

結核菌病原体サーベイランスの実践（総説） 第一版

2017年7月

略語一覧

- AMED: Japan Agency for Medical Research and Development (日本医療研究開発機構)
- AMK: Amikacin (アミカシン)
- BCG: Bacille de Calmette et Guérin (ウシ型結核菌ワクチン株)
- bp: base pair(s) (核酸の個数を示す単位)
- cfu: colony forming unit (コロニー形成単位)
- CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute
- CS: Cycloserine (サイクロセリン)
- DNA: Deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
- DR: direct repeat (直列反復配列)
- EB: Ethambutol (エタンブトール)
- EQA: External Quality Assessment (外部精度評価)
- GLI: Global Laboratory Initiative (世界検査室主導機構)
- INH: Isoniazid (イソニアジド)
- IQC: Internal Quality Control (内部精度管理)
- IR: interspersed repeat (散在型反復配列)
- LPA: Line Probe Assay
- MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 飛行時間型質量分析法)
- MDR-TB: Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (多剤耐性結核菌)
- MFLX: Moxifloxacin (モキシフロキサシン)
- MGIT: Mycobacterium Growth Indicator Tube
- MIC: Minimum Inhibitory Concentration (最小発育阻止濃度)
- MIRU: Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (マイコバクテリウム散在性反復配列ユニット)
- NALC-NaOH: N-acetyl-L-cystein-NaOH (N-アセチル-L-システイン-水酸化ナトリウム)
- NESID: National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease (国の感染症サーベイランスシステム)
- NGS: Next Generation Sequencing (次世代シーケンス)
- PAS: Para-amino salicylate (パラアミノサリチル酸)
- PCR: Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
- PZA: Pyrazinamide (ピラジナミド)
- QA: Quality Assurance (精度保証)
- RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms (制限酵素断片長多型)

RFP: Rifampicin (リファンピシン)

SRLN: Supra-national Reference Laboratory Network (上位参照検査室ネットワーク)

SM: Streptomycin (ストレプトマイシン)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (一塩基多型)

TA: training (トレーニング)

TR: tandem repeat (縦列型反復配列)

VNTR: Variable Number of Tandem Repeat (反復配列多型)

WGS: Whole Genome Sequence (全ゲノムシーケンス)

WHO: World Health Organization (世界保健機関)

XDR-TB: Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (超多剤耐性結核菌)

著者（執筆順）

加藤誠也 公益財団法人結核予防会結核研究所所長

御手洗聡 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部部長

瀧井猛将 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部副部長・結核菌情報科長

内村和広 公益財団法人結核予防会結核研究所臨床疫学部疫学情報室長

謝辞

本指針は国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）研究開発課題「地域における結核対策に関する研究」（研究代表者：石川信克）の分担研究課題「結核病原体サーベイランスシステム構築に向けた広域分子疫学評価と検査精度保証」（分担研究者：御手洗聡）の一部として作成されたものである。

連絡先

分担研究者：御手洗 聡

〒204-8533

東京都清瀬市松山 3-1-24

結核予防会結核研究所抗酸菌部

利益相反 (COI)

本指針の著者全員は、本研究に関して、「厚生労働科学研究における利益相反 (Conflict of Interest : COI) の管理に関する指針」(平成 20 年 3 月 31 日付科発第 0331001 号厚生労働省大臣官房厚生科学課長決定) 及び「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について」(平成 26 年 4 月 14 日付科発第 0414 第 5 号厚生労働省大臣官房厚生科学課長決定) の示す利益相反について、報告すべき事項を有さない。

目次

略語一覧.....	2
著者	4
謝辞	5
利益相反.....	6
要約	8
序文	10
1. 結核の現状と病原体サーベイランス.....	11
2. 結核菌サーベイランスシステムの目的・意義及び必要性.....	13
3. 結核菌病原体サーベイランスと大規模サーベイの関連性.....	14
4. 結核菌サーベイランスの要素と内容.....	15
<u>a.</u> 結核菌サーベイランスの前提条件	15
<u>b.</u> 結核菌病原体サーベイランスの方法.....	26
<u>i.</u> 薬剤感受性調査の方法と利点・欠点.....	26
<u>ii.</u> 分子疫学解析の方法と特徴	29
<u>c.</u> 結核菌病原体サーベイランス情報の管理	45
<u>d.</u> 結核菌病原体サーベイランス情報の利用	45
5. 結核菌病原体サーベイランスのシステム	47
<u>a.</u> 結核菌病原体サーベイランスモデルの構造.....	47
<u>b.</u> 結核菌病原体サーベイランスモデルと構築に関する課題.....	48
6. まとめ	50

要約（加藤誠也）

日本の結核罹患率は2015年に人口10万対14.4まで低下し、低まん延化（罹患率が人口10万対10未満）が視野に入るようになった。対策の評価や感染リスクの分析とそれに基づいた対策の強化のために、「薬剤感受性検査及び分子疫学的手法からなる病原体サーベイランスの構築に努めること」が国の方針として明示された。

結核菌病原体サーベイランスを構築・運用する前提条件として検査の精度保証が必要である。精度保証の方法として、内部精度管理(IQC)、外部精度管理(EQA)、トレーニング(TA)がある。さらに外部精度評価にはクロスチェック、パネルテスト、立会調査がある。培養検査についてはIQCで、治療開始前の塗抹陽性検体中の培養陽性率、および雑菌汚染率を指標とする。同定検査もIQCで、結核菌及び非結核性抗酸菌の基準株をそれぞれ陽性・陰性コントロールとして実施する。薬剤感受性検査は検査プロセスごとのIQCとパネルテストによるEQAによって精度保証を行う。遺伝子タイピングについては陽性コントロール、陰性コントロール、反復数マーカー等を用いたIQCの他パネルテストによるEQAも試みられている。

結核菌の分離・培養は前処理後、液体培地または固形培地で培養する。保存は数か月程度までの短期であれば、常温でも可能だが、長期に及ぶ場合には -20°C さらに必要に応じて -70°C で保管する。輸送の際は法令を遵守し、通常の結核菌（四種病原体）と超多剤耐性菌では輸送方法が異なるので、それぞれ確認する必要がある。結核菌DNAの抽出はキットの利用が可能で、DNAは輸送方法に制限はない。

病原体サーベイランスは感染症法に基づいて実施にされるので、同意は不要であるが、研究利用に際しては研究倫理規定に準拠した手続きが求められる、

これまで、薬剤感受性調査は結核登録者情報システム、結核療法研究協議会による調査、検査センターを対象とする調査が実施されてきたが、精度保証、対象者の代表性、患者情報の精度など一長一短がある。

遺伝子タイピングの方法としてRFLP、スポリゴタイピング、VNTR等があり、現在は日本ではVNTRが主要な方法となっているが、今後はゲノム解析が使われるようになる可能性がある。

薬剤感受性に関する病原体サーベイランスが構築されると、薬剤耐性結核菌の流行の把握、患者管理の適正性の評価や薬剤耐性発生予防の方策の検討等に有用である。結核分子疫学情報によって特定の遺伝子型結核菌の広がり状況や、特定の場所における結核菌の伝播状況の把握が可能となるので、感染拡大防止策の検討に用いられる。

薬剤感受性に関する病原体サーベイランスのモデルとして、医療の一部として病院で採取された検体を院内または外部の検査センターが検査した結果を、保健所が把握して、国の感染症サーベイランスシステムに入力する。

分子疫学については、病院または検査機関で検体から培養の結果として得られる菌株を用いて、地方衛生研究所等に搬送して VNTR 検査が実施される。その結果を保健所が収集する疫学情報と合わせて地域データベースに整理・保存し、地域における感染状況の分析等に活用する。さらに都道府県域を越えた分析に用いるために、各地の地域データベースの情報を統合した全国データベースの構築が必要になる。病原体サーベイランスの構築にあたっては、菌の遺伝子型検査を行う地方衛生研究所、疫学調査を担当する保健所と検体や疫学情報を提供する医療機関の連携体制とともに、薬剤感受性試験及び VNTR 等遺伝子型別法の精度保証を行う機関が必要である。

序文（御手洗聡）

結核はかつて「国民病」といわれ、罹患率が 698.4（対 10 万人・1951 年）と極めて高率な時期もあった。結核は飛沫あるいは空気感染する病原体であるから、その当時は一般社会において無作為な相互感染が高頻度に発生していたと思われる。その後、国民皆保険制度や公衆衛生事情の改善により結核の罹患状況は急速に改善し、現在の罹患率は人口 10 万対 14.4（結核の統計 2016）まで低下している。活動性結核患者の多くは過去の高まん延期の潜在結核感染症からの再燃（高齢者）であるが、高齢者においても新規感染を疑わせる症例が少なからず認められる。青年層では外国出生の患者が多くを占めるようになるなど、結核感染の状況は大きく変化している。

結核菌に関する病原体サーベイランスは、薬剤耐性モニタリングと分子疫学を対象とする。一般には疾病の動態（何らかの悪化や新しい関係性）を予測あるいは早期探知する手段であるから、当該疾病が常に高度耐性・高まん延状態にある状況では機能しづらい。特に相互感染が高頻度に発生する状況では、感染ルートの解明が困難であり、ある程度罹患率が低下して感染の一方向・一対一対応が見込める状況でなければ概況としての病原体の多寡しか評価できない。日本の結核は現状として低まん延に近い中まん延状態と考えられ、薬剤耐性については世界的にも耐性率の低い状況にあり、結核菌の病原体サーベイランスを実施可能な状況となっている。しかしながら、システムとしての確立には実践経験に基づく検証と一般化（標準化）が必要であると考えられ、その意味で具体性のあるサーベイランス実施上の指針が必要と考えられる。

今回、結核菌病原体サーベイランスの実践を考慮し、総論としてのガイドラインと分子疫学情報を具体的に利用する際の手引きを作成した。これらの手引きに基づいて病原体サーベイランスが実践され、知識の蓄積としてフィードバックされることを期待する。

平成 29 年 5 月 30 日

1. 結核の現状と病原体サーベイランス（御手洗聡）

a. 背景

我が国の2015年における年間新登録全結核患者数は18,280人で、登録率としては人口10万対14.4となっている。近年の我が国における登録率の年間減少率は5%前後となっており、このままの減少率で推移するならば、2020年代後半には、人口10万対10以下の結核低まん延状態（人口10万対年間全結核患者登録者数10未満）になることが推定される。我が国における新登録全結核患者のうち80歳以上が約4割を占めている一方、20～59歳の年齢層においては、無職または臨時日雇等が約2割を占めている¹⁾。

目標達成のためには、①高齢者、ハイリスクグループ、デインジャーグループに対する結核対策の強化、②潜在性結核感染症治療の積極的な推進③各地域の実情に応じた医療提供体制の再構築、④新しい技術・対策の開発研究、⑤人材の養成と技術支援の強化、⑥大都市部での対策強化が必要とされている（ストップ結核日本アクションプラン 2014年7月）²⁾。

