

## 第80回総会ミニシンポジウム

## II. 結核の外來性再感染

座長 土屋 俊晶

キーワード：外來性再感染，内因性再燃，多剤耐性結核，院内感染，肺 *Mycobacterium avium* 感染，分子疫学的解析

シンポジスト：

## 1. 多剤耐性結核の再感染

露口一成（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター  
臨床研究センター）

## 2. 結核の外來性再感染—文献的考察

尾形英雄（結核予防会複十字病院呼吸器内科）

3. 肺 *M. avium* 症における異なる菌株による再感染，重感染

桑原克弘（国立病院機構西新潟中央病院呼吸器科）  
指定発言：結核菌分子疫学解析法を用いた大阪における  
外來性再感染の考察

松本智成（大阪府立呼吸器・アレルギー医療セン  
ター）

一度結核に感染し治癒すると，外來性の新たな結核菌に接しても，感染・発病することはないと一般には考えられてきた。しかし，HIV感染者での外來性の再感染はよく知られた事実である。また，病理学的検索や薬剤耐性パターンの相似性，結核感染の疫学的研究あるいは感染菌の phage typing による鑑別法の導入によって，特別な免疫異常のみられない人々においても，再感染が起きていることが内外で報告され始めている。

特に，近年目覚ましい進歩を続ける RFLP や spoligo-typing などの分子疫学的解析法の導入により，結核菌の同一性が鑑別でき，結核の外來性再感染がかなりの頻度で起きていることが最近実証されてきている。

そこで，このミニシンポジウムでは露口一成先生から，大阪地域の3病院が関係した，結核病棟内での多剤耐性結核菌の院内感染事例など，多剤耐性結核菌による外來

性再感染事例が報告された。

一般に変異株である耐性菌は，感受性菌に比べ毒力が弱いと信じられてきたが，多剤耐性結核菌でもクラスターを形成する割合が42%と高く，毒力が強い Beijing strain 以外の多剤耐性結核菌でも再感染を起こす強毒菌の存在を報告した。また，再発時に多剤耐性化した8例中2例が，RFLP分析で外來性の再感染であることを証明した。

尾形英雄先生は国内外の多くの文献を考察し，結核の外來性再感染の実態を報告した。

宿主側の著しい免疫力の低下がない集団においても，高蔓延国では再感染は多く発生している，低蔓延国では内因性再燃の割合が高くなる傾向を示唆し，低蔓延国入りしてきたわが国では，結核病棟で再感染が起こる危険が高いことを指摘した。

桑原克弘先生は，環境に常在菌として存在する非結核性抗酸菌である *M. avium* 菌における外來性再感染について，IS1245をプローブとしたRFLP分析により検討し，肺 *M. avium* 症において異なる菌株の再感染・重感染が日常的に起きている実態をご報告いただいた。

最後に，指定発言として松本智成先生は，初回治療時と再治療時の菌株の分子疫学的解析を行い，大阪地域での再発患者の約90%が再燃で，諸外国での報告に比べ外來性再感染率が低いと報告した。その理由は，結核行政がうまく機能し，退院後戻った地域には排菌患者がないためと指摘した。併せて，IS6110 RFLPに代わる結核菌のタイピング法である VNTR 解析についても言及していただいた。

本ミニシンポジウムでは，多剤耐性結核菌であったが

ゆえに結核病棟内での再感染が判明した事実をもとに、国内外の文献の考察も含め、宿主側の因子、菌側の因子および結核菌の再曝露程度により、外来性再感染が普遍的に起こり得ることを、分子疫学的解析により実証し

た。低蔓延国に近づいている本邦では、外来性再感染は結核入院病棟を中心に起こるので、これを意識した入院患者・職員への感染防止対策が必要であることを各演者は警告した。

## 1. 多剤耐性結核の再感染

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 露口 一成, 吉田志緒美, 鈴木 克洋  
岡田 全司, 坂谷 光則

### はじめに

わが国の結核医療は、長年にわたってそのほとんどが隔離入院治療という形で行われてきた。しかし、結核病棟が特に他の一般病棟と比べて特別な感染対策が施されていたわけではなく、空気感染防止のための空調管理設備を備えた病室が整備され始めたのもごく近年のことである。結核病室の多くは大部屋であり、感受性結核患者と耐性結核患者が同室となることも多かった。これは、①結核患者が新たに他の結核菌の感染を受ける(再感染)ことは稀である、②耐性結核菌は変異菌であるので毒力は弱い、という漠然とした認識があったからと考えられる。すなわち、感受性結核患者が耐性結核菌の外来性再感染を受けることはまずあり得ないと想定されていたのである。

しかし近年分子疫学の進歩により結核の再感染発病を確実に証明することが可能となり、耐性結核菌による再感染発病が起こり得ることも報告されている。ここでは、われわれが経験した多剤耐性結核菌による再感染発病と考えられる2事例について概説し、今後の結核感染対策のあり方について考えてみたい。

### 事例 1

本事例は多剤耐性結核の院内集団感染事例である。初発患者 A は56歳の男性で、平成12年3月発症の初回多剤耐性結核患者である。発症時の分離結核菌の薬剤感受性検査で isoniazid (INH), rifampicin (RFP) を含む多剤に既に耐性を示しており、近医入院にて化学療法を施行されるも大量排菌持続していた。平成14年6月に他患者とのトラブルのため当院転院となる。

当院転院までの約2年間における患者 A の接触者から後に5名の多剤耐性結核患者が発生し、5名の分離菌株は RFLP 分析により患者 A の菌株と同一であると考えられた。うち3名は特に基礎疾患のない若年女性であった。他の2名は63歳男性と53歳男性であり、基礎疾患として肺気腫、糖尿病を有していた。2名とも全剤感受

性肺結核にて入院加療を受けており、入院中のみ患者 A と接触歴があった。2名とも感受性肺結核治療後に多剤耐性肺結核を発症している。従って感受性結核罹患中に多剤耐性結核菌の再感染を受けたと考えられる。なお、2名とも感受性肺結核罹患時の分離菌は保存されておらず、RFLP 分析は行えなかった。本事例の患者は6名全員 HIV 陰性であった。

