

結核対策における地域ベースの結核菌 RFLP 解析の意義

オオハタ リツコ ナカジマ ヒロシ
大島 律子* 中嶋 洋*

目的 結核対策に分子疫学的手法のひとつである RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism 制限酵素断片長多型) 解析を用い、感染源・感染経路の究明や二次感染予防などに役立つ指標を得ること。

方法 平成12~15年度までの4年間に岡山県内の医療機関で新登録患者から分離された結核菌を収集し、患者の年齢や居住地区等の疫学的背景が明らかでない474株を対象として RFLP 解析を実施した。RFLP パターンのバンド数の分布から結核蔓延状況を解析し、クラスター解析から地域の流行株を調べた。感染様式を推測するため、RFLP パターンの年次推移や患者年齢層毎の違いおよび地域別の違いを調べた。集積された RFLP 解析結果は、菌株情報と併せてデータベース化し、結核感染事例発生時に感染源および感染経路を究明する他、モニタリングにより集団感染や散発事例の潜在的なリンクを発見するため用いた。

結果 474株の RFLP パターンから、県内の結核状況が過去の高蔓延時代を強く反映していることが判った。パターンが100%一致したクラスター37組110株中、患者間に接点が認められたのは20%であり、おもに60歳以下であった。RFLP パターンの類似性による分類では、3つの流行株グループが認められ、約40%がこれらに属した。RFLP パターン分布では、年次推移・患者年齢層毎および地域別に大きな相違はみられなかった。これらのことから、県内の結核菌の大部分は、過去の株が高齢者の再燃等で広い年齢層に広範囲に感染して受け継がれて来たと推測された。したがって、高齢者の発病防止が岡山県の結核対策上重要と思われた。RFLP データベースの活用では、事例の感染源および汚染源の究明において疫学調査結果を支持する科学的根拠となり有用であったが、集団感染や散発事例の潜在的なリンクの発見はできなかった。

結論 RFLP 解析により、結核蔓延状況や流行株の存在等、結核対策に役立つ基礎データが得られた。また、事例の感染源・汚染源究明においては、従来の疫学調査結果を科学的に支持する事ができた。データベースからの集団感染や散発事例の潜在的なリンクの発見はできなかったが、今後、疫学調査の強化と効率的な調査の継続により発見が可能となり、結核対策に貢献できると思われた。

Key words : 結核, RFLP 解析, 岡山県, 結核蔓延状況, 流行株, データベース

1 緒 言

近年、結核の伝播の解析に分子疫学的手法が多く用いられるようになった。それらの手法の中で、世界的に標準化され、最も広く用いられているのが、結核菌遺伝子の挿入配列 IS6110 をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションによ

り検出する RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism 制限酵素断片長多型) 解析法^{1~3)} である。

岡山県では、感染源・感染経路の究明を行い、結核の二次感染予防等結核対策に役立つ指標を得ることを目的とし、平成11年12月から平成16年3月まで「結核対策特別促進事業」として、県内の新登録患者から分離された結核菌株を集積し、DNA の RFLP 解析を実施した。我々は、約4年間における調査で得られた知見および分子疫学的手法のひとつである RFLP 解析の結核対策にお

* 岡山県環境保健センター
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細菌科
大島律子

る意義について報告する。

II 研究方法

調査は、岡山県が実施主体となり、県内の全保健所（県の9保健所、岡山市保健所および倉敷市保健所）、結核病床を有する11病院、医療機関から結核菌検査の依頼を受けている民間の6検査機関および岡山県環境保健センターの各機関が連携して行った（図1）。

1. 使用菌株およびRFLP解析

調査の対象は、県内の医療機関や検査機関で結核新登録患者から分離された結核菌全株とした。

ここで、平成12～15年の岡山県の結核新登録患者のうち、菌陽性患者は45～55%で、4年間の結核菌の推定分離株数はおおよそ900（平成12～15年の結核新登録患者総数1846の約50%）になる⁴⁻⁷。しかし、複数の医療機関からの同一患者の菌株の重複、一部の医療機関の理解が得られず菌株が提供されない、菌株受理と菌株情報入手までのタイムラグが大きい等の問題が生じ、平成12～15年度に実際に搬入されたのは709株で、うち、調査期間内に菌株情報が入手できてRFLP解析に供されたのは、474株（調査期間の推定分離株数の約50%）であった。

