

## Original Article

THE EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT FOR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING BY PROFICIENCY TESTING PANEL TO THE COMMERCIAL LABORATORIES

Satoshi MITARAI

Committee for Mycobacterial Examinations, Japanese Society for Tuberculosis

**Abstract** [Objective] The Committee for Mycobacterial Examinations has programmed and implemented the external quality assessment for *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing by proficiency testing panel to the commercial laboratories that perform drug susceptibility testing more than 20 cases monthly.

[Method] It utilized 20 strains, exactly pairs of 10 strains, of *Mycobacterium tuberculosis* that were evaluated for the resistance pattern in the WHO/IUATLD supra-national laboratory network (SRLN), and the concordant results within SRLN were employed as the gold standard of the test. Each laboratory performed the drug susceptibility testing with routine method including the preparation of bacterial suspension.

[Results] As a result, the sensitivity for isoniazid (INH) was 95% on an average, ranging from 29% to 100%. The specificity and efficiency for INH were 100% and 97% (50–100), respectively. Additionally, the reproducibility for INH was 99% (90–100). Similarly, the sensitivity, specificity, efficiency and reproducibility for rifampicin (RFP) were 95% (63–100), 99% (67–100), 97% (70–100) and 98% (90–100), respectively. The sensitivity, specificity, efficiency and reproducibility for streptomycin (SM) were 66% (33–100), 94% (64–100), 86% (65–100) and 96% (80–100), respectively. For EB, the sensitivity, specificity, efficiency and reproducibility were 96% (33–100), 74% (57–86), 81% (60–90) and 96% (80–100), respectively.

[Discussion] The required standard for satisfactory results of sensitivity, specificity and reproducibility is 95%, and the results for INH and RFP were excellent on an average. However, several laboratories showed unsatisfactory results, especially in sensitivity. Almost all the discordant results for INH and RFP were false-susceptible comparing to the gold standard. For INH, one pair of tested strain showed discordant results in many evaluated laboratories and seemed to reflect the relatively low concordance even in SRLN. On the other hand, the reason for false-susceptible results for RFP was unclear. Several laboratories showed discordant results in one strain

pair so that it might be a technical mistake.

The sensitivity of SM was remarkably low and it was due to many false-susceptible results, which was twice the number of false-resistance. It was due to the character of tested strain partially considering relatively low concordance in SRLN. However, there was no persuasive explanation for the inconsistency in other strains that showed highly concordant results in SRLN. The difference of critical drug concentration in Löwenstein-Jensen and 1% Ogawa medium might contribute to the discrepancies.

The specificity of EB was low and it was due to many false-resistant results. About a specific pair of tested strain, almost 100% of laboratories showed concordant false-resistant results whereas SRLN showed perfectly concordant susceptible result. If this strain was considered as resistant and another strain that showed less than 70% concordance in the tested laboratories was excluded, the sensitivity, specificity and efficiency would improve to 96%, 97% and 97%, respectively.

The proficiency testing is a part of external quality assessment system and requires following corrective actions. A permanent quality improvement and maintenance will be expected through the spiral circulation of quality assurance activities.

**Key words:** Tuberculosis, Drug susceptibility testing, Quality Control, Commercial laboratory, External quality assessment

Bacteriology Division, *Mycobacterium* Reference Centre, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Satoshi Mitarai, Bacteriology Division, *Mycobacterium* Reference Centre, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan.  
(E-mail: mitarai@jata.or.jp)

## Association of *rpoB* mutations with rifampicin resistance in *Mycobacterium avium*

Saiko Obata<sup>a,b</sup>, Zofia Zwolska<sup>c</sup>, Emiko Toyota<sup>b</sup>, Koichiro Kudo<sup>b</sup>, Akio Nakamura<sup>a</sup>,  
Tetsuo Sawai<sup>a</sup>, Tadatoshi Kuratsuji<sup>d</sup>, Teruo Kirikae<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

<sup>b</sup> International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan

<sup>c</sup> National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases, Plocka Street 26, Warsaw 01-138, Poland

<sup>d</sup> National Research Institute for Child Health and Development, Okura 2-10-1, Setagaya 157-8535, Japan

Received 22 February 2005; accepted 2 September 2005

### Abstract

The susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium avium* to rifampicin (RIF) was examined. All 32 clinical isolates tested, including 18 from Japan, 13 from Poland and 1 from Thailand, were resistant to RIF (minimum inhibitory concentrations (MICs)  $\geq 32$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 17 isolates and 2–16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 15 isolates), whereas the type strain of *M. avium* ATCC 25291 was susceptible to RIF (MIC  $\leq 0.03$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Mutations in nucleotides 1276–1356 of the *rpoB* gene, termed the 81 bp core region, are associated with RIF resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. No mutations were found in this region in any of the *M. avium* clinical isolates tested. However, mutation of G  $\rightarrow$  A to give a Gly544  $\rightarrow$  Asp substitution was identified within the *rpoB* gene downstream of the 81 bp region in all clinical isolates. A RIF-resistant strain (ATCC 25291 Rif<sup>r</sup>; MIC  $\geq 32$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtained by culturing the type strain in RIF-containing broth possessed a mutation C  $\rightarrow$  T to give a His445  $\rightarrow$  Tyr substitution within the 81 bp region. When the *rpoB* gene of the ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> strain and of a clinical isolate were inserted into *Mycobacterium smegmatis*, organisms with the ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> sequence, but not those with the clinical isolate sequence, showed resistance to RIF. These results suggest that mutations of the 81 bp region of *rpoB*, as well as factors other than *rpoB* mutation, confer RIF resistance in *M. avium*.

© 2005 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

**Keywords:** *Mycobacterium avium*; Rifampicin; *rpoB*

### 1. Introduction

*Mycobacterium avium* is a non-tuberculous mycobacterium associated with life-threatening infections in patients with chronic obstructive lung disease, immunocompromised individuals such as HIV-infected patients and, occasionally, in individuals without apparent predisposing conditions [1,2]. *Mycobacterium avium* infection in the absence of other diseases is occasionally associated with frequent exposure to environmental organisms such as those found in bath water [3,4].

According to guidelines proposed by the American Thoracic Society, four-drug chemotherapy consisting of rifampicin (RIF), clarithromycin, streptomycin and ethambutol, is used to treat against *M. avium* pulmonary disease [2]. However, results show variable success, ranging from 40% to 91% [5]. Most *M. avium* clinical isolates are thought to be resistant to RIF in vitro [6]. Agreement regarding the indications for susceptibility testing is lacking [7].

The mechanisms of RIF resistance in *M. avium* have yet to be defined [8–10]. RIF resistance in *Mycobacterium tuberculosis* as well as in a number of bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* has been shown to result from a restricted set of mutations in the *rpoB* gene, which encodes the  $\beta$  subunit of RNA polymerase [11–14]. RIF acts to inhibit mRNA synthesis in bacteria by binding to the

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3202 7181x2838; fax: +81 3 3202 7364.

E-mail address: tkirikae@ri.imcj.go.jp (T. Kirikae).

RNA polymerase  $\beta$  subunit (RpoB) [15,16]. The RIF binding site consists of a pocket located on the upper wall of the main channel for double-stranded DNA entry, upstream of the polymerase catalytic centre [14]. Various RIF resistance mutations are clustered around this pocket [17]. In RIF-resistant *M. tuberculosis*, mutations in the *rpoB* gene have been found in 95–100% of clinical isolates [13]. Most of the mutations are located between nucleotides 1276 and 1356 (codons 426–452), a region termed the 81 bp core region [18].

In the present study, we examined whether mutations in the *rpoB* gene of clinical isolates and of a RIF-resistant laboratory strain of *M. avium* exist and whether such mutations participate in RIF resistance.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains and plasmid DNA

A total of 32 clinical isolates of *M. avium* were used in this study. Eighteen were obtained from the International Medical Center of Japan, Tokyo, 13 were from the National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases in Warsaw, Poland, and 1 was provided by T. Chotpitayasunondh, Sirikit National Institute of Child Health, Bangkok, Thailand. These clinical isolates were each derived from a separate patient. *Mycobacterium avium* was identified with COBAS AMPLICOR™ *M. avium* Test (Roche Diagnostic, Tokyo, Japan). *Mycobacterium avium* ATCC 25291 and *Mycobacterium smegmatis* ATCC 700084 were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and XL2-Blue strains were from Toyobo Co., Ltd. (Osaka, Japan) and Stratagene (La Jolla, CA), respectively. The *E. coli* mycobacterial shuttle vector pGFM-11 [19] was provided by C. Loch, Pasteur Institute, Lille, France. pGFM-11 was digested with *Pst*I, resulting in deletion of the *gfp* gene, and the digested plasmid, named pM-11, was used as a vector for cloning and expression.

Plasmid DNA was isolated and purified with a NucleoSpin Plasmid Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) for small-scale purification and a QIAGEN Large-Construct Kit (QIAGEN K.K., Tokyo, Japan) for large-scale purification. *Mycobacterium* spp. were grown and maintained at 37 °C in Ogawa egg-based medium (Kyokuto Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan). *Escherichia coli* was cultured at 37 °C in Luria–Bertani (LB) broth (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) and maintained on LB agar plates (Nacalai Tesque).

### 2.2. Antimicrobial agents

RIF and kanamycin were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) and Nacalai Tesque, respectively. RIF was dissolved in methanol at 5 mg/mL and diluted in Middlebrook 7H9 broth medium (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) supplemented with 10% v/v BBL™

Middlebrook OADC (oleic acid, albumin, dextrose and catalase) enrichment (BD Diagnostic Systems) and 0.2% glycerol (7H9-OADC). Kanamycin was dissolved in sterilised distilled water at 50 mg/mL and stored at –20 °C.

### 2.3. Derivation of a RIF-resistant strain by serial passage

A RIF-resistant *M. avium* strain, ATCC 25291 Rif<sup>r</sup>, was obtained by culturing the RIF-susceptible strain ATCC 25291 in the presence of RIF. Briefly, ATCC 25291 was grown on egg-based medium and then in 7H9-OADC at 37 °C until heavy growth was visible (ca. 2 weeks). The suspension was then inoculated into 7H9-OADC containing 1  $\mu$ g/mL RIF. Every 3 or 4 days, the suspension was passaged six times in fresh 7H9-OADC containing RIF at two-fold increasing concentrations up to 32  $\mu$ g/mL. Organisms growing in the medium containing 32  $\mu$ g/mL RIF were plated onto Middlebrook 7H10 agar (BD Diagnostic Systems) supplemented with Middlebrook OADC enrichment (7H10-OADC agar) and 32  $\mu$ g/mL RIF. Plates were incubated in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C until colonies formed. Organisms from a single colony, named *M. avium* ATCC 25291 Rif<sup>r</sup>, were isolated and maintained in 7H9-OADC containing 32  $\mu$ g/mL RIF.

