

分担研究課題 結核患者収容のための施設基準の策定に関する研究  
資料 3.

Mycobacteriology PT Procedual Manual (New York State Department of Health)

# Mycobacteriology PT Procedural Manual

## Table of Contents

Sample Set Description.....	p. 2
NYS Laboratory Permit Categories.....	p. 3
Lab Notification.....	p. 4
Organism Preparation.....	p. 4
Labeling and Tracking Organisms.....	p. 4
Transferring Specimens to 16 X 125 vials.....	p. 5
Cytospin Procedure.....	p. 5
Slide Staining procedure.....	p. 6
Transferring to Wheaton Bottles .....	p. 6
Contaminant Preparation.....	p. 7
Slide Preparation.....	p. 7
Protocol for Specimen Preparation .....	p. 9
Protocol for Isolate Preparation.....	p. 11
Shipping PT Samples.....	p. 12

## Sample Set Description

**A. Slides Categories: All Slides are numbered as follows:**

- # 0351 (first 2 digits are the year, third is sample type, last is sample #)
  - # 0352
  - # 0353
  - # 0354
  - # 0355
- 

**B. Specimens: Categories: All except Smears Only**

Specimens are numbered as follows:

- # SP 0361 (first 2 digits are the year, third is sample type, last is sample #)
  - # SP 0362
  - # SP 0363
  - # SP 0364
  - # SP 0365
- 

**C. Isolates Categories: Restricted, Restricted-S and Reference**

Isolates are numbered as follows:

- # IS 0371 (first 2 digits are the year, third is sample type, last is sample #)
- # IS 0372

**Categories: General, General-S, and Reference**

- # IS 0373 (first 2 digits are the year, third is sample type, last is sample #)
  - # IS 0374
- 

**D. Isolates Categories: Restricted-S, General S and Reference**

Isolates are numbered as follows:

- # IS 0381 (first 2 digits are the year, third is sample type, last is sample #)
- # IS 0382
- # IS 0383

## New York State Laboratory Permit Categories:

### MYCOBACTERIOLOGY

MYCOBACTERIOLOGY - Smears Only	(5 SLIDES)
MYCOBACTERIOLOGY - Restricted	(5 SLIDES, 5 SPECIMENS, 2 ISOLATES)
MYCOBACTERIOLOGY - Restricted-S	(5 SLIDES, 5 SPECIMENS, 2 ISOLATES, 3 ISOLATES)
MYCOBACTERIOLOGY - General	(5 SLIDES, 5 SPECIMENS, 2 ISOLATES)
MYCOBACTERIOLOGY - General-S	(5 SLIDES, 5 SPECIMENS, 2 ISOLATES, 3 ISOLATES)
MYCOBACTERIOLOGY - Reference	(5 SLIDES, 5 SPECIMENS, 6 ISOLATES, 3 ISOLATES)

---

**SMEARS ONLY.** This category is for laboratories that only examine smears for acid-fast bacilli. Laboratories holding this category must submit all specimens for growth detection and identification to a laboratory holding a New York State permit in the appropriate Mycobacteriology category.

**CATEGORY RECEIVES: 5 SLIDES**

---

**RESTRICTED and RESTRICTED-S** This category is for laboratories that examine smears for acid-fast bacilli, attempt to isolate acid-fast bacilli and identify *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, and *Mycobacterium africanum* as members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, and for those that perform *in vitro* susceptibility studies (**Restricted-S**)

**CATEGORY RECEIVES: 5 SLIDES**

**5 SIMULATED CLINICAL SPECIMENS  
2 ISOLATES FOR IDENTIFICATION**

**RESTRICTED-S-**

**3 ISOLATES FOR DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING**

---

**GENERAL OR GENERAL-S.** These categories are for laboratories that conduct all clinical tests for detection, isolation and identification of all mycobacteria (**General**), and for those that perform *in vitro* susceptibility studies (**General-S**).

**CATEGORY RECEIVES: 5 SLIDES**

**5 SIMULATED CLINICAL SPECIMENS  
2 ISOLATES FOR IDENTIFICATION**

**GENERAL-S**

**3 ISOLATES FOR DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING**

---

**REFERENCE:** These labs serve to validate test analytes. Reference Labs test all analytes.

**CATEGORY RECEIVES: 5 SLIDES**

**5 SIMULATED CLINICAL SPECIMENS  
4 ISOLATES FOR IDENTIFICATION  
3 ISOLATES FOR DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING**

## Lab Notification

Mail out notification letter to all of the participating labs stating the date that they should expect to receive their samples and what they should do with those samples. Include a copy of updated mycobacteriology laboratory standards and any additional readings that max would like to send.

## Organism Preparation

### MATERIALS

- |                                    |                  |
|------------------------------------|------------------|
| ➤ ATCC strains                     | Chocolate Plates |
| ➤ ATCC list with freezer locations | 7H10 Plates      |
| ➤ Media order forms                | 3CC needles      |
| ➤ 12B vials                        | TB Data Base     |
| ➤ PAPR                             |                  |

- 1) Meet with Max to select the organisms for the event. Do not discuss the chosen specimens with others in the lab.
- 2) If possible use the ATCC list to find samples, and allow the frozen samples to thaw. If necessary use the database to find clinical specimens that meet the criteria of the event.
- 3) Following BSLIII protocols: Transfer the selected organisms into 12B vials. Depending on availability dispense .2ml into each 12B, .1ml onto each a chocolate and 7 H 10 plate.
- 4) If there is insufficient amounts of the original specimen inoculate only one 12 B, or if the organism is slow growing you should also inoculate only one 12B.
- 5) The ideal growing temperature of each organism should be considered in order to ensure proper growth. (Certain organisms grow better at alternate temperatures.)

