

結核菌の制限酵素多型分類：第四報；5年間の分析結果

Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on *Mycobacterium tuberculosis*: Report No. 4; The Result of Analysis for Five years

生活科学課 川合 常明 廣地 敬
高瀬 愛子*¹ 品川 雅明*² 松本 英伸*³

1. はじめに

平成 11 年 3 月から開始した結核菌の RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 解析^{1,2)} は結核の集団及び散発的発生において、同一感染源であるかなど疫学調査並びに結核の蔓延状況を把握するなど結核予防対策の充実に役立てることを目的として行っている。

これまで、市内の協力医療機関 2 施設において分離された結核菌について RFLP 解析を行い、その結果を既に第 3 報³⁾として報告したが、今回、新たに追加した菌株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 月から平成 16 年 1 月までの 4 年 11 カ月間に、市内の協力医療機関 2 施設において、結核予防法に基づいて命令入所した結核菌培養患者のうち RFLP 解析を行うことに同意が得られた患者から分離された結核菌株は、今回新たに 74 株あり、計 350 株を用いた。

クラスター分析には、RFLP 解析の結果バンドが認められなかった 1 株、バンドがスメア状で検査不能の 2 株及び菌量不足で検査不能の 1 株、計 4 株を除く

346 株を用いた。

2-2 方法

前報と同様に高橋らの方法^{4,5)}に従い、制限酵素 *Pvu* を用い IS6110 をプローブとした RFLP (以下、IS6110-RFLP) 解析を行った。また、単一バンドを示した株についても前報と同様に制限酵素 *Sma* を用い PGRS^{6,7)} をプローブとした RFLP (以下、PGRS-RFLP) 解析を行った。

クラスター分析は第 3 報³⁾と同様に行った。

3. 結果

3-1 RFLP 解析検体の年齢分布

平成 11 年 3 月から平成 16 年 1 月までの結核予防法による命令入所者は 837 名であった。このうち結核菌培養陽性者は 665 名おり、RFLP 解析を行ったのは 350 名 (52.6%) であった (表 1)。年齢幅は 18 歳から 104 歳で、平均年齢は 61.4 歳 (最頻値 77 歳)、年齢分布で多かったのは 70 歳代 93 名、80 歳以上 59 名、60 歳代 59 名の順であった。

年代別で RFLP 解析の実施率が高いのは 40 歳代 38 名中 28 名 (73.7%) で、30 歳代 51 名中 33 名 (64.7%) であった。一方、低いのは 80 歳以上 169 名中 59 名 (34.9%) で、50 歳代 86 名中 47 名 (54.7%)

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

60歳代 102名中 59名(57.8%)、70歳代 163名中 93名(57.1%)であった(図1)。

3-2 IS6110-RFLP 解析コピー数の分布

コピー数の分布は1~21で、平均値10.4(最頻値12)であり、多かったのは12コピーが68株(19.7%)、次いで11コピーが65株(18.8%)であった(図2)。

また年齢別のコピー数においても同様な分布を示した。

3-3 クラスタ分析

バンドパターンが一致して類似度100%のクラスターを形成したのはIS6110-RFLP解析で28種類102株、PGRS-RFLP解析で2種類8株、計30種類110株あり、クラスター形成率は346株中110株(31.8%)であった(表2)。

年代別のクラスター形成率は10歳代が2株中2株100%、20歳代が29株中14株48.3%で、低いのは70歳代が91株中22株24.2%であった(図3)。

また、クラスター別の年齢分布は、ほとんどが10歳代から80歳以上の分布を示しており、クラスターによる年代の違いは認められなかった。

1 クラスタあたりの株数(以下、クラスターサイズ)は2から11であり、クラスターサイズ2の菌株が多く24種類48株(43.6%)、次いでクラスターサイズ3が9種類27株(24.5%)であった。

また、クラスターサイズ11の大きいクラスター

が1種類11株あり、次いでクラスターサイズ6が2種類12株あった(表3)。

3-4 疫学調査結果による関連性

クラスター分析の結果、類似度100%を含む類似度90%以上を示したクラスター60種類215株及び保健所の疫学調査結果を照合したところ、新たに6事例12株の関連性が判明し、第3報³⁾と合わせて13事例27株が同一菌による感染と確認された(表4)。