### 事例 2

本事例は当院で経験した多剤耐性結核菌による再感染発病事例である。患者 X は特に基礎疾患を有さない28歳男性で、平成13年1月より全剤感受性結核にて当院入院し化学療法を行った。入院中の一時期、多剤耐性肺結核に罹患していた患者 Y と同室であった。順調に排菌陰性化して退院し、化学療法にて治療に至ったが、その後、平成16年6月に再発し、そのときの検出菌の薬剤感受性検査では INH, RFP, ethambutol (EB), streptomycin (SM) を含む多剤に対して耐性を示していた。RFLP 分析を行ったところ、再発時の検出菌は初回治療時の検出菌とはパターンが異なっており、患者 Y の検出菌と同一パターンであった。すなわち、感受性結核治療中に多剤耐性結核菌の再感染を生じて、後に多剤耐性結核による再発を生じたと考えられた。なお、患者 X も HIV 陰性であった。

### 多剤耐性結核菌のクラスター解析

2001年から2004年までに当院で分離した多剤耐性結核菌株115株を対象に、RFLP法、spoligotyping法により解析を行った。RFLP法では48株(42%)が10群のクラスターを形成していた。5株以上からなる大きなクラスターが3群あり、クラスター a (12株)、クラスター b (11株)、クラスター c (7株)とした。事例1の株はクラスター c、事例2の株はクラスター a に属していた。spoligotyping法でクラスター a、クラスター b は Beijing strain と判定されたが、クラスター c は Beijing strain ではなかった。

多剤耐性結核は、一般にはその多くが不十分な治療による耐性の誘導が原因と考えられているので、クラスター形成率は低くなることが予想される。しかし、今回の検討ではクラスター形成率は42%であった。また、大きなクラスターを形成するクラスター a, b, c の株は、広く蔓延する強毒株であることが示唆された。

#### 再発時に多剤耐性を示した結核における再感染の頻度

当院において、いったん結核にて化学療法を行い治癒した後、少なくとも排菌陰性期間が6カ月以上持続した後には多剤耐性結核を発症した例につき、前後の菌株が入手できた8症例に対してRFLP分析を行った。8例中6例は前後の菌株のRFLPパターンが一致し内因性再燃であると考えられたが、残り2例(事例2を含む)はパターンが異なり再感染発病であると考えられた。この2例の再発時の耐性菌はクラスター a (事例2) とクラスター c に属する大クラスター形成株であった。

#### 考 察

近年 RFLP をはじめとする分子疫学的手法の進歩により結核の再感染発病について幅広い検討がなされている。当初は HIV 感染者での報告が相次ぎ、再感染発病の宿主側の危険因子として HIV 感染が注目されたが、その後 HIV 陰性者を含めて様々な状況下での再感染発病事例が報告された。伊藤はこれまでの報告の分析により、かつて考えられていたほど再感染発病は稀なものではなく、宿主側の因子、菌側の因子および曝露程度により普遍的に起こり得ることを指摘している<sup>9)</sup>。

今回の事例1では、2年間に基礎疾患をもたない若年女性3人が発病し、また、2人の中高年男性が再感染を受けて発病している。また、事例2では基礎疾患をもたない HIV 陰性若年男性が再感染を受けて発病している。以上よりこの2事例の菌は強毒菌であったことがうかがわれる。いずれも大きなクラスターを形成する菌であったこともその裏付けとなる。

かつて動物実験でカタラーゼ活性を欠く INH 耐性菌の増殖が感受性菌に比べて劣ることが示されたことから、変異株である耐性菌は感受性菌に比べて毒力が弱いと漠然と信じられてきた。しかし、今回われわれが経験したように、多剤耐性結核菌といえども再感染発病を引き起こす病原性の高い菌も存在する。それでは、病原性を規定するものは何であろうか? Niemann や Narvskaya も HIV 陰性者における多剤耐性結核再感染事例を報告しており<sup>2)3)</sup>、いずれも菌は Beijing strain であった。欧米では、集団感染や再感染発病の原因となる強毒菌として Beijing strain が関与しているとの報告が多い<sup>4)</sup>。しかし、

わが国や中国ではもともと半数以上が Beijing strain である<sup>5)</sup>。一方、事例1の菌は Beijing strain ではなかった。結局、Beijing strain であることも必ずしも決め手とはならず、現時点で菌の病原性を決定するのは困難であると言わざるを得ない。あえて言えば、クラスター解析で大きなクラスターを形成する菌が強毒菌であると言えるかもしれない。

多剤耐性結核の再感染は、結核の感染対策上大きな影響を与える。多剤耐性結核菌による再感染が起こり得、しかもどの菌が再感染し得るか予測することが不可能な以上、すべての排菌陽性耐性結核患者は感受性結核患者と同室に収容すべきではない。さらに、初回耐性結核の可能性も考えると、感受性不明の排菌陽性結核患者は全員陰圧個室収容が望ましい。CDCの結核院内感染防止ガイドラインではこの点を考慮に入れ、薬剤感受性パターンが同一であると判明し有効な化学療法が行われている場合に限り患者同士を同室にしてよいとしている<sup>6)</sup>。わが国の現状では、これを守るのはインフラの面からもコストの面からもきわめて困難である。しかし、結核患者の減少、在院日数の短縮化により結核病棟の稼働率が下がっていく中で、思い切った対策の転換を考慮する必要があるのではないだろうか。多剤耐性結核は、その医療にかかる金銭的・時間的コストの膨大さ、さらに、院内感染が生じたときの社会的なインパクトの大きさなどを考慮に入れると、その発生防止に最善の対策が講じられるべきである。

#### 文 献

- 1) 伊藤邦彦: HIV 陰性者における結核の外來性再感染発病. 結核. 2005; 80: 365-379.
- 2) Niemann S, Richter E, Rüsche-Gerdes S, et al.: Double infection with a resistant and multidrug resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Infect Dis. 2000; 6: 548-551.
- 3) Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E. et al.: Nosocomial outbreak of multidrug resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21: 596-602.
- 4) Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al.: Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis. 2002; 8: 843-849.
- 5) Qian L, Abe C, Lin TP, et al.: rpoB genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from East Asian countries. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1091-1094.
- 6) CDC: Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Facilities. MMWR. 1994; 43, RR-13.

