

第 76 回日本結核病学会総会，宜野
湾市，April 20, 21, 2001.
18) 高橋光良，鹿住祐子，森 亨，平
野和重，深澤 豊，阿部千代治：
コンピューター管理システムと分
子疫学を用いた薬剤耐性結核のモ

ニタリングの検討．第 76 回日本結核
病学会総会，宜野湾市，April 20, 21，
2001.

G. 知的所有権の取得状況
なし

表 1.各施設で結核菌群の鑑別・同定に用いた方法

同定法	施設数
ナイアシン + 他の方法	49
アキュプロープ+他の方法	27
DDH+他の方法	44
核酸増幅法+他の方法	25
培養および生化学的方法	17

表 2.各施設と結研の間の鑑別・同定の食い違い例

各施設	結研	例数
<i>M. tuberculosis</i>	MOTT ^b	32
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> + MOTT	16

表 3.各施設で用いた薬剤感受性試験法

感受性試験法	施設数
普通法	26
マイクロタイター法	29
ウエルパック法	7
上記 2~3 種の組み合わせ	13
その他の方法	3

表 4-1. 普通法を用いた施設と結研の成績の比較, 薬剤別

薬剤($\mu\text{g/ml}$)	一致率 (%)	過大評価率 (%)	過小評価率 (%)
Isoniazid (0.1) ^a	88.6	10.7	0.8
Isoniazid (1.0)	96.3	2.6	1.1
Rifampin (50) ^b	98.6	0.8	0.6
Streptomycin (20) ^c	93.9	3.2	2.9
Ethambutol (2.5)	86.5	13.4	0.2

^a結研の 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の成績との比較, ^b結研の 40 $\mu\text{g/ml}$ の成績との比較

^c結研の 10 $\mu\text{g/ml}$ の成績との比較

表 4-2. マイクロタイター法を用いた施設と結研の成績との比較, 薬剤別

薬剤($\mu\text{g/ml}$)	一致率 (%)	過大評価 (%)	過小評価率 (%)
Isoniazid (0.1) ^a	89.6	9.5	0.9
Isoniazid (1.0)	95.5	3.1	1.4
Rifampin (50) ^b	95.2	4.1	0.7
Streptomycin (20) ^c	91.0	6.1	2.9
Ethambutol (2.5)	83.2	16.4	0.4

^a結研の 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の成績との比較, ^b結研の 40 $\mu\text{g/ml}$ の成績との比較

^c結研の 10 $\mu\text{g/ml}$ の成績との比較

表 4-3. ウェルパック法を用いた施設と結研の成績との比較, 薬剤別

薬剤 ($\mu\text{g/ml}$)	一致率 (%)	過大評価 (%)	過小評価率 (%)
Isoniazid (0.1) ^a	82.4	16.3	1.4
Isoniazid (1.0)	93.2	6.8	0
Rifampin (50) ^b	96.4	2.7	0.9
Streptomycin (20) ^c	91.0	5.0	4.1
Ethambutol (2.5)	75.1	24.0	0.9

^a結研の 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の成績との比較, ^b結研の 40 $\mu\text{g/ml}$ の成績との比較

^c結研の 10 $\mu\text{g/ml}$ の成績との比較

表 5-1. 普通法を用いた施設と結研の成績の比較, 施設別

施設	試験株数	一致率 (%)	過大評価率 (%)	過小評価率 (%)
1	41	97.0	1.2	1.8
2	16	98.6	0	1.4
3	45	95.0	4.4	0.6
4	42	98.2	1.2	0.6
5	46	95.1	0	4.9
6	37	95.3	3.4	1.3
7	12	97.9	0	2.1
8	15	98.3	1.7	0
9	12	95.8	4.2	0
10	24	98.0	1.0	1.0
11	43	75.0	23.8	1.2
12	11	100	0	0
13	69	98.6	0.4	1.0
14	19	95.9	4.1	0
15	84	99.1	0.6	0.3
16	12	83.3	16.7	0
17	23	85.9	14.1	0
18	18	95.8	4.2	0
中央値		95.9	1.2	0.6
最大値		100	23.8	4.9
最小値		75.0	0	0
平均値		94.9	4.0	1.1

表 5-3. ウエルパック法で試験した施設と結研の成績の比較, 施設別

施設	試験株数	一致率 (%)	過大評価率 (%)	過小評価率 (%)
1	12	95.8	4.2	0
2	36	96.4	0.7	2.9
3	34	97.8	0	2.2
4	11	97.7	2.3	0
5	57	75.0	24.1	0.9
中央値		96.4	2.3	0.9
最大値		97.8	24.1	2.9
最小値		75.0	0	0
平均値		88.6	9.9	1.5

