

連載

わが国の結核対策の現状と課題(5)

「結核菌の分子疫学研究の現状と課題」

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部 前田伸司 御手洗 聡

1. はじめに

結核は空気（飛沫）感染によりヒト-ヒト感染をおこす伝染病である。したがって、その感染経路を解析することは、新たな感染の予防や、感染者の特定に極めて有用である。日本の結核罹患率は2007年時点で19.8（10万対）であり、過去最低となっている。過去の高蔓延状況を反映して、古い感染の再燃と思われる65歳以上の患者が全体の大半を占めているが、とくに青壮年層での発病には現状の「流行」が反映されていると思われ、感染経路の解析が重要となる。

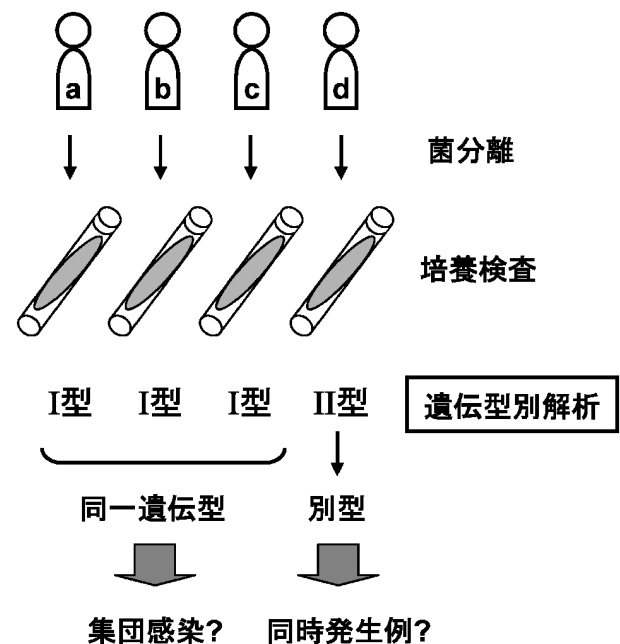
これまで結核菌の「型別」による疫学解析には二つの問題点があった。一つは「流行株」が存在することにより、不特定のランダムな感染が個々の症例に重複している可能性があることで感染の方向性がわからなくなる点であり、これは途上国などの高蔓延状況下で認められる。もう一つは型別を行うための方法であり、過去には十分な識別能力を有する方法がなかった。現在では罹患率も低下してきており、日常生活においてランダムな感染を受ける機会は少ないと思われ、一方向的感染経路解析が可能な環境となりつつある。また、分子生物学的型別が開発され、ツールとしても整備されつつある。

本稿では、結核菌の分子疫学に関する技術的あるいは制度的問題点について概説する。

2. 結核菌の遺伝子タイピング法

1993年に報告されたIS6110制限酵素断片長多型（Restriction fragment length polymorphism; RFLP）法¹⁾を利用することによって、集団発生や院内感染疑い例の確認および結核菌の伝播様式の解明が可能となった（図1）。また、結核菌のゲノム解析によって得られたDNA塩基配列情報に基づいた新しい分子疫学的手法が報告され、結核菌の型別法が飛躍的に発達した。結核菌型別法として迅速性、再現性、技術的に簡単、コストが安いおよび臨床材料を直接分析できるなどが望まれている。しかし、これらすべての基準を満たす型別法は未だに開発されて

図1 結核菌型別の有用性
結核菌型別分析により同一株による集団感染事例か、同時発生例か判別することができる



いない。

現状では、IS6110 RFLP分析法が型別法の標準分析法となっている。しかし、結果を得るのに時間がかかり、迅速性に欠けるという大きな問題点がある。新しい手法である反復配列多型（Variable Numbers of Tandem Repeats; VNTR）分析法は、RFLP法の欠点を補う方法として期待されており、今後型別法の中心となる手法である。本稿では、このVNTR分析法を中心に分子疫学の現状について述べる。

3. IS6110 RFLP分析法

IS6110の塩基配列をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーション法で結核菌の型別を行うのがIS6110 RFLP分析法である。この型別には、高分子DNA（約2μg）が必要なので、生きた培養菌からDNAを精製しなければならない。そのた