## 2. 結核の外来性再感染—文献的考察

結核予防会複十字病院呼吸器内科 尾形 英雄

### はじめに

1882年コッホの結核菌発見から、まだ間もない1900年代に外来性再感染という概念が提唱された。この時の「再感染発病学説」は、結核初感染による child type (肺門リンパ節結核) が自然治癒して免疫が形成された個体が、青年期に再感染すると adult type (肺尖中心の肺結核) を発病するという考え方だった。1909年 Hamburger と Monti は、ウィーンの小児入院患者にそのころ開発されたツベルクリン反応 (以下、ツ反) 検査をしたところ5歳で52%, 8歳で73.3%, 11歳で94.7%が陽性反応を示した。当時の欧米の医師たちは、このデータからヒトはみな小児期に結核菌の洗礼を受けるものと解釈した。さらに青年期になって肺結核を発病したときには、初感染巣や肺門リンパ節は石灰化していることが多いので、結核菌の新たな感染によって肺病変が形成されたと考えたのだろう。これに対して1931年小林は海軍入隊者のツ反が50~70%であったことから、青年期でも未感染者が少なくないこと、この未感染者はツ反陽転すると2~4カ月後胸膜炎を起こし、さらに1年以内には肺結核や粟粒結核を起こすことを報告した。また、千葉は国鉄職員の調査から、1192人のツ反陽転者のうち16%は1年以内に発病したが、以後は年間発病率が1%と急速に低下し、さらに5年以後は0.1%になったことを報告している。日本の特定集団における長期間の観察研究は、初感染時の肺門リンパ節結核や胸膜炎発病が、その後の二次結核症の発病に密接に結びつくことを立証した。日本だけでなく北欧の研究者もこうした初感染発病説 (一次結核症を起こした菌が二次結核症を起こす) を支持して、小児期に初感染が起こるとした旧説の「外来性再感染」は否定された。しかし、結核症が麻疹のように一度感染すれば強い免疫が形成され再感染が起こらな

い疾患なのか、こうした研究だけでは不明であった。その後、欧米中心に外来性再感染を実証する研究は数多く行われてきた。こうした研究を検査ツール別に分けると①ツ反、②薬剤感受性試験、③ strain typing、の3種類になるので、以下ツールごとに文献的考察を行う。

### ツベルクリン反応 (疫学調査)

ツ反を使った疫学調査が盛んだったのは、主に結核が高蔓延状態でまだBCG接種・化学療法のない時代である。Badgerは就労後の結核感染リスクの高い看護学生を対象に就労前にツ反陽性発病なし群とツ反陰性者群とに分けて就労後15年間の prospective studyを行った。ツ反既陽性者群からの発病率は8.3%で、陰性者群からの発病11%と比べて有意差がなくツ反陽性者にも外来性再感染が起こるためとした。日本では小池らが結核発病者の配偶者を対象に結婚前のツ反成績を調査して、既陽性者では1.8%の発病率だったが、陰性者では8.9%と有意に発病率が高く、既感染者への再感染発病は稀であるとした。前にも述べた千葉らの鉄道員を対象とした prospective study では、就労前のツ反陽性群のその後の発病率は0.25%、陰性群では21.7%と圧倒的な差が見られた。これも既感染者には外来性再感染は稀としている。しかし、こうした研究ではツ反陽性者からの発病に内因性再燃が混ざるため、外来性再感染が臨床的にどの程度含まれるか知ることができない。そこで、Steadは化学療法登場前にOslo, London, Copenhagenで実施された医学生・看護学生を対象とした3つの報告をまとめてTable 1のような結果を報告した。就労前のツ反陽性者・陰性者をさらにその後の結核感染曝露高リスク群と低リスク群に分けて調査を行った。ここで就労前ツ反陽性で結核曝露低リスク群が内因性再燃の頻度を表すことになる。Steadはツ反陽性者の高曝露群がツ反陽性低曝

**Table 1** Relationship of exposure to development of clinical tuberculosis according to antecedent tuberculin status (rate/1000 persons-years)

TB exposure Tuberculin	Heavily exposed		Not particularly exposed	
	Negative	Positive	Negative	Positive
Heinbeck (Oslo)	141	12.4	10.6	6.1
Prophit (London)	25.1	8.0	4.1	3.3
Madsen (Copenhagen)	40.6	3.7	13.8	2.1
Total	49.4	7.6	10.8	4.3

(Stead, Romeyn)



露群より高いのは病院業務が厳しいためだとしているが、再分析した Romeyn はツ反陽性者に対する外来性再感染の影響としている。しかし、ツ反成績をすべての根拠にする手法は、今からみれば非結核性抗酸菌感染による影響を排除できないため限界がある。

### 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の成績を基に外来性再感染を実証する試みは、感受性試験の開発とともに始まった。化学療法登場前（つまり感受性結核菌）に既感染または発病後自然治癒したヒトが、その後耐性結核を発病した場合、再感染発病者と考えたのである。例えば、1949年 Fortos は、胸部 XP で石灰化病巣のある看護師が SM 開発時の臨床実験に関わって結核を発病したが SM 耐性菌感染だったと報告した。McCoy, 伊藤, 中泉も、看護師が SM や para-aminosalicylic acid (PAS) の耐性結核になったが、ツ反陽性の既往・結核の既往歴・胸部 XP での陳旧性結核病巣などのいずれかに該当したので外来性再感染が起こったと報告している。ついで薬剤感受性試験が普及すると、1954年 Thomas は未治療耐性結核 9 例中 3～4 例が既往歴や胸部 XP から再感染が疑われたと報告した。大里は 200 例の未治療菌陽性結核患者の耐性化率を調査する中で、化学療法登場前に結核の既往歴があるか胸部 XP で結核陳旧性病巣のみられた 74 例中に耐性菌感染が 5 例みられたと報告している。北本は未治療結核患者 67 例中 4 例が耐性で、このうち 2 例は化学療法登場前のツ反陽性が確認されたという。岩崎は 1960 年全国結核療養従事者の結核新発生状況を調査した中で、菌陽性 83 例中 18 例に未治療耐性菌が見つかったこと、そのうち抗結核薬登場前にツ反既陽性だった 4 例は再感染発病だろうという。しかしこうした研究は、既往歴・ツ反陽性・胸部 XP 所見を結核既感染の根拠としているが、その客観的な証拠能力に疑問が残る。

これに対して初回治療時感受性結核だったのに、再発時に初回治療未使用薬に対する耐性菌であった場合、より外来性再感染とする証拠能力は高いと思われる。1980年 Ormerod は 16 歳と 13 歳の兄弟が 71 年、74 年にそれぞれ感受性結核菌に感染し SHP 治療を 2 年間受けて治癒したが、母親が 76 年に RSE+capreomycin (CPM) 耐性結核に罹患したところ、この兄弟が 78 年に RSE+CPM 耐性結核を発病した家族内再感染例を報告している。1981年馬場は、4 人の女性患者が感受性結核で入院したのに、多剤耐性結核菌に再感染した事例を報告している。最初に 69 歳の症例 1 が 73 年 5 月から SHP 治療を受けていたところ、11 月に HRSE, kanamycin (KM), ethionamide (TH), PAS, cycloserine (CS) 耐性菌を多量に排菌した。また 48 歳の症例 2 は 76 年 9 月から HRZE の 6 カ月治療

