

していた沖縄県での報告¹⁶⁾や、大畠らの1～17本の分布で10と12本にピークが見られた岡山県の報告¹⁷⁾と同様の分布状況であった。したがって当センター周辺地域と他の地域での結核菌感染伝播に大きな違いは見られないと考えられた。

クラスター形成率は最近の感染からの発病を反映しているという定義が分子疫学を応用した感染対策の原則である。オランダ(1995年)、デンマーク(1998年)でのクラスター形成率は46.0%(結核罹患率:人口10万対10.4)、50.0%(10万対9.6)と報告されており¹⁸⁾、結核の低蔓延地域(10万対10未満)では比較的高いクラスター形成率を形成するものと考えられている。一方ニューヨークにおける1989年の結核罹患率は10万対36(全米平均は10万対9.2)となっているにもかかわらず、Allandら¹⁹⁾の1989～1991年での報告によるとクラスター形成率は37.5%であった。わが国では、阿野ら²⁰⁾の2001年の報告で大阪中南部地域のクラスター形成率は32.0%で中蔓延地域であるとしている。財団法人結核予防会から出版されている「結核の統計2002」²¹⁾によると2001年の大阪府における結核罹患率51.9は、全国平均の27.9より高値であった。したがって、大都市では地方に比べると結核罹患率が高いという地域間格差が見られ、また高いクラスター形成率が都市部における最近の感染状況を示唆していると考えられている。

今回の検討によるクラスター形成率は43.6%であった。そこで当センター周辺地域の結核罹患率を推定するために、まず西成区および浪速区に居住する患者由来菌株22株の対象菌株に占める割合は低い値を示していたこと(9.7%)から、大阪府の罹患率を今回の当センター周辺地域の罹患率と仮定した。結核罹患率は年度ごとに変動があるため、長期にわたって集められたMDR-TB群のサンプリング期間の中央値であり、S-TB群のサンプリング期間である2003年のデータを用いた。「結核の統計2004」²²⁾によると大阪府の2003年の結核罹患率は人口10万対44.0であり、全国平均(10万対24.8)よりも高かった。したがって当センター周辺地域は世界の高蔓延地域に比べると低い中蔓延地域ではあるが、ニューヨーク¹⁹⁾や大阪中南部²⁰⁾で示されたのと同様に、都市における比較的最近の感染発病を反映していると考えられた。

高鳥毛ら²³⁾は1996年から2000年までに結核高蔓延地域(西成区および浪速区)を含む大阪市内在住患者によるRFLP法を実施した結果、高蔓延地域と他の地域とでクラスター形成率は差が見られなかったとしている。そこで彼らはクラスター形成率と地域の罹患率水準の間には相関がなく、高結核罹患率は最近の感染伝播によるものではなく古い感染の内因性再燃発病による可能性が高

いと述べている。今回の検討から比較的高いクラスター形成率と高蔓延地域とはいいがたい結核罹患率が示され、クラスター形成率と結核罹患率との間に関連性が見られないという高鳥毛らの考えが支持できた。

しかし、結核においては「クラスター形成率=最近の感染の反映」とは必ずしもいえないという報告がBradenら²⁴⁾による米国アーカンソー州での地域結核分子疫学的研究で示されている。それによると33%の患者がクラスターを形成していたが、疫学的関連が確認されたのはそのうちの42%にすぎなかったとしている。高橋ら¹⁶⁾も沖縄県における地域流行株の存在を示唆している。今回、疫学的関連性が認められた事例は家族内感染の4事例(S-TB群)と集団感染と思われる事例の3事例(MDR-TB群)のみであり、疫学的につながりがないと思われる感染がほとんどであった。同様にクラスターの大きさ(構成員数)はMDR-TB群とS-TB群とで同程度に認められ、両群ともに構成員の大きいクラスターグループが存在していたが、多くの患者間での相互接触関係が証明されなかった。構成員数が大きいグループの中で疫学的関連が低い場合には幾世代か前の流行を反映する地域特有な株と推定されることから¹⁶⁾、過去に起きた流行株による内因性再燃発病によるものと考えられている。しかし最近に起こった患者間の偶発的な伝播による感染発病もありうることから、このような場合、患者に対して綿密な接触調査を実施することが必要となってくる。当センターのような広範囲な地域から結核症患者を受け入れる医療機関においては、患者情報を管轄する保健所が多岐にわたってしまい、個人のプライバシーの保護のうえからも患者情報の詳細な把握は非常に困難である。したがって現時点での解析結果からは、感染伝播力の強い結核菌による最近の感染発病と、地域的に流行している菌による内因性再燃発病の両方が混在して、クラスターを形成している可能性が考えられた。

MDR-TB群とS-TB群との間のクラスター形成率に有意差は認められなかった。従来薬剤耐性結核菌の感染伝播力は弱いとされてきたが⁹⁾²⁵⁾、近年、阿野ら²⁰⁾は大阪中南部地域を対象としたRFLP法の結果、薬剤感受性患者群とINH、RFP、EB、SMいずれかの薬剤に耐性の患者群とのクラスター形成率に有意差はなかったと報告している。われわれもMDR-TBの感染伝播力が必ずしも弱いとはいえないことを示すMDR-TBによる集団感染事例¹⁰⁾を報告している。したがって結核菌の感染伝播力は薬剤感受性に関係しないとの考えを今回支持できたことは意義があると考えられた。

MDR-TB群とS-TB群で共通のパターンを示すクラスターが2組認められた。すなわち感染伝播力の強い感受性菌が感染伝播力を保ちながら多剤耐性化し流行した可

能性と、全剤感受性の流行株が不適切な治療で多剤耐性化（獲得耐性）してクラスターを形成した可能性が、両群における共通パターンの存在から示唆された。

Spoligotyping法

今回の検討では MDR-TB 群、S-TB 群ともに Beijing family が約 75% 以上を占め、両群に有意差は認められなかった。また RFLP 法でクラスターを形成したグループは大部分が Beijing family に属していた (Table 2)。Beijing family は感染伝播力が強く、薬剤耐性を獲得しやすいとされており⁹⁾²⁶⁾、今回両群が同じ割合で Beijing family に属していたことは、薬剤感受性の違いによる結核菌の感染伝播力に差はない可能性をさらに支持する結果と考えられる。

