

札幌市における結核菌 RFLP解析によるクラスター形成と感染危険度の関連

^{1,2}築島 恵理 ^{1,3}三觜 雄 ¹矢野 公一 ¹高瀬 愛子
⁴鎌田 有珠 ⁴網島 優 ⁵秋山也寸史 ⁵藤野 通宏
⁴飛世 克之 ⁵岸 不盡彌

要旨：〔目的〕分子疫学的手法により地域の結核流行の特徴を明らかにする。〔対象〕1998年11月から2003年12月までの登録患者で、結核菌培養陽性、研究協力に同意が得られた男性249人、女性96人。〔方法〕標準的なRFLP分析により類似度90%以上の者をクラスターと定義し、患者特性の関連を分析した。〔結果〕345株中207株（60%）がクラスターを形成し、31人（15%）で疫学的関連を認めた。多変量解析により、男性で年齢と感染危険度がクラスターと有意に関連し、調整オッズ比（95%信頼区間：CI）は、0～29歳と比較して、30～59歳0.17（0.03～0.79）、60歳以上0.15（0.03～0.69）、その他と比較して最重要2.35（1.17～4.70）であった。女性では、結核既往と糖尿病が最終モデルに残り、結核既往0.52（0.22～1.22）、糖尿病0.33（0.06～1.85）であった。感染危険度とクラスター形成との関連は、男性の結核既往者で特に高く、最重要4.53（1.16～17.68）であった。〔考察〕対象地域内の感染に対して男性結核既往者の内因性発病が関与している可能性が示唆された。

キーワード：結核菌、分子疫学、RFLP、感染危険度指数、クラスター

はじめに

近年、結核対策に分子疫学的手法が取り入れられ、制限酵素断片長多型 Restrictive Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析は、結核菌の遺伝子多型分析の標準的な方法として応用され、内因性の再発と外来性再感染の区別、集団感染の評価、地域における流行菌株の分析等に有用といわれている¹⁾。わが国でも地域集団や入院患者集団において、結核菌遺伝子分析が実施され、データが蓄積されている^{2)~4)}。

札幌市は人口187万人（2004年）の政令指定都市で、結核発生状況は、罹患率が人口10万人あたり22.5（1999年）から15.0（2004年）と低下しており、外国人やホームレス患者が少なく高齢結核患者の割合が高いという特徴がある。集団発生時における同一感染源の特定などの疫学調査および接触者健診の充実を図り、札幌市における今後の結核予防対策に役立てることを目的として、

1998年から保健所、衛生研究所と結核病床を有する医療機関との協力体制により結核菌 RFLP分析事業を開始した⁵⁾。RFLP分析を用いて、施設内アウトブレイクでの複数患者の結核菌遺伝子型の一致（クラスター形成）により最近の感染を証明する等、結核対策に活用されている。今回、直接的な感染曝露機会の有無を含めた札幌市全体における結核の地域流行の特徴を把握することを目的として、RFLP分析で認められたクラスター形成と患者特性との関連を検討した。

方 法

（1）対象患者

1998年11月から2003年12月までに本市に登録され結核予防法による入所命令の対象となった結核患者823人のうち、気道材料から結核菌が分離培養された633人で、書面により本人の同意が得られ、かつ、RFLP分析で結果判定可能であった345人を対象とした。研究協力の依

¹札幌市保健所、²札幌市清田区保健福祉部、³札幌市北区保健福祉部、⁴国立病院機構札幌南病院、⁵北海道社会保険病院

連絡先：築島恵理、札幌市保健所、〒060-0042 北海道札幌市中央区大通西19 (E-mail: eri.tsukishima@city.sapporo.jp)
 (Received 27 Nov. 2006/ Accepted 29 Jan. 2007)

頼にあたり、札幌市の結核対策を講じるために結核菌遺伝子分析研究事業を実施すること、協力は任意であること、治療上必要な検査が終了した後の検査材料を用いること、遺伝子配列が一致した相手に関して知らせることができないこと、必要に応じて再調査を依頼すること、プライバシーを保護することについて書面で説明して同意を得た。