RFLP解析は定法に従い^{8,9}、RFLPパターンのクラスター解析には解析ソフトを用いた。また、

IS6110によるRFLPパターンでバンド数（以下IS6110コピー数と称す）が5以下の場合には、個体識別能が低く¹⁰2次分類が必要なため、PCR法を基本としたspoligotyping^{11,12}を実施した。

2. 地域の結核蔓延状況および流行株の解析

結核蔓延状況は、RFLPパターンのIS6110コピー数の分布から解析し、県内で優勢に分布している流行株については、RFLPパターンのクラスター解析から調べた。また、感染様式を推測するため、RFLPパターンの年次推移や年齢層別および地域別の違いを調査した。地域別では、県人口の約80%を占める都市部の県南部と、主に農村部の県北部をそれぞれ東西に分割し、4地域における違いを調べた。

3. RFLPデータベースの作成

結核感染事例発生時に活用する他、モニタリングによる集団感染や散発事例の潜在的なリンクを発見するため、患者の年齢、検体番号、保健所単位の居住地域、発病年月日、検体採取年月日およびRFLP解析結果を記載したRFLPデータベースをExcel fileを用いて作成した。データベースは、岡山県環境保健センターが保健所から菌株情報の提供を受けて作成・管理した。RFLP解析結果は、岡山県健康対策課を通して保健所や医療機関に還元され、保健所では主に患者登録時の初回面接で得られた情報を基に患者の接触状況の検討

図1 岡山県における結核菌 RFLP 解析事業

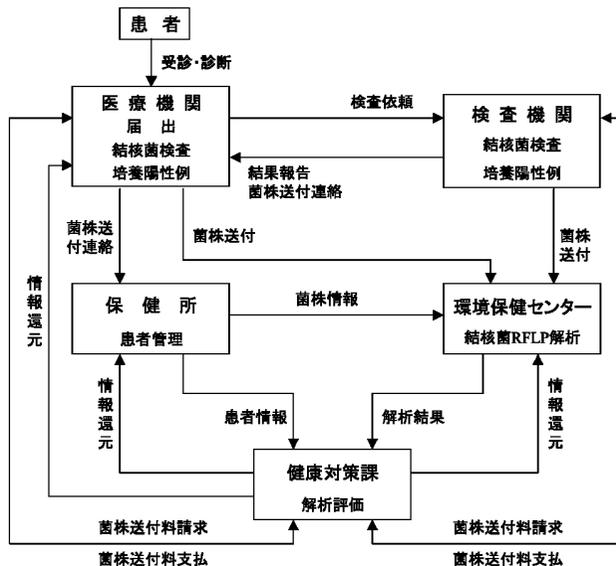


表1 RFLP解析事例(平成12~平成15年度)

