

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）

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

【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（2）

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

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17年度は、外国人の結核続発事例や多剤耐性結核の院内感染事例など4事例の感染源究明にデータベースが有用であった。

[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、データベースが有用な指標となった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17年度は、条件を満たした77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4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17年度のRFLP解析対象株

平成17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た結核菌のうち、以下の条件に該当した77株を解析した。

- ① 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
- 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77株を含め、平成17年度末現在、910株が登録された。

(4) 事例の感染源究明

4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）。

表1 事例の概要

事例 No.	所管保健所	患者	年齢	発病	患者間の発病時期の差	RFLP	事例概要
1	1043	O	A	33	不詳	2ヶ月 一致	2004年11月～2005年5月までに、県の中心地で隣接するO市とK市で20～33歳の4名の中国人労働者等が結核を発病した。4名の患者分離株のRFLPパターンを比較したところ、C・D2名のパターンが一致した。疫学調査の結果、C・Dは来日前に一定期間同じ集団研修を受けており、そこで感染した可能性が示唆された。
	1045	K	B	23	2004/11/7		
	1064	K	C	20	2005/5/-		
	1069	O	D	28	2005/3/-		
2	1076	T	A	80	2005/7/6	1.5ヶ月 一致	A・Bが相次いで発病し、疫学調査の結果、以前入院していたW病院で同室であった事が判明したため、両者分離株のRFLPパターンを比較したところ一致した。従って、W病院でAからBに感染したと考えられた。(A・Bとも結核既往歴無)
	1078	T	B	75	2005/8/21		
3	199	O	A	52	長期排菌患者 1976年頃入院 1999.12.15死亡	Aの死後 4年半後 Bが発病 一致	結核病棟を持つX病院の看護師Bが、職場の定期検診で結核と診断され、多剤耐性菌が分離された。Bには結核病棟勤務歴があったため、B分離株のRFLPパターンを、データベース中のX病院患者由来株と比較したところ、多剤耐性結核の長期排菌患者Aからの分離株と一致した。更に、薬剤感受性パターンも一致していた。
	1013	O	B	48	2004/6/-		
4	706	O	A		2003/1/-	2年以上 一致	BはAの接触者として予防内服していたが、副作用のため中断していたところ、2005年4月19日の接触者検診で発病が発見された。発病がAからの感染によるか別の感染源によるかを判別するため、A・B分離株のRFLPパターンを比較したところ一致し、Aが感染原と考えられた。
	1062	O	B	28	2005/4/?		

3 結果

(1) 77株の解析結果

77株のうち、70%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、73%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有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49%であった(図1)。

外国人由来株は9株(11.7%)で、調査を開始した平成11年度以来もっとも多かった。患者の年齢は9人中20歳代6人、30歳代2人、40歳代1人でほとんどが中国などアジア出身であった。これら9株は、事例1を除いてデータベース中にRFLPパターンが一致する株は認められなかった。

(2) 事例の検討結果(表1)。

事例1は、O保健所とK保健所の2つの保健所管内に及んだ事例であり、両保健所で中国人労働者の結核続発に注目して情報交換し、RFLP解析した結果、患者A・Bはそれぞれ別の感染源であったが、C・Dが同一感染源と判明した。

事例2は、RFLPパターンの一致により院内感染が明らかになった。

事例3は、X病院看護師である患者B分離株を、X病院患者分離株を多く含むデータベース中の全てのRFLPパターンと比較したところ、Bの発病4年半前に死亡した患者A分離株と一致した。多剤耐性の薬剤感受性試験結果(SM, EB, KM, INH, RFP, LVFX, SPFXおよびCPFVX耐性)も一致し、さらにAの入院期間とBの結核病棟勤務期間に重なりがあったことから、Aが感染源と考えられた。

