

結核の分子疫学

藤 兼 俊 明

要旨 結核菌ゲノム中にランダムに挿入されている挿入配列 IS 6110 をプローブとした結核菌群の遺伝子タイピング法 (restriction fragment length polymorphism 解析) が効果的な結核対策のために用いられている。本法の応用としては、菌株の異同からみた集団感染への対応、検査での cross contamination の評価、再発か再感染かの評価、地域での蔓延状況の評価、などが挙げられる。同一バンドパターンを示す集団に属する比率 (クラスター形成率) は地域の結核蔓延度の指標とされ、高蔓延国では約50%前後、低蔓延国では約20%前後、と報告されている。日本では、7.7%から32%、と地域により違いが報告されている。また、日本では、比較的類似性の高いバンドパターンを示すグループの存在が報告されている。これらは、過去の高い罹患率時代に感染した高齢者の患者が多い日本の結核の疫学的特徴を反映していると考えられる。(キーワード: 結核, 分子疫学, RFLP 解析)

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS

Toshiaki FUJIKANE

Abstract DNA finger printing of bacteria by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis based on insertion sequence (IS) 6110 is used for effective interventions in the control of tuberculosis.

RFLP analysis is used for judging the differences between bacterial strains detected from patient materials in outbreak cases. It is also used to confirm cross-contamination in Mycobacteriology laboratory and to distinguish endogenous reactivation from exogenous reinfection of tuberculosis. If patients are infected with bacteria having identical DNA fingerprints, they are considered to belong to a specific cluster. The proportion of clustering is assumed to reflect the recent tuberculosis transmission that has occurred within the community. High proportions (about 50%) were reported from the countries where the incidence of tuberculosis is high and low proportions (about 20%) were reported from the countries where the incidence of tuberculosis is low.

In Japan, a difference in the proportion by area was reported (7.7%–32%). It was also reported that a high proportion of patients belonged to the groups respectively having the similar patterns. These findings might reflect the epidemiological characteristics of Japan; there are many elder patients having been mostly infected in the past period when the incidence of tuberculosis was very high.

(Key Words: tuberculosis, molecular epidemiology, restriction fragment length polymorphism)

分子疫学の導入

わが国の結核罹患率は1997年に43年ぶりに上昇し、1999年7月に厚生省は結核緊急事態宣言を発表した。幸

いにも2000年以降再び減少傾向にあるが、なお先進工業国と比較し3から6倍と高率である¹⁾。わが国の結核の特徴は、高い罹患率が過去50年間に急速に低下してきたことである。そのため、地域社会の中に、過去に高率に

国立療養所道北病院 National Dohoku Hospital (現: 独立行政法人国立病院機構道北病院) 呼吸器科

Address for reprints: Toshiaki Fujikane, Department of respiratory medicine, National Hospital Organization Dohoku National Hospital, 7-Hanasaki, Asahikawa 070-8644 JAPAN

Received February 9, 2004

Accepted March 19, 2004

感染を受けた高齢者世代と、既感染率が低い中・若年者世代が混在している²⁾。このことは、世代間を通しての新たな感染伝播が生じる危険性をはらんでおり、これまでも多くの集団発生事例が報告されてきた³⁾。現在の結核対策は、いわゆる高危険群に重点を絞り早期発見に努めるとともに、いかに2次感染を阻止するかに重点をおき、接触者検診が重視されている。しかし、結核の発見動機では依然として自覚症状発見が大部分を占めている⁴⁾。したがって、発見された患者間の疫学的つながりを調査し、感染源を追求していくことは、効果的な感染予防対策上重要であり、所属団体や立ち入り先への聞き取り調査などが行われてきた。一方、検出された菌株の面からの疫学的つながりを調査する方法として、フェージ型、感受性試験結果⁵⁾など用いられてきたが、十分な情報をもたらすものではなかった。

近年の分子生物学の進歩により、新たに結核菌ゲノム中にランダムに挿入されている挿入断片をプローブとした結核菌群の遺伝子タイピング法が導入され^{6) 7)}、分子疫学的手法として注目されている。現在、挿入配列 IS 6110 をプローブとし、restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析による菌株のタイピングが最も広く行われている⁸⁾。本法の標準的な技法は、結核菌より抽出した DNA を制限酵素 *Pvu* II で消化し、IS 6110 内の 245bp の塩基配列を化学標識して作成したプローブとのあいだサザンハイブリダイゼーションを行う。化学発光などでX線フィルム上にバンドパターンを描出し、その異同・相似性を解析する (Fig. 1)。バンドパターンの相似性は、Unpaired Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) 等の数学的方法でコンピュータ解析し、Dice Coefficient で表示するのが一般的である⁹⁾。また、菌株同士の相似性をデンドログラムとして視覚的に表示することも可能である (Fig. 2)。

