

福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究 結核菌の RFLP 法による分子疫学的解析

須釜久美子 小澤奈美 渡邊奈々子 平澤恭子 大竹俊秀
微生物グループ

要 旨

2006 年度は，結核菌 26 株が当所に搬入された．Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析の結果，疫学的に関連のある事例の RFLP パターンが異なり，それぞれが異なる感染経路を有することが示された．また，集団感染事例の関連調査においては菌株および菌株情報のデータベースを活用し，結核菌 RFLP 分析の有用性を示すことができた．

キーワード：結核菌，RFLP 分析，RFLP パターン，集団感染，疫学情報

はじめに

福島県内で発生した結核について，科学的根拠を付与された結核対策の立案に資することを目的として，2002 年度より 2004 年度まで結核菌の Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析による分子疫学的調査研究事業を実施した．その結果，結核菌株のデータベースをさらに充実させる必要性があることから，引き続き 2005 年度からも RFLP 分析による結核菌の分子疫学的調査研究事業を実施している．

2006 年度は，結核菌 26 株が当所に搬入された．その多くは散発事例であるが，集団感染の関連調査事例については，前年度までのデータベースを基に RFLP 分析による解析を実施した．その結果について報告する．

方 法

1 結核菌からの 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 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^{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 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 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．

材 料

医療機関等で結核菌と同定された 26 株を用いた．保健所管内別搬入数を表 1 に示す．

表 1 結核菌の保健所管内別搬入数

保健所名	菌株数
県北	6
県中	0
県南	2
会津	4
南会津	0
相双	11
郡山市	3
いわき市	0
計	26

対象とした 26 株の患者の年齢階級および男女別菌株数を表 2 に示す。

表 2 年齢階級別および男女別菌株数

年齢階級	男	女	総数
10～19	0	0	0
20～29	1	5	6
30～39	3	1	4
40～49	1	0	1
50～59	5	0	5
60～69	0	0	0
70～79	2	1	3
80以上	5	2	7
計	17	9	26

結果

26 株のうち，患者間の関連調査および集団感染事例の関連調査の RFLP パターンを図 1 および図 2 に示す．なお，図の M は DNA マーカーを示している．

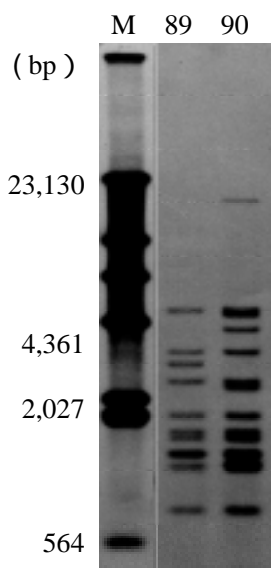


図 1 患者間の関連調査

図 1 のレーン No.89 と No.90 は，患者間と同じ時期に町内会の役員であったため RFLP 分析を実施した事例である．これらは異なる RFLP パターンを示した．

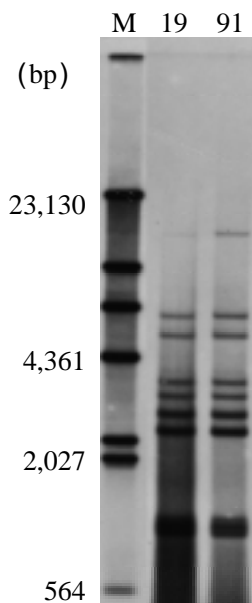


図 2 集団感染事例の関連調査

図 2 は 1998 年の集団感染事例の関連調査である．レーン No.19 は 2003 年度に搬入された菌株であり，レーン No.91 は 2006 年 11 月に搬入された菌株である．レーン No.19 と No.91 は同一の RFLP パターンを示した．この 2 例の患者及び関連事例の疫学情報を表 3 に示した．

相双保健所管内から，11 件の結核菌株が搬入されたが，それぞれに疫学的関連はなく，RFLP パターンもすべて異なった．

考察

図 1 に示した事例は，2 人の患者間に一定の接触がありながらも異なる感染経路の存在を示したものである．またこの 2 人はともに高齢者でもあることから，それぞれが内因性再燃によることも考えられる．

図 2 は 1998 年に発生した高校での集団感染事例の関連調査である．レーン No.19 (表 3 の患者 C) は表 3 患者 B の兄であり，レーン No.91 (表 3 の患者 D) は患者 A の従兄弟であり，また，患者 A と B は集団感染である．レーン No.19 (患者 C) とレーン No.91 (患者 D) の RFLP パターンが同一パターンを示したことは，レーン No.19 (患者 C) と No.91 (患者 D) の感染が 1998 年の高校での集団

表3 集団感染事例の疫学情報

	図2 での レーンNo.	登録年月	年齢 (登録時)	性別	関連	がフ- 号数	備 考
患者A	無	1998年4月	17歳	男	初発患者	10	患者Aと患者Bは1999年の結核研究所のRFLP分析で、同一パターンを示している。
患者B	無	1999年11月 2001年3月	18歳 20歳	男	患者Aと同学年	5 不明	患者Aの接触者検診の対象者で、1年後の検診まで異常なし。患者Aと同学年であったが、同じクラスではなかった。
患者C	19	1999年11月 2003年11月	25歳 29歳	男	患者Bの兄	不明 2	1999年頃に予防内服歴がある。
患者D	91	2006年6月	30歳	男	患者Aと接触有り(従兄弟)	10	職場検診で要精検。X-Pの結果異常所見がみられた。2002年から2003年にかけて家族に結核治療歴がある。

感染事例と関連していることを示唆している。しかし、患者 D については家族に結核治療歴があり、別の感染経路も考えられ、RFLP 分析により感染経路を検討する必要があると判断される。

患者 A および患者 B の結核菌株については、結核研究所に RFLP パターンの画像データと保存菌株があることから、その照合を依頼した。その結果、患者 A・B・C・D それぞれの RFLP パターンが同一パターンを示し、集団感染事例であることに科学的根拠が付与された。

今後、菌株および菌株情報のデータベースの充実とその活用により、結核菌 RFLP 分析の有用性がさらに高まると考えられる。

最後に、疫学情報等の提供をいただいた、県内各保健所の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1)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．
- 2)高橋光良．結核分子疫学の成果と展望．結核 2002；77：741-752．