

30 Abs.1 IfSG als Verwaltungsakt iSv § 35 S. 1 VwVfG anzusehen?

2-1) Falls so, kommen beim Erlass einer Anordnung die Paragraphen des VwVfG entweder für das Normalverfahren insbesondere vom § 28 (Anhörung) oder für das förmliche Verfahren von §§ 63-71 (mündliche Verhandlung) direkt zur Anwendung?

Oder vergleichbare Paragraphen jedes Landes-VwVfG?

Oder fällt solches Verfahren in diesem Fall aus? Warum?

2-2) Im Gegensatz zum § 30 Abs.1 S.1 IfSG, wobei die Behörde den Betroffenen auf jeden Fall eine Anordnung zur Absonderung erlassen müssen, scheint die Behörde im Fall bei sonstigen Kranken usw. iSv S.2 ein Ermessen zu haben. Gibt es vielleicht Sonderregelungen bezüglich dieses Ermessens neben dem § 40 VwVfG oder gewisse Kriterien, denen die Behörde folgen soll?

2-3) Gibt es irgendwelche Sondervorschriften neben dem § 49 VwVfG oder gewisse Kriterien für einen Widerruf einer Anordnung iSv §30 Abs.1 IfSG oder für den Erlass einer neuen Anordnung, den Betroffenen aus der Absonderung wieder freizulassen?

3) Falls irgendeiner der Anordnung iSv §30

Abs.1 IfSG nicht folgt, wie kann sich die zuständige Behörde durchsetzen ?

3-1) Findet dann wohl ein Landes-VwVG direkt die Anwendung ?

3-2) Wenn so, ist dann der Sache nach als nicht-vertretbare Handlung vor allem ein Zwangsgeld iSv §11 oder auch ein unmittelbarer Zwang iSv §12 VwVG jeweils nach vergleichbaren Vorschriften des betroffenen Landes-VwVG von der zuständigen Behörde möglich ?

3-3) Was für Bedeutungen oder Funktionen hat dann der §30 Abs.2 IfSG ?

Erlaubt er als Sonderregel der Behörde einen unmittelbaren Zwang iSv §12 VwVG oder einen sofortigen Vollzug iSv §6 Abs.2 VwVG jeweils nach vergleichbaren Vorschriften des betroffenen Landes-VwVG ?

Falls so, wären solche Zwangsmitteln ohne §30 Abs.2 IfSG, nämlich aufgrund solcher Vorschriften des Landes-VwVG, nicht möglich ?

3-4) Kann ein Ersatzzwangshaft durch einen Beschluss des Verwaltungsgerichts auf Antrag der zuständigen Behörde iSv §16 VwVG jeweils nach vergleichbaren Vorschriften des betroffenen Landes-VwVG erst danach angeordnet werden ?

Findet solche Ersatzzwangshaft durch das Verwaltungsgericht in der Praxis

häufiger statt, als das Zwangsgeld bzw. der unmittelbare Zwang, insbesondere nach §30 Abs.2 IfSG, von der Verwaltungsbehörde ?

3-5) Oder gibt es überhaupt irgendwelche andere Rechtsgrundlage für die Vollstreckung einer Absonderungsanordnung iSv §30 Abs.1 IfSG ?

4) Zum Schluß, gibt es vielleicht andere gewisse Rechtsvorschriften, die dem Schutz der Kranken oder Krankheitsverdächtigen usw. dienen sollen?

D. 考察

上記の研究成果を踏まえ、以下、若干のコメントを付することにしておく。本来であれば、ここからより本格的な分析に進むべきところ、時間的な限界もあり、かなわなかった。今後の課題としたい。

(1)強制隔離措置等をめぐる両国の制度を概観すると、以下のような把握がさしあたりは可能であるように思われる。

すなわち、薬剤耐性患者等の強制隔離措置の必要性は、両国の関係者から一様に指摘されたところであったが、(a)そのそもその前提として、立法上も制度運用上も、人身の自由や医療の場面における自己決定権は非常に強く尊重されるべき権利であるという認識のあったことが理解されよう。その上で、(b)公衆の安全・健康を守る必要性が高いという観点もまた重視されるべき

であり、(c)その結果、一部の患者が自由を制約されることはやむを得ないと解されるとしても、かかる強制措置は、それが必要最小限度にとどまること等、厳しい規律の下でのみ正当化されるものであるし、当該措置の前後において裁判手続を含む慎重な手続保障が必要であることなども言うまでもない（ドイツでは特別な裁判手続を要していた）。

わが国における制度設計を構想する際にも、これら(a)~(c)は非常に参考になる視点であるように思われる。

そもそも、(a)それ自体がままならないまま（かかる現状をどのように改善するかは絶えず問われ続けなければならないであろう）、強制措置が強化されることへの不安は小さくないといえる。また、(b)の観点は、わが国ではもっと重視されてよいと思うのであるが（ここでいう公衆の安全・健康とは、およそ公益一般に解消されるような抽象的なものではなく、要するに個々人の健康の問題に他ならない）、それ以外に、たとえば「拘束して治療をするほうがその人のためになる」というような（パターンリスティックな）発想が安易に混在することは望ましくないなどとも言えよう。強制措置である以上、公共の安全という視点から、その必要性を判断するべきであるからである。だからこそなおさら、(c)の視点が必要とされるのである。

なお、(a)と(b)、2つの要請をいかに調和するかは難問であるが、少なくともドイツなどでは、法制度上は、手続的にも大いに配慮されているといえそうである。最終的には、医師、行政及び裁判所という異なるアクター間の役割分担をどのようにデザイ

ンするかという問題に帰するように思われる。

該当なし

3. その他

該当なし

(c)の患者の権利保障のあり方こそは重要な論点であるが、どのような手続を、誰がいつの時点で行うかについては、実際にありうるケースの特性等に応じて具体的に考察をする必要もあるであろうから、今後の課題とせざるを得ない。しかしたとえば、オランダで指摘されたような、公正透明かつ客観的な判断を担保しようとする視点は重要であるように思われる（たとえば呼吸器科医と保健所の TB 公衆衛生医という複数の専門家による診断・助言等の手続が、市長による命令に前置していた）。

(2)入院基準となる感染性のレベルを誰がどのように見極めるかとか、入院と公費負担の関係がいかにあるべきか等、さらに検討を要する問題も多いが、本稿では十分に扱えなかった。これらの点も、今後の課題として認識をしておくこととしたい。

E. 結論

「D. 考察」の通り

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録

III 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	51	1507-1510	2007
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	82	925-927	2007
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	<i>Mycobacterium avium</i> 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	82	741-748	2007
Wada T., Maeda S., Hase A., Kobayashi K	Evaluation of Variable Numbers of Tandem Repeat as Molecular Epidemiological Markers of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in Japan	J Med Microbiol	56	1052-1067	2007
和田崇之、前田伸司	抗酸菌の分子疫学法	呼吸器科	13	92-98	2008
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	36	170-175	2008
Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, et al	Detection of Multidrug Resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	J Clin Microbiol	45(1)	179-192	2007
Huang Q, Tonge PJ, Slayden RA, et al	FtsZ: a novel target for tuberculosis drug discovery	Curr Top Med	7(5)	527-543	2007
Sekiguchi J, Nakamura T, Miyoshi-Akiyama T, et al	Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of <i>pncA</i> mutations in pyrazinamide-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains	J Clin Microbiol	45(9)	2802-2807	2007