## Labeling and Tracking Organisms

### MATERIALS

- |                                 |                         |
|---------------------------------|-------------------------|
| ➤ SATO thermal transfer printer | Thermal transfer labels |
| ➤ Label Maker program           | BACTEC                  |

- 1) Using the label maker program, label the 12B vials along with the chocolate, and 7H10 plates with the specimen identification number, last name, or ATCC strain, and the date.
- 2) Designate each vial containing the same specimen as either vial I or vial II.
- 3) Each specimen is to be tracked on a separate protocol sheet so that the GI and chocolate plate activity can be recorded daily.
- 4) **Select the needed tests for each individual organism (growth detection, identification, and susceptibility) on their respective protocol sheet so that the clinical lab pre-tests the samples to ensure that the correct organisms are prepared.**

- 5) Specimens should be placed in "Box two" and protocol sheets should be placed in the corresponding notebook so the growth indices can be monitored and recorded daily.
- 6) While the organisms are incubating, order 16x125mm vials containing Dubois Davis +tween 80 from the Media department. Be sure to mark "Sterile" on the order form. Order 6 tubes for every specimen used during the event)

## Transferring Organisms to 16X125 Vials

### MATERIALS

- 16x125mm vials containing Dubois Davis +tween 80 ordered from Media
- 1cc needles
- SATO thermal transfer printer      P APR
- Label Maker program                      7H10 Plates
- Thermal transfer labels                  Chocolate Plates
- Color dot labels                              37 Degree incubator
- Glas-Col rotator

- 1) For each time the organism is needed during the PT event prepare 5 16X125 vials containing Dubois Davis + tween 80 to account for any contamination that may occur. For each specimen choose the 12B vial that has grown to 999, or if both have grown to 999 choose the one that appears clearest, or the one that has grown closest to a doubling rate.
- 2) Each top of the 16X125 vials should be color-coded. The tube itself should be labeled as to which 12B vial the contents were taken, the specimen number, and the date the tube was inoculated.
- 3) The tubes should also be labeled sequentially
- 4) TB slow growing mycobacterium and slow growing non-TB mycobacterium require inoculation of 1ml. For all others types of bacteria, both TB and non-TB, you should inoculate with .5 ml. The 16x125mm vials are then placed in the Glas-Col rotator in the 37-degree incubator and allowed to grow until McFarland Standard # 2.
- 5) Chocolate plates should be done at the time of transfer to ensure that there was no contamination.
- 6) After two days of incubation a cytospin should be done on a 12x125 vial to ensure that there was no contamination during the transfer. Once McFarland two is suspected a final cyto spin can be done to check for purity. (Please see Cyto Spin Procedure below)
- 7) Order from the media department 20, 250ml Wheaton bottles with 200 ml of Dubois Davis + tween 80. Be sure to mark "sterile" on the order form.

## Cytospin Procedure

### MATERIALS

- Clear Frost slides                          Centrifuge
- Cyto Funnels                                  3CC Needles
- Cyto Funnel Caps                              P APR
- Cyto Spin Clamps                              Bovine Protein
- Cytospin Disk                                  Pencil

- 1) The GI of the organism will determine the amount of the organism that is needed to properly transfer bacterial colonies to the slide. The higher the GI the lower the amount of the organism needed, no more than .5 and no less than .2
- 2) Using a pencil, label clear frosted slides with the information that appears on the 12B vial so that there is no chance for cross contamination.
- 3) Set slides along with cyto funnels into slide holders. Be sure both are completely in place and clamped down. It is important to make sure that the slide and the funnel are locked tightly into place. When installing the funnels and the funnel caps it is crucial that the cap and the opening to the funnel are not contaminated.
- 4) Under BSLIII conditions transfer .2 ml of a Bovine protein into the funnel, this will help adhere the bacteria to the slide.
- 5) Maintaining BSL III conditions, extract between .2 and .5ml of the desired organism from the 12B vial and place in the funnel.
- 6) Place funnels into centrifuge disk. Make sure that there is a balanced load of specimens within the disk; it may be necessary to use an empty funnel and slide set.
- 7) Air seal and bring to centrifuge.

### Slide Staining Procedure

#### MATERIALS

- |                              |              |
|------------------------------|--------------|
| ➤ Hot Rack TB                | Methyl Blue  |
| ➤ Ziehl Neelsen              | Acid Alcohol |
| ➤ Distilled H <sub>2</sub> O | Rinse Rack   |

- 1) Place slides on hot rack.
- 2) Cover slides with Ziehl Neelsen stain for five minutes
- 3) Place Slides on rinse racks and flood with H<sub>2</sub>O.
- 4) Decolorize completely with acid alcohol usually 1min 30 seconds.
- 5) Flood Slide with H<sub>2</sub>O
- 6) Cover Slides with TB Methyl Blue for 45 Seconds.
- 7) Rinse with H<sub>2</sub>O. Let air dry and read.

### Transfer to Wheaton Bottles

#### MATERIALS

- 250 ml Wheaton Bottles containing 230 ml Dubois Davis
- Electric pipette dispenser
- 2 ml pipette tubes
- Chocolate plates
- PAPR
- 7H10 plates
- 37 degree incubator

- 1) Once McFarland 2 standard is assumed in the 16X125 vials they must be transferred into 250 ml Wheaton Bottles containing 230 ML of Dubois Davis+ tween 80.

