

今村賞受賞記念講演

## 全血インターフェロン $\gamma$ アッセイによる結核感染診断技術の特性

原田 登之

キーワード：結核感染診断，ツベルクリン反応，クオンティフェロン®TB-2G，潜在性結核感染，接触者検診

### はじめに

結核菌は体内に侵入した後，マクロファージにより貪食されるが，マクロファージの殺菌機構から逃れ，増殖あるいは休眠状態になると考えられている典型的な細胞内寄生菌である。結核菌に感染した者のうち発症するのは約10%程度であり，残りの90%は免疫防御機構により結核菌を封じ込めた潜在性結核感染となり，生涯発症しないか，あるいは高齢等により免疫能が低下した際に結核を発症する，いわゆる「再燃」が起こると考えられている。現在，この潜在性結核感染者は，世界人口の約3分の1と見積もられており<sup>2)</sup>，将来の感染源となりうる。従って，有効な結核対策の1つとして，この潜在性結核感染者を早期に見出し，発病を防ぐために予防内服を行うことが実施されている。

潜在性結核感染の診断に用いられる方法は，従来唯一ツベルクリン反応（ツ反）が世界的に使用されてきた。しかし，ツ反の診断感度は優れているものの，その特異性の点で重大な欠点をもっている。その理由は，ツ反で用いる PPD には数百種類もの異なった結核菌抗原が混在し，そのほとんどのものが BCG や非結核性抗酸菌の抗原と高い類似性を持ち，抗原としての高い交差性をもつためである。従って，結核感染していない PPD 被投与者においても，BCG 接種あるいは非結核性抗酸菌感染によってツ反が陽性になる場合がある。この欠点のため，BCG 接種が広範に行われている日本では，ツ反により正確な結核感染診断を行うことはきわめて困難である。低特異性はツ反のもつ最大の欠点であるが，他にも

PPD 投与およびツ反測定における技術的差，PPD 再投与によるブースター効果（抗原再投与による免疫反応の増強効果），ツ反測定のための再受診の必要性，等の弱点をもつ。

しかし，最近これらツ反のもつすべての欠点を一挙に克服し，さらに高い感度・特異度をもち合わせた診断法クオンティフェロン®TB-2G (QFT-2G) が開発され，診断試薬として平成17年4月に承認され，さらに本年1月に保険収載されるに至った。

### Interferon- $\gamma$ 産生誘導性結核菌特異抗原 ESAT-6 および CFP-10 の発見

1995年，デンマーク国立血清研究所 (Statens Serum Institute) の Andersen らのグループにより，マウス記憶 T 細胞から Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 産生を強く誘導する結核菌抗原 ESAT-6 (The early secretory antigenic target 6 kDa protein) が<sup>3)</sup>，結核菌培養濾液から精製・同定され，同時にその遺伝子もクローニングされた<sup>3)</sup>。翌1996年 Mahairas らのグループが BCG と *M. bovis* 間の遺伝子レベルでの相違を解析した結果，先の ESAT-6 遺伝子が BCG では欠落している RD-1 領域に存在していることが明らかになった<sup>4)</sup>。また，ESAT-6 と同様に IFN- $\gamma$  産生を強く誘導する結核菌抗原 CFP-10 が<sup>5)</sup>，ESAT-6 と同じ RD-1 領域内に位置していることも明らかになった。さらにその後の解析の結果，ESAT-6 および CFP-10 は，すべての *M. bovis* BCG 亜株と *M. avium*, *M. intracellulare* を含む大部分の非結核性抗酸菌には存在せず，*M. tuberculosis*, *M. bovis* (BCG 以外の) と *M. africanum* を含む結核菌群，お

よびごく一部の非結核性抗酸菌にのみ存在することが判明した (Table 1)。これらの発見を基に、BCGと大多数の非結核性抗酸菌には存在しない ESAT-6 および CFP-10 を刺激抗原としてリンパ球を刺激し、T細胞より産生された IFN- $\gamma$  量を測定することにより、BCG接種および大多数の非結核性抗酸菌感染の影響を受けない結核感染診断法 QFT-2G を開発することが可能になった<sup>9)</sup>。

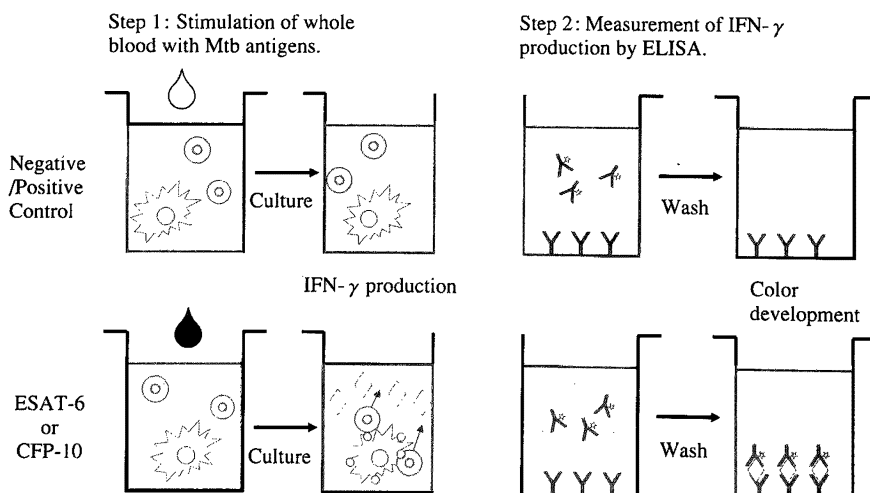
**QFT-2G の検査法**

QFT-2G の検査法は 2 段階から構成されており、第 1 段階の血液培養はヘパリン採血した全血約 5 ml を 24 ウェル培養プレートの 4 ウェルに 1 ml ずつ分注する。次に陰性コントロール、ESAT-6、CFP-10 および陽性コントロールを各 3 滴添加し、攪拌後 37°C で 16~24 時間培

養する。この抗原刺激は、採血後 12 時間以内に行わなければならない。培養後、血漿を保存チューブに回収する。第 2 段階は、血漿中に産生された IFN- $\gamma$  量を測定する ELISA 法であり、各抗原特異的な IFN- $\gamma$  産生量を算出し、この値を指標に結核感染を診断する (Fig. 1)。QFT-2G では、採血の翌日に ELISA で IFN- $\gamma$  量の測定が機器によりなされるため、ツ反より迅速かつ客観的な結果が得られる。また、ツ反と異なり生体に PPD を投与しないため、ブースター効果は考慮する必要がなく、さらにツ反のように医療機関を再訪して反応結果を測定する必要もない。このように QFT-2G はツ反の低特異性の欠点のみならず、他のすべての問題点を克服しうる診断法であると言える。

**Table 1** Distribution of ESAT-6 and CFP-10 among mycobacterial species

Species with ESAT-6/CFP-10	Species without ESAT-6/CFP-10
Tuberculosis complex <i>M.tuberculosis</i> <i>M.africanum</i> <i>M.bovis</i>	BCG substrains Gothenburg Moreau Tice Tokyo
Environmental strains <i>M.kansasii</i> <i>M.marinum</i> <i>M.szulgai</i> <i>M.flavescens</i> <i>M.gastri</i>	Danish Glaxo Montreal Pasteur
<i>M.leprae</i>	Environmental strains <i>M.avium</i> <i>M.intracellulare</i> etc.



**Fig. 1** QFT-2G test procedure

The procedure is composed of two steps. In the first step, each reagent (negative control, ESAT-6, CFP-10, and positive control) is added to whole blood taken in the presence of Heparin, and blood is cultured for 16 to 24 hours at 37°C. In the second step, plasma is harvested on the next day, and the IFN- $\gamma$  produced is measured by ELISA.

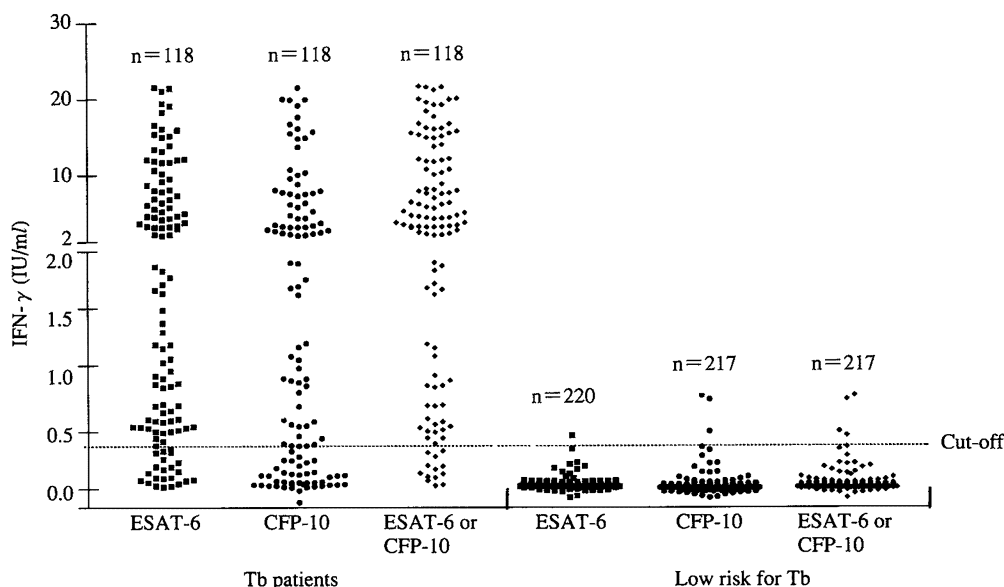
**QFT-2Gの治験**

われわれは、この QFT-2G を日本において結核感染診断法として使用するため、幾つかの機関と協力し、治療開始前の塗抹陽性結核患者 118 名および BCG 既接種健常者 217 名のボランティアの協力を得て治験を行った<sup>6)</sup>。Fig. 2 に示すように、結核患者の大多数が ESAT-6 か CFP-10 のいずれかの刺激に反応し、IFN- $\gamma$  産生が誘導された。対照的に、健常者群の大部分は反応しなかった。以上の結果から、各抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生量（各抗原刺激で誘導された IFN- $\gamma$  産生量から、陰性コントロールでの IFN- $\gamma$  産生量を差し引いた値）を算出し、

診断に適切なカットオフ値 0.35 IU（国際単位）/ml を決定した。本カットオフ値における QFT-2G の感度および特異度はそれぞれ 89.0% と 98.1% であり（Table 2）、結核感染診断法としてきわめて優れた数値をもつことが示された。この治験結果より、QFT-2G は BCG 接種の影響を受けず結核感染を感度よく診断できることが明らかになった。

**接触者検診における QFT-2G 検査のパフォーマンス**

治験では活動性結核をこの検査の真の目的である「潜在結核感染」の代用指標として QFT-2G の感度（潜在感染の状態にあるものの陽性率）を解析し、また QFT-2G



**Fig. 2** Dot plot of individual responses to ESAT-6 and CFP-10 for Tb patients and lowrisk subjects. Individual responses to ESAT-6 (the left lane), CFP-10 (the middle lane), and the highest response to either ESAT-6 or CFP-10 (the right lane) in each group are shown.

**Table 2** Specificity and sensitivity in each cut-off value

Cut-off (IFN- $\gamma$ IU/ml)	CFP-10		ESAT-6		CFP-10 and ESAT-6	
	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)
0.05	92.5	81.4	94.8	94.9	89.4	97.5
0.10	94.4	77.1	96.2	90.7	92.0	95.8
0.15	95.8	72.9	97.6	88.1	93.9	93.2
0.20	96.7	71.2	99.1	86.4	96.2	91.5
0.25	97.2	67.8	99.1	84.7	96.7	91.5
0.30	97.7	66.9	99.1	83.1	97.2	89.8
0.35	98.6	65.3	99.5	81.4	98.1	89.0
0.40	98.6	61.9	99.5	79.7	98.1	88.1
0.45	98.6	60.2	100.0	78.8	98.6	86.4
0.50	99.1	60.2	100.0	75.4	99.1	83.9

Specificities and sensitivities at every 0.05 IU/ml of IFN- $\gamma$  are shown in the left column (CFP-10 alone), the middle column (ESAT-6 alone), and the right column (the highest response in either antigen).