分子疫学的应用

本法を用いた菌株のタイピングの応用としては、第1に菌株の異同からみた集団感染への対応が挙げられる。集団感染が疑われる事例において患者より検出された菌株のタイピングを行い、バンドパターンの異同から共通の菌株の感染例であるか、を評価する¹⁰⁾。とくに従来の疫学調査では特定が困難であった不特定多数が集まる箇所での感染の証明に威力を発揮する¹¹⁾。

第2に、菌株の cross contamination の評価である^{12) 13)}。とくに予期しなかった結核菌培養陽性例において偽陽性の可能性がないのか、について従来確実な

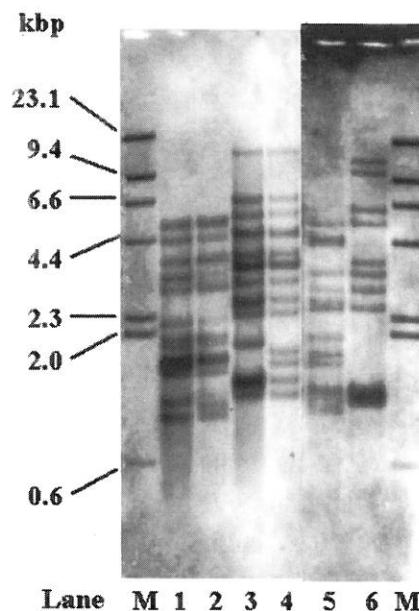


Fig. 1 IS 6110 restriction fragment length polymorphism patterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Lane 1 and 2 represent the patterns of the patients belonging to cluster. Lane 3 and 4 represent the patterns of the patients having the most common patterns (Dice coefficient > 0.9). Lane 5 and 6 represent the patterns of multidrug-resistant patients. Lane M represents Lambda *Hind* III fragments and these sizes are shown to the left side.

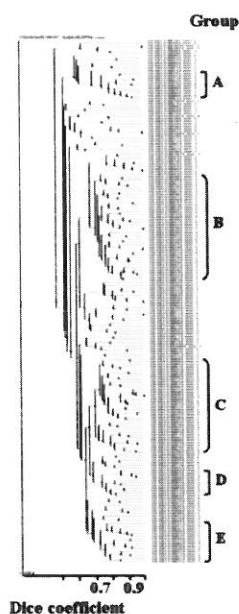


Fig. 2 The dendrogram shows the relatedness of band patterns, which was obtained by calculating measures with the Dice coefficient, and by cluster analysis with the UPGMA.

証明方法がなかった。本法を用い、検査段階で cross contamination する可能性のある菌株同士のタイピングを比較することで菌株の異同を明らかにすることが可能となった。さらに、検査手順のどの段階で cross contamination が生じたのか、についての情報をもとに、防止対策にも寄与する。

第3に、再発か再感染か、の評価である^{14) 15)}。従来とくに既治療例においては再発なのか新たな再感染なのか、についての判断が困難であった。本法の導入により、地域における発症例の菌株が保存されている場合にはそれらとのタイピングの比較が可能である。新たな再感染が疑われる場合には、感染源の探索や、再発例の場合にもまた接触者検診など、集団感染の可能性を念頭に置いた感染予防対策が重要となる。

第4に、地域での蔓延状況の評価である。菌株間で同一あるいは非常に類似したタイピングパターンを示す結核菌、あるいは分離されたそれぞれの患者をクラスターと呼び、地域の蔓延状況を反映したクラスター頻度（クラスター形成率）の違いが報告されている¹⁶⁾。結核罹患率の高いアフリカ諸国のチュニジアでは58%¹⁷⁾、エチオピアでは48%¹⁷⁾、ボツワナでは42%¹⁸⁾の菌株がクラスターに属する、と報告された。これらの国では、共通の菌株に感染し発病する患者の割合が多いこと、すなわち、地域内での伝播の頻度が高いと考えられる。また、東アジアでは、国を越えた広い地域で比較的類似したバンドパターンが共通してみられ、北京ファミリーとして注目されている¹⁹⁾。