Tuberculosis Research Committee (RYOKEN)	Drug resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in Japan: A nationwide surveillance in 2002	Int J Tuber Lung Dis	11	1129-1135	2007
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 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	82	155-164	2007
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低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討	結核	82:	449-454	2007
Shishido Y, Mitarai S, Otomo K, Seki M, Sato A, Yano I, Koyama A and Hattori T	Anti-tuberculosis drug susceptibility testing of <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Tokyo strain.	Int J Tuber Lung Dis	11	1334-1338	2007
山田博之、松本宏子、御手洗聡、藤木明子	ポリアクリルアミドを用いた人工痰の長期保存性と塗抹鏡検所見の再現性	結核	83	65-71	2008
吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、坂谷光則	Molecular Epidemiology of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Comparison between Multidrug-Resistant Strains and Pan-Sensitive Strains.	Kekkaku	82(6)	531-8	2007
吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、岩本朋忠、坂谷光則	Molecular epidemiological analysis of <i>Mycobacterium kansasii</i> isolates.	Kekkaku	82(2)	103-10	2007
徳永修、村田祐樹、濱谷舟、宮野前健、末永麻由、宮川知士、錦戸知喜、吉田之範、亀田誠、高松勇、土居悟、岡田賢司、樋口一恵、原田登之	小児活動性結核症例におけるクオンティフェロン®TB-2G 反応性の検討	日本小児呼吸器疾患学会雑誌	(投稿中)		

IV 研究成果の刊行物・別冊（一部）

3. 遺伝子診断の実際

12) 感染症

(8) 結核菌および非結核性抗酸菌

前田伸司¹⁾/小林和夫²⁾**(KEYWORDS)** 結核菌, 病原体遺伝子検査, 培養検査, 塗抹染色, 病原体診断抗酸菌感染症診断における
遺伝子検査の有用性

はじめに

世界では約 20 億人(人類の 1/3)が結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)に既感染(ほとんどは無症候性潜在性結核菌感染), 毎年 880 万人(罹患率人口 10 万対: 140)が結核を発病, 200 万人が死亡している。日本(2005)¹⁾では年間 2.8 万人(罹患率: 22.2)が結核を発病, 2,300 人(死亡率: 1.8)が死亡し, 結核は単一病原体感染症として, 人類に甚大な健康被害を与えている(表 1)。英国および米国の罹患率は, それぞれ 12, 4.9 であり, 日本の罹患率はその約 2~5 倍で, 日本はいまだに中蔓延国である。薬剤耐性結核(特に多剤耐性や超多剤耐性)やヒト免疫不全ウイルスと結核の重複感染は世界に共通な結核増加要因である。すなわち, 国内外を問わず, 発生動向から結核対策は重要な課題である。

結核菌を含めた抗酸菌は, 長鎖脂肪酸(ミコール酸)からなる脂質を多く含んだ特別な細胞壁を持つことから, 抗酸菌染色(Ziehl-Neelsen, Kinyoun や蛍光法)で陽性となる。また, 結核菌は遅発育性(倍加時間は約 12 時間)であり, 固形培地(小川培地など)を用いた場合, 集落形成に 3~4 週間を要する。液体培地(mycobacteria growth indicator tube; MGIT など)を利用すると 1~2 週間で生菌成育を検出可能であるが, 一般細菌(通常, 1 日)に比べると培養検査結果に長期間が必要である。そのため, 迅速(5 時間以内)に結果が得られる遺伝子検査は結核および非結核性抗酸菌感染症の診断に有用な方法である。また, 抗酸菌感染症の場合, 結核, あるいは非結核性抗酸菌感染症を迅速に鑑別診断することは, 治療法の選択および施設などの感染対策にも重要である。しかし, 遺伝子検出の結果は, 抗酸菌の DNA あるいは RNA が検体中に存在することを示すだけなので, 生菌の有無を確認するため, 培養検査を並行して行う必要がある。加えて, 培養検査は結核

表 1 世界および日本における結核の発生動向

	年間新規 結核患者数	罹患率 (対人口 10 万人)	年間死亡数	結核菌既 感染者数
世界	880 万人	140	200 万人	20 億人
日本	2.8 万人	22	0.23 万人	0.25 億人

1) MAEDA Shinji (財)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

2) KOBAYASHI Kazuo 国立感染症研究所免疫部・部長

菌などの薬剤感受性において「ゴールドスタンダード」であり、必須である。

Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct test (MTD) や Amplicor Mycobacterium kit による結核菌遺伝子(核酸)増幅検査の検出感度は約70%、特異度は96%以上である²⁾。核酸増幅検査での喀痰塗抹陰性検体の感度は40~70%で、塗抹陽性検体(感度:約95%)に比し、必ずしも高くないが、塗抹陰性検体でも臨床的に抗酸菌感染症が強く疑われた場合に使用すべきであろうと考えられる。また、抗結核化学療法経過中では喀痰に死菌が喀出されるため、培養陰性・核酸増幅検査陽性の結果がみられる場合もある。一方、これらの核酸増幅法は培養法に比べると感度が劣る(80~90%)ことも報告されている。

核酸増幅検査法の臨床的な位置付けに関して、①核酸増幅法は必ず塗抹・培養検査と並行して行う、②塗抹・培養検査陰性で核酸増幅検査が陽性の場合、臨床・画像所見を総合して診断する、③原則として治療経過判定には用いない、④気管支内視鏡など汚染されやすい器具を使って採取した検体が陽性の場合、解釈を慎重に行う、⑤検査精度の確保に努める、などの勧告が日本結核病学会の予防・治療合同委員会から出されている³⁾。

遺伝子検査と他の検査法の関連

検体中の抗酸菌を検出する簡便な方法として、塗抹検査法がある。この検査には直接塗抹検査とN-アセチル-L-システイン-水酸化ナトリウム(NALC-NaOH)で検体を処理後集菌し、塗抹検査を行う集菌塗抹検査がある。NALC-NaOH法で処理後集菌すると、検体を濃縮、さらに、雑菌を除去できるため検鏡が容易である。この検査で陽性の場合、処理済みの検体はそのまま培養検査や同定検査を行うことができる。

結核の発病様式は、①潜在性結核菌感染(約20億人、人類の1/3)を起源とした内因性再燃と、②外来性再感染に大別される。結核菌感染後の発病率は5~10%であるが、その多くは「内因性再燃」機序である。したがって、潜在性結核菌感染者を科学・効率的に発見し、発病高危険群や濃厚

接触者などの潜在性感染者に治療(発病予防)介入することは、結核制圧に新戦略を提供するであろう。無症候性潜在性結核菌感染を特異的に診断する方法として、宿主免疫応答を利用した「末梢血 Interferon (IFN)- γ 遊離試験:クオンティフェロン TB-2G など」がある⁴⁾。これは、大多数の非結核性抗酸菌と *Mycobacterium bovis* BCG に存在しない結核菌特異的抗原である ESAT-6 (early secreted antigenic target 6 kDa protein) と CFP-10 (10 kDa culture filtrate protein) で被験者の末梢血リンパ球を刺激し、培養上清に産生・遊離される IFN- γ を定量する検査である。結核菌に感染すると、これらの抗原に反応するリンパ球が誘導され、基準値(0.35 IU/ml)以上の IFN- γ がこれらリンパ球から放出される。一方、結核菌未感染の BCG 接種者由来リンパ球は ESAT-6/CFP-10 を認識しないため、本検査法はツベルクリン皮内反応と異なり BCG 接種の影響を受けない。本法は結核の接触者検診などで利用され、潜在性結核菌感染者の特定が可能のため、効率的な予防内服者の選定に極めて有用な検査である。結核菌の感染初期の段階で対応し、発症を未然に防止することが可能であれば、治療や遺伝子検査などは不要となり、感染の蔓延防止にも資する。