- 2) Under BSL III standards use an electric pipette and 2ml pipette tubes, transfer the entire contents (10ml) of the 16X125 tube into the 250-ml Wheaton bottle containing 230 ml Dubois Davis and a sterile stir bar. A chocolate and 7H10 plate should be made at this time.
- 2) Each Wheaton bottle is to be labeled with the specimen number and also the tube from which it was inoculated.
- 3) The Wheaton bottles are to be placed on magnetic stir plates to ensure equal consistency within the bottle.
- 4) A cyto spin should be done after two days of incubation to ensure the presence of AFB and to rule out contamination.
- 5) When McFarland two is assumed smears can be made to check for slide concentration. If a numerous slide concentration is present slides can be prepared for the event. (See slide Protocol)
- 6) Order (15) 125-ml Wheaton bottles with 90 ml mucin from media department.
- 7) Order (8) ONE-liter bottles with 700 ml Mucin from media department.
- 8) Order (10) 16x125mm tubes with 10-ml tripticase soy broth for contaminate preparation

## Contaminant Preparation

### MATERIALS

- 10 – 16x125 mm tubes with tripticase Soy Broth
  - Three different contaminants from freezer
  - 1CC needles
  - Chocolate plates
1. Remove 3 of the 10 16x125mm tubes of tripticase soy broth (TSB) from the cooler. Along with the contaminants.
  2. Under BSLIII conditions add .2ml of one contaminant into each TSB tube.
  3. Remove the contaminates from the incubator at the 24 hour mark and place in the cooler so that McFarland 2 is not surpassed.
  4. Add 1ml of McFarland #1 contaminants to 90 ml H<sub>2</sub>O for proper dilution of contaminants.
  5. 1ml of properly diluted contaminants into specimen.

## Slide Preparation

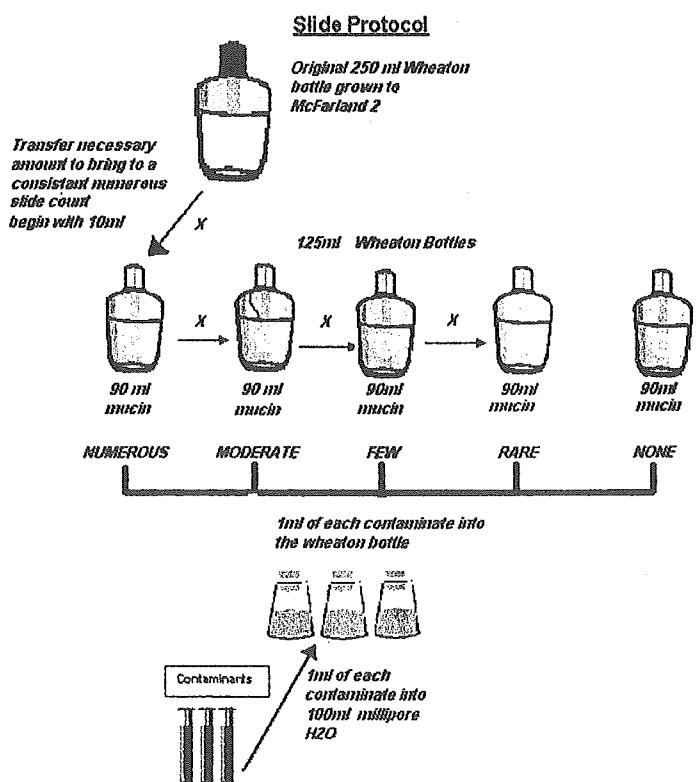
### MATERIALS

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Color-frost slides (previously labeled)</li> <li>➤ Samples grown to McFarland 2 in 250 ml Wheaton's</li> <li>➤ Electric pipette</li> <li>➤ Pipette tubes 10-ml</li> <li>➤ 125-ml Wheaton bottles with 90 ml Mucin in each</li> <li>➤ Stir Bars</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Forceps</li> <li>Bunsen burner</li> <li>Pipette tips</li> <li>Repeating pipette</li> <li>Slide trays</li> <li>Stir plates</li> </ul> |
|--|---|

- 1) Once a numerous concentration is reached within the 250 ml Wheaton bottle, and there is no Contamination in the sample, slides can be made.
- 2) Transfer enough of the sample from the McFarland 2, 250-ml Wheaton bottles into a 125 ml Wheaton with 90 ml mucin.



- 3) The procedure should start by transferring 10 ml into the mucin and should go up by 5 ml at a time until a numerous count is reached within the 125-ml mucin bottles.
- 4) The 125 ml Wheaton containing the mucin and a sterile stir bar should be placed on a stir plate and allowed to spin for a few minutes before preparing sample slides, to ensure a homogenous sample.
- 5) Once the numerous bottle is finished it should be labeled as numerous, and the specimen number, name, and the date the bottle was created.
- 6) Use the numerous bottle to create the remainder of your slides.
- 7) To create a moderate sample transfer the same amount of the numerous specimen into a 125-ml mucin as you did from the 250 ml Wheaton to the numerous.
- 8) To create a few sample transfer the same amount of the moderate sample into a 125 ml Mucin bottle as you did from the numerous to the moderate.
- 9) To create a rare sample transfer the same amount of the few sample into a 125ml mucin bottle as you did from the moderate to few.
- 10) Negative slides get contaminants ONLY.
- 11) Negative slides should be made first.
- 12) Set pre-labeled slides onto slide trays and arrange under the hood. It is important that the slides sit flat so that the Mycobacterium or contaminants do not run to one side of the slide and an even consistency remains in the center of the slide.
- 13) Using the rapid dispenser place 20 micro liters onto the slide and spread with the tip to a nickel sized spot.
- 14) Allow all of the slides to dry under the hood, and then heat fix.



