

結核菌の制限酵素多型分類：第三報；3年半の分析結果

川合 常明 廣地 敬 大谷 倫子 藤田 晃三
赤石 尚一^{*1} 高瀬 愛子^{*1} 品川 雅明^{*2} 松本 英伸^{*3}

要 旨

平成 11 年 3 月～平成 14 年 12 月までに市内の医療機関 2 施設において結核患者から分離された結核菌株 272 株について Restriction fragment length polymorphism, 制限酵素断片長多型解析を行った。

クラスター分析の結果, 類似度 90%以上のクラスター数は 47 種類, 146 株 (53.7%) であり, そのうち類似度 100%のクラスター数は 29 種類, 73 株 (26.8%) であった。

類似度 90%以上の 146 株について保健所の疫学調査結果とすり合わせ検討したところ集団感染が疑われた事例及び家族内感染例では 6 事例 13 株が類似度 100%であり, それぞれ同じ型の結核菌による感染であることが確認された。

本解析においては, 患者の同意を得て検体の提供を受けているが, 同意が得られた割合は 52.6%と低いことから, 感染源を特定するために十分な調査を行うことは難しかった。しかし, 本解析の目的は結核の蔓延防止であり, 培養陽性者の全菌株を検査することに意義があると考えられる。そのため, 現在行っている患者の同意を得ることの必要性について整理する必要があると考えられた。また, 早期に十分な疫学情報を得るとともに, RFLP 検査を迅速に実施できるように検討することが必要と考えられた。

1. 緒言

結核の集団発生及び散発的発生においては, 同一感染源であるかなど関連性を明らかにするために, 遺伝子型別法による制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism, 以下 RFLP) が疫学的解析に用いられている^{1, 2)}。

平成 11 年 3 月から結核予防対策の一環として市内の 2 医療機関において分離された結核菌の RFLP 解析を行い, その結果を既に第 2 報³⁾として報告したが, 今回, 新たに追加した分と合わせて解析を行ったので報告する。

2. 方法

2-1 供試菌株

平成 11 年 3 月～平成 14 年 12 月までに市内の医

療機関 2 施設において, 結核患者から分離され RFLP 解析を行うことに同意が得られた結核菌株 272 株を用いた。

2-2 方法

検査方法は前報と同様に行った^{4, 5)}。また今回からクラスター分析は画像解析用ソフト FingerprintingTM (BIO-RAD) を用い, 系統樹の構成は距離行列法の Unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) により解析を行った。

また, 単一のバンドを示した株については制限酵素 *Sma* で切断し, プローブ Polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS)^{6, 7)} を用いてハイブリダイゼーションを行い, 前記と同様 DNA 断片を検出し解析を行った。

1 札幌市保健所

2 国立療養所札幌南病院

3 北海道社会保険病院

3. 結果

3-1 RFLP 解析検体及び年齢構成について

平成 11 年 3 月～平成 14 年 12 月までの新登録肺結核患者のうち喀痰塗抹陽性者は 703 名であった。このうち結核菌培養陽性者（以下、培養陽性者）は 517 名おり、272 名（52.6%）について RFLP 解析を行った。年齢幅は 18～104 歳で平均年齢は 60.8 歳（最頻値 77 歳）であった。年齢分布で多かったのは 70 歳代が 71 名、80 歳代以上が 47 名、60 歳代が 41 名の順であった（図 1）。

3-2 クラスタ分析について

バンドパターンの類似性についてクラスタ分析を行った結果、バンドが 1～3 本違いで類似性の高い類似度 90%以上のクラスタ数は結核菌由来 IS6110 の PCR 産物をプローブとした分析（以下 IS6110）によるものが 45 種類・138 株（53.3%）あり、また PGRS をプローブとした分析（以下 PGRS）によるものが 2 種類・8 株あった。そのうちバンドパターンが一致した類似度 100%のクラスタ数は IS6110 が 27 種類・68 株（25.0%）あり 1 クラスタあたりの株数 2～7 であり、また PGRS が 2 種類・5 株であった（表 1）。

類似度 90%以上及び 90%未満の株について年代別に比較すると、類似度 90%以上で多かったのは 20 歳代が 23 名中 19 名（82.6%）、40 歳代が 22 名中 15 名（68.2%）であったが、50 歳代以上ではほぼ同率であった（図 2）。

3-3 疫学的な関連性について

類似度 90%以上のクラスタの 146 株について保健所の疫学調査結果とすり合わせ検討したところ、3 事例 6 株で関連性が判明し、第 2 報³⁾で報告したものと合わせて 6 事例 13 株が同一感染と確認された（表 2）。