め、培養に時間が必要である。また、分析には、高度な技術、解析用システムも必要である。

IS6110 RFLP 分析法は、型別能力の高さから伝播経路の解明や疫学研究に広く利用されている。しかし、分析原理や手法のため、結核菌が検出されてから1~1.5か月後以降に型別結果が得られる。そのため、集団発生疑い例や院内感染疑い例等では接触者調査等に利用できない場合や利用できても支障が生じることが多い。そのため迅速に結果が得られる新しい型別法の開発が望まれていた。

4. PCR を利用した迅速型別法

1) スポリゴタイピング

結核菌ゲノム上に36 bp からなる複数の Direct repeat (DR) が存在し、これら DR は異なる塩基配列で構成されたスペーサー DNA (37~41 bp) を介して連なっている。1 から43番目までのスペーサー DNA の有無を、それぞれに対応した塩基配列のオリゴ DNA をスポットした膜を使って、ハイブリダイゼーション法で調べるのがスポリゴタイピング法である。RFLP 分析法が、結果を得るのに4日(調製済みの DNA から)必要であるのに対して、スポリゴタイピング法では、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を利用して、DNA を増幅して分析するため2日で結果が得られる。欧米諸国では迅速な型別法として広く利用されているが、国内の結核菌では

分子多様性が低く、型別可能な株の割合が低いという欠点がある。これは、1-34部分が陰性、35-43部分のみが陽性となる“北京型(Beijing type)”結核菌が日本国内の結核菌の約70~80%を占めていることが原因である。また、日本だけでなく中国や韓国など東アジア諸国でも、北京型結核菌の割合が高いことが報告されている。

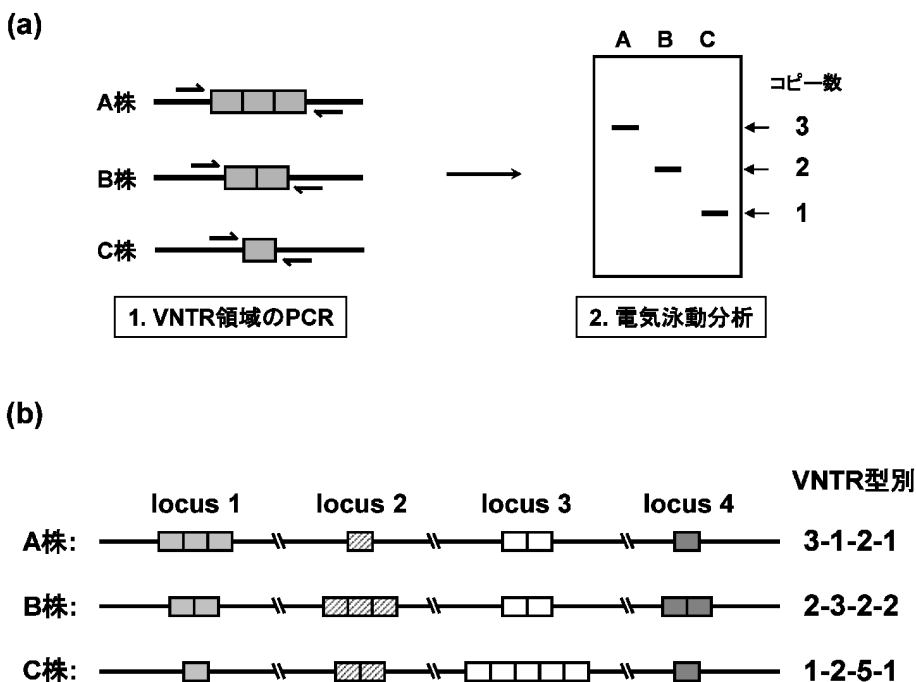
2) VNTR 分析法

(1) 分析ローカスの重要性

結核菌ゲノム上のミニサテライト中の繰り返し配列のコピー数を調べ、結核菌の型別を行う方法がVNTR 分析法である。調べるローカスの定常領域にプライマーを設計してPCR を行い、その分子量から反復配列のコピー数を算出する(図2)。PCR 法を利用して核酸を増幅するため、少量の未精製のDNA を検体として使うこと可能で、増菌等の培養は不要である。そのため、RFLP 分析法より迅速に結果が得られる有望な型別法である。微生物反復配列データベース²⁾によると、①全長が50~1,500 bp、②反復配列の単位が0~200 bp、③反復配列内での相同性が80~100%という条件で検索すると結核菌H37Rv では79箇所のミニサテライトが存在する。それぞれのローカスによって変化の頻度が異なり、非常に変化しやすい(不安定な)ローカスを選択すれば識別能は上がるが、家族内感染で同一感染源と

