

【調査研究】

岡山県における結核の分子疫学的解析(3)

大畠律子, 中嶋 洋, 狩屋英明, 日笠芙美子 (微生物科)

要 旨

県内の結核新登録患者から分離された結核菌 DNA について, Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析を行い, 平成12年度から平成14年度までの年度別変化をみた。RFLP パターンは多様性を示したが, 一方で, 類似性の高いパターンを持つ流行株と思われるグループが各年度をとおして見られ, 主要な感染源となっていることが示唆された。

[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, 平成11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。平成14年度は, 平成12年度から平成14年度までで, 菌株が搬入された年度ごとに RFLP パターンを比較し, 経年的な変化を調べた。

2 材料および方法

2.1 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12年4月から平成15年3月までに搬入された結核菌708株のうち, 疫学的背景が明らかな398株を対象とした(表1)。

2.2 菌株からの DNA 抽出

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。

2.3 RFLP 解析

高橋らの方法^{1,2)}に従い, 結核菌 DNA を制限酵素 Pvu 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, 次いで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 Random primer DNA labeling kit (宝酒造) で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 Finger Printing Plus (Bio Rad) を用い, UPGMA 法で行った。

3 結 果

使用した398株の地域別, 年齢別患者数の割合は, 平成12年および13年の県内の新登録患者数における割合³⁾と著しい差は無かった(表1, 2)。

結核菌 DNA の IS6110-RFLP パターンは多様性を示し, 平成12~14年度でそれぞれ131, 123および104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, それぞれ11組29株, 8組20株および6組16株であった。各年度内で同一クラスター中, 患者間に関連性が認められたクラスターは, それぞれ2組4株, 0組および1組2株であった。ただし, 各年度を通して解析した場合では, 同一クラスター11組24株で患者間に関連性が認められた。

IS6110 コピー数の分布は, 各年度とも1~17の間で, 10と12にピークが見られた(図1)。同一クラスターはコピー数1と7~17の間で見られた。

各年度における IS6110-RFLP パターンの相同性65%による分類では, 3種類の主要なグループ I ~ III が

平成12年度

表1 地域（地方振興局管内）別患者年齢別菌株搬入状況

	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						4	3
20-29歳		2	4					2		8	5
30-39歳		7	1							8	5
40-49歳		8								8	5
50-59歳	1	6	4	1			1			13	9
60-69歳	1	9	6	2						18	12
≥70歳	6	29	23	14	4	2	1	3	8	90	60
全年齢	9	63	38	18	4	2	2	5	8	149	100
%	6	42	26	12	3	1	1	3	5	100	

平成13年度

	東備	岡山	倉敷	井笠	勝英	津山	真庭	阿新	高梁	全県	%
≤19歳								1		1	1
20-29歳		8		1			1			10	7
30-39歳		4								4	3
40-49歳	1	5								6	4
50-59歳		7	2	4						13	10
60-69歳	2	4	6		1	1	1			15	11
≥70歳	11	20	22	4	2		1	6	1	67	50
?			19							19	14
全年齢	14	48	49	9	3	1	3	7	1	135	100
%	10	36	36	7	2	1	2	5	1	100	

平成14年度

	東備	岡山	倉敷	井笠	勝英	津山	真庭	阿新	高梁	全県	%
≤19歳			1							1	1
20-29歳		3	1							4	4
30-39歳		2	1					1		4	4
40-49歳		2	5	1		1				9	8
50-59歳		8	3	1		1				13	11
60-69歳	5	6	7						1	19	17
≥70歳	11	24	14	2	1		1		3	56	49
?		5	3							8	7
全年齢	16	50	35	4	1	2	1	1	4	114	100
%	14	44	31	4	1	2	1	1	4	100	

平成12年

表2 地域（地方振興局管内）別年齢別新登録患者数の割合

	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		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	