1 例目は学校内で 2 名が感染した事例で、1 名が平成 13 年 1 月頃発病し、その後平成 14 年 4 月にもう 1 名が発病した。2 名は学年が違い、学校以外では接触する機会は無かったが RFLP 解析の結果、バンドパターンが一致した。2 例目は同居の祖母と孫

の家族内感染であり、RFLP 解析の結果では類似度は高く 93%であった。3 例目は知人関係の 2 名の事例で、1 名が平成 13 年 2 月頃発病した後、その患者の弟の友人が平成 13 年 3 月頃発病した。友人は患者の弟の家に頻繁に出入りをしており感染した。RFLP 解析の結果でもバンドパターンが一致し（図 3）、3 事例ともそれぞれ同一感染であることが判明した。

4. 考察

クラスタ分析の結果、20 及び 40 歳代のそれぞれ 82.6%、68.2%が類似度 90%以上のクラスタに属しており、40 歳代以下の RFLP 解析は疫学的に重要な指標になるものと考えられた。

また、類似度 90%以上の 146 株について疫学調査結果から 6 事例 13 株の関連性が判明し、同一感染と確認され、そのほとんどが類似度 100%であった。

しかし、類似度 100%の 73 株中 60 株（82.2%）については疫学調査結果から、関連性を見出すことができなかった。その原因として、感染から検査結果判明までに 6 ヶ月以上と長時間を要し詳細な疫学調査が困難であったこと、肺結核の既往歴がある 24 名のうち 60 歳以上が 22 名（91.7%）いたが、初発時の菌株を得ることができなかったこと、

流行株（ある地域内で同一クラスタによるアウトブレイクがあった場合）に感染した場合は特に関連性がない患者間においてもバンドパターンは一致すると考えられること、等が考えられた。

これらのことから、詳細な情報が得られるように発病初期の十分な疫学調査及び他の地域の RFLP 解析情報等が必要である⁸⁾。また、RFLP 検査では培地上の菌の発育が不良の場合等そのまま検査に供することができないことから培養の継続あるいは再分離が必要であり、検査結果の判明まで長時間を要した。今後、できるだけ迅速に検査を実施できるよう検討する必要があると考えられた。

現在、本解析については患者から同意を得て実施

しているが、同意が得られた各年代の割合は10歳代が33%で最も低く、最も高い40歳代でも69%に過ぎず、全検体では52.6%と低いことから、隠れた集団感染あるいは散発感染事例等において感染源を特定するのは困難と考えられた。

結核菌のRFLP解析結果の活用は結核予防のための活動であるため「ヒトゲノム・遺伝子解析の研究に関する倫理指針」⁹⁾及び「疫学研究に関する倫理指針」¹⁰⁾の適用は受けないとされている¹¹⁾。

本解析は集団発生時の疫学調査及び接触者調査等、結核の蔓延防止を目的としており、培養陽性者の全菌株を検査することに意義があると考えられる。そのため、現在行っている患者の同意を得ることの必要性について整理する必要があると考えられた。

また、全国的あるいは地域的な流行株や流行状況の把握のため結核菌RFLPネットワークの構築を期待したい。

5. 結語

平成11年3月～平成14年12月までに市内の医療機関2施設より提供された結核患者からの分離株272株についてRFLP解析を行った。

患者の平均年齢は60.8歳、年齢幅は18歳～104歳で年齢分布では70歳代が最も多かった。

クラスター分析の結果、類似度100%のクラスター数はIS6110が27種類、68株(25.0%)であり、PGRSが2種類、5株、計29種類、73株(26.8%)であった。1クラスター当たりの株数は2～7株であった。

類似度90%以上のクラスターの146株について保健所の疫学調査結果から6事例13株の関連性が判明し、同一感染であると裏付けられた。

今後、RFLP解析データの蓄積を行い、結核予防対策に有効に活用されるよう継続していきたい。

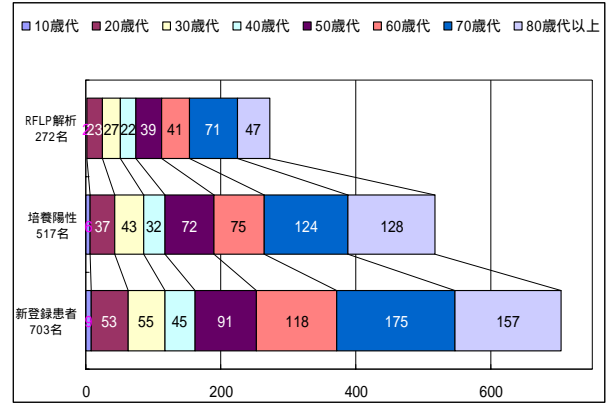


図1 年齢構成

表1 類似度90%以上のクラスター数及び検体数

類似度	クラスター数	株数
類似度90%以上	47	146
類似度100%を含む	IS6110	45
	PGRS	2
類似度100%	29	73
	IS6110	27
	PGRS	2