表 5-2. マイクロタイター法で試験した施設と結研の成績の比較, 施設別

施設	試験株数	一致率 (%)	過大評価率 (%)	過小評価率 (%)
1	15	90.0	8.3	1.7
2	42	99.4	0	0.6
3	39	95.5	2.6	1.9
4	16	76.6	23.4	0
5	50	95.5	0.5	4.0
6	26	84.6	15.4	0
7	25	95.0	5.0	0
8	41	95.7	3.7	0.6
9	25	91.0	8.0	1.0
10	18	37.5	59.7	2.8
11	38	96.1	3.9	0
12	43	96.5	3.5	0
13	25	95.0	4.0	1.0
14	32	91.4	7.8	0.8
15	47	88.8	11.2	0
16	33	93.2	5.3	1.5
17	15	86.4	10.2	3.4
18	11	95.5	4.5	0
19	31	93.5	5.6	0.9
20	15	88.3	8.3	3.4
21	87	94.0	4.6	1.4
22	17	87.5	7.8	4.7
中央値		93.2	5.3	0.9
最大値		99.4	59.7	4.7
最小値		37.5	0	0
平均値		91.6	7.2	1.2

表 6. 各施設と結研の成績の比較, 試験法別

試験法	施設数	以下の一致率を示した施設数(%)			
		95% <	90-95%	80-90%	< 80%
普通法	18	15 (83.3)	0	2 (11.1)	1 (5.6)
マイクロタイター法	22	9 (40.9)	6 (27.3)	5 (22.7)	2 (9.1)
ウエルパック法	5	4 (80.0)	0	0	1 (20.0)
計	45	28 (62.2)	6 (13.2)	7 (15.6)	4 (8.9)

表 7.各施設と結研の間的一致率

試験法	試験株数	一致率 (%)
各施設 (R)^a		
普通法	61	48.6
マイクロタイター法	88	38.4
ウエルパック法	28	30.6
結研 (R)^a		
普通法	37	79.2
マイクロタイター法	42	80.4
ウエルパック法	11	79.1
各施設 (S)^a		
普通法	560	98.6
マイクロタイター法	603	98.6
ウエルパック法	137	98.4
結研 (S)^a		
普通法	584	94.6
マイクロタイター法	649	91.6
ウエルパック法	154	87.5

^a各施設または結研で耐性 (R)あるいは感受性(S)と診断した例

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

「結核菌の臨床分離株を用いた RFLP 分析に関する研究」

分担研究者 水口康雄 千葉県衛生研究所長
共同研究者 岸田一則 千葉県衛生研究所上席研究員

千葉県下で発生が認められた結核感染事例について薬剤感受性試験と分子遺伝学的解析を行い、その成績が結核患者複数認められた事例のサーベイランスに果たした貢献について報告する。

A. 研究目的

結核菌の型別は、流行状況把握や感染源追求等の疫学調査のために重要であるが、従来使用されてきた薬剤感受性試験成績、ファージ型別では、実施困難であった。近年これらの生物学的性状による型別に代わり、遺伝子を分析する分子疫学的分類が利用されるようになった。なかでも、結核菌特有の挿入配列 IS6110 を指標とした Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析の有用性が多数報告されるようになった。本法を用いて患者から分離された菌株を分析することにより集団感染、再感染の詳細な疫学調査が可能となった。

われわれは千葉県内で発生した結核の複数患者発生例について微量液体希釈法による薬剤感受性試験と RFLP 分析を実施し、知見を蓄積した。

近年結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子の解析が進み迅速診断へ応用されるようになった。なかでもリファンピシン (RFP) 耐性は研究が進み結

核菌の RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコードする遺伝子 (*rpo* β) 上の点突然変異と相関がある¹⁾ ことが報告された。今回、われわれは千葉県内で分離された結核菌 *rpo* β 遺伝子の変異状況を調査し、RFLP 分析、薬剤感受性試験の成績と比較検討して得られた知見について報告する。

B. 研究方法

菌株： 1997 年から 2000 年にかけて千葉県内の結核患者から分離された結核菌 20 株について検査した。

DNA の抽出と精製：工藤 PD 培地に増殖した結核菌をベンジルクロライド法とフェノール/クロロホルム法を併用して抽出、精製した。

IS プローブ： IS6110 由来の 245bp の PCR 産物をオリゴラベリング法によりジゴキシンゲン標識したものをプローブとした。

RFLP パターンの検出： 結核菌 DNA 1 μ g を制限酵素 PvuII で消化後に 0.8% アガロースで 150V, 4 時間電気泳動後、ナイロンメンブレンにトラン