各事例のRFLPバンドパターンを図4に示した。
 事例1: クラスタ 34は義兄弟で勤務先が同じであり、バンド1本の違いで類似度96%であった。
 事例2: クラスタ 36は父親と息子の家族内感染であり、2つのバンドパターン間に1カ所ずれがあり類似度89%であった。
 事例3: クラスタ 43は夫婦の家族内感染であり、バンド1本の違いと2つのバンドパターン間に1カ所ずれがあり類似度84%であった。
 事例4: クラスタ 56は再発した患者であり、類似度100%であった。
 事例5: クラスタ 58は兄弟の家族内感染であり、類似度100%であった。
 事例6: クラスタ P1は病院職員で同一病棟に勤務しており病院内感染であった。なお、クラスター P1はIS6110-RFLP解析では単一バンドであったため、PGRS-RFLP解析を行い類似度100%と判明した。

表1 RFLP 解析実施状況

| | 命令入所者(人) | 結核菌培養陽性者(人) | RFLP 解析(人) | RFLP 実施率(%) |
|---------------------|----------|-------------|------------|-------------|
| 男 | 567 | 455 | 250 | 54.9 |
| 女 | 270 | 210 | 100 | 47.6 |
| 計 | 837 | 665 | 350 | 52.6 |
| 平成15年分再掲(平成16年1月まで) | | | | |
| 男 | 113 | 95 | 59 | 62.1 |
| 女 | 48 | 38 | 15 | 39.5 |
| 計 | 161 | 133 | 74 | 55.6 |

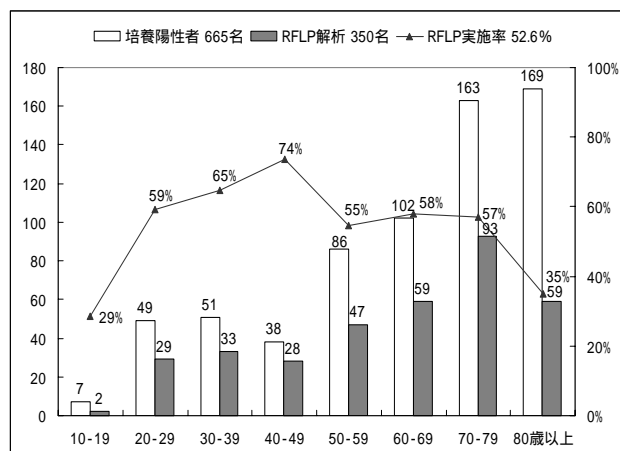


図1 RFLP 解析年齢分布

4. 考察

平成 15 年 1 月から平成 16 年 1 月までの 74 株を加えた計 350 株について RFLP 解析を行った。

本解析を行ったのは、培養陽性者 665 名のうち同意が得られた 350 名 (52.6%) であり、年齢分布で同意率が高いのは 20 歳代から 40 歳代で約 60% から 70% 以上であるのに対し、50 歳以上では 30% から 58% と低く、第 3 報³⁾ とほぼ同様であった。また、男女別では女性の培養陽性者は男性に比べ少なく、RFLP 解析の同意率も 210 名中 100 名 (47.6%) と低かった。

クラスター分析の結果、類似度 100% のクラスター形成率は 20 歳代が高く 48% であったが、30 歳以上では 29% から 37% であったことから、とくに 20 歳代の感染の広がりが推測された。

クラスター別の年齢分布ではクラスター間に年代の違いがないことから、感染のほとんどが結核患者の多くを占める高齢患者から年代の低い未感染者に感染したことが考えられた。

クラスターサイズ 11 や 6 の大きいクラスターでは毎年、クラスターに一致する株が確認され、これらの株の感染が何らかの要因で継続されていたことが考えられ、今後は疫学調査を行ってその要因を調査する必要があると考えられた。一方、1999 年及び 2000 年にクラスターサイズ 2 や 3 の小さいクラスターを形成したもののうち 2001 年以降これらのクラスターに一致する株が確認されなくなったクラスターは 7 種類 22 株あった。このことは、これらの株の感染が散発的なものでその後の感染がなかったか、あるいは変異株の出現により新たなクラスターが形成されたものと考えられた。

