

【調査研究】

岡山県における結核の分子疫学的解析 (2)

大島律子・中嶋洋・狩屋英明・日笠芙美子 (微生物科)

要 旨

1999年12月から、2002年3月までに県内の結核新登録患者から分離された結核菌のDNAについてRestriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析を行い、患者の疫学的背景と照合し、県内の結核の伝播状況を分析した。RFLPパターンは多様性を示し、極めて多くの感染源が存在することが示唆された。しかし、一方では、類似したRFLPパターンを持つ主要なグループの存在も判明し、高齢者から若年層への伝播が推測された。

[キーワード：結核菌，RFLP解析，RFLPパターン]

1 はじめに

岡山県では、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、1999年12月から結核対策特別促進事業として、県内の新登録患者から分離された結核菌DNAのRFLP解析事業を開始している。平成12年度は、主にIS6110コピー数の分布から県内の結核蔓延状況を地域別・年齢別に分析したが、平成13年度は、IS6110-RFLPパターンの相同性による型別から結核菌の伝播状況を分析した。

2 材料および方法

(1) 使用菌株

県内の結核病床を有する11病院と6検査機関で新登録患者から分離され、平成1999年12月から平成2002年3月までに搬入された結核菌504株のうち、疫学的背景が明らかでない278株を対象とした。

(2) 菌株からのDNA抽出

DNA抽出は、DNA抽出キットISOPLANT (ニッポンジーン) を用いて行った。小川培地上の菌体を1白金耳とり、マニュアルに従ってDNAを抽出した。

(3) RFLP解析

高橋らの方法^{1), 2)}に従い、結核菌DNAを制限酵素Pvuで消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動、ナイロンメンブレンへのトランスファー、UV固定を行い、次いで65℃3時間のハイブリダイゼーション後、プローブを加えて65℃15時間以上のハイブリダイゼーションを行った。プローブは、結核菌群特異的挿入配列IS6110由来245bpのPCR産物をRandom primer DNA labeling kit

(宝酒造) でピオチン標識して用いた。ハイブリダイゼーション後のメンブレンを洗浄後、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン液と室温で15分間反応させ、化学発光基質を加え、メンブレン上のDNAをX線フィルムに感光させて検出した。RFLPパターンのクラスター解析は、解析ソフトFinger Printing Plus (Bio Rad) を用い、UPGMA法で行った。

また、IS6110-RFLPパターンでバンド数が5本以下の菌株の2次分類として結核菌のプラスミド上の繰り返し配列polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) 解析³⁾も制限酵素SmaIを用い同様に実施した。