事例	関連性	患者	年齢	発病	RFLP	事例概要
1	同じ病室の患者	A* B	59 72	1999/7/— 2000/1/18	一致	患者Aが肺炎で入院中に結核と診断され、当時同室であった肺炎患者Bが6か後の接触者検診で結核と診断された。Bは高齢であり内因性再燃も疑われたが、両者からの分離株のRFLPパターンが一致したため、AからBへの感染と考えられた。
2	高校の同級生	A B	18 18	不明 2000/4/5	一致	2000年3月にX高校を卒業し、県外に進学した3人が同5~8月に結核と診断され、初発患者Aと患者Bからの分離株のRFLPパターンが一致した。接触者検診の結果、X高校の同級生や進学先の学生ら39人(県外8人)が感染の疑い濃厚の集団感染となった。
3	同じ病院の患者	A B C	68 58 71	2000/1/— 2000/5/— 2000/6/—	相違	結核以外の疾患で同じ病院に入院していた3人の患者が入院中に相次いで結核と診断された。院内感染が疑われたが、3人からの分離株のRFLPパターンが異なったため、それぞれ感染源が異なることが判った。
4	親子	A B	51 76	1999/10/— 2000/6/—	一致	患者Bの子である患者AからBへの感染が疑われ、両者からの分離株のRFLP分析をしたところ、パターンが一致し、家族内感染と考えられた。
5	同じ趣味のサークル	A B	86 73	2000/10/— 2000/11/—	相違	同じ趣味のサークルに属していた2人が約1か月の期間に相次いで発病したが、両者由来株のRFLPパターンが異なり、それぞれ別の感染源と判明した。
6	同じ病院の職員	A B C	32 36 21	2000/—/— 2000/12/— 2000/10/—	相違	結核病床を有するY病院で3人の職員が結核を発病し院内感染が疑われたが、3人からの分離株のRFLPパターンが異なり、それぞれ別の感染源と判った。Y病院内の患者由来株との比較でも、感染源と思われる株はみつからなかった。
7	共通の飲食店の利用者	A* B	47 59	1998/7/17 2001/—/—	相違	患者A・Bは共通の飲食店を頻繁に利用していた。Aからの分離株は保存されていなかったが、(財)結核予防会結核研究所(以下「結核研」と略す)で実施したRFLP分析写真があり、B由来株と比較した結果、パターンが異なり両者間の感染は否定された。
8	同じ病院の患者(A, B, C)と職員(D, E)	A B C D E	51 96 60 48 25	1999/5/— 2000/6/24 2001/9/— 2001/8/— 不明	相違	Z病院の結核以外の疾患の患者と職員が相次いで結核を発病したため、近年中にZ病院に関連があった結核患者も併せて分離株のRFLP分析を行い感染源を確認した。5人全てのパターンが異なり、それぞれ別の感染源と判明した。
9	同僚	A B	57 60	2001/11/7 2002/—/—	一致	患者Aの接触者検診で患者Bの発病が判明し、両者からの分離株のRFLP分析をしたところ、パターンが一致したため職場内感染と考えられた。
10	同僚	A B	44 51	2001/11/20 不明	一致	患者A・BはAの発病2年前からの同僚で、Aには1995年に結核治療歴があり、Bは1993年の結核登録以降入院加療せず慢性排菌状態であった。両者からの分離株のRFLPパターンは一致し、Aの発病はBからの再感染によると思われた。
11	同僚(A, B)とBの近隣居住者(C)	A B C	23 52 21	2000/8/— 不明 2001/3/—	一致	患者Aの接触者検診で、職場内に感染者1人と長期間咳をしている同僚Bが発見され、Bは結核排菌者と判明した。また、大学の健康診断で結核と診断された患者Cは、Bとパチンコ店で接点があり、分離株の薬剤感受性パターンがA・B由来株と同じであった。3人からの分離株のRFLPパターンは一致し、BがA, Cの感染源と考えられた。
12	同じ病室の患者	A B	50 75	2001/11/— 2002/1/—	一致	患者A・Bは患者Aが結核排菌状態と考えられる時期に病院の同室に入院しており、両者からの分離株のRFLPパターンが一致したため、AからBへの院内感染と考えられた。