After dilutions are made, organisms are dispensed on slides, air dried, heat fixed, and packed

## Protocol for Specimen Preparation

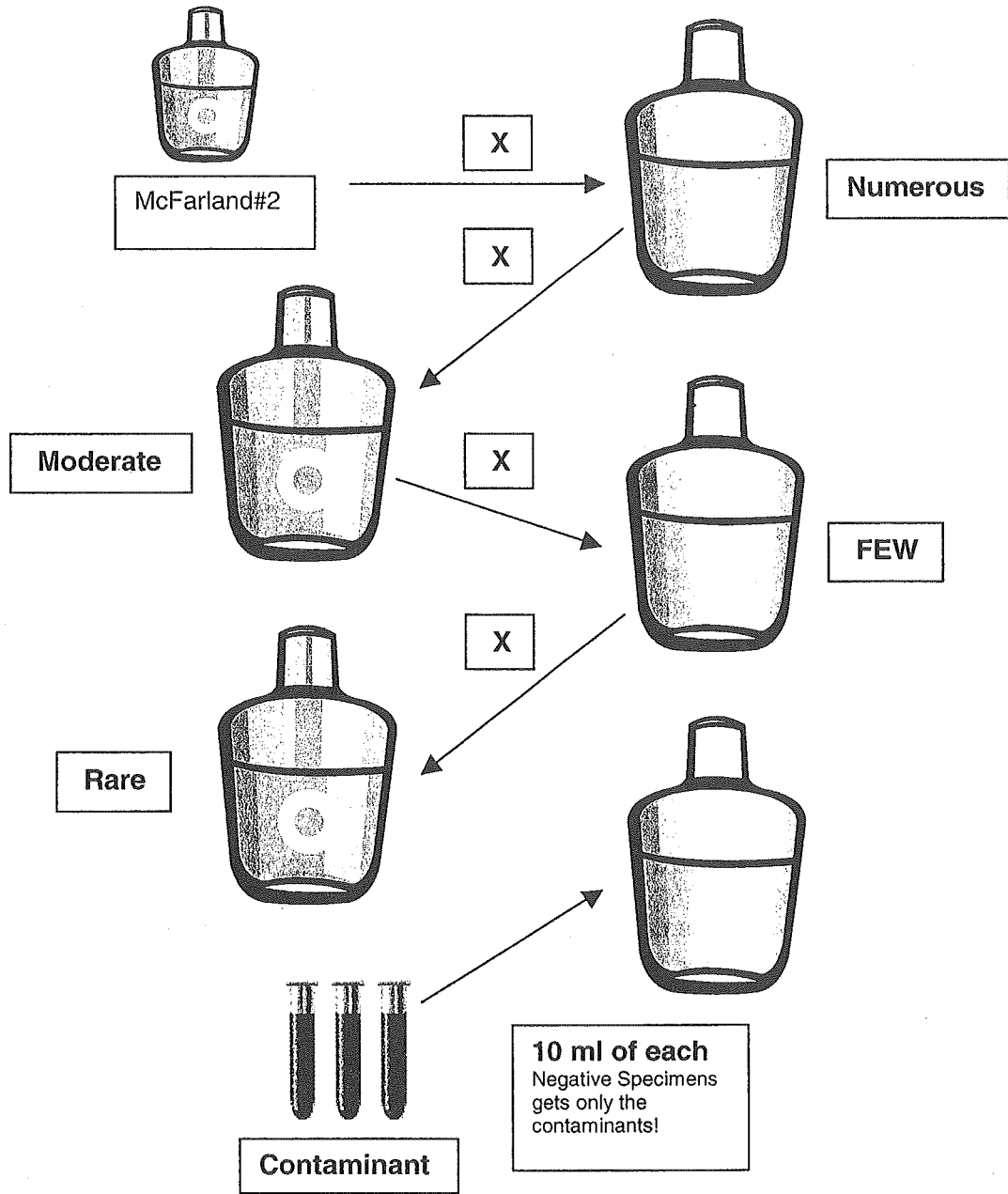
### MATERIALS

- Culture of AFB grown on rotary mixer to at least McFarland Standard No. 2.
- Mucin
- Contaminants
- Vacuum Pipette and Tips
- Vortex & magnetic stirrer
- Pre-labeled Nunc tubes
- Para film cut into 1 inch squares

### Specimen Preparation

1. Use selected organism that has grown to McFarland #2 in 200 ml of Dubois Davis. This is the undiluted specimen
2. **NUMEROUS** = Pipette needed amount (X) to of the McFarland #2 Specimen into the 1L Wheaton bottle containing 700 ml mucin so that upon smear a numerous count is seen.
3. **MODERATE** = Pipette X amount from the Numerous Wheaton Bottle into a different 1L wheaton bottle with 700ml mucin.
4. **FEW** = Pipette X amount of the moderate suspension into 1L Wheaton Bottle containing 700 ml mucin.
5. **RARE** = Pipette X amount of the few suspension into 1L Wheaton Bottle containing 700 ml mucin.
6. Negative specimens get only the contaminants.
7. Before Dispensing allow Dispensing Flasks to mix on magnetic stirrer for ~30 minutes.
8. Using 5 ml pipette tips and vacuum pipette aid dispense 3.0 ml into each labeled and color coded nunc tube.
9. Dispense Negative Specimens first
10. When completed, Para film the nunc tubes and store Specimens in the walk in cooler.