検査の判定基準に「疑陽性 (判定保留)」の概念を導入した<sup>7)</sup>。しかし、QFT-2Gは活動性結核症に反応するだけでなく、より本来的に潜在性結核感染に反応する、すなわち潜在結核感染も診断可能であるということは、多くの接触者検診事例でQFT-2Gを適用した経験から証拠が固められてきた。とくに、感染源と被験者の接触の濃厚さとQFT-2G陽性率の相関は有力な証拠である。

このような最初の事例は、某中都市の専門学校男性講師が初発患者であった事例である<sup>8)</sup>。その際、接触度の濃淡を基に、初発患者の講師と共に海外修学旅行に参加した集団を濃厚接触群、海外修学旅行に参加しなかった集団を非濃厚接触群とに分けてQFT-2G検査の結果を解析した。その結果、濃厚接触群では45.5%、非濃厚接触群では7.1%がQFT-2G陽性となり、明らかに接触度の濃厚さに応じてQFT-2G陽性率が上昇していた。

次に報告されたのは、初発患者が大学生である大学における集団感染事例である<sup>9)</sup>。この事例においては、ツ反発赤径にかかわらず接触者全員にQFT-2G検査が実施された。濃厚接触群のツ反発赤径の分布は非濃厚接触群のそれと比較し有意に右方偏位していたことから、濃厚接触群において大規模な感染が予想されたが、QFT-2G陽性率の圧倒的な違いから感染が明白になった。濃厚接触群におけるQFT-2G陽性者と疑陽性者はそれぞれ32.7%と16.8%であったのに対し、非濃厚接触群におけるQFT-2G陽性者と疑陽性者はそれぞれ0.8%と0.8%であった。この事例で得られたもうひとつの重要な証拠は、QFT-2G陽性者のツ反の分布が典型的な正規分布に従い、その平均は発赤で50 mm、これは活動性結核患者における平均30 mmの分布とは異なるもので、QFT-2G陽性が活動性結核とは別の現象、つまり潜在結核感染を判定していることが支持される。なお、この濃厚接触群での観察からツ反発赤30 mm未満のQFT-2G陽性者が少なくないことも確認された。

この他に病院における集団感染でも、やはり接触度の濃厚さに比例しQFT-2G陽性率が上昇していた事例、あるいは結核高蔓延国からの就労者等における高いQFT-2G陽性率等の結果が得られている。また海外においても、接触者検診で接触の濃厚さとQFT-2G陽性率が相関するという報告がデンマークから<sup>10)</sup>、医療従事者の職務上の結核感染曝露の程度とQFT-2G陽性率が相関するという報告がわれわれ<sup>11)</sup>、およびインド<sup>12)</sup>から報告されている。このような事例からQFT-2G検査により潜在性結核感染の検出が可能であることが明らかになってきた。さらにイタリア<sup>13)</sup>、結核中蔓延国である韓国<sup>14)</sup>などからもその利用の経験が報告され、いずれもQFT-2Gによる潜在結核感染診断の妥当性と有用性を示唆している。

一方、大規模な接触者検診において、従来のツ反によ

る診断法で感染と診断され予防内服対象となった者の大部分がQFT-2Gで陰性であったことから、これまではツ反により過剰な予防内服を行っていた可能性が示唆されてきた<sup>15)</sup>。最近、われわれはQFT-2Gの検査単価が5,000円から10,000円の場合、感染曝露が高度でない事例ではツ反検査でスクリーニングされた者にQFT-2Gを追加することは費用対効果の点で有利であることを示した<sup>16)</sup>。このように今後接触者検診に際し、QFT-2G検査が広く使われるようになると、過剰な予防内服を防ぐことができ、さらにより正確に既感染者を見出すことができるため効果・効率のよい結核対策ができると考えられる。

### おわりに

QFT-2Gは開発されてまもないため、今後解決されるべき幾つかの疑問点をもっている。例えば、感染源への曝露の時期から反応が陽性になるまでの期間、感染後長期間における応答の消長、化学予防や化学療法の影響など、まだその診断特性について知見は十分ではない。また小児・幼児における特性についても同様であり、さらに小児、とくに乳幼児では現行の最低採血必要量(5 ml)の多さからくる制約の克服も課題である。われわれはこれらの点についての検討を進めるべく現在も研究を行っており、得られた知見を基にQFT-2Gのより適切な使用方法を提供することにより、結核対策に貢献できると期待している。

### 謝 辞

発表の機会をお与えいただき、また座長の労をお取りいただきました第81回日本結核病学会会長渡辺彰先生、今村賞にご推薦いただきました結核研究所所長石川信克先生、本研究において終始ご指導を賜りました森亨先生、免疫検査科樋口一恵先生はじめ多くの共同研究者の諸先生方、接触者検診の際にご協力いただきました保健所・施設等のご担当の方々に深謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Comstock, GW: Epidemiology of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1982; 125 (suppl.): 8-16.
- 2) World Health Organization: Tuberculosis fact sheet number 104, 2002. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/>)
- 3) Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, et al.: Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* 1995; 154: 3359-3372.
- 4) Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al.: Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol.* 1996; 178: 1274-1282.

- 5) Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al.: Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000 ; 356 : 1099-1104.
- 6) Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al.: Specific detection of tuberculosis infection with an interferon-gamma based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 ; 170 : 59-64.
- 7) 原田登之, 樋口一恵, 関谷幸江, 他: 結核菌抗原 ESAT-6 および CFP-10 を用いた結核感染診断法 QuantiFERON® TB-2G の基礎的検討. *結核*. 2004 ; 79 : 725-735.
- 8) 原田登之, 森 亨, 宍戸眞司, 他: 集団感染事例における新しい結核感染診断法 QuantiFERON®TB-2G の有効性の検討. *結核*. 2004 ; 79 : 637-643.
- 9) 船山和志, 辻本愛子, 森 正明, 他: 大学での結核集団感染における QuantiFERON®TB-2G の有用性の検討. *結核*. 2005 ; 80 : 527-534.
- 10) Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, et al.: Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 ; 170 : 65-69.
- 11) Harada N, Nakajima Y, Higuchi K, et al.: Screening for Tuberculosis Infection Using Whole-Blood Interferon-gamma and Mantoux Testing Among Japanese Healthcare Workers. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006 ; 27 : 442-448.
- 12) Pai M, Gokhale K, Joshi R, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA*. 2005 ; 293 : 2746-2755.
- 13) Ferrara G, Losi M, Meacci M, et al.: Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 ; 172 : 631-635.
- 14) Kang YA, Lee HW, Yoon HI, et al.: Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA*. 2005 ; 293 : 2756-2761.
- 15) 宮下裕文, 樋口一恵, 東山典子, 他: 接触者検診における全血インターフェロングammaアッセイを用いた結核感染の診断—QuantiFERON®TB-2Gを用いた検討— *結核*. 2005 ; 80 : 557-564.
- 16) 森 亨, 原田登之: 接触者健診におけるQuantiFERON®-TB第二世代による感染診断の経費効果分析. *結核*. 2005 ; 80 : 675-686.

## Memorial Lecture by the Imamura Award Winner

CHARACTERISTICS OF A DIAGNOSTIC METHOD OF TUBERCULOSIS INFECTION  
BASED ON WHOLE BLOOD INTERFERON- $\gamma$  ASSAY

Nobuyuki HARADA

**Abstract** It is assumed that about 10% of individuals infected with *M. tuberculosis* (Mtb) develop tuberculosis (Tb), and the remaining 90% suppress contain Mtb through their immune systems, but have a latent tuberculosis infection (LTBI). To effectively control Tb, it is essential to detect individuals with LTBI in a Tb outbreak and provide chemoprophylaxis for them.

Until recently, the tuberculin skin test (TST) has been the only diagnostic method for LTBI. However, the specificity of TST is low, because the purified protein derivative (PPD) used for TST contains numerous Mtb antigens that are almost identical to BCG antigens or similar to non-tuberculous mycobacterium (NTM) antigens. For this reason, TST may produce positive results in BCG-vaccinated individuals or NTM-infected individuals without Mtb infection. Therefore, it is very difficult to diagnose LTBI in Japan, where BCG vaccination is widely administered. In addition to this, TST has other defects, such as technical variations for injecting PPD or measuring the TST response, the necessity of a return visit to the doctor to measure the TST response 2 days after PPD injection, and the booster effect through reinjection of PPD.

More recently, a new diagnostic method that can overcome these defects in TST, QuantiFERON<sup>®</sup>TB-2G (QFT-2G), has been developed. In QFT-2G, two Mtb-specific antigens, ESAT-6 and CFP-10, are used to stimulate whole blood, and based on produced interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Mtb infection is diagnosed. Since ESAT-6 and CFP-10 are absent from all *M. bovis* BCG substrains and most of NTM including *M. avium*, *M. intracellulare*, but are present in tuberculosis complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) and only a few strains of NTM, QFT-2G is not affected by prior BCG vaccination nor most of NTM infections. Moreover, as measurement of IFN- $\gamma$  can be carried out by machines on the next day following the blood draw, more objective results are obtained more quickly than with TST. It is not necessary to consider the booster effect in QFT-2G as PPD is not injected, nor to revisit the doctor. Thus, QFT-2G overcomes the defects of TST described here.

From a clinical trial of QFT-2G in which the subjects were smear-positive, untreated Tb patients and BCG-vaccinated healthy individuals, it has been demonstrated that the specificity and sensitivity of QFT-2G are 98.1% and 89.0%,

respectively, and QFT-2G is an excellent diagnostic method. Furthermore, many contact investigations have shown that QFT-2G detects not only active Tb but also LTBI. Several data indicate that frequency of contact with Tb patients correlates well with QFT-2G positive rates in contact investigations. The validity and usefulness of diagnosing LTBI by QFT-2G have been suggested in other countries.

In many contact investigations, it has been shown that most contacts who had been diagnosed as LTBI based on TST results were QFT-2G negative, suggesting that as a result, many unnecessary chemoprophylaxes were indicated. On the contrary, many QFT-2G positives were identified in those who were diagnosed to be uninfected with Mtb based on TST. Therefore, as the wide spread of QFT-2G testing in contact investigations would prevent unnecessary chemoprophylaxes and detect true infected individuals more accurately, we hope that more effective Tb control could be performed.

Although QFT-2G is an excellent diagnostic method, it is still new, and some questions remain to be answered. For example, the period of converting QFT-2G positive after Mtb infection, alteration of long-term QFT-2G responses after Mtb infection, and the effects of treatment for Tb or LTBI are not fully understood. The behavior of QFT-2G in infants or children is not understood either. Especially in infants, the problem of the blood volume required for the QFT-2G test is the major issue. We are working on these issues to provide more appropriate directions for QFT-2G users, and hope that we can contribute to Tb control.

**Key words:** Diagnosis of tuberculosis infection, Tuberculin skin test, QuantiFERON<sup>®</sup>TB-2G, Latent tuberculosis infection, Contact investigation

Immunology Division, Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

Correspondence to: Nobuyuki Harada, Immunology Division, Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: harada@jata.or.jp)

## 第81回総会教育講演

## 結核症における感染防御機序

河村伊久雄

**要旨：**結核菌は感染後生体内では細胞内寄生性を示し、マクロファージに取り込まれてもその細胞内殺菌機構に抵抗して細胞内に長期間生存する。多くの場合、結核菌はそのまま増殖せずにパーシスター (persister) としてヒトと共存するが、5~10%の感染宿主でその後活性化 (内因性再燃) し、成人に見られる慢性結核を発症する。ヒトと結核菌は長い共存の歴史があり、菌がどのようにして宿主免疫応答を刺激せずに生え続けるのかは、解明しなければならない疑問であった。しかし、1998年に結核菌の全塩基配列が明らかとなり、現在菌の病原性に重要と考えられるいくつかの因子が同定されている。また、最近 Toll-like receptor (TLR) がマクロファージや樹状細胞による結核菌の識別に関与することが示され、これら細胞と菌との interaction がその後の防御免疫の成立の重要な起点となっていることが明らかになってきた。さらに、結核に対する感染防御の主体は CD4<sup>+</sup>T細胞によって担われているが、その他に CD8<sup>+</sup>細胞障害性 T細胞、あるいは CD1 拘束性 T細胞も防御に関与することが報告されている。本発表では、結核に対する宿主防御に関する最近の知見を取り入れながら、これまで明らかにされたメカニズムについて紹介する。

**キーワード：**結核菌、マクロファージ、Toll-like receptor、T細胞、アポトーシス、オートファジー、インターフェロン- $\gamma$

## はじめに

結核は世界的に見て今なお単一の病原体による最大の感染症で、その原因菌である結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、数個で感染を引き起こすきわめて病原性の高い菌である。また、結核菌は非常に特徴的な脂質に富む細胞壁を有し、そこには強いアジュバント活性があるが、その一方で、宿主免疫応答を強く抑制することができる。

## 結核菌の殺菌抵抗性

結核菌は宿主体内に侵入後、肺胞マクロファージ、樹状細胞 (dendritic cell, DC) あるいは単球に積極的に侵入する。この細胞内侵入にはマクロファージ表面の補体レセプター (CR1, CR3やCR4)、マンノースレセプター、Fcレセプター、フィブロネクチンあるいはスカベンジャーレセプターなどが関与する (Fig. 1)。その他、感

染後菌の主要な増殖の場となる肺に存在する surfactant protein Aや、血中に存在する mannose-binding lectins が菌の侵入に関与することが示されている<sup>1)2)</sup>。

