

II 分担研究報告

結核菌に関する研究

薬剤耐性の実態調査

分担研究者：

山岸文雄 独立行政法人国立病院機構千葉東病院院長

研究要旨

薬剤耐性結核菌の頻度を調べることは、結核対策の有効性を判断し必要な修正を加える上で重要である。結核療法研究協議会（療研）では1957年から2～5年おきに薬剤耐性結核菌の全国調査を行っており、前回2002年に引き続いて2007年8月1日から第13回となる耐性結核菌サーベイを開始した。

今回の具体的な目的は、研究期間内に分離されたすべての結核菌について Isoniazid (INH)、Rifampicin (RFP)、Ethambutol (EB)、Streptomycin (SM)の薬剤感受性を明らかにすることであり、また、多剤耐性菌など必要な場合には、二次抗結核薬や Levofloxacin (LVFX)、Pyrazinamide (PZA)の薬剤感受性検査を実施し、それぞれの薬剤に関する未治療および既治療耐性を明らかにすることである。また多様化している同定法や培養法、感受性検査法に鑑み、参加施設でのそれらの方法の精度評価を行うことや、多剤耐性結核菌について RFLP/VNTR 等の分子疫学的検査を行うことも目的とした。

研究は全国から菌株を収集する段階にあり、平成20年1月末現在で、今回研究に参加している63施設から1,024株の抗酸菌（結核菌と非結核性抗酸菌）が結核予防会結核研究所に送付されているが、これは罹患率から推定された必要菌株数の32.9%に過ぎない。多くの参加依頼施設が結核病床の閉鎖・廃止や検査室での結核菌の不所持を理由に不参加となっており、適切な期間に代表性を維持しうる検体数が収集できない可能性が生じている。

本邦には結核菌の病原体サーベイランスシステムが存在しないため、療研調査は重要な疫学情報である。近年多剤耐性結核菌に加えて超多剤耐性結核菌の存在も確認されており、結核の薬剤耐性の動向は注目すべき問題である。

A. 研究目的

結核菌の薬剤耐性は結核対策の効果を判定する上で重要な指標であり、未治療耐性は主に感染防止対策の有効性を評価し、既治療耐性は治療体制の評価に有効であ

る。特に経年的な傾向・動向を評価することが重要であるが、横断的な耐性率についても標準治療法の策定上必要である。

全国的な薬剤耐性サーベイランスを実施することで地域別、年齢別、性別等で

の耐性の状況が明らかになるほか、検査法・検査施設ごとの感受性検査精度を評価することも可能となる。疫学上、あるいは菌検査の精度保証上有用な事業である。

結核療法研究協議会（療研）では、1957年から2002年までに2～5年ごとに過去13回入院時薬剤耐性菌に関する研究を行い、各年度の耐性菌の頻度と30年にわたる日本での薬剤耐性の頻度の推移を報告している。

前回の2002年の調査から5年が経過しており、この間結核予防法の一部改正とそれに続く新感染症法への統合があり、結核の取り扱いが大きく変化してきた。直接監視下短期化学療法（DOTS）の取り組みも前回と比べ広がってきている。2002年の調査では既治療・未治療ともに耐性頻度が減少したことが示されており、現在に至って減少の傾向が維持されているかどうか、興味のあるところである。液体培地を用いた感受性検査法や、検査の精度保証に関する意識も拡大しており、検査室の精度管理的意味合いも引き続き重要である。

今回、前回からの薬剤耐性状況の変化を確認し、併せて分子疫学的調査を行うことを含めて、結核菌の薬剤感受性の現状を調査することを目的として調査を開始した。

B. 研究方法

総括的研究目的：

日本における結核菌の薬剤感受性について総合的な情報を全国レベルで収集し、結核対策の一助とする。

個々の研究目的：

1. 研究期間内に分離されたすべての結核菌について Isoniazid (INH)、

Rifampicin (RFP)、Ethambutol (EB)、Streptomycin (SM)の薬剤感受性を明らかにする。また、多剤耐性菌など必要な場合には、二次抗結核薬(ETH、KM、PAS、CS)、Levofloxacin (LVFX)、Pyrazinamide (PZA)の薬剤感受性検査を実施する。

2. 既治療、未治療患者における耐性菌の頻度を評価する。
3. 疫学的情報（年齢、性別、地域、合併症）と薬剤耐性との関連を解析する。
4. 多様化している同定法や培養法、感受性検査法に鑑み、参加施設でのこれらの方法の精度評価を行う。
5. 多剤耐性結核菌について RFLP/VNTR 等の分子疫学的検査を行う。
6. 全ての抗酸菌を収集することにより、現状での非結核性抗酸菌の分離状況を明らかにする。

