

図1 抗酸菌検査の流れ

おわりに

検査の流れを図1に示した。新結核菌検査指針で重視していることは、検査の精度であり、高い検査精度を保持するために多くの方法を並列することは避け、推奨する方法が記述されている。どのような検査を行うかは担当の医師によりオーダーされる。検査に携わる検査技師のみならず医師や医療関係者にも結核菌検査指針の改定の主旨を理解してもらう必要がある。

参考文献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：新結核菌検査指針。結核予防会，東京，2000。
- 2) 厚生省保健医療局結核・感染症対策室：結核定期外健康診断ガイドラインとその解説。結核予防会，東京，1993。
- 3) Kubica GPW, Dye E, Cohn ML, *et al.*: Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cystein-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 87: 775-779, 1963.
- 4) 阿部千代治, 平野和重, 和田雅子, 他：酸化還元インジケータを用いた抗酸菌迅速培養システム MB-Redox の評価。結核 74: 707-713, 1999。
- 5) 斎藤 肇, 螺良英郎, 山中正彰, 他：MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) の評価に関する10施設での共同研究。臨床と微生物 24: 897-903, 1997。
- 6) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, *et al.*: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 31: 767-770, 1993。
- 7) 非定型抗酸菌症研究協議会：肺非定型抗酸菌症診断基準についての提案。結核 51: 61, 1976。
- 8) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班：非定型抗酸菌症 (肺感染症) の診断基準。結核 60: 51, 1985。
- 9) Catanzaro A, Perry S, Clarridge JE, *et al.*: The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis. *JAMA* 283: 639-645, 2000。
- 10) 日本結核病学会予防・治療合同委員会：核酸増幅法による結核菌検査の臨床での利用について。結核 70: 711-712, 1995。
- 11) 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会：結核菌の薬剤感受性試験，特に試験濃度改変と比率法導入への提案。結核 72: 597-598, 1997。
- 12) Canetti G, Froman S, Grosset J, *et al.*: Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull WHO* 29: 565-578, 1963。
- 13) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：ピラジナミド感受性試験法の提案。結核 75: 561-562, 2000。

シリーズ

結核、世界で最も重要な感染症（その1）

水口 康雄

はじめに

つい2～3年前まで、関係者は別として、結核の問題は既に解決した、という受け取り方が一般的であった。しかし、このところ再び結核が再興感染症として脚光を浴びるようになってきている。

理由はいくつか挙げることが出来る。後に述べるように WHO が 1993 年に結核の「非常事態宣言」を出したこと、結核先進国である欧米諸国で、1980 年代後半から患者の増加が認められ始め、少ない国でも 5% 前後、多い国では 20% を越す増加があったこと、我が国においても 1997 年、98 年と 2 年連続して患者の増加という事態が生じてきたこと、集団発生の報告が目立つようになってきたこと、これらを受けて厚生省は結核の「緊急事態宣言」を昨年 7 月に出して注意を喚起したこと、などである。

一般に再興感染症というと、ロシアにおけるジフテリアのように、一旦患者が激減したものが再び増加して社会問題化するといったイメージが浮かぶが、結核に関しては、話題にならなかった時代においても非常に多くの患者が存在していたわけで、我が国の場合は、単に問題が再認識されたことによるものといって良い。従って再興感染症というカテゴリーに入れるにはいささか抵抗がないわけではない。

一方結核の研究の進歩は著しいものがある。特に分子遺伝学の発展が結核菌研究にもたらした貢献の度合いは非常に大きい。それに加えて、アメリカを始めとしていくつかの国において、結核に関する研究費が大幅に増額されたことにより、多数の有能な学者がこの領域に参加することになったという事実も見逃せない。その結果、例えば微生物関係の学術雑誌に *Mycobacterium* 関係の論文が現れる率は、高い方から 6 番目、5 位の *Streptococcus* とほぼ同じで 6% 近くに達しているという¹⁾。従ってこの領域の進歩について行くだけで、今や大変なエネルギーを必要とする状況になってきている。残念なが

ら日本における研究は一部の研究者を除いてあまり活発とは言えない状態にあり、是非とも新しい意欲のある研究者がこの領域に参加して欲しいものである。それはそれとして、この結核のシリーズでは、結核に関する種々の問題を取り上げるのと同時に、最近の研究の進歩についても紹介を試みてみたいと考えている。

まずは本論に入る前に簡単に結核の歴史を振り返ってみたい。

結核の歴史

結核という病気はおそらく人類が農耕生活を始め、一ヶ所に定住するようになった以前から存在したと推測されている。その存在が確実なものとして認められているのは、エジプトのミイラ (BC 4,000～2,000) で、結核の痕跡が見いだされている。更に Hippocrates の時代には phthisis (衰弱) という言葉や scrofula (るいれき一首の回りにおける結核性のリンパ節の腫脹) という結核を表す言葉が使われるようになっていた²⁾。しかし結核という病気がはっきりとした概念を持って認識されるようになったのはルネッサンス以降であると考えられている。1543 年に書かれた H. Fracastoro の contagion 説には、「結核という病気は直接接触のほか衣類などの媒介物を介しても伝染する」、とあり、この時代には既に結核は感染する疾患として理解されていたことが伺える。

その後、人口の増加と共に患者の数も増加し、西ヨーロッパにおいては 1700 年代から 1800 年代の初期にはピークに達する事になった。アメリカ合衆国ではヨーロッパからの移民が結核を持ち込み、例えば 1800 年のボストンにおける死亡率は人口 10 万人あたり 650 にも達していた³⁾。一方、同じアメリカでもインディアンの結核は極めて悲惨なものであり、北アメリカのある保護区におけるインディアンの結

核による死亡率は、10万人あたり9,000人という驚くべき数字に達したことも知られている⁴⁾。この数字は17世紀のヨーロッパ（ピーク時）のその10倍にも達するもので、これまでに報告された数字のうち、最も高い。条件にもよるが、過去に洗礼を受けたことのない民族に結核が侵入した場合の悲惨さは、想像を絶するものがある。

アメリカやヨーロッパではその後、結核は減少に向かったが、結核の患者が減少に向かったのは化学療法剤やBCGが使用される以前のことであり、労働環境、居住環境や栄養の改善などが大きいものと考えられている。

東ヨーロッパ、アジア、アフリカ、南アメリカなどでは、ヨーロッパに100年ないし200年遅れて患者の増加が見られるようになっている。

我が国においては、明治、大正、昭和の始めまで、結核は常に死亡順位の上位を占め続けてきた。死亡統計を見ると、1899年から1930年までは第3位、1935年から終戦後5年たった1950年（昭和25年）までは死亡順位の第1位を占めている。その後減少に向かい、1951年には2位、54年には4位、59年には7位、72年に10位、となり、96年現在では22位となった⁵⁾。

Pandemie時代の結核は今と異なり、若者の病気であった（下図）。現在の我が国の結核は60才以上

が患者の半数以上を占め、完全に老人の病気と化した感がある。60才以上の人間が人口に占める割合はほぼ22%であるから、その比率は明らかに高い。このように約50年ほどの間に結核は大きく様変わりをしたことになる。若年者に結核が少なくなった理由の一つは、BCGによる感染予防が有効に働いたものと考えることが出来るが、後にも述べるようにBCGによる予防は完全ではない。一方高齢者の結核が増えたのは、かつて高頻度に感染を受けた人々が高齢化し、最近になっても過去の感染による発病が未だに起こっているということの説明されている。

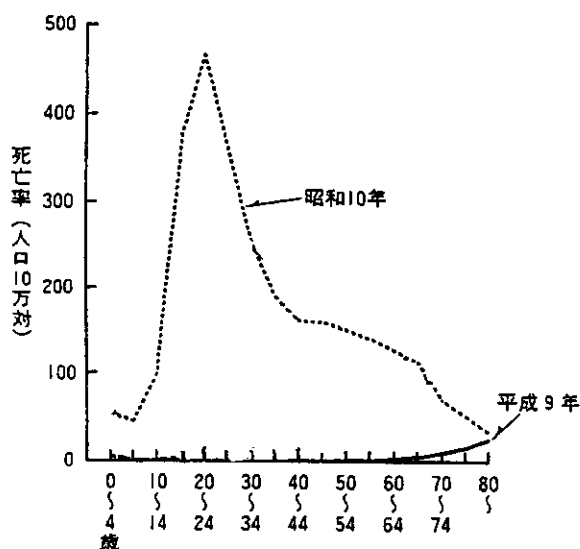
いずれにせよ、かつての結核は患者の数の多さのみではなく、前途有為の人間の生命を奪ってきたという、現在にも増して極めて深刻な問題であった。当時は富国強兵時代とも重なるわけで、結核が亡国病と言われたゆえんである。