対象者の特徴は Table 1 のとおりであり、平均年齢は 60.7 歳、男性 249 人、女性 96 人であった。

(2) RFLP 分析

RFLP 分析およびクラスター分析は札幌市衛生研究所で実施された。小川培地で培養された結核菌より DNA を抽出し、制限酵素 *Pvu* II を用い IS6110 をプローブとした RFLP (IS6110-RFLP) 解析が実施された。また、単一バンドを示した株については、制限酵素 *Sma* I を用い *PGRS* をプローブとした RFLP (以下、*PGRS*-RFLP) 解析が実施された。クラスター分析は、画像解析ソフト FingerprintingTM II (BIO-RAD) を用い、系統樹の構成

は距離行列法の UPGMA により行われた。

(3) 疫学調査

対象患者の状況は、結核患者登録票を後方視的に閲覧することにより情報を得た。登録票には、保健所保健師が患者・家族等に訪問面接調査した記録および各種申請書の記録等が記載されており、診断時年齢、性別、国籍、ホームレス状態の有無、結核症の既往・治療歴、結核以外の既往・治療歴、結核菌検査成績等の情報を抽出した。喀痰塗抹検査成績は「新結核菌検査指針 (日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会; 2000年)」により、(-), (±), (1+), (2+), (3+) の 5 段階に区分した。また、従前より接触者健診の実施計画の検討材料として、個々の結核患者の感染危険度指数 (= 「治療前最大ガフキー号数」× 「咳の持続時間」) を算定して、10 以上を「最重要」、0.1 から 9.9 を「重要」、その他を「その他」と区分しており、この記録についても抽出して分析した。

(4) クラスター形成率の比較検討

2 つ以上の菌株で IS6110-RFLP 解析または *PGRS*-RFLP 解析によるバンドパターン間の類似度が 90% 以上を示した場合を、クラスターと定義した。再発時の菌株が前回の菌株との類似度 100% となった症例があり、今回の解析では患者特性による検討を目的としたため、1 人の患者につき 1 菌株のみ分析対象とした。

対象患者の疫学調査結果をもとに、クラスター形成と関連する患者特性について検討した。感染に寄与すると思われる社会状況・生活状況に大きく男女差が認められることから、患者特性の全項目について性別に分析した。さらに、感染危険度については、年齢区分、既往歴の有無、糖尿病の有無別に感染危険度によるクラスター形成率の変化を比較した。なお、結核患者との最近の接触があってもクラスターとならない患者があり、相互の菌遺伝子が異なっていた場合のみならず、接触した相手が市外の登録者や RFLP 事業に同意のない事例等が認められ、解析のための情報として不十分であったため、本人の申告による曝露歴の有無は変数として取り扱わなかった。

統計解析には SPSS Ver12.0 を用い、ロジスティック回帰分析により危険度 5% で独立性を検定しオッズ比を推定した。多変量ロジスティック回帰分析は、ステップワイズ変数減少法により有意確率 0.20 以上の変数を除去し、最終モデルに残った特性について調整オッズ比を推定した。

結 果

(1) クラスター形成状況

IS6110-RFLP 解析によるコピー数は 1 から 21 に分布しており、12 コピーの菌株が最も多く、68 株 (19.7%) で

Table 1 Characteristics of TB cases for analyzed isolates

	Number	Percent
Age		
Mean, SD	60.7, 19.4	
Range	16-100	
Sex		
Male	249	72.2
Female	96	27.8
Nationality		
Japanese	341	98.8
Other	4	1.2
Homelessness		
No	343	99.4
Yes	2	0.6
Prior TB disease		
Absent	208	60.3
Present	137	39.7
With chemotherapy	38	
Without chemotherapy	58	
Unknown treatment	41	
Diabetes		
Absent	289	83.8
Present	56	16.2
Sputum smear AFB status		
(-)	101	29.3
(±)	32	9.3
(1+)	41	11.9
(2+)	86	24.9
(3+)	85	24.6
Importance level assigned from infectiousness index of TB cases		
Lower importance	133	38.6
Higher importance	118	34.2
Highest importance	94	27.2

TB: tuberculosis, AFB: acid-fast bacilli

あった。PGRS-RFLP分析を追加したところ、345株中207株(60.0%)が59種のクラスターを形成していた。1クラスターを形成する菌株数(クラスターサイズ)は2から16まで分布し、クラスターサイズ2が最も多く33種66株であった(Table 2)。