抗酸菌の遺伝子検査

1. 核酸増幅を利用した抗酸菌の検出法

DNA を増幅するキットとして、Amplicor[®]、TaqMan[®] MTB がある(表2)。Amplicor は結核菌ゲノムに存在する 16S rRNA 遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)法で増幅して、その PCR 産物を検出する。この方法は PCR 後、マイクロプレートを利用して固定したプローブと PCR 産物をハイブリダイゼーションさせ PCR 産物の有無を検出するため、結果までの所要時間は約5時間である。一方、TaqMan[®] MTB はリアルタイム PCR を利用して、PCR 産物を直接蛍光検出する方法である。この方法では、核酸の増幅と検出をリアルタイムで行うため Amplicor[®] のような PCR 産物検出のステップが不要となり、短時間(2.5時間)で分析可能である。

表2 核酸増幅を利用した抗酸菌の検出法

品名	適用菌種	標的分子	原理および検出法	分析時間 (核酸抽出液から)	製造	保険適用
DNA の増幅						
Amplicor [®]	結核菌群, <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i>	16S rDNA	PCR産物をプローブとの hybridization で検出	約5時間	ロシュ社	適用
TaqMan [®] MTB	結核菌群	16S rDNA	リアルタイム PCR 法で増幅産物を検出	約2.5時間	ロシュ社	適用
LAMP ¹⁾ 法 (研究段階)	プライマーの選択より幅広く対応可能		増幅産物を濁度あるいは蛍光で検出(感度は nested PCR と同等)	約1時間	栄研化学(株)	未適用
RNA の増幅						
RNA の増幅 MTD ²⁾	結核菌群	16S rRNA	TMA ³⁾ 法で増幅した RNA を HPA ⁴⁾ 法で検出	約2時間	Gen-Probe 社	適用
TRC ⁵⁾ Rapid M. TB	結核菌群(MAC ⁶⁾ および <i>M. kansasii</i> 用開発中)	16S rRNA	TMA ³⁾ 法で増幅した RNA を INAF ⁷⁾ プローブ法で検出	約1時間	東ソー(株)	適用

1) LAMP: Loop-mediated isothermal amplification, 2) MTD: Amplified mycobacterium tuberculosis direct test, 3) TMA: Transcription mediated amplification, 4) HPA: Hybridization protection assay, 5) TRC: Transcription reverse transcription concerted amplification, 6) MAC: *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, 7) INAF: Intercalation activating fluorescence.

まだ研究室段階であるが、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法が新しい検査法として注目されている⁵⁾。原理の詳細はここでは触れないが、①4種類のプライマーを利用するため特異性が高い、②一定温度の恒温槽(62℃)で増幅可能、③DNAの増幅に伴う濁度や蛍光を目視で判別可能、④反応は1時間以内に終了、⑤感度は nested PCR と同等、などの利点がある。LAMP 法は簡易、迅速、正確であり、すでに開発されている重症急性呼吸器症候群コロナウイルス RNA 検出キットなどで有用性は実証されている。喀痰の NALC-NaOH 処理を省き、検体を直接分析可能な結核菌用のキットの開発・改良が進められている。

RNAを増幅するキットとしてはMTDとTranscription reverse transcription concerted amplification (TRC) Rapid M.TBがある(表2)。これらは結核菌 16S rRNA を transcription mediated amplification (TMA) 法で増幅する方法である。MTD 法は標識した一本鎖 DNA プローブと増幅した RNA をハイブリダイゼーションし、RNA-DNA ハイブリッドを形成させ、反応しなかった標識プローブを分解する。そして、残ったハイブ

リッド体の蛍光を測定するという hybridization protect assay (HPA) 法を利用して結核菌 RNA を検出する方法である。TRC Rapid M.TB 法は、MTD 法と RNA-DNA ハイブリッドを形成する点までは同じだが、ハイブリッド形成したプローブのみが蛍光を発する intercalation activating fluorescence (INAF) プローブを利用する。そのため、未反応のプローブを分解するステップが省略可能となる。その結果、分析時間の短縮(約1時間)、増幅と検出を同一密閉チューブ内で実施可能となり、自動化、混入(汚染や夾雑物)の防止を図ることが可能となった。

2. 核酸の相同性を利用した抗酸菌の同定検査

従来からのナイアシン試験など抗酸菌の培養・生化学的性状に基づく同定法も利用されてきたが、現在は核酸を利用した方法が主流となっている。同定検査では、核酸の増幅は行わないので純培養した1白金耳程度の菌が必要である。

“AccuProbe Test”では、4菌種・群(*M. tuberculosis* complex, *M. avium-intracellulare* complex, *M. kansasii*, *M. goodii*)を同定可能である(表3)。それぞれの抗酸菌に特異的な遺伝子(核酸)部位の標識 DNA プローブ準備し、検体

表3 抗酸菌の同定検査

品名	検出可能な菌種数	同定に利用する部位・プローブ	原理	分析時間	製造
Accuprobe Test (アキュプローブ)	4 菌種 (結核菌群, MAC, <i>M. kansasii</i> および <i>M. goodii</i>)	16S rDNA 上の各菌種に特異的な部分に対応した DNA プローブ	RNA-DNA hybridization	約 2 時間	極東製薬工業(株)
DDH* マイコバクテリア	18 菌種 (結核菌群を含む)	ゲノム DNA 全体を利用	DNA-DNA hybridization	約 4 時間	極東製薬工業(株)

* DDH : DNA-DNA hybridization.

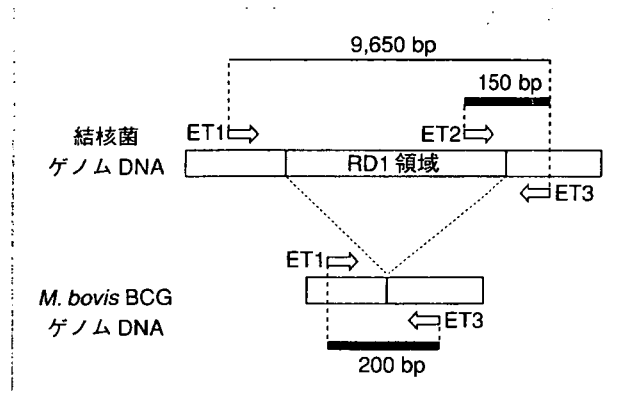


図 マルチプレックス PCR 用プライマーのデザイン

[文献6]より一部改変して引用

結核菌では主として ET2 と ET3 プライマーから 150 bp が、BCG では ET1 と ET3 プライマーから 200 bp の PCR 産物が得られる。

の rRNA と液相中で反応させる。その後、HPA 法で蛍光を検出し、菌種・群の同定を行う。“DDH マイコバクテリア”は、18 菌種の抗酸菌 DNA があらかじめ固定されたマイクロプレートを使い、被検菌のゲノム DNA を標識して DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行う。発色からハイブリッドを形成した菌種を検出し、同定するキットである (所要時間：4 時間)。“AccuProbe Test”のほうだが、簡便で短時間 (2 時間) で分析可能である。しかし、同定できる菌種が少ないという欠点がある。