若い世代が患者の主流を占めていたということは、必然的に社会で活動をしていた多くの人の中に結核患者が含まれていたことを意味している。結核であった有名人は数多い。思い出すままに何人かの名前を挙げてみても、音楽家ではF. Chopin、S. Foster、滝廉太郎など、画家ではP. Gauguin、A. Modigliani、竹久夢二、医師ではP. Ehrlich、E. Trudeau、T. Laennec、森鷗外、作家や詩人などでは、F. Dostoyevsky、A. Chekhov、R. Stevenson、J. Keats、石川啄木、正岡子規、Charlotte及びEmily Bronte、樋口一葉、など、哲学者、思想家、では、J. Calvin、B. Pascal、J. Rousseau等々である。一方、物語や演劇においても結核がストーリーの背景に存在することはそれほど珍しいことではない。

結核菌の発見

よく知られているように、結核菌がR. Kochによって見いだされ、発表されたのは1882年3月の24日の事である⁶⁾。Kochは更に病原体として断定されるためにはKochの3原則が満たされねばならないことを示し、これらの発表は皆から受け入れられることとなった。その後、Ehrlichは自らの喀痰

年齢階級別の結核死亡率の推移



の中の結核菌を染色によってみだし、Ziehl-Neelsen は抗酸性染色を開発した。なお、北里柴三郎が Koch のもとに留学したのは 1886 年で、当時 Gaffky 号数でよく知られている Gaffky も Koch の所で研究をしていたことが知られている。Koch は 1908 年の 6 月から 8 月にかけて日本を訪問し、大歓迎を受けた。

BCG ワクチン

一方、結核のワクチンである BCG は、Pasteur 研究所の A. Calmette と C. Guérin によって 1921 年に発表された。彼らはウシ型結核菌を 5% グリセリン加牛胆汁培地に 13 年間、230 代にわたる植え継ぎを行った結果、弱毒の菌株を分離することに成功し、これを BCG (Bacille Calmette-Guérin) と名付けた。その後、彼らはこの株を用いて経口投与、あるいは皮下接種等により有効性を確認し、その成果を発表した⁷⁾。

我が国の BCG は、BCG Tokyo 株と呼ばれるが、1925 年に志賀潔博士が Pasteur 研究所から分与を受け持ち帰ったものとされている。BCG は生菌でないとワクチンとしての効果が認められないが、液体培地に培養された菌をワクチンとして使用するには、品質管理の点で問題がある。我が国の研究者達は世界に先駆けて凍結乾燥ワクチンを開発することに成功し、1949 年には全国一斉投与が行われるようになった。

化学療法

S. Waksman によって発見された化学療法剤の streptomycin がはじめて 21 才の女性結核患者に用いられて著効を発揮したのは 1944 年で、ここから新しい時代が始まったことになる。それまでは、安静が唯一無二の療法であり、患者は各地に存在するサナトリウムに入って、自らの免疫機構が結核菌と格闘を行うのを傍観する以外に方法は無かった事になる。やがて isoniazid やその他の化学療法剤がこれに加わり、化学療法全盛時代を迎えることになった。

その後の我が国の結核は、前にも述べたように BCG による予防と化学療法剤による治療によって急速な減少に向かい、現在に至る訳であるが、未だに毎年 4 万人を越える患者の発生、3 千人に近い死亡者を出していることは、ご承知の通りである。

(千葉県衛生研究所所長)

文献

- 1) Galvez, A., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M. and Valdovia, E.: Publication rates reveal trends in microbiological research. *ASM News* 64: 269-275, 1998
- 2) Daniel, T., Bates, J. and Downes, K.: History of Tuberculosis. In *Tuberculosis* (Ed. B. Bloom), p13-24, ASM Press, Washington DC, 1994.
- 3) Grigg, E.R.: The Arcana of Tuberculosis. *Amer. Rev Tuberc. Resp. Dis.* 78:151-172, 1958
- 4) Furguson, R.: *Studies in Tuberculosis*. Univ. Tronto Press. Tronto, 1955.
- 5) 結核の統計 1999 (厚生省保健医療局結核感染症課監修)、結核予防会 (発行)
- 6) Koch, R.: Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner Klin. Wochenschrift.* 15:221-230, 1882
- 7) Calmette, A.: La vaccination préventive à contre la tuberculose par le BCG. *Masson et cie*, 1927

シリーズ

結核、世界で最も重要な感染症（その2）

水口 康雄

前回は結核に関する introduction というので、その歴史を含めて簡単な紹介を行った。今回は、世界および日本の結核の現状について述べ、更に BCG の効果に関しての考察を行ってみたい。なお、結核に対する関心の高まりを反映してか、このところ多数の医学雑誌において結核の特集が組まれているので、そのいくつかについて紹介をしておく¹⁻⁴⁾。興味のある方はご参照頂きたい。

世界の結核の現状

WHO の Snider らの推定によると⁵⁾、世界の人口の約 1/3 が結核菌の感染を受け、1992 年の段階では 1 年間の発病者の数は約 800 万人、死者は 270 万人に達したとされている（表 1）。また 1998 年の

西太平洋、アフリカ地域の発展途上国に圧倒的に多い。勿論これらの地域の人口が多い故もあるが、それだけではなく人口 10 万当たりに換算しても高い率を示している。これらの国では結核対策に十分に力を注ぐだけの余裕や人材が不足していることは言う待たないが、増加傾向は一部の先進国でも認められている。先進国での増加の主な原因は発展途上国からの移民と HIV 感染である。また先進国では感染者の 80% が 50 歳以上であるのに反し、発展途上国の場合、かつての日本のように感染者の大部分は 50 才以下の人間であり、問題は数字以上に深刻である。例えば中国においては、結核患者が 600 万人以上存在しており、そのうち 75% は 15~54 歳であるという⁶⁾。

種々の対策にも関わらずこのように多数の患者が発生し、減少しない理由はいくつか考えられるが、最大の原因はなんと云っても人口の増加であろう。推定によると、この地球上の人口は 1980 年に 45 億であったものが、昨年 1999 年には 60 億に達したと言われている。20 年間で 15 億人の増加であるから、人口 10 万人当たりの結核の罹患率や死亡率に変化がないと仮定すると、それだけで、この間に 30% の増加があってもおかしくないこととなる。この人口増加の殆どは発展途上国のものであり、結果として貧困の拡大、都市への人口の集中とスラム化、低栄養、地域紛争などの原因となっている。世界銀行の推定によると、この地球上では 8 億 4 千万人が栄養不良の状態にあり、毎日 4 万人が栄養失調で死亡しているとの事である。栄養不良で抵抗力を持たない人間の集団生活は、感染症の増加に格好の場所を提供する事になる。

一方、国連の推計によると世界中の難民の数は 1992 年で 1,800 万人、1998 年で 1,150 万人であり、その他に 1,700 万人あるいはそれ以上が自国内で抑圧された状態にあるという。この難民の多くはやは

表 1 世界の結核（1992 年）⁵⁾

地域	発生患者数	死亡者数
南西アジア	3,263,000	1,132,000
西太平洋	1,921,000	672,000
アフリカ	1,182,000	468,000
東地中海	683,000	266,000
アメリカ	584,000	117,000
西ヨーロッパ	197,000	29,000
先進工業国	199,000	14,000
総計	8,029,000	2,708,000

World Health Report によると、1997 年には、これが発病者 820 万人、死者 291 万人、患者総数 1,630 万人になったという。この 5 年間に数字は改善されるどころか逆に増加している事になる。近い将来においても状況の改善はあまり望めず、数字は更に増加するものと予測されている。いずれにしてもこれらの数字は単独の感染症としては最大であり、如何に結核が重要な感染症であるかを物語っている。

