

【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

大島律子・狩屋英明・中嶋 洋（細菌科）

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について DNA の Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析を実施している。平成15年度までは、県内の全結核患者から分離された結核菌を対象に結核蔓延状況の把握と RFLP データベースの構築を行った。平成16年度は、4年間の解析結果に基づいて調査対象を絞り、効率的にデータベースを整備して事例検討に活用した。

[キーワード：結核菌，RFLP 解析，データベース，事例検討]

1 はじめに

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、結核対策特別促進事業として平成11～15年度に、県内の新登録患者から分離された結核菌株を収集して 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。それにより、結核蔓延状況や特定の RFLP パターンをもつ優勢な株グループの存在が判明した¹⁻⁴⁾。また、結核感染事例の疫学調査においても、データベースは有用な指標となった。

平成16年度は、調査の効率化を図るため対象を絞って RFLP 解析を実施してデータベースを整備し、9事例の検討に活用したのでその概要を報告する。

2 材料および方法

(1) 調査対象

平成11～15年度までの解析結果から、結核対策においては過去の再燃ではなく最近の感染により発病した患者や潜在的な集団感染に繋がると考えられる患者からの分離株を調査対象とすることが重要と判断された。このため、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82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）から発生した患

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^{5),6)}に従い、結核菌 DNA を制限酵素 Pvu II 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、65℃ 3時間のプレ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 産物をビオチン標識して用いた。メンブレン上の DNA の検出は、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、X線フィルムに感光させて行った。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を併せてデータベースに記載した。

(4) 事例検討

9事例において、院内感染，施設内感染，生活圏内

表1 RFLP 解析事例の概要

事例	関連性	患者	年齢	発病	RFLP	事例概要
1	通勤のフェリーで接触	A	44	2002/3/ー	相違	患者Bは、毎日の通勤に患者Aの運転するフェリーを利用しており、AからBへの感染が疑われたが、分離株DNAのRFLPパターンが異なったため、別の感染源と判明した。
		B	49	2004/2/24		
2	同じ施設の入所者	A	91	2004/5/17	相違	患者A、Bは、それぞれH12年とH10年から施設Zに入所しており、同じ時期に結核を発病したため、同一感染源が疑われたが、分離株DNAのRFLPパターンが異なったため、別の感染源と判明した。
		B	75	2004/5/12		
3	同じ病院の患者	A	71	?	相違	患者A～Dは、いずれもY病院の患者であり関連が疑われたが、4名からの分離株DNAのRFLPパターンがそれぞれ異なったため、別々の感染源と判明した。
		B	68	2003/12/5		
		C	89	2003/5/1		
		D	80	2004/2/26		
4	院内感染疑い	A	60	2004/2/23	相違	患者Aは結核以外の疾患でX病院に入院中に結核を発病した。X病院は結核病床を有し結核患者との接触が疑われたため、患者Aからの分離株と過去に当センターに搬入されたX病院の患者由来104株のDNAのRFLPパターンを比較したが、一致する株は見られず、感染源は判明しなかった。
		X病院の患者由来株				
5	親子	A	57	1973/01/22登録 2001/11/7 再発	酷似	患者A、Bは親子であるが、Bが幼い頃別居し、Aの再発以降は接触がなく両者からの分離株の薬剤感受性も異なっていた。関連性を調べるため実施したRFLP解析の結果、両者からの分離株DNAのパターンは酷似し、Bの発病は幼少時にAから感染した結核菌に起因すると考えられた。また、Aから分離された菌株は、Bへの感染の後、薬剤感受性が変化し、また、遺伝子的にも僅かに変異したと推測された。
		B	30	2004/5/17		
6	BCG株との鑑別	A	77	?	相違	患者Aは、W病院入院中にBCG免疫療法を行っていた患者と同室であり、因果関係を確認するため分離株DNAとBCG株のRFLPパターンを比較したところ、パターンが異なり関係はないことが証明された。
		<i>Mycobacterium bovis BCG Tokyo</i>				
7	親子	A	89	2003/12/00	一致	患者A、Bは親子であり、先に発病したB(子)は大量排菌患者であった。Aには明瞭な結核病巣が認められず、Aの入院先のV病院での検査室内汚染も疑われたため、A・Bからの分離株および過去に当センターに搬入されたV病院由来株とDNAのRFLPパターンを比較したところ、A・Bのみで一致し、BからAへの感染と考えられた。
		B	V病院の患者由来株			
8	夫婦	A	79	? (2004)	一致	患者A、Bは夫婦であり、ほぼ同時期に発病した。両者とも高齢でB(夫)には陳旧性陰影が認められたため、同一感染源か否かを確認するため、分離株DNAのRFLP解析を行ったところ、パターンが一致し、夫婦間感染と判明した。
		B	93	? (2004)		
9	法事で同席	A	65	2004/10/ー	相違	患者A、Bは寺で行われた法事で同席しており、関連性を調べるため分離株DNAのRFLP解析を行ったところ、パターンは異なり、別の感染源と判明した。
		B	84	?		