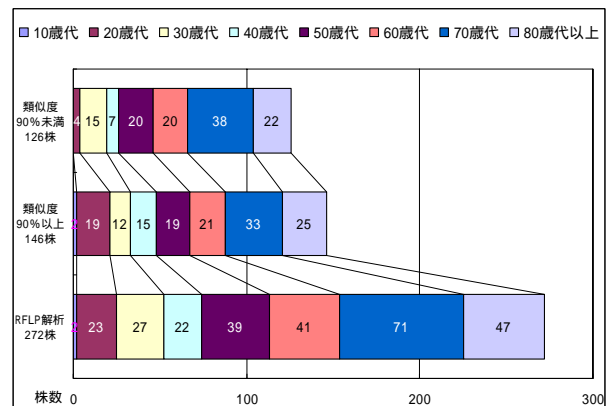


図2 クラスター分析による類似度及び年齢構成

表2 類似度 100%の患者の疫学調査結果

クラスターNo.	検体No.	性別	年齢	発病時期	既往歴	疫学調査結果
1	232	男	20	H14.5		
	250	男	57	H14.6		
2	137	男	20	H13.1		No.221と同じ学校に通学：事例1
	221	男	21	H14.4		No.137と同じ学校に通学：事例1
3	23	男	76	H11.3	有	
	30	男	18	H11.6		
4	193	男	58	H13.9		
	213	男	71	H13.10	有	
	226	男	88	H14.1	有	
5	183	男	50	H13.5		
	243	女	37	H14.4		
6	7	男	50	H11.1		
	20	男	67	H11.4		
	24	女	82	H11.5	有	*1：事例2
	117	女	96	H12.10		
7	18	女	76	H11.1	有	
	85	女	45	H11.11		No.86の妻：事例3
	86	男	44	H11.9		No.85の夫：事例3
8	94	男	61	H12.4		No.104の叔父，H13.9弟肺結核：事例4
	104	男	36	H12.7		No.94の甥：事例4
9	166	女	60	H13.6	有	
	203	女	51	H13.11		
10	116	男	50	H12.8		
	129	男	29	H12.12		
11	3	男	59	H11.2		
	180	男	67	H13.7		
12	170	男	83	H13.6		
	265	女	21	H14.6		父肺結核
13	161	男	66	H13.6	有	
	252	男	46	H14.5		
14	101	男	27	H12.6		
	201	女	72	H13.6	有	
15	48	男	52	H11.9		
	80	男	34	H12.4	有	
16	国131	女	69	H10.11	有	A病院に入院：事例5
	国130	男	76	H10.3		A病院に入院：事例5
	75	男	72	H12.2		A病院に入院：事例5
17	15	女	40	H11.1		
	107	女	46	H12.9	有	
	111	男	30	H12.1		
	123	男	50	H12.10		
	140	男	51	H13.3		H10.7妻結核
18	26	男	41	H11.5		
	53	男	43	H11.4		
19	168	男	60	H13.4		
	181	男	39	H13.7		
20	133	男	80	H12.6	有	

クラスターNo.	検体No.	性別	年齢	発病時期	既往歴	疫学調査結果
21	246	女	82	H14.7	有	
	14	男	25	H11.4		
	39	女	86	H11.7		
22	62	男	72	H11.11	有	
	79	男	23	H12.4		
	114	男	67	H12.8		4～5年前非結核性抗酸菌症
23	13	男	84	H11.1		
	34	男	77	H11.6	有	
24	139	女	22	H13.2		No.228の知人：事例6
	143	女	73	H13.3	有	
	152	男	65	H13.4	有	
	153	女	42	H12.10		
	210	男	87	H13.9		H14.6長男結核
	228	男	19	H13.3		No.139の知人：事例6
	241	男	62	H14.2	有	
25	227	男	77	H14.1	有	
	273	男	78	H14.8	有	
	202	女	78	H13.12		
26	214	男	84	H13.9		
	239	男	77	H14.2	有	
27	244	男	79	H13.6		
	142	男	82	H12.12	有	
28	266	女	26	H14.5		
	204	女	69	H13.11	有	
29	234	女	48	H14.1		H12～C X - P経過観察
	248	男	77	H14.4	有	