また表 1 から明らかなように、患者は南西アジア、

り発展途上国で発生している。

更に結核の蔓延を助長しているものに HIV の流行と耐性菌の増加がある。このうち HIV 感染と結核の合併についてはご承知の通りであるので、省略するが、アフリカがもっとも深刻といわれている。一方、耐性菌の増加も著しい。結核に使用される化学療法剤には first line, second line 合わせて 10 種類以上があるが、そのうち rifampicin と isoniazid が最も強力で、この 2 剤に耐性になると、治療に困難を来すことから、他の薬剤に対する耐性の有無に関わらず多剤耐性菌として取り扱うことになっている。結核菌の耐性は、治療中に生じる耐性突然変異が不十分な服薬により選択されて出現する事から、その頻度を表す際に、primary すなわち耐性菌により感染が起こった場合、と aquired すなわち治療中の耐性獲得（治療の失敗）に分けて考える事が必要になる。この多剤耐性の結核菌の増加が多く、この国で問題となりつつある。特に耐性の頻度が高い国は表 2 に示すように旧ソビエト連邦を形成していた国や東欧諸国である。

表 2 多剤耐性結核の頻度

国（地域）	primary MDR	aquired MDR
Estonia	10.2%	19.2%
Latvia	14.4	54.4
Romania	3.3	14.4
Kazakstan	10.9	33.3
Japap	0.8	19.7

MDR=multidrug resistant

更に深刻なのは刑務所に収容されている囚人で、シベリアの Tomsk 地域の刑務所での統計によると、囚人のほぼ全員が結核の感染を受け、その 10% が発病、患者の 50% は多剤耐性結核と言われている。ロシアには 100 万人を越す囚人が存在するので、毎年釈放される多剤耐性結核患者は 1 万 5 千人を越し、その結果、10 年以内にロシアでは多剤耐性結核菌の感染を受けた者の数が 500 万人に達するのではないかと予想されている⁷⁾。

このような状況の下、WHO が耐性菌のこれ以上の増加を抑制する目的で考え出したのが DOTS (directly observed treatment, short-course) と呼ばれる治療法である。耐性化は不十分な治療や治療の中断によって起こるので、患者が確実に薬剤を服用した事を第三者が確認する事により菌の耐性化を防ぐことを目的として行われるもので、効果をあげつつある。

日本の結核

我が国の結核の現状に関しては、昨年の厚生省の緊急事態宣言以来、マスコミその他でしばしば登場するようになったので結核にそれほど興味を持っていない人達でもご承知であろう。従って簡単に紹介しておく。

1930 年代から 50 年代にかけて猖獗を極めた結核も、表 3 に示すように、戦後の国民生活の安定、

表 3 我が国における結核の推移

年次	登録者総数	新登録患者数	死亡者数
1960	—	489,715	31,957
70	1,072,013	180,833	15,899
80	472,356	70,916	6,439
90	223,863	51,821	3,664
95	168,109	42,958	3,177
96	132,958	42,472	2,858
97	121,762	42,715	2,736
98	113,469	44,016	2,795
99	112,623	48,264	2,935

居住環境の改善、化学療法の発展などにより順調に減少してきた。90 年代の初め頃までは、このままの傾向が続くとすると 2000 年には罹患率を人口 10 万当たり 20 以下にすることも可能ではないかと期待されていたが、だんだんと足踏み状態となり、97 年からは 3 年連続して新登録患者が前年を上回るようになった。死者も 98,99 年と 2 年連続しての増加が認められている。増加に転じた理由は必ずしもはっきりとはしていないが、新登録患者の過半数は 60 歳以上の高齢者であり、高齢者の増加がこの結果を

もたらした事は確かである。言い換えると我が国の結核は基本的には老人問題であるということになる。

そのほか、我が国で見られる結核の特徴をいくつか挙げておくと、地域差が見られること、最も罹患率の低い長野県と高い大阪府の間には人口10万人当たりで17.3と74.9と約4倍の開きがある。更に小さなエリアで比較すると（1保健所当たり）、10以下の保健所が全国で5ヶ所あるのに対し、ずば抜けて高いのは大阪の西成保健所の506であり、50倍以上の差が認められている。結核は社会的・経済的な弱者の病気でもある。

一方、このところ問題にされてきたのが集団発生の多発である。しかし、集団発生が本当に増えてきているのかについては、いささか疑問がある。集団発生の届け出がなされるようになったのは1994年からであり、以後毎年その数を増しているが、おそらく届け出の率が高くなった事を反映していることに過ぎないのではないと思われるためである。そもそも結核の感染は排菌している患者からの菌を吸い込んで起こるものであるから、周囲に人間が密度高く存在すれば必ず集団的に感染が起こるはずであり、この率が近年になって急に増加したとは考えにくい。また、我々の調査によると、一見集団発生にみえるケースで、分離された結核菌のRFLP分析を行ってみると、実は全く関係のないものの集まりであっ

た場合もそれほど珍しくないことが明らかになって来ている。

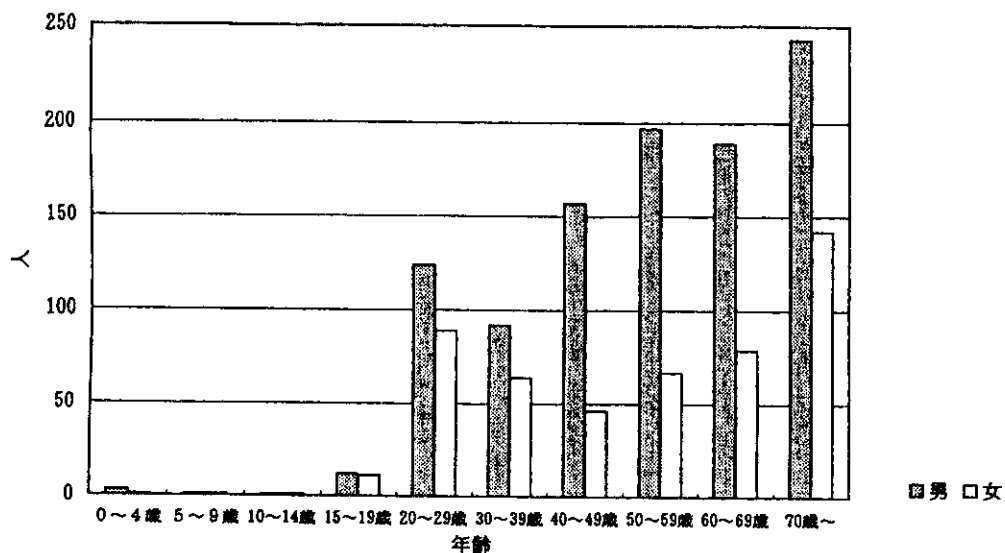
近年、特に憂慮されているのは、20代、特に20代の女性の発病が増えている事である。図1に千葉県における1998年の新登録患者の年齢分布を示すが、20代の女性患者の数は30代はおろか、40代、50代よりも多い。男性の場合も20歳代が30歳代より多く、まるで昔の日本に逆戻りしかけているのではないかとの感じを抱かせるほどである。10～19歳の患者数は極めて少なく、20歳代になって男女とも急速に患者数が増えるが、その理由、特に20代の女性に多発する理由は不明である。無理なダイエットなど栄養の摂取に問題があるのかもしれない。

ところで将来の日本の結核についての予測をしてみたい。筆者はどちらかというとな楽観的である。その理由はかつて高率に感染を受け、現在の患者の多数を占める高齢者は、やがてその数を減らして行くことに間違いはないためである。

BCGの効果について

BCGの効果については、これまで80%程度に有効であったという報告から、全くの無効であったという報告まで、矛盾した結果が出されており、有効だとしても本当のところどの程度に有効かについては不明である。詳しい議論についてはFineの論文

図 1 新登録患者の性・年齢別分布



を参照されたい⁸⁾。

結核菌はその危険度において細菌性の病原体の中では最も高いクラス 3 に属する。しかしながら実際には感染を受けて発病に至る割合は 10% 程度と決して高くはない。この理由は結核という病気の経過に原因がある。多くの急性感染症においては、感染の初期に病原体が爆発的に増え、また場合によっては毒素が産生され発病に至るわけであるが、やがて免疫が成立すると、増殖は抑えられ回復に向かうことになる。一方、結核の場合、感染から発病までに 6 ヶ月から 1~2 年の経過があるのが普通である。感染後、結核に対する防御免疫が成立するのには 4~6 週間で充分であり、この間に生じた細胞免疫により、多くの場合、菌の増殖は抑えられ、発病には至らないことになる。別の言い方をすれば結核の自然感染においても、発病は抗菌免疫が十分に成立しなかったヒトの場合にのみ起こるわけで、BCG が有効であるというためには、この発病率 10% を更にどれだけ低くできるかにかかっていると見える。BCG はそれだけ高い要求を背負されているワクチンである。

