

結核疫学調査における結核菌 DNA の RFLP データベースの活用 (3)

大島律子・狩屋英明・中嶋 洋 (細菌科)

【調査研究】

結核疫学調査における結核菌 DNA の RFLP データベースの活用 (3)

RFLP Database of *Mycobacterium tuberculosis* Applied for Epidemiological Investigation

大島律子・狩屋英明・中嶋 洋 (細菌科)

Ritsuko Ohata, Hideaki Kariya and Hiroshi Nakajima

要 旨

岡山県では、結核の感染源・感染経路を究明し、二次感染の予防に役立てるため、平成11年度から県内の結核新登録患者から分離された結核菌のDNAをRestriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析している。解析結果は菌株情報と併せてデータベースとし、結核蔓延状況の把握や結核感染事例の感染源究明に活用している。平成18年度は、院内感染が疑われた事例などの感染源究明にデータベースを活用した。

[キーワード：結核菌，RFLP解析，データベース，感染源]

[Key words : *M.tuberculosis*, RFLP analysis, database, source of infection]

1 はじめに

岡山県では、結核対策特別促進事業として、感染源・感染経路の究明や二次感染予防を目的に、平成11～15年度の間、新登録患者から分離された結核菌株全株を対象にDNAのRFLP解析を行い、菌株情報と融合させたデータベースを構築した。その結果、結核蔓延状況や優勢な株グループの存在が判明し^{1～4)}、また、結核感染事例の感染源究明にも、データベースの活用が有効であった⁵⁾。

調査の効率化のため、平成16年度以降、対象を感染源となる可能性の高い患者分離株等に絞って解析することになり、平成18年度は、条件を満たした53株を解析してデータベースに加えるとともに、データベースを活用して事例の感染源究明を行ったので概要を報告する。

2 材料および方法

(1)平成18年度のRFLP解析対象株

平成18年度に岡山県下の医療機関または検査機関において分離され、搬入された結核菌70株のうち、以下の条件に該当した53株を解析した。

- ①60歳以下の塗抹陽性患者（結核予防法第29条適用者）の菌株
- ②保健所から依頼のあった菌株
- ・社会福祉施設等（集団生活等）で発生した患者（利

用者、職員）の菌株

- ・接客業・看護師・保健師・保育士・教員・医師等の菌株
- ・その他保健所長が必要と判断した患者の菌株

(2)安全対策

結核菌のDNA抽出は、バイオセーフティーレベル3の施設内でN95微粒子用マスクを装着し、クラスIIの安全キャビネットを使用して行った。

(3)菌株からのDNA抽出とRFLP解析

DNA抽出は、小川培地上の菌体からDNA抽出キットISOPLANT（ニッポンジーン）を用いて行った。RFLP解析は、定法^{6)・7)}に従った。RFLPパターンのクラスター解析は、解析ソフトFingerprinting II（Bio Rad）を用い、UPGMA法で行った。RFLP解析結果は、保健所からの菌株情報と併せてデータベースに記載した。データベースには、今回解析した53株を含め、平成18年度末現在、965株が登録された。

(4)事例の感染源究明

2事例について、患者分離株のRFLPパターンを事例内の患者分離株間およびRFLPデータベースに登録された株のパターンと比較した（表1）。

(5)データベースとの比較

53株のRFLPパターンをRFLPデータベースに登録し、データベース中の株との比較を実施した。

3 結果

(1)53株の解析結果

53株のうち、60%以上が県南部に居住する患者由来株であり、患者年齢別では、36株（68%）が60歳以下であった。60歳より高齢の患者分離株は、老人ホーム入居中など接触者が多く解析の必要性ありと判断された株であった。

RFLPパターンのクラスター解析の結果、平成12～15年度に見られた類似性の高い流行株グループⅠ～Ⅲに属する株は64.2%であった（図1）。

外国人由来株は2株（3.8%）であった。

(2)事例の検討結果（表1）

事例1は、患者Bが高齢であったため、疫学調査だけではAからの感染による発病か内因性再燃かの判断が難しかったが、両者からのRFLPパターンが一致したので、AからBへの家族内感染と考えられた。また、Bには結核既往歴はなかったが、年齢から推測した過去の感染率は約65%であり⁸⁾、通常起こりにくいとされている「高齢者の外来性再感染」⁹⁾で発病した可能性も高かった。