マクロファージに取り込まれた結核菌はファゴソーム膜に囲まれた状態で存在するが、結核菌はファゴソームの成熟、およびファゴリソソーム形成を阻害し、マクロファージ内の環境を自身の生存に適したものに変わらせようと考えられている。近年、分子遺伝学的な手法が結核菌にも応用され、この菌の殺菌抵抗性のメカニズムが次第に明らかになってきた。Ferrariらは、*Mycobacterium bovis* BCG生菌を含むファゴソーム膜には tryptophane-aspartate containing coat protein (TACO) が集積し、これがファゴリソソームの融合を阻害することを示した<sup>3)</sup>。Schullerらは、TACO類似の coronin分子がヒトマクロファージにも存在し、この分子は多数のBCGを貪食したマクロファージのファゴソーム膜上には維持されるが、小数の菌を貪食したマクロファージのファゴソーム

からは早期に遊離することを示し、coronin分子に依存しないファゴリソーム融合阻害のメカニズムが存在することを示唆した<sup>4)</sup>。今のところ、TACOあるいはcoronin分子をファゴソーム膜上に維持するメカニズムは不明であるが、これが結核菌の殺菌抵抗性の主要なメカニズムであると考えられることから、この点を明らかにすることは今後の重要な課題である。

さらに感染が進むと、菌体成分の刺激により、あるいは防御免疫が成立した結果、感染病巣部には肉芽腫が形成される。肉芽腫内部、あるいは宿主組織内は酸素分圧が低く、偏性好気生菌である結核菌には非常に苛酷な環境と考えられる。しかし、結核菌はパーシスターとして冬眠状態(dormancy)のまま宿主体内で生存し続けることができる。この菌の感染後の著しい変化に関してMcKinneyらは、結核菌が肺で持続感染を成立させるためにはイソクエン酸リアーゼ(isocitrate lyase, ICL)が重要な役割を果たすことを明らかにした<sup>9)</sup>。ICLは、脂質を材料とした糖の生合成経路、グリオキシル酸サイクルの酵素の一つで、この結果は結核菌が酸素分圧の低い環境では脂質を炭素源として利用することを示すものである。これ以外に、低酸素条件下で誘導される結核菌遺伝子として熱ショックタンパクの一種である $\alpha$ -crystallin<sup>6)</sup>やnitrate reductase<sup>7)</sup>あるいはEis<sup>8)</sup>、KatG<sup>9)</sup>やMDP1<sup>10)</sup>などが細胞内増殖や持続感染に関与する因子として報告されており、菌がパーシスターとして存在するためには非常に複雑なメカニズムが働いていると思われる。

### 宿主防御免疫応答

#### (1) 初期感染防御反応

マクロファージの感染局所への動員、あるいは結核菌貪食後のマクロファージの活性化は、結核菌に対する初期防御反応だけでなく、特異的免疫応答の誘導においても重要である。最近、マクロファージや樹状細胞に存在するToll-like receptor (TLR)が、異物識別やその後のマクロファージの活性化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。このTLRファミリー分子のうち、TLR2は抗酸菌の主要な細胞壁リポ多糖体成分であるリポアラビノマンナン(lipoarabinomannan, LAM)、フォスファチジルイノシトールマンノシドあるいは耐熱性soluble tuberculosis factorや、19 kDaリポタンパクを認識することが示されている。また、易熱性結核菌体抗原はTLR4により認識され、炎症性サイトカイン産生が誘導される。さらに、TLR9は細菌DNAを認識し、結核菌感染後の宿主免疫応答の誘導に重要な役割を果たすものと考えられる。一方、病原性の強い結核菌やBCGのLAMはその先端にマンノース残基が付加しており(Man-LAM)、非定型抗酸菌のLAMとは構造的に異なり、マクロファージの活性化を誘導しないことが示されている。さらに最近、結核菌に感染したマクロファージがアポトーシスに陥ることで菌の細胞内増殖が抑制されることが報告されている。しかし、病原性の強い菌は細胞のアポトーシスを抑制する機序を有することが示されており、これは結核菌がマクロファージ内でパーシスターとして生存するために重要なメカニズムの一つと考えられる<sup>11)</sup>。

結核菌を貪食し、活性化したマクロファージはケモカインを産生し、感染局所への炎症性細胞を動員する(Fig. 2)。また、同様に感染マクロファージが産生する

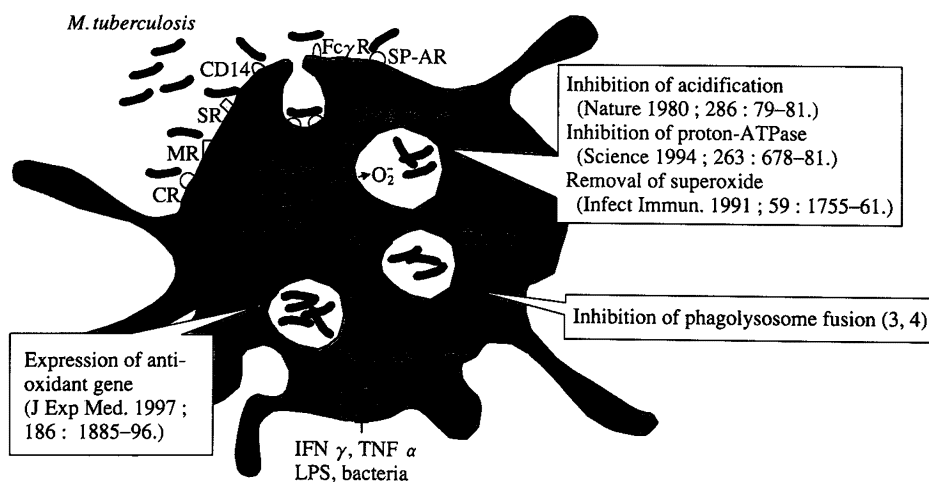


Fig. 1 Mechanism of intracellular survival of *M. tuberculosis*

CR: complement receptor, MR: mannose receptor, SR: scavenger receptor, SP-AR: surfactant protein A receptor, TACO: tryptophane-aspartate containing coat protein



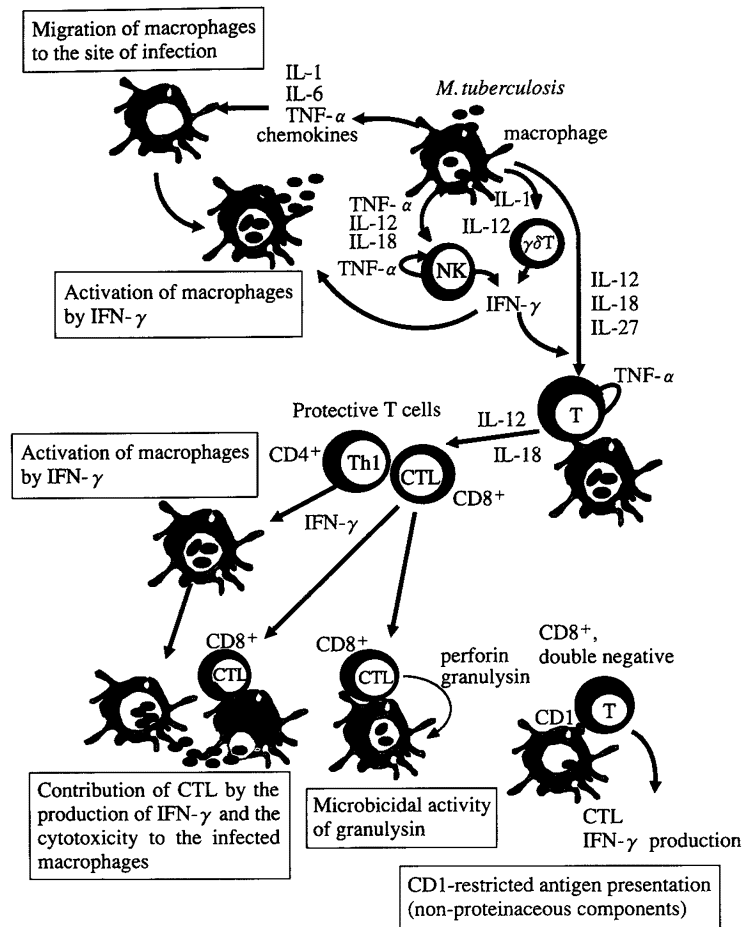


Fig. 2 Schematic mechanism of protective immunity against *M. tuberculosis*

サイトカインのうち、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-12やIL-18はマクロファージを活性化し、肉芽腫形成や感染初期の菌の増殖を抑制すると共に、NK細胞あるいは $\gamma\delta$ 型T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を誘導する役割を担っている。産生されたIFN- $\gamma$ はTNF- $\alpha$ と共にマクロファージを活性化し、殺菌活性の非常に強いNO産生を誘導して貪食した菌を殺菌処理する。また最近、IFN- $\gamma$ が細胞のオートファジー機構を活性化することでマクロファージの殺菌能を高めていることが示され、注目を集めている<sup>12)</sup>。このように結核に対する宿主初期防御反応では、感染局所で産生されたケモカインや炎症性サイトカインがマクロファージ、NK細胞や $\gamma\delta$ 型T細胞を感染部位に集め、それらを活性化し、その結果産生されたIFN- $\gamma$ がさらにマクロファージの活性化を誘導して、特異的防御免疫が成立するまでの期間、菌の増殖を最小限に抑えている。

#### (2) 獲得抵抗性の発現

結核菌を貪食したマクロファージやDCが産生するIL-12やIL-18、あるいはNK細胞や $\gamma\delta$ 型T細胞由来のIFN- $\gamma$ は、 $\alpha\beta$ 型T細胞のTH<sub>1</sub>細胞への分化を司る重要

なサイトカインで、IL-27と協調してIFN- $\gamma$ 産生能を有する感染抵抗性TH<sub>1</sub>細胞を誘導する。TH<sub>1</sub>に分化した $\alpha\beta$ 型T細胞は、抗原およびIL-18の刺激を受けて大量のIFN- $\gamma$ を産生する。このため、感染防御を担う $\alpha\beta$ 型T細胞が出現するとマクロファージの殺菌能が飛躍的に高まる。感染免疫に関与するT細胞としては、class II拘束性CD4<sup>+</sup>TH<sub>1</sub>細胞ばかりではなく、class I拘束性CD8<sup>+</sup>キラーT細胞も同時に誘導される。結核菌感染により誘導されるCD8<sup>+</sup>T細胞は、CD4<sup>+</sup>T細胞と同様IFN- $\gamma$ を産生すると同時に、多量の菌を貪食して殺菌能の低下したマクロファージや菌が感染した非食細胞系細胞を破壊し、新たに動員されてくる活性化マクロファージに菌を処理させるという機構で感染防御に関与すると考えられる<sup>13)</sup>。また、CD8<sup>+</sup>キラーT細胞は、結核菌感染細胞を傷害することで内部の菌を殺菌することができ、細胞質顆粒に含まれるperforinとgranulysinがこの殺菌メカニズムに関与することが報告されている<sup>14)</sup>。さらに、タンパク質以外のLAM, phosphatidylinositol mannoside, glucose monomycolateやisoprenoid glycolipidsなどの糖脂質成分

がマクロファージ上の CD1 分子に結合し、CD8<sup>+</sup>あるいは double negative T 細胞に抗原として提示されることがわかっている<sup>15)</sup>。これらを認識する CD1 拘束性 T 細胞は、抗原刺激後に IFN- $\gamma$  産生やキラー活性を発揮することで防御免疫に関与することが示唆されている。このように、防御免疫の発現にはその機能あるいは認識する抗原が異なる多様な T 細胞が関与する。感染の経過に伴いそれぞれの T 細胞の防御免疫における比重は異なると考えられるが、これら T 細胞活性の総和が結果的に菌の排除を可能にしている。

#### おわりに

結核菌の病原性と宿主感染免疫のメカニズムについての最近の知見を中心にまとめた。結核菌はヒトを宿主として共生することに成功した微生物であり、そのメカニズムが分子遺伝学的な手法で解析された結果、今までに見られなかった菌の感染におけるダイナミズムが明らかになってきている。今のところ、ヒトの発達した免疫システムを回避する菌側のメカニズムは断片的にしか明らかになっていないが、結核の病原機構を理解するうえでの最も重要な点であろう。その解明により、はじめて結核を過去の感染症とよぶことができる時代の到来が期待できると言えよう。

#### 文 献

- 1) Marth T, Kelsall BL: Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J Exp Med.* 1997; 185: 1987-1995.
- 2) Pasula R, Wright JR, Kachel DL, et al.: Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Investig.* 1999; 103: 483-490.
- 3) Ferrari G, Langen H, Naito M, et al.: A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell.* 1999; 97: 435-447.
- 4) Schuller S, Neefjes J, Ottenhoff T, et al.: Coronin is involved in uptake of *Mycobacterium bovis* BCG in human macrophages but not in phagosome maintenance. *Cell Microbiol.* 2001; 3: 785-793.
- 5) McKinney JD, Bentrup KH, Munoz-Elias EJ, et al.: Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature.* 2000; 406: 735-738.
- 6) Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, et al.: Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding  $\alpha$ -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 7534-7539.
- 7) Fritz C, Maass S, Kreft A, et al.: Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific. *Infect Immun.* 2002; 70: 286-291.
- 8) Wei J, Dahl JL, Moulder JW, et al.: Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene that enhances mycobacterial survival in macrophages. *J Bacteriol.* 2000; 182: 377-384.
- 9) Master S, Zahrt TC, Song J, et al.: Mapping of *Mycobacterium tuberculosis* *katG* promoters and their differential expression in infected macrophages. *J Bacteriol.* 2001; 183: 4033-4039.
- 10) Matsumoto S, Furugen M, Yukitake H, et al.: The gene encoding mycobacterial DNA-binding protein I (MDPI) transformed rapidly growing bacteria to slowly growing bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 182: 297-301.
- 11) Riendeau CJ, Kornfeld H: THP-1 cell apoptosis in response to mycobacterial infection. *Infect Immun.* 2003; 71: 254-259.
- 12) Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al.: Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.* 2004; 119: 753-766.
- 13) Kaufmann SHE: Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11: 129-163.
- 14) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al.: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science.* 1998; 282: 121-125.
- 15) Schaible UE, Kaufmann SHE: CD1 and CD1-restricted T cells in infections with intracellular bacteria. *Trend Microbiol.* 2000; 8: 419-425.