スファアした。UVクロスリンキングによりDNAをメンブレンに固定後ISプローブで65°C一晩ハイブリダイゼーションした。フィルターは洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシングニン Fab フラグメントと10分間反応後に化学発光基質を加えた。RFLPパターンは、暗箱内にメンブレンを設置し、デジタルカメラを使用して検出した。

PCR(polymerase chain reaction)による *rpo*β 遺伝子部位の増幅：TR1 (5´TACGGTCGGCGAGCTGATCC) と TR2 (5´TACGGCGTTTCGATGAACC) をプライマーとして *rpo*β 遺伝子の増幅を行った。結核菌DNA 10ng を FastStart Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics) の手順B (PCR procedure using GC-RICHsolution) に従って調整した。増幅産物は EXOSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製した。塩基配列の決定：精製した増幅産物を TR1、TR2 をシーケンシング用プライマーとして BigDye Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を使用し 96°C10秒、60°C4分を25サイクル反応させるサイクルシーケンス反応を実施した。増幅産物は AutoseqG-50 を使用して精製した。精製した増幅産物を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にセットして塩基配列を解析した。得られた成績は Telenti らの報告¹⁾ (表1にその一部を示す) と比較した。薬剤感受性試験：Broth MIC MTB I

(極東)を使用した微量液体希釈法により Streptomycin (SM), Ethambutol(EB), Kanamycyn (KM), Isoniazid (INH), Rifampicin(RFP), Levofloxacin(LVFX), Sparfloxacin(SPFX), Ciprofloxacin(CPFX)のMICを測定した。SM32μg/ml、EB8.0μg/ml、KM64μg/ml、INH4.0μg/ml、RFP4.0μg/ml、LVFX2.0μg/ml、SPFX1.0μg/ml、CPFX1.0μg/mlに発育が認められた場合耐性と判定し、従来法より高めに設定した。

(倫理面への配慮)

患者、当該施設の実名、所在地は公表しない。

分離された菌株に対する分析であるので、患者への危険性は無い。

実験動物は使用しない。

C. 研究結果

事例1

千葉県下で認められた多剤耐性菌感染事例での臨床分離株のRFLP分析成績と薬剤感受性試験について得られた成績を報告する。

ある精神病院において平成10年10月に55歳男性入院患者Hが結核を発症した。その約8ヶ月後に58歳男性患者M、47歳女性患者Eの発症が認められた。平成12年には2月にI、6月にTの2名の患者が認められた。分離された5菌株について薬剤感受性試験、RFLP分析、*rpo*β 遺伝子の解析を実施した。

	RFLPバンドの付加	RFP耐性	塩基配列の相違点	菌株分離時期
H		+	TTG	H10/10/21
M	+		TCG	H11/06/01
E			TCG	H11/06/10
I		+	TTG	H12/02/22
T	+		TCG	H12/06/12

表 4. 事例 1 由来株の RFLP 成績、RFP 耐性、*rpo*β 遺伝子検査成績

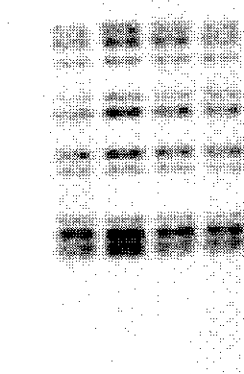
また、疫学的調査状況と RFLP パターンの類似性から同一感染源の存在が疑われ、感染源について初発患者 H が疑われたが、H 由来株は SM、INH、RFP 耐性であるが、その後に発症した

患者由来株から RFP 感受性株が分離されており、患者 H が今回の集団発生の感染源であるかは詳細な検討が必要と考えられる。

	SM	EB	KM	INH	RFP	LVFX	SPFX	CPFX
1	>128	32	4	4	>32	4	2	8
2	>128	4	1	2	32	0.25	0.125	0.25
3	>128	4	1	2	32	0.25	0.125	0.25
4	>128	128	2	>32	>32	0.25	0.125	0.25

表 5. 事例 2 由来株 (1~4) の薬剤感受性試験成績 数値は MIC 値 (μg/ml)