3. 結核菌と *M. bovis* BCG の鑑別

M. bovis BCG は乳幼児に対して結核の予防ワクチンとして使用されている。さらに、抗悪性腫瘍剤として膀胱癌の治療にも使われている。ワクチン接種後の副作用で組織から、あるいは膀胱癌治療では尿中から抗酸菌が検出された場合、通常の検査では結核菌群として同定され、結核菌と BCG の鑑別は困難である。遺伝子座の region of

difference (RD1~3 など) は BCG に欠失し、結核菌群と一部の抗酸菌のみに存在していることから、RD1 領域に 3 種類 (ET1~3) のプライマーを設定し (図)、PCR 法で分析すると、結核菌では 150 bp、BCG では 200 bp の PCR 産物が得られる⁶⁾。この分析系を用いることにより、結核菌と BCG を容易に鑑別することが可能である。

おわりに

結核菌および非結核性抗酸菌感染症の病原体診断において、遺伝子検査は日々進歩しており、その迅速性・簡便性から不可欠な検査となっている。しかし、迅速性に課題はあるが、生菌を高感度で検出し、かつ、薬剤感受性試験に極めて有用な培養検査や臨床および画像所見などを総合して結核を含め抗酸菌感染症を診断することが重要である。

文 献

- 1) 財団法人結核予防会：結核の統計 2006 資料, pp 1-12, 2006
- 2) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編：新結核菌検査指針 2000, 財団法人結核予防会, pp 1-12, 2000
- 3) 日本結核病学会予防・治療合同委員会：核酸増幅法による結核菌検査の臨床での利用について。結核 70 : 711-712, 1995
- 4) 原田登之, 樋口一恵, 関谷幸江, 他：結核菌抗原 ESAT-6 および CFP-10 を用いた結核感染診断法 QuantiFERON® TB-2G の基礎的検討。結核 79 : 725-735, 2004
- 5) 納富継宣：LAMP 法が拓く新しい遺伝子検査。日本臨牀 65 : 957-961, 2007
- 6) Talbot EA, Williams DL, Frothingham R : PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol 35 : 566-569, 1997

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

前田 伸司 菅原 勇 加藤 誠也

要旨: 日本、中国、韓国で結核菌の分子疫学的解析を行っている研究者を集めた会議を開催した。各国で作成した IS6110 RFLP データベースを持ち寄り、RFLP パターンの解析を行うと、韓国内の結核菌の約 4% を占める "K-strain" と同一パターンの株が 1 例、日本国内で分離された結核菌からも見つかった。このように、各国に特徴的な結核菌が既に周辺諸国に広まっている可能性が高い。今後は、地域的に関連がある各国同士、結核に関しても協力して調査研究していく必要がある。

キーワード: 結核、分子疫学、タイピング、RFLP、IS6110

背 景

日本、中国、韓国の結核研究所は、持ち回りで学術フォーラムを主催し各国の結核対策の状況、研究成果等について意見交換を行っている。昨年は、北京疾病管理センター北京結核・胸部腫瘍研究所病院長 Dr. Fu Yu が中心となり、北京で開催され、基礎研究から結核治療に関する話題まで幅広く議論された。

会議の中で、最近 3 国間の人事交流が盛んになっていくことから、結核を含めた感染症が互いの国から持ち込まれ東アジア地域内で広まる可能性が指摘された。状況を調査するために、各国内で分析している結核菌株の IS6110 制限断片長多型 (RFLP) 分析結果を比較して、それぞれの国内で広がっている株が同一株由来か異なる株なのか、検討を行うことになった。

第 1 回分子疫学担当者会議

2007 年 2 月 6 日から 9 日の 4 日間の日程で、結核予防会結核研究所において、分子疫学分析担当者を集めた会議を開催した。出席者は、韓国結核研究所 (KIT) から Dr. Young-Kil Park および Ms. Kang Hee Yoon と、国立釜山大学医学部臨床検査学教室から Dr. Chulhun L. Chang および Ms. Eun Ju Song、中国からは北京疾病管理センター北京結核・胸部腫瘍研究所 Dr. Li Weimin、日本からは

大阪市立環境科学研究所微生物保健課の和田崇之先生と結核研究所から著者ら 6 名が参加した。

会議の内容

初日は、全体で各国の結核に対する分子疫学的分析法の現状と今後に関するプレゼンテーションを行い、問題点等を議論した。各国の現状は以下のようであった。

〔韓国〕

学校や軍隊内での集団発生例が多く、結核菌のタイピング結果をデータベースと照合し、迅速に集団発生を検出するシステムを構築し、2004 年から現在まで約 6000 例の株を分析してデータベース化している。RFLP 分析により、K-strain と名づけられた韓国に特徴的な株がある。この株は、全体の 4.1% (42/1030) 存在していた。また、RFLP 分析パターンの類似度が K-strain の 70% 以上の株は K-family として分類されており、このような株は 19.3% (199/1030) 含まれていた。結核患者の年齢構成は、10～19 歳が 12.1%、20～29 歳が 36.4%、30～39 歳が 34.0%、40～49 歳が 14.6% で、20～39 歳が全体の約 7 割を占めている。

〔中国〕

全国で年間 450 万人の結核患者が発生している。結核発症のリスクファクターは、高年齢の男性が最も高い。北京で調べたところ 64.9% (265/408) が北京型結核菌

Table Comparison of IS6110 RFLP analyses among three countries

	No. of isolates	Mode no. of IS6110 copy	Number		Clustered isolates
			K-strain	K-family	
Korea	1030	10 (17.5)	42 (4.1)	199 (19.3)	348 (33.8)
Japan	391	14 (13.6)	1 (0.3)	40 (10.2)	106 (27.1)
China	50	10 (14) 18 (12)	0	2 (4)	4 (8)

(%)

だった。幸いなことに抗結核薬に対して感受性菌が多い。最近では、新しい結核菌タイピング法として反復配列多型 (VNTR) 分析法が導入されている。

(日本)

NTFゲノム領域におけるIS6110の挿入の有無で北京型結核菌は、祖先型 (IS6110の挿入なし) と蔓延型 (挿入あり) に分類することができる。大陸株 (中国, モンゴル) と日本株においてこの祖先型と蔓延型の比率を調べたところ、大陸株では、蔓延型が70.8%を占めていたのに対して、日本株では祖先型が78.7%を占めていた。世界的に北京株の蔓延型が拡散し広がっているのに対して、日本国内では、祖先型株が約8割を占めるという特徴があった。また、東京都をフィールドとした結核菌の地域疫学分析結果が報告された。

2日目以降は、解析プログラムを使って、データベース化した韓国のRFLP分析パターン (1030株) と日本のデータベース (391株) を結合させ、さらに中国からの株は生データを取り込んでデータベース (50株) を構築し、3カ国における結核菌RFLPパターンの比較を行った。

成 果

分析した結核菌の株数が異なる (特に中国からの株は例数が少ない) ため各国の全体的な傾向・特徴を把握することはできなかったが、RFLP分析データを比較したところ、韓国内で特徴的な“K-strain”と呼ばれているIS6110 RFLPと同じパターンの結核菌が、日本国内でも1株 (約0.3%, [1/391]) 存在することがわかった (Table)。この株は、韓国人街等がある大阪や東京などの大都市ではなく、東関東の病院で分離された菌であり、疫学的関連性は不明である。韓国では、全結核菌の約4%がこの