### 2.4. RIF susceptibility testing

A broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of RIF. A serial two-fold dilution of RIF was prepared in 100  $\mu$ L/well 7H9-OADC in 96-well plates (Nalge Nunc International, Rochester, NY). Clinical isolates of *M. avium* ATCC 25291 and ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> grown on egg-based medium were inoculated into 7H9-OADC and grown for 2 weeks. The turbidity of the bacterial suspension was adjusted to McFarland value No. 1 (OD<sub>530</sub> 0.16) with 7H9-OADC. The adjusted bacterial suspension was diluted at 1:100, and then 100  $\mu$ L/well was added to 7H9-OADC containing RIF in 96-well plates. The plates were cultured in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. MICs were determined 7–14 days after culture when sufficient bacterial growth in the RIF-free control well was observed. As described in Section 3.1, the ATCC 25291 strain was sensitive to RIF. Therefore, the strain was used as a standard strain for the determination of MICs. Intermediate and high resistance to RIF were defined as MICs of 2–16  $\mu$ g/mL and  $\geq$ 32  $\mu$ g/mL, respectively.

### 2.5. Bacterial DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) amplification of the *rpoB* gene

Genomic DNA of *M. avium* strains was extracted with DNAzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions and was stored at –20 °C until used in PCR. *rpoB* genes from ATCC 25291, ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> and all clinical isolates were amplified by PCR. The PCR

Table 1  
Polymerase chain reaction (PCR) primers

Primer	Sequences (5' → 3') <sup>a</sup>	Expected PCR product in <i>rpoB</i> <sup>b</sup>
MA-F1 MA-R1a	GCATCATGCATTTTGGCAGATTTCCGCCAGAGCAAGACGGA GTTGGATGCATTTAAGCCAGGTCCTCGACGGACGCGGAT	1–3510
MA-F1 MA-R1b	GCATCATGCATTTTGGCAGATTTCCGCCAGAGCAAGACGGA CGCTCCCGGGACAGACCA	1–1382
MA-F2 MA-R2	AGGAGAAGCGCTACGACC CTCCTCGGGCGCCAGCTT	887–2286
MA-F3a <sup>c</sup> MA-R1a	CGTGTGACGTCCATCCACAT GTTGGATGCATTTAAGCCAGGTCCTCGACGGACGCGGAT	2217–3510
MA-F3b <sup>d</sup> MA-R1a	ACGTGCTCACCTCGATCC GTTGGATGCATTTAAGCCAGGTCCTCGACGGACGCGGAT	2216–3510

<sup>a</sup> Underlined letters represent restriction enzyme sites.

<sup>b</sup> Numbers represents nucleotide positions of *rpoB*.

<sup>c</sup> The primer was designed for *rpoB* of *Mycobacterium avium* ATCC 25291 and ATCC 25291 Rif<sup>r</sup>.

<sup>d</sup> The primer was designed for *rpoB* of *M. avium* P.15.

products were sequenced to detect mutations in *rpoB*. The complete DNA sequence of the *M. avium rpoB* has not been reported, although some of the genomic sequence of *M. avium* 104 strain is published in TIGR (The Institute for Genomic Research, Rockville, MD) database. The *M. avium rpoB* DNA sequence was identified by a BLAST search of the published genomic sequence of *M. avium* 104 against the *rpoB* DNA sequence of *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank Accession No. NC\_000962). PCR to amplify the *rpoB* gene was based on the obtained *M. avium rpoB* sequence. Briefly, the DNA template was amplified in 25 µL reaction solution containing 0.875 U Expand High Fidelity Enzyme Mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 0.3 µM primers, (1 × Q-) Solution (QIAGEN Inc., Valencia, CA) and 1 × PCR buffer (Roche Applied Science). A pair of PCR primers, MA-F2 and MA-R2, was designed to amplify 1400 bp of the 887–2286 region containing the 81 bp core region (nucleotides 1276–1356; codons 426–452) of *M. tuberculosis*, in which a mutation is known to be responsible for at least 96% of RIF-resistant *M. tuberculosis* isolates (Table 1) [13,14]. In addition to the MA-F2 and MA-R2 primer pair, two pairs (MA-F1 and MA-R1b; and MA-F3a and MA-R1a) for *M. avium* ATCC 25291 and ATCC 25291 Rif<sup>r</sup>, and two pairs (MA-F1 and MA-R1b; and MA-F3b and MA-R1a) for *M. avium* P.15 were designed to amplify partially the sequence of *rpoB* gene (Table 1). PCR was carried out with a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) and consisted of an initial 2 min denaturation at 94 °C followed by 30 cycles of 94 °C denaturation for 15 s, 60 °C annealing for 30 s, 72 °C elongation for 1 min and a final elongation at 72 °C for 7 min.

## 2.6. DNA sequencing of *rpoB* and analysis of sequence homology

PCR products of *rpoB* were purified with a Microcon YM-30 filter (Millipore Corp., Bedford, MA) and the sequencing

reaction was performed with an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide and amino acid sequence homology were analysed with the GENETYX-WIN software system (Software Development, Co., Ltd., Tokyo, Japan).

## 2.7. PCR cloning of *rpoB*

The *rpoB* genes of *M. avium* ATCC 25291 and ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> strains as well as a clinical isolate (P.15) were cloned and inserted into the *E. coli* mycobacterial shuttle vector pM-11 to construct pMA1, pMA2 and pMA3, respectively. PCR cloning primers with the *EcoT22I* site in both the 5' and 3' primers, MA-F1 and MA-R1a, were designed to amplify *rpoB* (Table 1). Genomic DNA of *M. avium* ATCC 25291, *M. avium* ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> and *M. avium* P.15 was amplified in 50 µL reaction volume containing deoxynucleotide triphosphate (0.2 mM) (Takara Bio Inc.), 2.5 U Easy-A™ High Fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene), 0.1 µM primers, 1 × Q-Solution and 1 × provided PCR buffer. The amplification was carried out in a GeneAmp PCR System 9700. The amplification reaction consisted of an initial 2 min denaturation at 95 °C followed by 30 cycles of 95 °C denaturation for 40 s, 60 °C annealing for 30 s, 72 °C elongation for 4 min and a final elongation at 72 °C for 7 min. PCR products were treated with *EcoT22I*, electrophoresed on 1% agarose gels (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) to separate the products, and purified from the gels with a Sephaglas™ BandPrep Kit (Amersham Biosciences). Purified PCR products were ligated into the *PstI* site of the pGFM-11 vector with DNA Ligation Kit ver 2.1 I Solution (Takara Bio Inc.) according to the manufacturer's instructions. The plasmid was transformed into *E. coli* DH5α or *E. coli* XL2-Blue strains by heat shock. Transformants were plated onto LB agar containing 50 µg/mL kanamycin. The transformants were subcultured in LB broth containing 50 µg/mL kanamycin and the plasmid DNA was extracted from *E. coli* and purified with a NucleoSpin Plasmid Kit

Table 2  
Bacterial strains and plasmids used for cloning

Strains or plasmids	Characteristics	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> 80dlaclacZYA-argF)U169 <i>deoR relA1 endA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1 gryA96 relA1</i>	Toyobo Co. Ltd
<i>Mycobacterium avium</i> ATCC 25291	Rifampicin-susceptible strain	
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 700084	Rifampicin-resistant strain (MIC = 16 μg/mL)	
<b>Plasmids</b>		
pGFM-11	Kanamycin-resistant, <i>E. coli</i> –mycobacterial shuttle vector	[19]
pM-11	Kanamycin-resistant, pGFM-11 with deletion of 730 bp <i>Pst</i> I fragment ( <i>gfp</i> gene)	This study
pMA1	Kanamycin-resistant, pM-11 with 3.5 kbp <i>Eco</i> T22I fragment of <i>rpoB</i> gene of <i>M. avium</i> ATCC 25291 strain	This study
pMA2	Kanamycin-resistant, pM-11 with 3.5 kbp <i>Eco</i> T22I fragment of <i>rpoB</i> gene of <i>M. avium</i> ATCC 25291 Rif <sup>r</sup> strain	This study
pMA3	Kanamycin-resistant, pM-11 with 3.5 kbp <i>Eco</i> T22I fragment of <i>rpoB</i> gene of <i>M. avium</i> P.15 strain	This study

according to the manufacturer's instructions. The *rpoB* insert was sequenced using the sequencing primers to ensure that the cloning procedure did not cause additional mutations to the cloned genes. pM-11 was used as a control. Plasmid DNA from each strain was prepared with a QIAGEN Large-Construct Kit, according to the manufacturer's instructions, to obtain a total of 400 μg plasmid DNA for electroporation. Plasmid DNA genotypes are listed in Table 2.

### 2.8. Electroporation into *M. smegmatis*

Electroporation of plasmid DNA pM-11, pMA1, pMA2 or pMA3 into *M. smegmatis* ATCC 700084 was performed as described by Parish and Stoker [20], in 0.2 cm gap width electroporation cuvettes (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) in a Gene Pulser II Electroporation System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) at room temperature, 2.5 kV, 25 μF and 1000 Ω. Transformants were incubated in 7H9-OADC agar at 37 °C for 4 h. After incubation, the organisms were plated onto 7H10-OADC agar containing 50 μg/mL kanamycin and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> until colonies formed. The colonies were inoculated into 7H9-OADC agar and cultured for 4 days. DNA was extracted from the transformants with DNAzol Reagent. The presence of plasmid DNA in the transformants was confirmed by DNA sequencing. RIF susceptibility of *M. smegmatis* with or without plasmid DNA pM-11, pMA1, pMA2 or pMA3 was determined.