1 2 3 4 5



- 1 : 標準 DNA
- 2 : 患者 1 由来株
- 3 : 患者 2 由来株
- 4 : 患者 3 由来株
- 5 : 患者 4 由来株

由来	塩基配列
患者 1	TTG
患者 2	TTG
患者 3	TTG
患者 4	TTG

表 6. 事例 2 由来株の *rpo*β 遺伝子塩基配列 531 番目のアミノ酸に相当する部位

図 2. 事例 2 由来株の RFLP パターン

事例 2

RFLP パターンが同一であった多剤耐性結核菌の集団感染例由来結核菌について *rpo*β 遺伝子を検査した。

この事例は、昨年度の本報告書で報告した服薬不十分な患者からの感染事例である。RFLP パターン (図 3.) はすべての株が同じであるが薬剤感受性パターン (表 3.) は患者 1, 2, 3 は INH に対し 4~2 μg/ml の MIC 値を示したが、患者 4 は 32 μg/ml を示した。LVFX, SPFX, CPFY に対して患者 1 由来株は他の 3 株より高い MIC 値を示した。調査したところ、患者らは、それぞれ治療開始時期、治療方針等が異なり患者 4 は INH を含めた治療を開始後に分離した株であり、他の患者は多剤耐性菌のため INH 不使用であった。また、患者 1 由来株だけが治療のため LVFX 使用開始後に分離された株であった。*rpo*β 遺伝子の塩基配列を解析したところ 4 株とも共通の配列を有していた。事例 1 の RFP 耐性株と比較したところ全く同一の配列を示し 531 番目のアミノ酸は Leu (TTG) であった。

事例 3

同一市内で同時期に 3 名の結核患者が認められた。3 人は居住地、仕事先が別々であったが、調査したところ唯一の共通点は 3 人ともに市内のサウナ施設 J を利用していた。そこで 3 名の患者由来菌株の RFLP パターンを比較したところ、若干類似性が認めら

れたが異なるパターンを示したため、直接の感染関係は証明できなかった。

また 1 名は他のサウナ施設 O も利用していた。この施設は隣接市で営業するが、施設 J と関連はない。O 施設は 1 昨年に報告した結核患者が複数認められた施設であったため、O 施設利用患者由来株の RFLP パターンと比較したが共通したパターンは認めなかった。

比較的類似した RFLP パターンの菌株が認められたことから、この地域で他の結核患者由来株についても広く調査、検討する必要が認められた。サウナ施設 J、O 利用患者由来株の薬剤感受性を、表に示す。EB、INH の 2 剤耐性株が 1 株認められた。また、INH は従来法では 0.2 μg/ml が耐性判定基準であるが微量液体希釈法で MIC 値が 4 μg/ml を示す株が 1 株認められた。RFP 耐性株は分離されなかった。*rpo*β 遺伝子の塩基配列を解析したところ総ての株が同一の塩基配列で 531 番目のアミノ酸に相当する部位は TCG (Ser) であり他の RFP 感受性株と同様の成績であった。

1 2 3 4

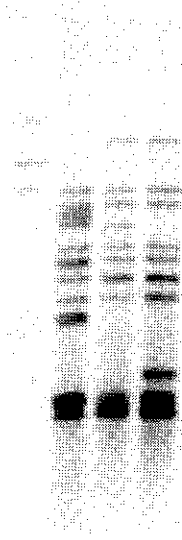


図 3. サウナ施設 J 関連患者由来株の RFLP パターン

1 : マーカー、2 : 患者 1、3 : 患者 2、4 : 患者 3
 相同性の高いパターンを示すが、それぞれ 2 本以上のバンドが異なる。

1 2 3 4 5 6 7 8 9

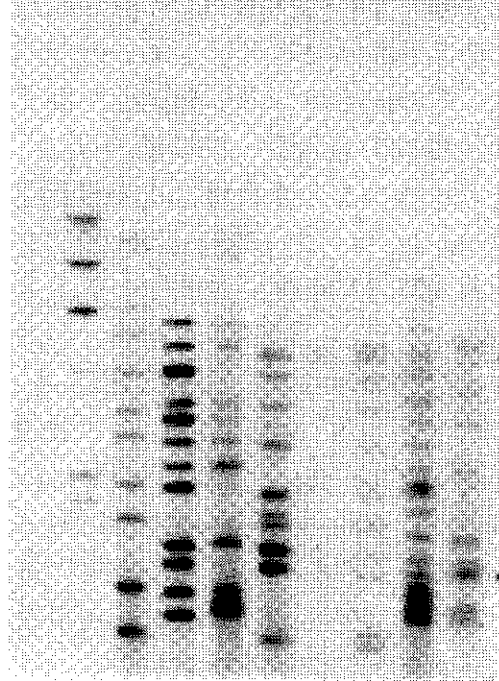


図 4. サウナ施設 O 関連患者由来株の RFLP パターン

1 : マーカー、2 : 患者 1、3 : 患者 2、
 4 : 患者 3、5 : 患者 4、6 : 患者 5、7 :
 患者 6、8 : 患者 7、9 : 患者 8 総ての株が
 異なるパターンを示した