BCG を接種されていても発病するケースは希ではない。その例を筆者が居住する千葉県におけるサーベイランス (約 7 年間の合計) から得られたデータとして示したものが表 4 である。20 歳未満の若年者について、結核を発病した患者の BCG 接種歴を調査した結果、その大半は BCG を接種されていた事が判明している。患者の数としては 20 歳未満の若年者は少ないのでこの程度の数で済んでいるが、

表 4 若年結核患者における BCG 接種の有無

年齢	BCG 接種			計
	有り	なし	不明	
0~4	12	18	1	31
5~9	4	2	1	7
10~14	21	0	0	21
15~19	79	12	37	128
計	116	32	39	187

これを 20 歳以上にも拡大して考えればもっと多数の患者が BCG の接種を受けていたことに間違いはない。ちなみに千葉県における BCG の接種率はだいたい 95% あるいはそれ以上である。このことから、表 4 の不明者の多くは BCG を接種されていると推測される。

しかしながら BCG 接種は全く無効であるとは種々の点から考えにくいことも確かである。BCG による免疫が既に成立している場合、感染初期から結核菌の増殖が抑えられるため、極めて短期間に発病するようなケースにおいては有効かもしれない。また大部分の人間にとっては、体内における結核菌の菌数が BCG 非接種の場合に比較して少なくなる結果、潜伏感染へ移行する頻度が低くなる、即ち 40 年から 50 年後に発病する可能性が低くなることも考えられる。いずれにせよ BCG がどのような場合に、どの程度に有効なのかに関しては、はっきりとしていないというのが現状である。

(千葉衛生研究所 所長)

文献

- 1) 緊急事態宣言下の肺結核、臨床と研究 77 (4) 2000
- 2) 抗酸菌感染症、日本臨床 56 (12) 1998
- 3) 結核の現状と院内感染対策、Medical Technology 26 (4) 1998
- 4) 結核、化学療法の領域 14 (4) 1998
- 5) D.E.Snyder et al: Global burden of tuberculosis. In Tuberculosis (ed. B. R. Bloom). pp3~11. ASM Press, Washington DC. 1994
- 6) 趙豊曾、他: 中国における結核の制圧、-DOTS 戦術の実施- 日中医学、15: 10-14, 2000
- 7) New York Academy of Science News Letter, Spring/Summer, 1999
- 8) P.E.F. Fine: BCG vaccination against tuberculosis and leprosy. British Medical Bulletin 44 (3): 691-703, 1988.

結核菌 DNA の RFLP 分析

高橋 光良*
たかはし みつよし

- Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 分析は感染源追跡が可能である。
- 集団や地域社会での感染様式の解析が行える。
- 分析を通じた結核対策の評価が重要である。
- 臨床現場での応用を考える。
- 患者管理としての RFLP 分析とは何か？

Key Words RFLP 分析, 分子疫学, Insertion sequence (IS) 6110, 結核菌群

はじめに

微生物のゲノム内に存在する繰り返し配列をプローブとした RFLP 分析により多くの病原性細菌の亜分類が可能になり、分子疫学と呼ばれる新しい学問に発展した。結核菌は感染の危険性が高くミコール酸を含有する厚い細胞壁に覆われているために、菌からの遺伝子抽出が難しかった。1980年代後半に結核菌ゲノム内にランダムに存在する IS 6110 の転位因子が発見された。この IS 6110 は動物継代、薬剤感受性の変化および培地の継代では変化せず、結核菌ゲノム上で安定な因子であり、菌の亜分類が可能であることから疫学的なマーカーとして有効な手段であることが示された¹⁾。ここでは、RFLP 分析の実際と臨床現場での応用について焦点を絞りたい。

□ RFLP 分析の感染源追跡の実際

結核感染事例は医師の診断の遅れが原因となる場合が多いが、集団検診や専門医療機関での受診がもとで発見されることも珍しくない。図 1 に示した集団発生事例は学校を舞台とした大きな集団発生である。喀痰などの材料から小川培地で分離培養後、同定検査により結核菌と判定された株について RFLP 分析を行った。分析方法は Isoplant (和光純薬) 法により DNA を抽出して制限酵素 *PvuII* で消化し、電気泳動する。さらに、アルカリ処理し、DNA を一本鎖にしてサザンブロッティングしてナイロンフィルターに転写後、UV 照射して DNA をメンブレンに固定する。あらかじめピオ

チン標識した IS 6110 の 246 bp をプローブとしてハイブリダイゼーションさせ、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを加えて化学発光にて検出した²⁾。

感染源追跡の分析を行う場合、地域的に同時期に発生した結核菌分離株を用いて分析することでより明確な判定が行える (図 1)。本症例中ではレーン 1 から 10 は同時期に検出された結核菌の RFLP パターンで疫学的な接触が無かったが、レーン 12 から 13 は家族内感染およびレーン 14 から 15 も家族内感染でレーン 16 の学友へ伝播していた。その後の感染者から検出された結核菌の RFLP パターンは後者のレーン 14 と 15 のパターンと一致していることから感染源として考えられた。しかし、前者の感染源も考えられ、2つの感染源により感染した可能性が示唆された事例であった。このように、各地域ごとのパターンを保存するか同時期に得られた疫学的に接触のない患者由来結核菌をランダムに選択することで感染源の有力な証明となる。

□ 臨床現場での RFLP 分析の応用

臨床の間では治療に重点が置かれ、結核対策の管理については実状の評価は行っていないのが一般的である。しかし、院内感染、外科医の剖検時感染、検査室汚染による判定ミス³⁾、BCG 接種後のリンパ節腫脹から得られた抗酸菌の結核菌と BCG の鑑別および膀胱癌 BCG 免疫療法時の患者より分離された菌の鑑別に有効な手段⁴⁾である。特

* 結核予防会結核研究所 基礎研究部細菌学科

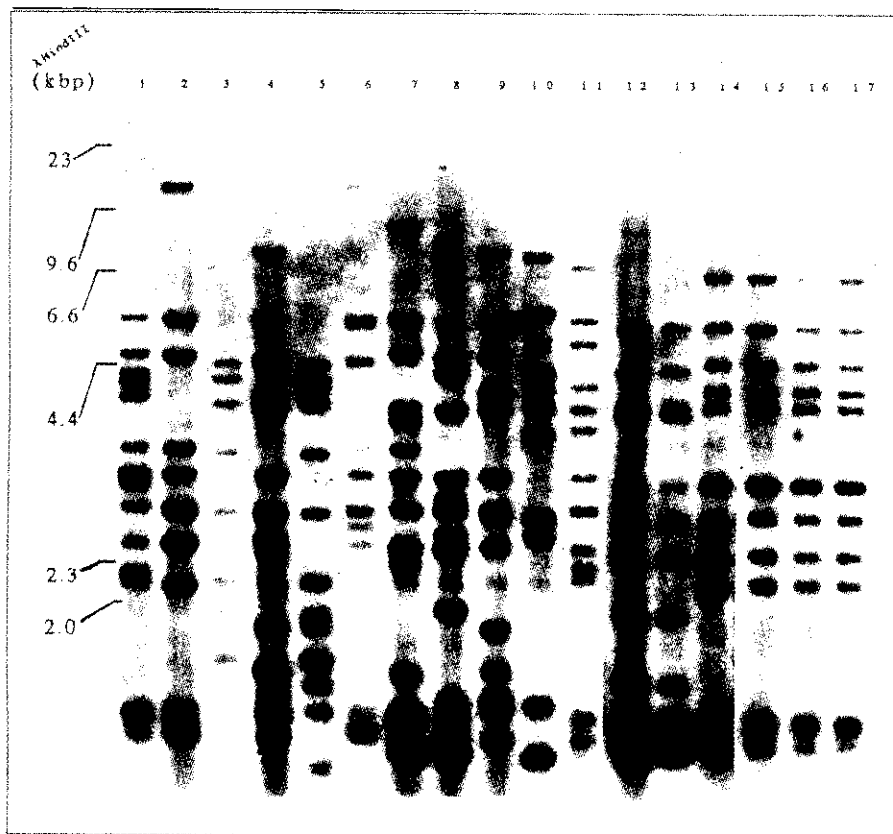


図1 学校内大規模集団発生事例

レーン1～10は同時期に同一地区より分離された疫学的に相関がない結核菌株のRFLPパターンである。レーン12～13および14～15は各家族内感染で父から娘に伝播した事例でレーン14～15の家族のパターンのみが分離株より検出されることから感染源が疑われた事例である。