## 3. Results

### 3.1. RIF susceptibility

RIF susceptibility of ATCC 25291 and ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> strains and of 32 clinical isolates was examined (Table 3). ATCC 25291 was susceptible to RIF (MIC ≤ 0.03 μg/mL), whereas ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> was resis-

tant to RIF (MIC > 32 μg/mL). All clinical isolates were variably resistant to RIF (MIC ≥ 2 μg/mL) (Table 3). Seventeen clinical isolates (53.1%) were highly resistant to RIF (MIC ≥ 32 μg/mL) and 15 isolates (46.9%) showed intermediate resistance to RIF (MIC 2–16 μg/mL). The majority of isolates obtained from Japan (16/18; 88.8%) were highly resistant to RIF, 12/13 (92.3%) isolates obtained from Poland and one from Thailand showed intermediate resistance to RIF.

### 3.2. DNA sequencing of the 81 bp core region of *rpoB*

The 81 bp core region of *rpoB*, containing nucleotides 1276–1356 and corresponding to amino acid codons 426–452, is responsible for RIF resistance in *M. tuberculosis* [13]. The DNA sequence of this region was determined in the two laboratory strains and in all clinical isolates of *M. avium* tested. A C → T point mutation at nucleotide position 1333 was detected in the ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> strain compared with the parent strain (Fig. 1). The mutation resulted in amino acid substitution His445 → Tyr. The DNA sequence of the 81 bp core region of *rpoB* was identical in all 32 clinical isolates tested and in the ATCC 25291 strain. When compared with the DNA sequence of *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium* ATCC 25291 and the clinical isolates tested showed six different nucleotides in this region. However, the amino acid sequence of this region in *M. tuberculosis* H37Rv was identical to those of *M. avium* ATCC 25291 and the clinical isolates.

### 3.3. DNA sequencing of the region downstream of the 81 bp core region

Because no mutations were found in the 81 bp core region in the clinical isolates, the DNA sequence of the region downstream of the 81 bp core region in *rpoB*, nucleotides 1357–1638 corresponding to amino acids 453–546, were determined in the laboratory strains and in all clinical

Table 3  
Rifampicin susceptibility of *Mycobacterium avium* strains used in this study, and mutations detected in the region of the *rpoB* gene from 1357 to 1638 bp in clinical isolates of *M. avium*

Strain	Origin	Rifampicin MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	Codon (amino acid substitution, position) containing a mutation at position <sup>b</sup>										
			1407	1425	1479	1491	1495	1530	1548	1554	1563	1631	
ATCC 25291	Demark	$\leq 0.03$	GTG (Val 469)	GGC (Gly 475)	TCC (Ser 493)	TAC (Tyr 497)	CGG (Arg 499)	TAC (Tyr 510)	GGC (Gly 516)	GTC (Val 518)	GAG (Glu 521)	GGC (Gly 544)	
ATCC 25291 Rif	Lab.	>32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IMCJ.1	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.2	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.3	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.4	Japan	>32	-	-	-	-	-	TAI	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.5	Japan	32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.6	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.7	Japan	32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.8	Japan	2	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.9	Japan	>32	-	-	-	-	-	-	-	GTG	-	GAC	
IMCJ.10	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.11	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.12	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.13	Japan	32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.14	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.15	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.16	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.17	Japan	>32	-	-	TCA	-	-	-	GGA	-	-	GAC	
IMCJ.18	Japan	16	-	-	TCA	-	-	TAI	GGA	-	-	GAC	
P.2	Poland	2	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.3	Poland	4	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.4	Poland	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GAC	
P.5	Poland	8	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.9	Poland	2	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.11	Poland	4	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.12	Poland	8	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.13	Poland	2	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.14	Poland	8	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.15	Poland	32	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.16	Poland	16	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.18	Poland	16	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
P.19	Poland	16	-	-	-	TAI	-	-	-	-	-	GAC	
T.1	Thailand	8	GTA	GGG	-	-	AGG	-	-	-	-	GAC	

- , same nucleotide as that of the ATCC 25291 strain.

<sup>a</sup> Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by microdilution.

<sup>b</sup> Base changes are underlined.

		GlyThrSerGlnLeuSerGlnPheMetAspGlnAsnAsnProLeuSerGlyLeuThrHisLysArgArgLeuSerAla	
<i>M. avium</i> ATCC 25291	426	GGCACCAGCCAGCTGTCCAGTTTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGGGGCTCACCCACAAGCGCCCTGTCTGGCG	451
<i>M. avium</i> P. 15		.....	
<i>M. avium</i> ATCC 25291 Rif <sup>r</sup>		.....T.....	
		Tyr	
		LeuGlyProGlyGlyLeuSerArgGluArgAlaGlyLeuGluValArgAspValHisProSerHisTyrGlyArgMet	
<i>M. avium</i> ATCC 25291	452	CTGGGCCCGGGTGGTCTGTCCCGGAGCGGGCCGGCTGGAGGTCCGCGACGTGCACCCGTCCCTACGGCCGGATG	477
<i>M. avium</i> P. 15		.....	
<i>M. avium</i> ATCC 25291 Rif <sup>r</sup>		.....	
		CysProIleGluThrProGluGlyProAsnIleGlyLeuIleGlySerLeuSerValTyrAlaArgValAsnProPhe	
<i>M. avium</i> ATCC 25291	478	TGCCCGATCGAGACCCCGAGGGTCCCAACATCGGTCGTATCGGCTCGTGTGTACGGCGGGTCAACCCGTTC	503
<i>M. avium</i> P. 15		.....T.....	
<i>M. avium</i> ATCC 25291 Rif <sup>r</sup>		.....	
		GlyPheIleGluThrProTyrArgLysValValAspGlyValValThrAspGluIleHisTyrLeuThrAlaAspGlu	
<i>M. avium</i> ATCC 25291	504	GGGTTTCATCGAGACGCCGTACCGAAGGTGGTCGACGGCGTGGTCACCGAGATCCACTACGTACCGCCGACGAG	529
<i>M. avium</i> P. 15		.....	
<i>M. avium</i> ATCC 25291 Rif <sup>r</sup>		.....	
		GluAspArgHisValValAlaGlnAlaAsnSerProIleAspGlyLysGly	
<i>M. avium</i> ATCC 25291	530	GAGGACCGCCACGTGGTGGCGCAGGCCAACTCGCCGATCGACGGCAAGGGC	546
<i>M. avium</i> P. 15		.....A.....	
		Asp	
<i>M. avium</i> ATCC 25291 Rif <sup>r</sup>		.....	

Fig. 1. Alignment of the nucleotide sequence and corresponding amino acid sequence of the 81 bp core region (amino acids 426–452) and downstream region (amino acids 453–546) of *Mycobacterium avium* strains ATCC 25291, P.15 and ATCC 25291 Rif<sup>r</sup>. Numbers indicate the amino acid positions of *M. avium* *rpoB*.

isolates. No mutations were found in this region in the ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> strain in comparison with the sequence of the parent strain. However, a G → A point mutation at nucleotide 1631 leading to amino acid substitution of Gly544 → Asp was found in this region in all clinical isolates. In addition, point mutations at nine other positions, which did not lead to amino acid substitutions, were found in the clinical isolates but not in the ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> strain. These mutations were G → A at nucleotide 1407, C → G at 1425, G → A at 1479, C → T at 1491, C → A at 1495, C → T at 1530, C → A at 1548, C → G at 1554 and G → A at 1563 (Table 3; Fig. 1). The number of these silent mutations varied among the isolates and ranged from one to three. Of 18 isolates obtained from Japan, 15 (83.3%) and 17 (94.4%) possessed mutations of G → A at 1479 and C → A at 1548, respectively, and 15 (83.3%) possessed both mutations. Two isolates obtained from Japan, IMCJ.4 and IMCJ.17, possessed three mutations of C → T at 1530, C → A at 1548 and G → A at 1563. One isolate, IMCJ.15 possessed three mutations of G → A at 1479, C → A at 1548 and G → A at 1563. Of 13 isolates obtained from Poland, 12 (92.3%) possessed a mutation of C → T at 1491. The isolate obtained from Thailand, T.1, possessed three mutations of G → A at 1407, C → G at 1425 and C → A at 1495.

#### 3.4. DNA sequencing of the complete *rpoB* gene from *M. avium* ATCC 25291, ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> and clinical isolate P.15

The sequence of the complete open reading frame of *rpoB* was determined in *M. avium* ATCC 25291 and ATCC 25291

Rif<sup>r</sup>, and in the clinical isolate P.15. All showed the same size *rpoB* gene (3510 bp). The *M. avium* ATCC 25291 *rpoB* nucleotide sequence was 89% homologous to that of *M. tuberculosis* H37Rv (3519 bp), and the amino acid sequence was 94% homologous to that of *M. tuberculosis* H37Rv. There were two mutations in ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> *rpoB* in comparison with the parent strain: one was a mutation of C → T at nucleotide 1333 that led to amino acid substitution His445 → Tyr, and the other was a silent mutation at nucleotide 570. In the clinical isolate 16 mutations were identified, of which one mutation of G → A at nucleotide 1631 led to the amino acid substitution Gly554 → Asp described above. The other 15 mutations did not lead to any amino acid substitutions.

#### 3.5. RIF susceptibility of *M. smegmatis* transformed with the *M. avium* *rpoB* gene

The *rpoB* genes of *M. avium* ATCC 25291, ATCC 25291 Rif<sup>r</sup> and the clinical isolate P.15 were cloned into pM-11, as described in Section 2.7. The genes were expressed in *M. smegmatis* because expression was not successful in *M. avium* ATCC 25291 and because it was reported that pAL5000, the ancestor of pM-11, is unable to transform members of the *M. avium* complex [6,21]. MICs of RIF for the transformants were then determined (Table 4). *Mycobacterium smegmatis* ATCC 700084 was relatively resistant to RIF (MIC 16 µg/mL) in comparison with *M. avium* ATCC 25291. MICs for *M. smegmatis* ATCC 700084 organisms carrying pM-11, pMA1 (ATCC 25291) and pMA3 (P.15) were 16 µg/mL,

Table 4

Rifampicin minimum inhibitory concentrations (MICs) for transformants of *Mycobacterium smegmatis* strain ATCC 700084

Strain	Plasmid <sup>a</sup>	Characteristic	Rifampicin MIC (µg/mL)
	None	Host strain	16
	pM-11	Transformant harbouring cloning vector for <i>M. avium</i> <i>rpoB</i> gene	16
	pMA1	Transformant harbouring the wild-type <i>rpoB</i> gene ligated to pM-11	16
	pMA2	Transformant harbouring <i>rpoB</i> gene with an amino acid substitution His445 → Tyr ligated to pM-11	64
	pMA3	Transformant harbouring <i>rpoB</i> gene with an amino acid substitution Gly544 → Asp ligated to pM-11	16

<sup>a</sup> Characteristics of plasmids are cited in Table 2.

identical to that of the parent strain. The MIC for the *M. smegmatis* ATCC 700084 strain carrying pMA2 (ATCC 25291 Rif<sup>r</sup>) was significantly greater (64 µg/mL).