RFLP 法と Spoligotyping 法のクラスターから推定した最近の結核感染発病率は、今回全対象結核菌 336 株において、大角ら¹⁵⁾が報告している 30.0% とほぼ同程度の 34.0% を示し、MDR-TB 群においては 32.1%、S-TB 群においては 35.0% であった。したがって最近における感染発病率も薬剤感受性に左右されない可能性が支持された。

ま と め

薬剤感受性の違いによる結核菌の感染伝播力の違いについて、遺伝子学的手法を用いた分子疫学的解析を行った結果、RFLP 法では MDR-TB と S-TB 群の間のクラスター形成率に有意差はなく (χ^2 検定 $p=0.51 > 0.05$)、Spoligotyping 法でも両群間の Beijing family の占める割合に有意差がないことを証明できた (χ^2 検定 $p=0.09 > 0.05$)。今回のデータは当センター周辺地域における結核対策の活動に役立つ基礎的データとして有用であると考えられた。

文 献

- 1) van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, et al.: Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 2578-2586.
- 2) van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al.: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 406-409.
- 3) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 907-914.
- 4) Cowan LS, Crawford JT.: Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1294-1302.
- 5) Tounoussova OS, Mariandyshev A, Bjune G, et al.: Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the archangel prison in Russia: predominance of the W-Beijing clone family. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: 665-672.
- 6) Diaz R, Kremer K, de Haas PEW, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of Spoligotyping versus IS 6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 743-750.
- 7) Kubica T, Rüscher-Gerdes S, Niemann S.: The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8: 1107-1113.
- 8) Krüüner A, Hoffner SE, Sillastu H, et al.: Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3339-3345.
- 9) van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PEW, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis.* 1999; 180: 726-736.
- 10) 露口一成: 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例について. 複十字. 2003; 293: 8-11.
- 11) WHO: Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendation for prevention and control. *Wkly Epidemiol Rec.* 2006; 45: 430-432.
- 12) Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, et al.: Analysis of the allelic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2438-2444.
- 13) Fillipi I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al.: Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1347-1349.
- 14) Goguet de la Salmonière YO, Li HM, Torrea G, et al.: Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2210-2214.
- 15) 大角晃弘, 高橋光良, 内村和広, 他: 結核菌 DNA 指紋法を用いた結核対策改善事業成績 (1996年4月~2004年5月の概略). 資料と展望. 2004; 51: 77-83.
- 16) 高橋光良: 結核分子疫学の成果と展望. 結核. 2002; 77: 741-752.
- 17) 大島律子, 多田敦彦: 岡山県内で分離された結核菌 DNA の IS 6110-RFLP パターン分析. 結核. 2002; 77: 629-637.
- 18) Bauer J, Yang Z, Poulsen S, et al.: Results from 5 years of nationwide DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in a country with a low incidence of *M. tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 305-308.
- 19) Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al.: Transmission of tuberculosis in New York City—An analysis by DNA

- fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1710-1716.
- 20) 阿野裕美, 森山和郎, 松本智成, 他: RFLP分析に基づく, 結核感染状況の疫学的検討—当院医療圏である大阪中南部地域の場合—. *結核.* 2002; 77: 783-788.
- 21) 厚生労働省健康局結核感染症課監修: 「結核の統計2002」. 結核予防会, 東京, 2002, 4.
- 22) 厚生労働省健康局結核感染症課監修: 「結核の統計2004」. 結核予防会, 東京, 2004, 4.
- 23) 高島毛敏雄: 社会経済弱者における結核対策の強化に関する研究. 厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「再興感染症としての結核対策確立のための研究」平成14年度分担研究報告. 2003; 49-213.
- 24) Braden CR, Templeton GL, Cave MD, et al.: Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis.* 1997; 175: 1446-1452.
- 25) Middlebrook G: Diagnosis and biological problems of isoniazid-resistant tubercle bacilli. *Bull IUATLD.* 1956; 26: 179-205.
- 26) Niemann S, Rüscher-Gerdes S, Richter E: IS 6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 3015-3020.

————— Original Article —————

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
— Comparison between Multidrug-Resistant Strains and Susceptible Strains —

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ¹Masaji OKADA,
and ²Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] Comparing multidrug-resistant *M. tuberculosis* strains with susceptible strains by molecular epidemiological methods.

[Methods] We examined 109 multidrug-resistant strains (MDR-TB) and 226 susceptible strains (S-TB) derived from National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center by restriction fragment length polymorphism (RFLP) with IS 6110, and Spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping).

[Results] In the case of MDR-TB, 47 strains (43.1%) belonged to 12 descriptions of clusters and the number of IS 6110 copies per isolate ranged from 9 to 25. Similarly, 99 strains (43.8%) belonged to 20 descriptions of clusters in S-TB and the distribution of IS 6110 copies were from 1 to 20. On the other hand, 84 strains of MDR-TB (77.1%) and 191 strains of S-TB (84.5%) belonged to Beijing family by Spoligotyping.

[Conclusion] MDR and susceptible *M. tuberculosis* strains were characterized similarities in ratio of clusters by RFLP patterns and high proportion of Beijing family by Spoligotyping. These finding supported the possibility that infectiousness of MDR-TB might be similar to that of S-TB.