にBCG日本株は1.9と1.5 kbpに2本のバンドを有することから結核菌や *M. bovis* との鑑別が可能となっている。もし、同一の感染源が検出すれば結核対策として、病室の換気、引圧処置の有無、個室の是非を検討することにより設備改善指針の補助的な道具となろう。

□ 患者管理としてのRFLP分析

活動性結核患者の培養陽性全例のパターンを解析してコンピューターに登録すれば、伝播の様式、再燃・再感染の区別や感染のリスクファクターが解析できる。この目的でオランダや米国⁵⁾では年間登録者の内、培養陽性株のRFLP分析を行いパターンをコード化して患者管理に利用している。その結果、外国の移民による結核伝播が解析されており、結核の対策上の処置がなされている。本邦では大きな標本を用いた分析の結果、1940年代の既感染者が高齢になり結核を発病していることが示唆されている。この傾向は伝統的な疫学研究と同様であることが確認されている。実際に高齢者間でのRFLPパターンは類似性のパターンが多く、外国で評価されているPCRを基本にした迅速な分析法は当てはまらず、IS 6110による分析がもっともよい分別方法である。しかし、1～5本を

示す菌株は二次的なプローブである polymorphic G+C rich sequence (PGRS) または direct repeat (DR) を用いて分析を行うことが望ましい。実際に低コピー数の株は分析によって細分化され、疫学的に有効な場合が多い。将来、RFLP分析をコード化して結核患者管理に利用される日が来るだろう。

文 献

- 1) Hermans P, van Soolingen D, Dale JW, Schuitema ARJ, McAdam RA, Catty D and van Embden JDA: Insertion element IS 986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 28: 2051-2058, 1990
- 2) 高橋光良, 阿部千代治: IS タイピング法: IS 6110 をプローブとしたRFLP分析による結核菌の亜分類. 日細誌 49(5・6): 853-857, 1994
- 3) 伊藤邦彦, 高橋光良, 吉山 崇, 和田雅子, 中園智昭, 尾形英雄, 水谷清二, 杉田博宣: 病院検査室における結核菌培養の Cross-contamination. 結核 74: 777-788, 1999
- 4) Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y,

Hirano K, Mori T, Dale JW, and Abe C : Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol Immunol* 37(4) : 289-294, 1993

5) Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A,

Parsonnet J, Ruston DC, Schecter GF, Daley CL And Schoolnik GK : The epidemiology of tuberculosis in San Francisco—A population-based study using conventional and molecular methods—. *N Engl J Med* 330(24) : 1703-1709, 1994

■ 告知 ■

緑内障ホットライン

電話番号：03-3261-2333

開設日：毎週火・木曜日

開設時間：

午前10時～午後4時

● 緑内障フレンド・ネットワークについて

「緑内障フレンド・ネットワーク」は、緑内障の患者、家族・身内に患者のいる人、活動に賛同する個人、団体、企業により構成されています。代表には、自身も緑内障により90%の視野を失ったことで、これまでも緑内障の知識の普及のために活動を続けてきた柿澤映子が就任し、緑内障の研究と治療に長年たずさわってきた北澤克明・岐阜大学名誉教授が顧問としてサポートしています。また、本ネットワークは、日本眼科医会からも支持を得ています。

運営は、『緑内障ホットライン』のほかにも以下の活動を実施し、将来的には各地に支部を設けて、全国規模の患者組織にしていきたいと考えています。

今後の活動予定

- (1) 社会一般への啓蒙活動として、ホームページの開設、講演会・勉強会の実施。
- (2) 会員同士の親睦とカウンセリングを目的としたイベントや集まり、会報の発行。
- (3) 健康診断項目に眼圧・眼底・視野検査を取り入れるよう、行政への働きかけ。

この件に関するお問い合わせは、下記までお願いいたします。

緑内障フレンド・ネットワーク事務局 担当/野田泰秀
TEL 03-3585-3433 FAX 03-3568-2230
所在地：東京都港区六本木2-2-7 クレール六本木1101

結核の疫学と分子疫学

結核予防会結核研究所基礎研究部細菌学科 高橋 光良

Key words 結核菌, 分子疫学, IS6110, RELP分析

要 旨

多くの感染症は公衆衛生上, 国の法律下で予防法, 医療体制, 地方公共団体の連携, 感染症の予防の施策を定めている。これまでの疫学的調査は疾病の起原菌の分離, ファージタイピング, 血清学的タイピング, 病原性プラスミドの制限酵素切断部位の相違および薬剤感受性試験を用いたタイピングとの総合評価で感染源を特定していた。結核症ではファージタイピングおよび薬剤感受性試験を用いたタイピングで感染源を追跡していたが, 完全な亜分類が不可能であったので妨げられていた。近年, 分子遺伝学の進歩により結核菌のゲノム中にランダムに挿入されたトランスポゾンIS6110が発見され, この遺伝学的に多様性のある表現特性を利用したRestriction fragment length polymorphism (RFLP)分析が開発された。この挿入断片は大腸菌のIS3ファミリーに属し, 1,355bpの長さを保有している¹⁾。培地上での継代, 動物継代および薬剤感受性の変化による転位がなく, 比較的安定であることから結核の感染源追跡のマーカーとし

ての有効性が示されている。ここでは, 伝統的な疫学と分子疫学の相違点や利点について述べるとともに, 本邦での結核の現状からのRFLP分析について示したい。

I. 疫学概念と分子疫学

感染症や伝染病の有無, 疾病の消長は寄生体の毒力, 宿主抵抗性および宿主-寄生体の相互関係により支配される。一般に原因微生物が患者から健康者へ伝播される過程の機序を解明することは予防対策上重要である。感染症の疫学では個体レベルに基礎を置きながら集団的に取り扱い感染源を追跡する学問が疫学である²⁾。感染症では, 宿主と病原体との平衡関係が成立する傾向がみられるが, その平衡関係は常に変動する。その関連因子としては病原体集団および宿主集団および環境因子が関与している(図1)。この内, 特に宿主集団が平衡に関与する割合が大きいことから, 疫学研究の中心は病原体集団, 宿主集団の両者の絡みあいと環境因子との関係から解析し, 最終的には

動物を用いた疾患の証明をする実験疫学も導入され評価の対象になっている。分子疫学は主に病原性微生物のゲノム中に存在する比較的安定な遺伝子部分を用いてISタイピング、リボタイピング、パルスフィールド電気泳動およびPCR-based methodを用いて検出結果の違いから分離株間の亜分類が可能となった。結核症の疫学では、感染症の事前対策や疫学調査に際して情報統計学の解析からの傾向で評価してきたが、異なる患者からの株が同一菌またはクローンの共通源であったとし

ても明確に決定する方法がなかった。これらの菌株を分別する方法として最良なのが遺伝子型と表現型を検討し、これらの特性が安定であることがわかった場合に最も説得力のある証明となりうる。結核菌の同一性で最大の科学的な裏付けとなる1つの表現型特性がIS6110のゲノム局在とコピー数の多様性にある。RFLP分析は一般的に菌株が保有する特異的パターンの多様性を利用する技法である(図2)。

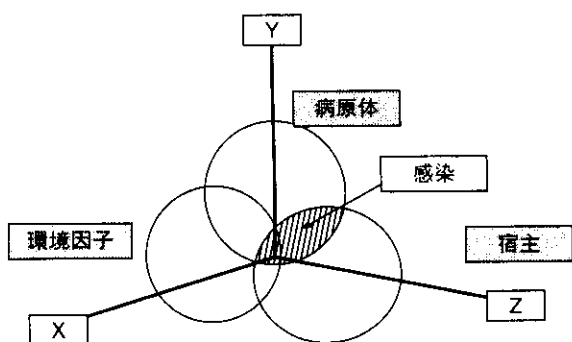


図1. 感染症における宿主と病原体の平衡関係
X軸：病原体，Y軸：環境因子およびZ軸：宿主。特に宿主が変動すると斜線で示した感染の領域も動く。

1. 感染症の流行性基準

感染症の平衡関係が種々因子により変動すると、増加、減少に相関して年ごとの流行(epidemic)になる。一方、グローバルに生じる流行を汎発流行(pandemic)と呼び、インフルエンザ、コレラ、ペストのように大規模な流行を引き起こすものが含まれる。これに対し、特定の地域や集団にみられる流行を地域流行(endemic)と呼び、リケッチア、マラリアなどの流行を示す感染症がある。しかし、ペストのようにネズミを媒体として大規模な発生をしてpandemicになるが、再びendemicな感染に戻る場合もあり、規定は一定ではない。結核症は世界人口の約1/3が罹患しており、毎年300万人が