	SM	EB	KM	INH	RFP	LVFX	SPFX	CPFx
患者1	1	0.5	2	0.5	<0.03	0.25	0.125	0.25
患者2	1	1	2	0.5	<0.03	0.25	0.125	0.25
患者3	1	0.5	2	1	<0.03	0.25	0.125	0.25

表 7. サウナ施設 J 関連患者由来株の薬剤感受性試験成績 数値は MIC (μ g/ml)

	SM	EB	KM	INH	RFP	LVFX	SPFX	CPFx
患者1	0.5	0.5	1	0.125	<0.03	0.25	0.125	0.25
患者2	0.5	1	1	0.125	<0.03	0.25	0.125	0.25
患者3	1	1	1	0.125	<0.03	0.25	0.125	0.25
患者4	1	1	2	0.125	<0.03	0.5	0.125	0.5
患者5	0.5	1	2	0.125	<0.03	0.5	0.125	0.5
患者6	0.5	>128	2	>32	<0.03	0.5	0.25	1
患者7	0.5	1	1	0.125	<0.03	0.25	0.06	0.25
患者8	1	1	2	4	<0.03	0.25	0.06	0.25

表 8. サウナ施設 O 関連患者由来株の薬剤感受性試験成績 数値は MIC (μ g/ml)

D. 考察

事例1由来5株は異なるRFLPパターンを示す2つのグループに分かれたが、両者の違いはバンド1本の付加のみで、その他のバンドは相同性が高く、疫学的調査からも同一感染源の存在が疑われた。この5株は、薬剤感受性パターンについて、SM、INH、RFP耐性とSM、INH耐性の2つのグループに分かれたが、RFLPパターンとは関連を認めなかった。*rpoβ*遺伝子を解析したところ、531番目のアミノ酸がSer(TCG)とLeu(TTG)の2つのグループに分かれ、RFP耐性と相関が認められた。SM、INH、RFP耐性株による感染事例2から分離された菌株の*rpoβ*遺伝子を解析したところ、Ser531→Leuと同じ変異が認められた。サウナ施設関連事例はすべてRFP感受性株であったが、*rpoβ*遺伝子を解析したところ、Ser531の変異は認められなかった。鈴木らの報告²⁾では、国内の臨床分離株でRFP感受性株は*rpoβ*遺伝子に変異は検出されず、RFP耐性株の93.6%に点突然変異が検出された。変異部位はSer531、His526、Thr525、His526、Lys527、Ser522、Asp516、Met515、Gln513など報告²⁾されているが、今回検出されたSer531→Leu変異が認められる株は、RFP耐性株の48.9%と高率であった。

E. 結論

千葉県下で分離された結核菌についてRFLP分析を行い、その疫学調査に対する有用性を確認した。しかし、微量液体感受性試験と*rpoβ*遺伝子解

析による成績と比較したところ、RFLP分析と薬剤感受性成績とは直接の関連は認められず、薬剤感受性の傾向を知るには耐性遺伝子の解析が重要と考えられた。

微量液体希釈法による薬剤感受性試験は、1週間で判定可能であり、詳細なMIC値を得られるため疫学的調査に有効であった。しかし、本法では耐性と感受性の中間にいずれにも判定できない判定保留域が存在する。今回検査した菌株でINHが判定保留域のMIC値を示した菌株で従来からの小川培地法で耐性と判定される菌株があり、臨床的な成績判定のためには今後データの蓄積とINH耐性に関与する遺伝子を解析し、比較検討が必要と考えられた。

*rpoβ*遺伝子解析による変異の検出は、RFP耐性と相関が認められ、耐性菌の迅速で高精度な検出に応用が可能である。

以上から、結核感染の疫学調査に従来からの聞き取り等の疫学調査、薬剤感受性試験等の性状検査に、RFLP分析や耐性遺伝子の塩基配列解析等の分子生物学的手法を併用することにより詳細な検討が可能となった。

F.参考文献

- 1) A.Telenti et.al:Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*1993;341:647-650
- 2)Y.Suzuki et.al.:Mutation in *rpoB* Gene of rifampicin Resistant Clinical Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan.感染症誌 1995;69:413-419

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 水口康雄：結核菌におけるゲノム解析とその有用性. 第75回日本結核病学会総会、大阪、2000年4月
- 2) 水口康雄：結核対策における地方衛生研究所の役割. 衛生微生物技術協議会第21回研究会、郡山、2000年7月

