

【調査研究】

岡山県における結核の分子疫学的解析(4)

大畠律子, 狩屋英明, 中嶋 洋 (微生物科)

要 旨

平成11年12月から平成16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 DNA について, Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析を行い, RFLP パターンのデータベースを構築した。これを利用して感染源を究明した18の事例をもとに, RFLP データベースの有用性と今後のあり方を検討した。

[キーワード: 結核菌, RFLP 解析, RFLP パターン, データベース]

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月から平成16年3月まで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株を集約し, DNA の RFLP 解析を実施してきた。平成12年度は県内の結核蔓延状況を分析し, 平成13年度は IS6110 - RFLP パターンの型別から結核菌の伝播状況を推測した。平成14年度は経年的な RFLP パターンの変化を調査した。平成15年度は, RFLP 解析データを活用して感染源を究明した事例をもとに, 集積された RFLP データベースの有用性と今後のあり方について検討した。

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11年12月から平成16年3月までに搬入された結核菌928株のうち, 重複等を除いた751株を RFLP 解析した。

2.2 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, クラスの安全キャビネットを使用して行った。

2.3 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。

2.4 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) でピ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。

2.5 RFLP データベースの作成

搬入された菌株について, 保健所からの菌株情報と RFLP 解析結果を併せてデータベースを作成した(表1)。

2.6 地域の結核蔓延状況および流行株の解析

平成15年度に搬入された159株のうち, 重複を除き疫学的背景が明らかな95株の IS6110 - RFLP パターンをクラスター解析し, 平成12~14年度の年度毎のパターン³⁻⁵⁾と比較した。

2.7 事例検討

保健所における疫学調査等から同一感染源が疑われた16事例, BCG 類似株が検出された1事例, および医療機関での検査室内汚染が疑われた1事例の計18事例について, データベースを活用し, RFLP パターンを比較検討した。

3 結 果

3.1 地域の結核蔓延状況および流行株の解析

95株の IS6110 - RFLP パターンのクラスター解析の結果、平成12～14年度と同様に³⁻⁵⁾、類似性の高い流行株と思われるグループ A が約43%を占めたが、平成12～14年度はグループ A が最も優勢であったのに対し、平成15年度はグループ B が優勢となっていた(図1)。

3.2 事例の検討結果

同一感染源が疑われた事例1～16のうち、事例1, 2, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14および16で RFLP パターンの一致により、同一感染源が確定した(表2)。RFLP パターンが一致しなかった事例は、いずれも従来の疫学調査だけでは同一感染源と見なされる可能性の高いケースであったが、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14では、平成13年6月から平成14年8月までの1年2ヶ月に及ぶ期間に、患者Bから患者A, C, Dへの感染が疑われた。RFLP 解析により、患者BからCへの感染は否定され、患者BからA, Dへの感染が確定した。

事例16では、県iv保健所管内居住の患者Aが結核として登録された11ヶ月後にa市居住の患者Bが登録され、a市保健所の疫学調査により、b市内の医療機関で患者A, B間の接触が判明した。a市保健所からその旨を通知された県iv保健所およびb市保健所はa市保健所と連携し、RFLP 解析事業を統括する県健康対策課を通してRFLP 解析実施機関の県環境保健センターにRFLP 解析を依頼した。県環境保健センターでは、RFLP データベース上の患者Aからの分離株のRFLP パターンと、新たに搬入された患者Bからの分離株のパターンを比較した。パターンは一致し、患者

AからBへの感染が確定された。

事例15では、患者からの分離株とBCG Tokyo株でRFLP パターンが一致し、膀胱癌免疫療法に用いられたBCG株由来株と判明した⁶⁾。

事例17は、臨床的に結核所見が見られない患者から相次いで結核菌が分離されたとの情報を受けたため、RFLP 解析を行ったところパターンが一致した。パターンは流行株パターン^{3,4)}とは異なり、データベース中で当該4株のみに見られたため、偶然の一致は否定され、検査室内汚染が確定した。