平成13年

	東備	岡山	倉敷	井笠	勝英	津山	真庭	阿新	高梁	全県	%
≤19歳		2	3	1				1		7	1
20-29歳	1	19	12	4	1	3				40	8
30-39歳		17	12		1	3				33	7
40-49歳	4	14	8	2		1	1			30	6
50-59歳	4	29	21	4		5	1	1		65	13
60-69歳	6	26	25	3	3	6	2	1		72	15
≥70歳	32	71	67	18	11	11	6	10	15	241	49
全年齢	47	178	148	32	16	29	10	13	15	488	100
%	10	36	30	7	3	6	2	3	3	100	

平成12年及び13年の平均値

	東備	岡山	倉敷	井笠	勝英	津山	真庭	阿新	高梁	全県	%
≤19歳	0.5	2.0	4.0	0.5				0.5		7.5	1
20-29歳	0.5	13.0	12.5	3.0	2.5	4.5				36.0	7
30-39歳	1.0	18.0	11.5	2.5	1.5	2.5		1.0	0.5	38.5	7
40-49歳	3.5	14.0	14.5	2.0	0.0	2.5	1.0	1.0		38.5	7
50-59歳	5.0	25.5	22.5	3.0	0.5	4.5	1.0	0.5		62.5	12
60-69歳	8.0	32.0	20.0	4.0	4.0	4.5	2.5	0.5	1.0	76.5	15
≥70歳	29.0	79.5	64.5	21.5	13.0	18.0	7.5	9.0	14.5	256.5	50
全年齢	47.5	184.0	149.5	36.5	21.5	36.5	12.0	12.5	16.0	516.0	100
%	9	36	29	7	4	7	2	2	3	100	

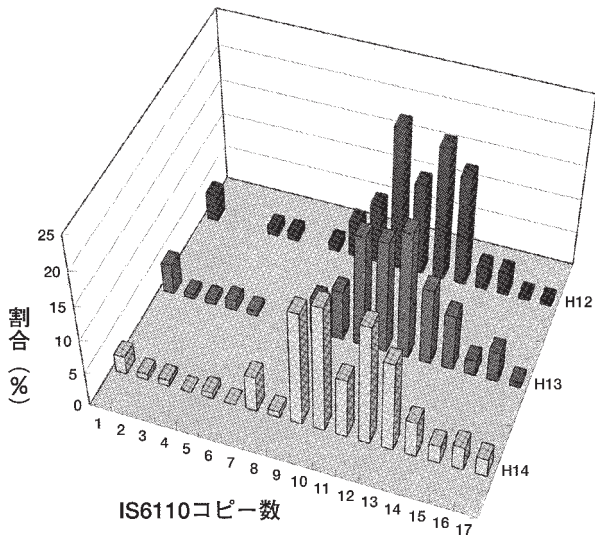


図1 年度別 IS6110コピー数の割合

存在し、それぞれ全体の39.6、43.0および54.4%を占めていた。また、同一クラスターの大部分はこれらに含まれていた(図2～4)。グループI～IIIに含まれた菌株は、いずれも県内広範囲に居住する広い年齢層の患者からの分離株であった。

4 考 察

使用した398株の地域別、年齢別患者数の割合が、平成12年および13年の県内の新登録患者数における割合と著しい差が無かったため、今回の分析結果は、県全体の状況を概ね反映していると考えられた。

各年度を通して IS6110-RFLP パターンが多様性を示したことから、県内には極めて多数の感染源が存在することが判明した。

IS6110 コピー数の分布および IS6110-RFLP パターンの類似性は、年度において若干の相異はあったも

の、各年度とも同様の傾向を示したことから、3年間に於ける県内の結核蔓延状況に大きな変化は無かったことが示された。

IS6110-RFLP パターンの相同性65%で分類される3種類の主要なグループI～IIIは、全体の約40～50%を占めていたが、これらは全国レベルでの分布が推測されている株であり、県内においても古くから主要な感染源となってきたことが強く示唆された。

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、全国レベルで分布する株により多くが感染し、伝播を続けていることが判った。

今回は県内の結核菌の3年間の変化を解析したが、結核は感染から発病までの結果が長いため、流行株等の年次の移り変わりは認められなかった。今後はさらにデータを蓄積し、長い期間での経年的変化を解析する方針である。