一方、結核の標準的治療法が無効である多剤耐性結核（少なくともイソニアジドとリファンピシンに耐性である結核菌による結核）は、現在の結核対策の有効性を著しく阻害するため、その発生の防止は、喫緊の課題である。今のところ、我が国における多剤耐性結核患者の発生頻度は、新登録結核菌培養陽性患者のうちの1%未満である¹⁾。薬剤耐性結核患者の発生は、結核対策の不十分さを反映していると考えられ、ある地域における薬剤耐性結核患者発生頻度の推移をモニタリングすることは、その地域における結核対策の評価をするために極めて重要である。また、結核低まん延状態が間近に迫っている我が国の状況において、より効率的な結核対策実施のためには、地域における結核菌の伝播状況の把握と結核菌の伝播を断ち切るための対策が必要である。地域における結核菌伝播状況の把握のためには、その地域で分離培養される結核菌の遺伝子型情報を用いて感染のリスクを推定することが有用である。さらに、結核の感染源となる結核菌陽性結核患者の早期かつ確実な結核診断のために、病原体サーベイランスで得られる情報と疫学情報を合わせて分析することが有用である。

我が国においては、結核菌の分離培養及びその保存は、患者の治療を目的として、主に病院検査室や検査センターで実施されている。全国または、地域の病院検査室や検査センターで分離培養される結核菌の薬剤感受性試験結果情報を集約してモニタリングする仕組みは未構築である。また、結核菌薬剤感受性試験に関する精度保証を実施する制度についても未構築である。

さらに、結核菌遺伝子型検査（VNTR 等）は、主に地方衛生研究所で実施されているが、薬剤感受性試験結果情報と同様に、全国で結核菌遺伝子型情報を集約してモニターする制度についても未構築であるのが現状である。

b. 「結核に関する特定感染症予防指針」における位置付け

平成 21 年（2009 年）に施行された「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」（以下、感染症法）の第 11 条（特定感染症予防指針）に基づいて策定される「結核に関する特定感染症予防指針」が、平成 23 年（2011 年）に改正された。予防指針中の「第一 原因の究明」では、国及び地方自治体が結核対策として推進すべきこととして、「薬剤感受性検査及び分子疫学的手法からなる病原体サーベイランスの構築に努める必要がある」と明記されている。また、「第四 研究開発の推進について」では、「結核の罹患リスクが高いグループや感染リスクのある場所を特定するとともに、感染経路の把握や海外からの結核菌の輸入が国内感染に与える影響を検証するため、分子疫学的手法を用いた研究を推進すること」と明記されている（厚生労働省健康局結核感染症課長通知 健感発 0516 第 1 号 平成 23 年 5 月 16 日）³⁾。これらの方針は、2016 年の一部改正の際に、ほぼそのまま引き継がれた。

【参考文献】

1. 厚生労働省. 結核の統計 2016 年版. 結核予防会 2016.
2. ストップ結核パートナーシップ日本. 改定版ストップ結核ジャパンアクションプラン. [http://www.stoptb.jp/dcms_media/other/stop.pdf#search=%27 ストップ結核アクションプラン%27](http://www.stoptb.jp/dcms_media/other/stop.pdf#search=%27%20ストップ結核アクションプラン%27)
3. 厚生労働省健康局結核感染症課長通知 健感発 0516 第 1 号 ([https://www.pref.iwate.jp/dbps_data/_material/_files/000/000/006/675/shishinkaisei.pdf#search=%27 厚生労働省健康局結核感染症課長通知+健感発 0516 第 1 号+平成 23 年 5 月 16 日%27](https://www.pref.iwate.jp/dbps_data/_material/_files/000/000/006/675/shishinkaisei.pdf#search=%27%20厚生労働省健康局結核感染症課長通知+健感発 0516 第 1 号+平成 23 年 5 月 16 日%27))

2. 結核菌サーベイランスシステムの目的・意義及び必要性（御手洗聡）

結核菌病原体サーベイランスシステムを構築・運営することの目的は、「我が国における結核菌の動態を明らかにすることにより、国民の結核罹患を予防するための基本的情報を提供するとともに、結核対策の実施状況の適正性についてモニタリング及び評価を行うこと」である。予防指針では、病原体サーベイランスは抗結核薬剤感受性試験結果情報の把握・結核菌遺伝子型情報の把握からなるとされている。

a. 抗結核薬剤感受性試験結果情報

抗結核薬剤感受性試験結果情報を共有する体制を構築する目的は、全国やある地域の抗結核薬剤耐性菌発生頻度の推移を観察することにより、地域における結核対策の実施状況に関する適正性を評価することである。例えば、ある地域において、新登録結核患者から得られる結核菌において、薬剤耐性菌の発生頻度が時系列で増加していることがわかった場合、その地域における結核患者管理の適正性や、新たな薬剤耐性結核菌の流行の有無について、検討する必要があることを示すことになる。また、抗結核薬剤感受性試験結果情報を共有する体制が構築されることにより、地域における薬剤耐性結核患者の発生頻度についての現状が把握され、その情報に基づいて、地域における薬剤耐性結核発生予防のための方策を検討することも可能となる。

b. 結核菌分子疫学

結核分子疫学を実施するための体制を構築する目的は、全国やある地域の新登録結核患者から得られる結核菌遺伝子型の推移に基づいて、地域における結核菌の伝播状況に関する情報を提供することにより、結核菌の伝播が起きている場所や集団等に代表される感染リスクの推定を行い、感染拡大の防止に寄与することである。

地域における結核分子疫学を実施するための体制が構築されると、その地域における集団感染の有無の判断や集団感染事例間の関連性の確認、通常の積極的疫学調査では未解明の結核菌感染伝播状況の発見、特定の地域や人口集団における結核菌の集積性や伝播状況の詳細を知ること、接触者健診対象者範囲に関するより正確な設定など、現行結核対策への積極的応用が可能となる。

3. 結核菌病原体サーベイランスと大規模サーベイの関連性（御手洗聡）

サーベイランス（Surveillance）とは一般的に「継続的調査監視」を意味しており、感染症の動向調査について言う場合は、当該感染症の発生に関する疫学的情報（通常は全部ではなく、定点などの一部情報）を継続的にモニタリングし、その疫学的動態の変化を迅速に検出するシステムを指すものと考えられる。

一方サーベイ（Survey）とは端的には状況調査であり、サーベイランスに対して使用する場合は、サーベイランスから得られた予兆・兆候を元にして、疫学的状況の変化が予測される（あるいは未知の状況である）事象を詳細に調査する活動を指している。

サーベイランスが継続的で特定の（Predictive value の高い）ファクターを継続的にモニターする活動であるのに対して、サーベイは目的を明確化した調査活動で、その意味では非継続的な単発の活動である。

通常（常時）はサーベイランスを特定の項目について継続的に実施し、一旦何らかの特異的な変化の予兆が得られたときは大規模にサーベイを実施することになる。組織体としては両方のキャパシティを備えておく必要がある。

4. 結核菌サーベイランスの要素と内容（御手洗聡・瀧井猛将・内村和広）

a. 結核菌サーベイランスの前提条件（御手洗聡）

i. 検査方法の精度保証

精度保証とは、検査の信頼性と効率を永続的に維持改善するために、精度や信頼性、適時性について監視評価することと定義される。精度保証の方法には、①検査の手順や試薬等についての内部管理活動である精度管理（IQC）と、②外部から検査の効率や質等を評価する外部精度評価（EQA）および③トレーニングの三つがある。さらに外部精度評価にも三つの方法があり、①日常業務上一度検査した検体を別の施設で再検査する方法（クロスチェック）、②結果既知の検体を検査し標準判定と比較する方法（パネルテスト）及び③現場での調査・指導（立会調査）が含まれる¹⁾。

1) 結核菌培養検査

培養検査は検体の前処理から培地への接種、培養と同定を連続して総合的に評価する必要があるため、安定した生菌を含む検体を作成する必要がある。このような検体を作成するのが困難なため、培養検査の精度保証には一般的に EQA が含まれない。一般にはトレーニングと IQC によって精度保証を行うのが一般的である。IQC の指標として重要なのは培養陽性率と雑菌汚染率である²⁾。

培養陽性率：塗抹陽性検体における培養陽性率をモニターしておく。単純な陽性度は患者の治療状況のばらつきによって大きく影響される可能性があるが、治療前の塗抹陽性検体は基本的に培養陽性となるので、陽性率 95% を基準に考える。この指標を算出する場合は、患者単位ではなく培養チューブ単位で算出する。また雑菌汚染したチューブは計算から除外して良い。従って計算式は以下の通りである。

$$\text{塗抹陽性検体での培養陽性率} = \frac{\text{塗抹・培養陽性検体数} - \text{雑菌汚染数}}{\text{塗抹陽性検体数} - \text{雑菌汚染数}} \geq 95\%$$

この計算の対象となるのは未治療結核患者の診断時検体のみである。治療経過をみるために提出された検体は計算から除外する。

培養における雑菌汚染率：培養精度を観察評価する上でもう一つ重要な指標が雑菌汚染率である。これも診断時の検体を対象に培養チューブ単位で計算する。一般に固形培地で培養した場合の汚染率は2～5%程度、液体培地で5～10%程度とされている³⁾。これを大きく下回る場合は雑菌汚染処理が過剰である可能性を考えるが、塗抹陽性・培養陽性率が十分であれば問題は無い。逆に汚染率が高率である場合は雑菌汚染処理が不十分であるから、プロセスの見直し（多くは検体の均質化不足）など適切な対処を考える。

2) 結核菌同定検査

結核菌の同定検査の精度保証は基本的に IQC に依存している。結核菌基準株 (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC27294 等) を陽性コントロール、非結核性抗酸菌の基準株 (*Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* 等) を陰性コントロールとして検査を実施する³⁾。

3) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験には IQC と EQA が利用される場合が多い。

(a) IQC: インキュベーターの温度管理を行う。市販のキットを使用する際は、輸送状況、保管状態、使用期限等に注意する。使用した薬剤感受性培地の精度が問題ないこと、及び検査成績が正しいことを示すため、検査バッチごとに全感受性株 (H37Rv 等) を使用する。

日常の精度管理に使用する菌株の保存は以下のように行う。①液体培養菌から液体培地を用いて、 $OD_{530nm} = 0.1$ の菌液を調製する。②凍結保存可能チューブに 1 ml ずつ分注する。③チューブをラックに収め、 -20°C 以下 (可能な限り -70°C 以下) に保存する。④1 菌株につき数十本保存し、必要時開封する。使用後は再度凍結しない。⑤使用時、被験菌と同様に希釈する。10,000 倍希釈菌液接種培地に 100～300 個のコロニー、その 10 倍希釈培地に 10～30 個のコロニーがみられる³⁾。

(b) EQA:

➤ クロスチェック (再検査)

クロスチェックは一度検査した検体を別の施設で再検査する方法なので、精度評価のために再検査を実施する施設に多大な負担が生じる。また無作為に検体をサンプリングする必要があるが、日本のように陽性率が低いと有意なデータを得るために多くの検体をサンプリングしなければならないので、さらに負担が大きくなる。例えば、Lot