クラスターのうちで、疫学調査により相互に直接的な結核菌曝露機会が判明したのは31人(15.0%)であり、残りの85%の曝露機会は不明であった。

(2) 男性の患者特性別クラスター形成

クラスターを形成した患者数は、男性249人のうち154人(61.8%)、女性では96人のうち53人(55.2%)であり、性別間に有意差は認められなかった。

男性において、高齢層ほどクラスターを形成している割合が低く、0~29歳の17人中15人(88.2%)がクラスターを形成したことと比較して、60歳以上は155人中91人(58.7%)であり、オッズ比(95%CI)が0.19(0.04~0.86)と有意に低かった。

国籍については、2人の外国籍患者の分離菌株を分析できたが、いずれも類似の株はみられなかった。居住区別の差は認められなかった。職業別では、無職の高齢者が多いことから業種による差異については例数が少ないため検討できなかった。2人のホームレス結核患者から分離された菌株はいずれもクラスターを形成していた。

既往症については、結核既往、糖尿病合併の有無による差は認められなかった。

喀痰塗抹検査成績では、(3+)群の65人中47人(72.3%)が最もクラスターを形成しており、(-)群の73人中41人(56.2%)と比較してオッズ比(95%CI)が2.04(1.00~4.16)と高かった。感染危険度指数による区分において、感染危険度指数が最も高い「最重要」群で71人中54人(76.1%)がクラスターを形成しており、「その他」群の92人中55人(59.8%)と比較してオッズ比(95%CI)が2.14(1.08~4.24)と有意に高かった。

多変量ロジスティック回帰分析により、年齢、既往症、糖尿病、感染危険度を変数として投入して有意確率0.20でステップワイズ変数減少法により選択したところ、年齢と感染危険度が最終モデルに残された。0~29歳と比較して30~59歳の調整オッズ比(95%CI)は0.17(0.03~0.79)、60歳以上の高齢者の調整オッズ比(95%CI)は0.15(0.03~0.69)で有意に低かった。感染危険度はその他レベルと比較して最重要レベルの調整オッズ比(95%CI)が2.35(1.17~4.70)で有意に高かった(Table 3)。

(3) 女性の患者特性別クラスター形成

女性の場合、年齢による特定の傾向は認められず、居住区別についても差は認められなかった。国籍については、分析対象者に女性2人の外国籍患者が含まれていたが、いずれも今回の分析菌株のうちに類似の菌株は認め

Table 2 Cluster size and number of clustered cases

Cluster size	No. of clusters	No. of cases
2	33	66
3	7	21
4	5	20
5	4	20
6	4	24
7	2	14
8	1	8
9	2	18
16	1	16
Total	59	207

られなかった。「看護師・保健師・保育士等」の患者12人のうち5人(41.7%)がクラスターを形成し、女性全体の割合よりも低かったが、統計学的に有意な差ではなかった。

女性においては、結核既往のない60人中37人(61.7%)がクラスター形成したことと比較して、結核既往のある群では36人中16人(44.4%)でオッズ比(95%CI)は0.50(0.22~1.15)と低い傾向が示唆されたが、統計学的に有意な差ではなかった。糖尿病のある群7人中2人(28.6%)でクラスター形成し、オッズ比(95%CI)は0.30(0.05~1.62)と低い傾向が示唆されたが、統計学的に有意な差ではなかった。

喀痰塗抹成績では、(-)群でクラスター形成したのは28人中19人(67.9%)で最も形成率が高く、この群と比較すると(2+)群で23人中9人(39.1%)がクラスターを形成し、オッズ比(95%CI)が0.30(0.10~0.96)と有意に低かった。感染危険度指数による区分において、女性では3群のクラスター形成に差が認められなかった。

多変量ロジスティック回帰分析により、男性と同様に変数を選択したところ、結核既往と糖尿病が最終モデルに残された。結核既往なしと比較して結核既往のある人では調整オッズ比(95%CI)は0.52(0.22~1.22)と低い傾向にあり、糖尿病なしと比較して糖尿病のある人で調整オッズ比(95%CI)が0.33(0.06~1.85)と低い傾向が認められた(Table 4)。

(4) 感染危険度によるクラスター形成率の変化の患者属性による相違

本研究の対象者のうち男性では感染危険度が有意にクラスター形成に関連していたため、結核発病後の周囲への感染が関与している可能性が示唆された。このため、感染危険度によるクラスター形成率の変化が結核発病前の患者属性によって相違があるかどうか、層別解析により検討した。男女別、属性別に、感染危険度とクラスター形成の関連を分析し、統計学的に有意差がみられた層