を終了したが、79 年 1 月に HRSE, KM, TH, PAS, CPM 耐性結核となった。54 歳の症例 3 は 77 年 10 月に HRZE の 6 カ月治療を受けたが 4～5 カ月後に症例 2 と同じパターンの耐性菌を再排菌。51 歳の症例 4 は HRS を 6 カ月で終了して 18 日後に症例 2 と同じパターンの耐性菌を再排菌した。1 例目と 2 例目は CS と CPM 耐性に違いが見られ、2 人の感染源は不明だったという。また症例 2 は症例 3 と、症例 3 は症例 4 と入院中に同室の時期があったのでそれぞれ感染源になったとしている。症例 3 は強皮症でステロイド治療を受けているが、他の 3 症例は特に免疫異常がなかった。こうした結核菌の感受性試験をツールとした再感染の証明方法は、客観性に優れ説得力がある。しかしその証明は再感染が耐性菌である場合に限り、本来ならずと高頻度には起こると思われる感受性菌の再感染については全く不明である。結局この手法では、結核医療全体における外来性再感染のもつ臨床的な意味については何も教えてくれなかった。

### Strain typing

最初に strain typing は、治療前の薬剤感受性試験と再燃時の感受性試験が異なった症例において、菌株の変化をより確実に証明するために使われた。1973年 Raleigh は 54 歳の男性が再治療時に HS 耐性で RE 治療を受けて良くなったが、3 年後に 2 回目の再発時は感受性菌だったので phage type を調べたところ異なる菌株であったという。感受性菌の感染源は同僚と考えられ、その phage type が一致したため再感染と確認された。1995年 Shafer は 40 歳女性が初回 R 耐性であったが、再排菌時に HR 耐性だったので RFLP 分析したところパターンの違う菌株であった。感染源は HIV 陽性の友人夫婦と考えられ、その HR 耐性菌の RFLP パターンと一致したという。Nieman は 24 歳男性が最初 HS 耐性だったが、その後 HRS 耐性になったため spoligotype を調べたところ全く異なるパターンであった。これらはいずれも免疫不全のない症例報告である。

Small は HIV 陽性結核患者で再発のみられた 17 人に対して、初回治療前・治療中・再発後の結核菌の薬剤感受性と RFLP 分析を実施した。6 例は感受性試験・RFLP とも不変、別の 6 例は感受性試験に変化があったが RFLP は不変だったのでこの 12 人はすべて内因性再燃による再発と考えられた。残りの 5 人は感受性結核から多剤耐性結核になっただけでなく RFLP パターンも異なっていた。その後 1 人はクロスコンタミネーションと判断されたので 4 例が外来性再感染と考えられた。近藤らは 1995 年老健施設で起きた入所者 22 人と職員 5 人計 27 人の集団感染事件について、感染源を含め 19 例の RFLP 分析で 18 例が同一パターンであったことを報告している。

Table 2 Studies included in the reviews; recurrences reinfections

Author, publication years	Country	Recurrences		
		Total (a)	With finger-print results (b)	Reinfections (% of b)
Das 1993	Hong Kong	NR	42	5 (12)
Godfrey-Faussent 1993	Kenya	NR	5	1 (20)
Das 1995	India	NR	13	3 (23)
Sahadevan 1995	India	NR	29	9 (31)
Vemon 1999	USA	8	7	0 (0)
van Rie 1999	South Africa	48	16	12 (75)
Caminero 2001	Gran Canaria	11	8	6 (75)
Bandera 2001	Italy	NR	32	5 (16)
Sonnenberg 2001	South Africa	69	39	14 (36)

NR=not reported (Lambert et al.)

さらに近藤らの病院に入院して治療を受けた13例の入所者のうち、感染源を除く12例についてその平均年齢が80.6歳で、発生時におけるわが国の年齢80歳の結核既感染率が約80%と推定されることから大部分は再感染による発病と考察している。こうしたHIV陽性者や高齢者では、結核免疫の明らかな低下がベースにあるので再感染が起こっても不思議はない。結核免疫に明らかな異常のない結核患者に外来性再感染がどの程度起こるかが重要である。

HIV陰性肺結核入院患者にMDRTBの再感染が起きたケースは、Narvskaya, 伊藤, 露口が報告している。Narvskayaは最初感受性結核で入院した3人が、感染源となったHRSE耐性菌排菌者と同じ耐性パターンで同じRFLP・spoligotypeの結核菌で再発したことを報告している。露口の報告した2例の再感染例は糖尿病を合併していたが、その他の免疫異常はない。これらの報告は、多剤耐性結核患者と感受性結核患者を同一病室で治療すれば外来性再感染の可能性のあることを示している。結

局外来性再感染と内因性再燃の比率をみるには、免疫不全のない患者の再発例全例の治療前の菌と再発時の菌のstrain typingを調査する必要がある。この場合再感染のチャンスは、結核の高蔓延国では多く、低蔓延国では少ないので後者は相対的に内因性再感染の割合が高くなることが予想される。日本における外来性再感染の頻度は別の演者から報告されるので、海外での研究報告をTable 2に示した。

#### ま と め

結核が再感染する疾患であることは、古くから多くの文献によって示唆されてきた。しかし外来性再感染の実態は、近年のstrain typingの発達によって初めて明らかとなってきた。外来性再感染は高蔓延国では多く発生し、低蔓延国では内因性再燃の割合が多くなる。低蔓延国に近づいている本邦では、外来性再感染は結核入院病棟を中心に起こるので、これを意識した入院患者・職員への配慮が必要となる。

### 3. 肺 *M. avium* 症における異なる菌株による再感染, 重感染

国立病院機構西新潟中央病院呼吸器科 桑原 克弘

#### はじめに

肺結核では内因性再燃が主で外来性再感染は比較的稀であると考えられている。その理由として低蔓延下によって結核菌による再曝露の頻度が少ないことが一因と考えられる。一方で非結核性抗酸菌, 特にMAC (*M. avium-intracellulare* complex) は環境に常在菌として存在することが知られており, 結核における再感染とは比較にならない頻度で日常的に曝露を受けていることが推測される。実際にMAC症は肺結核後遺症にしばしば続発