Quality Assurance System (LQAS: 無作為検体サンプリングシステム)を用いて、感度 80%でクロスチェックを実施しようとする、年間 100 検体しか検査を実施しない施設で陽性（耐性）率が 2.5%の場合、84 検体をサンプリングしなければならない。これではほぼ全数再検査である¹⁾。

世界的にみてもクロスチェックを実施しているのは結核の有病率が高い途上国であり、しかも抗酸菌塗抹検査のみである。少なくとも大規模に実施することを考えると、日本のような状況（検査数が多く、陽性率が低い）ではクロスチェックによる薬剤感受性試験の EQA は実践性がないと言える。

▶ パネルテスト（技能試験）

抗酸菌全般の薬剤感受性試験法は確立されていない。基本的に試験管内の検査結果と臨床的効果との相関が確立されているのは結核菌に関してのみであるが、基本的に手作業で行う検査であり、実施者の手技により検査結果が安定しない（再現性が低い）場合がある。その意味で、現在の実施方法（比率法あるいはそれに類する方法）で検査を継続する限り精度保証は必須と考えられる。

結核菌の薬剤感受性試験の外部精度評価は、日本においても比較的経験のあるところである。主に日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会が主体となって 2004 年から 2011 年までパネルテストを毎年実施していたが、現在は実施されていない。代わりに結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科が AMED の研究の一部として 2015 年からパネルテストを再開している。感染症法の改正により外部精度評価が求められる状況となっているので、継続は必要と考えられるが、適正な実施間隔や規模には依然として議論がある。方法としては結果既知の結核菌を 10～20 株使用する^{4,5)}。

薬剤感受性試験の場合は、喀痰などの臨床検体から分離培養を経て結核菌を分離し、同定検査を経て感受性試験に使用する、という一連のプロセスを含める方法と、既に株化された結核菌株を使用する方法の二つが考えられる。日本では感受性試験を実施している検査室の数がまだ比較的多いため、実践上の理由から後者を利用する場合が殆どである。株化した結核菌株の利点として、検査を繰り返すことで標準結果を高精度に確定できることが挙げられる。実際に日本の外部精度評価では GLI/SRLN における施設間判定一致率が 80%以上の菌株が

使用されている。ある意味ではこれらの施設でさえ一致しない株が使用されているとも言えるが、株化されているとはいえ、特に静菌的薬剤について確実な再現性を求めるのは容易ではない⁶⁾。

薬剤感受性試験のパネルテストは一般に INH、RFP、SM、EB の 4 薬剤について実施する。これは、ある程度の再現性をもって結果が得られることが主な理由である。いわゆる二次抗結核薬についてある程度の信頼性が得られるのは注射剤（日本の場合アミノグリコシド）とニューキノロン剤、PZA 程度である。CS や PAS ではそもそも EQA の経験がない。

パネルテスト株を選定する際には、結果の安定性以外に使用する株数とその構成を考える必要がある。基本的には、使用する株数は 10～20 株程度、含まれる耐性菌の割合は、各々の薬剤についておよそ 50%になるように構成する。これは「適中率」の適正化のためである。株数については、単純に「現実性」を考慮した結果である。あまり株数が多すぎると、現在の日本の検査室の検体処理能力（パネルテストとしての許容範囲）を超えてしまう。理論的に考えれば、それぞれの被検菌の「耐性・感受性」を独立事象として、95%の信頼度で評価しようとした場合、被検菌数は 59 株以上になってしまう。これだけの数だと SRLN でさえ敬遠されてしまうため、実際には 30 株以下でしか実施できない。

使用する結核菌株の構成にも注意が必要である。結核菌は感染症法において特定病原体に指定されているため、他の病原体に比べて厳重な管理が要求される⁷⁾。特に三種病原体等に指定されているいわゆる超多剤耐性結核菌は公安の許可の下、厳重な管理体制でしか輸送できないため、実践的に精度保証の目的では使用できない。つまりパネルテストに使用できる結核菌は四種病原体等に限定されるため、完全な盲験性を保証できない。現状ではフェアなパネルテストを実施することは不可能である。

テストである以上、一定の評価基準を設定しておくことも必要である。2004～2011 年の間に日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会が実施したパネルテストの総合的評価結果によると、現在 GLI/SRLN が採用している合格基準「INH 及び RFP の感度及び特異度が 95%以上であり、実施した全ての薬剤について判定一致率が 90%以上」が適当と考えられる⁴⁾。

➤ インスペクション/スーパービジョン（立会調査）

一般に上位機関から専門家が対象となる現地に赴き、現地の技師と薬剤感受性試験実施のプロセスを一緒に検討するものである。具体的な間違いや改善点を指摘することになるが、個人の評価に利用されないよう、教育及び改善が目的であることが明確化されなければならない。

通常はパネルテストやクロスチェックで問題点が発見された後、原因の解明と改善を目的として実施する。標準的なチェックリストを準備し、プロセスを一つずつ確認しながら問題点を明らかにする。時間もコストも大きくなるのが難点であるが、精度改善の方法としては最も有効と思われる。

4) 遺伝子タイピング

遺伝子タイピングの精度保証には IQC を行うのが一般的であるが、EQA を利用することも可能である。

IQC: 陽性コントロールとして反復数既知の基準株を検査ごとに用いることが勧められる。検体間の交叉汚染を検出する目的で、陰性コントロール（DNA を含まない水など）を検査の最初から設定しておくことも重要である。また、反復配列数が既知の PCR 産物を加えて電気泳動を行うことで、解析の精度を保つことができる。反復数が既知の PCR 産物を複数混合し、幅広いレンジの反復数をカバーできるものを各領域毎に作成し、反復数マーカーとして使用すれば精度管理しやすくなる。

EQA: 薬剤感受性試験の場合と同様に、反復数既知の結核菌 DNA を使用してパネルテストを行う方法がある。これまでに結核予防会結核研究所によって複数回「研究」として実施されている。これまでに実施された方法では、3 検体程度の反復数既知の結核菌 DNA を用いて、24 の領域を対象としている⁸⁾。

ii. 結核菌株の分離・保存・輸送

1) 結核菌の分離

結核菌の分離培養は一般に液体あるいは固形培地を用いて行われる。通常無菌状態である髄液などの検体を除いて、一般細菌の汚染を除去するための「前処理」を行うのが通常である。前処理には NALC-NaOH を用いるのが一般的であり、検体と等量混合した後、時折震盪しながら室温

で 15 分間処理する（ローテーターを使用して 15 分間震盪し続けても良い）。NaOH は結核菌にも毒性を有するので、15 分間という処理時間を厳守する。15 分後に中和のため 4 倍量以上の PB を加える。3,000G で 20 分間遠心し、上清を捨てて沈渣をリン酸緩衝液（pH 6.8）で再懸濁する。最終的なボリュームは 1～2ml となる。

(a) 液体培地

上記の懸濁液を 0.5ml 接種する。発育の検出には自動装置が使用されるのが一般的である。自動装置が陽性を告げた時点で 10^6 cfu/ml 程度の菌量があると考えられる。

(b) 固形培地

本邦で使用される固形培地は主に 2%工藤培地である。上記の懸濁液を 0.1ml 接種し、培地表面全体に拡げて培養する。接種した菌液を乾燥させるため 2～3 日は培地の蓋を緩めておく。表面が乾いたら蓋を閉めて培養を継続する。4 週目までは毎週 1 回、以降は 8 週目まで 2 週間に 1 回目視で発育を観察する。

2) 結核菌株の保存

上記で分離され、適切な方法で同定された結核菌は、そのまま継続する検査に使用される場合であっても、後で再検査あるいは追加検査を行うことを考慮して一部を保存する必要がある。感染症法上、保管は安全管理区域内に保管庫を設定し、施錠しなければならない。

(a) 短期保存

数週間～数ヶ月程度の短期保管であれば、培地ごと 4℃の冷蔵庫に保管すれば良い。1～2ヶ月程度であれば冷暗所保管（光の当たらない場所で常温・乾燥対策は必要）も可能である。

(b) 長期保存

年余にわたって結核菌を生きた状態で保管するには、一般的に凍結の必要がある。数年以内であれば-20℃が良いが、5年から10年以上の保存を考える場合は-70℃以下に保管するのが良い。分離菌を浮遊させる分散媒は液体培地そのもので構わない。他に 10%程度のグリセロールを含む滅菌水や、スキムミルク 3%とグルコース 5%を含む分散媒を用いても良い。

3) 結核菌株の輸送

結核菌は特定三種あるいは四種病原体等に指定されているため、結核菌株として輸送する場合は法令を遵守する必要がある⁹⁾。

(a) 生菌の輸送

パッキング（梱包）：一次容器、二次容器、三次容器を基本的に必要とする。後述する「ゆうパック」を使用する際はさらに外装四次容器（アルミケース）を必要とする。一次容器は結核菌が発育している培地そのもの（ボトルやチューブ）である。液体培地であればスクリュウキャップのプラスチックチューブであり、固形培地であれば最近はこちらもスクリュウキャップのプラボトルが増加しているが、依然としてゴムキャップのものがある。ゴムキャップには空気を取り入れるためのスリットが入っているので、輸送の際はパラフィルムやビニールテープで凝固水が漏れないように完全に密封する（可能な限りゴムキャップの培地は輸送に用いない方がよい）。

一次容器を吸収剤（衝撃吸収用ではなく、漏出の際の液体培地や凝固水の吸収用）で梱包し、さらにビニール袋などに入れて密封する（ジップロックなどが使いやすい）。さらにそれを衝撃吸収剤（プチプチ）で包み、二次容器に入れる。二次容器はいわゆる国連容器で、一定の衝撃に堪えられる様に作られている。様々な製品があるので、サイズを確認して購入する。通常は三次容器とセットで販売されている。

二次容器はゴムパッキング付きの樹脂製密封容器である。一次容器を（吸収剤と緩衝剤で梱包し）適切に収納したら、隙のないように確実に密閉する。この際、二次容器内に揮発性あるいは昇華性物質を入れると、圧力の上昇により爆発することがあるので、決してドライアイスなど入れてはいけない。蓋を緩めておけば良いだろうと考えては「密封」の意味がなくなる。二次容器を適切に密封したら、そのまま三次容器（外標は付いているが、ただの段ボール箱）に入れて、封印する。もし冷凍・冷蔵目的でドライアイスなどを入れる場合は、二次容器と三次容器の間に入れる。三次容器の役目は、その外装に記されたバイオハザードマークやUN 番号による内容の表示である。また、三次容器には差出人と受取人の情報（緊急連絡先を含む）を記載して貼付する。

輸送を外注する場合：まず基本的原則として、本邦で公安への届出なしに輸送できる結核菌は、四種病原体等に限られる。一般の宅配便を結核菌の輸送に使用してはならない。「ゆうパック」を利用する際は、ゆうパックの約款に基づいて、三次容器をさら

に外装の四次容器（ジュラルミンケースとされているが、実際にはアルミケース）に入れる。四次容器には荷送人及び荷受人の氏名、住所、電話番号、品名、検体に関連する感染性物質、検体の上下方向などの情報について適切に表示する。このほか包装物には、ゆうパック利用の際の遵守事項への適合性等安全性を担保された適正な包装物であることを証明するため、包装責任者による適正包装の確認済である旨、その確認の年月日、包装責任者の氏名及びその所属機関の名称を表示する。このパッキングの方法については毎年研修会が行われているので、受講については自治体の担当者等に確認する。厚生労働省のホームページ（http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kekka-ku-kansenshou17/03.html）からも情報が得られる。

