

RFLP 分析に基づく，結核感染状況の疫学的検討

—当院医療圏である大阪中南部地域の場合—

阿野 裕美 森山 和郎 松本 智成 谷川 信子
鳥羽 宏和 高嶋 哲也 菊井 正紀 露口 泉夫

要旨：DNA フィンガープリンティング法は，患者間の結核感染ルートを研究することを可能にした。われわれは，当院医療圏における結核感染状況を把握するために，2001年1月から12月の1年間に当院を受診し，新たに結核菌培養陽性が判明した全患者の RFLP 分析を行った。当院医療圏は，日本で最も結核の流行している大阪市を含む大阪府の中南部をカバーしている。分析の対象となった410名のうち131名(32%)がクラスターを形成した。クラスターサイズは最大13名から2名までの49組であった。患者の平均年齢は，クラスター形成患者52.1歳，非形成患者57.2歳で，有意にクラスター形成患者の年齢が低かった。また，クラスター形成患者の64%が60歳未満の低年齢層であった。

今回のわれわれの検討結果は，大阪府中南部地域において，今なお結核が流行していることを示唆していた。行政機関と連携して，RFLP 分析データを積極的に活用することにより，早期に結核感染経路を推定することも可能になるであろう。また，RFLP 分析によるクラスター形成率の年次推移を追うことにより，結核対策の指標として利用していくこともできるだろう。

キーワード：RFLP 分析，分子疫学的研究，結核症

はじめに

1990年に多形性を示す繰り返し塩基配列がThierryらによって発見されIS6110と命名された¹⁾。そして1990年にHermansらがIS6110をプローブとしたDNA分析が結核菌の疫学や診断のための手段に利用できることを報告して以来²⁾，結核菌染色体上に比較的安定でランダムに挿入されたISエレメントを用いたRestriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析が，結核菌の型別に用いられるようになった。RFLP分析は，接触関係などの状況証拠にたよっていた従来までの感染源の調査方法と異なり，結核菌の遺伝子間の類似度を数値化することにより，感染源の解明に科学的な裏づけを与える強力な武器となった。現在では結核対策上の評価や感染様式の解析に用いられ，分子疫学と呼ばれる分野にまで発展している³⁾⁴⁾。

当院は，結核罹患率全国ワースト1の大阪市の南隣に

立地し，その医療圏は，大阪府中南部の広域におよんでいる。当院を受診し菌株を保存している全患者の RFLP 分析を行うことは，院内感染対策や検体の cross contamination 対策はもとより，大阪中南部地域における結核の感染状況を把握する上で，重要な情報をもたらすものと思われる。

本報では，2001年に当院で新たに結核菌が分離培養された全患者の分析結果を報告する。

対象と方法

A. 対象患者

2001年1月から12月に当院を受診し，新たに結核菌培養陽性となった422名を対象としてRFLP分析を行った。患者の住所地は，大阪市152名，東大阪市59名，中南河内(八尾市，羽曳野市，藤井寺市，松原市，柏原市，富田林市，河内長野市)138名となり，これら大阪中南部地域だけで対象患者全体の83%を占めた。患者の臨床的デー

タは、当院のカルテから得た。

結核菌挿入配列 IS6110 を用いた RFLP 分析では、バンドパターンが 90% 以上一致した場合を同一クラスターと定義するが、バンド数が 5 本以下の菌株の場合には、同じバンドパターンを示しても同一クラスターと決定することはできない。当院では、現在セカンドタイピング法としてスポリゴタイピングの導入を検討しているが、その結果が出るまでは、バンド数 1 本とバンド数 2 本で同じパターンを示した 12 名については、クラスター形成患者群とクラスターを形成しなかった患者群のいずれに含めるべきか不明である。そこで、以下のクラスター形成患者と非形成患者間の比較については、分析対象数を 410 名として計算した。