表1 RFLP 解析事例 (平成12~平成15年度) つづき

事例	関連性	患者	年齢	発病	RFLP	事例概要
13	同じ病院の患者	A	89	2000/10/—	一致	患者A~Dは、精神医療と高齢者の認知症治療を主としたM病院に入院中に接触があった。4人からの分離株のRFLPパターンはA・B由来株及びC・D由来株でそれぞれ一致し、A-B間とB-C間の感染が示唆された。感染経路としてAからB、CからDへの感染が推測されたが、Bには腸結核の既往歴が有り、外来性再感染と考えられた。
		B	83	2001/11/—		
		C	82	1999/4/—	一致	
		D	64	2001/—/—		
14	同じ病院の患者(A, B)と職員(C, D)	A	49	2000/3/23	相違	同じ病院の患者A, Bが結核を発病後、Bの接触者検診対象者の職員Cが結核を発病し、3人の関連を調べた。B・Cからの分離株のRFLPパターンが一致し、BからCへの感染が支持されたが、Aはパターンが異なった。Cの接触者検診により、職員Dの発病と予防内服対象者数名が発見されたが集団感染には至らなかった。
		B	51	2000/12/—	一致	
		C	23	2001/7/—		
		D	23	2002/3/29		
15	同じ病院の患者	A*	52	1998/2/23	一致	1999年に結核研で実施された患者A~Cの分離株のRFLP解析によりA-B間の感染が支持されていたが、2002年に新たに同病院の患者Dが結核を発病したので4人からの分離株のRFLPパターンを比較した。D由来株のRFLPパターンはA-BおよびC由来株とは異なり、感染源が違うことが判った。
		B*	64	1999/11/17		
		C*	?	1998/4/—	相違	
		D	70	2002/2/14		
16	同じ病院の患者(A)と職員(B)	A	83	2002/1/7	一致	a市居住の患者Aの結核登録の11か月後にb市居住の患者Bが登録され、Bの疫学調査によりc市内のN病院でAとの接触が判明した。両者からの分離株のRFLPパターンは一致し、a~c市を所管する3保健所の情報交換によりAからBへの感染と考えられた。
		B	24	2002/10/—		
17	検査室内汚染	A	71	2001/12/—	一致	L病院で2002年1月4日に培養された結核菌4株について検査室内汚染が疑われ、RFLP分析したところパターンが一致した。培養時の塗抹陽性は患者Aのみで、結核の臨床所見はA・Bのみみられた。Cは肺に病巣があったため培養陽性により結核の届出がされていたが、Dは培養陽性時には病巣が消失しており結核が否定されていた。病院内の調査の結果、検体処理中にAの検体がB~Dの検体に混入したことが推測された。菌検査の誤りとその後の臨床所見からCの結核は否定され、L病院から保健所に結核登録取消の依頼があり、登録が抹消された
		B	77	2001/12/—		
		C	63	2002/2/4届出		
		D	56	2002/4/11登録抹消 臨床的に結核否定		
18		A	80	2001/3/—	一致	肺結核患者Aの喀痰分離株のRFLPパターンがBCG株と一致したため、結核研に鑑別を依頼したところBCG株と同定された。Aは膀胱ガンの免疫療法としてBCG膀胱内注入法を受けていたことが判明し、分離菌はそれ由来と判った。Aは感染危険度指数10と判定され、既に1回目の接触者検診は実施されていたが、2回目以降は中止された。

* これらの患者からの分離株は平成12年度以前に調査されたため、今回の調査対象474株には含まれていない

が行われた(図1)。

個人情報保護に関しては、人の試料に含まれる「病原体」を対象とする調査には、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年3月29日文部科学省・厚生労働省・経済産業省)に基づくインフォームドコンセントは不要と考えられた。しかし、病原体に関連する患者情報は、個人情報となるため、データベースは必要最小限の情報とし、RFLPパターンの一致により患者間の関連が疑われた時点で、保健所が把握する患者情報と検体番号で照合するシステムとした。

4. 事例検討

結核感染事例や検査室内汚染事例の感染源及び

汚染源を究明するため、保健所における疫学調査等から同一感染源が疑われた16事例、医療機関での検査室内汚染が疑われた1事例およびBCG類似株が検出された1事例の計18事例について、分離菌株のRFLPパターンを比較し、患者間の関連性や汚染の有無等を検討した(表1)。

III 研究結果

1. 調査した結核菌株の状況

調査対象と岡山県全体の患者構成に有意な差は無く(表2)、今回の調査は、県の全体像を概ね反映していると考えられた。全国との比較では、80歳以上の割合が岡山県で有意に高かった。

表2 調査対象と岡山県及び全国の年齢階級別結核新登録患者数の割合

(%)

年齢	H12年			H13年			H14年			H15年		
	調査対象* n=149	岡山県 n=544	全国 n=39,384	調査対象* n=117	岡山県 n=488	全国 n=35,489	調査対象* n=114	岡山県 n=441	全国 n=32,828	調査対象* n=94	岡山県 n=373	全国 n=31,638
<20	2.7	1.5	1.6	0.9	1.4	1.7	0.9	1.8	1.5	0.0	0.8	1.4
20-29	4.0	5.9	9.1	8.5	8.2	8.9	5.3	5.0	8.8	8.5	7.2	8.9
30-39	6.0	8.1	8.3	3.4	6.8	8.6	3.5	5.0	8.7	3.2	6.2	8.9
40-49	5.4	8.6	9.2	5.1	6.1	8.5	7.9	7.7	8.2	6.4	5.1	7.8
50-59	8.1	11.0	15.4	11.1	13.3	15.2	11.4	12.2	14.5	6.4	10.5	14.0
60-69	12.1	14.9	17.7	13.7	14.8	17.5	17.5	18.4	16.9	19.1	16.6	16.2
70-79	34.9	25.7	22.5	24.8	23.0	22.3	27.2	24.9	23.2	26.6	30.8	23.1
≥80	26.8	24.3	16.3	32.5	26.4	17.4	26.3	24.9	18.3	29.8	22.8	19.9
計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