研究参加施設・参加者：

全国の結核病床を有する施設のうち、参加の要請を諾とした施設

対象患者：

- 1) 全ての抗酸菌培養陽性症例
- 2) 臨床試験の実施に先立ち本人（または代諾者）から文書による同意が得られた患者*
- 3) 性別：不問

*個人情報保護のためのオプション

基本的に臨床情報は必要であるが、個人を特定する必要はない。従って、検体と臨床情報が一致していれば良く、個々の検体と個人に「背番号 (ID)」を施設毎にあたえ、患者個々の病院 ID との変換アルゴリズムについてはそれぞれの施設で

考えて頂く。また、生年月日は年齢に置き換え、地域については管轄保健所名とする。このように匿名化すれば資料として個人を特定できなくなり、検体の採取も非侵襲性であることから、同意書は基本的に必要ないと考えられる。

同意書については基本的に各参加施設の内部規則に沿うこととする（同意書例を資料に添付）。

研究期間：

研究期間は暫定的に2007年8月1日から2008年1月30日までとする。結核菌検体の代表性を確保するため、地域ごとの目標検体数をあらかじめ算出し、結核菌が必要数に達するまで収集を継続する。

表1 2005年の菌陽性患者数に基づく必要予測数

地域	罹患者数	比率	予定数	収集予定数 (10%増)
北海道・東北	856	0.08	214	235
関東	3,937	0.35	984	1,082
中部・北陸	1,666	0.15	416	458
近畿	2,745	0.24	686	754
中国・四国	901	0.08	225	248
九州	1,213	0.11	303	333
計	11,318	1	2,828	3,111

収集の対象とする菌：

- 研究期間中に新たに診断された結核患者（初回・再発）から分離された結核菌
- 研究期間中に新たに診断された非結核性抗酸菌抗酸菌症（初回・再発）から分離された非結核性抗酸菌

収集除外対象菌：

- 結核、非結核性抗酸菌症ともに、慢性排菌例から分離された抗酸菌は対象外とする。

収集方法：

上記菌株については、三種・四種病原体等の輸送基準に鑑みて、薬剤感受性検査結果が判明する以前にコーディネート施設である結核予防会結核研究所細菌検査科へ送付する。薬剤感受性検査結果が判った後であっても、多剤耐性菌でなければ、国連容器を用いて三重包装することにより、「ゆうパック」にて郵送することができる。国連容器（例：PATHOPAKシリーズ UN2814/2900）については、基本的に結核研究所より供与する。

多剤耐性結核菌が同定された場合、分離施設にて保管し、結核研究所で最終的に適当な時期に多剤耐性菌の輸送計画を立て、一括して収集する。もしも多剤耐性菌を保管しない施設から同菌が分離された場合、基本的に譲渡して頂くこととし、個別に対応する。

提供患者の匿名化について：

別途文章で同意が得られた患者について、院内で匿名化し院内IDを作成し、その院内IDを菌株にラベルで添付し、研究責任者以外の共同研究者（各施設での担当者）が院内にて保存する。

検体付随臨床情報：

結核菌と判明した株については、薬剤感受性検査が終了した時点でIDが結核研究所から戻され、その後、別紙に添付した調査票に各項目を記入し、結核研究所に再送付する。なお、多剤耐性結核菌

については RFLP あるいは VNTR による結核菌遺伝子タイピングを実施する。非結核性抗酸菌については ID と菌同定結果が戻される。

薬剤感受性検査：

サーベイランスのため、INH、RFP、SM 及び EB について、1%小川培地を用いた標準比率法にて薬剤感受性検査を実施する。なお、検査は結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科にて実施する。

多剤耐性菌などで必要が生じた場合、二次抗結核薬と LVFX についても、1%小川培地を用いた標準比率法を実施する。PZA の感受性検査が必要な場合、基本的に MGIT AST を用いる。また、判定が困難な場合など、遺伝子による感受性検査も必要に応じて実施する。

菌種同定：

非結核性抗酸菌については菌種同定検査を実施する。

分子疫学的検査：

多剤耐性結核菌については RFLP あるいは VNTR による遺伝子タイピングを実施する。

期待される結果：

- 1) 本邦の結核菌薬剤感受性率の経時的変化が判明する。
- 2) 本邦の多剤耐性結核菌頻度およびその関連が判明する。
- 3) 本邦の非結核性抗酸菌の頻度が判明する。
- 4) 自施設の抗酸菌検査精度が判明する。
- 5) 世界的な結核疫学成績との比較が可能となる。