事例2は、3名のRFLPパターンが異なったため、それぞれ別の感染源と判明した。患者Cは高齢であり、正確な発病時期が不明なことから内因性再燃の可能性も高いが、患者DおよびEは最近の感染と考えられた。患者Dからの分離株については、データベース中にRFLPパターンが一致した株が1株あったが、その患者は患者Dが勤務するX病院とは離れた地域の病院の患者で、しかも、発病は3年以上前であったため、両患者が接触した可能性は極めて低いと思われた。患者Eについてはデータベース中に該当する患者株は見あらず、感染源は明

らかにできなかった。

(3)データベースとの比較

53株のうち、14株は、965株のデータベース中の株とRFLPパターンが一致した（図1）。うち、10株は流行株のパターンであることや患者の年齢、居住地、発病時期などを考慮して偶然の一致と考えられた。残りの4株では、パターンの特徴や年齢、居住地などから関連性が疑われる一致グループもあったが、保健所が行った疫学調査の結果、関連性は認められなかった。

4 考察

53株の解析結果から、依然として流行株グループⅠ～Ⅲに属する株が最近の結核感染の主要な感染源となっていることが示唆された。また、53株中、感染源が明らかになったのは事例1の患者Bのみで、42株（79.2%）はデータベース中のいずれの株ともパターンが一致しなかった。過去の調査でも、75～80%の株でRFLPパターンが一致しておらず、極めて多様な感染源の存在が示唆されている^{1,2)}。今回、調査した患者の68%が60歳以下で最近の感染と思われることから、多数の潜在的な排菌患者の存在が推測され、結核対策上重要な問題と考えられた。

一方、RFLPデータベースの活用に関しては、パターン一致株について保健所等へ情報還元したが、関連性の認定に到らなかったため、疫学調査内容の見直しや情報交換のあり方などが今後の課題と思われた。

今後は、これらの課題を検討し、感染源究明に役立てたいと考えている。

表1 事例の概要

| 事例 | No. | 所管保健所 | 患者 | 年齢 | 発病 | 初診 | RFLP | 事例概要 |
|----|------|------------|----|----|-----------|-------------|------|--|
| 1 | 1100 | T | A | 75 | 2006/3/18 | 2006/3/20 | 一致 | 患者AとBは夫婦であり、Aの発病約2ヶ月後にBが発病した。Aが塗抹陰性であったことと、Bが高齢であったことから、Bの発病は内因性再燃も疑われたが、両者からのRFLPパターンが一致したので、AからBへの感染と考えられた。 |
| | 1104 | T | B | 78 | 2006/5/29 | 2006/5/2930 | | |
| 2 | 1105 | T | C | 93 | 不詳 | 2006/1/25 | 相違 | 患者CがX病院で結核と診断された約5ヶ月後に、隣県在住で同病院の勤務医師であった患者Dが結核を発病した。一方、患者Dの接触者検診により患者Eの結核発病が発見された。このため、患者CからDへの感染、およびDからEへの感染が疑われた。RFLP解析の結果、3名からのパターンが異なったため、それぞれ感染源が異なることが判った。 |
| | 1108 | T (勤務先) | D | 54 | 2006/7/14 | 2006/7/14 | | |
| | 1113 | T | E | 20 | 2006/11/6 | 2006/11/6 | | |