一方、結核罹患率の低い先進工業国のクラスター形成率は、ノールウェイで16%²⁰⁾、オランダで19%¹⁷⁾、スイスで21%²¹⁾と比較的低い頻度が報告されている。しかし、罹患率の低い国においても、地域によって²²⁾、あるいは、人種、出生地など²³⁾によって高いクラスター形成率を示すことから、感染伝播の高危険群として結核対策を強化すべき対象と特定される。また、高危険群に重点をおいた対策の強化により、結核罹患率が低下するとともにクラスター形成率の低下もみられた、とする報告²⁴⁾は、本法が結核対策の効果の指標としても有用であることを示している。

わが国における分子疫学

わが国における結核の分子疫学は、結核研究所の高橋らが中心となり、東アジア諸国等と比較したわが国のバンドパターンの特徴や、流行株の解析、集団感染事例における伝播の証明、等に成果を上げてきた^{25) 26)}。また、

地域における蔓延状況の評価も試みられ、クラスター形成率は、大阪中南部で32%²⁷⁾、岡山県で22%²⁸⁾、北海道北部で7.7%²⁹⁾、と報告されている。クラスター形成率には地域により大きな違いがみられているが、その原因についてはさまざまな因子が考えられる。2002年のわが国の結核罹患率は全国で人口10万対25.8であるが、都道府県別には12.5（長野県）から47.1（大阪府）まで4倍近い差異がある¹⁾。さらに、対象となった地域の高齢者人口の比率²⁹⁾や人口密度、住民の流動性の違い、等も影響することが考えられる。

また、いずれの報告においても指摘していることは、ある程度以上の類似性のある菌株を持つ集団の存在である。大畠らは、類似度80%以上でサイズが10以上である主要なクラスターが5種あり、約40%の株がこれらと類似度の高いパターンを示した、報告している²⁸⁾。自験例においても、それぞれ類似度がDice coefficient 0.7以上でサイズが対象者の5%以上であるグループが5種あり、対象者の58%が属していた²⁹⁾ (Fig. 2)。これら比較的類似したバンドパターンを示すグループの存在は、ヨーロッパ諸国からは報告されていない。これらのグループの成因として、挿入配列は安定している、とされているが、一方、トランスポジションを起こし、バンドパターンが変化することも指摘されている³⁰⁾。De Boer らは、半数の菌株が平均3.2年でバンドパターンの変化を生じた、と報告している³¹⁾。したがって、類似したバンドパターンを呈する菌株は、かつて共通の菌株から感染した可能性がある。すなわち、かつての高罹患率時代に共通の菌株の感染を受けた世代が高齢化を迎え再燃するまでの間にわずかにバンドパターンを変化させた結果、類似度の高いバンドパターンのグループとして把握されることが推測される。50年前のわが国の結核罹患率（人口10万対579.6、1955年）は、現在のボツワナの罹患率（同618.8、2001年）¹⁾にはほぼ匹敵する。大畠の40%や自験例の58%といった高い類似性を示すグループに属する比率が、現在のボツワナのクラスター形成率（42%）¹⁸⁾と近似することは注目される。ヨーロッパ諸国の多くは25年前においてすでに現在のわが国の結核罹患率を下回っており¹⁾、高蔓延時代に感染した世代がすでに存在しないために、このようなグループが把握されないと考えられる。結核の蔓延状況は、世代間の伝播と地域内の伝播を通し動的に変化していくと考えられるが、新しい分子疫学的手法がこれらの解明にも有用と考えられる。

おわりに

結核分子疫学の問題点や将来の展望については優れた

総説^{6) 7)}があるので割愛するが、現在ヨーロッパでは国内で分離されたすべての菌株の RFLP 解析を行いバンドパターンのデータベース化を行っている国がある³²⁾。また、多剤耐性株については国を越えたデータベース化が行われ、新たな発症者のバンドパターンの照合を行うことで感染伝播についての注意がはらわれている³³⁾。人口や罹患率の違いから培養陽性検体数が圧倒的に多いわが国での実現には大きな課題があると思われる。しかし、より簡便で比較・照合性に優れた方法が開発され、経年的に全国の分子疫学情報を把握することが可能となるならば、わが国の結核対策により一層寄与すると思われる。

