

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 平澤恭子 熊谷奈々子 長沢正秋 渡部啓司
微生物グループ

要 旨

2005 年度は、結核菌 22 株が当所に搬入された。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 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析による解析を実施した。その結果、感染経路を推定しえた事例もあった。

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、予防対策に有意義であると考えられる。そして、RFLP 分析で得られた情報が、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、RFLP 分析の有用性がさらに高まると考える。

キーワード：結核菌，RFLP 分析，RFLP パターン，集団感染

はじめに

福島県内で発生した結核について、科学的に正確な感染拡大防止対策を講じるため、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、家族間の感染や集団感染において、従来の疫学調査では確定できなかった感染について、科学的根拠を示すことが可能となった。しかし、県内の結核の疫学状況解明のためには、さらに医療機関等の協力を得て結核菌株の提供を受け、RFLP 分析を実施し、結核菌株のデータベースを充実させる必要がある。このため引き続き 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。

2005 年度は、結核菌 22 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 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^{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 °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。

材 料

医療機関等で結核菌と同定された 22 株を用いた。保健所管内別では表 1 に示すとおり、

県北保健所管内が 17 株，県中保健所管内が 1 株，会津保健所管内が 2 株，相双保健所管内が 1 株そして郡山市保健所管内が 1 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	17
県中	1
県南	0
会津	2
南会津	0
相双	1
郡山市	1
いわき市	0
合計	22

対象とした 22 株の患者の年齢階級別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	1	0	1
20～29	2	0	2
30～39	0	0	0
40～49	0	1	1
50～59	3	0	3
60～69	1	0	1
70～79	4	4	8
80以上	3	3	6
計	14	8	22

結 果

22 株のうち，集団感染との関連調査事例および患者間の関連調査事例の RFLP パターンを図 1 から図 3 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.31 は 2004 年の集団感染の初発患者であり，2004 年に搬入された菌株である。レーン No.64 はその初発患者と職場が一緒ではあるものの，接触がない患者由来の菌株である。これらはほぼ同一のパターンを示した。表 3 にその疫学情報を記した。

図 2 に示した RFLP パターンは，同じ病院で 4 日間同室だった患者間の関連調査結果で

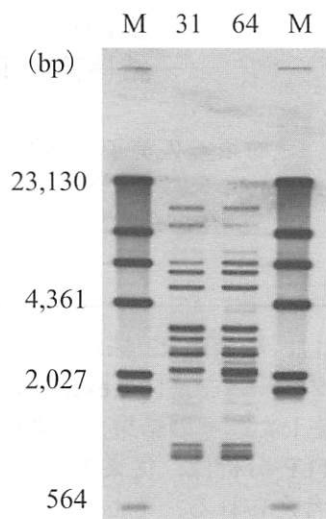


図 1 集団感染事例

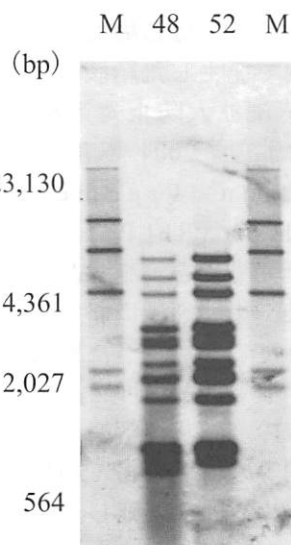


図 2 関連調査：同じ病院で同室

ある。レーン No.48 (患者 B) とレーン No.52 (患者 A) は，患者 B が慢性骨髄性白血病で入院していたところに患者 A が入院し，患者 A が結核と診断されるまでの 4 日間同室であった。これらは同一系統の菌株と考えられるパターンを示した。

図 3 には判定不能例を示した。レーン No.20 は，2002 年の集団感染の接触者検診対象者であり，2004 年に搬入された菌株である。レーン No.53 はその集団感染事例の初発患者の家族由来株である。レーン No.53 の菌株は，何らかの原因で劣性発育となった状態

表3 集団感染事例の疫学情報

No.	図1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読影した結果、2003年12月の職場の定期検診で所見が認められた。
2	64	25歳	男	職場は一緒 だが接触なし		2005年11月	塗抹 陰性	結核診査協議会にて、2005年6月の職場検診の胸部XPを昨年度と比較読影し、要精検の指示あり。11月に喀痰培養陽性となり肺結核と診断。