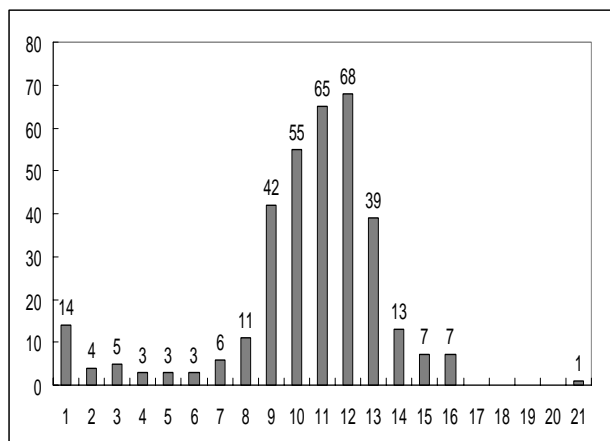


図 2 IS6110-RFLP 解析コピー数の分布

表 2 クラスター分析結果

| 類似度 | クラスター数 | | 株数 |
|--------------------|--------|------|-----|
| | IS6110 | PGRS | |
| 100% | IS6110 | 28 | 102 |
| | PGRS | 2 | 8 |
| | 計 | 30 | 110 |
| 90%以上 (100%を含む) | IS6110 | 58 | 205 |
| | PGRS | 2 | 10 |
| | 計 | 60 | 215 |

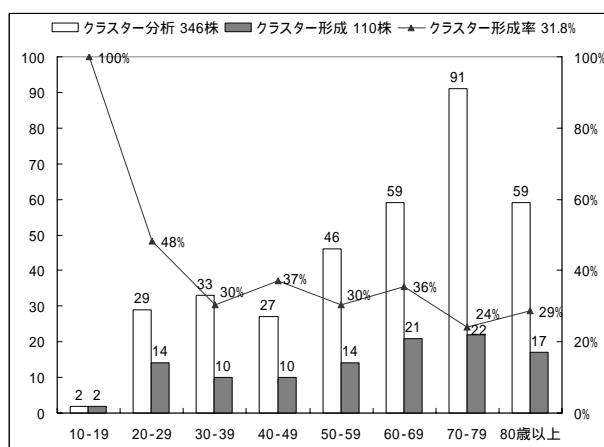


図 3 年齢別のクラスター形成率

表3 類似度 100%を示したクラスターの菌株採取年及びクラスターサイズ

| クラスターNo. | 1999年 | 2000年 | 2001年 | 2002年 | 2003年 | クラスターサイズ (株数) |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| 1 | | 1 | | 1 | | 2 |
| 3 | | | | 2 | | 2 |
| 4 | 2 | | | | | 2 |
| 5a | | | 2 | | | 2 |
| 5b | | | 1 | 1 | | 2 |
| 7 | | | | 1 | 1 | 2 |
| 10 | 1 | 2 | | | | 3 |
| 11 | 3 | 1 | 1 | | 1 | 6 |
| 12 | | 2 | | | | 2 |
| 15 | 1 | 3 | 2 | | | 6 |
| 17 | | | 2 | | 2 | 4 |
| 19a | | | 1 | 2 | | 3 |
| 19b | 1 | | 1 | | | 2 |
| 19c | | | | 1 | 1 | 2 |
| 21a | 3 | | | | | 3 |
| 21b | 1 | 2 | | | | 3 |
| 22a | | | | 1 | 1 | 2 |
| 22b | | 1 | 2 | | | 3 |
| 23 | 2 | | | | | 2 |
| 24 | | 1 | 1 | | | 2 |
| 30 | 2 | | | | | 2 |
| 31 | | | 2 | 1 | | 3 |
| 33 | | 1 | | 1 | | 2 |
| 34a | | | 1 | | 1 | 2 |
| 34b | | | 2 | | | 2 |
| 36a | | | 1 | 1 | | 2 |
| 36b | 1 | | 7 | 1 | 2 | 11 |
| 37 | | | 1 | | 1 | 2 |
| 41a | 1 | 2 | | | | 3 |
| 41b | 2 | | | | | 2 |
| 51 | | | | | 2 | 2 |
| 53 | | | 2 | | | 2 |
| 55 | 1 | | | 1 | | 2 |
| 56a | | | 2 | 1 | | 3 |
| 56b | | | 1 | | 1 | 2 |
| 57 | | | | 2 | 1 | 3 |
| 58 | | | | | 2 | 2 |
| P1 | | | 1 | 2 | 1 | 4 |
| P2 | | | 1 | 3 | | 4 |
| 合計(株数) | 21 | 16 | 34 | 22 | 17 | 110 |