K-strainであり、韓国内の結核菌に特徴的なRFLPパターンであると考えられている。一方、日本国内にも、韓国、中国内で分離された結核菌と異なる日本に特徴的なRFLPパターンをもつ結核菌 (いわば、J-strain) が存在することが示唆された。また、韓国、中国の研究者に新しい結核菌のタイピング法である反復配列多型 (VNTR) 法の技術講習を行った。

今 後

日本、韓国では、それぞれの国で特徴的なRFLPのパターンが存在することが示唆された。これらの株は、各国に固有のものか、分離した菌 (DNA) や疫学情報を共有することにより共同研究を進めていく必要がある。また、大阪市のように、大規模な韓国人街をもつ都市における結核患者では、K-strainの分離頻度が異なるのか等の研究を共同で開始する予定である。今後は、VNTR法を利用した結核菌のタイピングおよび共同解析も可能となった。近接した国との共同研究を通して、アジア地域内での結核対策に寄与できる方策等の開発を推進していきたいと考えている。

謝 辞

本事業は、厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 平成18年度「結核菌に関する研究」(主任研究者 加藤誠也) の研究課題の一部として研究補助を受けた。

文 献

- 1) Kim SJ, Bai GH, Lee H, et al.: Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among high school students in Korea. Int J Tuberc Lung Dis. 2001; 5: 824-830.

— Report and Information —

REPORT OF THE MEETING FOR RESEARCHERS IN CHARGE OF TUBERCULOSIS
MOLECULAR EPIDEMIOLOGY IN JAPAN, CHINA AND KOREA

Shinji MAEDA, Isamu SUGAWARA, and Seiya KATO

Abstract The meeting for the researchers who are in charge of tuberculosis (TB) molecular epidemiology in Japan, China and Korea was held. When the databases of IS6110 RFLP in each country were analyzed, the unique K-strain, which constitutes ca. 4% among total TB cases in Korea, was also found in the TB clinical isolates in Japan. Thus, it is very likely that the *Mycobacterium tuberculosis*, which is characteristic in each country, have already spread out into surrounding nations. It is expected that each country should facilitate the molecular epidemiological research in a concerted way.

Key words: Tuberculosis, Molecular epidemiology, Typing, RFLP, IS6110

Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

Correspondence to: Shinji Maeda, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: maeda@jata.or.jp)

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

¹鹿住 祐子 ¹宇田川 忠 ¹前田 伸司 ¹村瀬 良朗
¹菅原 勇 ²奥村 昌夫 ³東 由桂 ⁴後藤美江子
⁵常松 範子

要旨:〔目的〕*M. avium* タイピングにおける VNTR と RFLP の有用性を比較する。〔対象および方法〕喀痰・気管支洗浄液分離の 36 例 (55 株) と HIV・血液から分離された 12 例 (29 株) を用い、西森らの *M. avium* 用 VNTR と IS1245 を用いた RFLP を行った。〔結果〕16 例から複数回採取された検体は 12 例が VNTR と RFLP が一致した。1 例 (8 株) に多クローン感染 (2 株) と *M. intracellulare* の複合感染 (1 株) が認められ、VNTR は 2 種類であったが、RFLP は 5 種類確認された。そして HIV 感染者血液の 1 例 (6 株) の VNTR は 6 株とも同じパターンであったが、RFLP は 3 パターン得られた。用いた 84 株のうち多クローン感染が 6 株あり、それらは喀痰・気管支洗浄液から 5 株 (13.9%)、HIV 感染者血液から 1 株 (8.3%) であった。そして *M. avium* と共に他の菌種の複合感染が 3 例 (6.3%) あった。VNTR において、接触歴のない株で VNTR が一致した例が、全 48 例 89 株中で 4 組 9 例 (18.8%) あったが、これらの株は RFLP で区別可能であった。〔結論〕今回の 84 株の *M. avium* 分析例では RFLP の分析能は VNTR より高かったが、同一例から採取した検体から VNTR は同じであったが RFLP パターンが異なるものがあり、1 症例から複数回の検体採取を行う必要性が示唆された。

キーワード: *Mycobacterium avium*, Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR 法), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP 法), 多クローン感染

はじめに

Mycobacterium avium は 1901 年に Chester によってトリに病原性のある抗酸菌として報告され¹⁾、近年、HIV 感染者に播種性感染を引き起こすことで注目されている。日本における *Mycobacterium avium intracellulare* complex (通称 MAC: マック) は疫学に地域的分布差²⁾があり、近畿以東の北海道・東北・関東・東海および近畿では *M. avium*、以西である中国・四国・九州では *M. intracellulare* が比較的多い。そしてこの菌種は非病原性菌として自然界にも多く存在し、斉藤ら³⁾は 24 時間風呂において *M. avium* が浴水では少なかったものの、フィルターや濾材から高率に検出されたと報告している。さらにトリやヒ

トだけでなく、他の動物における *M. avium* 症報告は多く、佐藤らの報告⁴⁾でもブタに病原性が認められている。

この *M. avium* のタイピングは血清型別が用いられてきたが、特殊な機材と技術的熟練性を要するため、現在では挿入配列 (Insertion Sequence: IS) 型別によるタイピングが広く行われている。この方法は IS900、IS1331 など⁵⁾を用いて制限酵素断片長多型 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法の研究が行われてきたが、現在は 1414 bp の長さをもつ IS1245 が発見され⁶⁾、これが広く RFLP に用いられるようになった。そして近年、結核菌のタイピングに使われている Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法⁷⁾が *M. avium* においても応用されつつあり、今回われわれは *M. avium* タイピングに

¹結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター、²結核予防会複十字病院呼吸器科、³同検査課、⁴東京大学医学部附属病院感染制御部微生物検査、⁵東京都立大塚病院検査科

連絡先: 鹿住祐子, 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター病理検査科, 〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: kazumi@jata.or.jp)

(Received 14 Jun. 2007/Accepted 25 Jul. 2007)

における VNTR と RFLP の有用性を比較した。

材料と方法

(1) 材料

被検株として主な抗酸菌21菌種 (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii*: ATCC12478, *M. marinum*: ATCC927, *M. scrofulaceum*: ATCC19981, *M. szulgai*: ATCC35799, *M. goodii*: ATCC14470, *M. avium* subsp. *avium*: ATCC 25291, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*: ATCC19698, *M. avium* subsp. "suis": ATCC19978, *M. avium* subsp. *silvaticum*: ATCC49884, *M. intracellulare*: ATCC13950, *M. gastri*: ATCC15754, *M. nonchromogenicum*: ATCC 19530, *M. terrae*: ATCC15755, *M. fortuitum*: ATCC6841, *M. fortuitum*: ATCC49403, *M. chelonae* subsp. *chelonae*: ATCC35752, *M. abscessus*: ATCC19977, *M. mucogenicum*: ATCC49650, *M. lentiflavum*: ATCC51985, *M. mageritense*: ATCC700351) と抗酸菌に近縁の *Rhodococcus equi*: ATCC 6939, *Nocardia asteroides*: ATCC19247 を加えた計23菌種と16S rRNA シークエンス⁸⁾によって *M. avium* と同定した A から D の医療施設・48例からの分離84株を用いた。この内訳は16例から複数回臨床材料を採取して得られた52株, 1人1回の検体採取が32例32株であった。対象となった症例は病院の入院患者(肺癌, HIVなど), あるいは外来患者(呼吸器疾患, リウマチなど)で, *M. avium* 症の有無は確認していない。