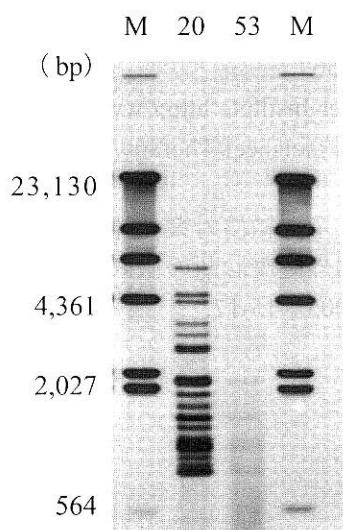


図3 判定不能例

で当所に搬入されたため、抽出した DNA では RFLP 分析の判定ができなかった。菌株を継代培養し再検査を試みたが、同様の状況であった。この事例については、レーン No.53 が結核菌であることの確認をする目的で、Elizabeth A.Talbot らが報告している Polymerase chain reaction (PCR) 法³⁾を実施した。図4に示すとおり、レーン No.53 は結核菌であることが確認された。

考 察

2005年(暦年)の県内の結核新登録者数(概数)は、昨年から51人減少の281人である。この新登録者のうち塗抹陽性患者は約100人である。このうち培養が陽性となり、その菌株が結核菌と同定され、RFLP分析が可能となる患者はさらに少ない状況である。また、2005年の県内の結核罹患率は13.4で

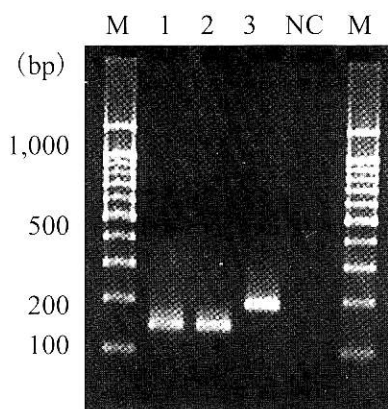


図4 結核菌とBCGとの鑑別

レーン No.1 : No.53 (150bp)
 レーン No.2 : 結核菌 (150bp)
 レーン No.3 : BCG (200bp)
 NC : Negative Control
 M : DNAマーカー

あり、減少は鈍化傾向にある。この傾向は全国と同様であり、その背景に集団感染疑い事例の散発が推測される。

図1は、2004年の集団感染の初発患者由来菌株と、その約1年後に実施された職場検診で発見された患者由来菌株とのRFLPパターンである。初発患者と職場検診で発見された患者は、職場は一緒であるものの接触はないと思われていたが、RFLP分析でほぼ同一のパターンを示したことから、その関連が明らかとなった。この集団感染事例の初発患者は、喀痰の塗抹検査でガフキー9号であり、今回のRFLP分析の結果からも、今後の感染拡大防止対策が非常に重要であると考えられる。

図2は、同じ病院で4日間同室であった患

者間の RFLP パターンである。患者 B は慢性骨髄性白血病で免疫抑制状態にあり、結核に対してハイリスク患者であったことは明確である。RFLP パターンから同一系統の菌株と考えられたが、患者 A と B がいつ感染したか、どちらからどちらに感染したかは、今回の結果から判断することはできない。しかし、病室が一緒だった際に感染した可能性は極めて高いと思われる。

図 3 は 2002 年の集団感染関連調査の RFLP パターンであり、初発患者登録から 3 年後に患者家族が検診にて要精検となった事例である。レーン No.53 の菌株が劣性発育の状況で搬入となった原因を明らかにすることはできなかったが、結核菌であることが確認できた。現在、市販の抗酸菌同定法では結核菌と *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) とを鑑別することができない。臨床においては、BCG は表層性膀胱癌の手術後に免疫反応を刺激することで作用する生物療法として使われている⁴⁾。この生物療法は、BCG の溶液剤が膀胱内に注入されるため、患者の尿中から数日経っても抗酸菌が出続ける場合、それが、BCG なのかあるいは結核菌なのかを鑑別する意義は非常に大きい。また、乳幼児の BCG 接種後の副作用に対してもその鑑別の意義は大きい。今回、鑑別法を確立したことにより、今後の活用が可能となった。

結核予防法が一部改正され、2005 年 4 月 1 日に施行された。その中で、県における予防計画を定めることが義務づけられたことから、「福島県結核予防計画」が策定され、各種対策が講じられている。その予防計画において、当所での結核菌 RFLP 解析を推進し、定期外健康診断計画の精密化を図る必要性が述べられている⁵⁾。今回、集団感染関連調査事例もあったが、前年度までの菌株情報を融合させたデータベースの活用により感染経路を推定しえた事例もあった。

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、予防対策に有意義であると考えられる。そして、RFLP 分析で得られた情報が、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、RFLP 分析の有用性がさらに高まると考える。

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.
- 3) Elizabeth A.Talbot, Diana L.Williams, Richard Frothingham. PCR Identification of *Mycobacterium bovis* BCG. J.Clin.Microbiol 1997 ; 35 : 566-569.
- 4) National Cancer Institute <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/biological> 2006/2/10
- 5) 福島県. 第三章 結核対策の課題及び施策の展開 2 定期外健康診断の徹底. 福島県結核予防計画 2005 ; 15-17.