Table 3 Proportions and odds ratios of clustered cases by characteristics of index patients (Men)

	No. of cases with shared characteristic	No. of clustered cases (percent)	Crude OR (95% CI)	P-value	Multiple logistic analysis	
					Adjusted OR* (95% CI)	P-value
Total	249	154 (61.8)				
Age						
0-29 years	17	15 (88.2)	1.00		1.00	
30-59 years	77	48 (62.3)	0.22 (0.05-1.04)	0.055	0.17 (0.03-0.79)	0.024
60 years or over	155	91 (58.7)	0.19 (0.04-0.86)	0.031	0.15 (0.03-0.69)	0.015
Nationality						
Japanese	247	154 (62.3)				
Other	2	0 (0)	not estimated	-		
Homelessness						
No	247	152 (61.5)				
Yes	2	2 (100)	not estimated	-		
Prior TB disease						
Absent	148	93 (62.8)	1.00			
Present	101	61 (60.4)	0.90 (0.54-1.52)	0.697		
With chemotherapy	26	13 (50.0)				
Without chemotherapy	44	24 (54.5)				
Unknown treatment	31	24 (77.4)				
Diabetes						
Absent	200	126 (63.0)	1.00			
Present	49	28 (57.1)	0.78 (0.42-1.48)	0.450		
Sputum smear AFB status						
(-)	73	41 (56.2)	1.00			
(±)	21	11 (52.4)	0.86 (0.32-2.27)	0.759		
(1+)	27	16 (59.3)	1.14 (0.46-2.78)	0.781		
(2+)	63	39 (61.9)	1.27 (0.64-2.52)	0.498		
(3+)	65	47 (72.3)	2.04 (1.00-4.16)	0.050		
Importance level assigned from infectiousness index of TB cases						
Lower importance	92	55 (59.8)	1.00		1.00	
Higher importance	86	45 (52.3)	0.74 (0.41-1.34)	0.317	0.72 (0.39-1.32)	0.290
Highest importance	71	54 (76.1)	2.14 (1.08-4.24)	0.030	2.35 (1.17-4.70)	0.016

TB: tuberculosis, AFB: acid-fast bacilli, OR: odds ratio, 95%CI: 95% confidence interval

*Adjusted ORs are shown for variables included in the final model by stepwise selection ($p < 0.20$). Age, previous TB, diabetes, infectiousness were entered in the first model.

別解析結果について、感染危険度別のクラスター形成数と形成率およびオッズ比 (95%CI) を Table 5 に示した。なお、男性における他の属性および女性では、層別解析により対象者数が不足したこともあり、有意な差がみられなかった。

男性における年齢別分析では、30歳未満でクラスター形成率が88.2%と高く、この年齢層では感染危険度「その他」群のクラスター形成率が100%であり、感染危険度が上昇してもクラスター形成率は上昇しなかった。この層ではクラスターを形成しない者が各群それぞれ0または1と少数であったため、オッズ比の推定はできなかった。30～59歳では、感染危険度が高くなるにつれてクラスター形成率が高くなる傾向があったが、「最重要」群のオッズ比 (95%CI) が「その他」群と比較して2.64 (0.82～8.45) と統計学的に有意な差ではなかった。60歳以上男性では、感染危険度が「最重要」群でクラスター形成率が有意に高く、オッズ比 (95%CI) が「その

他」群を基準として2.78 (1.13～6.82) であった。

男性における結核既往の有無別の解析では、結核既往がない層のうちで、感染危険度が「最重要」群のオッズ比 (95%CI) が「その他」群と比較して1.62 (0.70～3.75) と高い傾向があるが統計学的に有意な差ではなかった。結核既往がある層においては、「最重要」群でクラスターを形成する割合が最も高く、「その他」群と比較して推定オッズ比 (95%CI) が4.53 (1.16～17.68) と有意に高かった。

男性における糖尿病の有無別の解析では、糖尿病がない層において、「最重要」群でクラスターを形成する割合が最も高く、「その他」群と比較して推定オッズ比 (95%CI) が2.67 (1.20～5.92) と有意に高かった。糖尿病のある層においては、感染危険度によるクラスター形成率の差は認められなかった。