事例4は、Bの結核発病の感染源が2年以上前に接

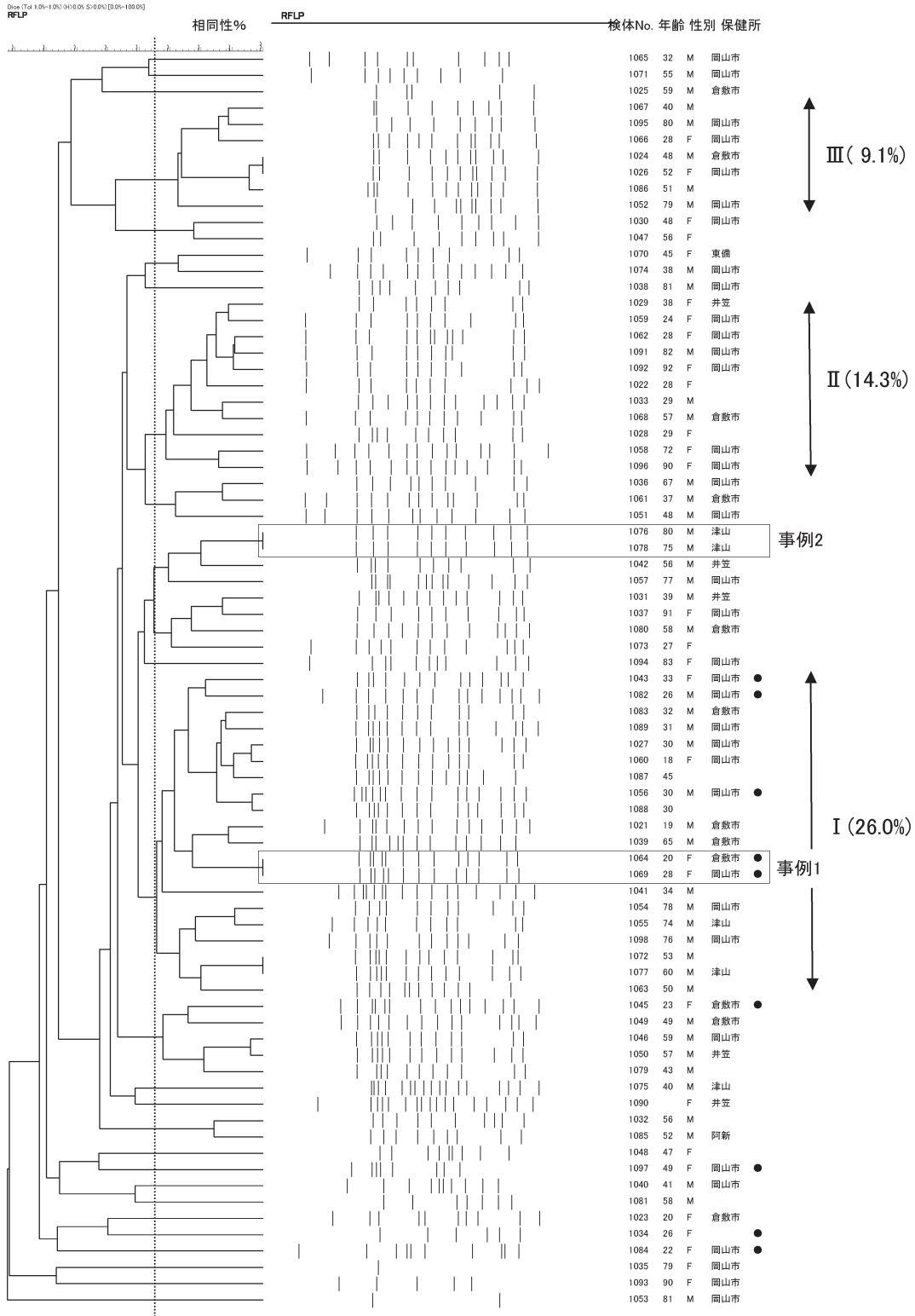


図1 H17年度に解析した結核菌77株のRFLPパターン

患者間に関連性有り

● 外国人

触した結核患者Aか否かを判断するため両者分離株のRFLPパターンを比較したところ一致し、Aが感染原と判断された。

4 考 察

今回の解析株では、若い外国人の患者が多かった。事例1を除いてデータベース中にRFLPパターンが一致する株は認められず、祖国で感染し来日後発病した可能性が高いが、感染源として重要と思われた。特に、事例1のような場合、迅速な発病者の察知と保健所間およびRFLP解析機関の連携により、感染の拡大を防ぐことができると考えられた。

RFLPデータベースの活用に関しては、事例3のように、ある患者の感染源を究明するためにデータベース上でその患者と接触の可能性が考えられる全ての患者分離株についてRFLPパターンを比較する方法により、患者間の隠れたリンクが検出されたことが最も大きな成果であった。

本年度は、事例3・4のように感染～発病までの期間が長かった事例で平成11年度から蓄積されたRFLPデータベースが感染源究明に効力を発揮した。こうした事例に対応するためにも、今後もデータベースの整備を継続し、感染源究明に役立てたいと考えている。

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