## The 81st Annual Meeting Educational Lecture

PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Ikuo KAWAMURA

**Abstract** *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is a facultative intracellular pathogen with which over a billion people have been infected and 3 million people die annually. The bacterium induces vigorous immune responses, yet evades host immunity, persisting within phagosomes of the infected macrophages. Thus, it is necessary to delineate that the virulence-related intracellular survival mechanism and the host immune responses to eradicate *M. tuberculosis* on the molecular basis. In this regard, recent findings clearly indicated that Toll-like receptors (TLRs) play an essential role in the recognition of MTB components by macrophages and dendritic cells, resulting in not only activation of innate immunity but also development of antigen-specific adaptive immunity. It has been also reported that induction of early death of the infected cells may be one of the strategy of host defense against MTB because macrophages go into apoptosis upon infection with MTB, resulting in suppression of the intracellular replication. Furthermore, recent report has shown that autophagy is induced by IFN- $\gamma$  and suppress intracellular survival of mycobacteria, suggesting that activation of autophagy pathway is required to overcome phagosome maturation arrest induced by MTB. In addition, it is known that IFN- $\gamma$

plays an important role in protection. The cytokine that is produced from NK cells and dendritic cells at the early period of infection strongly induces not only macrophage activation but also development of antigen-specific IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup>T cells. Since antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells and CD1-restricted T cells are also reported to contribute to the protective immunity, cooperation of these T cells is essential for the host resistance. In this paper, I am going to summarize the recent progress of the understanding of protective immunity against MTB.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, Macrophages, Toll-like receptor, T cells, Apoptosis, Autophagy, IFN- $\gamma$

Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine

Correspondence to: Ikuo Kawamura, Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8501 Japan. (E-mail: [ikuo\\_kawamura@mb.med.kyoto-u.ac.jp](mailto:ikuo_kawamura@mb.med.kyoto-u.ac.jp)).

## 第81回総会シンポジウム

## I. 結核分子疫学の新展開

座長<sup>1</sup>高嶋 哲也<sup>2</sup>岩本 朋忠

キーワード：結核分子疫学, IS6110RFLP, VNTR

シンポジスト：

1. 沖縄県での長期にわたる RFLP 分析の成果と課題  
前田伸司（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報科）
2. VNTRの基礎とその応用  
西森 敬（動物衛生研究所ヨーネ病研究チーム）
3. VNTRの臨床応用とその成果  
松本智成, 阿野裕美（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部）
4. 結核対策行政での分子疫学データの活用  
岩本朋忠（神戸市環境保健研究所微生物部）

特定菌株の追跡を可能とした分子技術である「結核菌遺伝子型別解析」は、従来からの疫学的手法と一体化することで、集団内での結核の分布を追及する科学、すなわち、結核分子疫学を生み出した。結核は空気感染で伝播し、感染から発病までに数カ月から数十年を要することから感染源や感染経路の特定がきわめて困難であったが、結核分子疫学の出現により、結核の疫学・対策・研究は新時代に突入したといえよう。

結核菌由来の挿入配列 IS6110 を用いた Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析、いわゆる DNA 指紋分析法による分子疫学的解析は、国内でも多くの施設で実施されており、特に集団感染事例での結核菌伝播の特定などに貢献している。また、解析対象を地域で分離された全菌株に拡大し、地域における感染実態の解明、結核対策プログラムの評価、未知の集団感染事例の発見などを目指し、結核対策改善に活用しようという動きもある。さらに、分子疫学データの臨床分野での応用も一部で既に実施されている。世界的な動きでは、

施設間データ比較を可能とする迅速・簡便な遺伝子型別手法の開発ならびにグローバルデータベースの構築に向けた新たな取り組みが精力的になされており、地球規模での結核制圧に向け、結核分子疫学はますますその重要性を増してきているといえる。

本シンポジウムでは、わが国における分子疫学ネットワーク構築の一助となることを期待して、抗酸菌レファレンスセンター、基礎、臨床、行政の立場からの結核分子疫学の展望について、それぞれの分野に造詣の深い4人のシンポジストに概説していただいた。

前田伸司氏（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター）からは、沖縄県での約10年にわたる RFLP 分析より得られた成果として、八重山における地域内流行型結核菌の存在と若年齢層でのクラスター形成率が高い傾向にあることが報告された。また、接触者調査の現場で分子疫学データをより有効に利用するには結果報告の迅速化や施設間でのデータ互換性が必要であることを強調された。西森敬氏（動物衛生研究所ヨーネ病研究チーム）には、IS6110 RFLP法の欠点を補う新しい方法として期待されている Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法の基礎として、①VNTR領域発見の経緯、②VNTRの構造と多型形成のメカニズム、③系統発生的解析への応用に向けたアリルプロファイルの利用について概説いただいた。松本智成氏（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部）からは、VNTR法を医療現場に応用することにより、①多剤耐性結核は治療の失敗だけではなく感染発病していること、②内因性再燃および外来性再感染の区別が可能となること、③喀痰からの直接VNTRにより早期に薬剤耐性状況を推測できた事例、④ *M. avium* 症での再燃か再感染かの判断が可

<sup>1</sup>地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター、<sup>2</sup>神戸市環境保健研究所

連絡先：岩本朋忠，神戸市環境保健研究所，〒650-0046 兵庫県神戸市中央区港島中町4-6  
(E-mail: tomotada\_iwamoto@office.city.kobe.jp)  
(Received 18 Jul. 2006)

能となることが報告された。岩本朋忠氏(神戸市環境保健研究所)からは、地域分離株のVNTRデータに基づく遺伝子型別データベースの構築とその活用法について概説いただいた。VNTR法の特徴を生かして、結核対策プ

ログラム上ハイリスクと考えられる株の出現を常時モニタリングする結核危機管理体制の整備ならびに海外分離結核菌との比較から得られた神戸市分離結核菌の特徴について報告された。

## 1. 沖縄県での長期にわたる RFLP 分析の成果と課題

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報科 前田 伸司

### はじめに

1996年から結核研究所と沖縄県福祉保健部は共同で、沖縄県内の保健所・医療機関等の協力のもと、新規登録結核患者で培養陽性例の約7割の株について挿入配列(IS)6110プローブを用いた制限酵素断片長多型(RFLP)分析を行ってきた<sup>1)2)</sup>。本研究プロジェクトは、通常の接触者調査だけではなく、分離された菌体から得られる分子疫学的情報を提供することにより、①患者発生調査の改善を計ることができる、②結核対策方針策定のための疫学情報を提供することができる、③将来全国的な結核菌DNA情報サーベイランスを導入する際の基礎となる知見が得られる、など接触者調査の改善と将来の大規模な結核菌DNA情報のデータベース化を目指したものである。

### RFLP分析

沖縄県の現在の人口は約136万人(平成17年国勢調査速報)で、結核新規登録患者の推移をみると、1996年に年間400人を超えていたが、2004年は339人となり、年ごとに若干の変動はあるものの減少傾向にある。また、罹患率は全国平均、沖縄県共にはほぼ同じ罹患率をたどって低下している。沖縄県での調査は、他県と隣接しない島であるという地域的な特徴があり、患者の移動も把握しやすいという利点がある。

分析を行った株は、1996年4月から2005年12月までの新規登録患者で塗抹検査または培養検査陽性となった結核菌1924株のうち、1323株(68.8%)であった。分析方法は、結核菌タイピングの標準法であるIS6110-RFLP分析を用いた<sup>3)</sup>。IS6110-RFLPは、結核菌ゲノム上にランダムに存在するトランスポゾンの配列の一部であるIS6110配列をサザンハイブリダイゼーション法で検出するというものである。分析で得られたバンド数は、ゲノム上に存在していたIS6110配列の数を反映し、位置(分子量)の違いは制限酵素サイトからIS6110配列までの距離を反映している。このようにRFLP分析では、挿入配列の数と酵素サイトからの距離という2つの独立した事

象を利用して結核菌のタイピングを行うという手法である。集団発生例などで同一感染源から感染した患者から分離した菌は、同一のRFLPパターンを示し、逆にRFLP分析結果が同一パターンであれば、同一感染源から感染した結核である可能性が強く疑われることになる。実際の分析では、アガロースゲルの濃度、泳動時間などの条件等が異なる場合もあるため、それらを補正するためにコンピューター上でプログラムソフト(BioNumerics ver. 4.0, Applied Maths社)を使って解析を行った。分子量マーカーを使って各レーンの泳動距離を修正後、系統樹を作製して同一菌株、つまりクラスターを形成する株どうしを見つけ出し、分類を行った。

### クラスター率

1323株を分析した結果、158種類のクラスターが存在することがわかった。最も多いのは、2株で構成されるクラスターで87種類存在し、最大クラスターはクラスター番号65で22株から構成されていた(Table)。分析した株の中で574株が何らかのクラスターを形成しており、クラスター率は43.4%(574/1323)であった。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という報告<sup>4)</sup>があることから、このクラスター率は中程度の値であると考えられる。

各年齢階層別にクラスター率(折れ線グラフ)と実際に分析した株数(棒グラフ)の関係を表すと、若年齢層では分析した株数が少ないが、クラスター率が高い傾向がみられた(Fig. 1)。一方、高年齢層では、クラスター率が低くなるという傾向がみられた。しかし、これらの違いは、統計学的に有意な差ではなかった。一般的にクラスター率が高いということは、最近の感染を反映しているといわれている。つまり、若年齢層ではクラスター率が高く、高年齢層では加齢によって細胞性免疫の低下が起これり内因性再燃の頻度が高くなることからクラスター率が低くなるという報告<sup>5)</sup>と今回の結果は、一致するものだった。

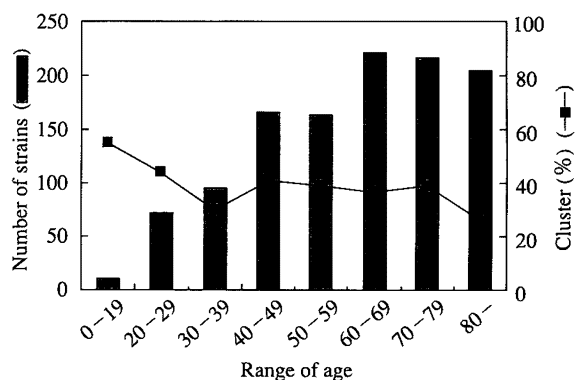
**Table** Cluster code and number of strains

Cluster code	No. of strains	Cluster code	No. of strains	Cluster code	No. of strains	Cluster code	No. of strains	Cluster code	No. of strains
3a	5	43T	3	73da	4	84	7	126	20
8	4	46	12	73f	3	85	10	126e	4
8a	3	48	7	73h	4	85a	7	128	4
8aa	14	50	10	73k	4	85aa	3	131	12
9b	5	50aa	3	73o	5	94	3	142	3
10a	3	52	3	75	3	108	7	151	3
12	6	52b	3	77	3	108a	5	157	4
18	5	55a	3	78	3	110	3	167	3
20	3	63	3	79	3	111	3	169	4
24	17	65	22	79a	5	112a	7	170	3
27	3	66	3	80	4	116	5	173	3
27a	3	67	3	80a	4	118	3		
32	4	73	20	80aa	6	121	5		
33	9	73a	3	80aT	4	122	6		
33e	4	73d	13	82	5	123	4		

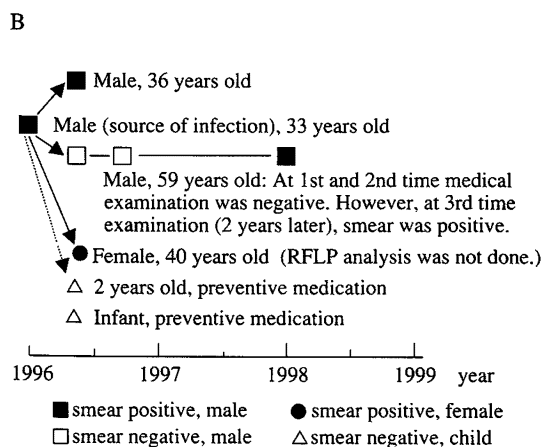
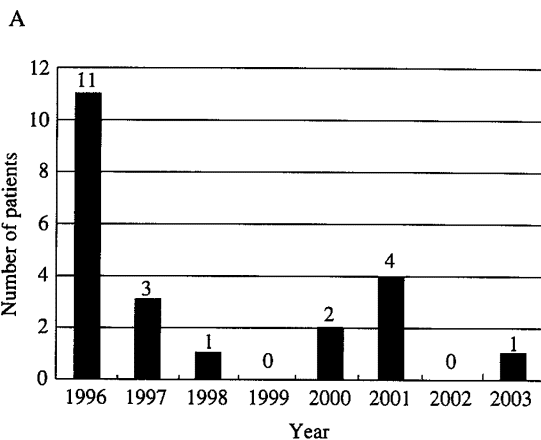
Except for the clusters which consist of 2 strains, the clusters composed of three or more strains were shown in this table.

