

患者喀痰からの BCG Tokyo 株の検出と 公衆衛生行政的対応について

オオハタ リツコ ナカジマ ヒロシ イワモト マユミ コデラ リョウセイ
大島 律子* 中島 洋* 岩本 真弓^{2*} 小寺 良成^{3*}

目的 結核として届け出のあった患者からの分離菌が、BCG 株と判明した事例の体験をもとに、迅速で有効な結核対策のための、発生動向調査や菌検査の精度管理のあり方ならびに医療機関と保健所など関係機関の連携について検討することを目的とした。

方法 医療機関で分離・培養された抗酸菌について、制限断片長多型 (restriction fragment length polymorphism, 以下 RFLP) 解析を行うことにより分子生物学的な面から病原体情報を取りまとめ、その結果を医療機関および所管保健所へ還元した。

結果 肺結核と診断された患者の喀痰材料から分離された菌株について、IS6110およびPGRS (polymorphic GC-rich repetitive sequence) をプローブとした RFLP 解析を行ったところ、BCG 様パターンを示す株が検出された。患者情報の追加調査により、患者は膀胱癌治療のため BCG 免疫療法を受けていたことが判明し、それに由来するものと推測された。この結果を受け、医療機関ではこの症例の再検討を行い、所管保健所においては、2 回目以降の接触者検診計画が中止された。

結論 今回の事例から、十分な発生動向調査と精度管理に基づく適切な菌検査の重要性が認識された。特に高齢者の結核では、合併症など特殊な事情があるため、医療機関と保健所の十分な連携と情報交換も重要と考えられた。また、分子生物学的手法としての RFLP 解析は、感染源究明に非常に有効であり、今後の結核対策に大いに役立つことが示唆された。

Key words : 結核, 発生動向調査, 菌検査の精度管理, 関係機関の連携, RFLP 解析, 情報交換

I 緒 言

我が国では、高齢者の結核は年々増加傾向にあり、1999年の新登録患者に占める60歳以上の割合は58%となった。最近の結核の新規登録患者数および罹患率にみられる逆転上昇の大きな要因は、このような高齢者における罹患率の上昇と人口の増加であると推測されている。一方で、多くの年齢で低下傾向の鈍化や上昇がみられるのは、高齢者から若い年齢層への結核の伝播による可能性が高く、結核対策上非常に重要であると思われる^{1,2)}。

高齢者の結核の多くは、過去の感染の再燃であ

るが、その要因として、加齢やさまざまな疾病に起因する免疫機能の低下があげられる。発病のリスク要因となる基礎疾患としては、糖尿病や悪性腫瘍などがあるが^{1,3)}、その基礎疾患の影響により結核の病態も複雑化し、診断にも影響を及ぼす場合がある⁴⁾。

現在岡山県では、結核対策特別促進事業として、感染源・感染経路の究明および県内の結核蔓延状況の把握を目的として、新登録患者から分離された結核菌 DNA の RFLP 解析を実施しているが、今回、その RFLP パターンの特徴から BCG 株を発見し、接触者検診等通常の結核菌としての対応を中止した事例に遭遇した。追加調査により、患者は膀胱の移行上皮癌を基礎疾患に持ち、BCG 免疫療法を受けていたことが判明し、分離された菌はそれに由来するものと思われた。