し, 同一患者から *M. avium* と *M. intracellulare* といった複数菌種を検出することもあり非結核性抗酸菌症では再感染, 重感染が結核より頻度が高くなる高いと考えられる。

さらにMAC症では同一菌種の異なる菌株による再感染, 重感染を受けている例があることが報告されている。*M. avium* がもつ遺伝子多型マーカーであるIS1245を用いた遺伝子多型解析を行い *M. avium* 症では複数クローンによる重感染や再感染が臨床病態と密接に関連し, 治療の側面からも問題となる可能性があり検討結果を提示する。

### 複数菌種による重感染の検討

2003年に当院で新規に喀痰から抗酸菌を分離した370症例中に複数菌種を同時に検出した症例を10例、2.2%に認めた。結核菌と *M. avium* を同時検出した例が2例、複数菌種の非結核性抗酸菌を検出した例は8例あり *M. avium* と *M. intracellulare* の同時検出例が6例であった。多くの例は一方が優勢であり感染は優勢の菌により成立しているものと考えられた。

### DNA 多型分析法

*M. avium* の菌株の異同を見るために *M. avium* のみがつ遺伝子挿入配列 IS1245 をプローブとしたサザン法で RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 分析を行い同一菌株であるかどうか検討した<sup>1)</sup>。

### 家族内感染例の検討

一般的な居住環境での MAC の曝露の状況を検討するために同一家族内で発生した *M. avium* 症例3家族計9例(姉妹例, 親子例, 夫婦例と同居の未発症の孫3名)由来の *M. avium* 菌株に対し RFLP 分析を行い同一菌株であるかを検討した。検討した3家族9例ともに異なる菌による感染であった。夫婦発症例では同居していた孫である7歳女兒, 8歳女兒, 12歳男児の胃液検査から *M. avium* が培養されたが, 未発症であることが確認されている。Fig. に示すとおり夫婦症例を含めてすべて異なる菌株であることが RFLP 分析で示された。

### *M. avium* 症の臨床病型別 RFLP 分析

非結核性抗酸菌症の診断基準を満たす *M. avium* 症例12例を対象に画像上, 結核類似型, 中葉舌区中心の気管支拡張症型(以下, 中葉舌区型), 結核後遺症に伴う

気管支拡張症型(以下, 結核後遺症型)に分類し RFLP 分析を行った。6例では1年以上の間隔をおいて菌株を採取し経時変化も検討している。

検討症例12例の性別, 年齢, 結核既往歴, 病型, 罹病期間, クローン構成を Table に示した。症例1~3の3例が結核類似型, 症例4~7の4例が中葉舌区型, 症例8~12の5例が結核後遺症型に分類された。

結核類似型では1例が多クローン性感染であったが, 他の2例は同一パターンで単一菌株による感染が推定された。中葉舌区型の4例では症例7を除き3例が多クローン性感染であり, 2/3, 3/6, 4/6と同時, 経時変化とともに多数の菌株が混在していた。結核後遺症型では4例が10年以上と罹病期間が長く単一菌株の長期持続感染例を2例認めたが, 2例が1年間の経過で菌株が交代していた。中葉舌区型を中心に複数菌株による重感染・再感染を起こしている症例が半数に及ぶことが示された。

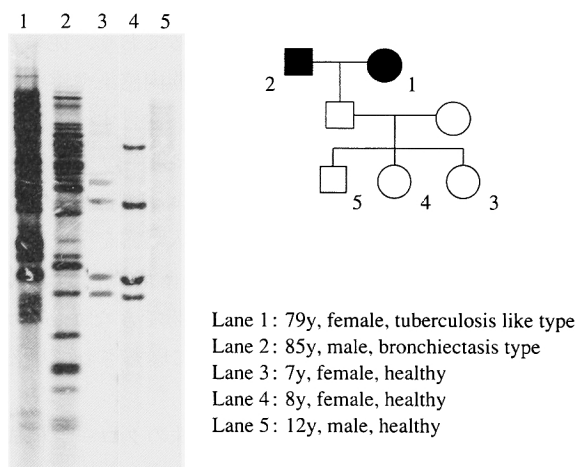


Fig. RFLP patterns of familial cases

Table Clinical features of 12 cases and RFLP patterns of subclones

Case	Sex	Age	Pre-existing tuberculosis	CT pattern	Duration from diagnosis (ys)	RFLP pattern (No. of types /subcultured colonies)
1	F	84	—	cavities	3	2/4
2	F	18	—	cavities	0.5	1/3
3	F	23	—	cavities	1	1/3
4	F	73	—	BE, nodules	15	2/3
5	F	56	—	BE, nodules	3	3/6 (1/3→2/3)*
6	F	79	—	BE, nodules	11	4/6 (3/3→1/3)*
7	F	54	—	BE, nodules	2	1/3
8	F	76	+	BE	22	1/8 (3 points)*
9	M	71	+	BE	10	1/6 (2 points)*
10	M	70	+	BE	19	2/6 (1/3→1/3)*
11	F	77	+	BE	4	1/3
12	F	76	+	BE	11	2/4 (1/3→1/3)*

\*Isolates were collected at different points in clinical course over one year period.

BE: bronchiectasis

## 考 察

結核がヒトからヒトへの伝播のみで主として単クローン性感染であるのに対し、MACではヒトからヒトへの感染はないとされ、その感染様式の詳細はいまだに不明である。感染源としては住環境や土壌、動物、食物などが菌のリザーバーになっていると推測されている。また今回示したように *M. avium* と *M. intracellulare* といった複数の非結核性抗酸菌種を同時検出する例も少なくないことを考えると、再感染や重感染が高頻度で起きていることが考えられる。さらに血清型、薬剤感受性などでMAC症を検討すると一部の症例で同一菌種であっても異なる菌株による多クローン性感染を認めたという報告が散見される。MACでも遺伝学的研究の進歩によりDNA多型を用いて菌株の異同の判定が可能となっており、筆者らは IS1245 を用いて *M. avium* 症の菌株のクローン構成を臨床分離株で検討し報告してきた<sup>2)3)</sup>。

MACによりわれわれが日常的に曝露を受けているという仮説のもとに行った *M. avium* 症の家族内発症例の検討では3家族すべてで菌株が異なっており、従来考えられていたように同一菌株による家族内感染や感染の拡大は一般的でないことが証明された。注目すべき事例として *M. avium* 症の夫婦例の喀痰と未発症の3名の同居小児より得られた培養検体より異なる菌株の *M. avium* が検出されており、未発症者でも吸入曝露を受けていることが証明された。この家族では循環風呂等の特にMACの曝露を受けやすい要因は確認できなかったが、家庭環境によっては日常的にMACに曝露されていることが示された。