図2 VNTR 法

(a)ゲノム上のミニサテライト領域をPCR 法により増幅し、PCR 産物の分子量から繰り返し配列のコピー数を算出する；(b)複数のVNTR 領域を個別に解析し、それぞれのコピー数を羅列して型別とする。領域の組み合わせにより、目的に応じた型別解析が可能である。



考えられる場合でも異なる結核菌と判定される可能性が生じる。また、逆に変化の頻度が低い(安定な)ローカスを選択すると、すべて同じ型の結核菌と判定される可能性がある。このように、VNTR分析による型別能は選択したローカスに依存し、それらの組合せが極めて重要である。

(2) VNTR分析システム

Supplyらは、15-locus VNTR分析および24-locus VNTR分析を標準分析法として提唱している³⁾。この分析法は、通常15-locus VNTR法で菌の分析を行い、高い分解能が必要な場合は、さらに9-locusを加えた合計24-locusの分析を行うという結核菌型別法である。現在、このSupply(15)-VNTR分析でヨーロッパ諸国での結核菌遺伝子型データベース構築が進められている。日本国内株をSupply(15)-VNTRで分析すると、大きなクラスターが形成されると岩本らは報告している⁴⁾。このようにSupply(15)-VNTRの分解能が低い原因として、日本国内の結核菌は先に述べたように大部分が北京型結核菌で、欧米諸国の結核菌と遺伝子型が異なることによるものと考えられる。結核研究所では、国内株の型別に特化したVNTR分析システムの構築を行い、12箇所の分析で、Supplyらの15-locus VNTR分析法より分解能が高いJATA(12)-VNTR分析法を報告している⁵⁾。

(3) VNTR法による型別の利点と型別データベース

結核菌のRFLP分析には、培養のためにバイオセーフティレベル3の実験施設、時間ならびに専門的技術が必要である。そのため、限られた施設でしか分析できない。しかし、VNTR法による結核菌の型別法は、①サーマルサイクラーと電気泳動装置があれば解析可能、②オートクレーブ後の死菌体でも分析可能、③遅くとも1週間以内には結果が得られる、④結果がデジタル表記なので他施設間での比較・共有化が容易にできる、という利点がある。

法律上、生菌を移動させることが困難な多剤耐性結核菌は、従来法による型別が難しい。しかし、死菌体でも分析できるVNTR法ならオートクレーブ後、分析施設に郵送することによって型別することが可能である。さらに、結核菌の型別法として、VNTR法と採用すると、①分離された菌株の迅速な遺伝子型別が可能なので、集団発生疑い例では効率良い接触者調査ができる、②全国規模の結核菌データベースが構築により、未知の流行パターンや伝播経路を察知できる、など結核制圧のために極めて有益である。

5. 病原体管理とサーベイランスへの利用

結核菌の分子疫学解析には、いくつかのシステムが必要となる。ひとつは「結核菌の分離と保存」であり、もうひとつは「臨床情報収集」である。

1) 結核菌株の保存と輸送

結核菌の分子疫学解析を実施するには、基本的に分離した結核菌株の保存が必要となる。2007年4月1日より「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律等の一部改正」(新感染症法)が施行された。感染症法改定の理由は、①生物テロや事故による感染症の発生・まん延を防止するための病原体等の管理体制の確立、②最新の医学的知見に基づく感染症分類の見直し、および③結核予防法を取り込んで総合的な感染症対策を実施するため、とされている。それに伴って同年6月1日より「感染症法に基づく特定病原体等の管理規制」が施行されるに至り、病原体を取り扱う施設の基準が厳格化された。

結核菌は基本的に四種病原体等に分類され、所持に関して許可や届出の必要はないものの、検査室の施設や排気設備の整備(経過措置あり)が求められ、菌の保管にも管理区域内での施設可能な保管庫が必要となる。特にイソニアジドとリファンピシンに耐性を有する多剤耐性結核菌は三種病原体に分類され、所持には厚生労働大臣への届出が必要である。問題は所持の届出のない施設では、三種病原体等を同定した日から7日以内に届け出るか、譲渡するか、あるいは10日以内に滅菌廃棄するしか方法がないことである。現時点で所持を届出していない施設の殆どは所持する予定のない施設であり、速やかに譲渡されない限りは滅菌廃棄されてしまい、以降の検査は不可能となる。VNTRを実施するためには滅菌後の遺伝子だけでも十分であるが、必要に応じてRFLPや他の検査も必要となる場合があり、菌株の保存は疫学研究上不可欠である。