三種病原体等に相当する結核菌を国内で輸送する場合は、公安への届出等も代行してくれる専門業者に依頼するのが現実的である。ただし、発注から実施まで最短でも3週間程度を要するうえ（これは個人で実施しても同じ）、輸送費用が高額になる場合がある。三種病原体等の輸送能力には限界があるため、2件以上の同時輸送や輸送途中で追加積載（どこかに途中で寄って荷物を追加）することもできない。

なお、三種病原体等の輸送を個人で実施することは極めて難しい。通過する全ての都道府県の公安の許可が必要であり、輸送ルート及びルート上のポイントの通過時刻を事前に分単位で決めて報告しておかなければならないが、これは専門業者でなければ設定すら困難である。さらに輸送には運転手の他に感染症の知識を有する同行者が必要であり、事故が発生した際に感染の拡大を防ぐための装備品（危険領域指示のためのロープ、消毒薬、N95マスク、使い捨て防護服、処理用ポリ袋、等）の携行も必要とされている。

(b) DNA の抽出と輸送

DNA の抽出には複数の方法がある。培養分離した結核菌から抽出する場合は、元が大量であるため、ある程度効率の低い方法でも十分な核酸（DNA）が抽出可能である。一番簡単なのは菌を滅菌水あるいはバッファーで懸濁し、95℃で10～20分間煮沸する方法である。このとき、懸濁液を入れたチューブは完全に沸騰

水中に沈める。ある程度冷ました後、11,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収する。この方法で回収した DNA は長期保存には向かないため、基本的にすぐに使用するか、凍結しても短期間で使用する。

抽出キットとしては複数の製品が利用可能であるが、結核研究所抗酸菌部では ISOPLANT[®]（和光純薬）を主に使用している。自動核酸抽出装置でも抽出は可能であるが、効率は製品により異なる。

DNA に感染性はないため、生菌が混入していないことが明確であれば、どのような方法で輸送しても構わない。劣化を防ぐ必要がある場合は冷蔵あるいは冷凍で送付するのが望ましい。

iii. 行政的利用と研究応用の前提条件

1) インフォームド・コンセントの取扱

a) 行政的情報利用時におけるインフォームド・コンセントの取り扱い

結核菌病原体サーベイランスに関わる情報収集・解析・公表については、本事業が感染症法第一五条及び同第一六条に基づいて実施される事業であり、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 平成 26 年 12 月 22 日（平成 29 年 2 月 28 日一部改正）文部科学省 厚生労働省」による倫理指針の対象外であるため、情報収集対象となる結核菌が分離培養された結核患者からのインフォームド・コンセント取得は不要である¹⁰⁾。

b) 研究として情報を利用する場合のインフォームド・コンセントの取り扱い

上記の通り、感染症法に基づいて収集された情報を研究として利用して分析・公表する場合、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 平成 26 年 12 月 22 日（平成 29 年 2 月 28 日一部改正）による倫理指針に照らして、研究者は、その公表の是非について、研究者が所属する倫理審査委員会の承認を得る必要がある。ただし、この場合、上記倫理指針「第 5 章 インフォームド・コンセント等 第 12 インフォームド・コンセントを受ける手続き等 (2) 自らの研究機関において保有している既存試料・情報を用いて研究を実施しようとする場合のインフォームド・コンセント イ 人体から取得された試料を用いない研究」に該当するため、必ずしもインフ

フォームド・コンセントを受けることを要しない。しかしながら、インフォームド・コンセントを受けない場合には、次の(ア)から(ウ)までのいずれかに該当していなければならない。

(ア) 当該研究に用いられる情報が次に掲げるいずれかに該当していること。

① 匿名化されているもの（特定の個人を識別することができないものに限る。）であること。

② 匿名加工情報又は非識別加工情報であること。

(イ) 当該研究に用いられる情報が(ア)に該当しない場合であって、その取得時に当該研究における利用が明示されていない別の研究についての研究対象者等の同意のみが与えられているときは、次に掲げる要件を満たしていること。

① 当該研究の実施について、4①から④*までの事項を研究対象者等に通知し、又は公開していること。

② その同意が当該研究の目的と相当の関連性があると合理的に認められること。

(ウ) 当該研究に用いられる情報が(ア)又は(イ)のいずれにも該当しない場合であって、学術研究の用に供するときその他の当該情報を用いて研究を実施しようとすることに特段の理由があるときは、次に掲げる要件を満たしていること。

① 当該研究の実施について、4①から⑥*までの事項を研究対象者等に通知し、又は公開していること。

② 研究が実施又は継続されることについて、原則として、研究対象者等が拒否できる機会を保障すること。

*4 研究対象者等に通知し、又は公開すべき事項

1又は9の規定において、研究対象者等に通知し、又は公開すべき事項は以下のとおりとする。

① 試料・情報の利用目的及び利用方法（他の機関へ提供される場合はその方法を含む。）

② 利用し、又は提供する試料・情報の項目

③ 利用する者の範囲

④ 試料・情報の管理について責任を有する者の氏名又は名称

⑤ 研究対象者又はその代理人の求めに応じて、研究対象者が識別される試料・情報の利用又は他の研究機関への提供を停止すること。

⑥ ⑤の研究対象者又はその代理人の求めを受け付ける方法

2) 予算と人員の確保

国及び地方自治体は、上記「結核に関する特定感染症予防指針」の実施主体として、結核菌病原体サーベイランスシステムの構築・維持管理・人員確保に関連した必要な予算措置をする必要がある。その場合、同サーベイランスを維持管理するための必要なインフラ整備と人員配置(含コンピュータ、コンピュータネットワーク等に関わる費用)、結核菌検査(結核菌遺伝子型検査費用、結核菌同定検査・薬剤感受性試験・遺伝子型検査の精度保証に関する費用)、結核菌運搬(郵送(病院検査室や検査センターから各衛生研究所への運搬等の費用)等を考慮する必要がある。

3) 個人情報との連結

a) 行政的情報利用時における個人情報の取り扱い

結核菌病原体サーベイランスの情報と結核菌が分離培養された結核患者の個人情報との連結については、保健所等の行政機関が感染症法第一五条に基づく積極的疫学調査の一環として実施する事業内容と考えられるので、取り扱う情報の管理には十分配慮しつつ、積極的に実施して、結核対策に応用する。

b) 研究として情報を利用する場合の個人情報の取り扱い

予め作成された研究計画内容に沿って、個人情報を取り扱う。原則として、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 平成 26 年 12 月 22 日(平成 29 年 2 月 28 日一部改正)文部科学省 厚生労働省」の「第 6 章 個人情報等」に記載されている内容を遵守し、研究の過程において、個人が特定されないことがないように十分配慮する。

b. 結核菌病原体サーベイランスの方法（御手洗聡）

i. 薬剤感受性調査の方法と利点・欠点

1) 結核患者登録者情報システムによる情報収集

結核患者登録者情報システムは「ヒト」に関するサーベイランスシステムであり、その一部として薬剤感受性の情報が入力されている。対象薬剤は INH、RFP、SM 及び EB である。平成 27 年 5 月 12 日付の厚生労働省健康局長通知（健発 0512 第 12 号）により薬剤感受性の情報を登録票に記載すること（＝医療機関から情報の収集）が規定され¹¹⁾、入力が促された。結核患者登録者情報システムによる情報収集は毎年データが得られるという点で適時性がある。しかしながら、この情報は保健所が病院から収集したものであるため、転記や入力の過程で誤りが生じている可能性が否定できない。また、それぞれの病院あるいは病院が委託している検査センターでの精度保証の実施が不明であるため、検査精度が保証されているとは言えない。これらの点は改善が必要である。

2) 結核療法研究協議会による調査

結核療法研究協議会（療研）は、元々は SM の使用優先順位を決定するための官民合同会議であったが、現在は結核診療に関わる様々な研究を行っている。その一つとして、1957 年から数年おきに耐性結核サーベイを実施している¹²⁻¹⁴⁾。この調査の利点は実際に結核菌を収集し、精度保証を行った上で試験結果を解析しているという点で、薬剤感受性試験の信頼性が高い。一方、参加が任意であることから、参加施設が実施ごとに異なるため、収集された検体が必ずしもその時々々の結核の疫学的状況を正確に代表していなかった。また、結核菌の収集や試験、解析に時間がかかることから、適時性が必ずしも保証されていない。

3) 検査センターを対象とする調査

検査センターでは診療所や病院からの依頼によって日々結核菌の薬剤感受性試験データが産生されているが、個々の患者管理に利用されるのみであり、公衆衛生上は全く利用されていない。大手の検査センターでは系統的に精度保証を行っている場合が殆どであり、検

査の信頼性は一般的に病院検査室よりも高いと言える。その点で高精度の情報が入手可能であり、適時性もあるが、依頼元から必ずしも正確な患者情報が得られない場合が多いことや、検体の重複があり得る点に問題がある。

2008～2010年に実施された研究（新興再興感染症研究事業・石川班御手洗分担）では上記3種の薬剤感受性試験データを相互比較し、基本的に有意差がないことを示している。結核菌薬剤耐性サーベイランスとして考えた場合、現在薬剤感受性試験を実施している全ての検査施設に精度保証を実施し、結核登録者情報システムで動向を把握するのが最も効率的と考えられる¹⁵⁾。ただし、薬剤感受性試験そのものの精度を考慮すると、適切な陽性適中率が確保可能なのは本邦では初回治療患者ではINHとRFPのみである（INHは初回耐性が3%以上期待されるため。また、RFPは極めて高度な特異性が期待できるため）。既治療患者であれば、どの薬剤でも高い陽性適中率が期待できるが、患者の絶対数が少ないので、変動する可能性があるため、慎重な解釈が必要である。

【参考文献】

1. Aziz, M. A., Ba, F., Becx-Bleumink, M., Bretzel, G., Humes R., Iademarco, M. F., Kin, S. J., Lamothe, F., Paramasivan, C. N., Ridderhof, J., Sloutsky, A., Van Deun, A., Shah, K. V., and Weyer, K.: External quality assessment for AFB smear microscopy. Association for public health laboratories. 2002. pp1-111.
2. World Health Organization. Laboratory quality management system: handbook. Geneva, World Health Organization, 2011.
3. 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 第8章 抗酸菌分離培養. 抗酸菌検査ガイド2016. 南江堂. 2016
4. 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 日本における結核菌薬剤感受性試験外部精度評価の評価基準に関する解析. 結核 2015; 90(4): 480-490.
5. 御手洗聡, 山田博之, 青野昭男, 近松絹代, 樋口武史, 五十嵐ゆり子, 高木明子. 三種病原体等に相当する結核菌（超多剤耐性結核菌）の同定検査に関する外部精度評価. 結核 2016; 91(11): 717-725.
6. Kam KM, Sloutsky A, Yip CW, Bulled N, Seung KJ, Zignol M, Espinal M, Kim SJ. Determination of critical concentrations of second-line anti-tuberculosis drugs with clinical and microbiological relevance. Int J Tuberc Lung Dis. 2010; 14: 282-8.