# Specimen Protocol

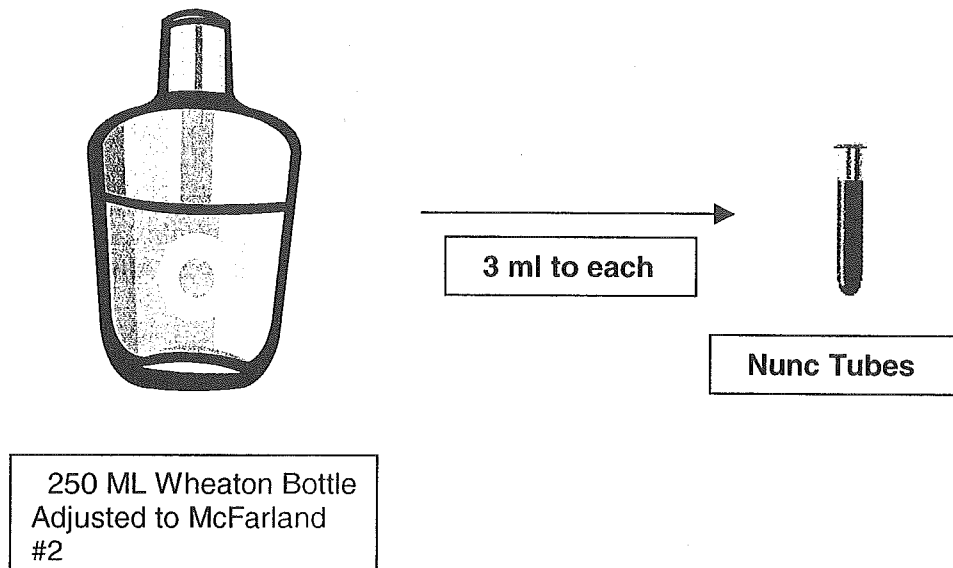


## Protocol for Isolate Preparation

### MATERIALS

- 250-ml Wheaton bottles with samples grown to McFarland 2
- Electric Pipette
- 5ml pipette tubes
- Chocolate Plates
- 7 H 10 plates
- Para film cut into 1inch squares
- Pre-labeled Nunc tubes
- Stir Plate
- Stir Bars

1. Once McFarland number 2 is achieved in the 250 ml Wheaton the samples that are to be used for growth detection, and Identification can be dispensed.
2. Use an electric pipette and 5ml pipette tubes to transfer 3 ml from the McFarland 2 bottle to individual pre-labeled nun tubes. A chocolate plate should be made at this
3. The top of each nunc tube should be wrapped with Para film to ensure closure and stored in the cold room until shipment.



## Shipping PT Samples

### Smears Only Laboratory

1. Into a cushioned mailer, place one (1) slide sample set.
2. Place paperwork into 7X10 envelope.
3. Deposit cushioned envelope and paperwork envelope into FedEx shipping envelope.
4. Affix corresponding FedEx mailing label to shipping envelope.

### Other Laboratories

Procedure:

1. Organize samples: retrieve the exact numbers needed for each category.

<b>Restricted</b>	<b>Restricted-S</b>	<b>Reference</b>	<b>General</b>	<b>General-S</b>
Slides	Slides	Slides	Slides	Slides
Isolate 1 & 2	ID Isolates 1 & 2	ID Isolates 1 - 4	ID Isolates 3 & 4	ID Isolate 3 & 4
5 Specimens	5 Specimens	5 Specimens	5 Specimens	5 Specimens
	Susceptibility Isolates 1,2 & 3	Susceptibility Isolates 1,2 & 3		Susceptibility Isolates 1,2 & 3

2. Retrieve Fed-EX mailing labels from LABLIC program and place on disk. Bring disk to mail room to print out dangerous goods labels and mailing labels.
3. Place canisters and appropriate paper work inside PT mailer box. Affix all necessary labels to box and seal.
4. Ship samples via FedEx overnight mail.

厚生労働科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

多剤耐性結核菌の感染性に関する研究

分担研究者 大角 晃弘 (財)結核予防会結核研究所研究部主任研究員

研究要旨

都内某区で発見された結核患者から分離された結核菌について結核菌 DNA 指紋法分析を実施した。そのクラスター解析結果 338 患者に対し数学モデルを用いて患者背景別感染伝播指数の推定を行った。クラスター解析結果については完全バンド一致を同一クラスターとした。その結果、女性に比べ男性が、住所不定者以外の者に比べ住所不定者が、それぞれ感染伝播指数が顕著に高いことが示された。相対比でみるとそれぞれ 6.8、7.1 であった。年齢階級別では 60 歳未満では大きな差はなかったが 60 歳以上では相対比にして 0.6 と低くなった。さらに、クラスターを形成した患者群での感染源と発生した二次患者の内訳示された。また年齢階級別にみると 30 歳未満の群ではほとんどが同年齢階級内での感染発病であるのに対し、高齢の群では全ての年齢階級群にほぼ同様の感染発病の発生を起していることが示された。分子疫学的検査に基づく感染伝播指数を用いた解析によって、新規感染・発病における住所不定患者の一般人口への影響が無視できないことが示唆された。また若年層においては同年齢層内での新規感染・発病が多く起こっていることが示された。

結核菌地域分子疫学研究会を設立し、結核菌の遺伝子タイピングを積極的病原体サーベイランスとして全国的に実施する体制の確立をめざして、研究者の情報交換や協力体制の整備を検討した。そのための方法論的な検討を行った。

A. 研究目的

多剤耐性結核の感染性ないし毒力に関して疫学的・臨床的観点から明らかにすることが本分担課題の最終目的である。これにアプローチするために主として用いる技術の妥当性や関連の可能性を、主として地域人口集団における分子疫学の観点から検討する。

B. 研究方法

1) 沖縄県の地域人口集団における結核菌分子疫学的研究

沖縄県では 1996 年以来県内で発生するすべての菌陽性患者の菌株を結核研究所に収集し、その RFLP 分析を行っている。昨

年度以来、本分担研究課題に併せて、薬剤感受性検査を並行して行った。

2) 都内某区の地域人口集団における結核感染伝播の分子疫学的研究

2002 年 9 月以降 2005 年 12 月までに、医療機関検査室またはその他の検査機関において、新宿区内で新たに登録された結核患者から分離培養された結核菌を結核研究所に送付し、結核菌 DNA 指紋法分析を実施した。そのクラスター解析結果 338 患者に対し数学モデルを用いて患者背景別感染伝播指数の推定を行った。分析対象とした患者背景は、性、年齢階級、住所不定者か否か、とした。モデルは Borgdorff の罹患モデル (D. 考察参照) をもとに登録時期、塗抹陽性の有無を調整したものを用いた。ま