#### 4. Discussion

It has been reported that *M. avium* isolates associated with human disease are more resistant to RIF than are isolates from natural sources [22]. In fact, all clinical isolates tested in this study, obtained from three geographically separate countries, were relatively resistant to RIF. On the other hand, the parental ATCC 25291 strain isolated from lesions of a hen [23] was quite sensitive to RIF. The number of *M. avium* and *Mycobacterium intracellulare* isolates that are significant in human disease is related to the number of isolates from environmental sources such as soil and house dust [22]. Unsuitable management of bath water occasionally causes waterborne *M. avium* infection [3,4]. These data suggest that some, but not all, strains of *M. avium* existing in the environment are able to infect humans and to cause chronic pulmonary disease. The virulence of *M. avium* strains is probably associated with drug resistance.

Mutation of the 81 bp core region of *rpoB* participates in RIF resistance in *M. avium*; a mutation was identified in the RIF-resistant laboratory Rif<sup>r</sup> strain. *Mycobacterium smegmatis* expressing the *rpoB* gene of the clinical isolate P.15 was resistant to RIF, but not more than the parent strain. Two RIF-resistant isolates from Belgium and the USA were reported to possess a mutation causing an amino acid substitution; however, whether they were clinical isolates was not mentioned [11].

Factors other than *rpoB* mutations may participate in RIF resistance in clinical isolates of *M. avium*. No mutations were identified in the 81 bp core region of *rpoB* in any clinical isolate in this study. A point mutation leading to an amino acid substitution was identified at nucleotide 1631 in the region downstream from the 81 bp core region in all clinical isolates. Nevertheless, the *M. smegmatis* strain expressing clinical isolate P.15 *rpoB* was not more resistant to RIF than the parent strain. These results indicate that mutations in *rpoB* are not associated with RIF resistance in the clinical isolates of *M. avium*. However, we cannot rule out the possibility that the *rpoB* gene of Japanese isolates that are more resistant to RIF than P.15 was associated with the RIF resistance. In addition,

the level of RIF resistance of the clinical isolates differed. For example, most isolates obtained from Japan were highly resistant to RIF, whereas most isolates obtained from Poland or Thailand showed intermediate resistance (Table 3), suggesting that these isolates may possess different mechanisms of RIF resistance. A permeability barrier to RIF has been reported in *M. intracellulare* [8]. Efflux pumps may remove RIF in some *Mycobacterium* spp., but they appear to have little effect on accumulation of the drug [24]. Ribosylation of RIF has also been reported in fast-growing *Mycobacterium* strains such as *M. smegmatis* [25].

#### Acknowledgments

This paper is dedicated to Iwao Ojima, leader of the International Projects on Anti-Tuberculosis Drug Discovery, in honour of his 60th birthday on 5 June 2005. We thank M. Nakano (Jichi Medical School, Tochigi Prefecture, Japan) for comments on the manuscript. This study was supported by Health Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare (H15-SHINKO-3).

#### References

- [1] Benson CA. Disease due to the *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS: epidemiology and clinical syndrome. Clin Infect Dis 1994;18(Suppl 3):S218–22.
- [2] Horsburgh Jr CR. Epidemiology of mycobacterial diseases in AIDS. Res Microbiol 1992;143:372–7.
- [3] Takahara M, Kano T, Aiyoshi M, et al. Pulmonary *Mycobacterium avium* infection in an immunocompetent aged woman related to use of home bath with a circulating water system. Jpn J Infect Dis 2002;55:213–24.
- [4] Watando A, Toyota E, Mori N, et al. Pulmonary *Mycobacterium avium* infection in an immunocompetent young adult related to use of home bath with a circulating water system. Jpn J Infect Dis 2001;54:151–2.
- [5] Heifets L. Susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex isolates. Antimicrob Agents Chemother 1966;40:1759–67.
- [6] Guilhot C, Gicquel B, Martin C. Temperature-sensitive mutants of the *Mycobacterium* plasmid pAL5000. FEMS Microbiol Lett 1992;77:181–6.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes. 2nd ed. Tentative Standard M24-T2. Wayne, PA: NCCLS; 2000.



- [8] Hui J, Gordon N, Kajioka R. Permeability barrier to rifampin in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;11:773–9.
- [9] Aubry-Damon H, Soussy CJ, Courvalin P. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2590–4.
- [10] Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Guriev SO, et al. RNA polymerase rifampicin resistance mutations in *Escherichia coli*: sequence changes and dominance. *Mol Gen Genet* 1983;190:344–8.
- [11] Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2380–6.
- [12] Portillo-Gomez L, Nair J, Rouse DA, et al. The absence of genetic markers for streptomycin and rifampicin resistance in *Mycobacterium avium* complex strains. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:1049–53.
- [13] Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:496–514.
- [14] Zhang G, Campbell EA, Minakhin L, et al. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 1999;98:811–24.
- [15] Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 2001;104:901–12.
- [16] McClure WR, Cech CL. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem* 1978;253:8949–56.
- [17] Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341:647–50.
- [18] Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatfull GF, Jacobs Jr WR, editors. *Molecular genetics of mycobacteria*. Washington, DC: ASM Press; 2000.
- [19] Kremer L, Baulard A, Estaquier J, et al. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol Microbiol* 1995;17:913–22.
- [20] Parish T, Stoker NG. Electroporation of mycobacteria. In: Parish T, Stoker NG, editors. *Mycobacteria protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 1998.
- [21] Casali N, Ehrt S. Plasmid vectors. In: Parish T, Stoker NG, editors. *Mycobacterium tuberculosis protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2001.
- [22] Engbaek HC, Runyon EH, Karlson AG. *Mycobacterium avium* Chester. *Int J Syst Bacteriol* 1971;21:192–6.
- [23] Saito H, Tomioka H, Sato K, et al. Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1998;27:994–7.
- [24] Piddock LJ, Williams KJ, Ricci V. Accumulation of rifampicin by *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:159–65.
- [25] Dabbs ER, Yazawa K, Mikami Y, et al. Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1007–9.



## 解説

# 結核症の分子疫学\*

高橋光良\*\*

Key Words : tuberculosis, molecular epidemiology

### まえがき

先進工業国では18~19世紀に猛威をふるった結核の蔓延はその後大戦, スペイン風邪の時期以外は通して着実に低下してきたが, 途上国では一向に改善しないどころか, じわじわと悪化の一途をたどっている. また, 1990年代以降には多くの先進国においても逆転上昇や改善の停滞がみられている. 結果として全地球的には結核はいまだに増加傾向を保っている. 現在, 結核は単一原因菌による感染症としてはもっとも死亡率が高く, 毎年200~300万人がこれにより死亡している<sup>1)</sup>. また, 全世界人口の1/3が結核菌に感染していると考えられており, もしこの傾向が続けば, 今後20年間で2億人が結核を発症する危険がある. さらに近年は結核対策に関連してとくに2つの主要な問題が浮上している. 結核菌とヒト免疫不全ウイルス(HIV)との重感染, 抗結核薬に対する耐性菌の増加である.

近年, 分子生物学的手法が感染症の対策に応用されるようになった. 臨床材料からの原因微生物の検出のために, PCRやほかの核酸増幅法による菌特異的な遺伝子の増幅が行われている<sup>2)~4)</sup>. また, 病原菌の薬剤耐性の分子メカニズムが解明されたことから, 薬剤耐性の有無を遺伝子レベルで検出することが可能になった<sup>4)~8)</sup>. 過去10年間, 多くの菌種特異的遺伝子マーカーが菌種以下レベルでの株間の差異, その安定性などに

ついてさまざまに研究されるようになった<sup>9)~13)</sup>.

1980年代以前には, 結核菌株のタイピングはファージタイピング, および薬剤感受性のパターンを比較する方法に限られていた. 結核菌の遺伝子タイピングは1988年にEisenach<sup>14)</sup>によりはじめて報告され, 挿入断片IS6110を用いたDNA指紋法が1990年の初めに標準法として開発・確立された<sup>15)~18)</sup>. このタイピングは当初もっぱら集団発生が想定される複数患者からの菌株間の関連の検討に用いられた. この技術は1980~1990年代の米国での結核逆転上昇の最中に導入され, そのなかで多剤耐性結核菌による大規模な院内・施設内感染の確認に応用されるなどして, その有用性を世にアピールした<sup>19)~21)</sup>.

疫学研究における遺伝子タイピングの有用な応用例としては, 外来性再感染発病と内因性再燃発病の区別, あるいは感染伝播の危険要因の評価研究ひいては結核対策の評価への応用をあげることができる. さらに遺伝子タイピング研究の延長上には結核菌進化の研究がある.

本稿ではIS6110のほか現在もっともよく行われている結核菌のDNA指紋分析の概要と, これの応用により得られた結核分子疫学の進歩について述べる.

### 結核菌遺伝子タイピングの さまざまな技術

抗酸菌のタイピング法は, タイピングの目的

\* Molecular epidemiology of tuberculosis.