(2) DNA の抽出

2週間培養した Middlebrook 7H9 液体培地発育菌 25 ml を 4,200 rpm 15分間遠心沈殿し, 沈渣を ISOPANT (ニッポン・ジーン) のマニュアルに従って抽出を行い, TE (pH 8.0) 200 μ l に浮遊させ DNA 抽出液とした。

(3) VNTR

PCR の温度条件とサイクル数は西森らの方法⁹⁾に従って17種類のプライマーセット (MATR) を使用した。PCR 産物を 1×Tris-borate (TBE), 2.5% アガロースゲルにてサイズマーカー (100 bp DNA Ladder Marker) と共に電気泳動した。泳動後サイズマーカーより増幅産物のバンドのサイズを簡易的に計測して, 西森らの換算表に従って反復配列のコピー数を求め, アリルプロファイルを作成した。

このとき, 各 MATR で複数のバンドがみられたとき, *M. avium* が複数混在 (以下, 多クローン感染), また他の菌種の混入を疑い, 7H9 液体培地発育菌を 10^6 まで希釈し, その 0.1 ml を 7H10 寒天培地に接種・培養し, シングルコロニーを得てから再分析した。

(4) RFLP^{5) 10) 11)}

RFLP は Soolingen⁵⁾ の方法に従って実施した。DNA 抽出液をエタノール沈殿後, 制限酵素 *Pvu* II によって

DNA を切断した。電気泳動は 0.8% アガロースを用い, 22 mA・30V で 16 時間行った。そしてアルカリ変性させ, DNA を 1 本鎖にし, トランスメンブランフィルターに 6 時間転写後 UV 固定を行った。さらにビオチン標識プローブ DNA (IS1245^{5) 11)} を加えたハイブリダイゼーション液にてハイブリダイゼーションを行った。次にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Roche 社) を反応させ, アルカリ下で ECL (GEヘルスケアバイオサイエンス) にて化学発光後に X 線フィルムに感光させて現像した。

結 果

(1) 主な抗酸菌21菌種と近縁2菌種による VNTR と RFLP の結果

主な抗酸菌21菌種と近縁2菌種の VNTR の結果は23菌種すべてに1から16の MATR において複数カ所にバンドの形成がみられた。Fig. 1 は西森らの *M. avium* 用のプライマー MATR を用いて PCR し電気泳動した *M. avium* subsp. *avium*: ATCC25291 (A) と *M. tuberculosis* H37Rv (B) である。4種類の *M. avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. "suis", *M. avium* subsp. *silvaticum*) は1から16の MATR すべてにバンドの形成がみられた。一方, 他の菌種はバンドのない MATR が複数あった。MATR-0 (Fig. 1 右端) においてバンドがみられたのは *M. paratuberculosis* のみであった。

RFLP では, 4種類の *M. avium* 以外からバンドの形成はみられなかった。

(2) 16例から複数回採取した臨床材料分離の *M. avium* による検討

16例から複数回採取した臨床材料から分離された *M. avium* 52株について VNTR と RFLP を行った (Table 1)。症例番号1から11, 16は検体の種類が喀痰あるいは気管支洗浄液, 12から15は HIV 感染者の血液である。

(a) 症例番号1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 14, 15 では VNTR と RFLP がそれぞれの症例内で同じパターンとなり, 症例番号9の KK41-377 と KK41-378 は VNTR が同じであったが, RFLP は1本バンド違いであった。

(b) 症例番号7では2003年3月から2004年1月までの間に8回検体が採取され, 6回は喀痰, 2回が気管支洗浄液であった。検体番号 KK41-366 は VNTR にて3カ所 (MATR3・4・12) にダブルバンドがみられ, コロニーをシングル化した後, それぞれのコロニーを16S rRNA 法によって同定した結果, *M. avium* と *M. intracellulare* の複合感染であった。このシングルコロニーから得られた *M. avium* を液体培地で増菌培養し, 再度, VNTR を行い, そして RFLP を行った。KK41-368 (気管支洗浄液) は VNTR の MATR 番号3と4に2本バンドがみられ, 寒

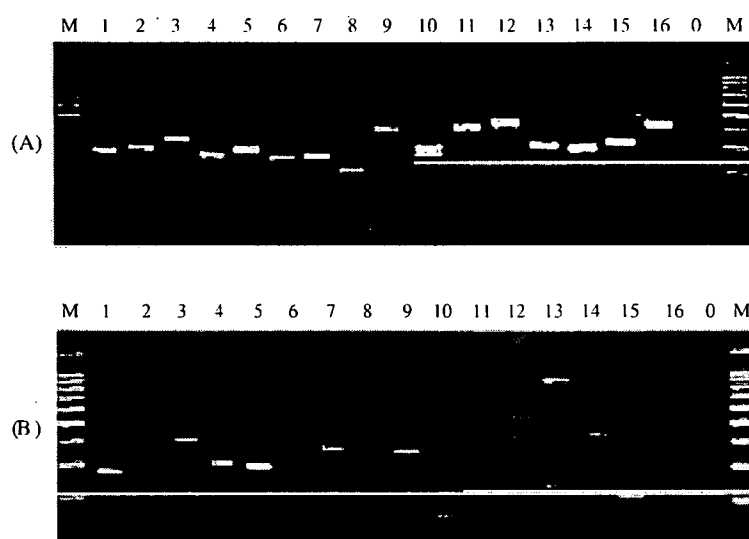


Fig. 1 (A) VNTR analysis pattern of *M. avium* subsp. *avium* (ATCC25291). (B) VNTR pattern of *M. tuberculosis* (H37Rv).

The primer sets reported previously⁹⁾ were used. M: 100 bp ladder marker; 1 to 16 were sequentially number of locus in Nishimori's primer sets. 0 was used for *M. avium* subsp. *paratuberculosis* detection.

Table 1 Comparison of VNTR and IS/245 RFLP analyses in the cases that specimens were collected from identical patients several time. (16 cases, 52 strains)

No. of case	strains	No. of strains	Results of VNTR	Results of RFLP
1.	KK41-300, 300-1	2	Same	Same
2.	KK41-347, 348	2	Same	Same
3.	KK41-352, 353, 354, 396	4	Same	Same
4.	KK41-355, 356	2	Same	Same
5.	KK41-357, 358, 359	3	Same	Same
6.	KK41-360, 361	2	Same	Same
7.	KK41-366~373	8	Polyclone and superinfection of the other <i>Mycobacteria</i>	Difference
8.	KK41-375, 376	2	Same	Same
9.	KK41-377, 378	2	Same	One band difference
10.	KK41-379, 380	2	Same	Difference
11.	KK41-392, 393, 394	3	Same	Same
12.	KK41-398~403	6	Same	Difference
13.	KK41-404~406	3	Same	Same
14.	KK41-411~413	3	Same	Same
15.	KK41-415~420	6	Same	Same
16.	KK41-438, 440	2	Superinfection of the other <i>Mycobacteria</i>	Same

天培地でシングルコロニーを作り、再度VNTRにて確認したところ、2種類の *M. avium* が混在した多クローン感染であった。KK41-371は分譲された元株（小川培地発育菌）にて行ったVNTRで多クローン感染が確認されたが液体培養で発育せず、死菌と考えられた。このため分析に必要なDNA量が得られず、RFLPは実施できなかった。この8検体の結果はVNTRにおいて多クローン感染であったためKK41-368は2つ（コロニー番号1