7. 厚生労働省健康局結核感染症課. 三種病原体等である多剤耐性結核菌の取扱いについて. 健感発 0407 第 9 号 平成 27 年 4 月 7 日
8. 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡. 結核菌型別分析における精度保証. 2014 年度厚生労働科学研究委託費 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」(主任研究者 宮崎義継) 平成 26 年度総括・分担研究報告書. 93-96, 2015.
9. 厚生労働省健康局結核感染症課. 特定病原体等の安全運搬マニュアル http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/7_01.pdf
10. 文部科学省・厚生労働省. 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 平成 26 年 12 月 22 日 (平成 29 年 2 月 28 日一部改正) <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10600000-Daijinkanboukouseikagakuka/000153339.pdf>
11. 厚生労働省健康局結核感染症課. 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施行規則の一部を改正する省令の施行等について. 健感発 0512 第 12 号 平成 27 年 5 月 12 日
12. Abe C, Hirano K, Wada M, Aoyagi T. Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001 Jan;5(1):46-52.
13. Tuberculosis Research Committee (RYOHKEN). Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: A nationwide surveillance in 2002. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 1129-1135.
14. Tuberculosis Research Committee (RYOKEN). Nationwide survey of anti-tuberculosis drug resistance in Japan. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19(2): 157-162.
15. 御手洗聡. 菌バンク機能の活用及び病原体サーベイランスの構築. 平成 21 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「罹患構造の変化に対応した結核対策の構築に関する研究」(主任研究者 石川信克) 総括・分担研究報告書. 2010; 42-55.

ii. 分子疫学解析の方法と特徴（瀧井猛将）

遺伝子型別法の技術革新により結核の分子疫学は飛躍的に進歩してきた（表 1）。

方法	長所	短所
IS6110-RFLP	高い分解能 再現性と安定性	5コピー数以下では解像度が低下 2~3μg程度のDNAが必要 操作が煩雑 画像データを収載する大容量メモリーが必要
スポリゴタイピング	簡便で安価 少量のDNAで解析可能 多検体に対応 結果をデジタル表記できる On-lineサイトで他の施設での結果を比較できる IS6110が低コピー数の菌株でも解析出来る	IS6110-RFLPより低い分解能 北京型ではパターンが同じ
VNTR	操作が少ない 再現性と安定性 少量のDNAで解析可能 領域毎に反復数(コピー数)をデジタル表記できる 費用対効果が良い 対策への情報の還元が早い	系統によって領域の分解能が異なる 分解能を上げるためには多くの領域の解析が必要
WGS	高い分解能 詳細な遺伝子情報が取得可能 (SNPs解析、系統解析、薬剤耐性予測等)	使用機器、解析費用が高額 データの標準化が難しい 公共利用できるデータベースが未整備

結核菌の株毎の特徴を分子生物学的に分ける方法がある。1つにはゲノム（遺伝子全体）に挿入されたトランスポゾンが株によって異なることを利用した方法（RFLP）、同じように反復配列を利用した方法がある（spoligotyping, VNTR）。新技術である次世代シーケンス技術（NGS）による全ゲノム解析（WGS）の導入によって菌株毎の遺伝子配列の変異などの詳細な情報を比較できる技術も整いつつある。本稿では結核菌の分子疫学の各解析法について概説する。

図 1 に本稿で取り上げる菌のゲノム中に存在する特徴のある配列や遺伝子を示した。

1) IS6110 制限酵素断片長多型（RFLP）法

ヒト型結核菌である *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv の完全な遺伝子配列が解読され[1] ゲノム中には反復配列の存在が明らかになった。これらの反復配列の長さや構造とゲノム中の挿入場所は多種多様である（図 1）。反復配列には縦列（隣り合って存在する）型の反復配列 tandem repeats (TR) と、ゲノム内に散在（隣り合わない）している反復配列 interspersed repeats (IR)の 2つの型がある。IR の中で分子疫学に利用されるのは insertion sequences (IS)であり、IS はゲノム中を自由に移動できる。IS6110 は 1990 年台初頭に Thierry らにより報告された最初の IS である[2]。

IS6110 は IS3 ファミリー に属する長さ 1,355bp で末端に 28bp の特異な逆向きの繰り返し構造 inverted repeats (TIR) を持つ。IS6110 は結核菌群のゲノムに存在している。通常 IS6110 はゲノム内に 0~25 個程度分布していることが知られている[3]。例えば DR 領域の様に IS6110 が挿入しやすい場所がある (図 1) [3, 4]。ゲノム中の IS6110 のコピー数や挿入位置の違いによる多型が存在し、結核菌の遺伝子型別の標的として広く利用されている[5, 6]。

IS6110-RFLP 法は、IS6110 中に制限酵素 (特異な配列を認識して遺伝子を切断する酵素) である *PvuII* の切断個所が一か所しかないことを利用した方法である。はじめに結核菌ゲノムを *PvuII* で消化し、IS6110 を含む DNA 断片を作成する。断片化した DNA を電気泳動でその長さに従って分離した後、膜に転写し、ビオチンという物質で標識した IS6110 の 3'側のプローブ (特異な配列に結合するようデザインされた短い DNA 鎖) を IS6110 に結合させる。結合したプローブは、化学発光を X 線フィルムへ感光させることにより検出する。検出された各バンドはそれぞれ 1 つの IS6110 を含む[7]。

この方法はバンドの出現パターンが安定しており、またとても再現性が高く分解能も高い。IS6110-RFLP のバンドのパターンの多様性は転写の頻度に依存している。多様性の様式としては転移が多く、コピー数の変化は比較して少ない。IS6110-RFLP パターンが変化しない期間はおよそ 3~4 年との報告がある[8, 9]。IS6110-RFLP 法は優れた点も多いがいくつかの短所がある。DNA 量が 2 μ g 程度必要なため、解析に必要な DNA を得るのに数週間の培養が必要になる。また、データが画像として得られるため、解析には大容量の記憶媒体をもつコンピュータが必要である。そして IS6110 のコピー数が 5 以下と極端に少ない場合では分解能が低下する [10-12]。さらに、データが画像であるため異なる施設間での相互比較が難しい。

以上のような短所もあるが IS6110-RFLP 法は結核菌の分子疫学の標準的な遺伝型別として利用されてきた。

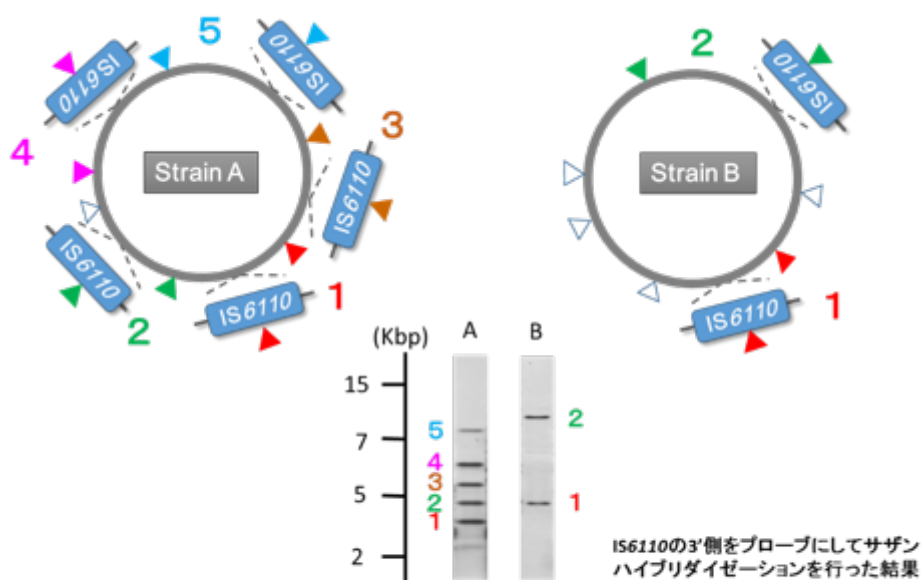


図2. IS6110-RFLP法による遺伝型別の概略

三角は制限酵素PvuIIの切断箇所を示す。塗りつぶしの三角はIS6110のプロープでハイブリダイズするDNA断片の末端を示す。IS6110;トランスポゾン

2) スポリゴタイピング法

スポリゴタイピング法は結核菌ゲノム内に存在する direct repeats (DR) 配列の多型を利用した解析法である。DR 領域は BCG ワクチン株の *Mycobacterium bovis* BCG P3 で見つかった反復配列で、36 bp の反復配列と 34~41bp のスペーサー配列から構成されている(図 1, 3)[13]。DR 領域は反復配列の clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) ファミリーに属している。この配列は染色体の複製時のセントロメアのように結核菌ゲノムの分裂でも同様に機能していると推定されている[14]。

DR の数とスペーサー配列は菌株間で異なっている。スポリゴタイピング法では結核菌 H₃₇Rv と *M. bovis* BCG P3 の既知スペーサー配列をコントロールとして、43 個のスペーサー配列の有無を菌株間で比較することにより、菌株の型別を行う。スペーサーの欠落は相同組換えや転移に起因していると考えられている。DR 領域は IS6110 が挿入しやすい部位であることも知られている (図 1) [15, 16]。

スポリゴタイピングの手技は比較的簡単で多検体にも対応が可能である。結果も 2 日ほどで得られる。検査費用も安価である。検査手技とし

ては図3に示すようにDRに対して相補的で互いに逆方向の二つのプライマーを用いて隣接するDRとの間のスペーサー、及びより遠隔のスペーサーを増幅する。一方のプライマーには標識としてビオチン化したものが用いられる[15]。膜に固定した *M. bovis* BCG P3 株、または結核菌 H37Rv 株の既知のスペーサーに由来するスペーサー配列にビオチンで標識されたPCR産物を結合させ、結合の有無を示すシグナルは、化学発光をX線フィルムへ感光させることにより検出する(図3 c, d)。スポリゴタイピング法ではDR領域を増幅するPCRに用いるごく微量のゲノムDNA (10fg ; 2~3 個の菌体分) で解析できることから菌を大量に培養する必要がない。培養菌を用いなくとも臨床検体から直接、もしくは抗酸菌染色したスライド、パラフィン切片からも検査が可能である[18]。結果の信頼性はDR領域の安定性と関係しており、その理由としてDR領域の分子時計が大変緩徐に進むことが考えられている。実際に、一度治癒した結核が再燃したときの分離株でも変化がないことから、スポリゴタイピング法は信頼性、安定性が高い[19-21]。

国際的な公共データベースとして SITVIT WEB が利用可能である。SITVIT WEB は 105 ヶ国からの 7 万株を越える臨床分離株(平成 29 年 2 月現在)について MIRU-VNTR とスポリゴタイピングの結果を収載している ([http:// www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT ONLINE/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)) [22]。欧米諸国ではスポリゴタイピングは迅速な型別法として広く利用されているが、日本国内で分離される結核菌の約 70~80%は北京型(スペーサー配列の 35 番目から 43 番目のみが陽性)が占めているため、スポリゴタイピング法での分子多様性が低く型別可能な株の割合が低い。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[17]。