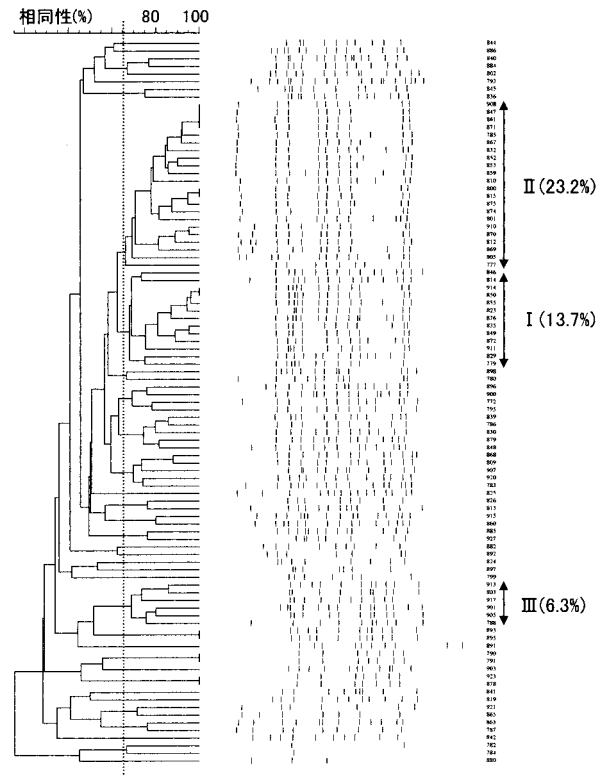


図1 H15年度のIS6110-RFLPパターンの相同性の比較

表1 RFLPデータベースの構造

No.	受付年月日	医療機関	検体No.	性別	年齢	保健所	発病年月日	検体採取年月日	IS6110コピー数	RFLP一致の有無*	備考

*X線フィルム上に検出されたRFLPパターンは、コンピュータに登録し、解析ソフトで系統樹を作成して一致の有無や類似性を解析する。

表2 RFLP 解析事例（平成12～平成15年度）

事例	依頼年月日	報告年月日	保健所	患者	年齢	発病	登録年月日	関連性	RFLP					
1	20000522	20000523	a市	A	59	1999/7/	1999/11/18	同じ病室の患者	一致					
				B	72	2000/1/18	2000/2/3							
2	20000706	20000711	a市	A	18	?	2000/5/29	高校の同級生	一致					
				B	18	2000/4/5	2000/5/2							
3	20000901	20000908	a市	A	68	2000/1/	2000/3/10	同じ病室の患者	相違					
				B	58	2000/5/	2000/5/31							
				C	71	2000/6/	2000/7/12							
4	20010124	20010129	a市	A	51	1999/10/	2000/4/17	親子	一致					
				B	76	2000/6/	2000/10/10							
5	20010301	20010307	a市	A	86	2000/10/	2000/11/13	同じ趣味のサークル	相違					
				B	73	2000/11/	2000/12/28							
6	20010425	20010508	?	A	32	2000/ /	?	同じ病院の職員	相違					
				B	36	2000/12/	2001/2/21							
				C	21	2000/10/	2000/12/13							
7	20010815	20010822	a市	A	47	1998/7/17	1998/7/27	共通の飲食店の利用者	相違					
				B	59	?	2001/3/28							
8	20020530	20020617	a市	A	60	2001/9/	2001/12/12	同じ病院の患者 (A, D, E) と職員 (B, C)	相違					
				B	48	2001/8/	2001/9/25							
				C	25	?	2001/3/28							
				D	96	2000/6/24	2000/7/4							
				E	51	1999/5/	2000/3/9							
9	20020530	20020617	a市	A	57	2001/11/7	1973/1/22	同僚	一致					
				B	60	?	2002/1/16							
10	20020530	20020617	a市	A	44	2001/11/20	2001/12/12	同僚	一致					
				県 i	B	51	?			1993/11/8				
11	20020611	20020619	a市	A	23	2000/8/	2000/8/	同僚 (A, B) と B の近隣居住者 (C)	一致					
				B	52	?	2001/3/							
				C	21	?	2001/4/							
12	20020625	20020703	a市	A	75	?	2002/1/29	同じ病室の患者	一致					
				県 ii	B	50	2001/11/			2001/11/29				
13	20020625	20020703	a市	A	89	2000/10/	2000/11/8	同じ病院の患者	一致					
				B	83	?	2001/11/28							
				20020530	20020617	a市	C			82	1999/4/	1999/8/6		
14	20011122	20010029	a市	A	23	2001/7/	2001/10/1	同じ病院の患者 (A) と患者 (B, C)	一致					
				20010605	20010612	a市	B			49	2000/3/23	2000/5/30		
				-----	-----	a市	C			51	2000/12/	2001/1/5		
				20020806	2002813	a市	A			23	2001/7/	2001/10/1	同じ病院の職員 (A, D) と患者 (B)	一致
							B			49	2000/3/23	2000/5/30		
15	20030109	20030117	a市	A	70	2002/2/14	2002/6/26	同じ病院の患者	相違					
				B	64	1999/11/17	1999/11/19							
				b市	C	?	1998/4/			1998/9/				
				a市	D	52	1998/2/23			1998/3/18				
16	20030417	20030421	県 iv	A	83	2002/1/7	2002/1/9	同じ病院の患者 (A) と職員 (B)	一致					
				a市	B	24	2002/10/			2002/12/24				
		20010920	県 iii	A	80	2001/3/	2001/4/19		一致					
						<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Tokyo								
		20020521	県 iv	A				同一病院：クロス コンタミネーション (検査室内汚染)	一致					
			B											
			C											
			D											