たクラスター分析結果については完全バンド一致を同一クラスターとした。

3) 標準的結核菌 DNA 指紋法を確立するための反復配列多型 (VNTR) を用いた結核菌の迅速タイピング法の改良とその応用に関する研究

従来のように疫学的リンクが疑われる複数の患者からの結核菌 DNA 諮問の比較を行うのみでなく、地域人口内で発生するすべての結核患者について菌株の遺伝子タイピングを行う結核菌の積極的分子疫学調査を、全国的にルチンに行う体制の確立をめざして、本研究班は、地衛研協議会の協力の下で、全国各地域で先進的にこのような活動を行っている関係者の研究会を 2004 年度に立ち上げ、情報交換を行い、今後の積極的な協力体制について検討を行った。そのなかで最近ある特定遺伝子型株による患者の多発が疑われている首都圏南西部については、その広域での全人口を対象とする結核菌 DNA 指紋型調査と疫学調査の実施の可能性について、関係諸機関と検討するための調査事業素案を作成し、次年度中に具体的に実施推進する予定である。その中で最も中心的な技術である遺伝子タイピングの技術が問題になったが、前田 (研究協力者) これについて標記の検討を行った。試験材料としては東京都内で分離された IS6110-RFLP 分析済みの菌株 (97 株) から DNA を精製して分析用の検体とした。

- 1) プライマーの合成: MIRU-2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40 についてのプライマーは Cowan ら<sup>1)</sup>、exact tandem repeat (ETR)-A, B, C, F については Frothingham ら<sup>2)</sup>の塩基配列を参考して合成した。
- 2) PCR 法による VNTR 断片の増幅: 結核菌 DNA (5 ng)、0.5  $\mu$ M Forward primer、0.5  $\mu$ M Reverse primer、2xCG buffer I、2mM dNTP、Ex taq (タカラ社) を混合し、H<sub>2</sub>O で全量を 10  $\mu$ l として PCR を行った。反応の条件は、95°C で 5 分加熱した後、95°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 1 分の

サイクルを 30 回繰り返し、72°C で 7 分加熱し、その後 4°C とした。

- 3) PCR 産物の分子量測定: 反応液は、Tris-borate-EDTA buffer (TBE) 緩衝液を用いた 2.5% アガロースゲルで電気泳動、またはマイクロチップ電気泳動システム SV1210 コスモアイ (日立ハイテクノロジー社) を用いて分子量を算出した。
- 4) IS6110-RFLP 分析: ビオチン化ラムダ /Hind III DNA を分子量マーカーとして用い定法に従い分析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、自治体が日常業務として実施している結核患者管理事業の一環として実施しているものであり、結核患者から分離培養された結核菌に対して DNA 指紋法を実施することについては、患者からの同意書を取得する手続きは取っていない。一方、各患者の特定可能な個人情報については、各自治体の結核対策担当課で管理しており、研究過程で知り得た個人情報に関しては、感染症予防のために必要な公衆衛生活動を実施するためのみに使用している。

[研究協力者]

伊礼壬紀夫・新垣さと子 (沖縄県保健環境部健康増進課)

前田伸司・村瀬良朗 (結核研究所結核菌レファレンスセンター結核菌情報科)

内村和広 (結核研究所研究部)

山田紀男 (結核研究所国際協力部)

## C. 研究結果

### (1) 沖縄県の地域分子疫学

今年度は事例の集積と薬剤感受性の検査を行うに留まった。またこれまでに集積した全 1,340 例について従来の IS6110-RFLP 分析に加えて新たに VNTR 分析を行った。

### (2) 都内患者の感染伝播指数の推定

2002 年 9 月以降 2004 年 10 月までに某区保健所に登録された菌陽性結核患者 244 人の内、207 人から得られた結核菌株に DNA

指紋法を実施してその分析結果をまとめた（検体収集率：84.8%）。41人から得られた検体が12個のクラスターに属していることが判明し、その内16人が住所不定者であった。一般住民と住所不定者のそれぞれにおけるクラスター形成率には統計学的差は認められなかったが、住所不定者の方が高い傾向にあった。乳児の結核患者から分離された菌株のDNA指紋型が他の一般住民及び住所不定者から分離培養された菌株のDNA指紋型と同一であった事例が認められたことから、一般住民と住所不定者の間における結核菌の伝播があることが強く示唆された。

上記の患者集団にもとづいて感染伝播モデル分析をおこなった。基礎としたクラスター分析結果および罹患率推定結果を表1に示した。罹患率についてはポアソン回帰分析により、性、年齢階級、住所不定者により調整を行った。表2に患者背景別感染伝播指数推定結果を示した。この結果から女性に比べ男性が、住所不定者以外の者に比べ住所不定者が、それぞれ感染伝播指数が顕著に高いことが示された。相対比で見るとそれぞれ6.8、7.1であった。年齢階級別では60歳未満では大きな差はなかったが60歳以上では相対比にして0.6と低くなった。

表3にクラスターを形成した患者群での感染源と発生した2次患者の内訳の推定結果を示した。この結果から住所不定者以外の患者から住所不定者への感染発病は少ないことに対し、住所不定者を感染源とする感染発病は住所不定者とそれ以外でほぼ同数の発生があることが示された。また年齢階級別にみると30歳未満の群ではほとんどが同年齢階級内での感染発病であるのに対し、高齢の群では全ての年齢階級群にほぼ同様の感染発病の発生を起こしていることが示された。

### (3) VNTR 分析技術の標準化

#### ① RFLP 分析

全97株についてRFLP分析を行うと57株が独自のバンドパターンを示し、40株がクラスターを形成した。つまり、クラスター率は41.2%であった。クラスターのサイズと頻度は、表1に示した通りであり、10株からなるクラスターを形成し、他は2-4株から形成される小さなクラスターがみられた。