倫理面への配慮：

基本的に臨床情報は必要であるが、個人を特定する必要はないため、結核研究所には臨床情報と検体のみを送り、患者個人を特定する変換規則は各施設で保管する。検体の採取も非侵襲性である。研究への参加を拒否する患者についてはこれを強要することはない。また、参加を拒否することによる何らの診療上の不利益を被ることもない。臨床情報調査票から得られる臨床的情報および各検体から得られる薬剤感受性検査の情報は、結核療法研究協議会委員および結核研究所内の担当者（データ管理責任者：御手洗聡）のみがこれを知りうるものとし、情報・検体については結核研究所内で当該目的以外に使用しないものとする。

研究母体：

結核療法研究協議会（山岸文雄委員長）
郵便番号 204-8533
東京都清瀬市松山 3-1-24
結核予防会結核研究所内

本研究に関する事務取扱

吉山 崇 結核予防会複十字病院診療部付部長
御手洗聡 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科長

C. 結果

【研究参加施設】

2007年6月に、療研委員の所属する施設および2006年時点で結核病床を有するとされている施設を併せて、合計220施設に対して書面による研究への参加依頼を実施した。結果として、123施設より回答を得、参加63施設、不参加60施設となった（無回答：97施設）。研究参加施設

の一覧を資料 2 に示した。尚、不参加の理由は表 2 の通りであった。また、多剤耐性結核菌 (MDR-TB) について、参加 63 施設中 35 施設 (55.6%) が所持すると回答していたが、不参加とした 60 施設中では 33 施設 (55%) が不所持としており、無回答 25 施設を除くと、明確に MDR-TB を所持するとした不参加施設は 2 施設 (3.3%) のみであった。

表 2 不参加施設 (60) 及び理由

サーベイ不参加の理由	施設数 (%)
結核病棟・病床の廃止/閉鎖 (結核病床なしとの回答を含む)	18 (30.0)
療研からの離脱・委員不明	2 (3.3)
検査の外注化	1 (1.7)
理由不明・その他	39 (65.0)

【検体収集状況】

2008 年 1 月 31 日現在で、参加施設より合計 1,024 株の抗酸菌が結核研究所へ送付されている。研究開始後、研究にかかる労力から結核菌のみ送付する施設が含まれることとなり、現時点では明確に結核菌/非結核性抗酸菌の比率を確定していない。現時点での収集検体数は予定数の 32.9%である。表 3 に地域別の検体数を示した。

表 3 地域別検体収集状況 (2008 年 1 月 31 日)

ブロック	受領数	充足率 (%)
北海道・東北	101	43.0
関東	358	33.1
中部・北陸	165	34.0
近畿	129	17.1
中国・四国	113	45.6
九州	158	47.4
計	1,024	32.9

【検体収集コスト】

検体収集に関して、今回より全ての菌株を国連容器を用いて輸送することとしたため、容器の購入に 6,000 円 (一個) × 100 = 600,000 円を要した。また、ゆうパックによる輸送に一件平均約 750 円 (結核研究所への輸送 128 回) を要したため、国連容器送付料金と併せて総額 233,660 円とが必要であった。さらに多剤耐性結核菌 (三種病原体) の輸送が厳格化され、郵便による輸送が不可能となったため、2007 年時点で唯一多剤耐性結核菌の輸送を受託する日通航空に依頼した。そのため、1 回の輸送に約 19~28 万円のコストが発生した。

D. 考察

結核療法研究協議会による薬剤耐性結核菌サーベイは、本邦の代表的な耐性結核疫学情報として認識されている。今回 2002 年度の調査に続いて、第 13 回となるサーベイを開始した。

近年結核菌の薬剤耐性は世界的な問題として注目されており、2007 年には Extensively Drug Resistant Tuberculosis (XDR-TB: 超多剤耐性結核) が結核対策上の重要な問題として挙げられており、少なくとも世界 31 カ国にその存在が確認されている。多剤耐性結核菌 (MDR-TB) に占める XDR-TB の割合は国によって様々であるが、療研調査から本邦では 30.9%と報告しており、世界的にも最も効率的な国の一つである。この原因は明確ではないが、本邦で長期にわたって二次抗結核薬が使用されていることや、既に XDR-TB として成立した患者からの新規感染があることが影響していると考えられる。今回の調査ではそれらの耐性結核菌の動向にも関心が向けられている。

今回の調査では、2007 年 4 月 1 日に施

行された新感染症法に従い、結核菌（多剤耐性菌は三種病原体、それ以外は四種病原体）の輸送法を厳格化した。現時点で多剤耐性結核菌以外の四種病原体となる結核菌については郵便（ゆうパック）による輸送方法を取っているが、国際的には郵便による病原体の輸送は禁止されており、日本もこの方向になる可能性があると思われる。郵便による輸送が不可能となると、民間輸送業者による輸送に頼ることになると思われるが、病原体の輸送を積極的に行う企業はないため、輸送コストの大幅な増加が予想される。今回の調査では、2002年度の調査時に99施設の参加があったのに対して、およそ三分の二の63施設にまで減少した。これは結核病床の閉鎖や廃止のほかに、特に多剤耐性結核菌（三種病原体）の所持にかかる規則が厳格化されたことにより、多くの施設が菌の所持を行わなくなったためと思われる。さらには、疫学倫理指針や個人情報保護法等の影響で、各施設がこのような疫学調査に慎重になっていることも一つの原因として否定できない。