また、現在の法律では三種病原体の輸送には事前に各都道府県の公安委員会の許可が必要であり、この取得に2~3週間必要である。さらに緊急時の装備を準備し個別に運送する必要があるため、輸送費用も大きく(一回の輸送で20~30万円程度)、現実には譲渡は殆ど実施されていない⁶⁾。これらの状況が改善されない限り、貴重な菌株は失われてしまう。

2) 海外での分子疫学サーベイランス

米国や欧州では既に低蔓延状況を実現し、同時に分子疫学解析を含む病原体サーベイランスシステムを確立している国々がある。

オランダではオランダ国立公衆衛生環境研究所(RIVM)が抗酸菌レファレンス検査室を有してお

り、オランダ国内の全ての分離培養結核菌が郵便システムを使って収集されている。また結核患者情報は実際の診断・治療・管理を担当している地方自治体の保健センターから集積され、データベース化されている。得られたクラスター情報などのデータは現場にフィードバックされ、従来の接触者検診では見落とされていた疫学的関連が明らかになるなどの成果が得られている⁷⁾。さらに RIVM ではオランダ国内だけでなく、ヨーロッパの他の地域とも分子疫学ネットワークを形成している。

イギリスでも抗酸菌検査情報に関するサーベイランスである MycobNet (Mycobacterial Surveillance Network) が、全国の HPA (Health Protection Agency) 抗酸菌レファレンス検査機関から収集された抗酸菌に関する情報を蓄積し、1年に1回発行される抗酸菌情報報告書にまとめている。収集した抗酸菌の同定検査結果、結核菌の薬剤感受性結果、VNTR 法による結核菌遺伝子タイピング等の情報を収集解析しており、HPA 本部である HPA Centre for Infections (CFI) に全国の情報が収集解析されている⁸⁾。

日本では一部の地域で小規模の分子疫学調査が実施されているが、上記のような全国的なサーベイランスシステムは存在しない。今後は結核診療の拠点となる病院や検査施設を中心としたサーベイランスシステムの構築が必要と考えられる。

3) 疫学研究指針

分子疫学研究においてもうひとつ重要なのは、個々の症例をリンクするための個人情報の収集である。「疫学研究に関する倫理指針」によると、原則的に個人の特定が可能な情報を収集しようとする場合、事前に対象者からインフォームドコンセントを得る必要がある。しかし、振り返って事後に同意を得ようとしても、患者とのコンタクトが取れないなど不可能な場合も多い。社会的重要性が高い研究では手続きを簡略化あるいは免除できるとされているが、効率的な運用のためには「行政調査」としての認識が必要ではないかと思われる。

6. おわりに

結核菌の分子疫学的解析は、主に集団発生や院内

感染疑い例において事後確認のために利用されて来た。しかし、迅速に結果が得られ、データを容易に共有化できる新しい VNTR 法が開発されたことにより、今後は型別結果が利用できる場面が多くなるものと考えられる。また、病原体サーベイランスシステムを構築し、特に注意を要する薬剤耐性や病原性の高い結核菌の型を予め登録し、いつでも照合できるシステム等の構築が必要であると考えられる。

文 献

- 1) Van Embden JDA, Crawford JT, Dale JW, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409.
- 2) GPMS: Genomes, Polymorphism and Minisatellites, <http://minisatellites.u-psud.fr>
- 3) Supply P, Allix C, Lesjean S, 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.
- 4) T Iwamoto, S Yoshida, K Suzuki, 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.
- 5) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他. 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム—JATA(12)-VNTR 分析法の実際—. *結核*. 2008; 83: 673-678.
- 6) 山岸文雄. 薬剤耐性の実態調査. 平成19年度厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 総括・分担研究報告書 結核菌に関する研究 (主任研究者 加藤雅也) 2008: 25-32.
- 7) 内村和広. オランダの結核菌情報システムについて. *資料と展望* 2004; 51: 71-77.
- 8) 大角晃広. 地方衛生研究所及び保健所における病原体保管及び輸送等の基準 (案) を遵守するために必要な設備及び技術に関する現状調査. 平成18年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究) 総括・分担研究報告書 病原体等の保管及び病原体等情報の一元集約化のあり方に関する研究 (主任研究者 御手洗聡) 2007; 49-63.