* 調査対象は年度の数値を示す

2. 地域の結核蔓延状況および流行株の解析

1) IS6110コピー数の分布

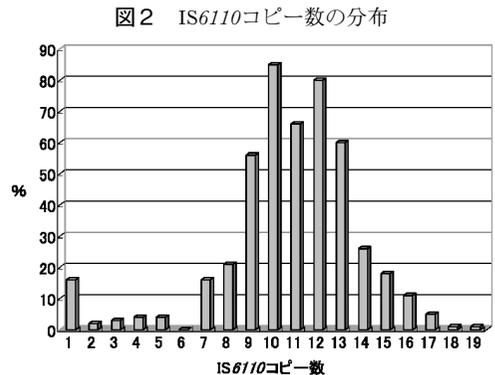
IS6110コピー数は10~12でピークを形成し、大阪市等他地域の結果^{13,14)}と同様であった(図2)。一般に、ピークの形成はその地域が高蔓延状況にある事を示すが⁹⁾、調査期間の岡山県の結核罹患率は人口10万対22.6~27.9^{4~7)}で、全国のそれ(25.8~31.0^{4~7)})と同様に、世界的に見て中蔓延状態であった。したがって、岡山県でのピーク形成は高齢者の再燃による過去の高蔓延時代の影響と推測された。

2) 調査対象結核菌 DNA の RFLP パターン

474株のRFLP解析の結果、401パターンがみられた。

パターンが100%一致したクラスターは37組あり、それぞれに2~11株の計110株が含まれた。37組中、患者間に接点が認められたのは10組22株(表1 事例2, 4, 9~14, 16)で、一致クラスターの20%であり、事例13以外は全て59歳以下の患者が関連していた。患者間に接点がみられなかった27組88株では、5組10株は58歳以下の患者分離株であったが、22組78株は60歳以上の患者分離株のみまたは大半が60歳以上の患者分離株で構成されていた。

401種類のRFLPパターンを国内外の分類^{15,16)}を参考に65%以上の類似性で分類すると、全体の41.9%を占めるI~IIIのグループがみられ(図3)、これらの中に一致クラスター37組中22組(69株)が含まれた。I~IIIのグループ内の株の