2002年度の調査からも明らかのように、結核菌の耐性比率は20〜40台の若い世代で相対的に高く、現在発病していない感染者が将来高齢化した際に発病することを考慮すると、未来においては耐性が増加する可能性もある。将来的な状況に対処するためには、病原体サーベイランスシステムの確立が重要であると考えられるが、このままでは貴重な病原体が集中的に失われる可能性が高く、療研サーベイとしても確実な代表性が得られない可能性がある。

E. 結論

2007年8月より第13回となる耐性結核

菌全国サーベイを開始した。2007年8月1日から2008年1月31日までの収集検体数は1,024検体となっており、2002年度に6ヶ月間でおおよそ4,500検体を収集したことと比べると、およそ四分の一と極めて少数である。この期間の罹患率は25.6（2002年）から20.6（2006年）まで25%程度減少しているものの、罹患率や菌陽性患者の減少だけでは収集菌数の減少を説明できない。本邦には定常的な結核菌の病原体サーベイランスシステムが存在しないため、療研調査がこれを代替しているが、もしも代表性のあるデータとならなかった場合重大な問題となる。療研調査のみでなく、適切な病原体サーベイランスシステムが必要と考えられる。

F. 健康危機情報

本研究においては、特に多剤耐性菌の感受性検査実施において、感染の危険があった。全ての結核菌の取り扱いバイオハザード指針に従ってBSL3レベルの実験室内で安全キャビネットを用いて行った。

G. 研究発表

学会発表

1. 御手洗聡：日本における多剤耐性結核と超多剤耐性結核。日本化学療法学会総会 仙台 2007年6月1日
2. 村瀬良朗, 前田伸司, 大友幸二, 山田博之, 御手洗聡：2002年度療研多剤耐性結核菌の分子疫学。日本結核病学会総会 大阪 2007年6月5日
3. 御手洗聡, 阿部千代治, 小林郁夫, 和田雅子, 鈴木克洋, 高嶋哲也, 川辺芳子, 尾形英雄：バクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST) および小

川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討. 日本結核病学会総会 大阪 2007年6月5日

4. Mitarai S, Otomo K, Yamada H, Mizuno K, Maeda S, Murase Y. Extensively Drug Resistant (XDR) tuberculosis in Japan. 38th World conference on IUATLD. Cape Town, South Africa 2007.
5. Mitarai S (RYOKEN). Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: A nationwide survey, 2002. 12th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Haikou, China 2007

原著論文

1. 大友幸二, 水野和重, 御手洗聡, 和田雅子 (結核療法研究協議会): 結核療法研究協議会 2002 年度入院時結核菌薬剤感受性に関する研究: 検査精度の検討 結核 2007. 82. 155-164.
2. 御手洗聡, 小林郁夫, 阿部千代治, 和田雅子, 鈴木克洋, 高嶋哲也, 川辺芳子, 町田和子, 田野正夫, 瀧川修一, 鎌田有珠, 重藤えり子, 藤井俊司, 森 健一, 須山尚史, 矢野修一, 川城丈夫, 尾形英雄: バクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST) および小川標準法によるイソニアジド

ド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討. 結核 2007; 82: 449-454.

3. Tuberculosis Research Committee (RYOKEN). Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: A nationwide surveillance in 2002. Int J Tuber Lung Dis 2007; 11: 1129-1135.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

<研究協力者>

吉山 崇

結核予防会複十字病院診療部付部長

御手洗聡

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科

水野和重

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科

山田博之

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科

角 泰人

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科

大友幸二

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター細菌検査科

資料1 結核菌の薬剤感受性状況に関する研究同意書

「結核菌の薬剤感受性状況に関する研究」に関する説明書

1. 研究課題名

結核菌の薬剤感受性状況に関する研究

2. 背景と目的

【目的】

日本国内における結核の耐性頻度や各結核菌の感染経路を調査し、結核対策の評価や改定のもとになる資料を提供することを目的とします。

【意義と必要性】

結核療法研究協議会では1957年以来過去13回結核菌の薬剤耐性の状況について調査を行っており、日本の代表的な資料となっています。結核は今でも年間28,000人ほどの患者さんが新しく発生する病気であり、決して過去のものではありません。また、最近では新しい耐性菌も世界的に問題となっており、薬剤耐性結核菌の頻度に変化が生じたかどうかを調べることは、今後の日本の結核対策を考える上で大変に重要な情報です。前回2002年の調査から5年経過し、この間結核予防法の一部改正とそれに続く新感染症法への統合があり、結核の取り扱いが大きく変化してきました。今年度、改めて14回目の調査を行い、日本の結核対策を考える上での資料にしたいと考えます。