Table 4 Proportions and odds ratios of clustered cases by characteristics of index patients (Women)

	No. of cases with shared characteristic	No. of clustered cases (percent)	Crude OR (95% CI)	P-value	Multiple logistic analysis	
					Adjusted OR* (95% CI)	P-value
Total	96	53 (55.2)				
Age						
0–29 years	14	8 (57.1)	1.00			
30–59 years	33	19 (57.6)	1.02 (0.29–3.60)	0.978		
60 years or over	49	26 (53.1)	0.85 (0.26–2.81)	0.787		
Nationality						
Japanese	94	53 (56.4)				
Other	2	0 (0.0)	not estimated			
Prior TB disease						
Absent	60	37 (61.7)	1.00		1.00	
Present	36	16 (44.4)	0.50 (0.22–1.15)	0.102	0.52 (0.22–1.22)	0.190
With chemotherapy	12	5 (41.7)				
Without chemotherapy	14	6 (42.9)				
Unknown treatment	10	5 (50.0)				
Diabetes						
Absent	89	51 (57.3)	1.00		1.00	
Present	7	2 (28.6)	0.30 (0.05–1.62)	0.161	0.33 (0.06–1.85)	0.135
Sputum smear AFB status						
(–)	28	19 (67.9)	1.00			
(±)	11	6 (54.5)	0.57 (0.14–2.37)	0.438		
(1+)	14	6 (42.9)	0.36 (0.09–1.33)	0.125		
(2+)	23	9 (39.1)	0.30 (0.10–0.96)	0.043		
(3+)	20	13 (65.0)	0.88 (0.26–2.96)	0.836		
Importance level assigned from infectiousness index of TB cases						
Lower importance	41	23 (56.1)	1.00			
Higher importance	32	17 (53.1)	0.89 (0.35–2.25)	0.800		
Highest importance	23	13 (56.5)	1.02 (0.36–2.85)	0.974		

TB: tuberculosis, AFB: acid-fast bacilli, OR: odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval

*Adjusted ORs are shown for variables included in the final model by stepwise selection ($p < 0.20$). Age, previous TB, diabetes, infectiousness were entered in the first model.

Table 5 Proportions of clustered cases and odds ratios for clustering by importance levels assigned from infectiousness index of tuberculosis cases stratified with shared characteristics (Men)

	No. of clustered cases/No. of shared characteristics, percent Estimated odds ratio (95% confidence interval), P-value							
	Total (249)		Lower importance (92)		Higher importance (86)		Highest importance (71)	
Age								
0–29 years	15/17	88.2%	8/8	100.0%	7/8	87.5%	0/1	0%
			1.00		0.00 (0.00), 0.999		0.00 (0.00), 0.999	
30–59 years	48/77	62.3%	13/25	52.0%	15/25	60.0%	20/27	74.1%
			1.00		1.38 (0.45–4.25), 0.569		2.64 (0.02–8.45), 0.103	
60 years or over	91/155	58.7%	34/59	57.6%	23/53	43.4%	34/43	79.1%
			1.00		0.56 (0.27–1.19), 0.134		2.78 (1.13–6.82), 0.026	
Prior TB disease								
Absent	93/148	62.8%	30/50	60.0%	29/50	58.0%	34/48	70.8%
			1.00		0.92 (0.41–2.04), 0.839		1.62 (0.70–3.75), 0.262	
Present	61/101	60.4%	25/42	59.5%	16/36	44.4%	20/23	87.0%
			1.00		0.54 (0.22–1.34), 0.185		4.53 (1.16–17.7), 0.030	
Diabetes								
Absent	126/200	63.0%	48/80	60.0%	34/65	52.3%	44/55	80.0%
			1.00		0.73 (0.38–1.42), 0.353		2.67 (1.20–5.92), 0.016	
Present	28/49	57.1%	7/12	58.3%	11/21	52.4%	10/16	62.5%
			1.00		0.79 (0.19–3.29), 0.741		1.19 (0.26–5.50), 0.823	