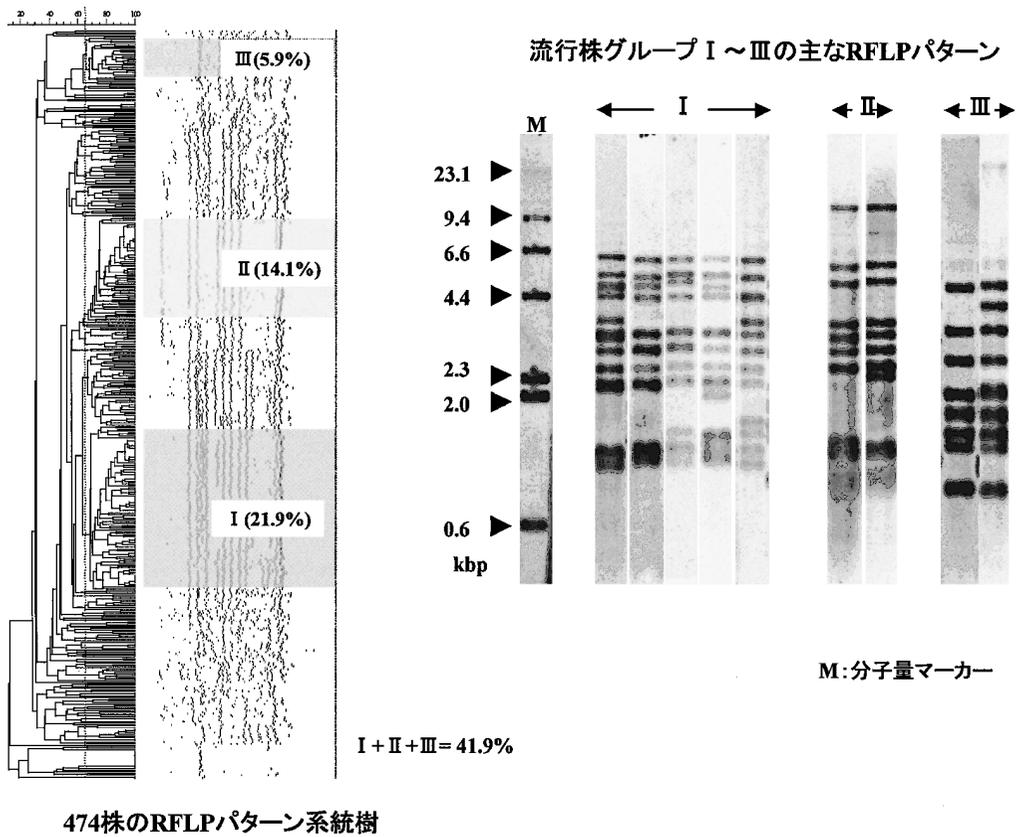


RFLPパターンは、それぞれ共通のバンドを多く持つため、元々は同一の株が変化した流行株のグループと思われた¹⁷⁾。

IS6110コピー数5以下の株は、28株中25株が60~94歳の患者からの分離株で、spoligotypingの結果約50%が共通のパターン¹⁸⁾を示したが、患者間の接点は認められなかった。

3) 年度別・年齢層別・地域別 RFLP パターン
年度毎のRFLPパターン分布は、平成15年度でIIの割合が高い他は、いずれもI~IIIが半数近くを占めて大きな変化はなかった。年齢層別では30歳以下でIIIがみられず、50歳以下でIS6110コピー数1の株がみられなかった以外は、大差はなかった。地域別では、県北東部でIの割合が低く北西部でIIの割合が低かったが、いずれもI~IIIが半数近くを占めていた(表3)。

図3 RFLP 解析結果



3. 事例検討結果

RFLP パターンの一致により、保健所による登録時疫学調査等から同一感染源が疑われたり、検査室内汚染が疑われていた事例1~17のうち、事例1, 2, 4, 9, 10~14, 16, 17でそれらの調査結果が強く支持された。事例1および12~14, 16は、いずれも結核病床を有しない病院での院内感染事例で、患者間あるいは患者から職員への感染が支持された。この結果から、院内感染に対する認識が強化され、保健所や医療機関で原因の究明と対策が検討された。また、事例13は、被感染者の結核既往歴とRFLPパターンの特徴から、偶然の一致ではなく「高齢者の外来性再感染」と考えられた。事例2では、3年時にクラスメートであったが特に親しくはなかった患者A・B間の感染が支持されたため、感染の場がX高校内と推測され、早期から集団感染を想定し、適切な接触者検診が行われた。事例11は、3人の患者の接点がパ

チンコ店のみで、疫学調査だけでは感染の判断が難しかったが、データベース上3人のみに一致するパターンを示したため、同一感染源であることが強く支持され、疫学調査対象範囲が適切に設定された。

事例3, 5~8, 15および14の一部は、RFLPパターンが異なったため、同一菌株による感染が否定され、接触者検診の対象範囲の変更等がなされた(表1)。

検査室内汚染の事例17はデータベース上他の株にはみられない特徴的なRFLPパターンで一致したため、汚染源究明が可能となった。

事例18はBCG株との鑑別で、肺結核で登録された患者分離菌がRFLP解析をきっかけにBCG株と判明し、以後の接触者検診が中止された¹⁹⁾。

表3 年度別・年齢層別・地域別の結核菌分離株のRFLPパターン

年度別					
	H12年度 (%)	H13年度 (%)	H14年度 (%)	H15年度 (%)	H12-H15年度 (%)
I	39(26)	21(18)	26(23)	18(49)	104(22)
II	15(11)	15(13)	16(14)	21(22)	67(14)
III	7(5)	8(7)	5(4)	8(9)	28(6)
その他	88(59)	73(62)	67(59)	47(50)	275(58)
計	149(100)	117(100)	114(100)	94(100)	474(100)