B. RFLP 分析法

0.1 mm のガラスビーズ、TE buffer (PH8.0) 750 μ l, Chloroform 200 μ l を混合したものに、小川培地上の結核菌を 2 白金耳加えて、4,600 rpm 200 秒の強度で Bead-beater 処理し、結核菌のゲノムを抽出した。このゲノムを制限酵素 *Pvu* II で消化し、1.2% agarose gel で 26 V 24 時間電気泳動した後、positively charged nylon membrane (Roche 社) にサザンブロッティングした。結核菌挿入配列 IS6110 をプローブとして 68 $^{\circ}$ C 16 時間ハイブリダイゼーションした後、ジゴキシゲニン発色 (Roche 社) を行って IS6110 のバンドを検出した。バンドの分析には、Molecular Analyst Software (Bio-Rad 社) の Double gel analysis 法を用い、各レーン間の補正は λ /Hind III と ϕ X174/Hae III を使用し、membrane 間の補正は H37Ra 株を用いた。

C. 統計学的解析

得られた成績の有意差の解析は、chi-square test と student's t-test を用いた。今回は危険率を 1% で計算したので、 $P \leq 0.01$ の場合に有意差ありとした。

結 果

A. 対象患者背景

対象患者 422 名の内訳は男性 313 名、女性 109 名で、20 歳と 50 歳にピークがあり、平均年齢 55.7 歳であった。住所地は大阪市 152 名、大阪市以外の大阪府下 243 名、他府県 27 名 (奈良県 9 名、和歌山県 8 名、兵庫県 2 名、三重県 2 名、近畿以外 6 名) であった。治療歴は、初回治療 335 名 (79.4%)、再治療 85 名 (20.1%)、治療歴不明 2 名であった。薬剤耐性は、INH, RFP, EB, SM の 4 剤に感受性 357 名 (84.6%)、いずれか 1 剤以上に耐性の患者 65 名 (15.4%) であった。65 名のうちで、SM 単独耐性 28 名 (6.6%)、多剤耐性 17 名 (4.0%)、その他の耐性 20 名であった。

B. IS6110 バンド数の分布

IS6110 バンド数は、1 本から 21 本で、10 本から 15 本にピークがあり、全体の 67% を占めた (Fig. 1)。

C. IS6110 の Similarity matrices

菌株間の類似度は普通 Dendrogram で表されるが、本報は対象が 422 名と多く図示するのが困難であったため、視覚的にとらえやすい Similarity matrices を Fig. 2 に示した。図中の薄い黒が類似度 65%、順次類似度が高くなり、濃い黒が類似度 95% 以上を表している。