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) 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13年版, 2001; pp. 69-75.
- 4) 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

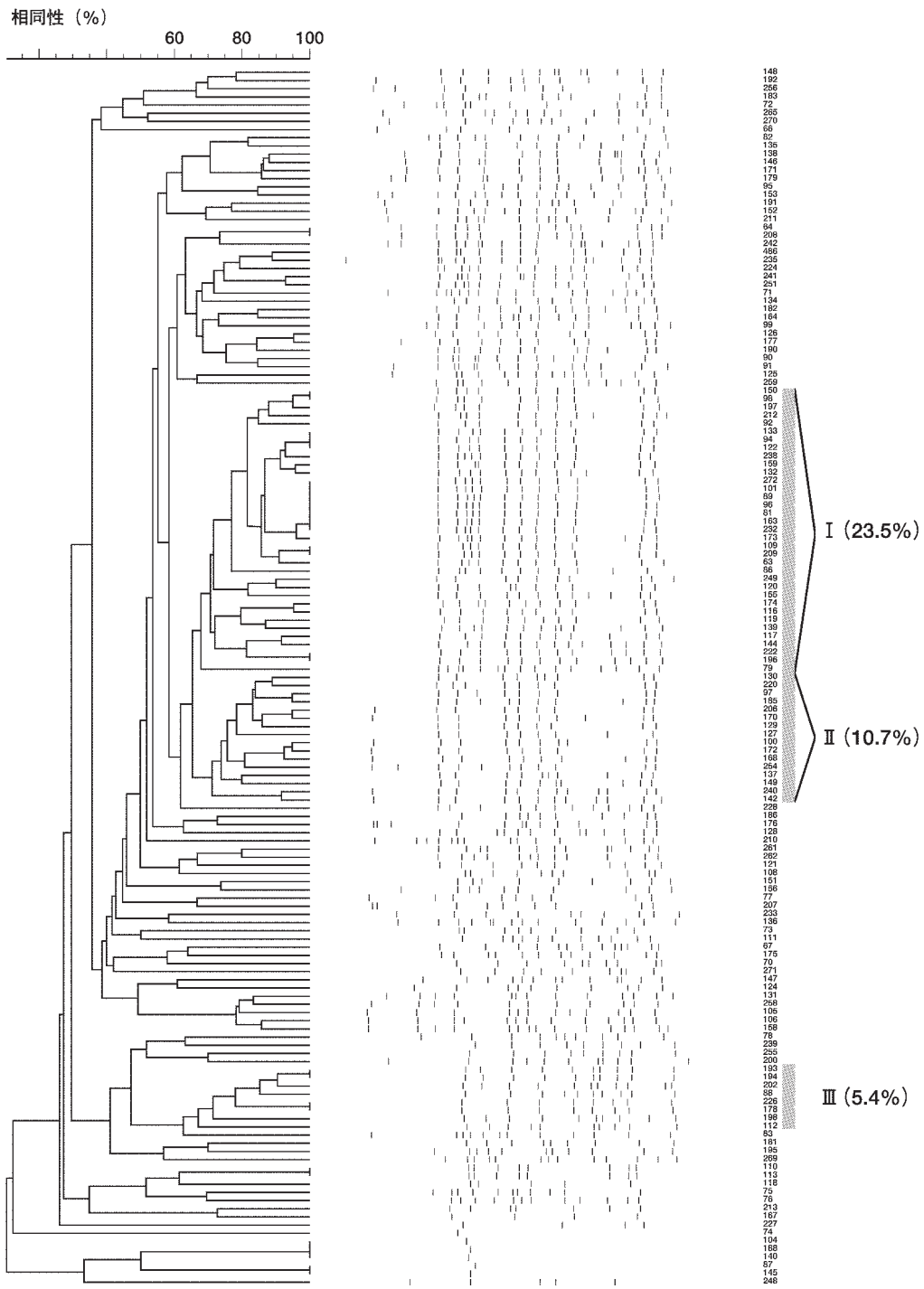


図2 H12年度の IS6110-RFLP パターンによる相同性の比較