Key words: *M. tuberculosis*, IS 6110-RFLP, Spoligotyping, Multidrug-resistant, Susceptible

¹Clinical Research Center, ²Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)

Mycobacterium kansasii 株における分子疫学的解明

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ³岩本 朋忠
¹岡田 全司 ²坂谷 光則

要旨：〔目的〕 *M. kansasii* 株に対する各種遺伝子型別法を用いた分子疫学的解明。〔対象と方法〕 2002年6月1日から2005年8月31日の期間、近畿中央胸部疾患センターにおいて臨床検体から分離、同定された *M. kansasii* 174株を対象として、*hsp* 65-PRA、ITS シークエンス、PFGE、IS1652-RFLPならびに MPTR-RFLPを行った。また *hsp* 65-PRA と ITS シークエンスの結果に乖離があった株に対しては *hsp* 65 シークエンスを行った。〔結果〕 *hsp* 65-PRA の結果、174株中 I 型が170株 (97.7%) を占め、II 型は2株、II b型は1株、VI 型は1株に認められた。ITS シークエンスでは I 型、II 型、VI 型の *M. kansasii* が *hsp* 65-PRA と同じ型を認め、II b型は ITS sequevar type II と判定された。IS1652-RFLP と MPTR-RFLP の結果、I 型の170株は同一のバンドパターンを示し、I 型以外の型 (II 型、II b型、VI 型) を示した4株に多型性が認められた。PFGE では、159株 (91.4%) がクラスターを形成し、残り15株に多型性を認めた。〔結論〕 今回各種遺伝子型別法を用いて遺伝子型別を試みた結果、世界的に蔓延している I 型が当センター周辺地域においても高い割合で分布している状況が認められ、I 型の高いクローナリティーが示唆された。また PFGE により I 型に亜分類が存在する可能性が考えられた。

キーワード： *Mycobacterium kansasii*, *hsp* 65-PRA, 16S-23S ITS シークエンス, PFGE, RFLP

はじめに

Mycobacterium kansasii (*M. kansasii*) は非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria, NTM) の I 群菌に分類される遅発育の光発色菌である。わが国では NTM 症の原因菌の約25%を占め、*Mycobacterium avium* complex (MAC) の次に多く症例報告されている菌種である¹⁾。またヒトに対する強い起病性をもち、主にヒトの肺結核類似症を引き起こす。現在 *M. kansasii* は DNA プローブを用いたハイブリダイゼーション²⁾³⁾ やシークエンス⁴⁾、制限酵素 (restriction enzyme) 処理による DNA 断片の多型解析⁵⁾ などの解析手法を用いて I～VII の遺伝子型に分類されているが⁶⁾、各種遺伝子型別法を同時に用いた詳細な解析の報告は少ない⁷⁾。今回われわれは、当センターにおいて分離、同定された *M. kansasii* 株を対象として、heat shock protein (*hsp*) 65-polymerase chain reaction (PCR)-restriction analysis (PRA) による遺伝子型別、16S-23S

internal transcribed spacer (ITS) シークエンス、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による高分子 DNA 解析、IS1652 ならびに major polymorphic tandem repeat (MPTR) の DNA プローブを用いた restriction fragment length polymorphism (RFLP) を用い、同菌の感染状況の解明を試みた。

方 法

〔対象〕

2002年6月1日から2005年8月31日の期間、独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにおいて、臨床検体から分離、同定された *M. kansasii* 174株。すべての菌株の同定は、アキュプローブ マイコバクテリウム カンサシ研究用 (極東製薬) で行った。今回これらの菌由来患者174名は結核病学会の診断基準⁸⁾により *M. kansasii* 症と診断され、HIV 感染は認められなかった。

hsp 65-PRA

Telentiらの方法⁹⁾に準じて行った。小川培地発育菌か

¹独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター、²内科、³神戸市環境保健研究所

連絡先：吉田志緒美，独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター，〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
(Received 3 Aug. 2006 / Accepted 18 Oct. 2006)

ら白金耳で径2~3 mmのコロニー2個分の菌量を採取し、1.5 mlマイクロチューブに分注したインスタジーンDNA精製マトリックス (BIO-RAD) 200 μ lに懸濁した。56°C, 15~30分処理後10秒間 vortexし、正確に100°C, 8分間処理した後直ちに氷水中に急冷した。10秒間 vortexし、12000 rpm, 3分遠心した上清をPCRに用いた。PCR増幅のために、次のプライマーを使用した; Tb11 [5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'] と Tb12 [5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3']。PCR条件は95°C 1分の熱変性の後、96°C 40秒, 60°C 50秒, 72°C 1分を45サイクル行い、最後に72°C 7分間伸張した。得られたPCR増幅産物の *Bst*E II 切断断片長 (60°C, 60分処理) および *Hae* III 切断断片長 (37°C, 60分) を制限酵素失活処理後マイクロキャピラリー電気泳動装置 Cosmo eye SV1201 (カイノス) を用いて解析した。

ITS シークエンス

ITS シークエンスは Richter らの方法¹⁰⁾に準じて行った。ITS 1 [5'-GAT TGG GAC GAA GTC GTA AC-3'] と ITS 2 [5'-AGC CTC CCA CGT CCT TCA TC-3'] を用いて ITS 全長を含む領域の PCR 増幅産物を得た。PCR 条件は95°C 9分の熱変性の後、94°C 45秒, 55°C 60秒, 72°C 90秒を30サイクル行い、最後に72°C 7分間伸張した。BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (ABI) を用いて、ITS 全長の塩基配列を決定した。

PFGE

Iinuma らの方法¹¹⁾に準じて行った。

1. 菌液調整, サンプルブロックの作成

ミドルブルック 7H9 培地 (BBL) を用いて、*M. kansasii* 株を37°C, 7~14日間培養し、McFarland No. 2~3の濁度に調整した後、D-cycloserineを1 mg/ml加え、12~18時間培養を続けた。次いで培養液を遠心し、TS 溶液 [50 mM Tris HCl (pH8.0), 0.5 M Sucrose/100 ml] に再浮遊して、-40°Cで凍結、その後直ちに氷水中で融解した (Freeze and Sawing)。菌液70 μ lに対し、1.5%低融点アガロース (BIO-RAD) 70 μ lを混合し、その混合液120 μ lを速やかにPFGE用インサートモールドに挿入し固相化した。