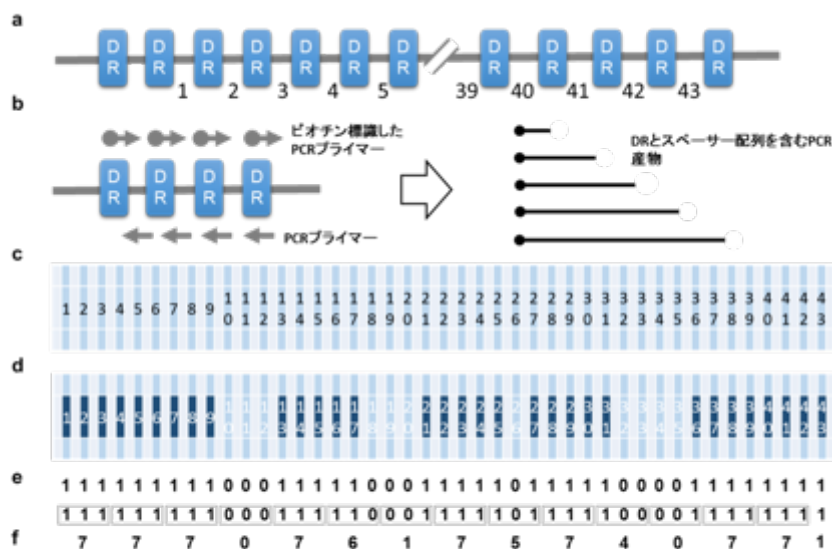


図3. スポリゴタイピング法の概要
a: DR領域とスペーサー領域、b: ビオチン化プライマーを用いたDRとスペーサー領域の増幅、c: スペーサー領域のオリゴDNAプローブを固定化したメンブレン、d: *M. tuberculosis* H37Rv株のスポリゴタイピングの結果、陽性のドットの背景を濃くしてある、e: binary codeへの変換: 陽性=1, 陰性=0、f: octal number表記: 000=0, 001=1, 010=2, 011=3, 100=4, 101=5, 110=6, 111=7

結論としてスポリゴタイピング法は IS6110-RFLP 法に比べて分解能が低いことが報告されている[23-28]。DR 領域は結核菌ゲノムの一カ所であり、かつ領域の長さはわずかゲノムの 0.1%程度なので、スポリゴタイピング法は分解能には限界がある。しかしながら、IS6110-RFLP 法でのコピー数が低コピー数 (5 より少ない) の場合にはスポリゴタイピング法は分解能が高いとの報告もある[11, 31]。

20 年以上前に既に確立されたスポリゴタイピング法であるが更に工夫を加えた方法が開発されている。スペーサーの合成オリゴヌクレオチドのプローブを共有結合で結合させたピースを用いて PCR で増幅した産物とハイブダイズさせたものを蛍光で検出するものであり、メンブレンを使用しないことに加えて多検体に対応できる特徴がある[67]。さらにマルチプレックスプライマーによるスポリゴタイピングと MALDI-TOF MS を組み合わせて自動化した方法も提案されている[68]。

3) 反復配列多型 (Variable Numbers of Tandem Repeats: VNTR) 分析法

結核菌はミニサテライト領域 (5-30 塩基対の反復単位が数十個繰り返している領域) が見つかった最初の菌類であり、variable number of tandem repeat (VNTR) 領域と名付けられたが、新しい VNTR-タイプが見つかり様々な名前がつけられた。最初に発見された VNTR は major polymorphic tandem repeat (MPTR) 、exact tandem repeat (ETR)であり、さらにそれぞれ 5 (A-E) 、6 (A-F)領域がある[63]。MPTR は 10 bp の反復配列が 5 bp の特異的な配列をもつスペーサー配列を持っている。結核菌のみならず、*Mycobacterium goodnae*、*Mycobacterium kansasii* または *Mycobacterium*

szulgai にもこれらの反復配列は存在していることが知られている[32]。MPTR は *M. kansasii* の RFLP 解析のプローブとして利用されている[33]。ETR 領域は結核菌株に広く存在する 53 bp から 79 bp の繰り返し配列である。ETR の遺伝子解析から、ETR 領域は多様性が高いのに対し、MPTR 領域では唯一 MPTR-A だけがいくつかの多型を示すことが知られている[34]。11 の MPTR/ETR 領域の中で、ETR の A-E の 5 つの領域が結核菌の遺伝子型別に利用されている。

VNTR 領域の多型を用いた型別法は VNTR 領域の外側を挟むプライマーを用いて PCR で増幅し、増幅された遺伝子断片の長さをアガロース電気泳動で調べる。各領域の反復配列のコピー数の算出は領域毎に報告されている反復配列の長さで測定した遺伝子断片長を比較することにより行う (図 4)。結果はコピー数として表記されるためデータ保存や共有が容易である。迅速で簡便、高い再現性があるにも拘わらず、5 ETR 領域の VNTR の分解能は IS6110-RFLP や スポリゴタイピングと比較すると低い[10, 23, 35, 36]。しかしながら、結核菌 H37Rv 株の全ゲノム配列解析から新たな VNTR 領域が同定され、Supply らにより *mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRUs) と命名された[37]。MIRUs は 46–101 bp の縦列反復配列で結核菌 H₃₇Rv 株ゲノムの 41 領域に散在している (図 1)。各領域の遺伝子配列を解析したところ 12 領域は反復配列数が多様であることから結核菌の臨床分離株の型別に利用されている[38, 39]。この 12 領域のうち 2 つ (MIRU-4 と MIRU-31) は前述の ETR 領域のそれぞれ ETR-D と ETR-E に相当する。MIRU-VNTR 法の最終結果は調べた領域のコピー数を並べた配列になり、これを MIRU-VNTR コードと呼んでいる[40, 41]。このデジタル情報を利用することで世界的にどこの検査室で得られた結果でも共有することができる。さらにインターネットを利用した世界的なデータベースの構築も可能であり、実際に国際的な疫学・遺伝学的な研究が行われている[42] (<http://www.miru-vntrplus.org/>)。国際的な公共データベースとしてスポリゴタイピング法の項で紹介した SITVIT WEB ([http:// www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT ONLINE/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)) [22]においても MIRU の 12 領域を使用した minimum spanning tress (MST)法による結核菌の系統解析に利用されている[43]。

MIRU-VNTR 法は信頼性が高く有用な型別方法であり、分解能は RFLP 法と比較して同等もしくは優れていると考えられる。一般的に MIRU-VNTR 法では検査対象の領域の数を多くすることで分解能が良くなる。12 領域の MIRU-VNTR 型別での分解能は IS6110 が多い結核菌臨

床分離株の *IS6110* RFLP 解析にわずかに劣るが[39, 40, 44, 45]、逆に *IS6110* が少ない結核菌臨床分離株の場合は 12 領域の MIRU-VNTR 型別の方が高いとの報告もある[46, 47]。一般的に、12 領域の MIRU-VNTR 型別法だけでは、疫学的な関連性が過度に評価される可能性があるため、疫学情報が不明な大集団を対象とした研究では、この手法だけで結核菌の一致・不一致の結論を出すことは難しい[48, 49]。

VNTR 法で分解能を上げるためには、利用する VNTR 領域を適切に選択する。2006 年には 24 領域の MIRU-VNTR（うち 12 領域は既に利用されている領域）が提案された[41]。現在では 24 領域のうち 15 領域（うち 6 領域は既に利用されている）を使用すると結核菌の多型の 96%を調べることが可能であり、24 領域の MIRU-VNTR 型別法は *IS6110*-RFLP 法での分解能と同等であるとの報告がある[42, 50, 51]。欧米では 24 領域の MIRU-VNTR 型別法は結核菌の遺伝子型別の標準法として提案されているが、日本では北京型が多く、MIRU-VNTR 15 領域または 24 領域にも使用されている 8 領域に加えて新たに 4 つの領域（3336, 2372, 2074, 3155）を加えた JATA-12 が提唱されている[52]。さらに北京型の結核菌に対しては 3 つの超可変（hypervariable）領域（3232, 3820 と 4120）を加えて実施する（JATA-15）ことによる分解能の上昇が期待できる。

以上のように、ミニサテライト遺伝子を利用した遺伝子型別法は迅速で感度良く多くの結核菌を識別できる手法である。VNTR 法は当初 *IS6110*-RFLP 法に比べて分解能が低かったが適切な VNTR 領域を選ぶことで *IS6110*-RFLP 法と同等の分解能が期待できるまでに改良された。加えて *IS6110*-RFLP 法と比べて結果を数列で整理（デジタル化した表記方法）できることは優れた点である（表 1）。結果のデジタル化により web 上のデータベース等の利用の促進や検査施設内・施設間での結果の共有化の促進が期待できる。この手法の再現性の良さは検査対象の菌の VNTR 領域の遺伝的な安定性に依存しているが、世界横断的に行われた検証実験では検査施設内・施設間の再現性が不確実であり、国際的な領域の統一化、精度保証、等の必要性が指摘されている[53]。

4) ゲノムシーケンス（WGS）法

近年、WGS が結核菌の型別に用いられるようになってきた。基本となる解析手法の 1 つとしては一塩基変異多型（Single nucleotide polymorphisms (SNPs)）がある。タンパク質をコードしている領域に SNPs があつた場合にはアミノ酸置換が発生しうる。この場合表現型に影響し

て選択圧を受ける。例えば薬剤耐性である。薬剤耐性は突然変異と関係している場合が非常に高い（特定の領域で起こる点突然変異や小規模の遺伝子欠落/重複）[54]。薬剤耐性遺伝子内の非同義置換の SNPs を探索することは薬剤耐性の発生の分子機構を研究する上で重要である。一方、同義置換の SNPs はアミノ酸置換を伴わないため表現型は中立である。同義置換の SNPs は進化的にも中立であり、結核菌の菌株間の系統解析や集団遺伝学的な用途に利用されているが[55, 56]、結核菌株の解析では同義置換と非同義置換の SNPs を組み合わせて作成されている系統図も見かける。*katG* 遺伝子の 463 番目や *gyrB* の 95 番目の SNPs を用いて結核菌群を主要な 3 つのグループに分類した (PGG1-PGG3) [57]。これらの 3 つの PGG グループは更に 36 の SNPs により 9 つの大きなクラスター (I-VIII and II.A) に分類される[56]。Dos Vultos らは DNA 複製や組換え、修復に関する 56 遺伝子の SNPs を結核菌の進化の重要な遺伝マーカーとすることを提案している[58]。SNPs は結核菌群の系統解析の最も重要な遺伝マーカーとなるがこれらを活用して系統関係を描くためには数多くの遺伝子セットを必要とする。