現在特定の菌株が流行しているアフリカ諸国の場合には類似度の高い集団がみられ、オランダのようにすでに

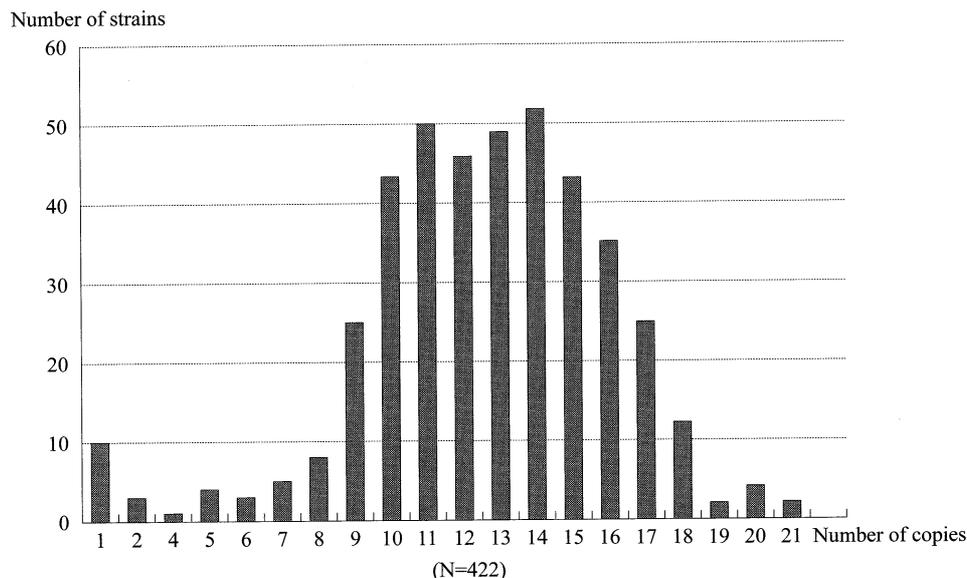


Fig. 1 Distribution of the number of IS6110 copies

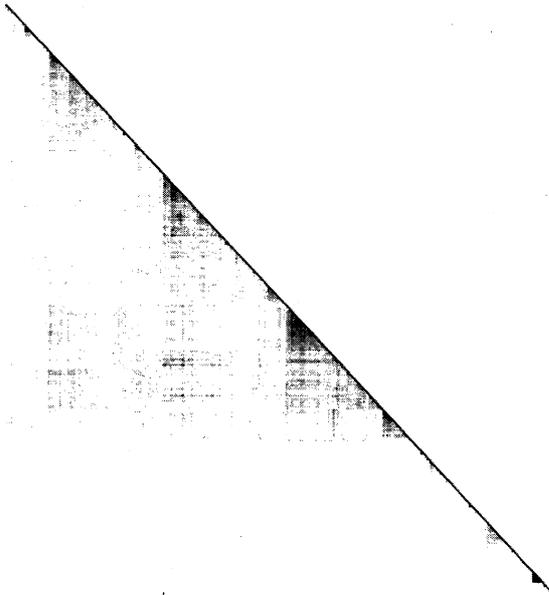


Fig. 2 Similarity matrices of banding patterns of RFLP analysis

*Similarity coefficients from 65 to 100% are shown by different gray tones in matrices. Diagonal is formed by 100% similarity coefficient values of corresponding strains.

Table 1 Cluster size of newly registered patients

Cluster size	No. of clusters	No. of patients with clustered cases
13	1	13
5	1	5
4	5	20
3	9	27
2	33	66
Total	49	131

結核が沈静化している国では特定の集団はみられない⁵⁾。当院の場合、オランダよりもむしろアフリカ諸国に近い Similarity matrices が得られ、数個の類似度の高い集団がみられた。

バンド数が1本と2本でクラスターを形成した12名を除く、対象患者410名に対するクラスター形成者の割合は、131名(32%)となった。また、バンドパターン数は328となり、1バンドパターン当たりの患者数は1.25人となった。

D. クラスター形成患者と非形成患者の比較

クラスターのサイズは、最大13名から2名までの49組・131名であった (Table 1)。

クラスター形成患者と非形成患者の臨床的特徴を比較したものを Table 2 に示す。平均年齢はクラスター形成患者52.1歳、非形成患者57.2歳で、有意にクラスター形成患者の平均年齢が低かった ($P=0.007$)。

60歳未満の低年齢層の占める割合は、クラスター形成患者131名中84名(64.1%)、非形成患者279名中138名(49.5%)で、クラスター形成患者のほうが有意に高かった ($P=0.005$)。

初回治療の割合は、クラスター形成患者131名中106名(80.9%)、非形成患者279名中219名(78.5%)で、両者の間に有意差は無かった ($P=0.572$)。

薬剤耐性では、INH、RFP、EB、SMのいずれかに耐性の患者の割合は、クラスター形成患者131名中23名(17.6%)、非形成患者279名中41名(14.7%)と両者の間に有意差はみられなかった ($P=0.456$)。

SM単独耐性は従来から一定の比率でみられているが、今回の解析でもクラスター形成患者12名(9.2%)、非形成患者16名(5.7%)で有意差はみられなかった ($P=0.199$)。

多剤耐性患者の場合も、クラスター形成患者6名(4.6%)、非形成患者11名(3.9%)で両者の間に有意差はみ

Table 2 Characteristics and their relationship with cluster formation

Characteristics	All patients	Patients with clustered cases	Patients with unique cases
	N=410	N=131	N=279
Median age — yr	55.7	52.1 ^a	57.2
Age < 60 yr — no.(%)	222 (54.1)	84 (64.1) ^b	138 (49.5)
Primary care — no.(%)	325 (79.3)	106 (80.9) ^c	219 (78.5)
Drug resistance — no.(%)			
Any drug	64 (15.6)	23 (17.6) ^d	41 (14.7)
Streptomycin only	28 (6.8)	12 (9.2) ^e	16 (5.7)
MDR	17 (4.1)	6 (4.6) ^f	11 (3.9)

^a $P=0.007$ (P values are calculated in comparison with unique RFLP patterns)

^b $P=0.005$

^c $P=0.572$

^d $P=0.456$

^e $P=0.199$

^f $P=0.762$

られなかった ($P=0.762$)。しかし、クラスターを形成していた6名のうち3名は、薬剤耐性パターンも完全に一致して、3名で1組のクラスターを形成していた。この同一クラスターを形成していた3名のうち、2名が初回治療、1名が再治療であった。

