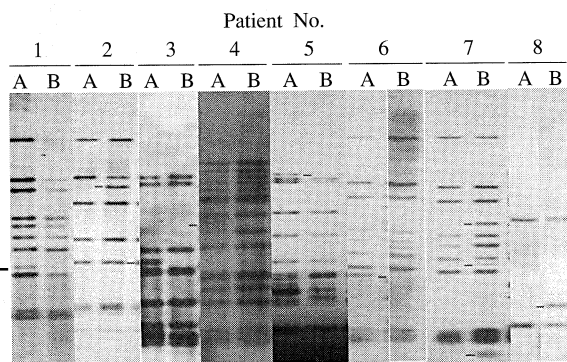


Fig. 4 Stability of RFLP patterns by *M. tuberculosis* clinical isolates from identical patients. Lanes show RFLP patterns from period isolates separated by 3 days to 90 days taken from each of 20 patients.

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 IS6110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。

7. *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, IS6110 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* (株の固有名) と異なり, 特徴のある 2 本バンドを示す⁶⁾。このため BCG と結核菌の鑑別は IS6110 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 の変異株が出現してきた。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. 5 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 IS6110 パター

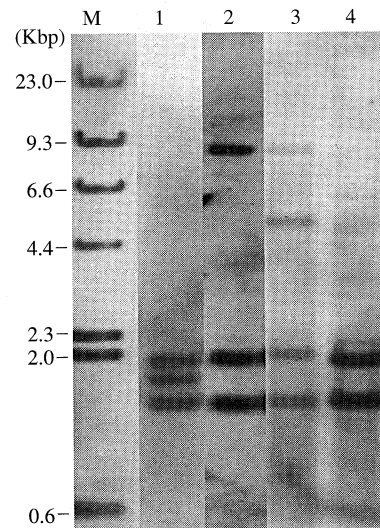


Fig. 5 RFLP analysis of *M. bovis* BCG-like clinical isolates. M, Molecular size maker at left side of lambda *Hind* III; Lane 1, isolate from a bladder cancer patients with BCG Tokyo instillation therapy; Lane 2, isolate from a abscesses of skin on the chest after BCG Tokyo vaccination; Lane 3, isolate from sputum specimen; Lane 4, *M. bovis* BCG Tokyo.

A. Differentiation between *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG by Major Polymorphic Tandem Repeat (MPTR) method (J Clin Microbiol. 1995; 33: 840-844)

```

M.tuberculosis :161' GGCACCGGCA ACATCGGCAG CGGCAACACC GGCAGCGGCA ACCTGGGCCT CGGCAACCTC
M.bovis (LONG)          ***** ***** ***** ***** ***** *****
BCG (MED-C) :181" GGCACCGGCA ACATCGGCAC CGGCAACACC GGCAGCGGCA ACCTGGGCCT CGGCAACCTC

```

B. Spoligotyping (J Clin Microbiol. 1997; 35: 907-917)

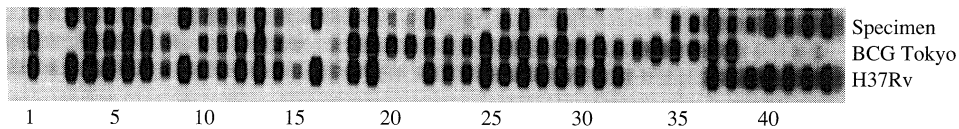


Fig. 6 Evidence of differentiation between *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG Tokyo by using MPTR (A) and spoligotyping methods (B). MPTR was performed with sequencing analysis after Big dye terminator by ABI 377. Spoligotyping was examined with hybridization by denatured biotinylated PCR products, and detection used streptoavidin conjugated peroxidase and ECL (substrate of peroxidase, Amasham Pharmacia biotech).