**成果と問題点**

クラスター番号65番の株を分析することによって、八重山における地域内流行型結核菌の存在を示唆する結果が得られている (Fig. 2)。これは1996年から2003年までの8年間にわたって散発的に22例ほど検出された結核菌で、疫学的調査にもかかわらず、ほとんどの例で関連が不明であった。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。唯一、疫学的関係が明らかになったのは、家族内での感染例である3例のみであった。すべての患者で共通する点としては、患者が石垣市在住か、あるいは過去に八重山に滞在したことがあるということであった。つまり、この結核菌は過去に八重山地区内で流行してい



**Fig. 1** Number of analyzed strains and percentage of clustered cases by age group



**Fig. 2** Presumed route of TB infection in cluster code 65. (Possibility of existing the endemic type of *M. tuberculosis*) Number of patients infected with the code 65 strain (A). The only example that epidemiologic connection became clear was family infection case (B).

た地域性の高い流行株であることが示唆された。このような結核菌存在の証明は、沖縄県で長期にわたって結核菌を分析することによって明らかになったものであり、本研究プロジェクトの大きな成果である。

しかしながら、分子疫学を利用した RFLP 分析結果から得られたクラスターのうちで、疫学的検討により伝播が証明できたのは、全体の約 10% 以下であり非常に低いものだった。このように RFLP 分析の結果が、実際の接触者調査の場で十分に活用されていないという現状である。この原因としては、①分析には 1 $\mu$ g 以上の精製した高分子 DNA が必要で、菌の培養が必要で時間がかかる。そのため、結核患者登録と RFLP 分析結果の報告とに時間的なギャップを生じて、再調査において患者との再接触等有意義な情報収集が困難である、② RFLP 分析を実施する場合、生きた菌を検査施設に送らなければならない、かなりの手間がかかる、ということが考えられる。

また、RFLP 分析結果は画像データとして得られるので、多施設間での結果の比較は全く同じ方法・装置によらなければ困難であるという RFLP 分析法自体の欠点がある。

#### 分子疫学の今後

分子疫学の成果を結核対策に生かすためには、接触者調査等を有効に行うことができるように、結果報告の迅速化が第一である。このためには、菌の輸送法の検討や分析法を含めた検討が必要となると考えられる。特に大都市周辺では、行政区域を越えて人が移動することが日常となっていることから、保健所の管轄を越えても追跡調査が可能な統一した方法で分子疫学調査を進める必要がある。このような要求に合致した方法のひとつとして、反復配列多型 (Variable Numbers of Tandem Repeats: VNTR) 分析法がある<sup>9)</sup>。

結核研究所では、この VNTR 法が現在の標準法である RFLP 分析に代わる方法と成りえるのかどうかの検討を行っている。現状の VNTR 分析の標準となる 12 カ所の Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU) と 4 カ所の Exact Tandem Repeat (ETR) について 253 株の結核菌を分析した。その結果、30 種類のクラスターが観察され、最大のクラスターサイズは 42 株からなるクラスターだった。VNTR 分析によるクラスター率は 62.8% で、同じ菌株を用いた RFLP 分析でのクラスター率が 29.6% だったことから、クラスター率を指標に判断すると、16 カ所の VNTR 分析法は、RFLP 分析に比べてタイプニング能力が著しく低いことがわかった。そのため、この方法をそのまま RFLP 分析法に代えて結核菌のタイプニング法として利用できないことが明らかになった。

個々の locus について検討を行うと、例えば MIRU26

のようにバリエーションの高い部位、逆に MIRU2、MIRU24 のように低い部位が存在していることがわかった。そのため、現在の標準と考えられている分析部位以外で多型性の高い新しい VNTR 部位を探し、RFLP 分析法と同等のタイプニング能力を得るには、どの locus の組み合わせが適当であるのか検討を行っている。

北京型結核菌が多くを占める日本国内の結核菌を分析するための最適な VNTR 法の確立が急務である。そして、適切な locus を選択し、適切な locus 数を分析すれば、現在の標準法である IS6110-RFLP 分析と同程度の分解能をもった VNTR 分析法の確立が可能であると考えられる。

#### ま と め

沖縄県で長期にわたって行ってきた結核菌の RFLP 分析により、地域流行型結核菌が存在することを明らかにすることができた。また、より有効な接触者調査のために、分子疫学による結核菌情報を積極的に利用できるようにすることが必要である。そのためには、まず分析結果報告の迅速化が必要な対策であり、日本における標準的 VNTR 法の確立を行い、RFLP 分析法から遺伝子増幅法を利用する VNTR 法にシフトしていく必要がある。

#### 謝 辞

本研究は、結核予防会結核研究所研究部分子疫学プロジェクト研究の一環として行われてきたものであり、その構成員の皆様に感謝致します。特に国内において RFLP 分析法の有効性を広めた高橋光良先生に深く感謝致します。

#### 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。日本公衆衛生雑誌。2003; 50: 339-348.
- 2) 大角晃弘, 高橋光良, 内村和宏, 他：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)。資料と展望。2004; 51: 77-83.
- 3) van Embden JD, 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) 森 亨：地域分子疫学の結核対策への応用。資料と展望。2004; 51: 45-57.
- 5) 阿野裕美, 松本智成, 吉多仁子, 他：IS6110 RFLP 解析に基づく、結核の分子疫学的検討—2001 年～2003 年—。結核。2006; 81: 321-328.
- 6) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol. 2000; 36: 762-771.

## 2. VNTR 型別の基礎とその応用

動物衛生研究所ヨーネ病研究チーム 西 森 敬

### はじめに

分子生物学的手法の発展により、結核菌において IS6110-RFLP が疫学的解析手段として確立されている。他方、トリ型結核菌においては保有する遺伝子挿入配列の種類によって IS1245-RFLP, IS1311-RFLP, IS900-RFLPあるいは IS901-RFLP<sup>1)</sup>が用いられている。しかし、この手法は特殊な機器や熟練を要し、異なる施設間のデータ比較の問題点が指摘され、しかも遺伝子挿入配列を少数しか保有しない菌株の解析においては有効な手段となりがたい。これらの問題を解決する手段として、デジタルデータとして施設間の比較が可能な Spoligotypingが結核菌群において開発されているが、広範囲にスペーサー領域が欠失している北京型の比率の高い地域ではその能力が十分に発揮できていない。これら欠点を補うものとして、特定の長さの配列が隣り合って繰り返す Tandem Repeat (縦列反復) の中で、菌株によってその繰り返し数の異なるものを Variable Number of Tandem Repeat (多型縦列反復、「数のさまざまな」との直訳があるが、意識「多型」を用いる) といい、この性状を使った Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 型別<sup>2)</sup> [または MLVA (Multi-Loci VNTR Analysis)] が検討されている (Fig. 1)。

### 塩基配列の縦列反復と多型縦列反復

縦列反復は真核生物のゲノム DNA の密度勾配遠心による分画で形成されるサテライトバンドの生成メカニズムに関与し、その繰り返し配列単位が数百 bp であったので、これがサテライトと呼ばれた。縦列反復単位のサイズが、1~13 bp ぐらいのものをマイクロサテライトあるいは SSR, 10~100 bp をミニサテライトと区別されているが、厳密なサイズの定義はないようである<sup>3)</sup>。このような経過から、結核菌のような原核生物においては存在しないと言われていたため、開発が遅れたが、遺伝子のシーケンス解析の過程において、原核生物にも遺伝子間領域に存在することが明らかになり、ゲノムプロジェクトの対象菌株の増加により、研究が加速された (Fig. 2)。縦列反復の領域の中で株によってその繰り返し数が異なる領域は多型縦列反復領域 (VNTR 領域) と呼ばれている。各 VNTR 領域は独立に変化すると考えられており、可変の幅が大きく、測定領域の数が多いほど、識別能力が高くなることが考えられるが、コストパフォーマンスを考えた選択が必要である。

### VNTR 型別法開発の流れ

結核菌群においては、大別して 4 グループの VNTR 領

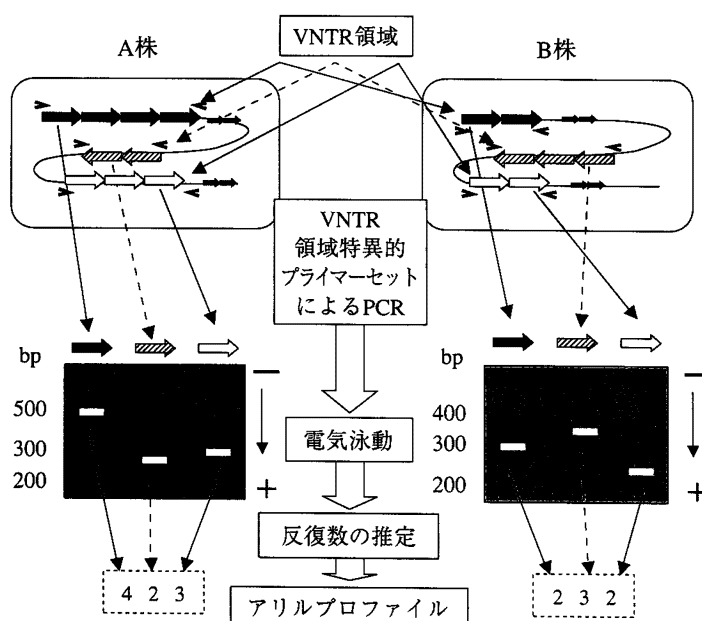


Fig. 1 Variable Numbers of Tandem Repeats 型別の概要 (村上美雪原図)



域の研究の流れがVNTR型別法の開発に貢献している。

ETR：Shawらは*katG*遺伝子(イソニアジド活性化)の上流にある75bpの縦列反復にコピー数の多型が6種類あることを報告し、またFrothinghamらは共通する10bpと多型の5bpが反復単位となって約15回反復するMPTRにおいて欠失による多型をみつけた。さらにFrothinghamらは、これら文献情報に加えて、コスミド情報から45bp以上、90%以上の相同性、反復全長200bp以内の条件で縦列反復領域を検索した。その結果多型性を示す6カ所のETRと呼ばれるVNTR領域を報告し、さらに13カ所のETRの存在も暗示していた<sup>4)</sup>。

MIRU：Supplyらは結核菌の2成分制御系の研究の過程で、*senX3-regX3*と名付けられた未知の領域の2つの遺伝子間に縦列反復が存在し、これが株間で多型を示す

ことをみつけた。さらにこの反復単位と相同性の高い領域が結核菌H37Rvに41カ所存在することをみつけ、Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)と名付けた。12カ所(新規10カ所)が株間で多型性を示すことを報告した<sup>5)</sup>。

QUB：SkuceらおよびRoringらはゲノムプロジェクトのWeb検索サービスのマニュアル検索および縦列反復構造検索プログラム〔Tandem Repeat Finder Program (TRFP)〕を用いて大学名に由来するQUBと名付けるVNTR領域を報告した<sup>6)7)</sup>(新規11カ所)。

Mtub：Vergnaudらは複数の結核菌株の全ゲノム情報が開示されたことから、この情報をTRFPにて網羅的に検索し、株間で比較することにより、Mtubと名付けたVNTR領域を報告した<sup>8)</sup>(新規7カ所)(Fig. 3)。