年齢層別						
	≤29歳 (%)	30-49歳 (%)	50-69歳 (%)	70-79歳 (%)	≥80歳 (%)	全年齢 (%)
I	11(31)	12(24)	24(21)	26(19)	31(23)	104(22)
II	3(8)	4(8)	14(12)	27(20)	19(14)	67(14)
III	1(3)	4(8)	7(6)	8(6)	8(6)	28(6)
その他	21(58)	29(59)	71(61)	76(55)	78(57)	275(58)
計	36(100)	49(100)	116(100)	137(100)	136(100)	474(100)

地域別					
	北東部 (%)	北西部 (%)	南東部 (%)	南西部 (%)	全県 (%)
I	2(14)	10(24)	51(22)	41(23)	104(22)
II	2(14)	3(7)	34(14)	28(15)	67(14)
III	1(7)	1(2)	10(4)	16(9)	28(6)
その他	9(64)	28(67)	141(60)	97(53)	275(58)
計	14(100)	42(100)	236(100)	182(100)	474(100)

IV 考 察

1. 結核蔓延状況と流行株の把握

高齢者と若い世代でRFLPパターンの分布に大差が無かったため、過去の高蔓延時代の株が、高齢者の再燃等で広い年齢層に感染して受け継がれていることが推測された。岡山県では、とくに80歳以上の患者が多いので、その発病予防が結核対策上非常に重要と思われた。

RFLP解析の結果、約40%が流行株グループに属したが、これらのパターンを示す株は全国的にもみられるため^{9,17)}、全国規模の流行株と思われた。また、I・IIを含む約70%は、アジアを中心にアメリカやヨーロッパ等に分布が拡大している遺伝子型の北京株と推測された^{18,20)}。

一致クラスターのうち、患者間に接点が認められたのは20%のみであり、RFLPパターンの一致

は必ずしも直接の感染を反映しないことが判った。同様の結果は、沖縄県の調査でも示されていた²¹⁾。この理由として、高齢者の再燃で過去の患者間の接点が判らない場合や、広く分布する流行株による感染で患者間に接点が無い場合が考えられた。一方で、感染があっても疫学調査上接点が発見できない場合も考えられた。それは、登録時疫学調査における社会への参加状況等に関する情報不足や、発病からの長期間の経過とプライバシー保護の問題により、患者への再調査が難しいことに起因すると推測された。

結核の蔓延状況は、罹患率が全国値(人口10万対24.8, 2003年)より低い岡山県(同19.1)のような「地方」と、大きく上回る大阪市(同68.1)等の「都市」ではかなり異なり、特に「都市」では、高齢者の再燃に加えて、若い世代の結核の増加、多剤耐性結核、外国人の結核やHIV等によ

り、複雑な状況にあると予想される。海外においても、ニューヨークやサンフランシスコ等の大都市で、従来の疫学調査にRFLP解析を加えた調査が行われ、結核患者の40%前後が最近の感染と判明し、薬剤耐性結核、HIV、貧困等の危険因子の関与が報告されている^{22,23)}。RFLP解析を用いた地域の結核蔓延状況の解明には、結核新登録患者分離株の全株を対象とすることが理想であるが、予算措置等の問題もあり、地域の実情に合わせて対象範囲を検討する必要がある。高齢者の再燃ではなく最近の感染と思われる患者分離株を選択することで、現在の蔓延状況が判り患者間の接点が発見される等、結核対策に役立つ知見が得られると予想される。

平成15年度で岡山県の「結核対策特別促進事業」は終了したが、この間に蓄積された我々のデータは、過去の結核高蔓延時代の影響が強い岡山県の現状を知る基礎になった。事業終了に伴う予算縮小のため、今後の調査方針について関係機関で検討した結果、調査対象を最近の感染で、社会活動への参加機会が多く感染源にもなる60歳以下の塗抹陽性患者および保健所が必要と判断した事例の患者の分離株に絞ることになった。そのため、保健所の役割はより重要となり、登録時疫学調査では、チェックリスト等により調査漏れを防ぎ、一事例で複数の患者がいる場合や、患者が1人でも学校や老人施設等に所属し集団感染に発展する可能性がある場合等、特殊な事例かどうかを十分に検討する必要がある²⁴⁾。

2. 事例検討におけるデータベースの活用

検討した事例中には院内感染が多く含まれ、予防対策強化の必要性が示唆された。RFLP解析結果により院内感染が強く支持された事例では、医療機関と保健所の間で原因の究明と今後の対策について検討されたケースもあり、今後、RFLP解析を院内感染有無の指標の一つとして、県内の保健所の医療監視体制強化に役立てることが課題と思われた。

