

Sub-speciation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from tuberculosis patients in Japan.

日本における結核菌群抗酸菌の分離頻度

背景

結核症は *Mycobacterium tuberculosis* (sensu stricto) を中心に、*M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii* を含む結核菌群による疾患である。中でも *M. bovis* は広い宿主を持った人獣共通病原体であり、世界の結核症の原因菌として、約 5-10% を *M. bovis* が担っていると推定される。日本においては、牛乳を煮沸あるいは低温殺菌していることや、牛乳の摂取自体がおよそ 120 年前からと比較的最近であることなどが、国内におけるヒトでの *M. bovis* 感染報告例がない原因と考えられる。*M. tuberculosis* 以外の特定の結核菌群の菌種が、どの程度結核症の発生率や有病率に寄与しているかは限られたデータしかない。結核菌群抗酸菌の詳細同定は、正確な抗酸菌症の診断や公衆衛生上の観察と適切な管理のために重要である。そこで我々は、日本全国の臨床的に活動性の結核症患者から分離した 970 株の結核菌群について、Multiplex PCR 法 (Mx-PCR) 法を用いて結核菌群抗酸菌の分離頻度を調査し、*M. bovis* による結核症が国内に存在するかどうか調査した。

方法

2002 年度の結核療法研究協議会 (結核に関する共同研究を行う医療機関連携組織) 耐性結核菌全国調査において、全国の結核患者から集められた 970 菌株を対象とした。小川培地上に発育した結核菌群からの DNA の抽出には、ISOPLANT extraction kit (Nippon Gene, Japan) を使用した。cfp32 (786 bp), RD9 (600 bp) および RD12 (400 bp) を検出する Mx-PCR 法には Type-it Microsatellite PCR Kit (QIAGEN, Japan) を使用し、増幅産物は、キャピラリー電気泳動 (QIAxcel system, QIAGEN, Japan) を用いて確認した。*M. tuberculosis* 以外の結核菌群抗酸菌が同定された場合、さらに RD4, RD7 及び MiD3 の検出の有無を確認し、それでも菌種の同定ができない株に関しては *hsp65* のシーケンスを行い、*M. africanum* が疑われた場合はさらに -215 *narG* の SNP 解析を行った。

結果

970 株の由来は、北海道/東北 89 株、関東 292 株、中部/北陸 121 株、近畿 404 株、四国/九州 64 株であった。Mx-PCR 法では 966 株 (99.6%) が *M. tuberculosis* であり、*M. bovis* は認めなかった。2 株が *M. canettii* と同定されたため *hsp65* による同定を施行し、*M. tuberculosis* と判定された。他の 2 株は Mx-PCR 法にて *M. africanum* subtype I 及び II と考えられた。-215 *narG* の SNP 解析の結果、*M. tuberculosis* に特異的な SNP を検出した。対象株は全て *M. tuberculosis* であった。

考察

2011 年の結核死亡は全世界で 140 万とされており、AIDS に続く克服すべき感染症の一つである。新たな分子生物学的手法により結核菌群検出は有意に進歩したが、結核菌群抗酸菌の詳細な菌種同定まで日常的に行うことはない。本研究は、結核菌群抗酸菌の詳細な分離頻度に関する初の全国的な研究である。Mx-PCR 法では *M. tuberculosis* 966 株、*M. canettii* 2 株、*M. africanum* 2 株と判定したが、シーケンス解析により最終的には全ての株を *M. tuberculosis sensu stricto* と同定した。

当初 RD 遺伝子の検出を Mx-PCR 法で行ったが、4 株で RD 領域の異常が疑われた。RD 領域での認識法は近年拡大傾向があるが、プライマー結合部位においてバリエーションがある可能性が報告されている。本研究においても、プライマー部位での変異が RD 偽陰性の結果となり、*M. canettii* や *M. africanum* の誤同定に至った可能性がある。PCR 法に基づく RD 分析は低コストで簡

便であり、日常臨床において多用される傾向にあるが、本研究で明らかのように、偽陽性・偽陰性といった誤解釈が起こりうる点に注意しなければならない。

本研究では結核患者から結核菌以外の分離は認められず、日本国内では *M. bovis* 感染は皆無に等しいと考えられた。*M. bovis* および *M. bovis* BCG はピラジナミドに自然耐性を有するため薬剤選択に注意が必要であるが、現状では *M. bovis* の分離によるピラジナミド耐性を憂慮する必要はないと考えられた。結核菌群の分離同定は、人畜共通感染症としての結核を考慮すれば、むしろ疫学的な観点から重要と考える。