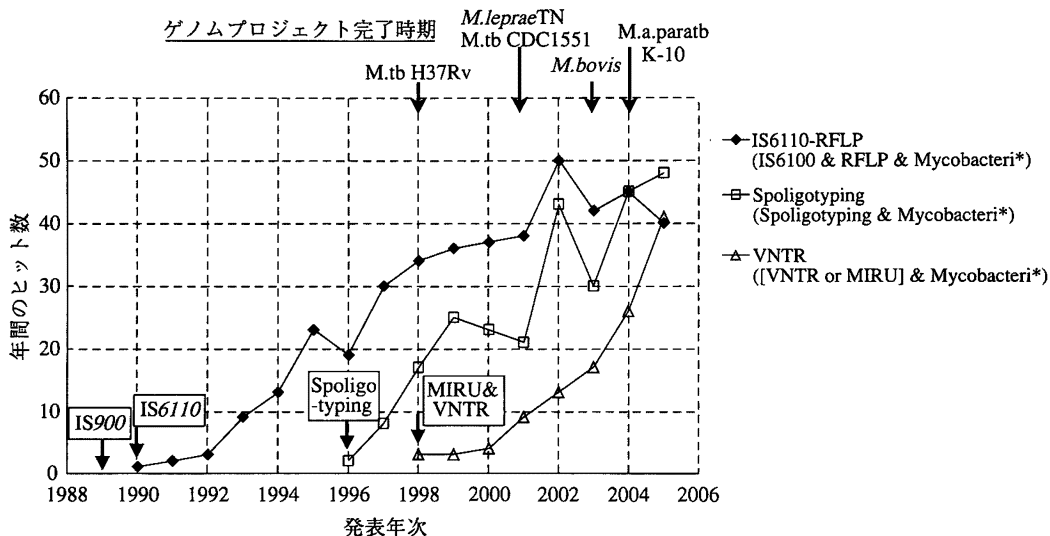


Fig. 2 解析手法別の文献数の推移 (The National Library of Medicine's PubMed database)

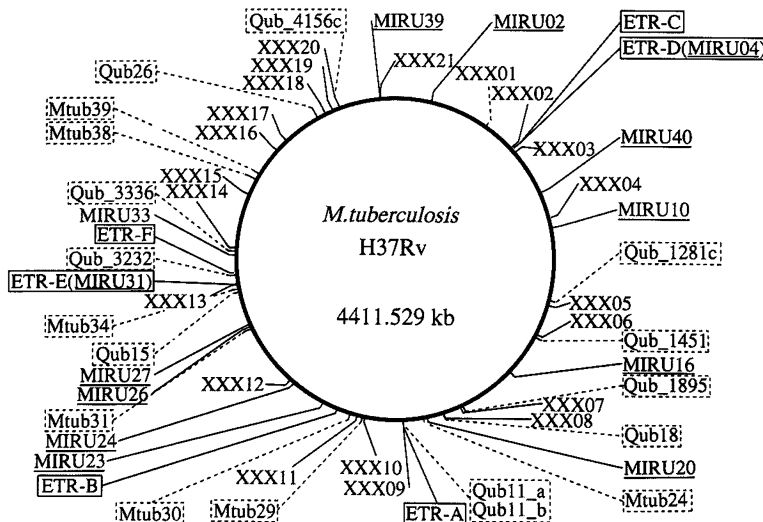


Fig. 3 ETR, MIRU, QUBおよびMtubの各VNTR領域の位置

このように VNTR 領域の検索は BLAST のような相同性検索と TRFP のような網羅的 (構造) 検索の 2 つの方法で実施されてきた。前者は縦列配列を形成する共通配列が特定されれば、縦列反復構造がなくても検索可能であるが、縦列反復構造をもっていない相同性のない領域は検出できない。他方後者は配列のサイズに関係なく一定の検索基準を満たすものをすべて検出できるが、未知の株において縦列反復構造を形成する可能性がある領域あるいは欠失により縦列構造を失った領域は検出できない。特定遺伝子情報あるいは全ゲノム情報の増加および検索サービスの整備により、後者は強力な縦列反復検索の手段となっており、結核菌のみならず、全ゲノムが公開された菌種等の VNTR がコンピューター上 (*in silico*) で解析できるようになっている (ミニサテライトデータベース <http://minisatellites.u-psud.fr/>)。

鳥型結核菌の VNTR 型別は第 7 回国際ヨーネ病学会で初めてわれわれのグループと Hermon-Taylor らのグループからヨーネ菌に関して報告されて以後 (<http://www.paratuberculosis.org/proc7/section1.htm>), MIRU との相同性検索あるいは網羅的検索によるヨーネ菌亜種の報告が 3 件ある<sup>9)</sup>。われわれは The Institute of Genome Research (TIGR) の *M. avium* 株 104 のゲノムプロジェクトにより提供された未完成塩基配列情報の検索サービス ([http://tigrblast.tigr.org/ufmg/index.cgi?database=m\\_avium:seq](http://tigrblast.tigr.org/ufmg/index.cgi?database=m_avium:seq)) を用いて、結核菌の縦列反復との相同性検索にて候補を選択した。さらにヨーネ菌ゲノムプロジェクトとの比較により 16 カ所の VNTR 領域を特定した。鳥型結核菌の野外および臨床株での有用性を検討する VNTR 研究を促進するために、TIGR のポリシーにならって、PCR プライマー情報を公開した (<http://ss.niah.affrc.go.jp/publication/kenpo/2002/109-4.pdf>)<sup>10)</sup>。これと並行して MAC の血清型参照株等のアレルプロファイルの比較、さらに VNTR 領域の配列情報の解析を実施している。

#### VNTR の構造と多型メカニズム

縦列反復における反復単位の増減のメカニズムとしては諸説あるが、「近接して存在する直接反復が複製時にずれて整列することにより、Slippage を生じ、その後の複製の結果、片方の直接反復とこれに挟まれた部分を反復単位として縦列反復が増減する」モデルが大腸菌等で提案されている<sup>11)</sup>。実際、結核菌 H37Rv 株において報告された 35 カ所の VNTR 領域の配列を *in silico* 解析してみると縦列反復単位が整数個繰り返すものはわずかで、ほとんどが端数をもった繰り返し数であった。上記モデルと同様に VNTR 領域は縦列反復の反復単位の一部である端数部分の直接反復に挟まれた構造をもっている。ただし、塩基配列レベルで検討すると、すべてが 100% の

相同性をもった反復単位の繰り返しではなく、さらに、BCG 株や H37Rv 株においては MIRU-4 の領域の端にある 55 bp の構成単位が欠失し、臨床分離株でも数パーセントにこの変則的な構造が報告されている<sup>12)</sup>。また、ETR-F は 55 bp と 77 bp の 2 種類の縦列配列単位が一部重複して隣接する構造が見られる。塩基配列レベルでのアレルの比較による変異の様式の確認が分子疫学的解析精度を向上させることが示唆される。

分子時計に関しては BCG における 12 カ所の MIRU の解析では 30 年間で MIRU-4 のみに増減の変化が報告され<sup>5)</sup>、結核菌の臨床株での検討でも 1~2 年間ほとんど変化はなく、最も多型性を示す MIRU-26 での 1 個の増減が報告され、この変化が IS6110-RFLP とは独立であることも報告されている<sup>13)</sup>。

#### おわりに

縦列反復の反復数の多型を利用した VNTR 型別は基本的に PCR と電気泳動で実行可能であり、一般の検査室での実施を考えた時、有望な分子疫学的解析法である。抗酸菌の分野では結核菌群から利用が始まったが、ゲノムのシーケンス情報が利用できれば他の菌種でも応用可能である<sup>9)14)</sup>。VNTR 型別の技術は比較的単純簡単であるが、一度反復数を決めるとそのデータが独り歩きする危険性をもっており、測定精度管理が重要である。統一した基準で反復数を求め、統一した書式で記述することにより、施設間のデータの比較やデータベースとしての蓄積が容易になることから、早期にコンセンサスを形成することが必要となってきている。さらに反復数の増減は分子時計の意味もあり、適切な処理をした系統樹解析は疫学研究の強力な手段となりえる。データベースと系統樹解析を組み合わせることにより、迅速かつ詳細な疫学解析に寄与することが期待される。

#### 文 献

- 1) Bartos M, Hlozek P, Svastova P, et al.: Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *J Microbiol Methods*. 2006; 64: 333-345.
- 2) Barnes PF, Cave MD: Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1149-1156.
- 3) Brown, TA (松村正實監訳): 「ゲノム 2 ー新しい生命情報システムへのアプローチ」, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 2003, 64-66, 142, 593.
- 4) 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.

- 5) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000 ; 36 : 762-771.
- 6) Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, et al.: Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology.* 2002 ; 148 : 519-528.
- 7) Roring S, Scott A, Brittain D, et al.: Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 : 2126-2133.
- 8) Le Fleche P, Fabre M, Denoed F, et al.: High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol.* 2002 ; 2 : 37.
- 9) Romano MI, Amadio A, Bigi F, et al.: Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet Microbiol.* 2005 ; 110 : 221-237.
- 10) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖 他: VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル. 動衛研研究報告. 2003 : 25-32.
- 11) Lovett ST: Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. *Mol Microbiol.* 2004 ; 52 : 1243-1253.
- 12) 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 : 3563-3571.
- 13) 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 : 4561-4566.
- 14) Ablordey A, Swings J, Hubans C, et al.: Multilocus variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43 : 1546-1551.

### 3. VNTRの臨床応用とその成果

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立  
呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部 松本 智成, 阿野 裕美

#### はじめに

#### 分子疫学解析の臨床応用

IS6110 RFLPは、発表以来結核菌分子疫学解析に応用され、現在では基準といえる解析法である。IS6110をプローブとした結核菌ゲノムのサザンブロット解析であるが、操作が煩雑であり、施設内、施設外再現性が乏しく、さらに結果判定に時間がかかるという問題点があった<sup>1)~6)</sup>。臨床現場において応用可能な分子疫学解析法は、迅速で、施設内、施設間の再現性があることが求められる。そこでわれわれが臨床応用に着目した結核菌タイピング法は Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 解析である<sup>7)~9)</sup>。この方法を用いた臨床応用として本シンポジウムでは、

- 再発時における内因性再燃，外来性再感染の迅速判断  
*Mycobacterium (M.) tuberculosis, M. avium*
- 喀痰からの直接 VNTR タイピング
- 接触歴がある場合の薬剤耐性結核の迅速検出を解説する。

#### VNTRとは？

結核菌遺伝子内にある多型反復配列領域の幾つかの組み合わせを選び出し、それぞれの領域に何個の反復配列があるかによって結核菌をタイピングする方法であり、

含まれる反復配列数はその菌に特有である。現在、6つの反復配列領域を用いて解析する Exact Tandem Repeats (ETR)-VNTR<sup>8)</sup>と12の反復配列領域を用いる Mycobacterium Interspersed Repetitive Unit (MIRU)-VNTR<sup>9)</sup>が発表されている。このうち、ETRとMIRUは2領域が共通である。海外では12領域で十分な解像度が得られるという報告があるが、われわれの検討では日本、特に、大阪では解像度は12領域では十分ではなく、まだまだ検討の余地があるかもしれないが少なくともETRおよびMIRUの16領域を必要とした<sup>9)</sup>。16領域を用いてVNTR解析を用いると、解像度ではIS6110 RFLPにやや劣るものの遜色はなくなる。また最近では、ETR、MIRU領域に加えてQUB、Mtub領域が発表され<sup>10)</sup>、ETR、MIRU、QUB領域のうちどの反復部位の組み合わせを用いたらより有効にタイピングできるかが今後の課題になっている。

#### 医療への応用における VNTR の利点

- 医療現場においてVNTRが有用な点として、
- PCRサーマルサイクラーと電気泳動装置があり、分子生物学の経験があれば比較的簡単に行える
- 迅速である
- 再現性が高い
- デジタルデータなので施設間の比較、ならびに過去の

データとの対比が行いやすい  
ということが挙げられる。

当院大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターでは2001年から現在まで得られた多剤耐性結核菌株合計207株について ETR および MIRU 領域をあわせた計16領域からなる VNTR 解析を行っている。この多剤耐性結核のタイピング結果より Tandem Repeats の出現範囲は MIRU 24 領域を除き分布されていることより16領域は必要と判断する。

多剤耐性結核菌の VNTR 解析を行うとクラスター形成をしている結核菌群がある。このことより多剤耐性結核は治療の失敗のみならず感染発病していることがわかった。従って、今後は治療の失敗のみならず感染防止にも力をいれなければならない。そのためにも VNTR による多剤耐性結核菌感染発病の監視網の構築が必要である。

#### 臨床現場における有用性

この16領域の VNTR (16VNTR) 解析を用いることにより、分子疫学解析が臨床応用できるようになってきた。16VNTR の臨床応用例としては、

- ①結核再発時の内因性再燃および外来性再感染の迅速検出
- ②薬剤耐性結核菌排菌患者と接触歴がある場合に、当該薬剤耐性菌の発病か否かの迅速検出が挙げられる。

#### 内因性再燃、外来性再感染の判断時の迅速結核菌 VNTR タイピングによる応用例

初回治療時に多剤耐性結核患者と接触歴のある患者が結核再燃した場合に VNTR を適用し、初回治療時の菌の再燃か多剤耐性結核菌の再感染発病かの迅速判断を可能とした。以前行った初回発症時の VNTR データと比較することにより、液体薬剤感受性試験の結果で感受性菌であるという結果が出る前に感受性菌による再燃であると判断できた。