ンである。このような問題に対処する方法の1つとしてMPTR法⁵¹⁾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 (Fig. 6 A)。また、SHORT (PCR産物313 bp)は*M. africanum*で検出される。検体を結核菌と*M. bovis* BCGに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、Spoligotyping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を確認する (Fig. 6 B)。これらの併用によってBCGと結核菌、牛型菌野生株などの鑑別をすべきである。

8. 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、そのタイプ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プ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

方法で分子タイプングを行って、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データベース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きわめて乏しく、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。

9. 疫学情報の標準化とコンピューター解析システム

コンピューター解析の共通化は結核の対策の一環としてRFLP分析を行い新たに構築したコンピューター患者管理システムを用いて感染様式の解析、薬剤耐性結核菌のモニタリングあるいは集団発生時の結核対策で予防内服や検診の範囲を把握することで経費の適正化を進めている。コンピューター化することにより大きな標本での結核感染様式や感染のリスク因子の解析を推進可能に

きる。本システムは、特定の患者に関連する、結核菌 RFLPデータの処理と管理をするシステムである。主な機能は、患者情報管理、RFLP電気泳動パターン情報管理、スポリゴタイピング情報と、菌株情報の管理、菌株情報のクラスタリング管理、および遺伝子情報のクローン管理を、すべて、Web上で管理運営する。検索に関しては、患者情報の検索を、クラスター情報や、菌株、クローン情報から行う。また、患者情報や、クローン情報から、関連するクラスターや菌株情報を検索し、菌株に関する電気泳動画像ファイル、スポリゴタイピング画像およびそれぞれの数値情報を表示、エクスポートする機能等を持っている。実験データは、電気泳動画像解析ソフトウェアで、解析を行った後、画像データやクラスターデータをデータベースに登録する。スポリゴタイピングに関する情報は、スキャナーでデータを取り込んだあと、専用の解析ソフトウェアで、各菌株ごとに、分割し、モデル化してデータベース化を行う。これらのデータについて、患者情報とクローン情報を付加する。検索は、それぞれ、患者情報、クローン情報、クラスター情報、菌株情報をキーに必要な情報を検索、表示、エクスポートを行う。本機能を利用することにより、基本的な遺伝子画像に関するデータベースの構築を実現できる。

将来的な拡張性としては外部へ情報公開を行う機能を拡張で構成可能であるが、ID番号を付与後、個人情報の漏洩に配慮して行うべきであろう。

ま と め

最近では、多くのDNAフィンガープリンティングが抗酸菌の分離株のタイピング(亜分類)に用いられるようになった。初期の研究では制限エンドヌクレアーゼ分析(Restriction endonuclease analysis, REA)が行われた。これは菌の全DNAを特定の制限酵素で切断し、DNA断片をアガロース電気泳動で分離し、可視化して比較するものである。その後、結核菌に存在する種々の繰り返し配列がクローニングされ、それらをプローブとして用い、それに相補的なDNA配列のみをもつ断片だけを可視化する方法(サザンハイブリダイゼーション)により検出する、制限酵素断片長多型分析(restriction fragment length polymorphism analysis, RFLP)が行われるようになった。IS6110またはIS986挿入断片の発見と応用によって抗酸菌感染の分子疫学は大きく進展した。

抗酸菌のタイピング法は迅速で、再現性があり、技術的に簡単で、コストが安く、臨床材料を直接分析できることが望まれる。これらの基準をすべて満たしているタイピング法は未だ開発されていない。さらに、個々のタイピング法の分解能や安定性は研究目的に応じて最適なものにすべきである。結核の集団感染対策では、菌の進

化による多様化を研究する場合は当然異なる遺伝子マーカーを必要とする。現在のところ完璧な方法はないとは言え、IS6110をプローブとして用いたRFLP分析や他の分子タイピング法は抗酸菌の伝播様式の解明に大いに寄与している。

謝 辞

今村賞にご推薦頂きました結核研究所副所長石川信克先生、また、実験に際し多くの助言および材料を下さいました共同研究者であります結核研究所森亨先生、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イ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成し得たことであり、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、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。本研究は平成11-13年度厚生科学研究費補助金、新興・再興感染症「薬剤耐性結核のサーベイランス、耐性分子機構および多剤耐性結核の治療に関する研究」の分担研究、厚生労働省国際共同研究費平成10-14年の助成金および平成14年度厚生科学研究費補助金、新興・再興感染症「都市における結核の感染経路に関する研究」の分担研究で研究協力者とともに検討してきたものである。