感染、家族内感染およびBCG株との関連について調べるため、RFLPパターンを比較検討した(表1)。

3 結果

(1) 82株のRFLP解析結果

搬入された82株は、約60%が県南部に居住する患者由来株であった。RFLPパターンのクラスター解析の結果、平成12～15年度で見られた類似性の高い流行株と思われるグループⅠ～Ⅲのうち、ⅠとⅢが約27%を占めたが、平成15年度に23.2%を占めたⅡは3.7%で

あった(図1)。

(2) 事例の検討結果

患者間の感染が疑われた事例1、2、3、5、7、8、9では5、7、8がRFLPパターンの一致により、同一感染源であることが支持された(表1)。RFLPパターンが異なった事例では、感染源の違いが明らかになり、以後の疫学調査がより正確になった。

事例4と7は、患者Aからの分離株とデータベース上でAとの接触の可能性が考えられる患者分離株とでRFLPパターンを比較した。事例4は一致する株

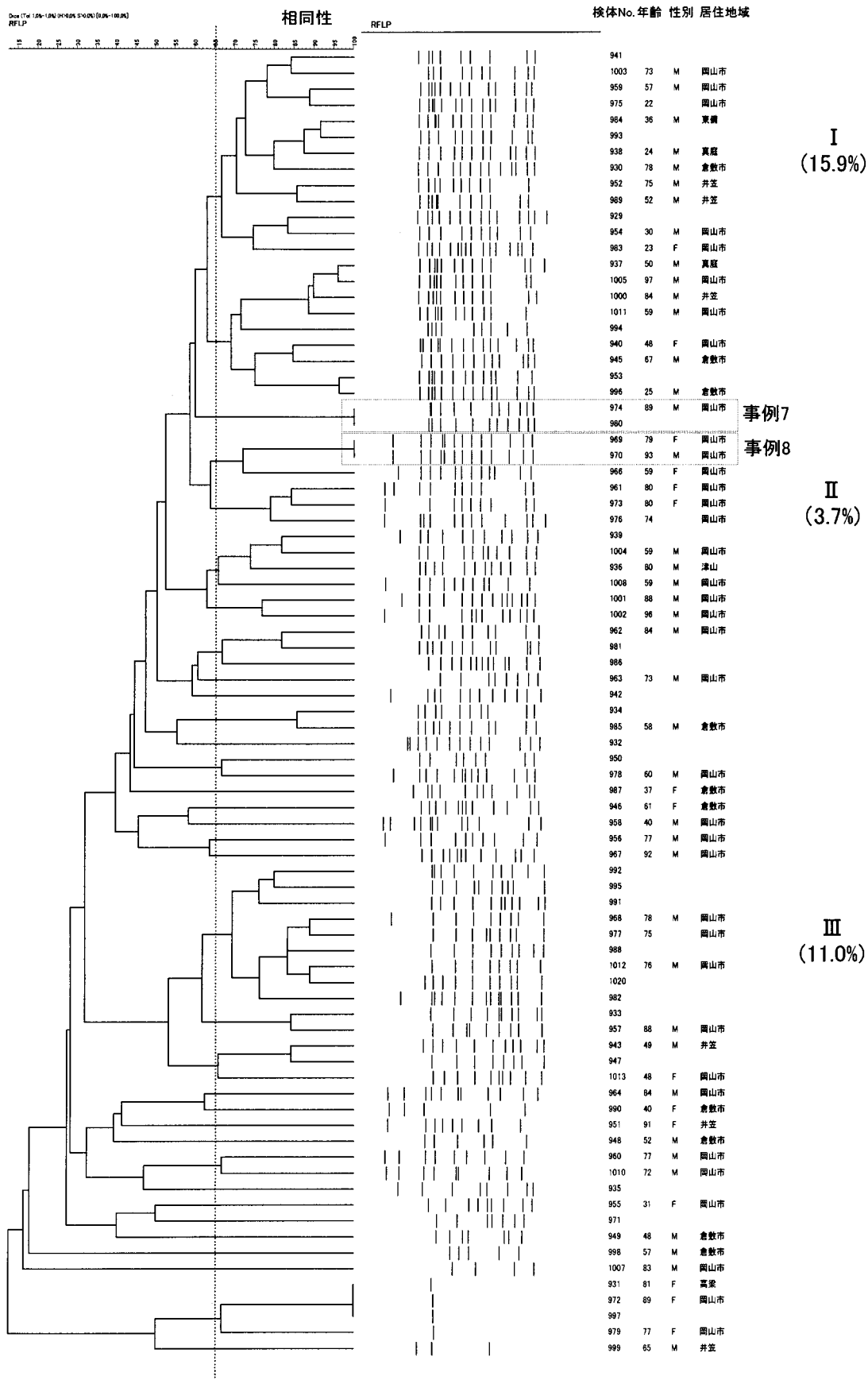


図1 82株のRFLPパターンによる相同性の比較

表2 RFLP 解析事例数

	集団感染	院内感染	施設内感染	職場内感染	生活圏内感染	家族内感染	BCGとの鑑別	検査室内汚染	計
H12	1(1)	2(1)			1	1(1)			5(3)
H13		1 1(1)			1		1(1)		3(1) 1(1)
H14		4(2)		2(2)	1(1)			1(1)	8(6)
H15		1(1)							1(1)
H16		2	1		2	3(3)	1		9(3)
計	1(1)	11(5)	1	2(2)	5(1)	4(4)	2(1)	1(1)	27(15)

() は、RFLP パターンが一致した事例数

が見つからず、感染源は究明できなかった。事例7では、患者Aの感染が患者Bからの家族内感染か或いはV病院における院内感染かに焦点を置いて解析した結果、A・B間で分離株のパターンが一致し、家族内感染と判断された。

4 考 察

82株のRFLP解析の結果、RFLPパターンの分布は、結核新登録患者分離株の全株を対象とした平成12～15年度に比較してグループI～Ⅲの占める割合が10～20%程度低くなっており、最近の感染はグループI～Ⅲの他に多くの感染源により起こっていることが示唆された。

事例の検討では、9事例中同一感染源であることが支持されたのは3事例のみであったが、平成16年度はそれ以前よりも検討事例数が増加し、疫学調査におけるRFLP解析の意義が保健所担当者に浸透し、積極的に活用されるようになってきたことが示された(表2)。また、事例4と7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も用いられ、データベースが今まで以上に有効に活用された。今回の2事例では感染源究明には至らなかったが、このような活用方法により、今後患者間の隠れたリンクが検出されることが期待される。

今年度は、調査対象を絞ってRFLP解析を実施した最初の年であり、対象外の菌株が搬入されるなど若干の混乱はあったが、全体としてはスムーズにRFLP解析が進められた。今後もRFLPデータベースの整備を継続し、結核の感染源究明に役立てたいと考えている。

文 献

- 1) 大畠律子, 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) 大畠律子, 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) 大畠律子, 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) 大畠律子, 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) 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
- 6) 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