今回、類似度 90%以上の 205 株について疫学調査の結果、新たに 6 事例 12 株の関連性が判明した。1 事例は病院内の感染であり、他 5 事例は家族内感染で、このうち 2 事例はバンドパターン間にずれがあり類似度 90%未満であったが、疫学調査の結果から関連性を見出すことができた。しかし、類似度 100%の 110 株中 83 株(75.5%)は第 3 報³⁾と同様、疫学調査においても関連性が見出せなかった。

過去約 5 年間の本解析と疫学調査で集団発生が疑われた 13 事例 27 株について関連性が判明し同一感

染であることが裏付けられた。

今後、さらに RFLP 解析データを蓄積することにより、クラスターサイズの大きな特定株を追跡調査するなど結核の蔓延状況を把握できるものと考えられるが、患者から同意が得られた割合は 52.6%と低い。今後、患者の同意率を高めるように改善する必要があると考えられ、また第 3 報³⁾で述べたように患者から同意を得る必要性について整理する必要がある。

表 4 疫学調査の結果、関連性が判明した事例

| クラスター | 検体 | 類似度 : 100%一致、 : 100%未満 | 性別 | 年齢 | 発病時期 | 既往歴 | 疫学調査結果 |
|-------|-------|------------------------------|----|----|--------|-----|-------------------------|
| 1 | 137 | | 男 | 20 | H13.1 | | H14.3 友人が発病 |
| | 221 | | 男 | 21 | H14.4 | | 137 の 1 学年下、教室の共有なし |
| 10 | 85 | | 女 | 45 | H11.11 | | 86 の妻 |
| | 86 | | 男 | 44 | H11.9 | | 85 の夫 |
| 11 | 24 | 95% | 女 | 82 | H11.5 | 有 | 69 の祖母 |
| | 69 | | 男 | 30 | H11.11 | | 24 の孫 |
| 12 | 94 | | 男 | 61 | H12.4 | | H13.9 月弟肺結核、104 の叔父 |
| | 104 | | 男 | 36 | H12.7 | | 94 の甥 |
| 21 | 国 131 | | 女 | 68 | H10.11 | 有 | 同一病院 |
| | 国 130 | | 男 | 75 | H10.3 | | 同一病院 |
| | 75 | | 男 | 72 | H12.2 | | 同一病院 |
| 34 | 145 | 96% | 男 | 67 | H13.1 | 有 | 127 義弟：事例 1 |
| | 127 | | 男 | 71 | H13.2 | 有 | 145 義兄：事例 1 |
| 36 | 41 | | 女 | 58 | H11.7 | 有 | 146 の親 |
| | 146 | | 女 | 35 | H11.11 | | 41 の娘 |
| | 139 | | 女 | 22 | H13.2 | | 228 の知人 |
| | 228 | | 男 | 19 | H13.3 | | 139 の知人 |
| | 210 | | 男 | 87 | H13.9 | | 253 の親：事例 2 |
| | 253 | 89% | 男 | 56 | H14.1 | | 210 の息子：事例 2 |
| 43 | 264 | 84% | 女 | 79 | H14.6 | | 271 の妻：事例 3 |
| | 271 | | 男 | 84 | H14.10 | 有 | 264 の夫：事例 3 |
| 56 | 199 | | 男 | 66 | H10.7 | 有 | H13.11 再発：事例 4 |
| | 298 | | 男 | 68 | | | 199 本人 H15.11 再発：事例 4 |
| 58 | 326 | | 男 | 34 | H14.3 | | H10 年頃同僚が結核、331 の兄：事例 5 |
| | 331 | | 男 | 29 | H15.4 | | 326 の弟：事例 5 |
| P1 | 256 | | 女 | 27 | H14.5 | | 病院職員 266 と同一病棟に勤務：事例 6 |
| | 266 | | 女 | 26 | H14.6 | | 病院職員 256 と同一病棟に勤務：事例 6 |