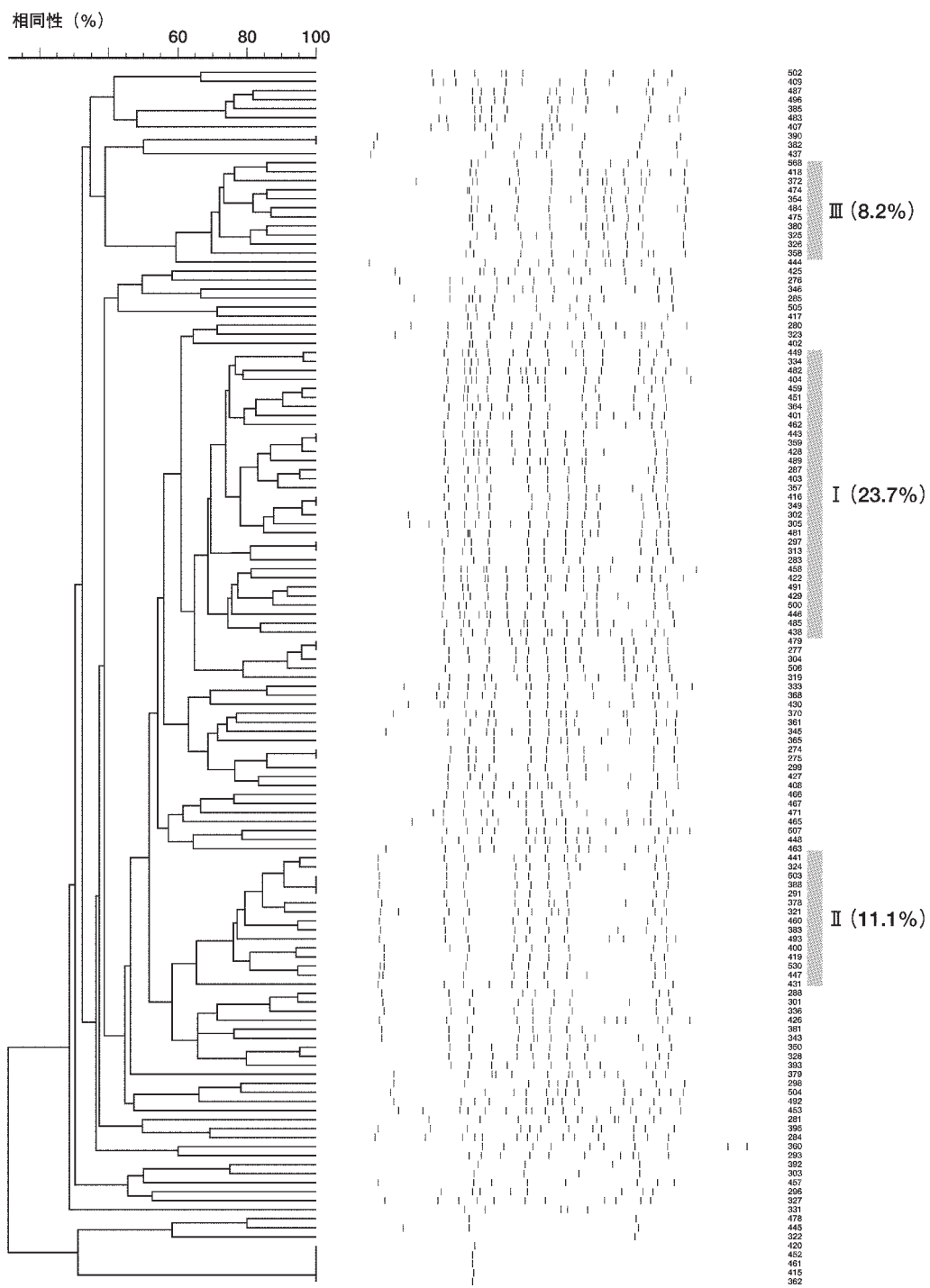


図3 H13年度の IS6110-RFLP パターンによる相同性の比較

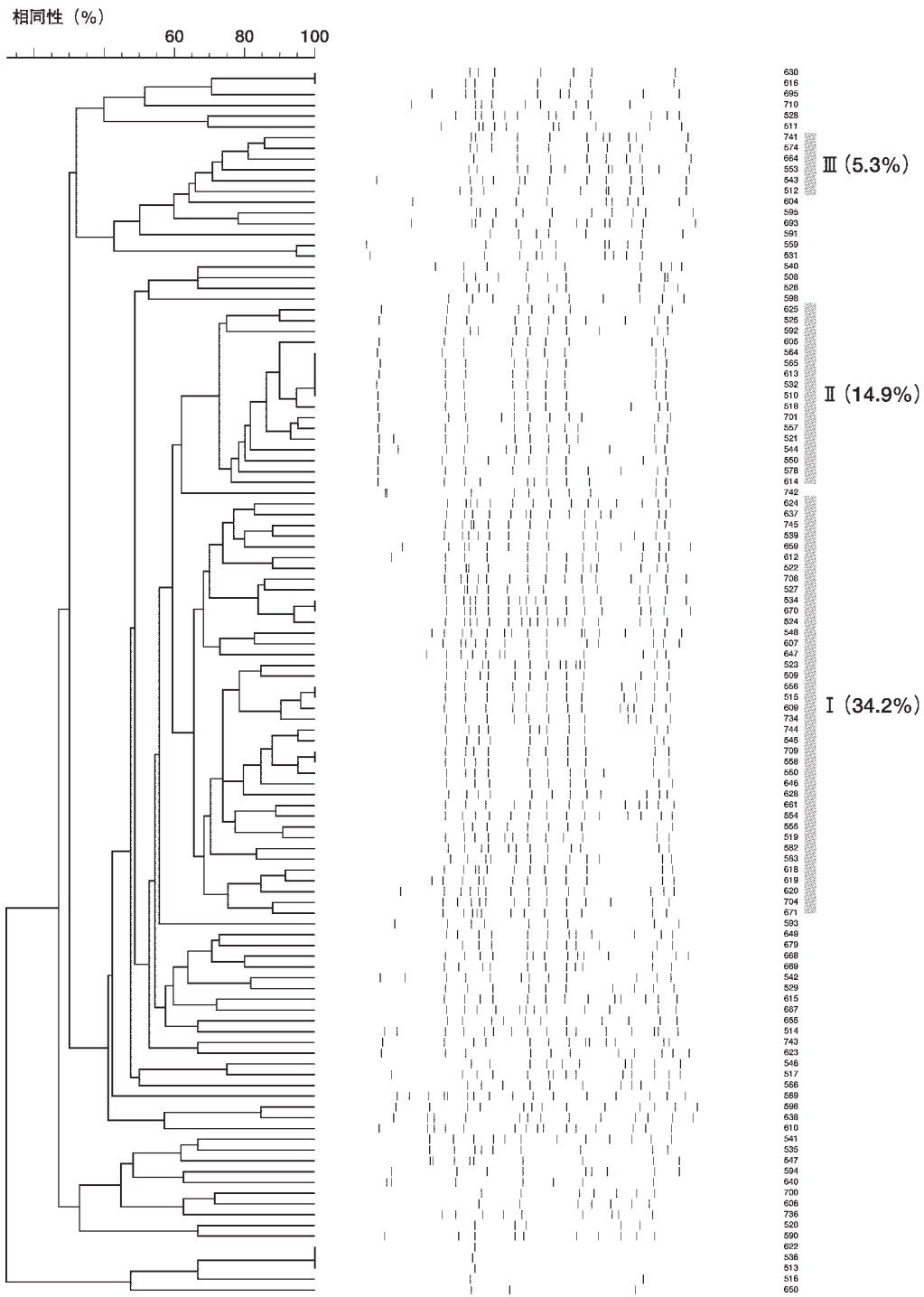


図4 H14年度の IS6110-RFLP パターンによる相同性の比較