文 献

- 1) Enarson DA, Chretien J: Epidemiology of respiratory infectious disease. *Curr Opin Med.* 1999; 5: 128-135.
- 2) Ohmori M, Ishikawa N, Yoshiyama T, et al.: Current epidemiological trend of tuberculosis in Japan. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002; 5: 415-423.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Gruft H, Johnson R, Claffin R, et al.: Phage-typing and drug-resistance patterns as tools in mycobacterial epidemi-

- ology. *Am Rev Respir Dis.* 1984 ; 130 : 96–97.
- 8) Snider DE Jr, Jones WD, Good RC: The usefulness of phage typing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Am Rev Respir Dis.* 1984 ; 130 : 1095–1099.
 - 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 : 1293–1298.
 - 10) Sola C, Horgen L, Maisetti J, et al.: Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 36 : 1122–1124.
 - 11) 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.
 - 12) Otal I, Samper S, Asensio MP, et al.: Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J Clin Microbiol.* 1997 ; 35 : 273–277.
 - 13) Plikaytis BB, Crawford JT, Woodley CL, et al.: Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol.* 1993 ; 139 : 1537–1542.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 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 (6) : 2213–2218.
 - 23) 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.
 - 24) Dahle UR, Sandven P, Heldal E, et al.: Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway. *J Clin Microbiol.* 2001 ; 39 : 1802–1807.
 - 25) 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.
 - 26) 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.
 - 27) 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.
 - 28) 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.
 - 29) 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.
 - 30) Kurepina NE, Sreevatsan S, Plikaytis BB, et al.: Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis*: non-random integration in the *dnaA-dnaN* region. *Tubercle and Lung Disease.* 1998 ; 79 : 31–42.
 - 31) 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.
 - 32) 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 IS6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998 ; 2 : 743–750.
 - 33) 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.
 - 34) Niemann S, Rusch-Gerdes S, Richter E.: IS6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol.* 1997 ; 35 : 3015–3020.
 - 35) van Rie A, Warren RM, Beyers N, et al.: Transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain resembling “strain W” among noninstitutionalized, human immunodeficiency virus-seronegative patients. *J Infect Dis.* 1999 ; 180 : 1608–1615.

- 36) 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.
- 37) Park Y, Bai G, Kim S: Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the Western Pacific region. *J Clin Microbiol.* 2000 ; 38 : 191-197.
- 38) 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.
- 39) 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 ; 86 : 45-49.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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 Microbiol.* 1995 ; 33 : 3234-3238.
- 45) Bauer J, Andersen AB, Kremer K, et al.: Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol.* 1999 ; 37 : 2602-2606.
- 46) Kremer K, van Soolingen D, van Embden J, et al.: *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 36 : 2793-2794.
- 47) 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.
- 48) 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 : 1738-1742.
- 49) Yeh RW, de Leon AP, Agasino CB, et al.: Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Genotypes. *J Infect Dis.* 1998 ; 171 : 1504-1513.
- 50) de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, et al.: Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J Infect Dis.* 1999 ; 180 : 1238-1244.
- 51) 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.

Memorative Lecture by the Imamura Award Winner

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
USING BY RFLP ANALYSIS BETWEEN GENOMIC DNA
— Its Accomplishment and Practice —

Mitsuyoshi TAKAHASHI

Abstract Recently, epidemiology of *M. tuberculosis* have been performed by molecular techniques as a probe with the insertion sequence (IS) 6110. 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. The subspecies typing of *M. tuberculosis* strains by IS6110 has become possible, based on the visualization of multiple loci of an insertion sequence (IS6110) 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 IS6110 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, IS6110 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 time, 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 for the tracking of source of infection, (2) diffuse infection, (3) the presence of region-specific influential strains, (4) cross-contamination of strains in the laboratory, (5) the stability of IS6110, (6) phylogeny of tuberculosis (genotypes in Okinawa prefecture), and (7) the distinction between *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG, (8) computer-assisted patients management system. We also investigated the mode of transmission and risk factors of tuberculosis, based on the tuberculosis epidemiological data obtained in many parts of the world as well as the findings we gathered in our country from 1992 to 2001.

Key words: Molecular epidemiology, *M. tuberculosis*, RFLP

Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Mitsuyoshi Takahashi, Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama Kiyose-shi Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: tak@jata.or.jp)