4 考 察

RFLP 解析の活用により、従来の疫学調査では確定できなかった感染の有無について、科学的根拠に基づいたより正確な調査が可能となった。

また、事例14や事例16のように、発病時期に大きな差がある患者間では、疫学調査で接触が判明した時点では、もはや菌株が保存されておらず、比較不可能な場合が多かったが、RFLP 解析結果のデータベース化により、比較が可能となった。

一方で、事例16は県および2市の3保健所に関連したケースであり、各保健所、県庁および環境保健センターの関係5機関が連携して感染源が究明できた貴重な事例であったが、このような場合は特に、科学的根拠となる RFLP 解析結果が重要になると思われた。

事例 16 では、結核菌との鑑別用に BCG Tokyo 株の RFLP パターンをデータベースに保持していたことが役立った。

事例 16 では、RFLP データベースで解析された地域の流行株や他の RFLP パターンとの比較により、偶然の一致と検査室内汚染が明確に区別できた。この結果を受けて当該検査室では、汚染の原因究明が行われ、検査マニュアルが改訂された。

以上のことから、RFLP 解析結果のデータベース化により、感染源・感染経路の究明において、疫学調査に科学的根拠を与えることができる、地域の結核蔓延状況や流行株等を把握した疫学調査ができる、ということが判り、結核対策に非常に有用であると思われた。

しかしながら、結核対策特別促進事業は平成15年度で終了したため、今後は RFLP 解析の対象を絞る必要がある。これまでに解析した事例1～16のうち、RFLP

パターンが一致して感染源が確定できたのは、主に60歳以下の患者が関連した事例であった。従って、60歳以下の患者分離株を対象とする方法が効率的と思われる。ただし、事例1、4および13のように、高齢者では起こりにくいとされている外来性再感染が疑われた⁷事例もあり、高齢者施設等で同時期に複数の患者が結核を発病した場合などは、菌株の保存を徹底し、早急に RFLP 解析を実施する必要があると思われる。

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) 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)
- 4) 大畠律子, 中嶋洋, 狩屋英明, 日笠英美子: 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
- 5) 大畠律子, 中嶋洋, 狩屋英明, 日笠英美子: 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
- 6) 大畠律子, 中嶋洋, 岩本真弓, 小寺良成: 患者喀痰からの BCG Tokyo 株の検出と公衆衛生行政的対応について, 日本公衆衛生雑誌, 49, 790 - 794, 2002
- 7) 佐藤敦夫: 高齢者結核. 泉孝英, 網谷良一編, 結核, 第3版, 263 - 269 医学書院, 東京, 1999