近年、特に集団感染の解析での WGS の有用性が多く報告されている[59-62]。WGS に基づいた型別は結核菌群の型別に十分な威力を発揮する。加えて薬剤耐性などの付随情報も得ることができる[61, 63]。WGS 法と MIRU-VNTR 法を比較した結核治療の無作為対照化試験には WGS は再発と再感染を MIRU-VNTR 法に比べてよく分離することができるとの結果であり[64]、WGS 法が VNTR 法の次世代の分子疫学研究の技術となりうることを示した。WGS 法ではデータの標準化の問題と拡張性のあるデータベースの構築が大きな課題となっている。WGS 型別の標準化の向上をめざした多くの研究がおこなわれており、インターネットからアクセス可能な世界的なデータベースの構築が進められている[65]。同時にゲノム情報解析ツールの開発も進んでおり、インターネット上で複数の代表的なツールが利用可能である[66]。

WGS は前述の IS6110-RFLP 法や VNTR 法の短所を克服でき、1 回で迅速に同定が可能であり、薬剤耐性予測や分子疫学的な型別も出来る（表 1）。今後解析費用が安価になれば、通常業務で使用される検査法になると考えられる。WGS で得られる情報はとても多く、現在その情報の一部を利用しているに過ぎない。結核感染の対策や診断、治療などに活用するために有用な遺伝情報を結核菌のゲノム情報から見つけ出す新たな技術の開発が待たれる。

【参考文献】

1. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd *et al*: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998, 393(6685):537-544.
2. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL: IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic acids research* 1990, 18(1):188.
3. Wall S, Ghanekar K, McFadden J, Dale JW: Context-sensitive transposition of IS6110 in mycobacteria. *Microbiology* 1999, 145 (Pt 11):3169-3176.
4. Yesilkaya H, Dale JW, Strachan NJ, Forbes KJ: Natural transposon mutagenesis of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: how many genes does a pathogen need? *Journal of bacteriology* 2005, 187(19):6726-6732.
5. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT: IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Molecular and cellular probes* 1991, 5(1):73-80.
6. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD: 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. *Journal of clinical microbiology* 1991, 29(11):2578-2586.
7. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM *et al*: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology* 1993, 31(2):406-409.
8. de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, Nagelkerke NJ, van Embden JD, van Soolingen D: Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *The Journal of infectious diseases* 1999, 180(4):1238-1244.
9. Yeh RW, Ponce de Leon A, Agasino CB, Hahn JA, Daley CL, Hopewell PC, Small PM: Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *The Journal of infectious diseases* 1998, 177(4):1107-1111.
10. Barlow RE, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH, Dickens A, Qamer S, Hawkey PM: Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of clinical microbiology* 2001,

39(7):2453-2457.

11. Bauer J, Andersen AB, Kremer K, Miorner H: Usefulness of spoligotyping To discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *Journal of clinical microbiology* 1999, 37(8):2602-2606.
12. Yang ZH, Ijaz K, Bates JH, Eisenach KD, Cave MD: Spoligotyping and polymorphic GC-rich repetitive sequence fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains having few copies of IS6110. *Journal of clinical microbiology* 2000, 38(10):3572-3576.
13. Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD: Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and immunity* 1991, 59(8):2695-2705.
14. Skuce RA, Neill SD: Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: exploiting molecular data. *Tuberculosis (Edinb)* 2001, 81(1-2):169-175.
15. Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD: Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular microbiology* 1993, 10(5):1057-1065.
16. van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, van Der Zeijst BA, Schouls LM: Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Journal of bacteriology* 2000, 182(9):2393-2401.
17. Van Soolingen D: Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of internal medicine* 2001, 249(1):1-26.
18. Kulkarni S, Sola C, Filliol I, Rastogi N, Kadival G: Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mumbai, India. *Research in microbiology* 2005, 156(4):588-596.
19. Driscoll JR, McGarry MA, Taber HW: DNA typing of a nonviable culture of *Mycobacterium tuberculosis* in a homeless shelter outbreak. *Journal of clinical microbiology* 1999, 37(1):274-275.
20. van der Zanden AG, Hoentjen AH, Heilmann FG, Weltevreden EF, Schouls LM, van Embden JD: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *Molecular pathology : MP* 1998, 51(4):209-214.
21. Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S: Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by

- analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* 1999, 37(2):409-412.
22. Demay C, Liens B, Burguiere T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, Rastogi N: SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2012, 12(4):755-766.
 23. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA *et al*: Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of clinical microbiology* 1999, 37(8):2607-2618.
 24. Diaz R, Kremer K, de Haas PE, Gomez RI, Marrero A, Valdivia JA, van Embden JD, van Soolingen D: Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 1998, 2(9):743-750.
 25. Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, Varnerot A, Zarifi AZ, Tabatabaee J, Douraghei M, Ghazisaeedi K, Mansorri D, Bahadori M *et al*: Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods. *The Journal of infection* 2004, 49(2):94-101.
 26. Goguet de la Salmoniere YO, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden J, Gicquel B: Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 1997, 35(9):2210-2214.
 27. Gori A, Bandera A, Marchetti G, Degli Esposti A, Catozzi L, Nardi GP, Gazzola L, Ferrario G, van Embden JD, van Soolingen D *et al*: Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging infectious diseases* 2005, 11(8):1242-1248.
 28. Gori A, Esposti AD, Bandera A, Mezzetti M, Sola C, Marchetti G, Ferrario G, Salerno F, Goyal M, Diaz R *et al*: Comparison between spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphisms in molecular genotyping analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Molecular and cellular probes* 2005, 19(4):236-244.
 29. Brudey K, Gutierrez MC, Vincent V, Parsons LM, Salfinger M, Rastogi N, Sola C: *Mycobacterium africanum* genotyping using novel spacer oligonucleotides in the direct repeat locus. *Journal of clinical microbiology* 2004, 42(11):5053-5057.

30. Zhang J, Abadia E, Refregier G, Tafaj S, Boschirola ML, Guillard B, Andremont A, Ruimy R, Sola C: *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *Journal of medical microbiology* 2010, 59(Pt 3):285-294.
31. Cronin WA, Golub JE, Magder LS, Baruch NG, Lathan MJ, Mukasa LN, Hooper N, Razeq JH, Mulcahy D, Benjamin WH *et al*: Epidemiologic usefulness of spoligotyping for secondary typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. *Journal of clinical microbiology* 2001, 39(10):3709-3711.
32. Hermans PW, van Soolingen D, van Embden JD: Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *Journal of bacteriology* 1992, 174(12):4157-4165.
33. Picardeau M, Prod'Homme G, Raskine L, LePennec MP, Vincent V: Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *Journal of clinical microbiology* 1997, 35(1):25-32.
34. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998, 144 (Pt 5):1189-1196.
35. Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N: Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *Journal of clinical microbiology* 2000, 38(7):2520-2524.
36. Roring S, Scott A, Brittain D, Walker I, Hewinson G, Neill S, Skuce R: Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *Journal of clinical microbiology* 2002, 40(6):2126-2133.
37. Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C: Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular microbiology* 1997, 26(5):991-1003.
38. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology* 2000, 36(3):762-771.
39. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P: High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global

- analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98(4):1901-1906.
40. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C: Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of clinical microbiology* 2001, 39(10):3563-3571.
 41. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S *et al*: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 2006, 44(12):4498-4510.
 42. Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S: Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of clinical microbiology* 2008, 46(8):2692-2699.
 43. Hill V, Zozio T, Sadikalay S, Viegas S, Streit E, Kallenius G, Rastogi N: MLVA based classification of *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages for a robust phylogeographic snapshot of its worldwide molecular diversity. *PloS one* 2012, 7(9):e41991.
 44. Blackwood KS, Wolfe JN, Kabani AM: Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? *Journal of clinical microbiology* 2004, 42(11):5001-5006.
 45. Hawkey PM, Smith EG, Evans JT, Monk P, Bryan G, Mohamed HH, Bardhan M, Pugh RN: Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* 2003, 41(8):3514-3520.
 46. Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT: Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of clinical microbiology* 2002, 40(5):1592-1602.
 47. Lee AS, Tang LL, Lim IH, Bellamy R, Wong SY: Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution minisatellite-based typing. *Journal of clinical microbiology* 2002, 40(2):657-659.
 48. Cowan LS, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oemig TV, Crawford JT: Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of

- Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *Journal of clinical microbiology* 2005, 43(2):688-695.
49. Scott AN, Menzies D, Tannenbaum TN, Thibert L, Kozak R, Joseph L, Schwartzman K, Behr MA: Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* 2005, 43(1):89-94.
 50. Alonso-Rodriguez N, Martinez-Lirola M, Herranz M, Sanchez-Benitez M, Barroso P, Bouza E, Garcia de Viedma D: Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC microbiology* 2008, 8:34.
 51. Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Haas W, Rusch-Gerdes S, Loch C, Niemann S, Supply P: Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* 2007, 45(3):691-697.
 52. Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S, Maeda S: Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of medical microbiology* 2008, 57(Pt 7):873-880.
 53. de Beer JL, Kremer K, Kodmon C, Supply P, van Soolingen D: First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Journal of clinical microbiology* 2012, 50(3):662-669.
 54. Ramaswamy S, Musser JM: Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 1998, 79(1):3-29.
 55. Baker L, Brown T, Maiden MC, Drobniewski F: Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging infectious diseases* 2004, 10(9):1568-1577.
 56. Gutacker MM, Mathema B, Soini H, Shashkina E, Kreiswirth BN, Graviss EA, Musser JM: Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *The Journal of infectious diseases* 2006, 193(1):121-128.
 57. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM: Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94(18):9869-9874.
58. Dos Vultos T, Blazquez J, Rauzier J, Matic I, Gicquel B: Identification of Nudix hydrolase family members with an antimutator role in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology* 2006, 188(8):3159-3161.
 59. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R *et al*: Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *The New England journal of medicine* 2011, 364(8):730-739.
 60. Niemann S, Koser CU, Gagneux S, Plinke C, Homolka S, Bignell H, Carter RJ, Cheetham RK, Cox A, Gormley NA *et al*: Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints. *PloS one* 2009, 4(10):e7407.
 61. Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A: Generations of sequencing technologies. *Genomics* 2009, 93(2):105-111.
 62. Kato-Maeda M, Ho C, Passarelli B, Banaei N, Grinsdale J, Flores L, Anderson J, Murray M, Rose G, Kawamura LM *et al*: Use of whole genome sequencing to determine the microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* during an outbreak. *PloS one* 2013, 8(3):e58235.
 63. Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Ruckert C, Nubel U, Blom J, Wirth T, Jaenicke S, Schuback S, Rusch-Gerdes S *et al*: Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS medicine* 2013, 10(2):e1001387.
 64. Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, Kremer K, van Hijum SA, Siezen RJ, Borgdorff M *et al*: Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC infectious diseases* 2013, 13:110.
 65. Kohl TA, Diel R, Harmsen D, Rothganger J, Walter KM, Merker M, Weniger T, Niemann S: Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: a standardized, portable, and expandable approach. *Journal of clinical microbiology* 2014, 52(7):2479-2486.
 66. Satta G, Atzeni A, McHugh TD: *Mycobacterium tuberculosis* and whole genome sequencing: a practical guide and online tools available for the clinical microbiologist. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2017, 23(2):69-72.
 67. Ocheretina O, Merveille YM, Mabou MM, Escuyer VE, Dunbar SA, Johnson WD, Pape JW, Fitzgerald DW: Use of Luminex MagPlex magnetic microspheres for

high-throughput spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Port-au-Prince, Haiti. *Journal of clinical microbiology* 2013, 51(7):2232-2237.