#### 結核菌 VNTR のまとめ

- 多剤耐性結核菌患者と接触歴がある薬剤感受性結核患者が再発排菌した時、VNTR により結核菌をタイピングすると液体感受性試験の結果より早く再燃か再発かを評価することができる。
- VNTR によるタイピング結果は数字なので保存、過去の比較検討が容易である。

#### M. avium 症のタイピング

非結核性抗酸菌感染症の今後の加療の評価に再燃か再感染かの判断は重要であり、分子疫学解析法を駆使して治療成績を検討すべきである。この分野にも VNTR が導入され臨床応用が模索され始めてきた。

#### 臨床現場における非結核性抗酸菌症 (M. avium) への分子疫学解析の応用

非結核性抗酸菌症の加療にも分子疫学解析の結果が応用される可能性があり、そうすべきである。M. avium は、現在リファンピシン、エブトール、クラリスによる加療が推奨されているが、クラリスの感受性が治療成績に影響を与えるといわれているクラリス感受性株であっても排菌陰性化しない場合がある。気管支拡張症等の宿主側の因子も関与するであろうが、菌側の因子も関与するはずである。また、環境菌でもある非結核性抗酸菌症の再発は、必ずしも同じタイプの菌であるとは限らず、いったんは排除できても外来性再感染にて再発する場合もありうる。従って、今後、M. avium 感染症加療時に、正しい治療評価を行うためにはタイピングを行い、

- ①治療成績、再発のしやすさは、M. avium の型と関連があるか
- ②再発は、内因性再燃か外来性再感染か
- ③外来性再感染の場合、感染源は何かを見極めなければならない。

現在用いられている M. avium のタイピング法は、IS901, IS1245, IS1311 を用いた RFLP が知られている。しかしながら結核菌の RFLP 分析でも述べたようにこれら RFLP は解析に時間を要するし、気管支拡張病変に伴う M. avium の場合、重複感染がしばしば報告されており、混合感染の場合 RFLP バンドが重複してしまい判断を見誤る可能性がある。動物衛生研究所の西森敬等が M. avium の VNTR 解析を発表しており<sup>7)</sup>、VNTR を用いることによって M. avium の感染症式が明らかになり治療成績が向上する可能性がある。

残念ながら VNTR 解析ができる抗酸菌は、Mycobacterium tuberculosis と avium のみである。M. avium と同様に MAC に含まれる M. intracellulare も VNTR タイピングすることができない。今後、M. intracellulare を含めて、M. kansasii 等の非結核性抗酸菌の遺伝子配列の決定ならびに、VNTR 解析用のプライマーの開発とその臨床応用が望まれる。

#### M. avium のまとめ

- 肺非結核性抗酸菌症再発時は、必ずしも同じ菌種とは限らない。
- 正しい治療評価をするためにはタイピングを行い再燃か再感染かを見極めるべきである。
- M. avium のタイピングにおいても VNTR は有用である可能性がある。

喀痰からの直接 VNTR タイピング— VNTR の迅速性、再現性、データ検索のしやすさを利用した臨床応用

#### 喀痰結核菌 PCR 陽性検体からの VNTR

患者は当時16歳の男児。父、母、叔母が当院にて結核加療歴あり。父、母が液体感受性試験にてSM耐性、INH判定保留域の結核に感染発病したということが判明している。男児はINH予防内服をせず保健所にて定期的に検診を受けていた。2003年、両肺尖に浸潤影が出現、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターに紹介になった。問題となったのは、少年の結核が両親と同じ菌によって発症しINH耐性であるのかどうかであった。当初、喀痰塗抹陰性が続き、喀痰結核菌PCRも陰性であったが、胃液の結核菌PCRが陽性となった。翌日胃液検体から直接VNTR解析の結果が判明した。その結果、VNTRパターンは父親、母親由来の結核菌株と一致し、家族内感染が明らかとなった。男児は、SM耐性、液体感受性試験にてINH判定保留域の結核感染であろうということで注意深く加療された。約1カ月後、少年からの結核菌の液体感受性試験の結果が判明、父親、母親と同様の感受性の結核菌感染発病であること、ならびにIS6110 RFLPパターンにて両親と同じパターンであることが明らかになった。

VNTRは結核菌PCR陽性検体から直接に解析でき、解析を16多型反復領域に増やして解析を行うことによりIS6110 RFLPと解像度がほぼ等しくなった。接触が明らかならぬ者どうしのタイピングでは12領域のMIRUタイピングで十分かもしれない。既にタイピングしてある多剤耐性結核患者と接触歴がある結核患者が排菌し、結核菌PCRが陽性となった場合、多剤耐性結核菌の発病か否かが数日で判明できる。VNTRの結果は数値データなので、容易にVNTRデータベースを構築することができ、直接結核菌PCR陽性検体を解析することにより結核菌発生をリアルタイムで監視することができる。データベースと発生したVNTRタイプを比較することにより毒性の強い、もしくは感染力の強い結核菌を見いだすことができるであろう。VNTRデータベースと、OligoArray®のような低密度DNA chipにより解析した薬剤耐性遺伝子変異データベースとMICデータベースを組み合わせて構築することにより、将来的には、VNTRと薬剤耐性遺伝子変異情報によりある程度の薬剤感受性を数日で予想することができるであろう。結核感染対策ならびに公衆衛生の道具としてVNTRと薬剤耐性遺伝子変異解析を利用すると、結核菌感染経路をより精細に解析することが可能となる。

#### 喀痰からの直接VNTRのまとめ

- VNTRは喀痰から直接解析により数日で判定可能。
- 正確な結核感染経路解明のため、結核菌のタイピングを全例行うべきである。

- 薬剤耐性結核菌患者と接触歴のある患者が喀痰結核菌PCR陽性もしくは培養陽性になった場合、VNTRにより薬剤耐性結核菌が感染したのか、他の感受性菌が感染したのかの迅速判断に有用である。

#### 分子疫学解析の臨床応用(まとめ)

VNTRを用いることにより *M. tuberculosis* ならびに *M. avium* 再発時における内因性再燃、外来性再感染の迅速判断に有用である。また、明らかな接触歴のある場合、喀痰からの直接VNTRタイピングにより薬剤耐性結核の迅速検出に有用である。今後の診療に分子疫学解析法が積極的に用いられる時代がくることが期待される。

#### 文 献

- 1) van Soolingen D: Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med.* 2001; 249: 1-26.
- 2) van Rie A, Warren R, Richardson M, et al.: Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med.* 1999; 341: 1174-1179.
- 3) Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al.: Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 717-720.
- 4) 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.
- 5) 松本智成: 高齢者結核・非結核性抗酸菌症の現状と問題点, 結核菌の分子疫学, 化学療法の領域. 2005; 21: 185-194.
- 6) Braden CR, Crawford JT, Schable BA: Quality assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping in a large laboratory network. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1210-1215.
- 7) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, 他: VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル. 動物衛生研究所報告書. 2003; 109: 25-32.
- 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 (Pt 5): 1189-1196.
- 9) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000; 36: 762-771.
- 10) Roring S, Scott A, Brittain D, et al.: Development of Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium bovis*: Comparison of Results with Those Obtained by Using Existing Exact Tandem Repeats and Spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2126-2133.

#### 4. 結核対策行政での分子疫学データの活用

神戸市環境保健研究所微生物部 岩本 朋忠  
 神戸市保健所 藤山 理世, 田中 賀子, 河上 靖登  
 兵庫区保健福祉部 白井 千香

##### はじめに

わが国での行政機関における結核菌遺伝子型別解析(分子疫学的解析)の適用は、主として、接触者検診での結核菌伝播の科学的証明を目的として導入されてきた。一方、オランダ、米国などの結核低蔓延国では、国内あるいは地域内での全分離株に遺伝子型別解析を実施し、その結果を患者管理システムに取り入れることで、同一パターンのクラスター解析からの集団感染予測を可能とし、迅速な予防内服や対策を推進している。わが国においても、結核菌分子疫学的解析を個々の事例(集団感染など)に適用するだけではなく、地域で分離した全菌株を対象として実施することで、a)新たな疫学的関連性・感染経路の発見、b)地域、人口集団別に見た流行株などの特定、c)結核対策プログラムの評価などに利用し、結核対策改善のために役立てようとする動きが盛んになりつつある。また、技術面では、PCR法に基づく手法である、Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR)法が開発され<sup>1)2)</sup>、結核菌遺伝子型別解析の迅速化・データ管理の簡素化・データの施設間互換性・広域データベース構築が実現可能となり、分子疫学的解析データの活用は、今後、ますますその可能性を広げてゆくものと期待される。

神戸市では、平成15年度より結核菌地域分子疫学サーベイランスを開始し、市内結核蔓延状況の精査・二次感染源として重視するべきトレンド把握などに利用してきた。また、現在の標準法であるIS6110 RFLP法の抱える問題点を解決する手法として期待されているVNTR法の有用性を確認し、Kobe VNTR Databaseを構築するとともに、その活用法について検討してきた。

##### グローバルレベルでみた神戸市分離株の特徴

スポリゴタイピングやVNTR法は、解析結果がデジタル表示されるため、データ解析の曖昧さや個人の主観的解釈による解析のばらつきを排除できる。したがって、施設間でのデータ交換が容易となり、世界規模でのデータベースの構築が進んでいる<sup>2)3)</sup>。全世界的結核菌サーベイランスへの道が拓かれたといえる。

われわれは、平成15、16年度の2年間にわたって2医療機関(西神戸医療センター、NHO兵庫中央病院)よ

り収集した、神戸市結核新規登録患者由来株234株を用いて、スポリゴタイピングおよび12-loci MIRU VNTR (12 MIRU)を実施し、結果をグローバルデータベースと比較した。なお、本解析においては、Institut Pasteur de GuadelopeのDr. Solaの協力を得、近々公開予定のSIT-VIT 1 Database (spoligo international typing—MIRU VNTR international typing database)を利用した。得られた結果を以下にまとめる。

〔I〕スポリゴタイピングにより234株中180株(77%)が北京ファミリー株に分類された。近隣アジア諸国、ロシアと同様に、神戸市においても北京株が主要な遺伝子型であることが分かった。神戸市で分離された北京株(180株)を12 MIRU解析により海外分離株と比較したところ、高頻度に検出される2つの特徴的な遺伝子型の存在が明らかとなった。一方は、世界的に蔓延している遺伝子型であり(MIRUプロファイル、223325173533)、180株中34株(19%)がこのMIRUプロファイルを示した。もう一方は、世界的には比較的稀な遺伝子型(MIRUプロファイル、221325173533)であり、24株(13%)がこの遺伝子型に属した。北京株の高蔓延状態にある神戸市の結核であるが、より詳細に検討すると、世界規模で蔓延しているタイプと地域内(神戸市あるいは日本国内)で蔓延しているタイプが共存した状態であるのは、わが国での結核の伝播を考えるうえで興味深い知見といえる。

〔II〕北京株以外の特徴的な株として、大阪株(T3-Osaka株)が神戸においても6株(2.6%)検出されたのは興味深い。結核罹患率の高い大阪湾岸地域での流行株の存在を示唆するものであり、今後、行政の枠組みを越えた広域データベースの構築によりT3-Osaka株などの湾岸地域流行株の存在が明らかになるものと期待される。

〔III〕フィリピンおよびハワイ諸島で高頻度に検出されるManila株が3株検出された。他の神戸市分離株とはMIRUプロファイルが大きく異なっており、フィリピンからの移民あるいはフィリピンへの渡航者による持ち込みの可能性が考えられる。これら3株はIS6110 RFLPパターンも一致していることから、今後、本遺伝子型の拡がりに対しては十分警戒しなければならないものと思われる。

### Kobe VNTR Database 構築

結核菌遺伝子型別解析の迅速化・データ管理の簡素化・解析結果の信頼性の確保・他施設とのデータ互換性を目的として、VNTRデータに基づく結核菌遺伝子型別データベースの構築を検討した。国際的に広く利用されている12 MIRUに基づくVNTR法では、わが国のように北京株が高率に蔓延している地域においてはその分離能が著しく低下することが知られている<sup>4)5)</sup>。神戸市分離株においても同様の結果が得られており (Table 1), VNTRに基づく結核菌遺伝子型別データベースの構築においては、新たに報告された多型性の高いVNTR locusの追加を検討する必要がある。