対象患者410名のうち初回治療患者325名に限って分析した結果は、4剤に感受性の患者286名中クラスター形成患者は95名(33.2%)、いずれかの薬剤に耐性の患者39名中クラスター形成患者は20名(51.3%)となり (Table 2には記載無し)、薬剤感受性患者と薬剤耐性患者のクラスター形成率に有意差は無かった ($P=0.026$)。

E. クラスター形成患者の住所地

Fig. 3は、クラスターを形成した患者の住所地を、市町村別にプロットしたものである。大阪府以外の府県の患者については、図の左側にまとめて記載した。図内の数字は同一クラスター No.を表している。当院受診患者の83%が大阪市、東大阪市、中南河内に集中している結果、クラスター形成患者も大阪中南部に多くなった。なかには地図上で住所地が非常に接近している例や、同じ鉄道または幹線道路沿いに同一クラスターの患者が集中している例もあった。しかし、患者間の接触調査を実施していないので、当院のカルテによる情報だけでは、それ以上明らかな感染ルートは特定できなかった。

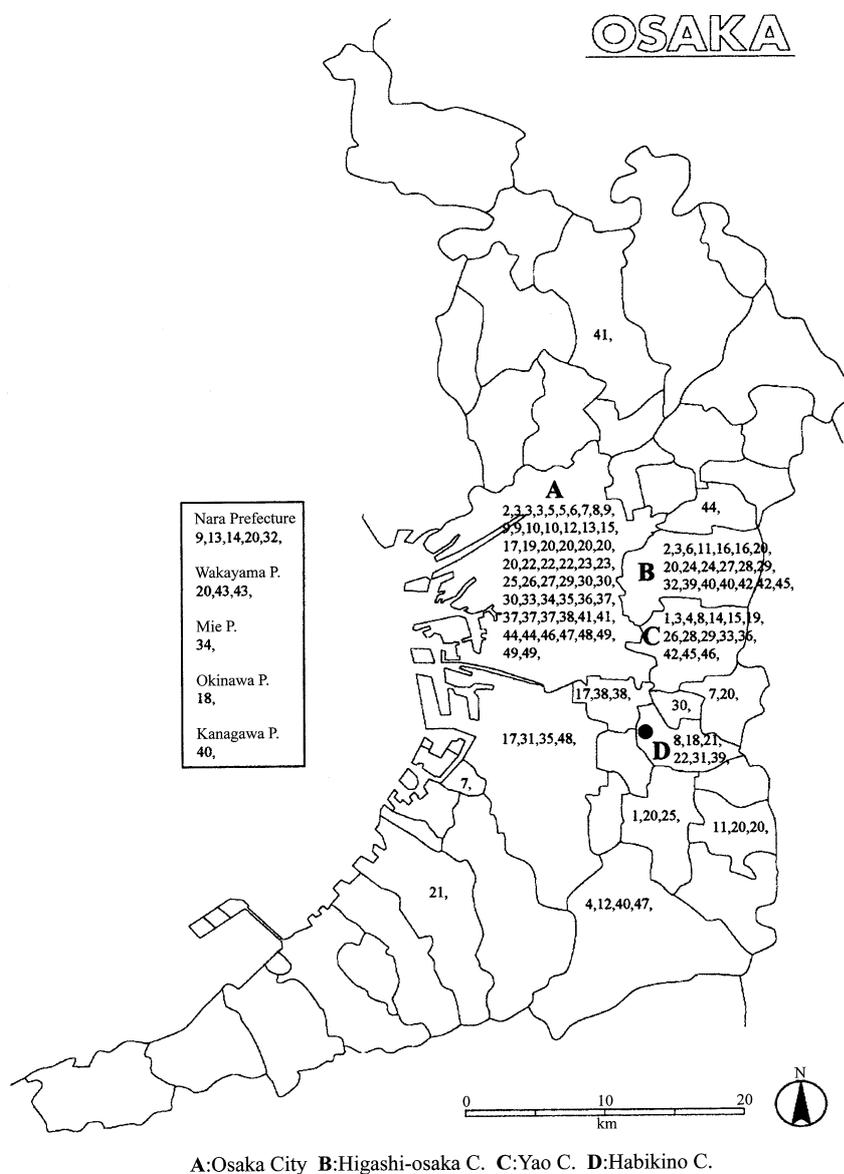


Fig. 3 Residence map of patients with clustered cases
 *Our Hospital is located as shown by closed circle. Each figure shows one case and the same figure belongs to the same cluster.