3 結 果

使用した287株の地域別、年齢別患者数の割合は、平成12年の県内の新登録患者数における割合¹⁾と大きな差は無かった(表1)。

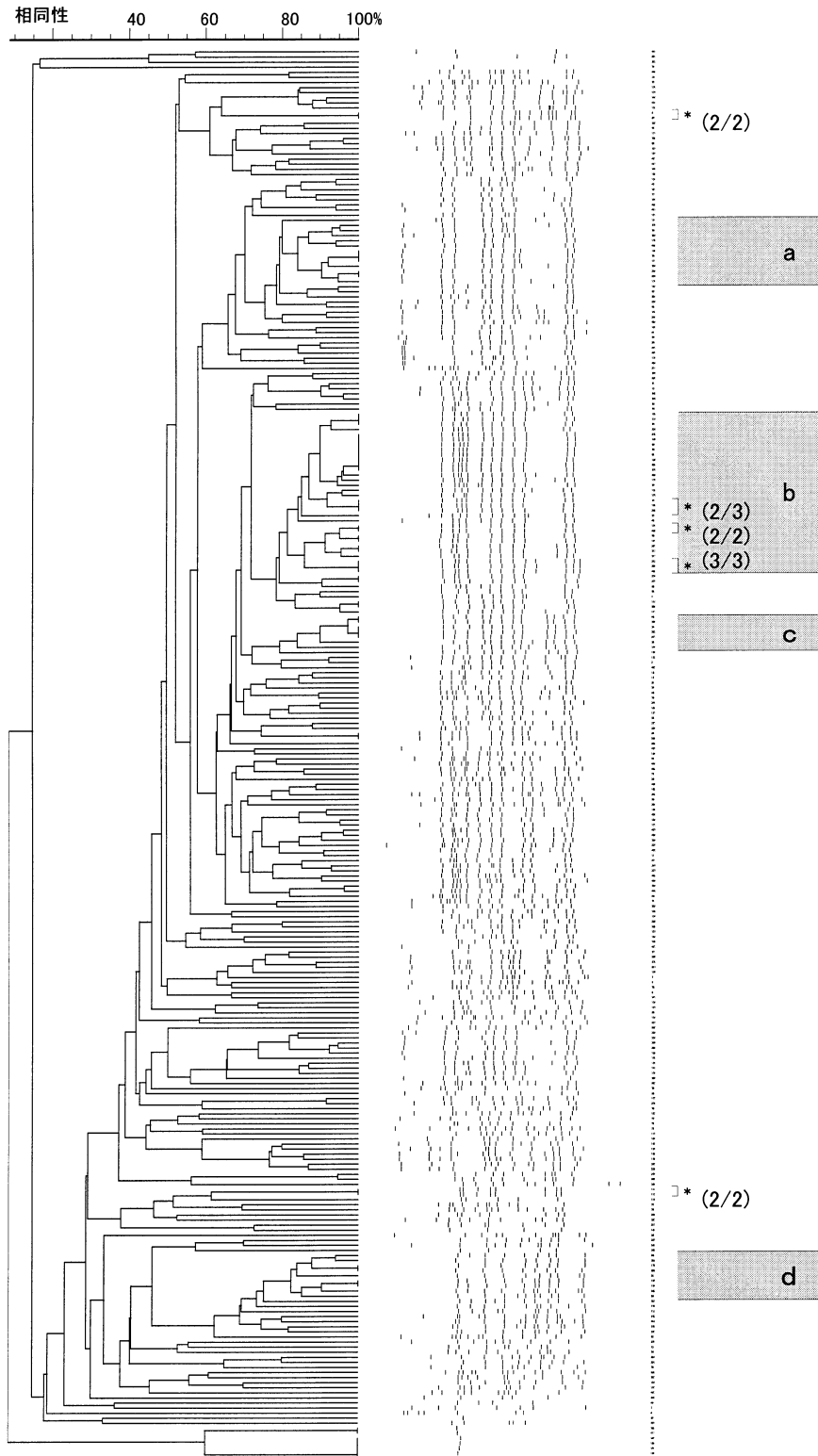
表1 地域(地方振興局管内)別患者数の割合

平成12年新登録患者数											
	東備	岡山	倉敷	井笠	勝英	津山	真庭	阿新	高梁	全県	%
≤19歳	1	2	5							8	1
20-29歳		7	13	2	4	6				32	6
30-39歳	2	19	11	5	2	2			1	44	8
40-49歳	3	14	21	2		4	1	2		47	9
50-59歳	6	22	24	2	1	4	1			60	11
60-69歳	10	38	15	5	5	3	3		2	81	15
≥70歳	26	88	62	25	15	25	9	8	14	272	50
全年齢	48	190	151	41	27	44	14	12	17	544	100
%	9	35	28	8	5	8	3	2	3	100	

使用菌株(平成11年12月～平成14年3月に搬入)											
	東備	岡山	倉敷	井笠	勝英	津山	真庭	阿新	高梁	全県	%
≤19歳	1	2		1				1		5	2
20-29歳		10	4				1			15	5
30-39歳	1	12	3					1		17	6
40-49歳	1	11	3					1		16	6
50-59歳	1	13	5	4			1			24	9
60-69歳	3	17	11	2	1	1	1		1	37	13
≥70歳	15	57	37	20	6	6	2	12	9	164	59
全年齢	22	122	63	27	7	7	5	15	10	278	100
%	8	44	23	10	3	3	2	5	4	100	

278株の結核菌DNAのIS6110-RFLPパターンは多様性を示し、244パターンが認められた。パターンが100%一致した同一クラスターは20種類見られ、54株が含まれたが、IS6110コピー数が1の同一クラスターはPGRS解析に