この経験を踏まえ、有効で無駄のない結核対策のための、発生動向調査や菌検査の精度管理のあ

* 岡山県環境保健センター

^{2*} 岡山県保健福祉部健康対策課

^{3*} 岡山県岡山保健所

連絡先：〒701-0298 岡山市内尾739-1 岡山県環境保健センター保健科学部微生物科 大島律子

り方ならびに医療機関と保健所をはじめとする行政機関の連携について検討したので報告する。

II 対象および方法

1. 当研究所に菌株が搬入された時点での患者情報

患者：80歳男性

発病：H13年3月

初診：H13年4月9日（A医院）

診断名：肺結核，喀痰塗抹G5，感染危険度数5（判定：重要）

届出：H13年4月19日（B病院）

2. RFLP 解析

1) 使用菌株

被検菌株は，B病院で喀痰材料から分離・同定後小川培地に培養され，当研究所に搬入されたものをを用いた。

2) 菌株からの DNA 抽出

DNA抽出は，DNA抽出キット ISOPLANT（ニッポンジーン）を用いて行った。小川培地上の菌体を1白金耳とり，マニュアルに従ってDNAを抽出した。

3) RFLP 解析

高橋らの方法^{5,6)}に従い，結核菌DNAを制限酵素 *Pvu* II で消化した後，0.8%アガロースゲル電気泳動，ナイロンメンブレンへの転写，UV固定を行い，次いで65°C 3時間のプレハイブリダイゼーション後，プローブを加えて65°C 15時間以上のハイブリダイゼーションを行った。プローブは，結核菌群特異的挿入配列 IS6110由来245 bpのPCR産物をRandom primer DNA labeling kit（宝酒造）でビオチン標識して用いた。ハイブリダイゼーション後のメンブレンを洗浄後，アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン液と室温で15分間反応させ，化学発光基質を加え，メンブレン上のDNAをX線フィルムに感光させて検出した。また，IS6110によるRFLPパターンでバンド数が5本以下の菌株の2次分類として，結核菌のプラスミド上の繰り返し配列 PGRS をプローブとしたRFLP解析^{6,7)}も，制限酵素 *Sma* I を用い，同様に実施した。

3. BCG 様パターンを示す株の検出に関する患者情報の追加調査

通常，結核患者の喀痰からBCG株が分離され

ることはきわめてまれなため，医療機関の主治医，検査担当者および所管保健所担当者から病状等についての詳細な情報を収集した。

4. 菌の確認

被検菌株がBCG株であることの確認は，財結核予防会結核研究所に依頼した。

III 結果

1. RFLP 解析結果

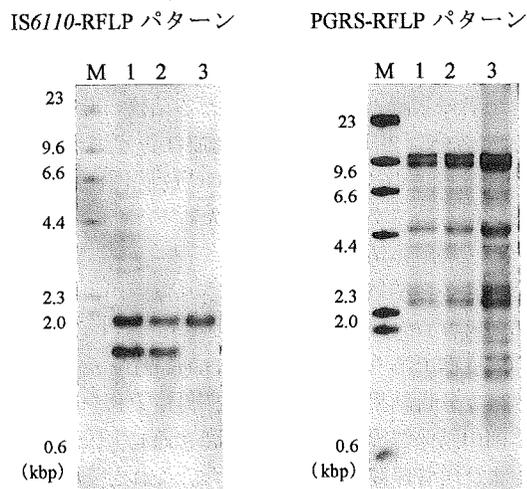
被検菌株はIS6110をプローブとしたRFLP解析により，1.7 kbと1.5 kbの2本のバンドを持つBCG Tokyo株特有のパターン^{6,8~10)}を示したため，2次分類として，PGRSをプローブとしたRFLP解析を実施したところ，この結果でもBCG Tokyo株とパターンが一致した（図1）。さらに，財結核予防会結核研究所に依頼した確認検査においても，BCG Tokyo株との一致がみられた。

2. 追加調査により得られた情報

1) 所管保健所からの情報

結核既往歴：S 18年，S 27年およびS 38年の3

図1 RFLP 解析結果



M : Lambda DNA/*Hind* III Fragments

1 : 患者由来株

2 : *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo KK12-21

3 : *Mycobacterium bovis* BCG Glaxo KK12-03

回

合併症：平成10年に膀胱移行上皮癌発病

現病の経過：H13年3月頃から微熱，食欲低下，体重減少，軽度の咳があり，4月9日に血痰を認めたため近医（A 医院）を受診，結核の疑いとして専門病院（B 病院）を紹介され4月13日に入院したが，7月に基礎疾患治療のために転院したC 病院で肝不全により死去した。

患者環境：一人暮らし，無職。行動範囲は近所への買い物程度。

接触者：県内に住む患者の長男夫婦およびその子供，患者自宅の離れに住む患者の孫とその同居人，近所に住む兄夫婦および兄の息子夫婦とその子供3人の計12人（いずれも成人）が家族検診の対象として，A 医院の職員が接触者として検診の対象にあげられた。