2. 誌上発表

- 1) 水口康雄：結核、世界で最も重要な感染症(その1) BMSA 会誌.2000 ; 12 (2) : 6-8
- 2) 水口康雄：結核、世界で最も重要な感染症(その2) BMSA 会誌.2000 ; 12 (3) : 2-5
- 3) 水口康雄：結核、世界で最も重要な感染症(その3) BMSA 会誌.2001 ; 12 (4) : 2-5

H. 知的所有権の取得状況

なし

平成 12 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

分子疫学による薬剤耐性結核菌の解析

分担研究者 高橋光良 財) 結核予防会結核研究所 細菌学科科長

共同研究者 平野和重、和田雅子、阿部千代治 財) 結核予防会結核研究所

【研究要旨】結核菌の DNA fingerprinting は疫学的な感染源追跡、グローバルな伝播のモニタリングおよび進化的要因解析に用いられている。我々は本邦における薬剤耐性結核の現状のモニタリングで伝播の現状を明らかにするために IS6110 DNA fingerprinting およびコンピューター患者管理システムを用いて分析を行った。結核菌株は 1997 年度化学療法研究会で全国より集められた 2144 株のうち薬剤耐性臨床分離 224 株を用いた。その結果、コンピューター患者管理システムは患者情報と結核菌のタイピングを迅速にマッチングすることが可能で、これまでの IS6110 の分析からは薬剤耐性結核菌での伝播は 13 クラスタが確認された。クラスタの大きさは 2 から 3 に多く、最大 11 で総計 47 名 (21.0%) であった。そのうち MDR のクラスタ形成の分布は 10/47 (21.3%) であり、他の抗結核薬での分布で最大なのが SM の 25/47 (53.2%) であった。地区別クラスタ形成率は北海道、関東および関西であった。また、年齢階級別に見ると中高年層と青年層にピークが見られた。さらに、これらの伝播が疫学的に証明されたとするとリスク因子は男性、>60 歳および治療歴なしが高かった。加えて、外国株とのクラスタ解析では今回分離した株との類似性は低かった。現在感染源追跡の疫学調査を行っている。

A. 研究目的

世界的に薬剤耐性結核菌による集団感染や院内感染事例や保健婦への感染例が報告されている。これまでに本邦においても薬剤耐性結核菌による院内感染・家族内感染事例が報告され、耐性菌での感染が懸念されている。近年、結核菌の伝播を科学的に証明する手段として分子疫学的手技が確立

され population を基にした感染源追跡が実施されている^{1,2)}。そこで薬剤耐性結核菌の伝播をモニタリングするために IS6110 DNA fingerprinting 法で日本と東南アジア各国で分離された薬剤耐性結核菌分離株を用いて検討を行った。これらの結果より同一パターンが検出され

た患者間の接触状況について疫学的な検討を加える。

B. 研究方法

1) 日本の臨床分離株は 1997 年度結核療法研究協議会（療研）で分離された結核菌 2144 株のうち薬剤耐性が確認された 244 株を用いた。また結核蔓延国からのモニタリングを比較するために外国株として韓国、インド、インドネシア、ネパール、タイ、イエメン、ポリビア、フィリピン、韓国、モンゴル、マレーシア、ミャンマー株を用いた。

2) DNA の抽出と精製

DNA の抽出と精製は直接小川培地から菌を分取してベンジルクロライド法により調製した³⁾。

3) ビオチン化プローブの精製

プローブとして結核菌 IS6110 由来 245bp の PCR 産物をオリゴラベリング法のビオチン化-dCTP の取込みで標識した。また、 λ HindIII と ϕ 174 HaeIII の内部マーカ―は 4ng/lane を入れて電気泳動後、Digoxigenin-dCTP 標識 λ HindIII と ϕ 174 HaeIII のプローブを用いて分析標準法⁴⁾にて分析した。

4) DNA の検出とクラスター解析

精製結核菌 DNA を制限酵素 PvuII で消化後、電気泳動、ナイロンフィルターへの転写および UV 固定を行った。次いで 65℃でサザンハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、ビオチン化プローブ IS6110 はアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン液を添加後、化学発光物質を加え X 線

ファルム上でバンドを検出した。さらに確認のために 2 回分析を行った。一方、Digoxigenin 標識 DNA は抗-Digoxigenin ペルオキシダーゼ(POD)を用いて Enhanced Chemi-luminescence (ECL; Amersham pharmacia biotech) の化学発光にて検出し、Bio-Image 社の Whole Band Analyzer Ver. 3.2.1 に X 線ファルム上の結核菌のバンドと内部マーカ―である λ HindIII + ϕ X174 HaeIII のバンドを取込みクラスター解析した。