より細分された。これらの同一クラスターの中には、集団感染1事例2株および保健所の疫学調査等で患者間に関連性が認められた4クラスター9株の計11株が含まれていた(図1, 表2)。



*疫学的に関連が認められたクラスター(関連性有/クラスター構成株)

図1 IS6110-RFLPパターンによる相同性の比較

表2 クラスターの概要

主要相 同性80% クラスター	同一ク ラスター No.	同一ク ラスター サイズ	非同一 クラスター サイズ	患者の年齢							患者居住地(地方振興局管内別)									
				<20	20- 29	30- 39	40- 49	50- 59	60- 69	70≤	東備	岡山	倉敷	井笠	勝英	津山	真庭	阿新	高梁	
	1	2						1		1								2		
	2	3								3								2	1	
	3	2				1				1		1	1							
a			8	1	1		1		1	4	1	2	2		1			2		
	小計		13	1	1	1	1		1	8	1	3	3	2	1	1		2		
	%			8	8	8	8	0	8	62	8	23	23	15	8	8	0	15	0	
	4	3								3			1	1						
	5	8			1	1				3	3	1	2	2	1			2		
	6	3						1		2(1/2)		3(2/3)								
	7	2			1		1					2								
b	8	2						1		1			2							
	9	2								2			1		1					
	10	3			2			1				3								
			9				1	1	2	5		4	2	1				1	1	
	小計		32		4	1	2	4	5	16	1	16	6	4	1		2	1	1	
	%			0	13	3	6	13	16	50	3	50	19	13	3	0	6	3	3	
	11	2						2						2						
	12	2								2			1						1	
	13	2				1				1		2								
c	14	3								3	1	1			1					
			2							2		1		1						
	小計		7			1				6	1	2	2	1	1					
	%			0	0	14	0	0	0	86	14	29	29	0	14	14	0	0	0	
	15	2				1				1		1	1							
	16	2									2									
	17	2				1				1			2							
d	18	2				1				1		1	1							
			5						1	2	2	1	1	2	1					
	小計		9			2		1	2	4		2	4	2	1					
	%			0	0	22	0	11	22	44	0	22	44	22	11	0	0	0	0	
	19	2								2		1						1		
	20	5							1	4		3	2							
同一クラスター計		54			2	4	6	1	6	4	31	2	25	13	7	1	2	2	1	1
%					4	7	11	2	11	7	57	4	46	24	13	2	4	4	2	2
a~d 計		61			1	5	5	3	5	8	34	3	23	15	8	4	2	2	3	1
%					2	8	8	5	8	13	56	5	38	25	13	7	3	3	5	2
うち同一クラスター		37			0	4	5	1	3	3	21	2	16	9	5	1	2	2	0	0

疫学的に関連が認められた患者(関連性有/全員)

IS6110コピー数の分布は、1~17の間であり、10と12にピークが見られた。同一クラスターは、コピー数1と8~13の間で見られた（図2）。

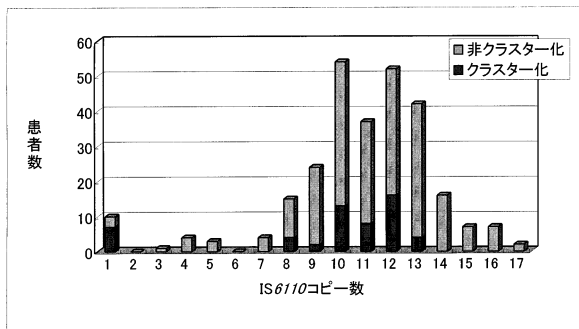


図2 IS6110コピー数の分布

全体をIS6110-RFLPパターンの相同性80%で分類すると、4種類の主要なグループa~d（図1、表2）が存在し、同一クラスターのうち11クラスター37株（69%）がそれらに含まれた。患者の年齢別では、c以外は60歳以上が66~70%を占めていたが、cは86%を70歳以上が占めていた。地域別では、aとcは県南市街部である岡山・倉敷の割合が全278株における割合（67%）より低く、県北部の割合が全体（17%）より高かった。bとdは全体と同程度であった。

a~dにグループ化された61株と非グループ化217株の比較では、患者の年齢構成には差は認められなかったが（図3）、地域別患者数の割合では、グループ化された株で岡山地区が低く、井笠地区~県北部がやや高い傾向であった（図4）。