また肺MAC症で臨床像と感染菌株のクローン構成との関連の報告は少なく、過去にWallaceらによる肺MAC症を結核類似型と中葉舌区型に分類しPFGE法と血清型を用いた検討のみであった<sup>4)</sup>。結核類似型ではほとんどが単一の遺伝子型であったのに対し、中葉舌区型では88%が2種以上の遺伝子型を示し、中葉舌区型は多クローン性感染が多いとしている。筆者らの検討でも結核類似型と結核後遺症型の両病型では一部の症例のみが多クローン性感染であったのに対し、中葉舌区型では4例中3例が多クローン性感染であった。さらに中葉舌区型では経時的变化も認め同時多クローンによる重感染、反復性の再感染がしばしば認められることが証明さ

れた。この検討では一検体からわずか3～4コロニーの継代であり継代する数を増やして検討すれば多クローン性感染の頻度がさらに上昇する可能性が高く、主として単一クローンによる感染である結核症とは感染様式が全く異なることを示している。

これらの知見からは *M. avium* 症を含むMAC症では結核のような単クローンによる感染、病巣拡大といった病態のみではなく、多クローン性の反復性感染が病態と密接に関わっていることが示唆される。多クローン性感染例では一時的に化学療法で除菌したとしても環境のリザーバーから再感染、再定着を受けるため再燃し、さらに進展してゆく過程が考えられる。これは中葉舌区型の症例が治療で一時的に菌所見が改善されても再燃、再排菌をくり返しゆっくりと増悪する臨床経過と一致する。一方で10年以上に及ぶ長期観察中であっても単クローン感染が持続する例があり、これらの例では薬剤耐性も難治化に関与していると考えられる。このようにMAC症では重感染・再感染といった視点が治療戦略上にも重要となる可能性がある。

## 結 語

MAC症においては多クローンによる重感染、再感染が結核症に比べはるかに頻度が高く、病態と密接に関わっている可能性がありさらなる検討を要すると考えられる。

## 文 献

- 1) Soolingen D, Bauer J, Ritacco V, et al.: IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: Proposal for standardization. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 3051-3054.
- 2) 桑原克弘, 渡辺 靖, 和田光一, 他: 肺 *Mycobacterium avium* 症の家族内発症例に対する IS1245 をプローブとした分子疫学的検討. *結核.* 2004; 79: 519-523.
- 3) 桑原克弘, 渡辺 靖, 和田光一, 他: IS1245 を用いた肺 *Mycobacterium avium* 症の臨床病型と多クローン性感染の関連についての分子疫学的検討. *結核.* 2004; 79: 39-46.
- 4) Wallace RJ, Zhang Y, Brown B, et al.: Polyclonal *Mycobacterium avium* complex infections in patients with nodular bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 1235-1244.

## 指定発言：結核菌分子疫学解析法を用いた大阪における外来性再感染の考察

大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 松本 智成

### 分子疫学解析法を用いた大阪における結核再発の検討

IS6110 RFLPの開発とその応用は、接触者検診、結核行政に様々な影響を与えつつある。その中の一つに結核再発が再燃であるか外来性再感染であるかという問題がある。今まで結核の再発は、内因性再燃が主であると言われてきたが、IS6110 RFLPが導入されたことによって、南アフリカ共和国の結核蔓延地域における結核再発患者の再感染率が75%であるという驚くべき数字が発表され<sup>2)</sup>、引き続きスペインにおける結核菌中蔓延地域での再感染率が44%<sup>3)</sup>、イタリアにおける結核菌低蔓延地域での再発率が16%である<sup>4)</sup>と発表された。

日本における上記データは公表されておらず、これらの報告をうけて当院でも当院当該地区である大阪中東部における検討を行った<sup>5)</sup>。対象は、当院にて加療し再発した患者で、初回治療時と再治療時の結核菌株が得られていて治療歴が明瞭な患者25名の初回治療時と再発治療時の結核菌株のRFLP解析を行った。1996年から2003年1月にかけて、治療記録があり培養陽性になった3685結核患者のうち、67患者に再発が認められた(再発約1.8%)。初回、再発時に培養陽性になったのは21患者であり、その患者由来の結核菌株をIS6110 RFLP解析を

行ってみると、2患者(9.5%, 2名/21名)の初回治療時と、再発治療時の結核菌株IS6110 RFLPバンドパターンが異なっていることが明らかになった(ただしそのうちの1患者においては再発時1コロニーしか菌株が得られておらず、しかも胸部レントゲン上陰影の増悪が認められないことより、なんらかのコンタミネーションの可能性はある)。当院での再発患者の9.5%が再感染であり、これは今までの上記報告に比べ低い値である。

われわれが行った大阪での再発患者の菌株を用いたIS6110 RFLP解析では25名中2名が初回治療時と再治療時にパターンが異なり外来性再感染が疑われたが、他は、パターンが同じでほとんどが再活性化による再発であった。

なぜ、大阪では再発患者の約90%が再燃で、再感染率が低いのかという理由を考察してみると、大阪における行政、保健所の対結核活動が優れているからと考えている。つまり新規排菌結核患者が見つかって加療を受け、もはや感染性がなくなり病院を退院する頃には、保健所が接触者検診を行い該地域の他の排菌結核患者を見つけ入院させるので、患者が加療を受け排菌陰性化し退院する頃には、その地域はもはや活動性結核の人はいない。こうして退院後の患者は他の種類の結核菌の曝露、感染を受けないと考察している(図1：外来性再感染率

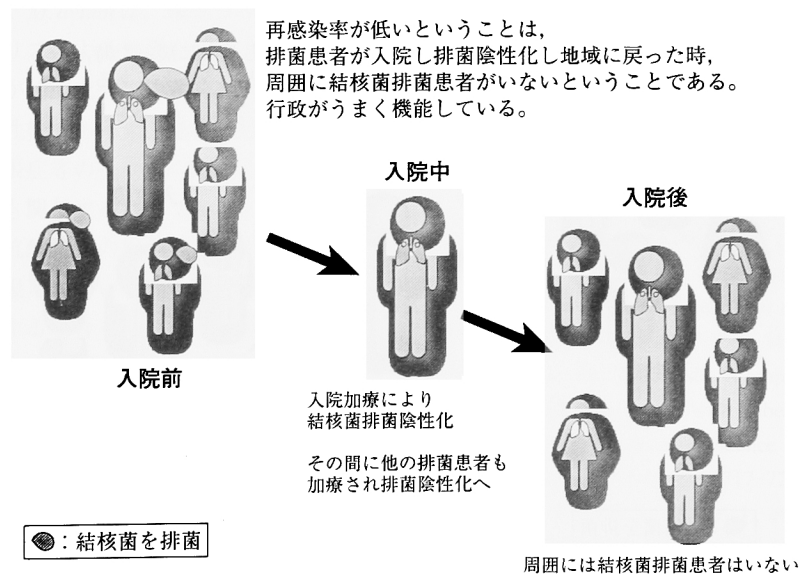


図1 外来性再感染率が低い場合

Fig. 1 What should be thought when a rate of exogenous tuberculosis re-infection is low?