\*\* Mitsuyoshi TAKAHASHI, Ph.D.: 財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報科(〒204-8533 清瀬市松山3-1-24); TB Information Division, Mycobacterium Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, JATA, Kiyose 204-8533, JAPAN

にそって分解能や特異性といったパフォーマンスが優れていることはもちろんであるが、これに加えて迅速性、再現性、技術的に簡単で、コストが安く、臨床材料を直接分析できることなど実地上の利便性も期待される。これらの基準をすべて満たしているタイピング法はいまだ開発されていない。さらに、目的によってもタイピング法に求められる分解能や安定性が違うこともありえよう。したがって、唯一無二の方法は現在のところ存在しないが、これまでの流れの上ではIS6110をプローブとして用いるRFLP分析が実用上は大きな寄与をしてきた。以下これを中心にそれを補強するいくつかの方法について述べる。

### 1. IS6110をプローブとする方法

結核菌群のDNA指紋法の標準法として、現在もっとも広く行われている手法は挿入断片IS6110をプローブとしたタイピング法である<sup>18)</sup>。この方法はそれぞれの菌株に含まれるIS6110のコピー数(菌株によって0から約25コピー程度含まれている)と染色体上の位置の差異(断片の分子量に応じた遊走距離の差)を分析するものである。つまり1,355bpから成るIS6110は制限酵素PvuIIによって特定の塩基配列の1か所のみで切断されるため、右側の断片をプローブとして分析を行えば、1コピーのIS6110がそれを含む断片の分子量に応じた位置にバンドとして示される。

まず培養した菌からDNAを抽出し、PvuIIで処理した後、長さの異なるDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、これをメンブレンに転写する。その後、メンブレン上のIS6110を含むDNA断片にペルオキシダーゼで標識したIS6110プローブをハイブリダイズさせたのち、基質を加え、化学発光を生じさせ、X線フィルムで検出する。

ある結核菌の菌株はIS6110をまったくもたないか、数コピーしかもたず、このような菌の頻度は地理学的地域により有意に異なっている。このような菌株のタイピングは、IS6110のRFLP分析のみでは不十分で、IS6110が5コピー以下の場合にはスポリゴタイピング<sup>22)</sup>やMIRU-VNTR<sup>23)</sup><sup>24)</sup>、polymorphic GC-rich sequence (PGRS) RFLP<sup>25)</sup>タイピングなど別のタイピング

法が併用される。

異なる検査施設で行われた分析結果の比較を可能にするために、IS6110のRFLP分析法は標準化されている。また、内部標準、外部標準の分子量マーカーを同時に泳動することにより、視覚的な判定とは別に、電算システムを用いて解析が可能になる。これについてはHeersmaら<sup>26)</sup>、van Embdenら<sup>27)</sup>により詳細に記載されている。

この方法の問題点についてはさらに「IS6110 RFLPの安定性の問題点」「クラスター形成と最近の感染伝播」「分子遺伝子タイピングの制約」の章において重ねて検討する。

### 2. スポリゴタイピング

IS6110のRFLP分析とは独立のタイピング方法として、とくにIS6110によるタイピングでコピー数が5個以下の菌株に対する2次分析の方法としてスポリゴタイピング<sup>22)</sup>が広く用いられている。スポリゴタイピングは結核菌群菌株のDR領域に複数存在する36bpのdirect repeat (DR) に挟まれた配列(スペーサー配列)を増幅して比較する方法である。DRの数は菌株間で異なり、スペーサー配列も菌株間で異なる。結核菌のH37Rv株およびM. bovis BCG P3株のDR領域の解析を行い、43の合成オリゴヌクレオチドが設計されている。実際にスポリゴタイピングを行うには、DRに対し相補的なプライマーを使用し、隣接するDRとの間に存在するスペーサー配列を増幅する。増幅したスペーサー配列をメンブレンに固相化した43の合成オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせ、個々のスペーサー配列の有無を解析する。一方のプライマーはあらかじめピオチンラベルされているので、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体および基質を用いて化学発光で検出することができる。

スポリゴタイピングは手技も簡単で、再現性も高い手法である。さらにその結果は43個のスペーサー配列の有無を表示すればいいので、これをコード化することも可能であり、データの扱い方も処理も簡単である。

しかしながら、これをもってIS6110 RFLPの代替法とすることは難しい。IS6110のパターンで明らかに分離できる結核菌の菌株が同一のスポリゴタイピングを示すことがある。つまり一般

的にスポリゴタイピングの分離能はIS6110よりも低い。しかしながら、スポリゴタイピングのパターンが異なっている菌株は例外なくIS6110のパターンも異なるので、迅速なスクリーニング法としては有用である(あとで述べるligation-mediated PCRを用いればさらに効率よく大きな標本でのスクリーニングが可能である)。

van Embdenら<sup>28)</sup>はH37RvとBCG以外の株から見出されたスペーサー配列を加えて解析すればスポリゴタイピングの分離能が向上すると考え、51種のスペーサー配列を用いて検討したが、分離能はあまり向上しなかったという。

スポリゴタイピングはIS6110等に比べてより安定な遺伝子多型を解析していると考えられるので、結核菌群の菌種やその亜種の分類に有効である。たとえば後に述べる北京ファミリーの結核菌はすべて43個のスポリゴタイピングのスペーサーのうち最後の9つにのみ反応する。さらに大部分の*M. bovis*株は39~43番目のスペーサーを欠落している。そして大部分の*M. bovis*とすべての*M. bovis* BCGは3, 9, 16番目のスペーサーを欠落している。最近オランダで報告されたヒトでの*M. microti*症における分離株も、また、英国やオランダで動物から分離される*M. microti*株のスポリゴタイピング分析から、同種は2亜種以上に区分されることが知られた<sup>29)</sup>。

スポリゴタイピングがIS6110のRFLPと比べて有用な点のひとつは一度のアッセイで結核菌群の検出とタイピングが同時に行える点である。さらにスポリゴタイピングは死菌でも実施可能で、チール・ネールゼン染色に用いたスライドグラスやパラフィン包埋材料を用いても実施できる。スポリゴタイピングを行う上での問題点は臨床材料を直接用いた場合、PCR反応を阻害する物質が存在することである。現在スポリゴタイピングに対する臨床材料の前処理法の改善が研究されている。

### 3. MIRU-VNTR法<sup>23)24)</sup>

初めはvariable number of tandem repeat (VNTR)を含むexact tandem repeat (ETR)-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-Eの各遺伝子座をPCRにより増幅し、0.8%アガロースゲル電気泳動後、53bpのtandem copiesの数を数値化して分

別する技術であった。しかし、IS6110と比較すると分別能が低いことから疫学研究には向かなかった。最近になり、ヒトミニサテライト様の構造が結核菌ゲノム上に見出された。Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU)と命名された40~100bpから成るtandem repeatが結核菌群中に12遺伝子座あることが示された。この12遺伝子座とETR-A, ETR-B, ETR-Cの15遺伝子座の組合わせによりIS6110と同等の分離能があることが示された。MIRU-VNTRの変異の比はスポリゴタイピングとIS6110の中間型である。本法は迅速診断が可能であり、安定性があり、株間を比較するための数値化が容易であることが報告されている。

### 4. Mixed-linker PCR法

Mixed-linker PCR法<sup>30)</sup>はIS6110に特異的なひとつのプライマーを用い、もうひとつのプライマーとしては切断されたゲノムに結合されたリンカーに相補性のものを用いる。一方の鎖のリンカーにはチミジンの代わりにウラシルが含まれており、この鎖をuracil N-glycosylaseで除去することによって、特異的な増幅が得られる。DNA指紋法パターンの自動検出ができるよう最適化された有望な方法である<sup>31)</sup>。この方法は最近さらに発展して高速ligation-mediated PCR (FlIP)<sup>32)</sup>となったが、これは微量の菌から6.5時間内で菌の分別が行え、Mixed-linker PCRと同じ分別能と再現性を発揮する。

Ruhulら<sup>33)</sup>は大阪での結核集団感染で分離された菌株について開発したself ligation-mediated PCRを応用した。これはIS6110を制限酵素Sau3AIによって切断、セルフ・ライゲーションのあとPCR増幅(4種のIS6110特異的なオリゴヌクレオチドの存在下で)、ポリアクリルアミド・ゲル泳動にかけるものである。5~15本からなるバンドパターンが得られ、全工程は8時間程度であるという。

### 5. PGRS法

結核菌のpolymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS)は短い配列で、コピー数は100以上に及び、スポリゴタイピングと同様に2次のマーカーとして広く使われている<sup>25)</sup>。ただし、培養が必要であり、時間的損失は免れない。

## 結核対策への応用

結核菌の菌種以下の分類技術として1980年代まではファージ感受性や薬剤感受性の利用しかなかった<sup>34)</sup>が、遺伝子タイピングはこれらとは比較にならないくらい高い特異性をもっている<sup>35)</sup>。これからこの技術は、①接触者対応への応用(予期された感染伝播の証明ないし否定、および予期しなかった感染伝播の発見・曝露)に主として力を発揮する。そのほかに②結核菌群亜種の同定、も実用上は重要である。これらの応用原理とその成果をもとに、この技術は③結核疫学の研究や結核対策の評価にも用いられ、そして④結核菌進化の研究の有力な武器になっている。ここでは上記①～③について記述する。④以下については章を改めて検討する。

### 1. 接触者対応への応用

このための応用原理は、まず疫学的接点からあらかじめ疑いのもたれている症例間の菌の伝播を確認・否定することである。第二の応用は予期しない菌の伝播(「隠されたリンク」)を発見することである。この応用を実現するためには、地域で発生する全部の患者の菌株を分析することが必要である。米国の多剤耐性結核の大規模な院内・施設内集団感染<sup>20)</sup>は、このようにして発見された事例として有名である。

腎移植施設で患者10人が相次いで結核を発症し、何人かが死亡した<sup>35)</sup>。初発患者は腎移植後別の施設で感染・発病したあと再入院した。この患者の結核の診断は遅れ、そのため多くの患者が感染に曝露された。6人の患者菌株のDNA(IS6110)パターンは初発患者と一致したが、ほかの4人の病気は別個の感染源からのものと考えられた。これはDNA指紋分析応用の初期の事例であるが、その後このような応用は結核対策の中で確立されている。

このように実用上は上記の第1の型の応用例が多いが、第2の型のRFLP応用を含む体制をとる事業(地域分子疫学サーベイランス)が現在では普通になりつつある。地域で発生するすべての結核患者にこの技術を適用することによって、本来は予期されていない伝播関係について、通常の接触者調査では発見されなかった接点のみ

つけることが可能である<sup>36)~39)</sup>。さらに真の続発例と偶然同時発生例を正しく区別することも可能である<sup>39)40)</sup>。

チューリッヒ<sup>37)</sup>、アムステルダム<sup>38)</sup>、サンフランシスコ<sup>41)</sup>では、遺伝子タイピングでDNAパターンから関係があるとされた患者同士の中で、問診によって疫学的関連が確認されたのは5~10%に過ぎなかった。たとえば米国ボルチモアの大規模な地域患者の調査では、遺伝子タイピングでクラスター形成をした者は全体の46%(80人)いたが、そのなかで疫学的なリンクが確認されたのは20人(24%)だけであった<sup>39)</sup>。同様にサンフランシスコでは221人中73人(33%)の菌株がIS6110のRFLPにより同一の菌株であった<sup>42)</sup>。このうち39人(53%)は感染源との関係がわからなかったために接触者検診が行われていなかった。