5) コンピューター患者管理システムとクラスター分析

分離された結核菌の IS6110 をプローブとした RFLP 分析パターンと患者個人票からクラスター解析する。患者管理システムは当所で作製指導したコンピューターシステムを用いて分析した。分析はキーワードから個人票番号、検体番号、クラスター番号、地区別、年齢および genotype 別に検索可能にした。RFLP 分析は Bio-image 社の genomic solutions GelPrint AQ で解析後クラスター解析後、X 線ファルム上の結核菌のバンドと内部マーカ―である λ HindIII + ϕ X174 のバンドを取込み、各実験の歪みを最適化後に最近隣法により評価した。

C&D. 結果と考察

結核先進国である欧米では麻薬患者や HIV 患者および結核蔓延国からの移民が持ち込む結核菌に警戒している。特に結核蔓延国である東南アジア-ロシアは MDR-TB の hot spots であるこ

とが報告されており⁵⁾、そこからの移民が持ち込む結核菌の対策のために蔓延国に対して援助菌や対策支援を行い、グローバルに結核を制圧することを年頭に入れている。1991年に結核の感染源追跡の疫学的指標となるIS6110を用いてRFLP分析が可能となり、各国で評価された結果グローバルに解析可能^{6,7)}であることから結核の伝播のモニタリングをコンピューター解析するためのシステムが構築されている⁸⁾。しかし、当初でのこれまでの研究から本邦ではHIV患者および外国人結核は頻度が稀でリスク因子としては低い。これに対し、1940年代の結核蔓延時代の既感染者が高齢なり発病や再燃を散発的に発生して集団発生を引き起こすことが考えられている⁹⁾。そこで日本に適合したカテゴリーを設定して地区を越境する分散型の集団感染や薬剤耐性菌の伝播の現状を解析する手段としてコンピューター患者管理システムを構築し(図.1)、1977年度療研2144株中薬剤耐性を示した244株を用いて国内における伝播の解析をした。その結果、同一のクラスター13群で総計47株が検出された(表.1)。これまでに大きな標本でISコピー数を解析すると1本から19本保有し、ピーク形成が1本と11本に見られた。薬剤耐性株のそれは1本と15本以上で確認された。一方、クラスターの大きさを解析すると2名から3名にピークがあり最大で11名がそれぞれのクラスターを形成し総計47/224(21.0%)であった(表.2)。次

いで抗結核薬に見たクラスター形成の分布を検討した。その結果、INH単剤と2 drugs耐性は何れも5/47(10.6%)で、MDR耐性は10/47(21.3%)であった。興味あることにSM単剤耐性株は25/47(53.2%)と高い割合で存在しており、これはクラスター番号1のSM単剤株が影響していた。特に50-60代の中高年齢層が大きく関与して高齢層が存在しない点および青年層が高頻度に存在していた(表.3)。外国ではモルモットやマウスの動物実験では毒力が弱いが感染力が強いCDC1551株等の存在も報告されており¹⁰⁾、ハイリスクの菌株としてのタイピングとして重要かも知れない。事実、これまでに分析した結核菌のRFLPバンクからのマッチングでは少なからず存在が確認されている(データは示していない)。次いで地区別のクラスター形成率を検討した結果、平均の21.0%を越す地区は北海道地区、関東地区および関西地区であり都市部に多く存在することが判った(表.4)。この傾向は厚生労働省監修の結核の統計と一致していた。さらに、年齢階級別に見た薬剤耐性224株のクラスター形成率を検討すると、60歳以上の高齢層よりむしろ中高年齢層でピークがあり次いで青年層にピークが形成していた(表.5)。疫学的な感染源追跡調査をしないと明確に断言できないとしても、米国の例でP.Small¹¹⁾らが提唱している近年の感染であることは間違いない。加えて、薬剤耐性結核菌のリスク因子を解析すると男

性で 74.5%、>60 歳で 56.9% および治療歴なしの患者で高かった(表.6)。これらのことは薬剤耐性結核菌が青年層に推移していることを示唆するが、今後の疫学調査によりその全貌が明らかになる。さらに、欧米で報告^{11,12)}されている HIV に合併した結核感染は今回のクラスター形成株中には存在しなかった。また、今回比較検討した外国由来結核菌株のクラスターの類似指数は 70%以上相同性を保有するものは存在しなかった。最後に、今回のモニタリングでコンピューター患者管理システムはマッチングの手間を省くには優れており、迅速な解析が可能であった。しかし、実験誤差である泳動距離やゲルのスマイリング補正には限りがあり最終判断は目視による判定が多いために分析機関を限定する必要があると思われる。