考 察

2001年度の大阪府全域の結核登録者数は4,575人で⁶⁾、その4割の1,830人が培養陽性とする、本報の分析対象患者数は、府下全域の約23%に相当する。対象患者が、大阪府の年間結核菌陽性患者の約4分の1を占めていることと、当院受診患者の83%が大阪中南部に集中していることを考慮すれば、当院のRFLP分析結果は、大阪中南部地域の結核感染状況を把握する上で、非常に重要な情報をもたらすものと思われる。

IS6110バンド数の分布は、10本から15本で全体の67%を占め、大きなピークを形成していた。結核蔓延諸国では、特定のバンドパターンが流行していることからバンド数の変化が乏しくなり、結核の有病率の高い韓国では、61%が9本から10本に集中していたという報告もある⁷⁾。今回分析したバンド数のデータから、現在大阪中南部地域で結核が流行していることが推測された。

IS6110の類似度を表す Similarity matrices は、数個の類似度の高い集団を形成しており、結核の蔓延状態にあるアフリカ諸国や、すでに結核の流行が沈静化しているオランダのデータ⁵⁾と比較すると、むしろアフリカ諸国に近いグラフを描いた。さらに、クラスター形成患者の割合でも、オランダは18.9%⁵⁾、パリは20.5%⁸⁾、イタリアは15%⁹⁾であるのに比べて、本報では31.9%と高く、この値は、1999年のニューヨークのクラスター形成率(31.0%)¹⁰⁾に匹敵した。2年以内の分析期間では感染伝播の患者を完全に把握することは困難で、最近の感染の過少評価になる可能性が高いという報告がある⁴⁾。そのことと考え合わせると、2001年の1年間に限って分析した結果、結核菌培養陽性患者の3人に1人が何らかのクラスターを形成していたという事実は、当院受診患者が集中している大阪中南部地域が、現在もある程度の結核蔓延状況にあることを示唆していた。

クラスター形成に関わる臨床的要因を分析すると、クラスター形成患者の平均年齢のほうが非形成患者より低く、60歳未満の低年齢層の占める割合もクラスター形成患者のほうが有意に高く、低年齢層結核の蔓延を示唆していた。

薬剤耐性と薬剤感受性結核患者間では、クラスター形成率に有意差は無かったが、多剤耐性患者同士による1組(3名)のクラスターがみられた。初回治療多剤耐性の患者もクラスターを形成していた事実から、治療が困難な多剤耐性結核の感染をくい止めるために、より適切な患者管理が必要になるとと思われる。

今回の検討で、当院の当該地域が、ある程度の結核蔓延状況にあることがわかった。今後はこれらのRFLPデータを積極的に活用し、結核感染源対策に役立てていくこ

とが必要であると思われる。従来の疫学調査は、集団感染の発生が疑われた場合に、関連する菌株を集めてRFLP分析を実施し、同じ菌による感染を証明する方法であった。しかし、この方法では、結核の集団感染を早期に発見することはできない。当院のように、全患者のRFLP分析を行った場合には、従来の方法では予測できなかった患者間で、同一クラスターを形成している事実を発見できる場合がある。今回の報告でも、最大13名のクラスターを形成した患者群の中に、同じ職場の同僚が4名含まれていた。しかし、その他の患者については、院内のカルテだけでは、詳しい行動半径や接触者情報を得ることができず、このデータを有効に利用することができなかった。膨大なRFLPデータを有効に活用し、集団感染が発生する前に感染源を推定して具体的な対策を講じるためには、これらの患者について系統的な疫学調査を実施する必要がある。病院と保健所などの行政機関が密接に連携して、RFLP分析でクラスターを形成している患者群に的を絞った疫学調査を実施することができれば、従来の方法では発見できなかった新たな結核の感染経路を解明することが可能になるのではないだろうか。