2. 溶菌, 除タンパク, 制限酵素処理

リゾチーム4 mg/ml加 Lysis 溶液500 μ lにサンプルブロックを入れ、溶菌処理 (37°C, 18時間) 後、Proteinase K (1.0 mg/ml) 加 ES 溶液900 μ lにゲルを移し変えて除タンパク処理 (50°C, 18時間) を行った。次いで Proteinase Kの不活化処理のため、Pefabloc 1.5 mM/ml加 TE 溶液を500 μ l入れたチューブに、サンプルブロックを0.5 mm幅にスライスしたサンプルプラグを入れ、室温で2時間振盪した。TE 溶液で30分、3回の洗浄処理を行い、2回の pre-incubation の後、*Dra* I (100U) による制限酵素

処理 (37°C, 18時間) を行った。

3. 電気泳動

0.5%TBE 溶液に溶かした1%アガロースゲルにサンプルプラグを挿入した。14°Cに冷却した0.5%TBE 溶液2000 mlを泳動槽に循環させ、PFGE 泳動装置 CHEF DR III (BIO-RAD) を用いて19.5時間の電気泳動を行った。

4. 染色, 撮影, 画像処理, 系統樹作成

ゲルを ethidium bromide (EtBr) 溶液に30分振盪して染色を行い、撮影した。Phoretix 1D Pro (Nonlinear Dynamics 社) を用いてゲルイメージ解析処理を行い、Phoretix 1D Database (Nonlinear Dynamics 社) を使用してデータベース化し系統樹を作成した。

IS1652-RFLP

IS1652 配列は *M. kansasii* に特異的な947 bpの長さを保有した配列であるが、DNAプローブの pMK1-9¹²⁾に陰性の *M. kansasii* にのみ認めるとされている²⁾。今回われわれは Yang らの方法¹²⁾に準じて行った。IS1652 プローブは IS 1 [5'-TCC TCC GTG CGC GCT GGA GC-3'] と IS 2 [5'-CGG ACC TGC CCA TCA GCG TC-3'] を用いて作成し、各種制限酵素 *Alu* I, *Eco*R I, *Pvu* II, *Sma* I についてそれぞれのパターンの比較から多型性の検討を行った。

MPTR-RFLP

10 bpの繰り返し配列で、5 bpの間隔をもつ MPTR 配列は *M. kansasii* 以外に結核菌群、*M. gordonae*, *M. asiaticum*, *M. gastri*, *M. szulgai* にも存在する³⁾¹³⁾。結核菌の染色体上には100以上のコピー数をもつ多型性を示すが、*M. kansasii* に対しては高い分離能が認められている¹³⁾。今回 Hermans らの方法¹³⁾に準じて、IS1652-RFLPと同様、制限酵素 *Bst*E II, *Sma* I を用いて多型性の検討を行った。

結 果

*hsp*65-PRA, ITS シークエンス

M. kansasii 174株中170株 (97.7%) が *hsp*65-PRA, ITS シークエンスとともに I 型と認められた。残り4株のうち、2株は両手法で II 型に、1株は VI 型と認められたが、*hsp*65-PRA パターンによる型別と ITS シークエンスによる型別での食い違いを示す株が1株認められた (Table 1)。この株の PRA パターンは Iwamoto and Saito¹⁴⁾の定義した II b 型のパターンを示し、ITS シークエンスは II 型の配列であった。II b 型の PRA パターンを示した株については、*hsp*65 gene の PCR 産物のシークエンスを決定し、Iwamoto and Saito¹⁴⁾の報告した atypical type II と一致することを確認した。

PFGE

PFGE により *M. kansasii* 174株は、バンドパターンの

類似した大きなグループを形成する159株とユニークなパターンを示す15株に大別された。159株は *hsp65*-PRA および ITS シークエンスですべて I 型に型別された。一方、ユニークなパターンの15株には II 型、II b 型、VI 型を示した4株と I 型の11株が含まれていた。そこで今回の PFGE 結果を PFGE 電気泳動パターンの評価基準¹⁵⁾に基づいて、A、B、Cの3つに分類した。グループ A はバンドの変化がない同一クローナリティーと2~3バンドの違いをもつ株からなり、*hsp65* PRA および ITS シークエンスで I 型に型別された170株のうちの159株(91.4%)が分類された。グループ B は4~6バンドの違いをもつ株からなり、I 型2株と VI 型1株が分類さ

れた。グループ C は7バンド以上の違いを認める株からなり、I 型9株と II 型2株および II b 型1株が分類された (Fig. 1)。

IS1652-RFLP ならびに MPTR-RFLP

IS1652-RFLP では I 型と I 型以外の4株 (II 型、II b 型、VI 型) 間で多型性を示したが、I 型の170株はすべて共通したバンドパターンを示し、多型性は認められなかった。

MPTR-RFLP でも同様に、タイプ間では多型性を示したが、I 型は多型性を認めなかった (Fig. 2)。また異なる制限酵素処理による多型性分類の比較では、いずれの RFLP においても変化は認められなかった。

Table 1 Distribution of *Mycobacterium kansasii* isolates according to subtype in NHO Kinki-chuo Chest Medical Center (n=174)

Type	<i>hsp65</i> -PRA	Sequencing	RFLP		Subtypes by PFGE		
		ITS	IS1652	MPTR	A Pattern	B Pattern	C Pattern
I	170	170	170	170	159	2	9
II	2	3	3	3	0	0	2
II b	1*	0	0	0	0	0	1*
VI	1	1	1	1	0	1	0
Total	174	174	174	174	159	3	12

