

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（4）

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 (Department of Bacteriology)

【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（4）

RFLP database of *Mycobacterium tuberculosis* applied for epidemiological investigation

大畠律子, 狩屋英明, 中嶋 洋 (細菌科)

Ritsuko Ohata, Hideaki Kariya and Hiroshi Nakajima (Department of Bacteriology)

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など結核対策に役立てることを目的に、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、菌株情報と併せてデータベース化している。平成19年度は、多剤耐性結核菌の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、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染予防を目的に、結核菌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、感染事例の疫学調査に活用している。平成11～15年度は、新登録患者から分離された結核菌株全株を対象に解析し、県内の結核蔓延状況や優勢株グループの存在を明らかにした¹⁾。平成16年度以降は、調査の効率化のため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しており、平成19年度は条件を満たした32株を解析してデータベースに加えるとともに、多剤耐性結核菌の院内感染が疑われた事例について感染源究明を試みたのでその概要を報告する。

2 材料および方法

(1) 平成19年度のRFLP解析対象株

県内の医療機関または検査機関において分離された結核菌のうち、以下の条件に該当した35株が搬入され、重複や死滅菌を除いた32株を解析した。

- i) 60歳以下の塗抹陽性患者（結核予防法第29条適用者）の菌株
 - ii) 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

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（平成10年法律第114号）（以下「感染症法」と略す）の改正に伴い、平成19年6月1日以降は、感染症法第56条の25、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（平成10年厚生省令第99号）（以下「感染症法施行規則」と略す）第31条の36及び特定病原体等の運搬に係る容器等に関する基準（平成19年厚生労働省告示第209号）に従って菌株が運搬された。また、三種病原体である多剤耐性結核菌が1株搬入されたが、感染症法第56条の27及び届出対象病原体等の運搬の届出等に関する規則（平成19年国家公安委員会規則第5号）に基づいて運搬された。