考 察

RFLP分析におけるクラスター形成は最近の感染を示唆するといわれ⁹⁾、本研究においても、他の多くの報告^{2)6)~9)}と同様に男性で年齢が若いほどクラスター形成率が有意に高かった。本市では人口の増加・流入が続いており、特定の遺伝子型が長期間流行する環境がなかったこととも矛盾しなかった。また、今回対象となった女性では、結核既往のない者が、結核既往者よりもクラスターを形成する傾向がみられたことから、新たな感染を受けて発病した患者がクラスター形成に関与していることが示唆された。糖尿病のない者が、糖尿病患者よりもクラスターを形成した傾向は、糖尿病が内因性発病のリスク要因といわれることから、同様の関連を支持する結果であった。結核感染を受けるリスクが高い職業といわれている看護師のクラスター形成については、個別にクラスター形成した事例が含まれていたが、例数が少なかったため看護師のみに焦点をあてた統計学的分析はできなかった。

一方で、男性では、感染危険度の高い患者が、RFLP分析のクラスター形成と有意に関連していた。クラスター形成患者のうち疫学調査によって直接的な感染曝露機会が明らかになったケースは15%であり、多数の曝露機会が不明であるが、感染危険度の高い患者が周囲に感染させることによりクラスター形成に寄与していると考えられ、本市の結核流行の特徴であると考えられる。ニューヨークにおいて、1993年以降に初めて分離された菌株パターンを“recent strain”として“historical strain”と区別し、患者の感染性を肺結核の有無、塗抹抗酸菌結果、空洞病変等から指標を作成して解析したところ¹⁰⁾、クラスターを形成する初めの2人の感染性が高いほど大きいクラスターを形成することが明らかにされており、本研究とは別の視点から患者の感染性とクラスター形成の関連を支持する結果であった。

結核既往のある患者については、最近の分子疫学的手法により、再発時の起因菌のDNAパターンが前回と異なる事例¹¹⁾、既感染率の高い集団での同一菌によるアウトブレイク事例¹²⁾等により外来性再感染が証明されており、また、家族間の潜在性感染から33年後に発病した症例でDNAパターンが一致した報告¹³⁾があり、再感染、内因性発病のどちらも起こりうるということが証明されている。本研究の男性対象者で、高齢者層（60歳以上）の分析において感染危険度が「最重要」の者では「その他」と比較して2.8倍、結核既往のある層の分析において「最重要」では「その他」と比較して4.5倍、それぞれクラスターを形成しやすいと推定されたことから、内因性発病であっても感染源としてクラスター形成に大きく寄

与すると考えられた。一方、若年者や結核既往のない層においては、感染危険度が低くても最近の感染を受けたことによってクラスターを形成する割合が比較的高いため、感染危険度による差が目立たなかったものと考えられた。糖尿病が内因性発病による結核発病のリスク要因と考えられている一方で、本研究の層別分析で糖尿病のある層において感染危険度によるクラスター形成率に差がみられなかったことに関しては、この層の「最重要」群の16人のうちで結核既往者が3人と少数であったためと考えられた。糖尿病があり結核既往のある者において、医学的管理が十分に行われ結核発病が早期発見された結果として感染危険度「最重要」が少なかった可能性が示唆されたが、詳細な分析のためにはさらなるデータの蓄積が必要と考えられた。

分子疫学的手法を用いて地域における結核流行の患者特性を検討した報告では、南アフリカ Cape Town¹⁴⁾において、特定地域の住民および治療脱落による再発がクラスター形成に有意に関連し、スペイン Elche⁷⁾では、若年、接触者のうち最も接触が濃厚な第1の円での高い感染率、都市部に居住、気管支鏡での採痰、多人数の職場が有意に関連しており、それぞれの地域における結核対策への応用が試みられている。本研究の結果から、結核既往者の内因性発病からの感染が本市における結核流行を特徴づける一つの要素と考えられ、本市の結核発生動向において、発病から登録まで3カ月以上経過したいわゆる「発見の遅れ」が全国と比較して高く、特に初診から登録まで1カ月以上の「診断の遅れ」が46.46%と高いことが関連する可能性についても検討する必要があると思われた。したがって、本市の結核対策において、基礎疾患をもつ高齢者や結核既往者等の発病ハイリスク患者の肺結核発病の早期発見に焦点をあて、「結核診療機能強化研修」等のさまざまな機会を活用して医療機関との連携をより強化する対策が特に重要であると考えられた。