#### ② VNTR 分析

同じ株をVNTR法で分析を行ったところ、MIRUの12ヶ所の分析では、クラスター率55.7% (54/97) で、20株からなるクラスターが最も大きなサイズであった。更に4ヶ所のETRを加えて合計16ヶ所の分析を行うとクラスター率は50.5% (49/97) となり、11株からなるクラスターが最も大きなクラスターとなった。一方、IS6110-RFLP分析で同一株と判定された3株からなるクラスターを形成した菌株がVNTR分析で2株と1株というように2つに区分された例が2例、2株からなるクラスターがそれぞれ別の株と判定された例が2例あった。

### D. 考察

#### (1) 分子疫学的にみた結核菌の感染性

ここで用いたBorgdorffらの方法は以下のようにして特定の属性を持った結核患者の感染伝播力（感染から発病に至るまで、伝播指数で表わす）を定量する（Borgdorff MW, Nagelkerke NJD, van Soolingen D, de Haas PEW, Veen J, van Embden JD: Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting *Am J Epidemiol* 147: 187-95, 1998）。

これまでの研究ではクラスターには1人の感染源を想定していたが、どの人が感染源とは確実にはいえない。この方法では各成員にそうなる確率を与える。その確率は「成員が所属する亜集団（例としてBorgdorffらの研究では国籍）、および性・年



年齢別の罹患率、およびその成員が二次患者を発生させる確率（これは例では国籍のみに依存）に比例する」と仮定する。よって、

$$P_i^s = P_i^t \times IR_i / \sum_{j(\text{cluster})} P_j^t \times IR_j$$

ここに  $P_i^s$  はクラスター  $j$  の成員  $i$  が感染源である確率、 $P_i^t$  はその感染源  $i$  がクラスターを形成する（つまり感染源となる）確率である。かくして成員  $i$  は確率  $P_i^s$  で感染源であり、確率  $(1 - P_i^s)$  で二次患者である。この確率はクラスター成員全員について合算し（上式分母）、各成員についてはその相対値として表わす。

各成員の  $P_i^t$ 、 $IR_i$  は当初は不明。潜在的感染源で実際にはクラスター形成しない者の発生率は  $(1 - P_i^t) \times IR_i$  である。よって、ある国籍の感染源患者の発病率は次のようになる。

$$IR_i = IR_i^{nc} / (1 - P_i^t),$$

ここで  $IR_i^{nc}$  は非クラスター患者の属する亜集団における罹患率である。上 2 式から次式が成り立つ。

$$P_i^s = \left[ \{P_i^t / (1 - P_i^t)\} \times IR_i^{nc} \right] / \left[ \sum_{j(\text{cluster})} \{P_j^t / (1 - P_j^t)\} \times IR_j^{nc} \right]$$

..... (\*)

$P_i^t$  の解法として EM アルゴリズム ( $P_i^t$  を欠落データとして扱う) を用いる。初期値として推定値を用い、これから出発して収斂するまで順次 update していく。その推定初期値としては、すべての国籍に対して共通の値とする。また非クラスター患者の罹患率比は多重ポアソン回帰モデルにより推定する。非クラスター患者の罹患率（性、年齢階級、国籍別）はこれにベースラインの罹患率を乗じて求める。

上の式から  $P_i^s$  (初期推定値) =  $RR_i / \sum_{j(\text{cluster})} RR_j$ 、ただしクラスターの成員  $i$  に対して、

$$RR_i = RR_{\text{sex}} \times RR_{\text{age}} \times RR_{\text{nationality}}$$

である。 $P_i^s$ 、 $P_i^t$  の逐次計算は以下のように行う。

まず、国籍別の伝播指数 TI は次のように定義する。

TI = 二次患者数 (国籍問わず) ÷ (感染源患者数 + 非クラスター患者数)

分母は国籍別にみた潜在的感染源の総数である。患者を初感染発病に限定すればこれは  $R_e^{\text{FAST}}$  に近似する。平均して、短期間内では 1 人の感染源は二次患者を  $R_e^{\text{FAST}}$  人作る。 $R_e^{\text{FAST}}$  は実効初感染発病患者再生産率である。この患者がつくる 3 次発生、4 次発生は  $(R_e^{\text{FAST}})^2$ 、 $(R_e^{\text{FAST}})^3$  ... となるので、最初の患者から作られるすべての患者数は  $R_e^{\text{FAST}} < 1$  ならば、この級数和  $R_e^{\text{FAST}} / (1 - R_e^{\text{FAST}})$  となる。ゆえに

$$TI = R_e^{\text{FAST}} / (1 - R_e^{\text{FAST}}),$$

またこれから

$$R_e^{\text{FAST}} = TI / (1 + TI)$$

となる。上 2 式の matrix equivalents を用いて国籍別 TI を検討する。国籍別  $R_n$  も上の式で計算する。

二次患者の数はポアソン分布に従うとして、感染源に少なくとも 1 人の二次患者を作る確率、つまりクラスターを形成する確率  $P_i^t$  は、

$$P_i^t = 1 - \exp(-R_n)$$

となる。この式を式 (\*) の逐次計算に適用し収斂させる。

Borgdorff とも言っているように、この推定方式の問題は観察を短期間に限定していることで、感染の数年以上後に発生する患者、つまり  $R_e^{\text{SLOW}}$  を無視していることからくる伝播の過小評価である。

もう一つの問題はさらに根元的なもので、クラスター形成が必ずしも同一感染源からの感染を意味しないことがあるということである。オランダの観察ではクラスター形成した患者の 55% は疫学的な関連が不明であったという。しかしその一方で Borgdorff らは疫学的関連が確認された患者の 87% は同居家族や近い友人であったことからすれば、偶発的な接触による感染が上の「不明」