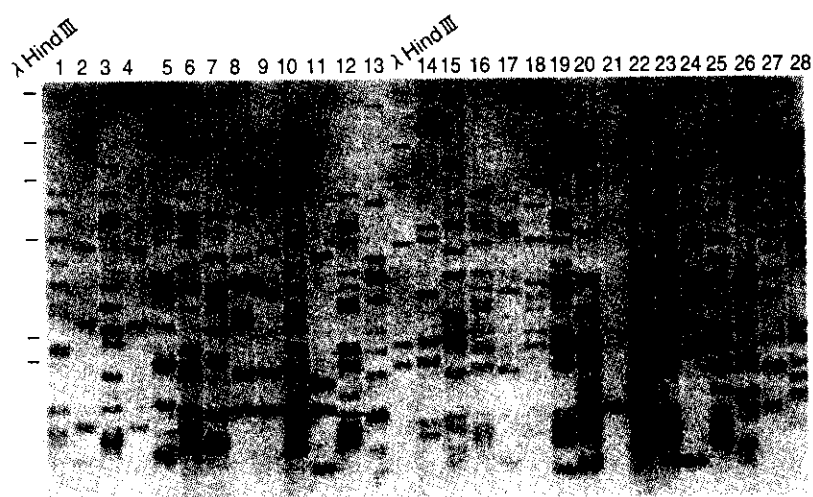


図2. 結核菌のIS6110をプローブとしたRFLP分析
上記レーン1～28の結核菌が保有する特異的パターンの多様性を利用して解析する。

死亡する疾病である³⁾。特に東南アジアでの罹患率が高く、結核征圧のkey pointとなっている。近年の分子疫学を用いた研究から、結核菌は世界各地にみられるが、遺伝学的に国別パターンが存在していることが解明されてきており、endemicな感染症との考え方が成立する。また、RFLP分析の結果からは散発性の再燃を伴うendemicな結核感染も存在する。一方、pandemicの立場からみると結核先進国のように移民、外国人就労者や外国赴任者間での伝播も存在する。これらのことから、結核症はその国々に合った対策が展開されるべきである。

2. 結核の感染源

結核の感染源は感染した患者や動物からの排泄物、体液、喀痰、衣類などを含み、とりわけ既感染者が結核誘因のリスクにあげられる。結核既感染者が結核病巣の修復過程で肺に肉芽腫を形成し、空洞化して休眠状態になると考えられている⁴⁾。本邦では1940年代の既感染者が高齢になり、免疫状態の悪化から再燃すると考えられているが、一部外来性の再感染と考えられる事例もあり、RFLP分析による解析がこの手の問題を解決してくれることだろう。Multidrug resistance (MDR)：多剤耐性の結核菌による伝播が世界的に問題になっているが、RFLP分析はこのようなMDRの菌株のモニタリングを通して結核のリスクファクターや対策に有効な手段として使用されている⁵⁾⁶⁾。

3. 結核感染の伝播経路の解析

一般的にヒトが感染することを基準にするとその感染経路は複雑である。間接的に伝播される疾病は動物感染、ノミ・シラミなどからの節足動物感染、水系感染・牛乳による感染・食物感染・衣類からの間接的な感染が含まれ、直接的に伝播される疾病は空気感染・接触感染・胎盤感染などが含まれる。結核感染は空気感染であり、くしゃみによるしぶきが空气中に結核菌とともに排出され、

その吸入による直接的な感染である。伝播経路が空気であるために感染源となるヒトを予防、制圧することは事実上不可能である。結核先進国では患者の早期発見とdirectly observed treatment short-course (DOTS)の化学療法が広く普及され、急激に罹患率の減少に効果を上げている⁷⁾。さらに、結核の分子疫学の大規模な患者管理の成績はこれまでの伝統的な疫学の傾向と何ら変わることがないことがわかってきている。しかし、再燃や外来性の再感染の区別、院内感染および集団感染での結核対策の評価に有効利用できる。また、結核患者が激減すれば、本邦でもRFLP分析を用いたコンピューターシステムによる結核患者管理を通して迅速に対策が実行できる環境が作れるだろう。

II. 結核の分子疫学と応用

小川培地に培養した結核菌からIsoplant[®] (和光純薬)を用いてDNAを抽出してDNAを制限酵素で消化する。次いで、アガロース電気泳動を用いて分子量の異なるDNA断片を分けてアルカリでDNAを一本鎖化しサザンプロテイングにてナイロンメンブレンに転写後、UV固定する。さらに、IS6110と同一の断片をビオチン標識したIS6110由来プローブでハイブリダイゼーションしてからアビジンにアルカリフォスファターゼ標識した物質を加え、ビオチンとアビジンの化学的親和性により二次的に結合させ、アルカリフォスファターゼの基質を加えて化学発光にてX-rayフィルム上で検出する。現在では国際的な標準化方法が提唱されており⁸⁾、本邦での成績は1本から19本のユニークなISコピー数が確認されている。パターンの比較解析を行うに当たり、コンピューターシステムが確立されており、グローバルに菌の亜分類を可能にしている。

RFLP分析の主な利用法としては患者間の感染源追跡による科学的な証明であるが、上記したよ

うに空気感染である感染源のヒトを予防、制圧することはできない。しかし、集団中に潜んでいる感染に対して新たに獲得した患者関係を評価できる。たとえば、同一パターンを示した患者間のグループには再燃を伴う事例が含まれるかもしれないが、他の事例では最近獲得したことを意味している。このように、その国の結核対策や政策の評価に利用できよう。

結核菌の薬剤耐性は不適切な治療や患者個人の不適切さから生ずる。特に結核蔓延国での発生頻度が高いことからグローバルレベルで大きな問題となっている。薬剤耐性菌による伝播が原因となる初回耐性は集団での薬剤耐性の限られたRFLPパターンを伴うことからクラスター分析と薬剤感受性パターンの相関関係もまた初回耐性と獲得耐性を検査する薬剤耐性菌のモニタリングとして重要な応用である。

結核のリスクが高い集団である免疫不全患者(HIVを含む)、麻薬患者、ホームレスおよび精神病院患者をリスクファクターに置き換えてクラスターと非クラスターの形式的な多変量比にして最近の感染とこれらのファクターを解析し評価する試みが行われている。忘れてはいけないのは、このアプローチは活動性結核が基本であって感染ではないことである。また、HIV患者のように疾病の進行が活発な場合はこのファクターを過剰評価する危険性がある。本邦でのリスクファクターは若年層への伝播が指摘されている高齢者からの感染が重要な問題点であろう⁹⁾。

結核菌の遺伝学的表現型の特徴が機能遺伝子と密接な関係をもつことから、多くの研究者がその変異性について試みている。ある株は組織親和性を保有しており、たとえば、腺病(瘰癧)や髄膜炎を生じやすいことがわかっている¹⁰⁾。また、動物モデルで南インドの分離株は結核菌H37RvやErdo-man株より毒力が劣ることが示されている¹¹⁾¹²⁾。個々の菌株の生物学的・疫学的比較を評価することでヒトの集団中での表現型が明らかになり、組

織付着能や侵入因子をコードしている遺伝子あるいは毒力に関与する脂質の有無を評価する手段として応用されるだろう。

RFLP分析は公衆衛生において政策・対策の評価を科学的に証明する方法として有効である。しかし、この技術には制限があり、それは培養依存性であること、そして感染だけで発症していない患者の疫学には利用できないことである。この新しい分子疫学を通して分析した結果は、皮肉にも最近の感染が活発に伝播しており、これまでの疫学の傾向から、戦略的な患者発見と迅速な予防内服をすることの重要性を再強調している。しかし、分子疫学では集団発生で感染源追跡を決定する補助や結核対策を評価する手段として、両者を統合して解析することが重要である。また、これまでの疫学的な疑問について科学的に理解を付与してくれる優れた分析法である。誰が結核を伝播したか？それはどこまで広まっているか？感染の危険を付与した物は何か？危険性の回避には何が必要か？活動性疾病を進行させる因子は何か？そして高い危険性に対して最近の化学予防の処置をどのように遂行するか？もし結核の病原因子が検出されれば、結核対策での標的も決定することだろう。