このように、接触関係が予期しえない人の中での感染による続発例の発見は従来の接触者検診の限界を指摘している。スイスの研究<sup>36)</sup>は薬物中毒、ホームレス、アルコール依存者等の社会集団の間での結核の伝播について観察し、このような集団から感染が一般人口にばら撒かれていることを報告している。

メキシコの高蔓延地区での検診による患者発見のプロジェクトでは、発見された患者の少なからぬ部分が特定の社会的なネットワーク(不法バーを中心とした対人関係など)からの感染で起こっていることが知られ、通常の接触検診のあり方に疑問を投げかけた<sup>43)</sup>。教会合唱団員間の結核集団発生事例<sup>44)</sup>では、ともすれば接触者対応がシェルターのような共同生活の場のみに向けられるが、教会のような一般社会のネットワークが結核伝播の場になりうることを示し、通常の接触者検診の限界を指摘した。Bockら<sup>45)</sup>はカード賭博の仲間を中心に発生した集団感染について報告した。このような隠れた社会ネットワークが多数の接触者の存在は通常の接触者対応では確認困難であり、遺伝子タイピングの利用が有効な手段となりうることが示された。

一方、デンマークの地域人口集団の観察<sup>39)</sup>では、結核患者と接触のあった発病例22例中6例(27%)の菌株はその接触者とは違う遺伝子型を保有した。そのなかには家族内接触者からの発病例2

例が含まれる。Behrらは患者分離株の54のうち38(70%)のペアのみの初発患者と接触者に同一遺伝子型を保有していることが検出されたことを報告している<sup>46)</sup>。このこともやはり古典的な疫学的リンクの信頼性について、問題を提起しているといえよう。

ただし、地域分子疫学サーベイランスを先進的に実施してきたオランダでは、DNA指紋分析の結果による新たな感染例確認はそれほど多くなかったといっている<sup>47)</sup>。オランダでは古典的な接触者調査がきちんと行われており、このような努力は新しい技術のもとでもやはり重要であることを示している。

## 2. *M. bovis* BCGの同定

結核菌群の中でもとくに鑑別が微妙なものに結核菌(人型菌)と牛型菌の区別がある。BCG生ワクチンは*M. bovis*の弱毒変異株である。BCG被接種者やBCGワクチン療法患者において結核類似病変が発生し、抗酸菌が分離された場合、その菌株の鑑別・同定は、古典的方法では非常に困難であったが、DNA指紋法により比較的容易になった。

そのひとつの方法がIS6110とIS1081のパターンを比較することである<sup>48)</sup>。そのほかには先に述べたスポリゴタイピングの利用や、さらには既知の特定BCG株と試験株のIS6110パターンの比較対象も大いに参考になる。

世界中で用いられているBCGワクチン株には細菌学的に変異がみられることはよく知られており、DNA指紋の比較により、それがいっそう明確に区別されるようになってきている。このBCGワクチン株の多様性が免疫原性やワクチンとしての効果にどのように影響しているかは明らかにされていない<sup>49)</sup>。

## 3. 結核疫学研究への応用

### (1) 外来性再感染発病の証明

結核の外来性再感染は、結核症の病理発生に関し古くから学会を二分する重大な問題であった。最初の発病についても、また、再発についてもその対策上の意義はきわめて大きい。

患者が結核を再発した場合、前の結核症の再燃か、新たな結核菌で再度感染したのかを知ることは重要である。Das<sup>50)</sup>らの研究によれば、香

港における結核患者のDNA指紋分析では再発患者の12%で初回治療時と再発時の菌株のパターンが違っていた。しかし、継続して治療している患者から複数回にわたって分離されたペア菌株でもこの程度の不一致がみられた。つまりこれらの菌株のDNAパターンにおける不一致の多くは検査室内交叉汚染やさまざまな誤謬で起こっている可能性があり、外来性再感染発病とは断じ難い。

ところが、ニューヨークでの進行したHIV感染の多剤耐性結核患者の継時的排菌例におけるDNA分析<sup>51)</sup>で、再排菌の菌株が17症例中4例で以前の菌株と異なるDNAパターンになっていたことが示された。

この場合には進んだHIV感染のために細胞免疫が高度に障害されているために外来性再感染発病が起こりうると理解された。ところが結核高蔓延の南アフリカで、極端に多い外来性再感染がvan Rieら<sup>52)</sup>によって報告された。治療前の菌株と化学療法後の再発時に得られた菌株のペア16組のうち12組で治療前後の株が別のDNA指紋を示した。その後Camineroら<sup>53)</sup>も再発患者18人中8人(44%)で前後の菌株のDNAは多くパターンが違っており、外来性再感染による発病が疑われることを報告した。これらはHIV感染のない症例での外来性再感染として注目された。ただし、アフリカにせよ、スペインにせよ、結核治療者の結核感染の頻度が計算上非常に高いことになり、全部を外来性再感染に帰するにはやや不自然さが残る。

日本でも老人施設で外来性再感染によると考えられる結核の院内感染が報告され<sup>54)</sup>、また、結核治療中の患者や回復間もない結核患者が別の結核患者からの多剤耐性結核菌による再感染(重感染)により発病した事例が報告されている<sup>55)</sup>。これらはいずれもIS6110タイピングにより伝播関係が確認されている。

当然ながら外来性再感染による発病は、患者集団がさらされる感染の機会に依存するので、オランダのように結核感染のリスクが非常に低い地域では再感染は重要でないことが分子疫学的に確認された<sup>56)</sup>。今後一般集団における外来性再感染発病、または再発の重要性については、

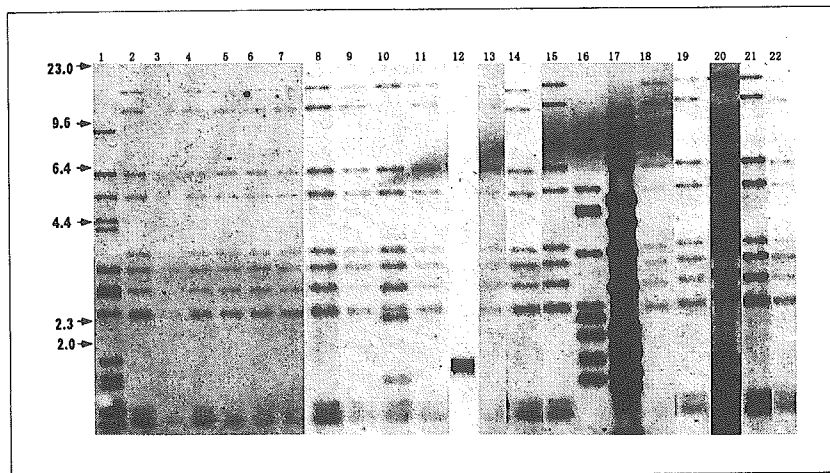


図1 検査室汚染

検出されたRFLPパターンレーン10, 12, 16, 17, 20は別パターンであったが, 残り17名の患者パターンは同一であった. 原因は希釈溶液への結核菌汚染であることが判明した事例.

より規模の大きい, よく設計された研究によって明らかにされることが望まれる.

#### (2) 患者・菌株の感染力

これまでの疫学的観察から喀痰塗抹検査で陽性の者だけが事実上感染性があると考えられているが, サンフランシスコにおける分子疫学研究<sup>57)</sup>の成績によれば, 塗抹陽性患者とは別に塗抹陰性患者が感染源となったケースが新たな感染の17%あった.

オランダの人口集団での研究で, INH耐性はDNA指紋分析のクラスター形成のリスク因子でないと報告された<sup>54)</sup>. INH耐性はさまざまな遺伝子の突然変異によって起こるので, van Soolingenら<sup>58)</sup>はそのうち*katG*遺伝子の315番目のアミノ酸に変異(aa315変異)がある結核菌分離株について検討した. その結果, この変異株は33%が単剤耐性(ほかのINH耐性株では69%), 14%が多剤耐性(ほかでは7%, 差は非有意), また, IS6110クラスター形成は感受性株と変わらなかったが, ほかのINH耐性株では低い. したがって, aa315変異株は感受性株と同様の毒力があるといえる. これらの研究は, 異なる遺伝子変異によるINH耐性株が2次発生患者を作り出す能力や, 耐性獲得能力において異なっている可能性を示唆する.

クラスター形成を感染伝播の機会と考えて, これから感染リスク要因の評価をすることができる<sup>41)59)~61)</sup>. たとえばニューヨークにおける研

究ではHIV陽性であること, HIV陰性でヒスパニック系であること, 多剤耐性結核菌による感染であること, 低所得, 若年齢であること, 等々がクラスター形成率と関連していた<sup>59)</sup>.

#### (3) 検査室での交叉汚染の証明

RFLP分析による感染伝播の証明のさらに特異な応用例として検査室交叉汚染(cross-contamination)の証明がある. 日本の結核専門病院において, 4人の患者の臨床経過と結核菌所見が一致しないことから, これら患者B~Eが培養陽性とされた時期にやはり陽性であったほかの患者AのRFLPパターンを比較した. その結果, B~E株は患者Aと一致していることが判明した(図1). このことからこの患者Aの菌株がなんらかの原因でほかの患者B~Eの検体を汚染したものと考えられた. このような検査室を介する偽陽性の原因として, 伊藤ら<sup>62)</sup>は一般的に検体の取違い, 検査技師の肺結核による検体内への汚染, 試薬の抗酸菌汚染, 陽性検体から他検体への汚染が考えられ, とくに「陽性検体からの汚染」が高率に発生すると述べている.