の相当部分を説明する可能性はあるとしている。

これらの問題についてじゅうぶん気をつけながら多剤耐性結核患者と一般の患者の伝播の問題に今後アプローチしていく必要がある。

## (2) RFLP 分析と VNTR 分析の問題点

IS6110-RFLP 分析、MIRU (12 locus)、MIRU プラス ETR (16 locus) の3つの分析法について、クラスター率で比較すると RFLP 分析が最もクラスター率が低くタイプング能力が最も高かった。しかし、個々の株を詳細に検討すると RFLP 分析で同一と判定された株でも VNTR 分析法で区別可能な例もあったことから、一概に IS6110-RFLP 分析の方が優れているとはいえないケースも存在する。VNTR 分析では、調べる locus 数を増やすとクラスター率が低くなりタイプング能力の上昇が観察された。

VNTR 法には、以下のような長所が存在する。すなわち、1) IS6110 のコピー数が少ない場合でも解析できる<sup>3)</sup>。2) PCR 法で DNA を増幅するので、純度が低い DNA (約 5 ng 程度) でも分析可能であり、菌を培養する必要が無く迅速 (1-2 日間) に結果が得られる。さらに、3) 結果がデジタルなので施設間での比較が容易である、などが考えられる。

97 株の解析結果から、今回 VNTR 分析に使った 12 カ所の MIRU と 4 カ所の ETR の合計 16 カ所すべてを調べるとタイプングできる可能性が最も高くなる。しかし、国外で報告されている例と異なり、国内の例では MIRU2, MIRU24, ETR-B 及び ETR-C の多様性が低かった。そのため、国内の結核菌を分類する際、それら 4 部位を省き、残り 12 カ所の VNTR を調べるのが、最も効率的であることが判った。一方、VNTR 法のタイプング能力を上昇させる方法として分析する locus 数を増やす方法、調べた locus

以外の多様性の高い部位を探す方法の 2 つが考えられる。調べる locus 数を増やすことは、それに対応するだけの PCR のチューブ数と分析の手間が増えるので、別の多様性の高い locus を探す方が現実的な対応と考えられる。

## E. 結論

分子疫学的検査に基づく感染伝播指数を用いた解析によって、新規感染・発病における住所不定患者の一般人口への影響が無視できないことが示唆された。また若年層においては同年齢層内での新規感染・発病が多く起こっていることが示された。

地域からの分離株について IS6110-RFLP 及び VNTR 分析を行った結果、VNTR 分析は IS6110-RFLP 分析よりタイプング能力が低いことがクラスター率の比較から明らかになった。しかし、VNTR 分析は結果が早く得られることから一次分析のために実用性は高い。またデジタルな結果表示も多施設での情報共有の上で利便性が大きく、特異度を改良することで今後はさらに利用の幅が広がると考えられる。

## F. 健康危機情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

- (1) 前田伸司. 抗酸菌遺伝子タイプング技術の実際的問題点. 第2回分子疫学研究会 (2005年9月、於東京)
- (2) 前田伸司. RFLP 解析のこれまでの成果と問題点、今後の VNTR 導入の課題. 第1回大都市における結核対策の推進に関する研究会 (2006年2月、於大阪). 第3回分子疫学研究会 (2006年3月、於清瀬) .

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1 新宿区におけるクラスター分析結果および推定罹患率

	患者	観測人年	罹患率	クラスター率
性				
女性	75	451,538	16.6	17.3%
男性	263	453,018	58.1	30.0%
年齢				
<30	44	273,649	16.1	43.2%
30-49	86	269,908	31.9	26.7%
50-59	72	130,376	55.2	31.9%
>60	136	230,624	59.0	19.9%
住所不定				
no	243	901,597	27.0	20.6%
yes	95	2,959	3210.5	44.2%

	非クラスター群		相対比		95%CI	
	患者	罹患率	調整なし	調整後		
性						
女性	62	13.7	1	1		
男性	184	40.6	3.0	2.4	1.8	3.2
年齢						
<30	25	9.1	1	1		
30-49	63	23.3	2.6	2.2	1.4	3.5
50-59	49	37.6	4.1	2.7	1.6	4.4
>60	109	47.3	5.2	4.5	2.9	7.0
住所不定						
no	193	21.4	1	1		
yes	53	1791.1	83.7	48.0	34.6	66.6

表2 患者背景別TI推定値

	TI	オッズ比
女性	0.04	1.0
男性	0.25	6.8
30歳未満	0.23	1.0
30-49歳	0.25	1.1
50-59歳	0.26	1.1
60歳以上	0.15	0.6
住所不定者以外	0.08	1.0
住所不定者以外	0.56	7.1

表 3.

クラスターを形成した患者の背景要因別感染源—2次発生患者内訳(推定値)

感染源		2次発生患者		
		ホームレス以外	ホームレス	計
住所不定者以外	11.4	15.2	0.9	16.1
住所不定者	20.6	21.4	19.5	40.9
計	32.0	36.6	20.4	57.0

感染源		2次発生患者		
		女性	男性	計
女性	1.5	0.8	1.5	2.4
男性	30.5	9.6	45.0	54.6
計	32.0	10.5	46.5	57.0

感染源		2次発生患者				計
年齢階級		30歳未満	30~49歳	50~59歳	60歳以上	
30歳未満	3.7	4.4	0.4	0.5	1.3	6.5
30~49歳	10.2	2.9	4.9	5.4	4.8	18.0
50~59歳	9.3	3.5	4.5	3.0	4.2	15.1
60歳以上	8.8	4.4	3.1	4.9	5.0	17.4
計	32.0	15.3	12.8	13.7	15.2	57.0

表 4. RFLP及びVNTR分析結果とクラスター率

分析法	IS6110-RFLP分析		12 MIRU		12 MIRU + 4 ETR	
	サイズ	頻度	サイズ	頻度	サイズ	頻度
結果	10	1	20	1	11	1
	4	3	9	1	5	2
	3	2	5	1	4	1
	2	6	4	2	3	2
		40	2	6	2	9
				54		49
クラスター率	41.20%	(40/97)	55.70%	(54/97)	50.50%	(49/97)