が低い場合)。

逆に言えば再感染率が高いということは、加療により菌が陰性化しても、その周囲には排菌患者がいて結核菌の新たな曝露を受け感染するからである(図2: 外来性再感染率が高い場合)。いったん結核菌感染を受ければ結核に対する免疫がつき、もう二度とかかることはないと考えられていたが、van Rie等の報告によれば抗結核加療が終わるや否や再感染の危険性はあるとのことである<sup>2)</sup>。

再燃率が高い場合、その患者への治療期間、投薬量、ならびに再燃をもたらすような合併症がないかの検討が重要になってくる。分子疫学解析を用いて個々の症例を検討することにより、結核治療の妥当性を検討することができる<sup>5)</sup>。

再感染率が高いということは、排菌患者が入院し排菌陰性化し地域に戻った時、新たな結核菌に曝露を受けたということである。結核行政がうまく機能していないことを示す。再感染の場合、集団感染、高蔓延結核菌の存在も考慮。遺伝的に免疫力が低い可能性も考慮。

逆に再感染率が低いということは、排菌患者が入院し排菌陰性化し地域に戻った時、周囲に結核菌排菌患者がいないということである。このことは結核行政がうまく機能していることを示す。しかしながら加療がうまくいっていない可能性もありDOTSも含めて治療が適当であったかの検討を要す。

#### 臨床現場における結核菌分子疫学解析の応用

IS6110 RFLPは、操作が煩雑であり、施設内、施設外

再現性が乏しいこと、ならびに結果が出るまでに時間がかかるという問題点があった<sup>6)</sup>。臨床現場において応用可能な分子疫学解析法は、迅速であること、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(図3: VNTRの原理)<sup>5)7)9)</sup>。この方法は、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 ETR-VNTR<sup>8)</sup>と12の反復配列領域を用いる 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>5)</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。

この16領域のVNTR (16VNTR) 解析を用いることにより、分子疫学解析の臨床応用が可能になった。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

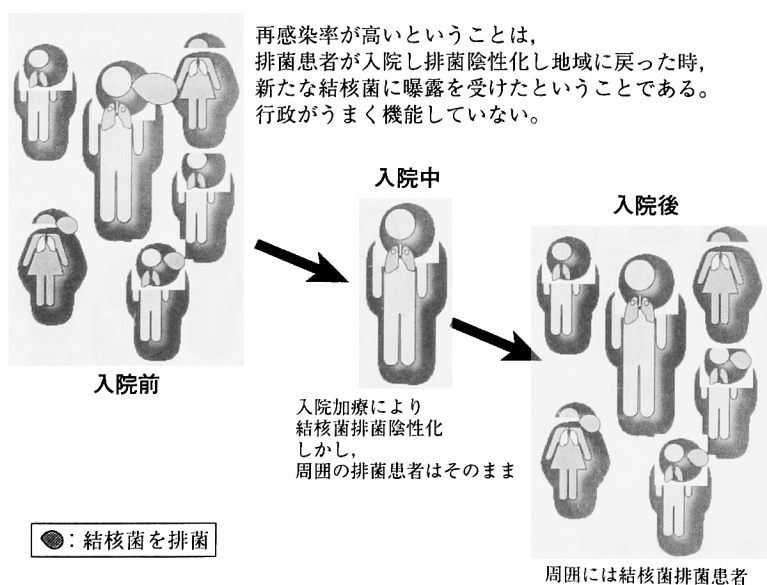


図2 外来性再感染率が高い場合

Fig. 2 What should be thought when a rate of exogenous tuberculosis re-infection is high?

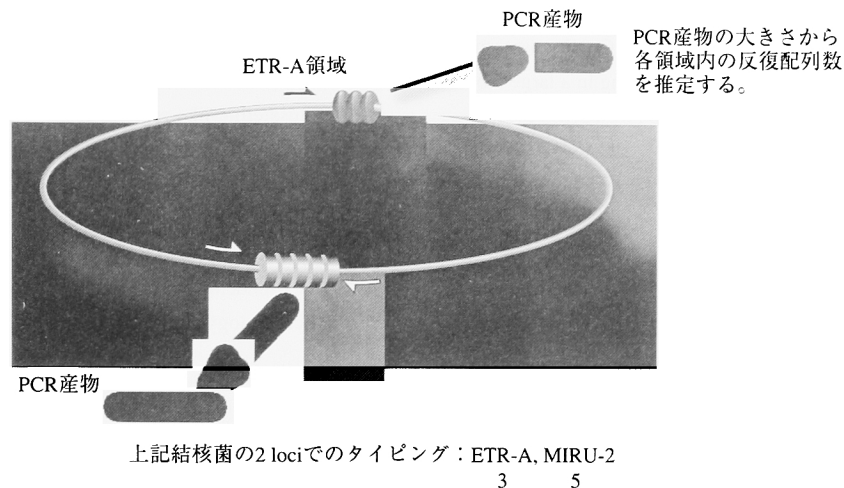


図3 VNTRの原理

多型反復領域が2つの場合MIRU-2, ETR-AのVNTR例。おのおのの領域を増幅するPCR反応を行い、得られたPCR産物の大きさから中にある反復配列数を決定する。おのおの反復配列数はその菌に固有の数である。解析する反復配列数が多いほど解像度が高くなる。

Fig. 3 How *Mycobacterium tuberculosis* is typed by VNTR.