【研究協力要請の理由】

あなたから採取した検体から抗酸菌が分離されています。この研究は抗酸菌を対象とするため、上記の理由から、必要な情報のご提供をお願いする次第です。

【研究方法】

患者さんの診断のために検査された検体から、研究期間内に分離された抗酸菌について抗結核薬の感受性を検査します。また、薬剤耐性のある結核菌については、遺伝子を使った検査を実施して結核菌の型を調べ、他の患者さんから分離された菌との一致を調べて、感染経路の研究を行います。しかし、患者さんどうしを具体的に結びつけることはできないよう、匿名化されていますので心配はありません。

【研究期間】

平成19年8月1日から平成20年1月30日までを予定しています。

【研究計画の開示】

研究計画については、研究に協力して頂ける方からの求めに応じて、全て開示します。しかし、個人情報は一切公開いたしません。

3. 研究への参加・不参加

感受性試験へ参加するかどうかはあなたが自由に決定することができます。辞退された場合でも診療にはなんの影響もありません。また、参加後でも自由に同意を撤回することができます。

平成 年 月 日

説明者（説明医師）署名

以上の趣旨を理解し、研究へ参加していただける場合は「参加同意書」ご署名をお願いいたします。

同意書

研究責任者： ○○○○○殿

研究課題名：結核菌の薬剤感受性状況に関する研究

《説明を受け理解した項目》（□の中にご自分でレ印を入れて下さい）

- 研究協力を自らの意思で行うことと撤回の自由があること
- 研究計画の概要
- 実施計画の内容を見ることができること
- 研究に参加した場合に考えられる利益及び不利益
- 個人情報の保護
- 結果の伝え方
- 結果の公表
- 研究から生ずる知的財産権について
- 資料・試料の保管と廃棄
- 問い合わせ・苦情の受付先

《この研究に参加することの同意》（「はい」または「いいえ」に○を付けて下さい）

この研究（治療）に参加することに同意しますか？

はい いいえ

本人：

住所：

電話：

平成 年 月 日

本人署名又は記名・押印：

代諾者氏名：

代諾者と本人との関係：

平成 年 月 日

代諾者署名又は記名・押印：

同意撤回書

〇〇〇〇〇 殿

研究課題名：結核菌の薬剤感受性状況に関する研究

私は上記研究に参加することに同意しましたが、その同意を撤回いたします。

氏 名 _____

代 諾 者 _____

同意撤回年月日 年 月 日

資料2 「結核菌の薬剤感受性状況に関する研究」参加協力施設一覧

施設名	施設名
国立病院機構函館病院	済生会明和病院
市立室蘭総合病院	国立病院機構滋賀病院
国立病院機構札幌南病院	京都市立病院呼吸器科
北海道社会保険病院	大阪市立北市民病院
労働福祉事業団岩見沢労災病院	(財) 結核予防会大阪病院
国立病院機構道北病院	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター
青森県立中央病院	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
岩手県立中央病院	西神戸医療センター
国立病院機構盛岡病院	国立病院機構奈良医療センター
東北厚生年金病院	神田病院
埼玉県立循環器・呼吸器病センター	国立病院機構和歌山病院
国立病院機構茨城東病院	国立病院機構松江病院
国立病院機構宇都宮病院	(財) 岡山県健康づくり財団附属病院
国立病院機構西群馬病院	川崎医大川崎病院
埼玉県立循環器・呼吸器病センター	川崎医科大学附属病院
国保直営総合病院君津中央病院	国立病院機構南岡山医療センター
東京都立府中病院	国立病院機構東広島医療センター
国立病院機構東京病院	国立病院機構山陽病院
(財) 結核予防会複十字病院	国立病院機構東徳島病院
東京都立清瀬小児病院	国立病院機構愛媛病院
川崎社会保険病院	国立病院機構高知病院
川崎市立井田病院	国立病院機構福岡東医療センター
国立病院機構南横浜病院	九州大学胸部疾患研究施設
国立病院機構神奈川病院	国立病院機構大牟田病院
国立病院機構富山病院	国立病院機構東佐賀病院
金沢市立病院	長崎市立病院成人病センター
県立須坂病院	国立病院機構長崎神経医療センター
国立病院機構中信松本病院	国立病院機構熊本南病院
総合病院聖隷三方原病院呼吸器センター	国立病院機構西別府病院
国立病院機構天竜病院	国立病院機構南九州病院
国立病院機構東名古屋病院	国立病院機構沖縄病院
国立病院機構三重中央医療センター	
総計 (63 施設)	