*Atypical type II by *hsp65* sequence

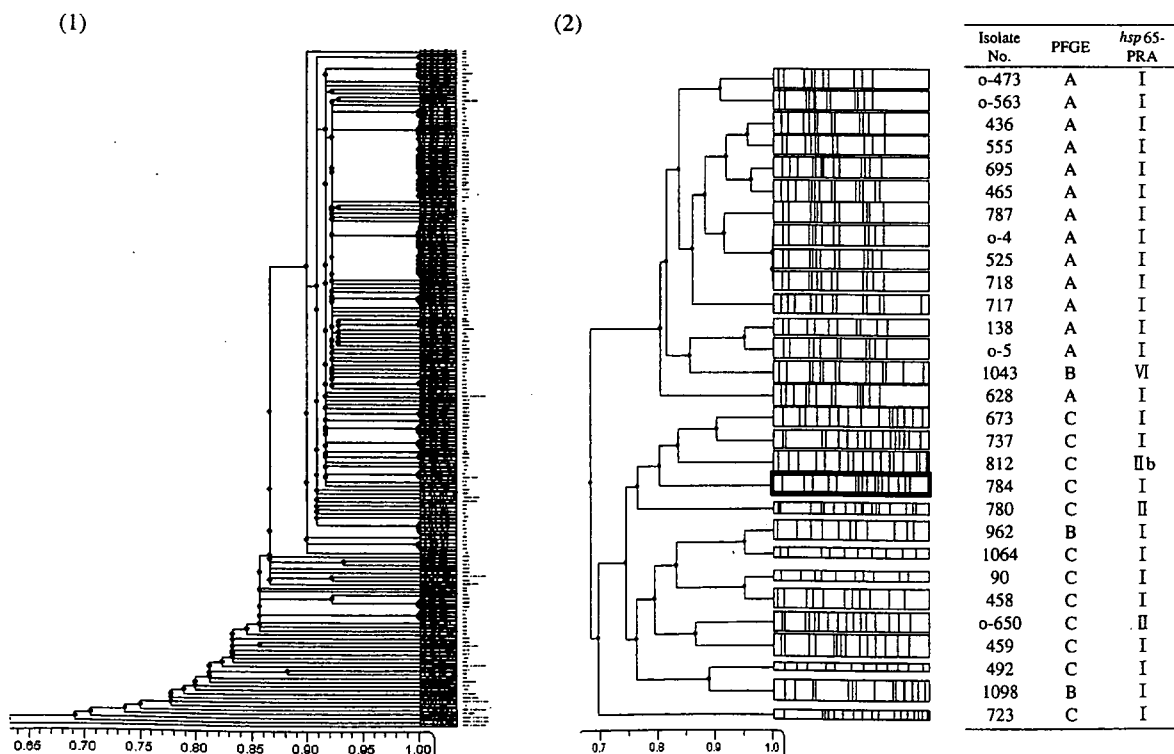
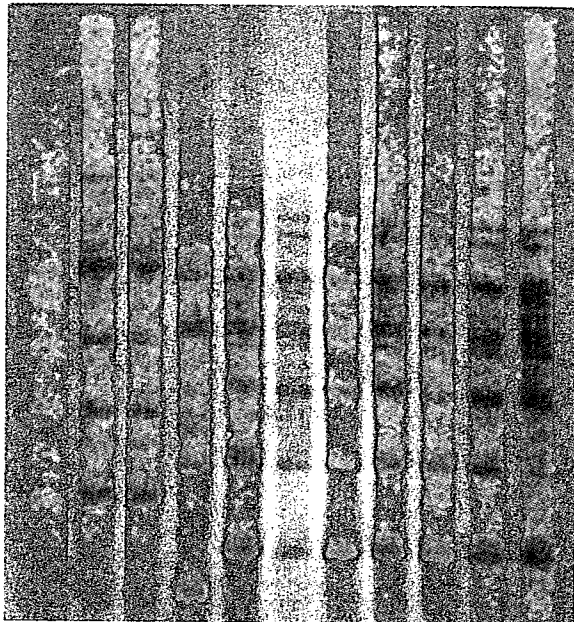


Fig. 1 Phylogenetic tree for single linkage of 174 *Mycobacterium kansasii* isolates (1) and polymorphic analysis of isolates consist of the representative pattern A, and all patterns of B and C (2) by PFGE. The pattern A showed the indistinguishable common pattern, and the pattern B and C showed polymorphous pattern by PFGE.

(1) IS1652

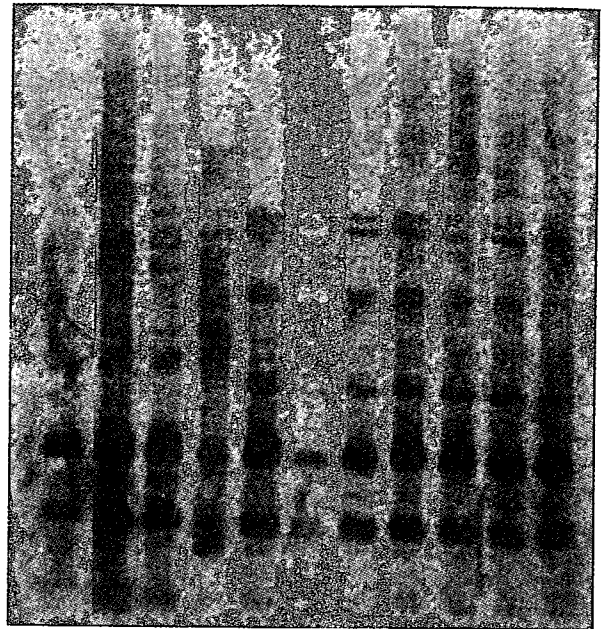


Isolate No. 812 o-650 780 1043 90 1098 673 784 1064 962 459

Type IIb II II VI

I

(2) MPTR



812 o-650 780 1043 90 1098 673 784 1064 962 459

IIb II II VI

I

Fig. 2 RFLP analysis of IS1652 and major polymorphic tandem repeat (MPTR) in relation to the *Mycobacterium kansasii* genotype, according hsp 65-PRA.