おわりに

結核症は空気感染が伝播経路であるために、感染源とヒトを予防・制圧することは事実上不可能であるが、分子疫学はその政策・対策の評価に利用できるし、院内感染、集団発生や外来性の再感染の実験的な証明に有力な手段であることに違いはない。高齢者層に患者が集中しており、IS6110を用いた分子疫学の評価でも同一パターンによる最近の感染が生じていることから、高齢者医療の充実を計り、早期発見による予防内服、DOTSの普及、さらには保健婦の充実が結核対策上不可欠であると考えられる。

文 献

- 1) Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, et al : Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis* : a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol **28** : 2051-2058, 1990
- 2) Brachman PS : Principles and methods : Transmission and principles of control, p.120. In Principles and practice of infectious disease Part I -Section C. Epidemiology of infectious disease, ed by Mandell GL, Douglas RD, Bennett JE. New York, John Wiley & Sons, 109-120, 1979
- 3) Christopher D, Suzanne S, Paul D, et al : Global burden of tuberculosis. JAMA **282** : 677-686, 1999
- 4) 岩井和郎編 : 結核病学. I 基礎・臨床論. JATA book : 126-127, 1991
- 5) Thomas RF, Lisa FS, Khin LM, et al : A mult-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis. JAMA **276** : 1229-1236, 1996
- 6) Rebecca WW, Zhenhua Y, Michael K, et al : Evidence from molecular fingerprinting of limited spread of drug-resistant tuberculosis in Texas. J Clin Microbiol **37** : 3255-3259, 1999
- 7) Mitchison DA, Nunn A J : Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis **133** : 423-430, 1986
- 8) Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : Recommendations for a Standardized methodology. J Clin Microbiol **31** : 406-409, 1993
- 9) 大森正子 : 日本の結核の現状と将来予測. 治療 **76** : 2677-2684, 1994
- 10) Small PM, Embden JDA : Molecular epidemiology of tuberculosis. Tuberculosis : pathogenesis, protection, and control. ASM press, 569-579, 1994
- 11) Prabhakar R, Venkataraman P, Vallishayee RS, et al : Virulence for guinea pigs of tubercle bacilli isolated from the sputum of participants in the BCG trial, Chingleput district. South India Tbercle **68** : 3-17, 1987
- 12) Kelly CL, Collins FM : Growth of a highly virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* in mice of differing susceptibility to tuberculosis challenge. Tuber Lung Dis **79** : 367-370, 1999

結核菌のRFLP分析

高橋光良*

KEY WORDS

結核菌/RFLP/分子疫学

はじめに

近年、結核菌のゲノム中にランダムに存在する挿入配列：Insertion sequence (IS) 6110が発見され、このIS6110をプローブにしたRestriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis：制限酵素断片長多型分析が可能となった。本法はバーコードのようなパターンを検出してその同一性により感染源追跡などに大きく寄与している。また、結核菌のゲノム上に発見された分子時計の異なるIS1081¹⁾、Direct Repeat (DR)²⁾、Polymorphic GC-rich sequence (PGRS)³⁾ およびSpoligotyping法⁴⁾を用いることで二次的な分別法として検討できるようになった。現在これらの分析法を総称して分子疫学とよんでいる。ここでは、結核対策における意義とグローバルに解析されているISタイピングとの比較から日本の結核の現状を解析したい。

I 結核症の分子疫学

これまで結核症の疫学では、別の患者の株が同一菌またはクローンの共通源であっても明確

に決定する方法が示されず解析できなかった。このような関係の菌株は十分な表現型と遺伝子型の特徴を示すかどうかを推論して、これらの特性が安定であることが確立した場合、最も説得力のある証明となる。結核菌の同一性で最大の裏づけとなる一つの表現型特性がIS6110のゲノム局在とコピー数の多様性にある。RFLP分析は一般的に菌株特異的パターンの多様性を利用するDNA fingerprinting技法である。培養した結核菌からDNAを抽出し、このDNAを制限酵素で消化する。次いで、アガロース電気泳動を用いて分子量の異なるDNA断片を分けてアルカリでDNAを一本鎖化しサザンブロッティングにてナイロンメンブレンに転写する。さらに、IS6110と同一の断片をビオチン標識したプローブでハイブリダイゼーションしてからアビジンにアルカリフォスファターゼ標識した物質を加え、ビオチン-アビジンの化学的親和性により二次的に結合させ、アルカリフォスファターゼの基質を加えて化学発光にてX-rayフィルム上で検出する⁵⁾。現在では国際的な標準化方法が提唱されており⁶⁾、わが国の成績では1本から19本のISコピー数が確認されている⁷⁾。大きな標本を分析するにあたりコンピュータシステムが確立されており、パターンの保存および比

* タカハシ ミツヨシ (財)結核予防会結核研究所
細菌学科 科長

較解析を簡易にしている。IS6110は大腸菌のIS3ファミリーに属する転位因子で、全長は1,355bpである。このISの安定性⁹⁾は多くの研究者により分析されており、同一患者から分離された株の大部分は同一パターンを示すことが報告されている。

一方、同一患者排菌例の29%が90日間で1本のバンドの変異が認められている⁹⁾。さらに、RFLP分析は株の同一性を信頼できる指標として多くの研究者により支持されている。しかし、ISコピー数を1~5本保有している結核菌での疫学的な一致率は低い、この理由はIS6110がゲノム上のhot-spotとよばれる特異的な部分のみに挿入されるからと考えられている。このために二次的な‘分子時計’であるDR配列、PGRS配列、IS1081およびspoligotypingを用いて分別する。加えて、RFLP分析により一般化されたDNA fingerprintingは細菌中の遺伝学的転位活性のため絶対的に安定ではない。単一バンドの付加や欠損が慢性排菌患者や集団発生事例で証明されている。しかし、経験上から単一バンドで異なるパターンを保有する疫学的に関連のある株は同一視することが可能であると思われる。パターンの変動は動く遺伝子配列の特徴をもった繰り返し配列であるのでRFLPパターンが不安定であることは驚くことではない。この特殊な配列の転位頻度はRFLPパターンが有意的に変化しそうなもので集団発生事例の感染源での時間の尺度との比較においてはまれのようである。しかし、この現象は異時間の幅が大きいほど、株を追跡しているRFLPタイピングの変動が増加すると考えられる。RFLPの手法がDNAのマイクログラム量で行っているために、現行では培養陽性菌に限られる。そのためにPPD陽転になった潜在感染者の追跡には利用できない。加えて、生菌からDNAを抽出することが要求されるので、時間の浪費と特殊なバイオセーフティーの実験室が必要となる。Polymerase chain reaction (PCR) 反応でDNA

を増幅して利用する他のIS6110を基にした手法はこれらの問題点を巧みに回避したものとして開発されている¹⁰⁾。

II IS6110を用いた結核菌の分子疫学の有効性

IS6110は動物継代した培養菌、マクロファージ内で増殖した菌および薬剤耐性獲得菌において変化しないことが示され、患者間の感染源追跡の疫学的マーカーになることが示された⁸⁾。その後、各国で評価され中央アフリカやチュニジア^{8),11)}など結核蔓延国でのコピー数分布は同一あるいは類似のパターンが多くピークを形成¹¹⁾し、結核先進国であるオランダなどのコピー数分布は個々のパターンを示す⁸⁾ためにピークを形成しないことが示された。日本では1940年代の既感染者が高齢になり発病・再燃する散発的な感染が多く存在しており事情がかなり異なることから有効性の確認をする必要がある。われわれは結核菌の集団発生、家族内発生、職場内発生、薬剤獲得菌、臨床分離菌株、種々BCG、BCG膀胱癌療法後の分離菌およびBCG接種後の腋下リンパ節腫脹より分離された菌を用いてIS6110タイピングを行った。その結果、6事例中五つは同一パターンを示したが、職場内発生1事例にパターンの異なる物が存在していた。これは今までの分別では明確な亜分類ができなかったことを意味している。また、親子間の感染の薬剤感受性菌で感染した子どもと薬剤耐性になった親とのタイピングは同一パターンであった⁷⁾。このことはISの転位と薬剤の獲得機構は関係がないことを示唆している。事実、薬剤耐性機構の主流がゲノム内の点突然変異によるアミノ酸の置換であることが証明されている。また、臨床分離菌株のISコピーは1本から19本みられ(図1)、全国的に同一パターンが点在し類似性の高いパターンが存在していた。おそらくこの要因は結核が蔓延していた1940年代既感染者が発病していることによると考えられ