網掛けは新たに判明した事例

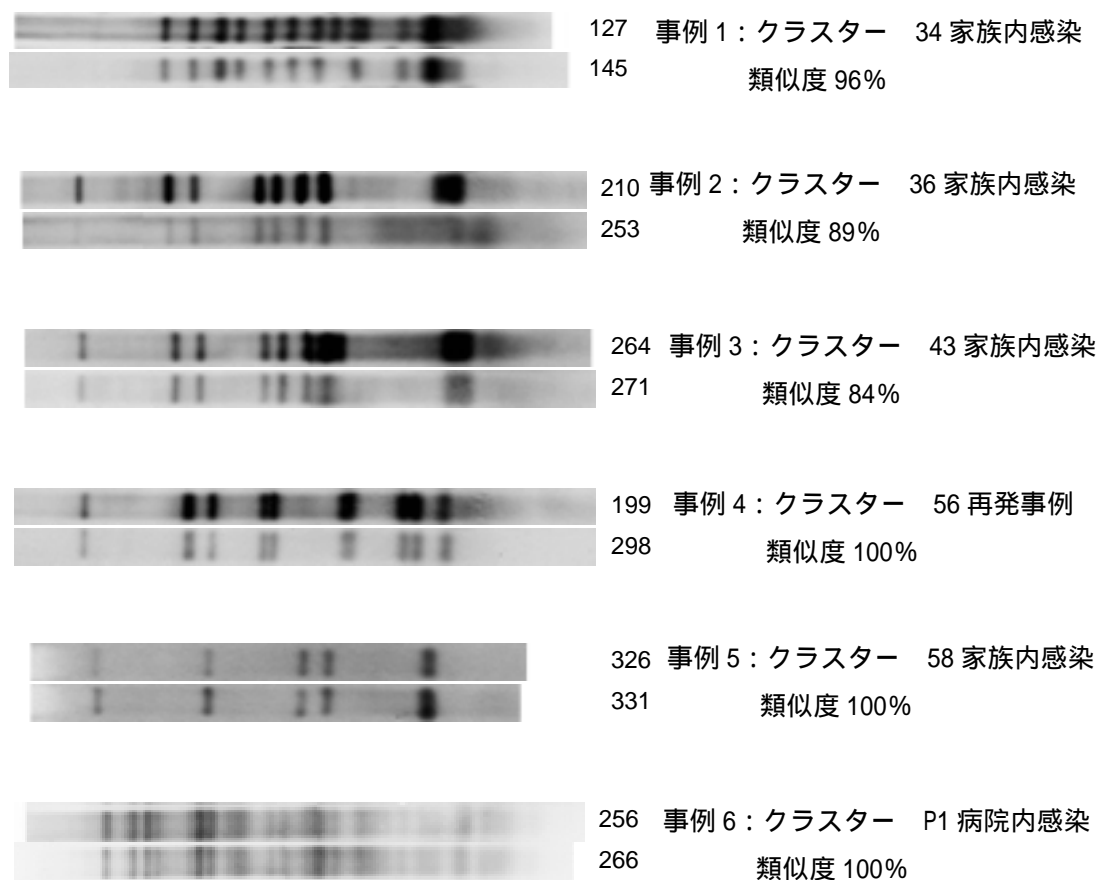


図4 疫学調査の結果、関連性が判明した菌株のRFLPパターン

5. 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 : 結核菌の制限酵素多型分類 : 第 3 報 ; 3 年半の分析結果報告、札幌市衛研年報、30 , 47-52 , 2003 .
- 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 : 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. R, Kerry R, Kathy J 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 .