関連性あり

*1 No.24の孫(30歳,発病時期H11年11月,既往歴なし)は類似度93%を示した。

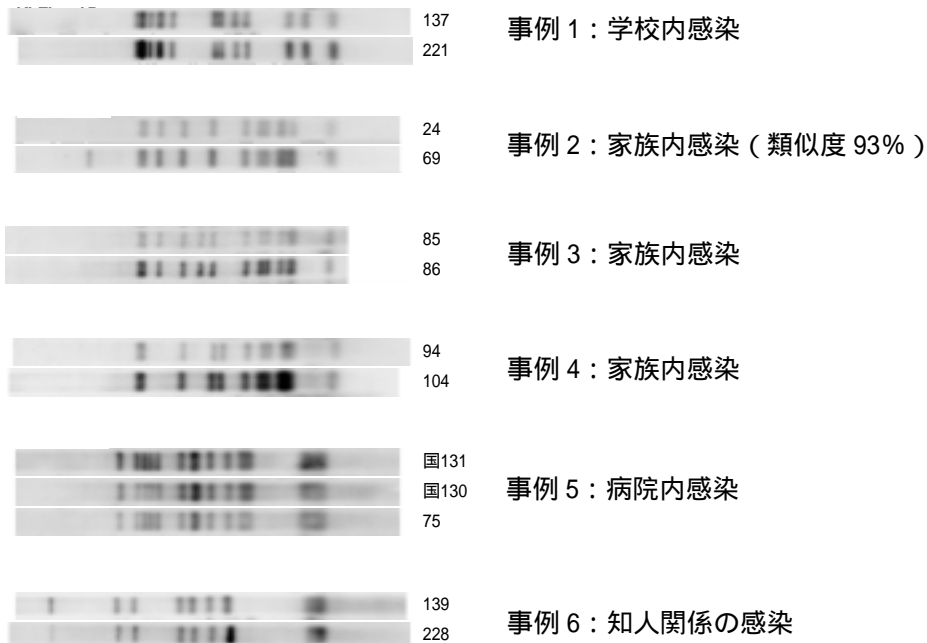


図 3 疫学調査の結果，関連性が判明した菌株の RFLP 画像

6. 文献

- 1) 高橋光良: 呼吸器疾患・結核, 資料と展望, No. 17, 1996.
- 2) Hermans PWM, Van Soolingen D, Dale JW et al: Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis, *J Clin Microbiol*, 28, 2051-2058, 1990.
- 3) 川合常明, 廣地敬, 赤石尚一他: 結核菌の制限酵素多型分類: 第2報; 分析結果報告, 札幌市衛研年報, 28, 53-57, 2001.
- 4) 高橋光良, 阿部千代治: IS タイピング法: IS6110 をプローブとした RFLP 分析による結核菌の亜分類, 日細誌, 49, 853-857, 1994.
- 5) 川合常明, 廣地敬, 赤石尚一他: 結核菌の制限酵素多型分類: 第1報; 方法の検討, 札幌市衛研年報, 27, 52-56, 2000.
- 6) Bruce C. Ross, Kerry Raios, Kathy Jackson et al: Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool, *J Clin Microbiol*, 30, 942-946, 1992.
- 7) Cousins D, Williams S, Liebana E, et al: Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis, *J Clin Microbiol*, 36, 168-178, 1998.
- 8) 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.
- 9) 文部科学省, 厚生労働省, 経済産業省: ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針, 2001.
- 10) 文部科学省, 厚生労働省: 疫学研究に関する倫理指針, 2002.
- 11) 文部科学省, 厚生労働省: 疫学研究に関する倫理指針, 疑義回答一覧, 2002.

Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on *Mycobacterium tuberculosis*: Report No. 3 ; The Result of the Examination

Tsuneaki Kawai Takashi Hirochi Tomoko Otani Kozo Fujita
Shoichi Akaishi^{*1} Aiko Takase^{*1} Masaaki Shinagawa^{*2} Hidenobu Matsumoto^{*3}

We conducted the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of 272 strains of *Mycobacterium tuberculosis* which were isolated at two hospitals in Sapporo city from March 1999 to December 2002.

146 strains were classified into 47 clusters with more than 90% of similarity. 73 strains were classified into 29 clusters with the identical pattern. Six instances involving 13 cases were considered to be infected from the same source in respective endemics through epidemiological information.

We collected those strains with informed consents from patients from the beginning of this project. However, it was difficult to perform enough investigation to identify the source of infection through the RFLP results in the limited numbers of isolated organisms with consents (52.6%). All of isolated organisms have to be analyzed for the prevention of spread of tuberculosis. And also, more accurate and earlier epidemiological information and more speedy analysis are required.

1. Health Center of Sapporo City
2. Sapporo South National Hospital
3. Hokkaido Social Institute Hospital