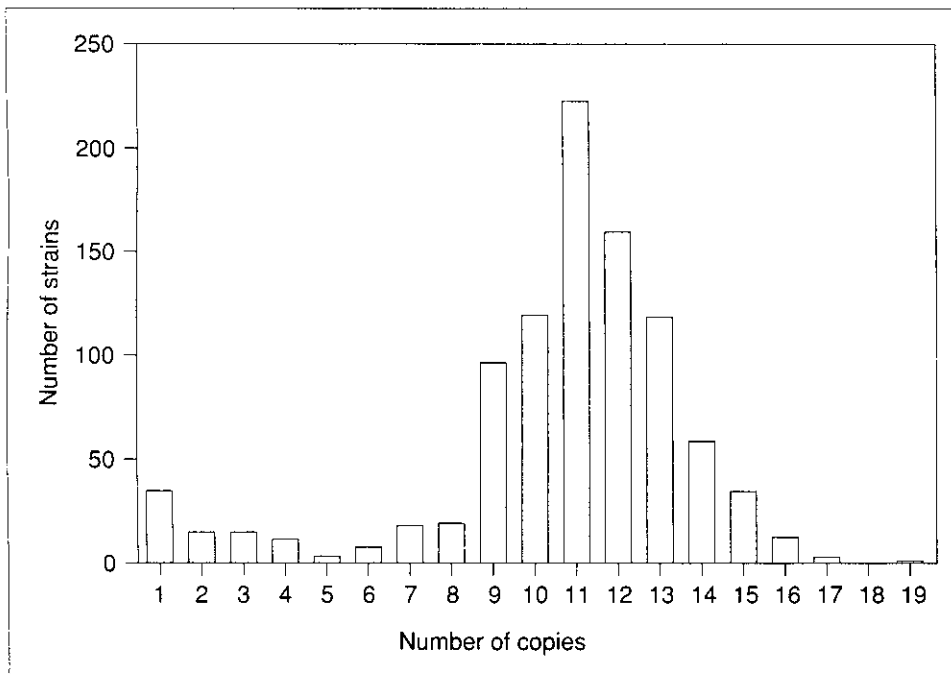


図1
結核菌941株のゲノム内
IS6110コピー数の分布

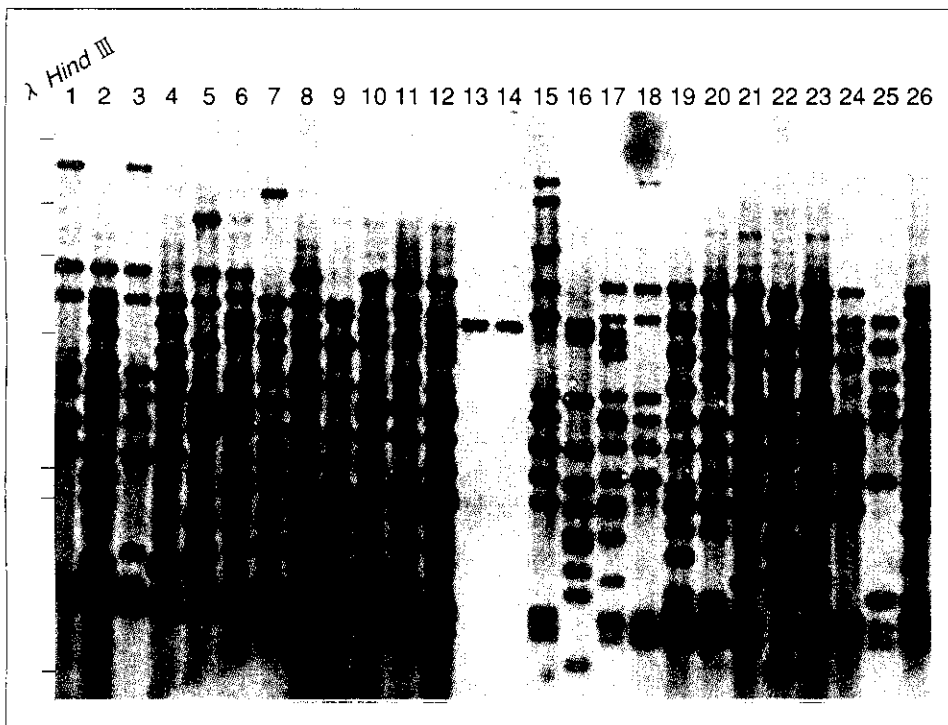


図2
感染源が同一であった結核菌
の集団発生、家族内発生およ
び職場内発生26事例
類似性指数>0.85で解析した場
合、1型：レーン1, 3, 15, 18, 2
型：レーン2, 6, 8, 10, 12, 17, 19,
20, 21, 23, 24, 3型：レーン13, 14,
4型：レーン16, 22.

る。事実、解析した年齢層は60歳以上が半数を超えている。地域的に分析すると1~3本の違いで分別可能であった。多くの感染事例で同時多発の菌の分別が可能であり、わが国でも有効性が確認された。さらに、分析した多くの株はクラスター解析すると四つの優勢なタイプに分別され、このうち三つは日本特異的なパターンで

あった(図2)。

一方、種々BCG菌ではTokyo株、Moreau株とRussian株が1.9と1.5kpの2本のバンドを保有するのに対しBCG Pasteur株、Copenhagen株、Glaxo株、Tice株とSweden株は1.9kpに1本のバンドを示すことがわかった。このことは、一般的に*M. bovis*は1.9kpを含む1~5本のISをもつこ

	イエメン	バングラデシュ	タイ	インド	韓国	インドネシア	ポリビア	日本*
A	13	2	・	・	・	・	・	34
B	5	・	・	・	・	・	・	・
C	2	5	5	4	5	3	2	・
D	・	・	・	・	・	・	8	・
E	・	・	・	・	・	・	・	115
F	・	・	・	・	・	・	・	171
G	・	・	・	・	・	・	・	44
other	5	・	2	5	6	6	6	90

表1
類似指数>0.53で分析した
クラスター群との相関
日本で分析されたタイプは1型：
E, 2型：F, 3型：A, 4型：Gに属
する。
*：941株中の454株が類似性指
数>0.85のクラスターを形成した。

とから日本のBCG Tokyo株は結核菌や*M. bovis*の感染事例と分別可能なことを意味している⁷⁾。実際に、膀胱癌患者へのBCG免疫療法後分離された菌株やBCG接種後のリンパ腺炎から分離された菌株の分別に有効であった。

Ⅲ 外国人由来結核菌との比較

上記したように日本には優勢なIS遺伝子型が存在し多くの感染事例に際して検出される(図2)。しかし、外国人を発端とした集団感染事例のパターンは遺伝学的距離が異なり、特異的なパターンであることからイエメン、インド、インドネシア、タイ、韓国およびポリビアより集めた臨床分離結核菌について分析を行った¹²⁾。その結果、各国で特異的なパターンを保有し分別可能であるが、大陸に沿った国々で共通のバンドが多く存在していることがわかった(表1)。また、ポリビアは遺伝的距離がかなり異なることが示された。このことは国内の外来性の菌との分別が可能であることが示され、薬剤耐性結核のモニタリングや結核対策に有効であると考えられる。これらの結果は、在住している移民や外国株間のパターンには特徴があるとする韓国、デンマークの研究と一致している^{13),14)}。さらに、遺伝学的にみて結核菌の祖先が共通であると推測された。現在のspoligotypesの研究からも共通祖先であると考えられている北京ファミリーであることが証明されている。

Ⅳ RFLP分析で何ができるのか？

RFLP分析は主として患者間の感染源追跡の科学的な証明のために用いられている。その有効性に関しては多くの研究者により支持されており、標準化法が用いられている。近年、その応用として再燃と再感染の区別、検査室でのcross-contaminationの判定、薬剤耐性結核における初回耐性菌と獲得耐性菌の分布によるモニタリング、結核菌の感染様式、地理学的に伝播している流行株の解析およびBCG Tokyo株と結核菌群との分別が可能である。最大の関心が患者管理としてのRFLP分析であり、パターンをコード化してコンピュータに入力し、同一パターンについて疫学的な接触者情報を解析することである。オランダでは全株について分析を行い患者管理に反映しており、予防内服や検診の範囲の目安となっている。

参考文献

- 1) van Soolingen D, Hermans PWM, Hass PE DE, et al : Insertion element IS*J081*-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species : a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol 30 : 1772~1777, 1992
- 2) Sahadevan R, Narayanan S, Paramasivan CN, et al : Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from