

結核菌の RFLP 法による分子疫学的解析

須釜久美子 平澤恭子 熊谷奈々子 長沢正秋 渡部啓司
微生物グループ 細菌

要 旨

2003 年 12 月から 2005 年 3 月末日までに当所に搬入された結核菌 45 株について、**Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)** 法による分子疫学的解析を実施した。同一の RFLP パターンを示したものには家族間の感染や集団感染事例があったが、疫学調査からは関連がみられなかったものもあった。また、接触者健診によって発見された患者からの 2 株の RFLP 分析の結果は、1 株が初発患者と同一パターンを示し、1 株が異なるパターンを示した。

RFLP 分析法は、家族間の感染や集団感染の科学的根拠となり、従来の疫学調査では確定できなかった感染について科学的根拠を与えることが可能となった。

当所で実施した結核菌 RFLP 分析結果が、保健所や関係する医療機関において活用されることにより、結核に対して適切な予防対策が講じられると考える。

キーワード：結核菌、RFLP 分析、RFLP パターン

はじめに

福島県の結核罹患率は全国で低い方から第 9 位である¹⁾。また、結核新登録患者数は、1998 年から 492 人、614 人、479 人、383 人、365 人、374 人であり、1999 年にはやや増加したが、減少傾向を示しており、2004 年には 335 人となっている^{1・2)}。しかし、この減少傾向は全国と同様近年鈍化しており、その背景に集団感染疑い事例の散発が推測される。そこで、県内で発生した結核について正確な感染拡大防止対策を講じるため、2002 年度より **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)** 分析による分子疫学的調査研究事業を開始している。この事業を開始するにあたり、結核菌 RFLP 解析検査実施要綱が 2003 年 9 月 22 日から施行された。結核菌株はその実施要綱に基づき、2003 年 12 月から 2005 年 3 月末日までに 45 株が当所に搬入されている。それらについて RFLP 分析による分子疫学的解析を実施したので、その結果について報告する。

材 料

医療機関等で結核菌と同定された 45 株を

用いた。保健所管内別では表 1 に示したとおり、県北保健所管内が 15 株、県中保健所管内が 1 株、会津保健所管内が 20 株、南会津保健所管内が 3 株、相双保健所管内が 4 株、そしていわき市保健所管内が 2 株であった。

表 1 結核菌の保健所管内別搬入数

保健所名	菌株数
県北	15
県中	1
会津	20
南会津	3
相双	4
郡山市	0
いわき市	2
合計	45

なお、菌株は結核菌 RFLP 解析検査実施要綱に基づき搬入されているが、会津保健所管内の 18 株は、この事業を開始する時点では、医療機関で保存されていたものであり、2000 年 12 月から 2003 年 10 月までに登録された患者由来株である。他の 27 株については 1 株が 2002 年、4 株が 2003 年、21 株が 2004

年、そして 1 株が 2005 年の新登録患者由来株であった。

対象とした 45 株の患者の年齢構成を表 2 に示す。

表 2 年齢階級別の菌株数

年齢階級	菌株数
10～14	1
15～19	2
20～29	4
30～39	4
40～49	5
50～59	8
60～69	6
70～79	7
80以上	8 *
合計	45

* *M. avium* を含む

方 法

1 菌株からの DNA 抽出

DNA の抽出は、小川培地上の菌体を集菌し、リゾチーム処理後、DNA 抽出キット ISOPLANT (ニッポンジーン) を用いて行った。また、DNA 抽出はバイオセーフティレベル 3 の施設内でクラス II B の安全キャビネットを使用して行った。

2 RFLP 分析

高橋の方法^{3, 4)}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 °C 4 時間のプレハイブリダイゼーション後、プローブ DNA を加え、65 °C 15 時間のハイブリダイゼーションを行った。メンブレン上の DNA の検出は、ハイブリダイゼーション後のメンブレンを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン液と室温で 20 分間反応後、化学発光物質を加え、X 線フィルムに感光させて検出した。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 (コスモバイオ社) でビオチン標識して用いた。DNA マーカーは、ベクター社の

Biotynylated DNA molecular weight markers を用いた。

結 果

45 株のうち、同一のパターンを示した例および接触者健診がされた例の RFLP パターンを図に示す。なお、図の M は DNA マーカーを示している。

図 1 のレーン No.1 と 19、図 2 のレーン No.2 と 17 は、それぞれ同一のパターンを示した。これらは同一保健所管内ではあるものの、疫学調査からは患者間の関連がみられなかった。