2) 医療機関からの情報

菌の同定：核酸増幅法による同定キット AMPLICOR (Roche) を用いており，ナイアシンテスト等の生化学試験⁹⁾は実施していなかった。

合併症に関する情報：患者がH12年6月からH13年の始めにかけて膀胱移行上皮癌の治療のためにBCG膀胱内注入療法を受けていたことが判明した。

3. 患者情報と関連づけた原因菌の分析

患者の年齢と過去3度にわたる結核の既往歴からワクチンとしてのBCG接種は否定されたため，分離されたBCG株はBCG膀胱内注入療法由来のものであると推測された。

4. 病原体情報の還元

患者から結核菌として分離された菌が，膀胱癌治療のためのBCG免疫療法に由来するBCG Tokyo株であり，通常の人には病原性を示さないという分析結果は，県内の結核対策業務を総括する岡山県保健福祉部健康対策課を通して医療機関および所管保健所へ還元された。これを受けて，医療機関では当症例の再検討が行われ，所管保健所では，登録直後の接触者検診はすでに実施済みであったが，2回目以降の検診計画が中止された。

IV 考 察

近年，膀胱の移行上皮癌に対する免疫療法としてBCGの膀胱内注入法が行われることがあるが，副作用が高度な場合，全身播種などを生じ，

喀痰や血液等からBCG株が分離されることがある^{11~13)}。今回の事例は，基礎疾患により免疫状態が低下したため，治療に用いられたBCG株により発病したものと推測された。このような事例は全国で年間に数例は発見されるが，医療機関や保健所でもその認識は低く，また，最近医療機関で菌の同定に多く用いられている核酸増幅法による検出キットでは，結核菌とBCG菌は「結核菌群」として一括して検出されるため¹⁴⁾，見過ごされている可能性がある¹⁵⁾。

今回，保健所と医療機関の双方で患者の膀胱ガンを把握していながらもBCG株として検出できなかったのは，上述の事情に加え，双方の情報交換が十分でなかったためと考えられた。保健所からの患者情報と，医療機関からの疾病や菌分離同定検査方法に関する情報が十分に交換されていれば，結核審査協議会等でBCG株の分離が予測できた可能性があった。また，その情報が医療機関の検査サイドに伝わっていれば，菌同定の段階で，生化学試験等により鑑別でき，不要な感染予防対策による患者や家族等周囲の人々の身体的・精神的負担を回避できたと思われる。

現在，保健所が掌握する結核関係情報は，結核発生动向調査事業により収集・解析されている。しかし，これらは登録制度による患者発生届け等を主な情報源としているため，病原体情報に関する解析が不足していると思われる。菌同定検査所見やRFLP検査所見等の病原体情報は，感染源究明の重要な指標になりうると考えられた。

一方，今回の事例から，特に高齢者の結核では，合併症など特殊な事情があるため，医療機関と保健所間の連携と情報交換の必要性も認識された。

今後，同様なケースが生じた場合の対策として，担当者への周知徹底の必要性も示唆された。菌検査に関しては，適切な検査方法のマニュアル化と精度管理が必要と思われる。また，分子生物学的手法であるRFLP解析結果の活用の有効性も認識された。RFLP解析は，本来，集団感染と偶然同時発生の判定，再燃と再感染の区別，感染経路の確認などに科学的な根拠を与える非常に有効な手段であり，地方衛生研究所において徐々に普及してきている¹⁶⁾。今回のようなBCG株との鑑別には，データベースとしてあらかじめBCG

株のパターンを登録し、疑わしい事例と比較することで迅速に対応できると思われた。今後の課題として、病原体情報として RFLP 解析結果を発生動向調査に取り入れることは、より正確な結核対策に役立つと思われた¹⁶⁾。

以上のことから、迅速で有効な結核対策のためには、十分な発生動向調査と精度管理に基づく菌検査が重要であることがわかった。また、医療機関と保健所における普段からの連携と情報交換の必要性も認識された。さらに、RFLP 解析結果の活用は今後の結核対策に大いに役立つことが示唆された。

本稿をまとめるにあたり、多くのご指導・ご助言をいただきました勅結核予防会結核研究所の高橋光良先生、国立療養所南岡山病院の坂口基先生ならびに当研究所の小倉 肇所長に深謝いたします。