本市では、市内の居住地による結核罹患率の差が他の政令指定都市と比較して小さく、地域による一定の傾向が認められず、市内全域で既感染者からの感染が起こっていると考えたと今回の結果と矛盾しない。しかし、個別のクラスターを検討した場合にクラスター内で居住地が近接している患者はごく一部であり、職業、余暇その他さまざまな活動において市内全域あるいは他市との交流が活発であるために、疫学的関連が把握できていない可能性も残される。香港の研究では⁸⁾、感染機会の可能性を含めても疫学的関連が35%にしか認められず、非濃厚接触 (casual contact) での感染が高率に起こっていると推測している。一方、オランダ Amsterdam¹⁵⁾で、通常のインタビュー以外にクラスター形成患者への2回

目のインタビューを実施した結果、クラスター形成者のうち86%に疫学的関連が認められたと報告している。結核菌遺伝子分析を有効に対策に活用するためには疫学調査との関連が重要であり、本研究では同意書が得られた患者の記録を閲覧する方法をとったが、今後、結核を含む感染症に関する調査研究の法令への位置づけの動向をみながら同意の手順についても検討する予定である。また、RFLP分析では検体採取から結果が出るまでに数カ月間を要する場合があります、再調査や接触者健診への活用が必ずしも容易ではないが、迅速に遺伝子多型を分析できる手法として、PCR法を用いた Variable Number of Tandem Repeat (VNTR), spoligotyping^{21,16)}等が活用されてきている。世界各地で大きな集団感染事例の感染源となった北京型結核菌¹⁷⁾が、国内でも70%以上の分離率が報告されるなど多くの割合を占めると考えられており、これらの分析のための最適なプローブの標準化・普及等¹⁸⁾¹⁹⁾によって、疫学調査とのより有機的な連携を図ることが期待される。

ま と め

結核菌 RFLP分析によるクラスター形成と患者特性の関連を検討することにより、対象地域における結核流行の特徴を明らかにした。男性で「若年」「感染危険度が最重要」、女性で「結核既往なし」「糖尿病なし」がクラスター形成に有意に関連した。男性の層別分析では、高齢層と結核既往のある層において、感染危険度指数の高い患者のクラスター形成率が特に高く、地域内の感染に対して結核既往者の内因性発病が大きく関与している可能性が示唆されたことより、本地域の結核対策において内因性結核発病の早期発見が重要な鍵を握ると考えられた。

謝 辞

結核菌 RFLP分析を実施し細かいデータを提供していただいた札幌市衛生研究所の藤田晃三所長、川合常明様に深謝いたします。本事業の円滑な運営にご協力いただいた国立病院機構札幌南病院、北海道社会保険病院のスタッフの皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Barnes PF, Cave D: Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J of Med.* 2003; 349: 1149-1156.
- 2) 阿野裕美, 松本智成, 吉多仁子, 他: IS 6110 RFLP解析に基づく、結核の分子疫学的検討—2001年～2003年. *結核.* 2006; 81: 321-328.
- 3) 高橋光良: 結核菌 DNAの RFLP分析を用いた結核分子疫学の研究と実践. *結核.* 2003; 78: 641-651.
- 4) 大島律子, 中嶋 洋: 結核対策における地域ベースの結核菌 RFLP解析の意義. *日本公衛誌.* 2005; 52: 736-745.
- 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. *札幌市衛生研究所年報.* 2000; 27: 52-56.
- 6) Kempf MC, Dunlap NE, Lok KH, et al.: Long-term molecular analysis of tuberculosis strains in Alabama, a state characterized by a largely indigenous, low-risk population. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 870-878.
- 7) Ruiz M, Navarro JF, Rodriguez JC, et al.: Effect of clinical and socio-economic factors on the rate of clustering of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Elche (Spain). *Epidemiol Infect.* 2003; 131: 1077-1083.
- 8) Chan-Yeung M, Kam KM, Leung CC, et al.: Population-based prospective molecular and conventional epidemiological study of tuberculosis in Hong Kong. *Respirology.* 2006; 11: 442-448.
- 9) Haldal E, Dahle UR, Sandven P, et al.: Risk factors for recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J.* 2003; 22: 637-642.
- 10) Driver CR, Macaraig M, McElroy PD, et al.: Which patients' factors predict the rate of growth of *Mycobacterium tuberculosis* clusters in an urban community? *Am J Epidemiol.* 2006; 164: 21-31.
- 11) Kruuner A, Pehme L, Ghebremichael S, et al.: Use of molecular techniques to distinguish between treatment failure and exogenous reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Infectious Diseases.* 2002; 35: 146-155.
- 12) 近藤有好, 桶谷典弘, 桑原克弘, 他: 老健施設における結核の外来性再感染と思われる集団発生について. *結核.* 2002; 77: 401-408.
- 13) Lillebaek T, Dirksen A, Baess I, et al.: Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. *J Infect Dis.* 2002; 185: 401-404.
- 14) Verver S, Warren RM, Munch Z, et al.: Transmission of tuberculosis in a high incidence urban community in South Africa. *Int J Epidemiol.* 2004; 33: 351-357.
- 15) van Deutekom H, Hoijing SP, de Haas PEW, et al.: Clustered tuberculosis cases. Do they represent recent transmission and can they be detected earlier? *Am J Respir Crit Care Med.* 2004b; 169: 806-810.
- 16) Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology.* 2006; 23: 1186.
- 17) Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al.: Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis [serial online].* 2002; 8.
- 18) 大島律子, 多田敦彦: 岡山地区で分離された結核菌における Beijing family および他の遺伝子型. *結核.* 2004; 79: 47-53.