68. Honisch C, Mosko M, Arnold C, Gharbia SE, Diel R, Niemann S: Replacing reverse line blot hybridization spoligotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of clinical microbiology* 2010, 48(5):1520-1526.

c. 結核菌病原体サーベイランス情報の管理（内村和広）

結核菌病原体サーベイランスのプラットフォームとして感染症サーベイランスシステム（NESID）を想定した場合、収集された情報の管理はNESIDの仕様に準ずることとなる。すなわち、データはNESID上のデータベースに一元管理され、保存されるデータは全て暗号化処理が行なわれる。また、NESIDへの接続は基本的に政府共通ネットワークや地方公共団体総合行政ネットワーク(LGWAN)といった専用ネットワーク経路となり、一般のインターネットからは隔絶されている。さらにデータベースサーバとネットワークの間にはファイアウォールが設置され通信が監視されている他に悪意ある侵入を検知および防御するシステムも導入されている。

情報管理上の問題は、結核菌病原体サーベイランスシステムのユーザ管理にも存在する。NESIDユーザはアカウントとパスワードにより認証を行なうがこの管理を厳密に行なう必要がある。パスワードはシステムより定期的な変更が要求されるが、パスワード自体をメモ等に残し多数の目に触れることのないよう管理を徹底しなければならない。

d. 結核菌病原体サーベイランス情報の利用

i. 薬剤感受性情報

抗結核薬剤感受性情報に関する結核菌病原体サーベイランスは、ある地域内で分離培養される結核菌に関する抗結核薬剤感受性試験結果情報を収集・解析することにより、その地域における薬剤耐性結核菌の発生状況の情報を継続して提供するものである。全国における薬剤耐性結核菌の発生状況に関する情報を収集・解析する体制が構築された場合、現在数年ごとに実施している全国抗結核薬剤耐性菌状況調査を実施する必要がなくなるとともに、地域（または全国）における抗結核薬剤耐性菌発生状況に応じて、地域における結核患者管理の適正性、地域における新たな薬剤耐性結核菌の流行の有無、地域における薬剤耐性結核発生予防のための方策を検討すること等に用いることが可能となる。

ii. 分子疫学情報

結核分子疫学情報に関する結核菌病原体サーベイランスは、ある地域内で分離培養される結核菌の遺伝子型情報を収集・解析することにより、その地域における結核菌の伝播状況の情報を継続して提供するものである。上記抗結核薬剤感受性情報に関する結核菌病原体サーベイランスと同様

に、全国規模の結核分子疫学情報を収集・解析する体制が構築された場合、地域を越えた全国規模の結核菌伝播状況を把握することが可能となり、ある特定の遺伝子型結核菌の広がり状況や、特定の場所における結核菌の伝播状況について把握した上で、結核菌の感染拡大防止の方策を検討することが可能となる。

5. 結核菌病原体サーベイランスのシステム（加藤誠也）

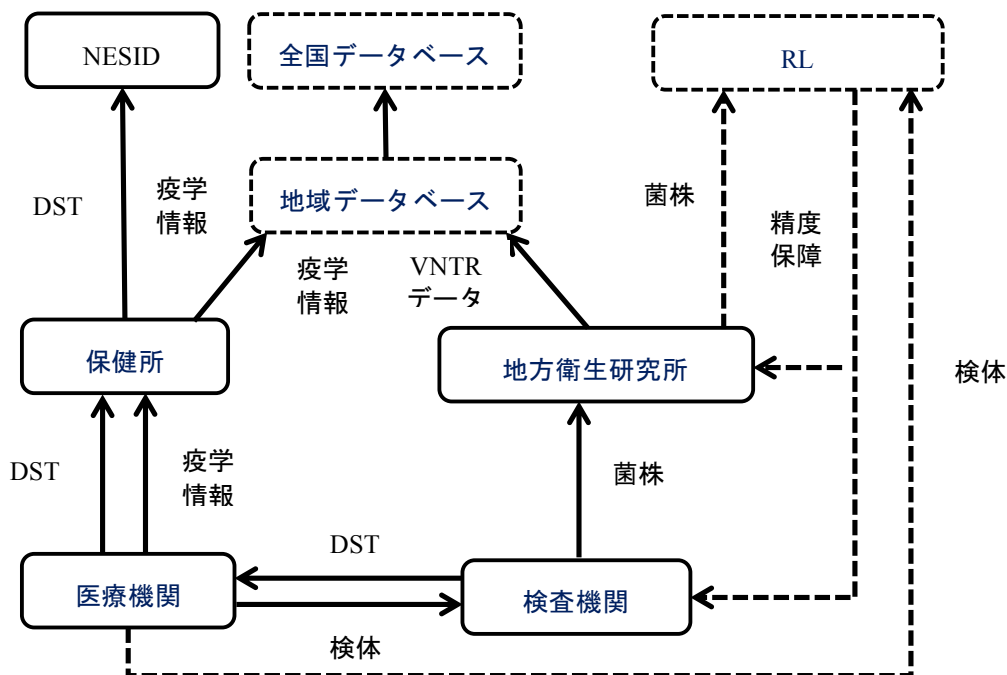
今後、我が国では「結核に関する特定感染症予防指針」に基づいて、薬剤感受性検査及び分子疫学的手法による結核菌病原体サーベイランス構築が求められている。システムの構築にあたって、臨床現場で得られた検体あるいはデータをどのポイントで公的なシステムに取り込むかが問題となる。我が国の保健医療体制を考慮した現実的な結核菌病原体サーベイランスとして、以下のようなモデルが考えられる。

a. 結核菌病原体サーベイランスモデルの構造（図4）

薬剤感受性については医療機関において患者に対する医療の一部として、検体を採取し、医療機関内の検査室または外注先の衛生検査所（いわゆる、検査センター）で検査が行われ、治療方法の選択のために使われている。保健所は感染症第15条（積極的疫学調査）に基づいて、医療機関から薬剤感受性検査の結果を入手し、患者の登録票（いわゆるビジブル）に記録するとともに、国のデータベースシステムであるNESIDに入力する。

一方、分子疫学に関しては、医療機関内の検査室または衛生検査所で患者に対する医療の一部として実施される培養検査の結果得られる菌株を感染症法第15条に基づく行政検査として実施する。菌株は地方衛生研究所、または保健所から検査を依頼された機関に搬送してそこでVNTR検査が実施される。VNTRデータは保健所が収集する疫学データと統合し、地域における構築されたデータベースに整理・保存されて、地域における感染状況の分析等に活用する。さらに都道府県域を越えた分析に用いるために、各地の地域データベースの情報を統合した全国データベースの構築が必要となる。

また、病原体サーベイランスの構築の際に重要な事項は精度保証であり、国レベルでリファレンス検査室が必要になる。薬剤感受性検査に関しては、日本結核病学会抗酸菌検査委員会が主体になり、医療機関あるいは検査センターに対して結核研究所がパネルテストを実施してきた経緯がある^{*)}。



NESID: National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease (感染症サーベイランスシステム)

DST: drug sensitivity test (薬剤感受性検査), DB: database (データベース)

RL: reference laboratory (リファレンス検査室)

図4 結核菌病原体サーベイランスモデルの構造

b. 結核菌病原体サーベイランスモデルと構築に関する課題

上記のモデルは、我が国における検体の入手・それぞれの検査の実施体制等を考慮した場合に、実現可能性が高いシステムと思われる。しかし運用するにあたって、様々な課題がある。

薬剤感受性検査は培養陽性の結果によってオーダーされるが、培養陽性が判明した時点で患者が既に転院しているような場合には、医療機関は診療報酬の請求ができないため、費用負担が問題となる。また、医療機関が持っている薬剤感受性検査の結果の保健所への提供方法が必ずしもスムーズでない場合がある。保健所においては NESID(国のサーベイランスシステム)への入力が適切に行われていない場合がある。2015年のデータでは培養陽性患者中の薬剤感受性検査結果がシステムに入力されているのは76%に過ぎない。

さらに大きな問題は検査の精度保証の確保である。日本結核病学会抗酸菌検査委員会が実施したパネルテストの結果は検査センターの方が医療機関の検査室より良好な傾向であった。これは、結核患者が減少して、個々の医療機関では検

査機会が少なくなると精度の維持が難しくなることを示唆していると考えられることから、検査施設を集約化する必要がある。

分子疫学調査については2011年に予防指針に記載されて以来、実施する自治体が多くなっているが、地域の網羅的实施から耐性のある菌株や集団感染が疑われる場合のみの限定的な実施、さらには必要な時のみ外部に依頼して実施まで格差が大きい。地方衛生研究所の人員・人材確保は十分でない自治体が多く、結核菌のVNTR検査を実施する財源の確保が難しい地域が多い。検査結果として得られる結核菌の遺伝子型の情報は保健所が実施する実地疫学情報と合わせて解析しなければ有用な活用はできない。このために、VNTRのデータは保健所にわかりやすい形で保健所に提供される必要がある。当然のことながら、検体及び患者等の疫学情報は医療機関の協力がなくして活用することはできない。従って、分子疫学サーベイランスの構築には地方衛生研究所・保健所・医療機関の連携体制の構築が極めて重要になる。医療機関は一方的に検体と疫学情報を提供することにならないように、情報還元が重要である。

検体の収集の際の患者同意については、法に基づく行政検査として実施される場合には基本的には不要であるが、医療機関の理解が必須である。また、患者に対して同意は必要ではないが、法に基づいた検体の収集と検査であることを説明して理解を求めることが望ましい。

選択的に実施の場合、医療機関や検査センターでの菌株保存期間は短い場合もあり、検査が必要と判明した時点で、既に菌株が廃棄されていることがある。これを防ぐには、可能な限り検体を収集しておく必要がある。

【参考文献】

- 1) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 抗酸菌検査施設を対象とした薬剤感受性検査外部精度評価第8回(2010年度)結果. 結核 2012; 87: 87-91

6. まとめ（加藤誠也）

日本の今後の結核対策の進展に重要な役割を持つ病原体サーベイランスの構築は始まったばかりである。これまで、結核療法研究協議会が5年に1回実施してきた全国調査は患者が減少する中で、薬剤耐性も低いレベルで推移しているため、全国的な代表性を維持しながら必要検体数を確保することが困難になっており、なるべく早いサーベイランス体制の構築が望まれる。また、サーベイランスのために限ったことではないが、精度保証も重要な課題になっている。

分子疫学調査については、既に接触者健診等において有用性は明らかになっているが、外国出生患者の影響や低まん延状況における感染リスクの把握等のためにますます重要になる。分子疫学は菌情報と患者の疫学情報と合わせて解析することによって大きな成果になることから、サーベイランス体制の構築にあたっては、菌の遺伝子型検査を行う地方衛生研究所、疫学調査を担当する保健所と検体や疫学情報を提供する医療機関の連携体制を構築することが重要である。