#### 4. 結核対策の評価と向上

サンフランシスコの2年間にわたる発生患者の観察で, 患者の40%がクラスター形成をしていた. 44クラスターのうち20は2人だけのもので, 最大のものは30人から成るものであった<sup>41)</sup>. クラスター形成の相対危険度は, ヒスパニック

ス3.3倍, 黒人2.3倍, 米国での出生5.8倍, HIV感染1.8倍等となっていた。ここでも通常の面接で「接触関係」が確認できたのはこれらの10%のみであり, 方法上の限界を感じさせる。このようなことから, 米国のある事例<sup>69)</sup>からは古典的な「同心円方式」による接触者検診の推進方法よりも, 地域単位のアプローチのほうが効果的なのではないかと考えられた。

オランダでも長期間すべての結核菌分離株のDNA指紋分析を全国的に行っているが, この所見の分析から患者の出身国別に結核の伝播程度を分析した<sup>63)</sup>。ある患者が「クラスターの感染源となる確率」は, 「クラスターを形成しない患者の罹患率×ある潜在的な患者がクラスター形成する確率」に比例すると仮定する。これを用いて, 1人の潜在的な患者からの最近の感染により発生する新たな結核患者の平均人数(伝播指数)を計算する。この伝播指数は国別で非常に差があり, いろいろな人口集団について計算し比較すれば, 結核対策の評価に役立てうるであろう。

サンフランシスコでの同様な研究<sup>64)</sup>では伝播指数は外国生まれよりも米国生まれのグループに大きく, 35歳以下の黒人患者でもっとも高いことが報告された。

オランダで1993~1996年に集められたすべての結核菌分離株でのRFLP分析の結果を用いて, 2名のオランダ人患者が構成する合計81クラスターすべての患者年齢間における相関を検討した<sup>65)</sup>。2人の患者間の平均年齢差は13.9歳であり, 一方全患者における任意の組合わせの平均年齢差は25.5歳であった。このことからオランダでは感染伝播は同年代の人に選択的に起こりやすいと結論された。

これと同一データを用いて感染源と2次患者の潜伏期間および連続感染間隔(伝播の連鎖における時間間隔)を求めた<sup>66)</sup>。連続感染間隔の幾何平均は29.5週間であり, 潜伏期間の幾何平均は20.8週間であった。比較的短期間(潜伏期間と連続感染間隔は5年以内に限定される)の制約のもとでの計算であるにもかかわらず, その所見は初期の研究と一致した。

大阪ではホームレス患者の菌株のクラスター形成率は一般患者人口と変わらなかった。この

ことからホームレス集団内で結核の伝播が頻発しているわけではなく, 結核の高罹患率はむしろ過去に獲得した感染の内因性再燃の促進によると考えられた<sup>67)</sup>。

モントリオール市内のハイチ生まれ患者とそのほかの患者との結核菌RFLPパターンは類似しており, 彼らの結核の中に持込み例は少ない<sup>68)</sup>。また, 南アフリカの高蔓延地域では結核感染の19%だけが家庭内で起こり, ほかは地域社会で起こっていると推定された<sup>69)</sup>。

オランダでは結核診断の遅れは, 潜在結核感染を早く発見して予防内服を行っておけば予防できたはずの集団発生を多くひき起こしていることが全国的な分子疫学サーベイランスから明らかにされた<sup>70)</sup>。従来の接触者検診からも, また, 近年のDNA指紋研究からも, 効果的な感染者は場合によってはちょっとした偶発的な接触によっても感染を伝播させることも確かめられている<sup>71)72)</sup>。結果としていかに接触者検診をきちんと行っても続発例の発生をとどめることができないことになる。このようなオランダの経験にたつて, 「組織的なDNA指紋法サーベイランスではこれらの続発例をみつけ出し, それによって接触者検診の制約やその貧弱な実施状況を明らかにしてくれる。これにより未確認の集団発生をあげきだし, 従来の同心円方式による接触者検診を補完してくれる」とLambregts-van Weezenbeek<sup>47)</sup>は述べている。

### IS6110 RFLPの安定性の問題点

ある菌株のIS6110のパターンがほかの菌株と区別されるためにはある程度以上の速さで変異しなければならず, 同時にその菌株由来の菌が同一のIS6110のパターン(独自性)を示すためにはあまり速く変異しては不都合である。IS6110のRFLP指紋分析が行われるようになってまもなく結核菌株におけるIS6110の変異の頻度が調べられ, いずれの場合においても, 上に述べた意味でのこの方法の信頼性・有用性が一応確認されている。

長期にわたって結核菌を出し続けている患者から, 連続して分離された複数菌株のIS6110のRFLPパターンを比較することにより, IS6110の



安定性が検討された。サンフランシスコにおける研究<sup>73)</sup>では、49人の患者から90日以上において連続分離された菌株のペアではその29%でわずかなパターンの変化が認められただけであった。同時に調べたPGRS-RFLPのパターンではより安定性が低かったことから、IS6110とPGRS-RFLPの変化は独立に起こっていると考えられた。

オランダでは544の連続的に採取した患者分離株を対象にしてIS6110のRFLPパターンの安定性が検討されたが、その転位活性は3.2年(半数の菌株において1つのバンドが変異するまでの推定期間、半減期)であり、サンフランシスコの例と比べてより安定性が高いという結果が示された<sup>74)75)</sup>。両者の違いとして考えられるのはサンフランシスコの例では分離株を再培養しており、その結果DNAに変化が生じた可能性があるという点である。これに対して、オランダの例ではオリジナルのRFLPのパターンを比較しておりかつ、期間内の検査室の手技は同一であった。上記の3~4年という時間は疫学的に関係のある菌株と異なる菌株を区別するのに十分であり、IS6110を用いたDNA指紋分析の結核伝播の疫学研究における有用性を支持するものである。

これに対しては、長期間排菌の続く患者は繰り返し化学療法(淘汰の波)を受けているので、一連の遺伝学的ボトルネックが作り出され、上記のような研究が伝播の鎖の中にある分離株にどのように関係づけられるのか疑問だという批判もある<sup>76)</sup>。変化のスピードはともかくとして、実際的には1本のバンドの付加や欠失といったわずかな遺伝子変異を示す株同志は関係のある株とみなすべきである。

### クラスター形成と最近の感染伝播

DNAタイピングのもっとも基本的な原理として、菌の「最近の感染伝播」を意味する遺伝子タイピングを共有する複数株の「クラスター形成」がある。米国での2つの大きな研究がこのアプローチの有用性を示しているが、同時にその問題をも提起している<sup>43)77)</sup>。これらの研究では、米国の大都市の発病例中30~40%がクラスター形成をしており、それだけの者が最近の感染により発病したと考えられた。これは通常行われる

接触者対応の疫学調査では補足できない範囲のものであり、それゆえに分子疫学的方法の有用性が示されるとした。

しかし、より最近の成績ではクラスター形成がただちに「最近の感染」を意味するものでないことも明らかにされており、遠い過去の感染からの内因性再燃例の患者同士の菌株がクラスター形成していることも稀でなく、クラスターを基礎とした伝播研究の限界がその後も報告されている<sup>78)79)</sup>。

オランダでは1993年から国内で分離されたすべての結核菌群のDNA指紋分析が行われている。1993~1999年に分離された結核菌のクラスター形成率を時期を追ってみていくと、最初の2年間クラスター形成率(累積)は順調に上昇するが、その後上昇はほとんどみられない。このように「最近の伝播」を反映するクラスター形成率は分析期間に強く依存する。すなわち分析を始めて間もない時期では感染による発病がまだ起こっていない可能性が大きいので、クラスター形成率は低く、それゆえこの時点でクラスター形成率からみた「最近の伝播」の頻度は過小評価となる。対象標本の抽出(患者把握の漏れのなさ)程度も同様に重要な意味がある<sup>70)77)80)81)</sup>。

最近のモデル研究では、クラスター形成率は患者の年齢構成にも依存することが示唆されている<sup>82)</sup>。これは次章で述べるように沖縄でも観察されている。

結核低蔓延地域では内因性再燃が主な結核の発病の原因とみなされている。しかし、デンマーク、ニューヨーク、サンフランシスコ、オランダにおいて行われた人口集団を基にした研究から平均43%の結核患者から分離された菌がクラスターに含まれていた<sup>41)59)83)84)</sup>。このことは低蔓延地域においても有意の数の結核患者が最近の感染によって発生していることを示している。さらにサンフランシスコでは、2年間以上の研究で発生した患者のうちの6%が1クラスターに属しており、1人の患者からの直接あるいは間接的な感染であることが示されている<sup>41)</sup>。

これらの研究ではクラスターを形成する患者は若い世代であったが、低蔓延地域では未感染者が多いことを反映して高齢患者もまたクラス

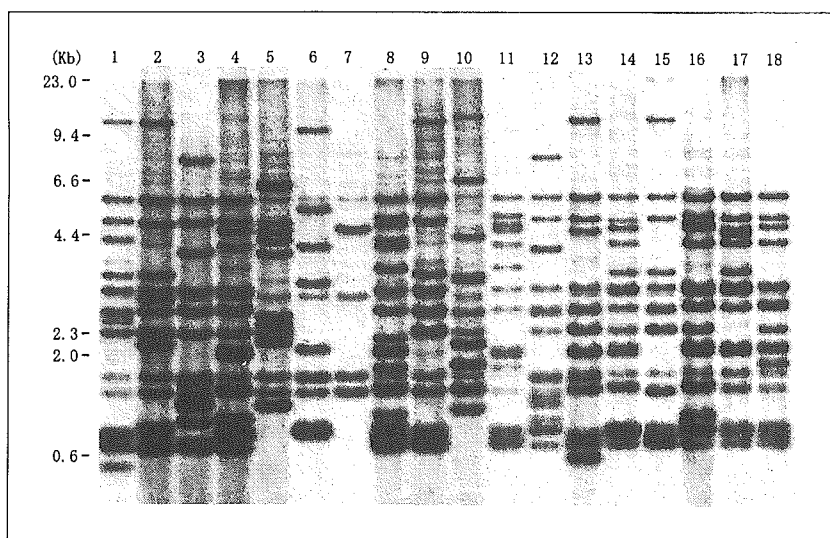


図2 日本の結核患者から分離された結核菌のIS6110を用いたRFLP分析  
左数値はラムダHindIIIの分子量マーカー，レーン1～18は結核菌分離株で類似度の高いRFLPパターンが検出される。

ターの形成を伴う。オランダではクラスター形成率は若者で高いが，クラスター形成患者の全人口での発生率は高齢者と若年者で同じであった<sup>84)</sup>。

スイスやノルウェーのようないくつかの低蔓延地域ではクラスター形成率は低く，それぞれ17%，16%であった<sup>36)85)</sup>。これらの国では最近の感染が結核の原因としては少ないことを示している。