(受付 2001.12.10)
(採用 2002. 5.16)

文 献

- 1) 厚生省保健医療局結核感染症課監修. 結核の統計 2000. 東京: 勅結核予防会, 2000; 9-16.
- 2) 毛利昌史. 結核の現状: 問題と対策 いまなぜ「結核」か?. BIO Clinica 2001; 16: 16-17.
- 3) 国立療養所化学療法共同研究会. 国立療養所における高齢者結核の現状. 結核 2001; 76: 533-543.
- 4) 蝦名昭男. 結核の画像診断と鑑別診断 陳旧性結核・再発. Modern Physician 2000; 20: 1117-1119.
- 5) 高橋光良, 阿部千代治. IS6110をプローブとした RFLP 分析による結核菌の亜分類. 日本細菌学雑誌 1994; 49: 853-857.
- 6) 高橋光良. 結核菌挿入断片 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.
- 7) Cousins D, Williams S, Liébana E, et al. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 168-178.
- 8) 高橋光良. 結核菌 DNA の RFLP 分析. Modern Physician 2000; 20: 1154-1156.
- 9) 阿部千代治. 抗酸菌の検査. 東京: 勅結核予防会, 1998; 89-91, 49-50.
- 10) Takahasi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Microbiol Immunol 1993; 37: 289-294.
- 11) 山口智道. BCG 膀胱内注入法によって起きた粟粒結核. 資料と展望 1993; 5: 48.
- 12) Aljada IS, Crane JK, Corriere N, et al. *Mycobacterium bovis* BCG causing vertebral osteomyelitis (Pott's disease) following intravesical BCG therapy. J Clin Microbiol 1999; 37: 2106-2108.
- 13) Floyd MM, Silcox VA, Jones WD, et al. Separation of *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by using high-performance liquid chromatography of mycolic acids. J Clin Microbiol 1992; 30: 1327-1330.
- 14) 新結核菌検査指針2000. 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編. 東京: 勅結核予防会, 2000; 56-65.
- 15) 日本結核病学会予防委員会. 新時代の結核研究と対策について—1999年. 結核 1999; 74: 623-652.
- 16) 森 享. 保健所における結核対策強化の手引きとその解説. 東京: 勅結核予防会, 2000; 49, 8-9.

DETECTION OF MYCOBACTERIUM BOVIS BCG TOKYO IN SPUTUM FROM A TUBERCULOSIS PATIENT AND ADMINISTRATIVE ACTION IN PUBLIC HEALTH

Ritsuko OHATA*, Hiroshi NAKAJIMA*, Mayumi IWAMOTO^{2*}, and Ryousei KODERA^{3*}

Key words : Tuberculosis, Sureillance, Quality assurance, Cooperation among related organaizations, RFLP analysis, Exchange of information

Purpose We encountered a tuberculosis patient with the BCG strain in his sputum. Based on this experience, we investigated ideal surveillance and quality assurance for bacteriological examination as well as cooperation between medical organizations and public administrative organizations such as public health centers for prompt and appropriate measures against tuberculosis.

Methods Acid-fast bacilli isolated in the laboratory of a hospital were analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and molecular epidemiological data for pathogen were provided to the public health center in charge.

Results DNA of acid-fast bacilli isolated from sputum of a tuberculosis patient showed a BCG like pattern on RFLP analysis using two IS6110 and PGRS (polymorphic GC-rich sequence) probes. Additional investigation revealed that the patient had been treated with BCG immuno-therapy against bladder cancer. Accordingly, it was suggested that this was the origin of the BCG strain in the sputum. Therefore, the patient was re-examined clinically, and further contact tracing by the public health center was stopped.

Conclusions This study indicates that adequate surveillance and quality assurance in bacteriological examination as well as effective exchange of information between medical organization and public health centers are very important for prompt and appropriate measures against tuberculosis. Further, it provided strong support for identification of pathogens of the molecular level by RFLP analysis.

* Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health

^{2*} Section of Measures against Health, Department of Health and Welfare, Okayama Prefectural Office

^{3*} Okayama Prefectural Public Health Center