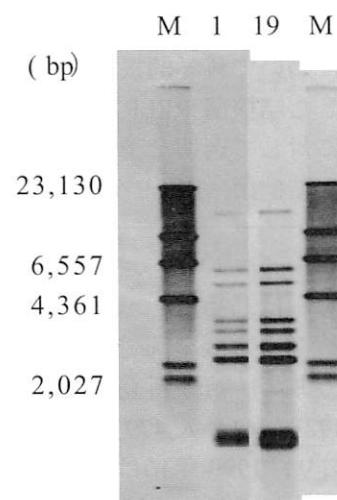


図 1 レーン No.1 と 19

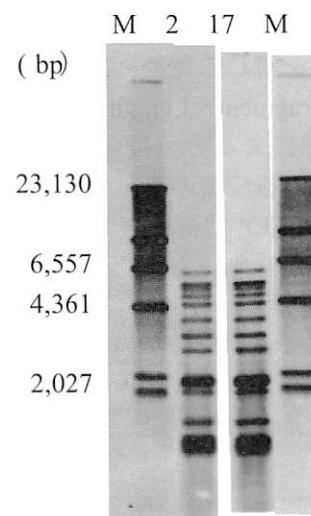


図 2 レーン No.2 と 17

図3のレーンNo.26と27、No.28と29は、それぞれ家族であり同一のパターンを示した。

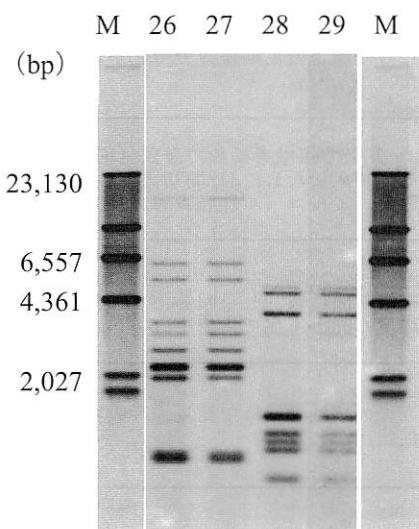


図3 レーンNo.26と27、28と29

図4には集団感染事例4株のRFLPパターンを示した。これらはすべて同一パターンを示した。この集団感染事例の疫学情報を表3に示した。

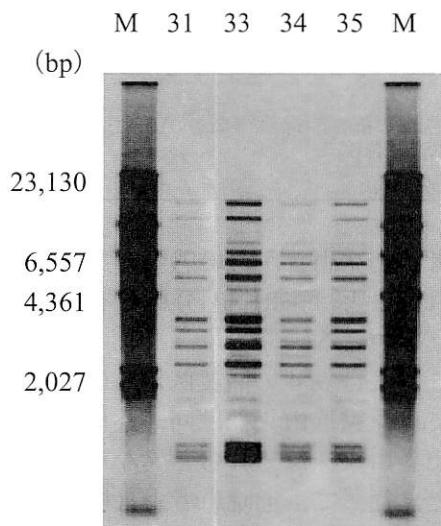


図4 集団感染事例

図5に示したRFLPパターンは、開業医が結核を発病し、その接触者健診がされた例である。レーンNo.30は開業医、レーンNo.42はその家族、レーンNo.45は開業医の通院患者由来株である。レーンNo.30と42は同一

パターンを示し、レーンNo.45はそれらと異なるパターンを示した。この事例の疫学情報を表4に示した。

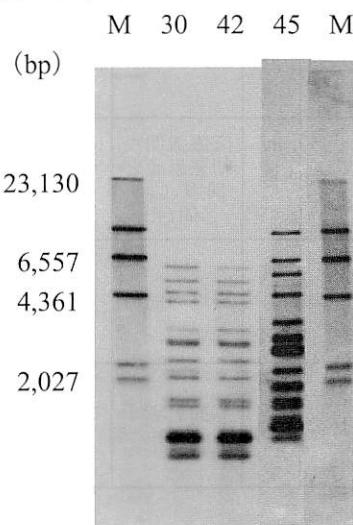


図5 感染事例

当所に結核菌として搬入された45株のうち、1株においてIS6110のバンドが検出されなかった。この菌株は結核菌ではない可能性が考えられたため、当所で抽出したDNAからの塩基配列解析を結核研究所にて実施した結果、この菌株は *Mycobacterium avium* (*M. avium*) であり、非結核性抗酸菌であることが判明した。なお、この患者からは結核菌も検出されていたことが医療機関で確認されている。

考 察

結核は結核菌を原因とする慢性の感染症であり、「微生物を含む飛沫が気化した後、5ミクロン以下の小粒子か粉塵粒子として浮遊する。これは空気の流れによって広く拡散する。」という空気感染⁵⁾である。従って患者（感染源）との接触が濃厚なほど感染の危険度も高くなり、密閉された空間では感染の可能性が高くなる。図3で同一パターンを示したレーンNo.26と27およびレーンNo.28と29はそれぞれ家族であり、患者から家族へ感染したことがRFLP分析により裏付けられた。しかし、図1に示したレーンNo.1と19および図2に示したレーンNo.2と17については、保健所管内は同じであるものの疫学調