考 察

近年、分子遺伝学の発展によって、NTMの分子疫学解析に各種遺伝子型別法を応用した多くの疫学的解明の研究が進み、*M. kansasii*においてもいくつかの分子疫学的解析がなされている^{6) 7) 14) 16)}。先人の報告から *M. kansasii* が世界的に分布している状況がうかがえるが、国あるいは地域に発症頻度の分布差が見受けられる。英国ウェールズ地方では最も多いNTMであり¹⁷⁾、チェコのKarvina地方¹⁸⁾や南アフリカの鉱山¹⁹⁾でも多数報告されているが、オーストラリアではあまり分離されていない²⁰⁾。わが国¹⁾および米国²¹⁾ではMACに次いで多く分離されているが、米国内でも地理的に中南部に多い傾向があり^{22) 23)}、サンフランシスコの統計では5年間で269名の *M. kansasii* 症の患者が報告されている²⁴⁾。わが国においても症例数の増加に伴い全国的な広がりを見せているが、米国同様に流行の地域性が見られ、特に近畿圏地域は他の地域に比べて最も多い¹⁴⁾。しかも近畿圏内に位置する当センターでは年間60から70例の新規 *M. kansasii* 症患者が受診している。そこで感染経路の推測ならびに疫学的解明に有用な遺伝子型別解析を同菌株に対して実施することは治療戦略を図るうえでも非常に重要である。

同菌に対する代表的な解析法のひとつである hsp 65-

PRAはTelentiら⁹⁾が開発したPCR-based hsp 65 gene内の制限酵素切断部位の多様性からNTMを分別するPCR-restriction analysis (PRA)である。Picardeauら(フランス)⁷⁾は *M. kansasii* の臨床分離菌39株と水道水からの分離菌24株を対象として hsp 65-PRAを行い、I型～V型の5つのタイプに分類した。また臨床分離菌191株を対象としたTaillardら(スイス)⁶⁾はさらにVII型までの7つのタイプに分類している。Picardeauら⁷⁾の結果ではI型は39.7%、II型は31.7%と同程度の割合を示し、Taillardら⁶⁾によるとI型は67%、II型は21%を占めていた。一方Chimaraら¹⁶⁾が臨床分離菌184株について検討したサンパウロでの報告では182株(98.9%)がI型と認められ、Iwamoto and Saito¹⁴⁾のわが国での報告においても、臨床分離菌198株中184株(92.9%)がI型に分類されている。今回われわれの検討ではI型が高い割合(97.7%)で認められた。

そこで今回の解析を含めたI型が多数を占めた報告^{14) 16)}と、Picardeauら⁷⁾やAlcaideら⁴⁾のII型が比較的多い欧米の報告との間に違いが表れる理由について考察してみると、まず対象とするサンプリングの違いが考えられる。I型が多数認められた報告^{14) 16)}は臨床検体のみを対象としており、一方環境由来検体を含めた場合^{4) 7)}にはII型が多く認められている。また *M. kansasii* は自然界からの分離は稀で、同一地域の水道水から繰り返し分離される

と報告されている²¹⁾。したがって、諸国間で異なる地理的環境の影響下におけるサンプリングの違いから、*M. kansasii*の感染状況の相違が生じたと考えられた。また、環境宿主側のリスクファクターの違いも関係していると思われる。Picardeauら⁷⁾の報告では臨床分離菌13株(33.3%)にHIV感染を認め、そのうち8株がII型に属していた。Taillardら⁶⁾は、HIV感染が認められる39株(20.4%)のうち15株がII型であると報告している。またAlcaideら⁴⁾は彼らの考察の中で、Tortoliら²⁹⁾が検討した69株のうちHIV感染を認めた株は20株(29.0%)含まれ、そのうちのアキュプロブ法で陰性を示した12株がおそらくII型に相当すると述べている。そこでTaillardら⁶⁾や、Chimaraら¹⁶⁾は宿主の免疫状態がI型以外の型の感染による*M. kansasii*症と関連していると考えられている。したがって、今回のHIV感染陰性の*M. kansasii*症患者由来菌株を対象とした検討から、全身性の重篤な免疫不全をもたない患者群での*M. kansasii*症はI型が大部分を占めるであろう可能性を支持した。

Tortoliの論説²⁶⁾でI型はヒトから、II型はヒトもしくは環境から、III型からV型は環境から多く分離されるため、III~V型が分離された場合はcolonizationの可能性があるとされているが、その後新たに報告されたVI型、VII型に関してはその臨床的意義は未だ不明である。今回われわれが分離したVI型による*M. kansasii*症患者は日本結核病学会の診断基準⁸⁾を満たしていることからcolonizationの可能性は低いと考えられる。VI型についての報告例が限られており、今後のデータ蓄積が必要ではあるが、今回のわれわれの結果はVI型のヒトへの感染は臨床的に意義があることを強く示唆するものである。

Alcaideら⁴⁾は*M. kansasii*の*hsp65*-PRAによって得られた5つの型がITSシーケンスによって塩基上に相違を認めると報告している。今回174株中173株の*hsp65*-PRAとITSシーケンスの型は一致したが、1株のみが*hsp65*-PRAでIIb型、ITSシーケンスでII型を示した。これはIwamoto and Saito¹⁴⁾の定義するI型とII型の中間型(atypical type II)であり、II型からI型への分化を示唆する株の存在が今回の解析においても認められたのは興味深い。

IS1652-RFLPの結果、各型間で多型性が認められた。Yangら¹²⁾は1から11本のバンド間で多型性を示したとしている。またPicardeauら⁷⁾はII型とIII型にIS1652配列は存在するが、I型、IV型、V型には存在しなかったとしている。しかし今回の検討でII型以外のI型、IIb型、VI型の各型にもIS1652配列の存在が認められた。IV型、V型、VII型の菌株が分離、同定されなかったため、すべての型にIS1652配列が存在するかどうかは現時点では不明だが、今後さらに菌株を蓄積してゆけば、この