文 献

- 1) 結核の統計2003. 結核予防会, 東京, 2003
- 2) Ohmori M, Ishikawa N, Yoshiyama T et al : Current epidemiological trend of tuberculosis in Japan. *Int J Tuberc Lung Dis* **6** : 415-423, 2002
- 3) 青木正和, 最近の結核集団感染の多様性 In : 結核集団感染, 改訂版, 結核予防会 東京, pp. 5-9, 1999
- 4) 平成12年度結核緊急実態調査報告書. 厚生労働省, 2001
- 5) Gruft H, Johnson R, Claflin R et al : Phage-typing and drug-resistance patterns as tools in mycobacterial epidemiology. *Am Rev Respir Dis* **130** : 96-97, 1984
- 6) van Soolingen D : Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infection : main methodologies and achievements. *J Inter Med* **249** : 1-26, 2001
- 7) 高橋光良 : 結核分子疫学の成果と展望. *結核* **77** : 741-752, 2002
- 8) 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* **31** : 406-409, 1993
- 9) Heersma HF, Kremer K, van Embden JDA : Computer analysis of IS 6110 patterns of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Biol* **101** : 395-422, 1998
- 10) 田丸亜貴, 鈴木定彦 : RFLP 解析による結核小規模感染事例の疫学的研究, *結核* **74** : 555-561, 1999
- 11) 石畠英昭, 鬼塚黎子 : 2つの酒場を舞台にした肺結核集団発症の事例, *結核* **72** : 623-628, 1997
- 12) Small PM, McClenny NB, Singh SP et al : Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the Mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J Clin Microbiol* **31** : 1677-1682, 1993
- 13) 伊藤邦彦, 高橋光良, 吉山 崇ほか : 病院検査室における結核菌培養の Cross-contamination. *結核* **74** : 777-788, 1999
- 14) van Rie A, Warren R, Richardson M et al : Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *New Engl J Med* **341** : 1174-1179, 1999
- 15) 川田 博, 中西好子, 高原 誠ほか : 簡易宿泊施設での外来性再感染肺結核と思われる症例の検討. *日呼吸会誌* **36** : 353-357, 1998
- 16) van Soolingen D, Hermans PWM, de Hass 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* **29** : 2578-2586, 1991
- 17) Hermans PWM, Messadi F, Guebrexabher H et al : Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and the Netherlands : Usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* **171** : 1504-1513, 1995
- 18) Lockman S, Sheppard JD, Braden CR et al : Molecular and conventional epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Botswana : a population-based prospective study of 301 pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* **39** : 1042-1047, 2001
- 19) van Soolingen D, Qian L, De Haas PEW et al : Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* **33** : 3234-3238, 1995
- 20) Heldal E, Docker H, Caugant DA et al : Pulmonary tuberculosis in Norwegian patients. The role of reactivation, re-infection and

- primary infection assessed by previous mass screening data and restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* **4** : 300-307, 2000
- 21) Pfyffer GE, Strassle A, Rose N et al : Transmission of tuberculosis in the metropolitan area of Zurich : a 3 year survey based on DNA fingerprinting. *Eur Respir J* **11** : 804-808, 1998
- 22) Small PM, Hopewell PC, Singh SP et al : The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* **330** : 1703-1709, 1994
- 23) Borgdorff MW, Behr MA, Nagelkerke NJD et al : Transmission of tuberculosis in San Francisco and its association with immigration and ethnicity. *Int J Tuberc Lung Dis* **4** : 287-294, 2000
- 24) Jasmer RM, Hahn JA, Small PM et al : A molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco, 1991-1997. *Ann Intern Med* **130** : 971-978, 1999
- 25) Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y et al : Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol Immunol* **37** : 289-294, 1993
- 26) 高橋光良, 鹿住祐子, 平野和重ほか : RFLP 分析による結核感染の疫学. *結核* **70** : 553-559, 1995
- 27) 阿野裕美, 森山和郎, 松本智成ほか : 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* **77** : 783-788, 2002
- 28) 大畠律子, 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* **77** : 629-637, 2002
- 29) Fujikane T, Fujiuchi S, Yamazaki Y et al : Molecular epidemiology of tuberculosis in the north Hokkaido district of Japan. *Int J Tuberc Lung Dis* **8** : 39-44, 2004
- 30) Yeh R W, de Leon A P, Agasino C B et al : Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis* **177** : 1107-1111, 1998
- 31) de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PEW et al : Analysis of rate of changes of IS 6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based of serial patient isolates. *J Infect Dis* **180** : 1238-1244, 1999
- 32) Bauer J, Kok-Jensen A, Faurschou P et al : A prospective evaluation of the clinical value of nation-wide DNA fingerprinting of tuberculosis isolates in Denmark. *Int J Tuberc Lung Dis* **4** : 295-299, 2000
- 33) Thomsen VO, Bauer J, Lillebaek T et al : Results from 8 yrs of susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Denmark. *Eur Respir J* **15** : 203-208, 2000
- (平成16年2月9日受付)
- (平成16年3月19日受理)