### 地域別にみた結核菌株の特徴づけ

#### 1. 菌株多様性の地域差と有力株の存在

発生患者の人種や発生地域別にみたRFLPパターンの特徴の探索や比較もRFLP技術開発当初からさまざまに行われてきた<sup>61)</sup>。デンマーク<sup>83)</sup>やオランダ<sup>83)</sup>，スイス<sup>37)</sup>，ノルウェー<sup>85)</sup>，ニューヨーク<sup>59)</sup>，サンフランシスコ<sup>41)</sup>など，結核の発生が低い地域ではIS6110のRFLPパターンは一般に非常に多様である。それはまず結核が現在流行していない地域では内因性再燃による発病が多く，分離した個々の菌株の遺伝子型は過去長期間における散発的な感染を反映していること，さらにこのような地域で現在発生する患者をみれば，分離される菌はほかの多くの国・地域からもち込まれた結核菌であることが多いことによると考えられる。

これに対してアフリカ，アジアなど結核が蔓延している地域ではIS6110のRFLPのパターンは低蔓延地域に比べて多様性が低いとされる。たとえば，チュニジアでは62%の分離株が65%以上の類似性を有する3つのファミリーに属しており<sup>86)</sup>，エチオピアでは52%の分離株が4つのファミリーに属している<sup>87)</sup>。ただしWarrenら<sup>88)</sup>は南アフリカのケープタウンでは結核高蔓延地域であるにもかかわらず，クラスター形成は意外に低く(30%)，また，RFLPのパターンは多様であったと報告している。このような不一致の原因は不明であるが，WarrenらはBCG接種が菌の伝播に干渉しているかもしれないと述べている。しかし，RFLPパターンの「多様性」の定義自体もまだ曖昧な点があり，また，対象とする患者の標本抽出のような問題も単純ではない。それらを無視してただちに蔓延状況別の比較を論じること自体性急であろう。

これに対してSolaら<sup>77)</sup>は4つの遺伝子マーカー(IS6110, DR, Spoligotyping, DRE-PCR)を用いて，相加平均による加重対群法(UPGMA)を用いて地中海のある地域の患者株113株の数値解析を行い，このような方法が種内の遺伝学的微小進化を解析するのに適した手法であることを示した。また，ごく最近，マイクロアレイ技術によりゲノム領域の欠失を指標として結核菌の進化と地球

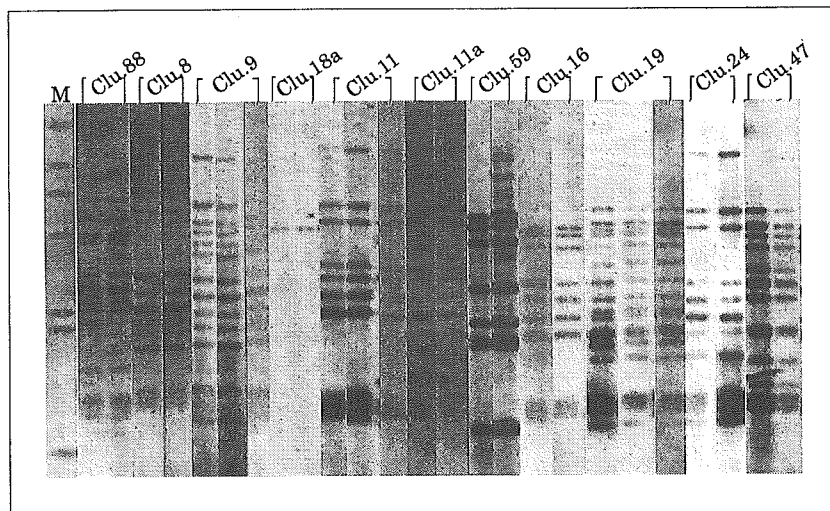


図3 沖縄県で検出されたクラスター株の一部

上の地域における菌の特徴の安定した関連を示唆する研究<sup>89)</sup>が発表された。今後この類の集団遺伝学的手法を用いた研究が進むことを期待したい。

## 2. 沖縄県における地域分子疫学プロジェクト

上述のように地域人口集団内での結核感染・発病の動態を精密に明らかにするため地域の全患者を対象とする地域分子疫学サーベイランス事業が欧米の多くの低蔓延国・地域で展開されている。日本ではわれわれが沖縄県との共同研究として同様の観察を1996年4月から行ってきた<sup>90)</sup>。このプロジェクトでは県内で発生する菌陽性結核患者の菌株をできるだけ多く結核研究所にてRFLP分析し、そのパターンを相互比較し、感染伝播が疑われる患者の組合わせについては保健所が綿密な聞き取り調査を行い、これによってより正確な接触者対応を行えるようにすることを目的としている。以下これについてやや詳細に紹介する。

沖縄県は戦後まもなく保健所を中心とした結核対策を確立し、1972年の本土復帰をへたのち今日に至るまでとくに保健所を核とした患者管理のすぐれたシステムの運営が行われている。県の人口は約130万、結核罹患率は、復帰当時は全国よりも高水準だったが、2002年には人口10万対22と全国(26)よりも低い水準を達成している。年間新発生培養陽性患者数は200前後であり、入院治療施設も8病院と比較的限定されている

点も有利である。RFLP分析は1996年4月～2000年1月までに新登録となった患者990名のうち766名(77.4%)に対して行われた。

RFLP分析の結果、結核菌ゲノム内のIS6110コピー数の分布をみると、1～23本にばらついている(図2)。この知見は先に述べた療研の全国的サンプル株の分析でみられた1～19本の間のばらつきを示したことと類似していた<sup>91)</sup>。実際に沖縄県分離株と療研分離株とのコンピューターによるクラスター分析によっても類似性が確認された。また、疫学的に関連が確認できない、偶然の一致と思われる同一パターンを示した菌株クラスターも確認された。コピー数1本、12本、14本という株が比較的多く、コピー数の分布でピークを形成していた。同一パターンのクラスターが64群(所属する患者の総数272人、全分析患者の35.5%)発見された。図3は検出されたパターンの一部である。また、クラスターを形成しないユニークなパターンを示した株は494(64.5%)であった。

クラスター5は上述のある地域から得られた患者18人からなる一大クラスターであるが、その成員の間の相互接触関係は証明されていないケースが多く、幾世代か前のこの株の流行を反映するendemicな有力株であることと推定された。

IS6110で1～5本のバンドを保有する株に対しては、このプロジェクトでは2次タイピングとしてスポリゴタイピング<sup>28)</sup>を行っている。そのよう

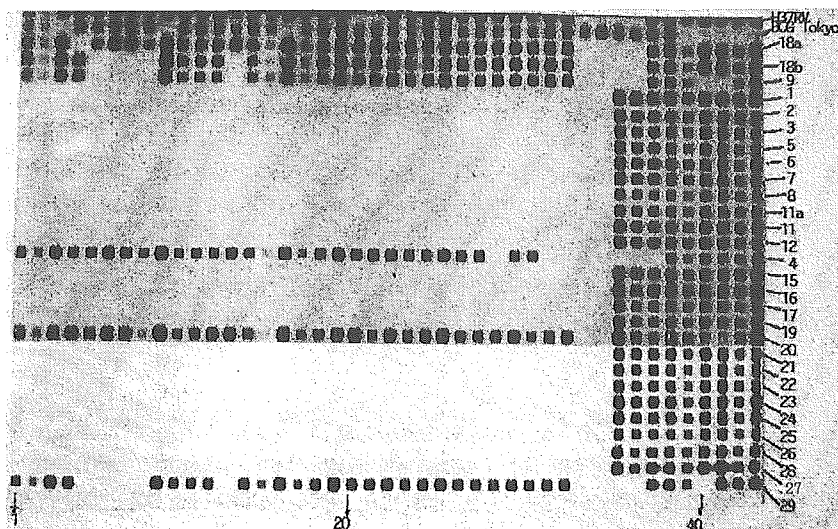


図4 沖縄県のIS6110でクラスターを形成したグループのスポリゴタイピング  
横軸：DR間spacer配列数，縦軸：クラスターグループ

なクラスター18群に属する菌株をスポリゴタイピングしたところ、2つのグループに大別された。

沖縄県でクラスター形成をした株の70%が後に述べる北京遺伝子型で、スポリゴの37~43スペーサーを欠損したパターンとして検出される株であった。また、沖縄で分離された結核菌をランダムに抽出した標本では303株中216株(71.3%)が北京遺伝子型であった。

2つの菌株間のバンドについて個数と部位の一致性を類似性指数として計算し、この値が100%(完全一致)となる菌株の群をクラスターというが、少数のバンドの不一致なども許した、より低い類似性の株同士も類似性の水準ごとにまとめる分析(クラスター分析)を行い、その結果をデンドログラム(樹状図)としてまとめて解析した。上述のように完全一致のクラスターは64群例発見された。そのうちの42%までがサイズ(構成員数)2の小さいものであり、次いでサイズ3が20%、サイズ4が11%含まれていた。年齢階級別にみたクラスター形成の割合は10~19歳が57%、20~29歳が43%で70歳以上34%であり、このことより若年者層ではクラスター形成がやや高い傾向が認められ、このことは最近の感染による発病が若年者に多いことを反映すると考えられた。

最近まで結核低蔓延地域では内因性再燃が主な結核の発病の原因とみなされていたが、冒頭

に掲げた欧米諸国・諸地域<sup>(41)(59)(83)(85)</sup>で行われた地域分子疫学研究では平均43%の結核患者から分離された菌がクラスターに含まれており、このことは低蔓延国でも「最近の感染」が患者発生に重要な役割を果たしている可能性のあることを示唆するもので、沖縄県の成績とも一致する。

しかし、われわれの観察では61のクラスターを形成する272人中の10クラスターに所属する21名(9%)のみにおいて疫学的検討による伝播が確認されたに過ぎない。このなかには直接の接触はないが事業所の集団発生で同僚から感染発病した親からその子供に伝播したような事例も確認されている。伝播の疫学的関連が確認できなかった多くのクラスターにおいては、構成員が高齢者同士のことが多く、疫学的接点の証明が困難という例が多かった。米国アーカンソー州で行った高齢者を対象とした疫学調査においても、強力な追求にもかかわらず10%しか接触が確認されなかったと報告されている<sup>92)</sup>。このことは、おそらく過去(場合によっては親あるいはそれより前の代に)に起きた有力流行株の垂直伝播による発病を示唆するが、最近の患者間の偶発的な接触による伝播も完全には否定できない。また、現在の接触関係の確認は1保健所管内の患者同士については可能だが、2保健所以上をわたる場合にはプライバシー保護の上からも困難になるため、疫学的関連の確認が困難になると