For example, we type *Mycobacterium tuberculosis* by 2 repetitive loci, such as MIRU-2 and ETR-A. The number of each repetitive unit is calculated by the length of PCR products corresponding to each locus. Each number of repetitive units is specific to the bacillus. The more repetitive loci we analyze, the higher resolution the bacillus is typed with.

#### 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。

#### 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得る。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。

*M. avium*のタイピングにもRFLP法が知られているが、結核菌のRFLP解析と同じ問題点を抱える。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ならびにその臨床応用が望まれる。

#### 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; 2月

- 号：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. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002; 40: 2126-2133.

————— The 80th Annual Meeting Mini-Symposium —————

EXOGENOUS RE-INFECTION IN TUBERCULOSIS

Chairperson: Toshiaki TSUCHIYA

**Abstract** Patients infected by tuberculosis (TB) had been thought to never experience exogenous re-infection. However, exogenous re-infection in HIV-positive patients is well known. Thanks to the introduction of histopathological examination, analysis of similarities in drug-resistance patterns and epidemiological surveys of genetic phage typing for TB infection, we have begun to understand that even people with a normal immune system can experience re-infection.

Recent advances in the techniques of restriction fragment length polymorphism (RFLP) and spoligotyping allow determination of similarities in tubercle bacilli, revealing a high ratio of exogenous re-infection.

In this mini-symposium, Dr. Kazunari Tsuyuguchi reported cases of nosocomial multidrug-resistant tuberculosis (MDRTB) infection, as exogenous re-infection, at 3 tuberculosis hospitals in the Osaka area. Although the virulence of MDRTB as a variant strain has generally been regarded as weaker than that of drug-sensitive strains, he reported even non-Beijing strain MDRTB, which displays strong virulence, could possess possible infectivity with a 42% ratio of clustering formation and 2 of 8 patients with MDRTB exhibiting exogenous re-infection, as analyzed by RFLP.

Dr. Hideo Ogata reported the actual condition of exogenous re-infection, having cited a large number of reports at home and abroad. In his report he indicated that even among hosts without serious hypimmunity, re-infection rate is high in high-prevalence countries. Conversely, endogenous TB reactivation is high in low-prevalence countries. As Japan has become a low-prevalence country, endogenous reactivation might be seen in TB wards.

Dr. Katsuhiko Kuwabara reported on his study about exogenous re-infection of *Mycobacterium avium*, which represented resident flora in the environment, using IS1245 RFLP analysis. He demonstrated that re-infection and multiple infections were frequently observed in *M. avium* infection.

Dr. Tomoshige Matsumoto finally added that about 90% of patients with recurrence in the Osaka area exhibit endogenous reactivation, as found using molecular epidemiologic analysis of bacterial strains from initially treated and retreated patients. Compared with reports from other countries, the ratio of exogenous re-infection in Japan is lower than elsewhere. Thanks to the public health service about TB, sources of TB infection are not present, so patients with TB do not experience exogenous re-infection, he concluded. He also discussed the variable number of tandem repeats (VNTR)-typing method that has been taking the place of the IS6110 RFLP.

In this mini-symposium referring to molecular epidemiological analyses and reports from Japan and overseas, we showed that depending on factors involving hosts, parasites and the density of TB re-exposure, the possibility of universal exogenous nosocomial re-infection exists. Each presenter alerted us to the fact that as exogenous re-infection occurs mainly in TB inpatient wards, prevention of TB infection is crucial for inpatients and medical staff in Japan as a low-prevalence country.

1. Exogenous re-infection by multidrug-resistant tuberculosis: Kazunari TSUYUGUCHI, Shiomi YOSHIDA, Katsuhiko SUZUKI, Masaji OKADA, Mitsunori SAKATANI (NHO Kinki-chuo Chest Medical Center)

We describe three recurrent cases of multidrug-resistant (MDR) tuberculosis (TB) nosocomially re-infected with MDRTB strain during treatment for drug-sensitive TB. The first and the second patients, both of whom were middle-aged heavy smoker men, were associated with the outbreak caused by non-Beijing MDRTB strain. The third patient was a immunocompetent young man and the isolated strain was Beijing MDRTB strain. All the patients were HIV-seronegative. We conclude that exogenous re-infection by



MDRTB can occur on various situations. These results underscore the importance of placing MDRTB patients separately from drug-sensitive TB patients.

2. Reviews of the exogenous re-infection in tuberculosis: Hideo OGATA (Fukujuji Hospital, JATA)

In Japan, they have thought that a tubercular relapse is based on endogenous reactivation in almost all cases. However, there are many studies which prove exogenous re-infection using tuberculin test or drug susceptibility test. The technique of developed strain typing contributed exogenous re-infection to clarifying greatly in a real proof and its frequency in recent years.

3. Multiple and repeated polyclonal infections in patients with *Mycobacterium avium* lung diseases: Katsuhiro KUWABARA (NHO Nishi-Niigata Chuo National Hospital)

The routes of transmission and environmental reservoirs of *Mycobacterium avium* infections have been unclear. IS1245 based RFLP analysis showed genetic diversity of *Mycobacterium avium* clinical isolates and the relation between clinical subtype and polyclonal infection. Our study demonstrates that polyclonal infections are common in *Mycobacterium avium* lung diseases, especially nodular bronchiectasis type. In addition, not only simultaneous polyclonal infections but also repeated polyclonal infections were observed in some patients. The knowledge of polyclonal infection will lead to

better understanding of *Mycobacterium avium* pathogenesis and epidemiology.

Special commentaries: Consideration of exogenous re-infection of tuberculosis in Osaka, Japan, by using molecular epidemiologic tools: Tomoshige MATSUMOTO (Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases)

By using IS6110 RFLP, we showed that 9.5% of TB recurrence was caused by re-infection in the middle-eastern area of Osaka Prefecture, Japan. The molecular typing tools are now being applicable not only to epidemiological but also to clinical fields by an introduction of PCR-based method, such as Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) typing. We showed some examples about usefulness of the clinical application of molecular epidemiology, using VNTR.

**Key words:** Exogenous re-infection, Endogenous reactivation, Multidrug-resistant tuberculosis, Nosocomial infection, *Mycobacterium avium* infection, Molecular epidemiology.

Department of Respiratory Center, National Hospital Organization (NHO) Nishi-Niigata Chuo National Hospital

Correspondence to: Toshiaki Tsuchiya, NHO Nishi-Niigata Chuo National Hospital, 1-14-1, Masago, Niigata-shi, Niigata 950-2085 Japan. (E-mail: [tsuchiya@masa.go.jp](mailto:tsuchiya@masa.go.jp))