われわれは、MIRU-VNTRでの分離能向上のために最適なVNTR locusセットを特定するために、180株の北京株を含む234株の神戸市分離株を用いて、27領域のVNTRの多様性を評価した。27領域VNTRの内訳は、12 MIRU loci<sup>2)</sup>, ETR 4 loci (A, B, C, F)<sup>6)</sup>, QUB 8 loci (11a, 11b, 26, 1451, 1895, 3232, 4156c)<sup>7)8)</sup>, その他のVNTR 3 loci (1955, 3820, 4120)<sup>9)</sup>である。12 MIRU

では、MIRU 26が最も高い多型性を示した (多型性指数インデックス PCI=0.571)。一方、MIRU 26よりも高い多型性を示す locusが9領域で認められた。これら9領域を多様性指数の高い順に記述すると次のとおりとなる; VNTR 4120 (PCI=0.918), QUB 3232 (PCI=0.906), VNTR 3820 (PCI=0.860), QUB 11b (PCI=0.831), QUB 11a (PCI=0.794), QUB 26 (PCI=0.780), QUB 4156c (PCI=0.690), QUB 3336 (PCI=0.664), VNTR 1955 (PCI=0.582)。IS6110 RFLPでの結果との比較から、12 MIRUにこれら9領域のVNTRを加えることで、同一クローン株の特定、すなわち、RFLPパターンの完全一致と同等の解像度が得られることが分かった (Table 1)。また、疫学的関連株の見落としを最小限にするために分離能をやや低くした組み合わせとして、12 MIRUに多型性の上位4~9位の6 lociを加えた組み合わせを評価したところ、RFLP類似クラスター (約85%以上の相同性) レベルの解像度が得られることが示された。以上のことから、最も高い分離能を示す組み合わせであるMIRU+VNTR 9 lociによるクラスターを Kobe Clone Sharing Type (KCT), MIRU+VNTR 6 lociによるクラスターを Kobe VNTR Sharing Type (KVT)としてデータベース管理することで、疫学的関連性を強く示唆する (同一クローン由来株の特定) レベルでのクラスター解析 (KCTクラスター) による集団感染推定と、最近の感染による拡がりを疑わせるレベルでのクラスター解析 (KVTクラスター) による結核蔓延状況・感染様式の解明への利用が可能となると判断し、Kobe VNTR Databaseを構築した (Table 2)。

遺伝子型別解析法を分子疫学に適用するに当たっては、同一クローン由来株を他の菌株と区別するのに十分な分離能をもつことに加えて、同一クローン由来株を同一パターンとして検出できる遺伝的安定性をもつことを確認しなければならない<sup>10)~13)</sup>。われわれは、慢性排菌患者8名より継続的に分離した33株および集団感染6

**Table 1** Discriminatory power by different typing methods

Cluster size	No. of patterns discriminated by:			
	MIRU 12-locus	IS6110 RFLP	KVT	KCT
2	19	18	14	10
3	10	5	9	10
4	2	2	2	1
5	4	1	2	0
6	2	0	0	0
7	1	0	0	0
8	0	0	1	0
24	1	0	0	0
34	1	0	0	0
Unique	58	167	150	177
HDI	0.963	0.998	0.996	0.998

**Table 2** Example of Kobe VNTR Database

Patients' information (ID no., address, age, sex)	MIRU	VNTR 1	KVT cluster no.	VNTR 2	KCT cluster no.
	221328173533	864763		989	
	221328173533	973334		866	
	221328173533	973775	6	589	
	221328173533	973775	6	78A	3
	221328173533	973775	6	78A	3
	221328173533	973775	6	78A	3

Order of MIRU loci: 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40

Order of VNTR 1: QUB 11a, QUB 11b, VNTR 1955, QUB 3336, QUB 4052, QUB 4156

Order of VNTR 2: QUB 3232, VNTR 3820, VNTR 4120

The MIRU-VNTR profiles consists of digits (when nine or less repeats were detected at a particular locus) and letters; the letter A represents 10 repeats, the letter B represents 11 repeats, and so on.

事例より分離した18株を用いてKVTとKCTの安定性を評価した。KVTのアリルプロファイルは慢性排菌患者株、集団感染事例株いずれにおいても、初回分離株からのプロファイルの変化は認められなかった。IS6110 RFLPパターンの変化について同様に調べたところ、慢性排菌患者1名からの分離株および集団感染事例1例での分離株において、1バンド付加の変化を認めた。KCTプロファイルはRFLPパターン変化のみられた慢性排菌患者株に加えて別の慢性排菌患者1名の計2名からの分離株において、VNTR 3232領域でタンデムリピートの1リピート増加を認めた。一方、RFLPパターン変化の見られた集団感染事例株では、KCTプロファイルの変化は認められなかった。以上の結果は、KVTとKCTともに、その遺伝的安定性はIS6110 RFLPと同等であることを示しており、感染源調査に適用可能であると考えられる。

#### KOBE VNTR Databaseの活用

結核の分子疫学サーベイランスにより、神戸市では、結核罹患率の高い中央3区（兵庫区、中央区、長田区）および若年層でKVT/KCTクラスター形成率が高くなっており、これらの地域あるいは若年層で感染の拡がりが増えていることが示唆された。また、全体的にみたクラスター形成率もここ数年やや増加傾向を示しており、今後の罹患率減少がより困難な状況に直面しているものと考えられる。VNTR法の迅速性・データ管理の簡便さという特徴を生かした新たなデータ活用法として、神戸市では重点的監視株モニタリングシステムの構築に取り組んでいる。結核対策プログラムの推進上リスクとなりうる患者（ハイリスク・デインジャーリスク集団など）・菌株（多剤耐性結核菌、large cluster形成株、集団感染事例株など）に対して、その出現をVNTR解析およびVNTR Databaseにより常時モニタリングすることで、結核危機管理の体制を整えようとするものである。患者情報を担う保健所、分析機関である研究所、さらに医療機関の連携を深めることで、ハイリスク株の出現を早期にとらえ、対策への初動を早めることを狙いとしている。現在のところ、VNTR Database 充実のためのバックグラウンドデータ（過去の分離株のVNTRデータ）を蓄積しつつ、試験的に運用している段階であるが、監視対象株によるクラスター形成が早期に検出されるなど、その成果は徐々に表れつつある。今後は、患者発生一菌株収集一遺伝子型別データ解析のサイクルをできるかぎり短くして、リアルタイムに近づけた監視体制の整備を目指したい。また、VNTR法のもう一つの利点である、施設間データ互換性の特徴を生かして、より広域的に感染様式の解明を推し進めたいと考えている。

#### ま と め

行政による結核対策での分子疫学データの活用は、単に疫学的な関連が疑われる患者群株の同一性を科学的に証明するという限定的な利用から、地域内でのすべての分離株を対象とした分子疫学データを患者データと統合管理することで、より積極的に結核感染伝播の実態をあぶりだそうとする時代に突入したといえる。遺伝子型別解析手法についても、本稿で示したVNTR法を適用することで、IS6110 RFLPが直面してきた課題（手技が煩雑、労力・時間を要する、大量のデータ管理が困難、他施設とのデータ互換性に乏しい）は解消できるものと思われる。結核菌は空気感染で伝播し、感染から発病までの潜伏期間は幅広く、また、その発病率も10%程度であることから、感染源や感染経路の特定が困難である。結核患者の接触者調査を科学的にサポートする分子疫学の導入は、結核の感染様式について新たな知見を与えるものであり、結核対策プログラムのより一層の向上に寄与するものと期待される。

#### 謝 辞

貴重な菌株をご提供いただいた西神戸医療センター、NHO兵庫中央病院、NHO近畿中央病院に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, et al.: High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 1901-1906.
- 2) 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: 3563-3571.
- 3) Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. 2006; 6: 23.
- 4) Kam KM, Yip CW, Tse LW, et al.: Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates of the Beijing family. J Clin Microbiol. 2005; 43: 306-313.
- 5) Kremer K, Au BK, Yip PC, et al.: Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. J Clin Microbiol. 2005; 43: 314-320.



- 6) 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.
- 7) Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, et al.: Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*. 2002 ; 148 : 519–528.
- 8) Roring S, Scott A, Brittain D, et al.: Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol*. 2002 ; 40 : 2126–2133.
- 9) Smittipat N, Billamas P, Palittapongpim M, et al.: Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2005 ; 43 : 5034–5043.
- 10) Cave MD, Eisenach KD, Templeton G, et al.: Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1994 ; 32 : 262–266.
- 11) Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S: Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol*. 1999 ; 37 : 3078 ; author reply 3078–3079.
- 12) Niemann S, Rusch-Gerdes S, Richter E, et al.: Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains in actual chains of transmission. *J Clin Microbiol*. 2000 ; 38 : 2563–2567.
- 13) 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 : 4561–4566.

————— The 81st Annual Meeting Symposium —————

## A NEW ERA OF MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS IN JAPAN

Chairpersons: <sup>1</sup>Tetsuya TAKASHIMA and <sup>2</sup>Tomotada IWAMOTO

**Abstract** Molecular epidemiology of tuberculosis (TB) is a science to study TB transmission dynamics and to enhance our understanding of the epidemiology of TB by utilizing molecular typing methods as an adjunct to classical epidemiological approach. Before the era of molecular epidemiology, it was quite difficult to ascertain the source of the infections since *M. tuberculosis* is spread by air-borne droplets of respiratory secretions expelled by an infectious person to a susceptible host and it can remain latent as an asymptomatic infection for years. Now a day, our understanding of TB transmission dynamics has been refined by genotyping of *M. tuberculosis* strains.

The methods of molecular epidemiology, especially IS6110 RFLP of *M. tuberculosis*, were first introduced to outbreak investigations and then gradually been expanded its application to population-based study in Japan. IS6110 RFLP is obviously a powerful tool for strain differentiation of *M. tuberculosis* but its labor-intensiveness limits the achievable throughput and makes it less useful for long-term prospective studies. Recently, apart from IS6110 RFLP, DNA amplification-based method, i.e., variable number of tandem repeats (VNTR) has appeared as a substitute for or adjunct to the IS6110 RFLP.

In this symposium, we have invited four opinion leaders in molecular epidemiology of TB from different fields: Mycobacterium reference center, basic science, clinical practice, and public health practice. We, as the chairpersons of this symposium, hope that this symposium would trigger the

development of molecular epidemiological network of TB in Japan.

1. Achievement and problem of molecular epidemiologic study with IS6110-RFLP analyses of tuberculosis in Okinawa: Shinji MAEDA (Mycobacterium Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

The long-term RFLP analyses of tuberculosis in Okinawa showed that endemic *M. tuberculosis* might be present. This is one of the achievements of our project study. On the other hand, for more effective examination of contact persons, information of molecular epidemiology should be used actively. Therefore because the analysis report needs to be sent back quickly, the PCR-based VNTR method should substitute for the RFLP analysis.

2. Basic knowledge and application of Variable Numbers of Tandem Repeats: Kei NISHIMORI (Department of epidemiology, National Institute of Animal Health)

Genomic loci of Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR loci) in *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium*, the history of analysis of VNTR loci, the hypothetical mechanisms of increase or decrease of number of repeats, the structures of the loci, and the necessity of standardizing the VNTR typing were introduced.

3. Clinical application of VNTR: Tomoshige MATSUMOTO,

and Hiromi ANO (Department of Clinical Research and Development, Osaka Prefectural Hospital Organization Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases)

Tuberculosis genotyping was first introduced to outbreak investigations and population-based studies. The advent of Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) can be applied to clinical fields of not only *Mycobacterium tuberculosis* but also of *Mycobacterium avium*. In Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, clinical application of VNTR was first introduced in Japan to determine whether *Mycobacterium tuberculosis* or *avium* disease was caused by reactivation or reinfection when relapsed. We showed some examples about usefulness of the clinical application of VNTR.

4. Molecular epidemiology of tuberculosis to improve TB prevention and control activities : Tomotada IWAMOTO (Department of microbiology, Kobe Institute of Health), Riyo FUJIYAMA, Noriko TANAKA, Yasuto KAWAKAMI (Kobe City Public Health Center), Chika SHIRAI (Hyogo-ku Health and Welfare Department, Kobe)

*M. tuberculosis* isolates in Kobe have been characterized as:

a) Beijing family strains are highly prevalent (77%), b) two major MIRU profiles in Beijing family were found, one is globally pandemic genotype and the other is locally prevalent strains, c) six strains belonged to T3-Osaka family, and d) Manila family strains made cluster consisting of 3 strains. Kobe VNTR Database which consists of 12-loci MIRU and 9 additional VNTR loci has been developed. The basis for the selection of these supplemental 9 VNTR loci and the application of VNTR database in TB control program were introduced.

**Key words:** Molecular epidemiology of tuberculosis, IS6110 RFLP, VNTR

<sup>1</sup>Osaka Prefectural Hospital Organization Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, <sup>2</sup>Kobe Institute of Health

Correspondence to : Tomotada Iwamoto, Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, 4-6, Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 650-0046 Japan.  
(E-mail : tomotada\_iwamoto@office.city.kobe.jp)