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興研究事業）

分担研究報告書

結核菌に関する研究

結核菌の迅速型別法の開発と多剤耐性菌を用いた分子疫学的解析

分担研究者：

前田 伸司 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 科長

研究要旨

現在の結核菌型別の標準法である IS6110 制限酵素断片長多型分析 (RFLP) 分析に代わる、PCR を利用した反復配列多型 (VNTR) 分析法の国内での利用について検討を行った。米国疾病予防管理センター (CDC) が採用している Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)-VNTR やヨーロッパ諸国が採用した Supply からの 15-locus-VNTR 分析法を使って日本国内株を分析した場合、大きなクラスターが残ることが報告されている。そのため、国内株分析に最適な VNTR システム樹立を目指し検討を行い、12 箇所のミニサテライト DNA を調べることで、IS6110 RFLP と同程度以上の型別能力を持った VNTR システムを構築した。この Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR システムで集団感染・院内感染事例を分析すると、RFLP 分析による型別結果と一致することが確認できた。また、多剤耐性結核菌で IS6110 RFLP 分析で同一パターンとなりクラスターを形成した株について、VNTR 分析 (35 loci) を行うと JATA (12)内の 1 locus だけ、株間でコピー数が異なるという事例が 2 例存在することがわかった。以上の結果から、1) JATA (12)-VNTR は、集団感染・院内感染疑い例では、十分な識別能を持っていること、2) VNTR 分析では、1 locus コピー数が異なっても同一株と判断し、少なくとも 2 loci 以上でコピー数が異なる場合、別株と判定すべきこと、などが明らかになった。

A. 研究の目的

国内では特定の場所での集団感染や院内感染疑い例が報告され、結核菌型別を依頼されることが多い。挿入配列 (IS) 6110 を利用した制限酵素断片長多型分析 (RFLP) が、現在の結核菌型別の標準法

となっている。しかし、この分析法は、精製した高分子 DNA が必要であり、さらに結果を得るのに少なくとも 4 日必要である。また、生きた菌を分析施設に運ばなければならない、第三種病原体と規定されている多剤耐性菌の場合、輸送が困

難な状況である。近年、新しく開発された菌のミニサテライト DNA を比較する反復配列多型 (VNTR) 分析は、PCR を利用する方法であり、粗抽出 DNA を利用することが可能なため 2 日で結果が得られる。米国では Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU) - VNTR が、ヨーロッパで諸国では Supply らの 15-locus VNTR が標準型別法として採用されている¹⁾。しかし、これら方法を日本国内の株に適応すると大きなクラスターが残り、型別能力は高くないことが報告された²⁾。VNTR 分析では、locus の選択が重要であり、効率よく国内株を分析するためには、適切な locus の選択が必要である。

本研究では国内株分析に有効な VNTR システムを確立して、その手法を用いて実際の臨床分離株の解析を行った。

B. 研究方法

・分析した結核菌：2002 年結核療法研究協議会が感受性検査のために全国から集めた 3122 株の中で、都道府県ごと 3~10 株となるようにランダムに選んだ 325 株について分析を行った。また、多剤耐性菌と区分された 55 株についても分子疫学的解析を行った。

・分子疫学的解析：IS6110 RFLP、スポリゴタイピング及び 35 loci (北京型結核菌を効率よく型別できると考えられる) について VNTR 分析で型別を行った。

・各分析法の評価：クラスター率、Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI)³⁾等を利用して、型別能力の比較を行った。また、個々の locus のコピー数の多様性 (型別能力) は、 h 値⁴⁾を用いて比較した。

C. 結果

日本国内 (全国) で分離された 325 株を IS6110 RFLP 分析及びスポリゴタイピング法で分析したところ、クラスター形成率は、それぞれ 18.5% (60/325)、90.2% (293/325) であった。スポリゴタイピング法でクラスター形成率が高いのは、分析した結核菌の約 7 割 (70.2%) が北京型といわれる遺伝子型 (スポリゴタイピング法で同一パターン) を持つためである。そのため、このスポリゴタイピング法は、日本国内での結核菌の型別では効率が低いことが確認できた。次に 35 loci について VNTR 分析を行い、 h 値を利用して個々の locus における多様性を比較した。この h 値は、0 から 1 までの値をとり、1 に近いほど型別能力が高いということを表す。locus によって h 値は異なり、最大は VNTR 3232 で 0.929、最低は VNTR 0154 (MIRU-02) で 0.018 だった。 h 値が高い locus を幾つか分析すると、IS6110 RFLP より高い識別能をもつ VNTR システムを構築できる。しかし、 h 値が高い locus では、高い頻度で分析の際に得られる PCR 産物の分子量が大きく (1 kb 以上)、繰り返し配列 1 単位 (53 bp~77 bp) の違いをアガロースゲル電気泳動では、区別することは困難であり、分析精度が確保できないことが予想される。そのため、 h 値が高いが、実際の分析際に困難が伴うと考えられる 4 つの loci を除いた上で、IS6110 RFLP 分析と同程度の HGDI を持ち、さらにクラスター形成率等が RFLP 分析より優れている 12 loci を選択し、Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12) とした。2006 年に Supply らが提唱した 15-locus (Supply [15]) - VNTR が、ヨー