さらに、クラスター形成率が結核の蔓延状況を反映するのであれば、全患者のRFLP分析を継続してクラスター形成率の年次推移を追うことにより、この地域における結核対策の評価の指標とすることもできるだろう。

ま と め

1. 2001年度に当院で新たに結核菌が分離培養された患者422名の、IS6110バンド数の分布は1本から21本で、10本から15本にピークがあり全体の67%を占めた。
2. 分析対象患者410名のうち、クラスター形成患者は131名(32%)で、バンドパターン数は328、1クラスター当たりの患者数は1.25人であった。
3. クラスターサイズは、最大13名から2名までの49組であった。クラスター形成患者の平均年齢のほうが非形成患者より低く、クラスター形成患者では60歳未満の低年齢層の占める割合が有意に高かった。治療歴別、薬剤耐性別では、クラスター形成患者と非形成患者間で有意差は無かった。
4. 今回の検討結果から、当院医療圏である大阪中南部地域は、ヨーロッパ諸国に比較してクラスター形成率が高く、1999年のニューヨークに匹敵し、現在もある程度結核の蔓延状況にあることが示唆された。

文 献

- 1) Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, et al.: IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex.

- Nucleic Acids Res. 1990 ; 18 : 188.
- 2) Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, et al.: Insertion element IS186 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1990 ; 28 : 2051-2058.
 - 3) 高橋光良: 結核菌 IS6110 をプローブとした結核の分子疫学. 資料と展望. 1996 ; 17 : 43-53.
 - 4) van Soolingen D: Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Int Med. 2001 ; 249 : 1-26.
 - 5) Hermans PW, Messadi F, Guebrexabher H, et al.: Analysis of the Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and the Netherlands: Usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. J Infect Dis. 1995 ; 171 : 1504-1513.
 - 6) 厚生労働省保健医療局結核感染症課監修: 「結核の統計2001」. 結核予防会, 東京, 2002.
 - 7) van Soolingen D, de Hass PE, Haagsma J, et al.: Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol. 1994 ; 32 : 2425-2433.
 - 8) Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, et al.: Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding Area. J Clin Microbiol. 1998 ; 36 : 486-492.
 - 9) Garzelli G, Lari N, Nguon B, et al.: DNA restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Pisa, Italy. Eur J Epidemiol. 1997 ; 13 : 845-851.
 - 10) Geng E, Kreiswirth B, Driver C, et al.: Changes in the transmission of tuberculosis in New York City from 1990 to 1999. N Engl J Med. 2002 ; 346 : 1453-1458.

————— Original Article —————

MOLECULAR EPIDEMIOLOGIC STUDY OF TUBERCULOSIS

—A Study on Isolates of *M. tuberculosis* in Southern Half of Osaka Prefecture—

Hiromi ANO, Yoshio MORIYAMA, Tomoshige MATSUMOTO, Nobuko TANIGAWA,
Hirokazu TOBA, Tetsuya TAKASHIMA, Masanori KIKUI, and Izuo TSUYUGUCHI

Abstract Restriction fragment length polymorphism, RFLP or DNA fingerprinting technique provides a very useful tool for the study of epidemiology of tuberculosis transmission in human.

We performed RFLP analysis with the IS6110 insertion sequence of the organisms isolated from culture-positive patients who visited our Hospital during the period from January to December 2001. Our Hospital covers patients living in southern half of Osaka Prefecture including a part of Osaka City, which is the highest TB prevalence area in Japan.

The number of copies of IS6110 per isolate ranged from 1 to 21. Most isolates (67%) carried 10 to 15 copies.

Of 410 available isolates during the year of 2001, 131 (32%) belonged to a cluster and 279 (68%) did not. The clusters comprised one matching isolate in minimum to 13 isolates in maximum and had a total of 49 distinct RFLP patterns. The

average age of the clustered cases was 52.1 years and 64% cases belonged to patients with ages younger than 60 years.

Above findings suggest that many cases of tuberculosis in southern part of Osaka Prefecture result from recent transmission. It remains to be elucidated, however, how and where these recent infections occurred in these clustered cases.

Key words: RFLP typing, Molecular epidemiologic study, Tuberculosis

Osaka Prefectural Habikino Hospital

Correspondence to : Hiromi Ano, Osaka Prefectural Habikino Hospital, 3-7-1, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583-8588 Japan. (E-mail: ano@zeus.eonet.ne.jp)