点は解明されるものと考えられた。

MPTR-RFLPでRossら²⁷⁾はDNAプローブのpMK1-9に陽性の*M. kansasii*は共通したバンドパターンを有するが、陰性の*M. kansasii*は不均質であると報告している。しかしArendら²⁸⁾は22株の*M. kansasii*を対象としてITSシーケンスをターゲットとしたキットであるINNO-LiPA Mycobacteria DNA probe test (Innogenetics)で分類したうえでMPTR-RFLPを行った結果、3つに分類されたグループごとに各々の共通するパターンが存在したが、すべての株に疫学的関連性は認められなかったとしている。今回の検討でもIS1652-RFLPと同様に各型間の多型性が認められたが、174株由来の患者の居住地域や職場環境といった生活圏は分散しており、疫学的関連性は乏しいと考えられた。

PFGEではPicardeauら⁷⁾が制限酵素*Dra*Iを用いたPFGEパターンから大きなクラスターを形成したグループをパターンIと定義し、そのパターンIは*hsp65*-PRAでI型に相当したと報告している。またパターンIの中に4つの亜分類を認め、そのうち最も多く見られるパターンはIaであるとしている。Zhangら²⁹⁾によると、彼らが得たパターンDa(制限酵素*Dra*I処理)と、Iinumaら¹¹⁾が認めたM型(制限酵素*Vsp*I処理)は上記のパターンIaと共通するパターンを有したとしている。そしてZhangら²⁹⁾は供試した71株中、パターンDaの31株と1~3のバンドの違いをもつ33株、それに4~6のバンドの違いをもつ4株の合計68株(95.8%)にクローナリティーを認めたと報告し、また*hsp65*-PRAで81株中78株(96.3%)はI型であったとしている。今回われわれの得たグループA(159株)は、目視比較によりZhangらのDa(IinumaらのM型)に属するものと判断でき、I型の中でも特にクローナリティーの高いグループと考えられた。また今回の結果は1施設のみで得られた臨床検体を対象としたものであるが、全国規模の検体を対象としたIinumaら¹¹⁾の結果と同様にPFGEにより他の手法では識別できなかったI型の一部を亜分類できた。したがって、今回の検討からわが国における*M. kansasii*の感染状況を知るうえで重要な知見が得られたと考えられ、同時に今回検討した各種遺伝子型別解析法の中ではPFGEが最も分離能の高い手法であることが示唆された(Table 2)。

われわれは、これまでの報告からNTMに対する有用性が認められている各種遺伝子型別解析法を用いて、*M. kansasii*症例の多い当センター周辺地域で集められた菌株の遺伝子型別特徴の解明を試みたが、大部分はI型の遺伝子型に属しており、全国規模で集積された菌株との間に明確な違いを認めることができなかった。これらの高い分離能をもつ手法を用いても臨床分離株の大部分

Table 2 Comparison of results for *Mycobacterium kansasii* subspecies by different molecular typing methods

Isolate no.	hsp65-PRA	Sequencing	PFGE	RFLP***	
		ITS		IS1652	MPTR
1043	VI	type VI	B pattern	6	vi
962	I	type I	B	1	i
1098	I	type I	B	1	i
673	I	type I	C pattern	1	i
784	I	type I	C	1	i
737	I	type I	C	1	i
458	I	type I	C	1	i
459	I	type I	C	1	i
1064	I	type I	C	1	i
492	I	type I	C	1	i
90	I	type I	C	1	i
723	I	type I	C	1	i
o-650	II	type II	C	2	ii
812*	II b	type II	C	2	ii
780	II	type II	C	2	ii
Others**	I	type I	A pattern	1	i

*Atypical type II by hsp65 sequence

**159 *Mycobacterium kansasii* isolates except for types that were defined on the basis of B, C patterns by PFGE.

***Classification of both RFLPs is based on each homogeneous cluster.

がI型に分類されたことから、*M. kansasii* I型は系統発生的には比較的新しく分化した遺伝子型であると考えられた。したがって、その菌株間でのクローナリティーは高く維持されており、現在までに報告されている*M. kansasii*の遺伝子型別解析手法では同一クローン由来株の判別には限界があるものと思われる。*M. kansasii*の感染様式をより詳細に解明するためには、さらに高い解像度をもつ新たな手法を用いたアプローチが必要であろう。

一方、*M. kansasii*の感染様式の疫学的解明のためには、患者背景からの要因解明も重要である。発症の誘因として Marrasら¹⁷⁾は粉塵曝露歴の関与を強く示唆する報告をしており、Alcaideら³⁰⁾はホームレスとの関連性を指摘している。よって、鉄工や造船関係の工場が多い当センター周辺の住環境の影響が菌の発症に大きく関係している可能性があると考えられた。また宿主側のリスクとして、HIV陽性患者や、AIDSではないが免疫抑制状態にある患者（腎移植や、長期ステロイド使用）が*M. kansasii*に感染している事例が多く報告されている^{31) 32)}。今回得られた遺伝子型別のデータを基にしてHIV感染以外の患者背景を加えた詳細なデータベース構築を現在検討中である。

ま と め

今回各種遺伝子型別法を応用して*M. kansasii*の分子疫学的解明を検討した結果、地域特性の解明には至らな

かったが、I型の蔓延した感染状況が推測された。IS1652-RFLPではII型、III型以外の型（I型、IIb型、VI型）にIS1652配列の存在が見出された。またPFGEにより、I型はクローナリティーの高い菌株で形成されていること、およびいくつかの亜分類の存在が示唆された。今後*M. kansasii*のさらなる疫学的解明のために、より詳細な検討を行う必要があるものと思われる。

文 献

- 1) The Mycobacteriosis Research Group of the Japanese National Chest Hospitals: Rapid increase of the incidence of lung disease due to *Mycobacterium kansasii* in Japan. *Chest*. 1983; 83: 890-892.
- 2) Yang M, Ross BC, Dwyer B: Isolation of a DNA probe for identification of *Mycobacterium kansasii*, including the genetic subgroup. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 2769-2772.
- 3) Huang ZH, Ross BC, Dwyer B: Identification of *Mycobacterium kansasii* by DNA hybridization. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 2125-2129.
- 4) Alcaide F, Richter I, Bernasconi C, et al.: Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and pathogenicity studies. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 1959-1964.
- 5) Devallois A, Goh KS, Rastogi N: Rapid identification of Mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 Mycobacterial species. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 2969-2973.