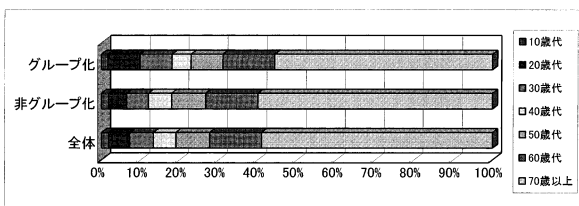


図3 年齢別患者数の割合

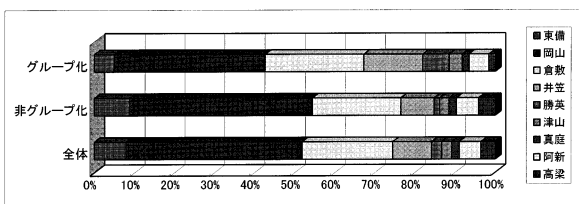


図4 地域別患者数の割合

4 考察

使用した278株の地域別、年齢別患者数の割合が、平成12年の県内の新登録患者数における割合¹⁾と大きな差が無かったため、今回の分析結果は、県全体の状況を反映していると考えられた。

IS6110-RFLPパターンが一致した同一クラスターは20種類54株見られたが、患者間に疫学的関連が認められたのは5クラスター11株であり、うち9株は59歳以下の患者からの分離株であった。このことから、結核発病の大部分が再燃と考えられている⁵⁾高齢者においては、パターンが一致した患者間の接点を見出すことは困難であるが、若い世代においては、パターンの一致は重要な疫学的指標になることが示唆された。ただし、最近、高齢者の外来性再感染による発病と考えられる事例も報告されており⁶⁾、疫学調査とRFLP解析を組み合わせた総合的な判断が必要と思われた。

相同性80%の主要グループa~dは、全体の22%を占め、高齢者が大部分ではあるが若い患者も含まれ、県内広域で分離されていることから、高齢者から若年層へ全県的に伝播している主要な感染源と考えられた。特に、最大のグループbは、他よりも若年層の割合が高く、同一クラスターNo.7, 10のように若年層の患者間での関連性が判明しているものも含まれていたため、高齢者から若年層へ伝播した株が若年層で広がっていることが推測された。

グループ化株と非グループ化株の比較から、a~dの株は古くから県内広範囲に存在し感染源となってきたことが示唆された。非グループ化株の中にもa~dに類似したパターンを示す株が多く見られ、全体の約40%はa~d近縁の株と思われた。a~d近縁株以外の約60%のうち、高齢者は大部分が過去の感染によると考えられるが、若年層では高齢者から以外の多様な感染源が推測され、その究明が今後の重要な課題と考えられた。

以上のことから、岡山県の結核は、多様な感染源により発生しているが、一方で、古くからの感染源となっている株が存在し、高齢者から若年層へ伝播していることがわかった。今後、感染源の究明に際し、これらの知見を考慮に入れ、疫学調査とRFLP解析を有効に組み合わせた分析をすることで疫学的指標が得られるものと思われた。

文 献

- 1) 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
- 2) 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
- 3) Cousins D, Williams S, Liebana E, et al. : Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol. 1998; 36: 168-178.
- 4) 岡山県保健福祉部健康対策課: 岡山県における結核の現状, 平成12年版, 2000; p.63-66.
- 5) 佐藤敦夫: 高齢者結核. 泉孝英, 網谷良一編, 結核, 第3版, 医学書院, 東京, 1999; p.263-269.
- 6) 多田敦彦, 河原伸, 堀田尚克, 堀場昌英, 玉置明彦, 岡田千春: 外来性再感染により発病したとされた高齢者肺結核の一例. 結核, 1999; 74: 272-274.