表3 集団感染事例に関する疫学情報

No.	図4での レーンNo.	年齢	性別	初発患者と の関連	発病時期	診断時期	ガフキー 号数	備 考
1	31	46歳	男	初発患者	2003年12 月ころ	2004年6月	9	結核診査協議会で再撮影した結果、2003年12月の職場の定期検診で所見が認められた。
2	33	72歳	男	医療機関で 初発患者と 同室（3日 間）		2004年9月	塗抹 陰性	2ヶ月後の接触者検診で発見（培養+）。 発見時症状なし。3日間初発者と同室、糖尿病、アルコール性肝障害あり。
3	34	28歳	男	職場の同僚		2004年8月	塗抹 陰性	2ヶ月後の接触者検診で発見。症状なし。 接触時間は週2回、1回あたり10分から15分程度。高血圧症で治療中。
4	35	15歳	女	同居者 (娘)		2004年7月	塗抹 陰性	直後の接触者検診で発見。呼吸器系の自覚症状はなし。

表4 感染事例に関する疫学情報

No.	図5での レーンNo.	年齢	性別	初発患者と の関連	発病時期	診断時期	ガフキー 号数	備 考
1	30	64歳	男	初発患者 (開業医)	2004年1月	2004年6月	8	
2	42	33歳	男	家族		2004年11月	塗抹 陰性	職場検診にて肺に炎症性の所見がみられたため、気管支鏡洗浄液を検査したところ、PCRで陽性を示した。塗抹検査では陰性。培養で陽性。初発患者とは過去2年間で盆暮れに2~3泊の接触のみ。
3	45	53歳	女	開業医の通 院患者（頻 回通院者で はない）	2004年12月	2005年1月	5	6ヶ月後の接触者検診で要断層の所見あり。喀痰検査で結核菌検出。

査からは関連がみられなかった。このレーンNo.1と19については、患者の年齢がどちらも20歳代である、この管内では1998年に高校での集団感染事例が報告されている⁶⁾、この患者の一人はその集団感染事例の関連患者である、といった状況から、患者同士の関連がなくても、集団感染事例に何らかの関連があった可能性が推測される。

図4および表3の集団感染事例についてはすべて同一パターンを示し、初発患者からの感染による集団感染が裏付けられた。この事例においては、表3No.2の患者は医療機関で初発患者と3日間のみの接触であり、表3No.3の患者も職場が同じとはいっても濃厚接触とはいえない。これらの比較的薄い接触

の患者が初発患者からの感染であることが確認されたことは、RFLP分析の有用性を示すものだといえる。

図5および表4の開業医からの感染事例について、家族由来株は同一パターンを示し、通院患者由来株はそれらと異なるパターンを示した。従って、通院患者由来株は開業医からの感染とは異なる経路を有することが示された。この事例においては、図4・表3の事例とは逆に、一見初発患者からの感染が疑われる患者の感染源が初発患者ではなく別にあることが示された。このこともRFLP分析の有用性を示しているといえる。

このRFLP法について、高橋は時間がかかることと技術の熟練を要することが最大の欠

点であると述べるとともに、RFLP 法は培養陽性例に制限され、発症していない感染に対処できないため、情報供給源として一般的な疫学管理には向かないと述べている⁷⁾。しかし、RFLP 分析は結核対策上の有効な手段であることは明確であり、従来の疫学調査と統合して行うことが有意義であるとも述べている⁷⁾。

本県においても当所で実施した結核菌 RFLP 分析結果が、保健所や関係する医療機関において疫学調査の結果と合わせて活用されることにより、結核に対してより適切な予防対策が講じられると考える。

まとめ

2003 年 12 月から 2005 年 3 月末日までに当所に搬入された結核菌 45 株について、RFLP 分析法による分子疫学的解析を実施した結果、家族間の感染や集団感染について科学的根拠を与えることが可能となった。

結核菌 RFLP 分析は、従来の疫学調査の補助的手段かつ科学的根拠として、福島県結核対策推進指針の基本目標である結核罹患率の減少に貢献できるものと考える。

引用文献

- 1) 福島県保健福祉部健康衛生領域医療看護グループ. 結核のしおり 2004 ; No44.
- 2) 福島県保健福祉部健康衛生領域医療看護グループ. 結核のしおり 2003 ; No43.
- 3) 高橋光良. 結核分子疫学の成果と展望. 結核 2002 ; 77 : 741-752.
- 4) 高橋光良. RFLP 分析を用いた結核菌の分析疫学. 日本細菌学雑誌 1998 ; 53 : 662-668.
- 5) 矢野邦夫. 結核感染の予防策 (CDC の結核対策ガイド). INFECTION CONTROL' 99 別冊 1999 ; 130 - 134, .
- 6) 福島県結核対策推進協議会. 福島県の結核をとりまく現状. 福島県結核対策推進指針 2003 ; 1-8.
- 7) 高橋光良. 結核菌の分子疫学. 光山正雄, 編. 結核. 大阪 : 医薬ジャーナル社, 2001 ; 88 - 96.