- 6) Taillard C, Greub G, Weber R, et al.: Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: Swiss national survey. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 1240-1244.
- 7) Picardeau M, Prod'Hom G, Raskine L, et al.: Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 25-32.
- 8) 日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会: 肺非結核性抗酸菌症診断に関する見解—2003年. *結核.* 2003; 78: 569-572.
- 9) Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al.: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 175-178.
- 10) Richter E, Niemann S, Rüsck-Gerdes S, et al.: Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 964-970.
- 11) Iinuma Y, Ichiyama S, Hasegawa Y, et al.: Large-restriction-fragment analysis of *Mycobacterium kansasii* genomic DNA and its application in molecular typing. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 596-599.
- 12) Yang M, Ross BC, Dwyer B: Identification of an insertion sequence-like element in a subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 2074-2079.
- 13) Hermans PWM, van Soolingen D, van Embden JDA: Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J Bacteriol.* 1992; 174: 4157-4165.
- 14) Iwamoto T, Saito H: Comparative study of two typing methods, *hsp65* PRA and ITS sequencing, revealed a possible evolutionary link between *Mycobacterium kansasii* typ I and II isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 254: 129-133.
- 15) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2233-2239.
- 16) Chimara E, Giampaglia CMS, Martins MC, et al.: Molecular characterization of *Mycobacterium kansasii* isolates in the state of São Paulo between 1995-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 739-743.
- 17) Marras TK, Daley CL: Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2002; 23: 553-567.
- 18) Kubín M, Svandová E, Medek B, et al.: *Mycobacterium kansasii* infection in an endemic area of Czechoslovakia. *Tubercle.* 1980; 61: 107-112.
- 19) Corbett EL, Blumberg L, Churchyard GJ, et al.: Nontuberculous mycobacteria: defining disease in a prospective cohort of South African miners. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 15-21.
- 20) Dawson DJ, Reznikov M, Blacklock ZM, et al.: Atypical mycobacteria isolated from clinical material in south-eastern Queensland. *Pathology.* 1974; 6: 153-160.
- 21) American Thoracic Society: Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: S1-S25.
- 22) Good RC, Snider DE Jr: Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States 1980. *J Infect Dis.* 1982; 146: 829-833.
- 23) Horsburgh CR Jr, Selik RM: The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am Rev Respir Dis.* 1989; 139: 4-7.
- 24) Bloch KC, Zwerling L, Pletcher MJ, et al.: Incidence and clinical implications of isolation of *Mycobacterium kansasii*: results of a 5-year, population-based study. *Ann Intern Med.* 1998; 129: 698-704.
- 25) Tortoli E, Simonetti MT, Lacchini C, et al.: Tentative evidence of AIDS-associated biotype of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1779-1782.
- 26) Tortoli E: *Mycobacterium kansasii*, species or complex? biomolecular and epidemiological insights. *Kekkaku.* 2003; 78: 705-709.
- 27) Ross BC, Jackson K, Yang M, et al.: Identification of a genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2930-2933.
- 28) Arend SM, Cerdá de Palou E, de Haas P, et al.: Pneumonia caused by *Mycobacterium kansasii* in a series of patients without recognised immune defect. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10: 738-748.
- 29) Zhang Y, Mann LB, Wilson RW, et al.: Molecular analysis of *Mycobacterium kansasii* isolates from the United States. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 119-125.
- 30) Alcaide F, Benítez MA, Martín R: Epidemiology of *Mycobacterium kansasii*. *Ann Intern Med.* 1999; 131: 310-311.
- 31) Witzig RS, Fazal BA, Mera RM, et al.: Clinical manifestations and implications of coinfection with *Mycobacterium kansasii* and human immunodeficiency virus type 1. *Clin Infect Dis.* 1995; 21: 77-85.
- 32) Lichtenstein IH, MacGregor RR: Mycobacterial infections in renal transplant recipients: report of five cases and review of the literature. *Rev Infect Dis.* 1983; 5: 216-226.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF *MYCOBACTERIUM KANSASII* ISOLATES

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ³Tomotada IWAMOTO,
¹Masaji OKADA, and ²Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] To make molecular epidemiological analysis of *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*) isolates.

[Methods] We examined 174 *M. kansasii* isolates from clinical samples of patients at National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center from June 1, 2002 to August 31, 2005 by polymerase chain reaction (PCR)-restriction analysis (PRA) of the heat shock protein (*hsp*) 65 gene (*hsp*65-PRA), sequencing (ITS, 16S-23S internal-transcribed spacer, and *hsp*65 for discrepant case between *hsp*65-PRA and ITS sequence), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and restriction fragment length polymorphism (RFLP) with the major polymorphic tandem repeat (MPTR) probe and the IS1652 probe of genomic DNA.

[Results] Of the 174 *M. kansasii* isolates, 170 strains were classified as *M. kansasii* type I using *hsp*65-PRA, while two isolates belonged to type II and one each isolate to type IIb and VI, respectively. Although the ITS sequence of these isolates also identified the same region of polymorphism by *hsp*65-PRA, only type II b might be revealed atypical type II, a transitional type from typical type II to intermediate type I by *hsp*65 sequence. The polymorphic patterns by RFLPs with MPTR and IS1652 probe were shown specific for each

homogeneous cluster by *hsp*65-PRA. In addition, 159 isolates were recognized the same common pattern A by PFGE analysis. In contrast, the rest 15 isolates revealed significant polymorphism within 11 isolates of type I, and 4 isolates among type II, II b, and VI.

[Discussion] We verified the *M. kansasii* genotype I was predominant, with the same pattern of major worldwide type regions, and reflected a very tight clonal structure. Type I was furthermore indicated recognition of subtypes by PFGE analysis.

Key words: *Mycobacterium kansasii*, *hsp*65-PRA, 16S-23S ITS sequencing, PFGE analysis, RFLP analysis

¹Clinical Research Center, ²Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ³Kobe Institute of Health

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)