E. 結論

コンピューター患者管理システムは患者情報と結核菌のタイピングを迅速にマッチングすることが可能で、これまでの IS6110 の分析からは薬剤耐性結核菌での伝播は 13 クラスターで総計 47 名(21.0%)が確認された。クラスターの大きさは 2 から 3 に多く、最大 11 であった。そのうち MDR のクラスター形成の分布は 10/47(21.3%)であり、他の抗結核薬での分布で最大なのが SM の 25/47(53.2%)であった。地区別クラスター形成率は北海道地区、関東地区および関西地区であった。また、年齢階級別に見ると中高年層と青年層にピークが見られた。さらに、

これらの伝播が疫学的に証明されたとするとリスク因子は男性、>60 歳および治療歴なしが高かった。加えて、外国株とのクラスター解析では今回分離した株との類似性は低かった。現在感染源追跡の疫学調査を行っている。

F. 研究発表

a. 刊行物

- 1.高橋光良.結核菌 DNA の RFLP 分析 .2000.Modern Physician. Vol.20:1154-1156.
- 2.高橋光良.結核の疫学と分子疫学 2000.PharmaMedica. Vol.18:13-17.
- 3.高橋光良.結核菌の RFLP 分析.2000.カレントセラピー. Vol.18:122-126.

b.学会発表

- 1.Mitsuyoshi T, Toru M, Yuko K, Kazue H,Yutaka F, and Chiyoji A. Study of molecular epidemiology in Okinawa prefecture, Japan , with IS6110 DNA fingerprinting and spoligotyping analysis of *Mycobacterium tuberculosis* (1). TRSU Progress reports 2000. Vol.2: 39-48.
- 2.高橋光良、鹿住祐子、森亨、平野和重、深澤豊、阿部千代治.RFLP 解析と spoligotyping 法を用いた結核菌分離株の解析 .2000. 実験結核抄録.Vol.70:36-37.
- 3.深澤豊、鹿住祐子、平野和重、高橋光良、阿部千代治.水道水より分離した非結核性抗酸菌を用いての同定法の

比較.2000.実験結核抄録：40-41.

4.Mitsuyoshi T, Toru M, Yuko K, Kazue H,Yutaka F, and Chiyoji A. Study of molecular epidemiology in Okinawa prefecture, Japan by *IS6110* DNA fingerprinting and spoligotyping analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. US-Japan cooperative medical science program -Thirty-five tuberculosis and leprocy research conference-. 2000. Supplement: 7-13.

5.高橋光良. 結核菌の分子疫学における現状と展望-シンポジウム-. 2000. 結核病抄録. Vol.75：98.

6.高橋光良、鹿住祐子、森亨、平野和重、深澤豊、阿部千代治.RFLP分析を用いた沖縄県における結核の感染・発病に関する研究. 2000. 結核抄録. Vol.75：199.

7.高橋光良、鹿住祐子、平野和重、深澤豊、阿部千代治.Spoligotypingを用いた結核菌の分子疫学の評価. 2000. 結核抄録. Vol.75：200.

8.高橋光良、阿部千代治.沖縄県で分離された結核菌を用いた分子疫学.2000. 日細誌抄録. Vol. 55:176.

9.高橋光良. 結核菌の分離同定と分子疫学-シンポジウム-.2001.感染環境. Vol. 1:30.

G. 知的所有権の取得状況 なし

【文献】

1) Small,PM, M.D., Hopewell, PC,

M.D., Singh, S.P, B.S., Paz, A,M.D., Parsonnet,J, M.D., Ruston, D.C, B.S., Schecter, G.F., M.D., M.P.H., Daley,C.L.,M.D., and Schoolnik, G.K., M.D. 1994. The epidemiology of Tuberculosis in San Francisco – A population-based study using conventional and molecular methods–. N. Engl. J. Med. 330:1703-1709.

2) Chaves, F., Dronda, F., Cave,M.D., Alonso-sanz, M., Gonzalez-Lopez, A., Eisenach, D., Ortega, A., Lopez-cubero, L., Fernandez-Martin, I., Catalan, S., and Bates, J.H. 1997. A longitudinal study of transmission of Tuberculosis in a large prison population. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 155:719-725.

3) Anil K. Jhingan, 1992. A novel Technology for DNA isolation. Methods in Molecular and cellular Biology. 3:15-22.

4) Van Embden, J.D.A., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale,J.W., Eisenach, K.D., Gicquel,B., Hermans, P., Martin, C., McAdam,R., Shinnick, T.M., and Small,P.M.1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : Recommendations for a Standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 31:406-409.

5) Becerra, M.C., Bayona, J., Freeman.,Farmer, P.E. and Kim, J.Y. Redefining MDR-TB transmission