19) 高嶋哲也, 岩本朋忠: 第81回総会シンポジウム「結核

分子疫学の新展開」. 結核. 2006; 81: 693-707.

Original Article

ASSOCIATION BETWEEN CLUSTERED STRAIN OF *M.TUBERCULOSIS*
AND INFECTIOUSNESS INDEX OF TUBERCULOSIS CASES
IN A POPULATION-BASED *IS 6110*-RFLP ANALYSIS^{1,2}Eri TSUKISHIMA, ^{1,3}Yuu MITSUHASHI, ¹Koichi YANO, ¹Aiko TAKASE,
⁴Arisu KAMADA, ⁴Masaru AMISHIMA, ⁵Yasushi AKIYAMA
⁵Michihiro FUJINO, ⁴Katsuyuki TOBISE, and ⁴Fujiya KISHI

Abstract [Objective] Isolates of *M. tuberculosis* were analyzed for their DNA fingerprints to facilitate understanding of ongoing transmission of tuberculosis in Sapporo (population 1.87 million), Japan, where the incidence rate of tuberculosis was 15.0 per 100,000 in 2004.

[Subject] Out of all tuberculosis patients registered in the city from November 1998 to December 2003, isolates from culture-positive respiratory tuberculosis cases for whom written informed consent had been obtained, were analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). The study included 345 cases (249 men and 96 women) whose isolates were available for DNA patterns.

[Method] Using standard *IS6110*-RFLP typing, cases whose isolates shared identical fingerprints were considered to belong to the same cluster. Proportions of clustered cases were evaluated according to their clinical and socio-economical characteristics.

[Results] Out of 345 cases, 207 (60.0%) were classified into 59 clusters, and 15% of clustered cases having definite epidemiological links. Multiple logistic regression analysis in men showed that age and infectiousness were significantly related to clustering. The adjusted odds ratios (OR) [95% confidence intervals (CI)] were 0.17 [0.03-0.79] for 30-59 years, 0.15 [0.03-0.69] for 60 years or over and 2.35 [1.17-4.70] for those cases assigned as the highest level of transmis-

sion of tuberculosis from the infectiousness index of cases. For women the final model showed the adjusted OR [95% CI] were 0.52 [0.22-1.22] for those with previous history of tuberculosis and 0.33 [0.06-1.85] for diabetics. In male cases with a previous history of tuberculosis, most highly infectious cases were significantly associated with clustering (OR [95% CI], 4.53 [1.16-17.68]).

[Conclusion] The results suggest that highly infectious male tuberculosis cases with endogenous reactivation have contributed to recent transmission of tuberculosis in the studied area.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Molecular epidemiology, Restriction fragment length polymorphism, Infectiousness index of tuberculosis cases, Cluster rate

¹Sapporo Public Health Office, ²Health & Welfare Department, Kiyota Ward Office, City of Sapporo, ³Health & Welfare Department, Kita Ward Office, City of Sapporo, ⁴National Hospital Organization Sapporo-Minami National Hospital, ⁵Hokkaido Social Insurance Hospital

Correspondence to: Eri Tsukishima, Sapporo Public Health Office, 19 Odori Nishi, Chuo-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-0042 Japan. (E-mail: eri.tsukishima@city.sapporo.jp)