と5）となったが、KK41-371は増菌できなかったため最終的に8株を検査し、VNTRはAとBの2種類のパターンであったが、RFLPは①から⑤の5種類あった（Table 2）。

(c) 症例番号10の2株はVNTRが同じであったがRFLPは異なった。

(d) 症例番号12は1人のHIV感染者から採取された血液で1998年10月から1999年3月までの間6回採取

Table 2 Typing pattern of isolates from case 7

Number of strain	VNTR	RFLP
KK41-366	<i>M. avium</i> pattern A and <i>M. intracellulare</i>	pattern①
KK41-367	pattern A	pattern②
KK41-368 (1)	pattern A	pattern③
KK41-368 (5)	pattern B	pattern④
KK41-369	pattern A	pattern⑤
KK41-370	pattern A	pattern⑤
KK41-371	Polyclone	Non
KK41-372	pattern A	pattern①
KK41-373	pattern A	pattern①

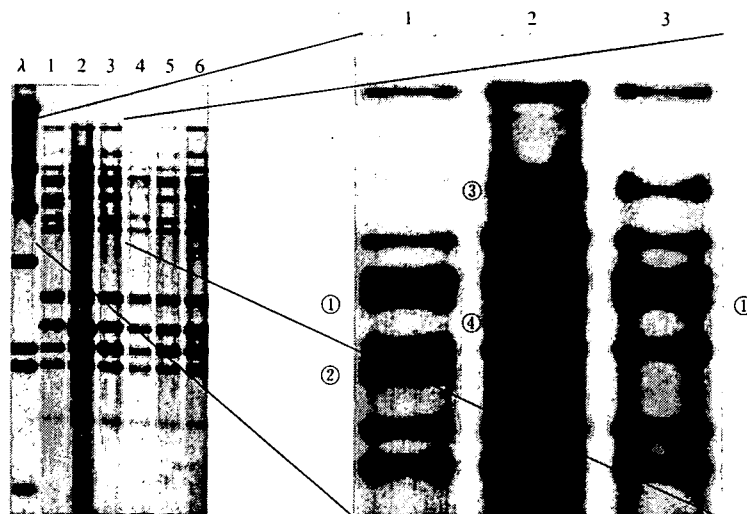


Fig. 2 RFLP pattern of *M. avium* isolated from blood specimens of HIV patient. *M. Lambda Hind III* digested DNA marker: 1: KK41-398 (1st sample), 2: KK41-399 (4 months later), 3: KK41-400, 4: KK41-401, 5: KK41-402, 6: KK41-403

し、VNTRは6株とも同じであったが、RFLPパターンはKK41-398（採取時期1998年10月26日株）とKK41-399（1999年2月19日株）はそれぞれ別パターンであった。さらにこれら2株は同一パターンであったKK41-400（1999年2月20日株）、KK41-401（1999年3月1日株）、KK41-402（1999年3月10日株）、KK41-403（1999年3月17日株）と異なった。従って症例12の6株からVNTRは1種類であったが、RFLPパターンは3種類得られた（Fig. 2）。

KK41-398、KK41-399とKK41-400の比較をFig. 2に示す。KK41-398とKK41-399を比較するとKK41-398の①と②がKK41-399では消失し、③と④が出現した。このKK41-399とKK41-400を比較した結果、④が消失し、①が出現した。

(e) 症例番号16の2検体のうちKK41-438（2006年1月採取）は複数のMATRに複数のバンドがみられたため寒天培地でシングル化し、その中の10個のシングルコロニーをとり、それぞれ16S rRNA シークエンスにて同

定した。その結果、1個を*M. avium*と同定し、9個が*M. intracellulare*であった。これによって得た*M. avium*（新たなKK41-438）を2004年に同じ症例から分離したKK41-440と比較した。このKK41-440のVNTRはそれぞれのMATRにおいてシングルバンドで、複合感染はなく、両者を比較した結果、VNTRとRFLPの結果は同じであった。

(3) 他の菌種との複合感染と*M. avium*の多クローン感染

(a) *M. avium*と他菌種の複合感染

48例84株のうち1株（HIV感染者・血液）からVNTRによって*M. tuberculosis*が*M. avium*と共に検出された。Fig. 3 (A) は分離株のVNTRの結果であり、複数のMATRに複数のバンドがみられた。このときのアンプリコマイコバクテリウム（Roche社）¹²⁾の結果は*M. tuberculosis* complex、*M. avium*共に陽性であった。このため*M. avium*と*M. tuberculosis*の混在を考え、寒天培地にて単一菌種のコロニー化を試みたが、*M. tuberculosis*と

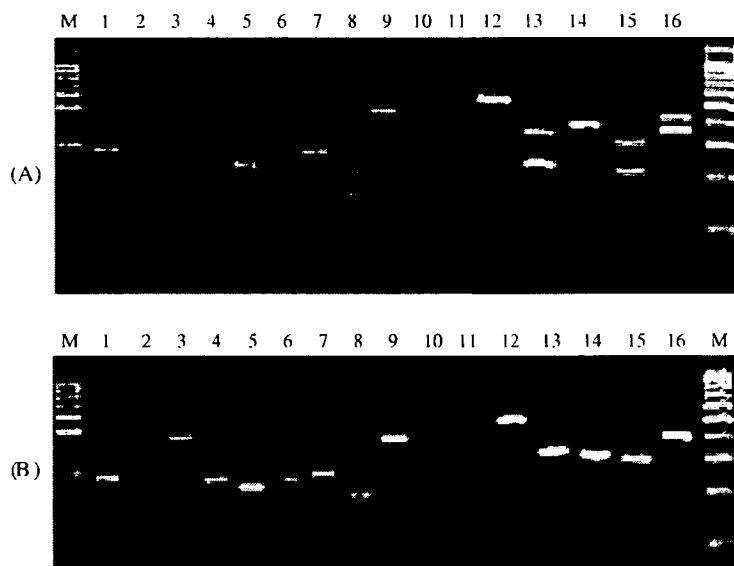


Fig. 3 VNTR pattern of KK41-408 (a combined case of *M. tuberculosis* and *M. avium*)
 This was a double infection case (A). *M. avium* and *M. tuberculosis* were detected by the Amplicore kit. So, bacilli were cultivated with INH for 2 weeks at 37°C. In analysis of Amplicore kit, MTB became negative and *M. avium* was positive. VNTR analysis was performed again (B).