搬入された菌株の管理は、感染症法第56条の24、25および感染症法施行規則第31条の29、30に適合した施設で管理した。

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

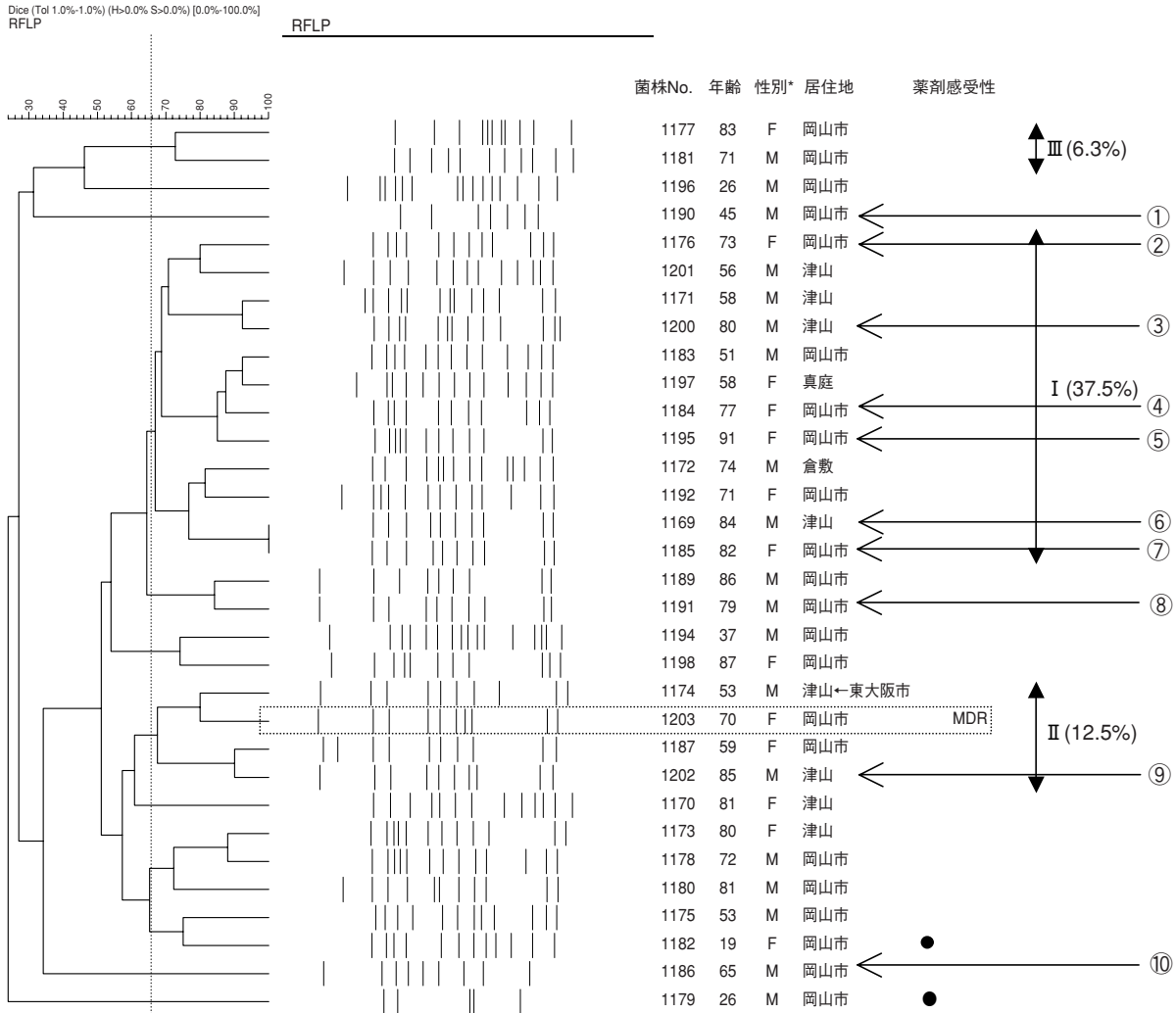


図1 H19年度に解析した結核菌32株のRFLPパターン

- ▭ 多剤耐性結核の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

トISOPLANT（ニッポンジーン）を用いて行った。RFLP解析は、定法^{2),3)}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32株を含め、平成19年度末現在、997株が登録された。

(4) 事例の感染源究明

A病院の70才の患者aが多剤耐性結核を発病し、院内感染が疑われたため、患者分離株のRFLPパターンをRFLPデータベースに登録されたA病院の患者分離株495のパターンと比較した。

(5) データベースとの比較

32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) 32株の解析結果

32株のうち、22株(68.8%)が県南部に居住する患者由来株であり、患者年齢別では、20株(62.5%)が60歳より高齢の患者分離株であり、調査対象条件i)に該当しなかったが、保健所の疫学調査により、接触者が多い等の理由で解析の必要性ありと判断された株であった。また、外国人由来株は2株(6.2%)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20株(62.5%)であった(図1)。

(2) 事例の検討結果

患者a分離株のRFLPパターンは、データベース中のA病院の患者分離株495のいずれとも一致しなかった。さらに、データベース中のA病院の患者以外の患者分離株のパターンとも一致しなかったため、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

32株のうち、10株は997株のデータベース中の株とRFLPパターンが一致した(図1 ①～⑩)。これらの中で、⑥-⑦は調査の結果、親族間の感染と考えられた。③は、2006年6月に発病した同じ町内の77才男性患者分離株と一致したが、その患者は他の疾患で長年入院しており、患者間の接点は不明であった。②、④、⑤および⑨はそれぞれデータベース中の2、2、12および5名の患者分離株と一致したが、患者間の関連性は判明しなかった。①は、流行株グループのパターンではないが、主に県南部に居住する9名の患者分離株と一致した。①と併せて10名の患者中6名が40～50歳の男性であり、何らかの関連が疑われたが、10名の患者の発病が2001年から2007年の長期間に分散しており、患者間の接点は判明しなかった。⑧と⑨については、保健所が行った疫学調査の結果、一致株との間に関連性は認められなかった。

4 考察

32株の解析結果から、依然として流行株グループⅠ～Ⅲに属する株が過半数を占めていた。これは、結核は感染から発病までの期間が数ヶ月から数十年に及び、その結果、流行株の変遷も緩慢に進んでいるためと推測された。

多剤耐性結核の院内感染が疑われた事例では、感染源の究明に至らなかった。平成17年度の事例検討では、データベースを活用して医療従事者の職場内多剤耐性結核感染の感染源を究明することができたが⁴⁾、今回の事例は、患者が一般患者の高齢者で、発病時期など不明の点が多く感染時期の推測が困難だったことなど

が感染源が究明できなかった原因の一つと思われた。

感染源究明のためのRFLPデータベースの活用に関しては、パターン一致株①～⑩について保健所等へ情報還元したが、⑥-⑦以外は確かな関連性は見い出されなかった。③と一致株は患者が高齢者同士であることから、過去に同一感染源から感染してそれぞれに発病した可能性が考えられた。②、④、⑤および⑨はそれぞれ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。一方、①については、一致した10名の患者分離株のグループは、より詳細な疫学調査によって患者間の関連性が検出される可能性が示唆された。この10名の患者は、発病時期に開きがあり、また、管轄保健所が2市1県の3カ所に分かれているため、患者間の関連性究明には、各保健所とRFLP解析実施機関の長期に及ぶ密な情報交換が必要となり、その体制づくりが重要な課題と思われた。

今後は、これらの課題を検討し、感染源究明に役立てると共に、迅速な分子疫学的解析結果を提供できるよう、新しい結核菌型別法である Variable Number Tandem Repeats (VNTR)法⁵⁾の導入を進め、データベースの充実を図る予定である。

文 献

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 大島律子，狩屋英明，中嶋洋：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(2)，岡山県環境保健センター年報，30，80-92，2006
- 5) 前田伸司，村瀬良朗：共通化した反復配列多型(VNTR)分析法による結核菌の型別，結核，83，230，2008