ロッパ諸国で採用されている。この Supply (15)と JATA (12)のクラスター形成率の比較を行った。その結果、12箇所を分析する JATA (12)は、15箇所を分析する Supply (15)および現在の結核菌型別の標準法である IS6110 RFLP より、クラスター率は低く優れていることが明らかになった。

次に、この日本国内株分析のために樹立した JATA (12)を使って多剤耐性 (MDR) 結核菌の分析を行った (図)。MDR 結核菌は、薬剤耐性という菌の表現型及び遺伝子変異が蓄積された特殊な結核菌なので、型別法で同一パターンとなった場合、疫学的関連は明らかではないが、同一菌由来の感染と推定することができる。RFLP 分析では、クラスターが 8 個 (4 株からなる : 1 クラスター ; 2 株

株 : 5 クラスター) が形成し、両分析法ともほぼ同じクラスター形成率だった。

RFLP 分析でのクラスター A (DR16, 50, 51, 55) を構成する株を 35 loci について VNTR 分析を行うと、34 loci で同一プロファイルだったが、VNTR 1955 の 1 locus だけコピー数が異なっていた。すなわち、3 株はコピー数が 3 だったが、1 株 (DR55) はコピー数が 1 だった (図 1-c)。また、クラスター G (DR12, 49) の株でも、1 箇所 VNTR 2163b (11b) だけコピー数が異なり、他は同一プロファイルだった。これら 2 つ以外のクラスターでは、35 loci のすべてで、コピー数は一致していた。このように、多剤耐性株という共通の表現型を持ち RFLP 分析において同一パターン、VNTR 分析で 35 loci 中 34 loci で同一プロファイルということなので、疫学

図. 多剤耐性結核菌の型別分析

(a) IS6110 RFLP 分析結果から作成した系統樹 ; (b) 4 株から形成されたクラスター A の RFLP 分析 ; (c) クラスター A を構成する株の 35 loci の VNTR 分析

からなる : 7 クラスター) 存在することが判明した。JATA (12)-VNTR では、8 個のクラスター (3 株 : 3 クラスター ; 2

的情報に関するデータは無いが、これらの株は同一株由来である可能性が極めて高いと考えられる。よって、VNTR 分析

では、1 locus だけコピー数が異なっていた場合は、同一株と考える必要があるということが明らかになった。

D. 考察

欧米で採用されている Supply (15)-VNTR で日本国内の株を分析すると米国 CDCが採用している MIRU-VNTR より型別能力は高いが、大きなクラスターが残ることが報告されている²⁾。本研究で樹立した JATA (12)-VNTR は、12 箇所分析する Supply (15)より分解能が高いことが明らかになった。また、集団感染や院内感染疑い例を使った分析では、各事例内で RFLP 分析が同一パターンとなった例では、すべて JATA (12)-VNTR でも同一プロファイルとなった。一方、RFLP パターンが異なった例、つまり、同時発生例では、1 例を除いて JATA (12)-VNTR で分析を行うと少なくとも 5 以上の loci でコピー数が異なることが確認できた。

55 株の MDR を用いた研究から、JATA (12)で 1 locus コピー数が異なった場合は、同一株由来と考える必要があるという結論となったが、locus によって変化の頻度が異なることが報告されている。また、分析した例数が少ないことから、JATA (12)-VNTR 分析結果と IS6110 RFLP 分析結果を比較することによって、各 locus におけるコピー数変化の頻度などのデータを、今後も蓄積していく必要がある。

E. 結論

JATA (12)-VNTR は、集団感染・院内感染疑い例では、十分な識別能をもっていることが明らかになった。また、VNTR 分析では、1 locus でコピー数が異なっ

ても同一株と判定すべき、という結果が得られたことから、少なくとも 2 loci 以上でコピー数が異なる場合、別株と判定する必要があることが示唆された。

[参考文献]

- 1) Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006; 44: 4498-4510.
- 2) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, Tomita M, et al.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 2007; 270: 67-74.
- 3) Hunter PR and Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988; 26: 2465-2466
- 4) Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, et al.: Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. J Clin Microbiol 2005; 43: 314-320.

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Wada T., Maeda S., Hase A., Kobayashi K.: Evaluation of Variable Numbers of

Tandem Repeat as Molecular Epidemiological Markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: J Med Microbiol. 2007; 56: 1052-1067.