*M. avium*のそれぞれ独立したコロニーを得ることができなかった。このためこれをMGIT (ベクトンディッキンソン社)・0.1 µg/ml INH含有液体培地にて2週間培養し、培養後に再度アンプリコアマイコバクテリウムを行い、*M. tuberculosis* complex陰性、*M. avium*陽性を確認し、VNTRを実施し*M. avium*の結果とした (Fig. 3 (B) : 写真は左から1~16のMATRを使用した結果である)。他に2株 (略痰由来) が*M. avium*と*M. intracellulare*の複合感染で、この*M. tuberculosis*と合わせて他の抗酸菌が*M. avium*と共に検出されたのは48例84株中3株 (6.3%)であった。

(b) 多クローン感染の株

48例84株から*M. avium*の多クローン感染であった6株がVNTRによって検出された。この内訳は略痰と気管支鏡洗浄液の36例 (55株) の中に5株 (13.9%)、HIV感染者血液12例 (29株) の中に1株 (8.3%)のみであった。

(4) VNTRの結果をRFLPと比較

84株に加えて多クローン感染のためシングル化し、新たに6株が追加となったが、KK41-371が対象から削除され、計89株の比較を行った。

(a) 48例 (89株) のVNTRの結果をRFLPと比較した。VNTRが同じパターンを示し、RFLPが異なった4組 (9例) をTable 3に示した。グループ1, 2は異なった施設の例で、3と4は同じ施設であった。同じ施設内の例は診療期間に違いがあるなど、これら4組にはそれぞれ接

Table 3 The groups of the strains with identical VNTR profile and different RFLP pattern

Number of Group	Strains	Hospital
Group 1	KK41-254	A
	KK41-345	B
	KK41-354	C
Group 2	KK41-346	B
	KK41-430	D
Group 3	KK41-255	A
	KK41-271	A
Group 4	KK41-431	D
	KK41-434	D

点が認められなかった。

(b) この他に施設A (KK41-272-2) と施設C (KK41-375) はVNTRのパターンが同じで、RFLPの結果はバンドの位置が一致していたもののKK41-272-2が5本バンド、KK41-375は4本バンドでバンドが1本異なるパターンであった。

(5) RFLPのバンド数について

RFLPを行った89株のうち17株 (19.1%) はバンド数が3本以下であった。

考 察

結核菌のRFLPは結核感染の疫学調査や集団感染、あるいは小さなグループ (同じ事業所内・病院内・家族内

感染など)における感染拡大予防のために導入され、さらにこの感染経路解明¹⁰⁾だけでなく、検査技術の高度化による検査室内汚染¹¹⁾の原因追求のためにも用いられている。結核菌型別には IS6110 を使った RFLP が使われ、*M. avium* の型別には IS1245 が用いられている。しかし、*M. avium* は自然界にも多く存在し、分裂時間・発育温度域・環境に適応する能力が結核と異なり、またヒトの体内における多クローン感染や他の菌種との複合感染などの頻度も高く、この研究を困難にしている。同一症例からはほとんどの場合、同じ VNTR・RFLP パターンであったが、Table 1 の症例番号 7 のように、同一症例から多クローンと *M. avium*, *M. intracellulare* の複合感染が確認されるなど判定の困難な症例もある。*M. avium* は通常一過性で、1 人の症例から 1 回検出されるだけのケースが多いが、症例 7 は基礎疾患にリウマチがあり、免疫と *M. avium* の多クローン感染・他の菌種との複合感染の関連について、今後、例数を増やして検討したい。

同一症例から複数回臨床材料を採取した検討では、16 例中 12 例に VNTR と RFLP にて同じ結果が得られたが、4 例は多クローン感染や他の菌種の混在、そして VNTR と RFLP の結果がくい違うなど、同じ症例でも、常に同じ結果ではなかった。このため家族内同一感染源が疑われる場合、必要に応じて複数回の臨床材料採取が望まれる。

HIV 症例の報告では Picardeau ら¹⁴⁾は 93 例から 89 RFLP パターン (95.7%) が得られ、フォローアップされた 39 例のうち 37 例が単クローン感染 (monoclonal) で、2 株は初めの RFLP パターンと異なった。今回のわれわれの研究でも HIV 患者の血液のフォローアップ 4 例 (Table 1 の症例番号 12 から 15) のうち 1 例 (症例番号 12) は RFLP が初めのパターンと異なった。Lari ら¹⁵⁾の報告では 52 の HIV 陽性例のうち、47 例が単クローン感染で、5 例が多クローン感染 (polyclonal) であった。そして今回のわれわれの研究でも HIV 感染者 12 例 1 株 (8.3%) に多クローン感染があったのみで、血液検体では喀痰などより単クローン感染が多いと考えられた。

桑原ら^{16,17)}は IS1245 にて *M. avium* の RFLP 法を行った場合、1 本バンドの変異は同一株とみなしており、今回、われわれもそのルールに従った。そして Bauer ら¹⁸⁾は 1 年間に 33 回液体培地による継代培養を繰り返したところ、*M. avium* 6 株のうち 4 株に 1 ないし 2 のバンドが変化したと報告した。Pestel-Caron¹⁹⁾は IS1245 の安定性について評価を行うため分離菌 32 株を分析した。その結果、8 例 (25%) で 1~2 本、5 例 (16%) で 3 本以上の違いが認められたと報告した。われわれの行った今回の HIV 感染者血液から分離された KK41-398 から KK41-403 までの 6 株は、VNTR 分析によって、すべて同一ブ

ロファイルで単クローン感染であると考えられたが、RFLP 分析において 3 種類のパターンが得られた (Fig. 2)。この変化がヒトの体内ですでに起こっていたのか、菌株の保存条件が原因したのか、継代培養も含めて実験中に生じたのか不明である。症例 7 と 12 は VNTR が同じにもかかわらず短期間の間に RFLP のパターンが変わった。これは VNTR におけるコピー数の変化より、RFLP 分析における IS1245 の変化のほうが生じやすい *M. avium* があることを示唆している。

Viedma ら²⁰⁾は結核菌において MIRU-VNTR と RFLP を比較し、VNTR は同時に 2 種類の結核菌を検出でき、有用性が高いと報告した。*M. avium* においても RFLP では多クローン感染を見つけるためには数多くのコロニーを検査しなければならないが、VNTR では各 MATR にバンドが複数でき、その存在を容易に見つけることができる。それだけでなく、*M. avium* 以外の抗酸菌は IS1245 をもたないため IS1245 RFLP 分析を適応することはできないが⁶⁾、*M. avium* 用の VNTR を用いた場合、他の抗酸菌だけでなく、*Rhodococcus* sp. や *Nocardia* sp. も検出することができ、他の菌種が複合感染している場合も簡単に見つけることができるという利点がある。このため VNTR を行うにあたってあらかじめ *M. avium* と同定された株を用いる必要があるが、われわれは *M. avium* の分析においても同様に多クローン感染と、他の抗酸菌の同時検出において西森らの *M. avium* 用の MATR を用いた VNTR は有用であると考えた。

さらに RFLP には、① PCR などの核酸を増幅する作業がないため菌量が微量である場合、増菌 (2~3 週間) を行わなければならない、② DNA 抽出から判定まで検査過程が長い、③ バンド数の少ない場合、別の方法での確認が必要となる、などの問題がある。このバンド数の少ない株については森山ら²¹⁾も RFLP には IS1245 において単一バンドがあったため RFLP の菌株鑑別能が低かったと報告している。結核菌の RFLP 法において、バンド数 (コピー数) が少ない場合、タイピング能力が落ちる²²⁾といわれ、他の方法で確認することが勧められているが、*M. avium* の場合、トリ由来株はバンド数が少ないという報告¹⁵⁾もあり (ATCC 標準菌株: *M. avium* subsp. *avium*: ATCC25291 は 3 本バンド)、今後、バンド数の少ない例の検討が必要と思われる。

今後、① VNTR の感度、② 検体が喀痰である場合、喀痰の中の雑菌を処理し、均一にする前処理の生菌数に与える影響、③ 分離された菌の保存方法と継代培養の及ぼす影響、④ プレートから採取するコロニー数の問題、⑤ VNTR と RFLP の結果が異なった場合の解釈、などの課題が残った。

なお、今回の研究を通じて、主な抗酸菌 21 菌種と近