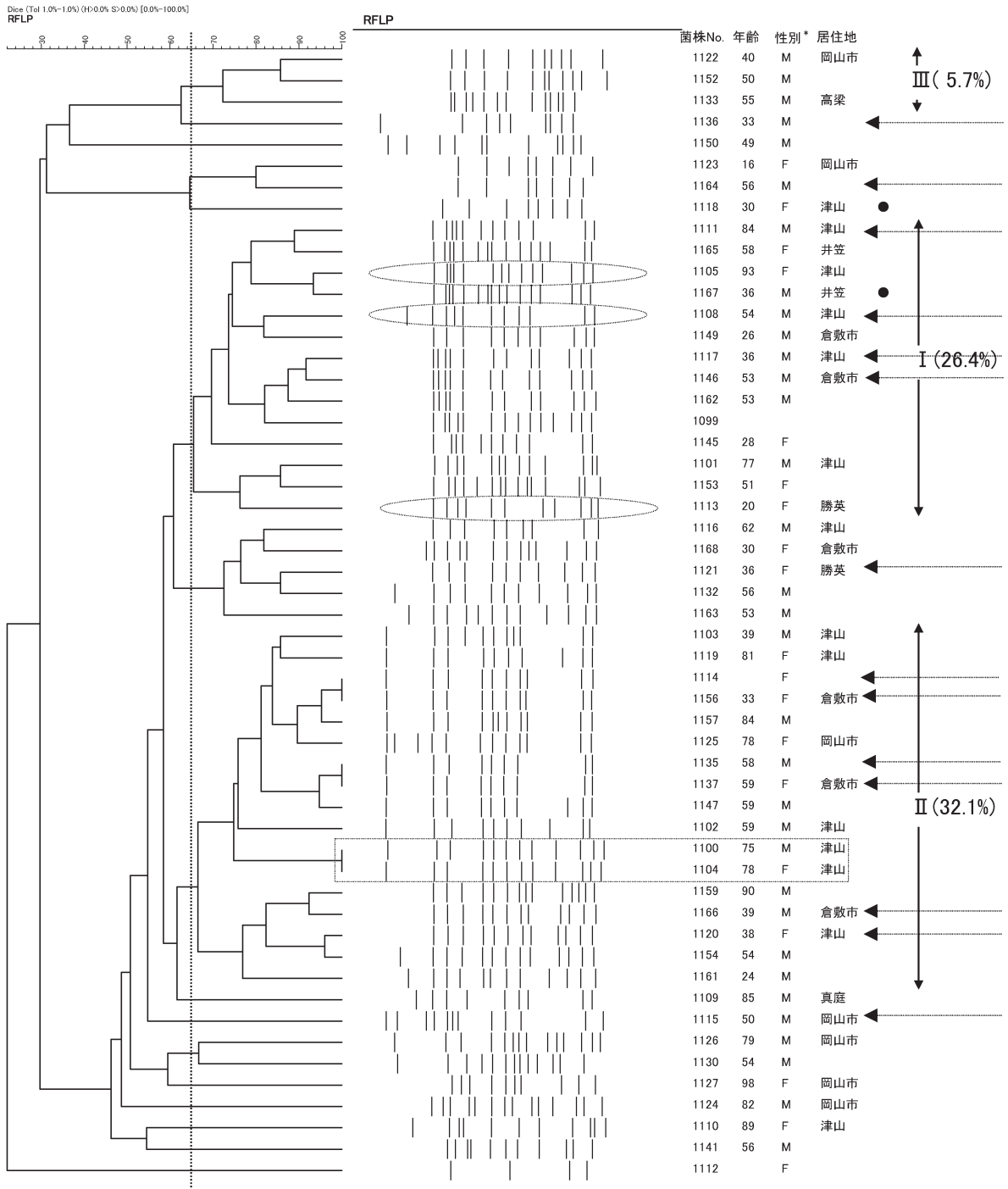


図1 H18年度に解析した結核菌53株のRFLPパターン

- 事例1 家族内感染
- 事例2 病院内感染が疑われた患者のパターン
- ← データベース中の他株と一致が見られた株
- 外国人
- * M 男性, F 女性

文 献

- 1) 大島律子, 多田敦彦: 岡山県内で分離された結核菌 DNA の IS6110-RFLP パターン分析, 結核, 77, 629-637, 2002
- 2) 大島律子, 中嶋洋, 狩屋英明, 日笠美美子: 岡山県における結核の分子疫学的解析 (2), 岡山県環境保健センター年報, 26, 48-52, 2002
- 3) 大島律子, 中嶋洋, 狩屋英明, 日笠美美子: 岡山県における結核の分子疫学的解析 (3), 岡山県環境保健センター年報, 27, 63-68, 2003
- 4) 大島律子, 狩屋英明, 中嶋洋: 岡山県における結核の分子疫学的解析 (4), 岡山県環境保健センター年報, 28, 69-72, 2004
- 5) 大島律子 中嶋 洋: 結核対策における地域ベースの結核菌 RFLP 解析の意義, 日本公衆衛生雑誌, 52, 736-745, 2005
- 6) 高橋光良, 阿部千代治: IS6110 をプローブとした RFLP 分析による結核菌の亜分類, 日本細菌学雑誌, 49, 863-857, 1994
- 7) 高橋光良: 結核菌挿入断片 IS6110 をプローブとした結核の分子疫学, 資料と展望, No.17, 43-57, 1996
- 8) 森享: 保健所における結核対策強化の手続きとその解説. 財団法人結核予防会, 東京, 2000, 3-4.
- 9) 佐藤敦夫: 高齢者結核. 「結核」, 第 3 版, 泉孝英, 網谷良一編, 医学書院, 東京, 1999, 263-269.