(2) 前田伸司、小林和夫：結核菌および非結核性抗酸菌. 臨床検査. 2007; 51: 1507-1510.

(3) 前田伸司、菅原勇、加藤誠也：日本、中国、韓国における結核分子疫学担当者会議開催報告. 結核. 2007; 82: 925-927.

(4) 鹿住祐子、宇田川忠、前田伸司、村瀬良朗、菅原勇、奥村昌夫、東由桂、後藤美江子、常松範子： *Mycobacterium avium* タイピングにおける Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法と Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法の有用性の比較. 結核. 2007; 82: 741-748.

(5) Nakata N., Fujiwara N., Naka T., Yano I., Kobayashi K., Maeda S.: Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure of glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. J Bacteriol. 2008; 190: 1064-1071.

(6) 和田崇之、前田伸司：抗酸菌の分子疫学法. 呼吸器科. 2008; 13: 92-98.

(7) 前田伸司、和田崇之：抗酸菌の分子疫学解析とその応用. Medical Technology. 2008; 36: 170-175.

2. 学会発表

(1) 前田伸司、村瀬良朗：反復配列多型を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化. 第 82 回日本結核病学会総会. 2007 年 6 月, 大阪市.

(2) 村瀬良朗、前田伸司、大友幸二、山田博之、御手洗聡：2002 年度療研多剤耐

性結核菌の分子疫学. 第 82 回日本結核病学会総会. 2007 年 6 月, 大阪市.

(3) 和田崇之、長谷篤、前田伸司、ShiRuiru、菅原勇、松本壮吉、岩本朋忠：日本国内の北京型結核菌に見られる遺伝的特性. 第 82 回日本結核病学会総会. 2007 年 6 月, 大阪市.

(4) 和田崇之、長谷篤、平山幸雄、前田伸司：大阪市内の行旅患者から分離された結核菌の遺伝型別解析. 第 82 回日本結核病学会総会. 2007 年 6 月, 大阪市.

(5) 鹿住祐子、村瀬良朗、前田伸司、菅原勇、後藤美江子、奥村昌夫： *M. avium* における VNTR 法の解析. 第 82 回日本結核病学会総会. 2007 年 6 月, 大阪市.

(6) 藤原永年、松本壮吉、前田伸司、矢野郁也、小林和夫：ミコール酸分子種の異なる cord factor の宿主応答. 第 82 回日本結核病学会総会. 2007 年 6 月, 大阪市.

(7) 藤原永年、中田登、前田伸司、中崇、水野浄子、牧野正彦、松本壮吉、矢野郁也： *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7, 12 型 glycopeptidolipid 糖鎖合成遺伝子の機能解析. 第 81 回日本細菌学会総会. 2008 年 3 月, 京都市.

(8) 中田登、藤原永年、前田伸司、中崇、矢野郁也、小林和夫、牧野正彦： *Mycobacterium intracellulare* 血清型 12 型 glycopeptidolipid 生合成遺伝子領域の解析. 第 81 回日本細菌学会総会. 2008 年 3 月, 京都市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

なし

厚生労働省科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

結核菌に関する研究

日本・中国・韓国分子疫学共同研究

分担研究者：

前田 伸司 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 科長
加藤 誠也 結核予防会結核研究所 副所長

研究要旨

近年、日本から中国、韓国への渡航者およびそれらの国から日本への渡航者が増加している。そのため、結核を含めた感染症がアジア地域内で広まる可能性も考えられる。そこで、近隣する3カ国（日本、中国、韓国）での結核感染症対策に寄与できるように、結核に関しての情報交換を行い、東アジアにおける反復配列多型（VNTR）分析を利用した結核菌型別標準法の確立を目指して共同研究を開始した。今後、共通の方法で結核菌の型別を行い、データベース化することにより、病原性の高い結核菌（スーパープレクター）などの発生状況や流入を早期に把握するためのシステムの確立を検討している。

研究協力者

【韓国】

Dr. Sungweon Ryoo Ms. Kang Hee Yoon（韓国結核研究所（ソウル））

Dr. Chulhun L. Chang, Ms. Eun Ju Song,
（釜山大学医学部臨床検査学教室）

【中国】

Dr. Li, Weimin（他1名）（北京疾病予防管理センター北京結核・胸部腫瘍研究所）

Dr. Mei, Jian（上海市疾病予防管理センター結核部門）

Dr. Qian, Gao（Fudan 大学医学部微生物学（上海））

【日本】

和田崇之（大阪市立環境科学研究所）

岩本朋忠（神戸市環境保健研究所）

松本智成（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター）

村瀬良郎（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター）

A. 研究目的

近年、日本から中国、韓国への渡航者及びそれらの国から日本への渡航者が増加している。結核を含めた感染症がアジア地域