また、事例1, 4, 12は、結核既往歴は無いが過去に感染を受けた可能性が高い高齢者が被感染者となっており、既往歴のあった事例13と併せて、通常起こりにくいとされている「高齢者の外来性再感染」が²⁵⁾、予想以上に生じていることが示唆された。

調査当初、データベースのモニタリングにより、集団感染や散発事例の潜在的なリンクを発見することが期待されたが、残念ながら今回は発見できなかった。この理由の一つに、菌株搬入と菌株情報の入手までのタイムラグが挙げられる。タイムラグは医療機関から保健所への菌株送付連絡の遅れ等により、数か月以上に及ぶ場合もあった。各機関への事業の周知徹底によりこれが解消されれば、最短で菌株搬入後一週間での結果還元が可能となる。一方で、結核疫学調査におけるRFLP解析の意義が保健所や他の機関の担当者十分に浸透しなかったことも理由の一つと思われた。このため、疫学調査内容の検討にRFLP解析を用いた保健所が一部に限られ、保健所間での差が生じた。調査期間中、保健所や関連機関の担当者を対象に、RFLP解析の原理と結果の解釈についての研修会が実施された。しかしながら、普段の業務では耳慣れない専門用語も多く、理解度に関するアンケートの結果、十分な理解が得られていないことが判り、担当者への基礎知識の普及も大きな課題と考えられた。今後、登録時疫学調査の強化、結果還元の迅速化およびRFLP解析に関する知識の普及に努めることで、集団感染や散発事例の潜在的なリンクの発見が可能になると思われる。

V 結 語

県内の結核新登録患者から分離された結核菌全株を対象としたRFLP解析によって、①県内の結核状況は過去の結核高蔓延時代を強く反映していること、②優勢に分布する流行株が存在すること、③RFLPパターン的一致により感染が支持された患者はおもに60歳以下であったこと、④接点が不明な患者分離株間でのRFLPパターン的一致があり、それは流行株や高齢者の再燃等に起因すると考えられたが、登録時疫学調査での情報不足も考えられること、等の結核対策に有用な基礎データが得られた。感染源・感染経路の究明においては、RFLP解析は、保健所が日常業務で実施している登録結核患者の疫学調査内容を検討するための科学的根拠となり、患者間の感染の有無の判断がより正確になり、適切な検診対象者の範囲設定が行われる等、結核対策に有用であった。

本稿をまとめるにあたり、事業主体である岡山県保健福祉部健康対策課ならびに疫学調査主体である岡山県、岡山市および倉敷市保健所の関係職員の皆様に感謝いたします。また、菌株収集にご協力いただきました県内医療機関ならびに検査機関の皆様に感謝いたします。そして、本稿執筆にご助言いただきました当所の小倉肇所長に厚く御礼申し上げます。

(受付 2004. 8. 7)
(採用 2005. 6. 28)

文 献

- 1) 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* 1990; 28: 2051-2058.
- 2) van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendation for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409.
- 3) van Soolingen D, de Haas PEW, Hermans PWM, et al. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1987-1995.
- 4) 厚生省保健医療局結核感染症課監修. 結核の統計 2002. 東京: 結核予防会, 2002.
- 5) 厚生省保健医療局結核感染症課監修. 結核の統計 2003. 東京: 結核予防会, 2003.
- 6) 厚生省保健医療局結核感染症課監修. 結核の統計 2004. 東京: 結核予防会, 2004.
- 7) 岡山県保健福祉部健康対策課. 岡山県における結核の現状 平成13年版. 岡山県, 2001; 6.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Burman WJ, Reeves RR, Hawkes AP, et al. DNA fingerprinting with two probes decreases clustering of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1140-1146.
- 11) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 907-914.
- 12) Yang ZH, Ijaz K, Bates JH, et al. Spoligotyping and polymorphic GC-rich repetitive sequence fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains having few copies of IS6110. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3572-3576.
- 13) Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 289-294.
- 14) 長谷 篤, 中村寛海, 春木孝祐. 大阪市内における結核の分子疫学. 財大同生命厚生事業団第5回「地域保健福祉研究助成」報告集. 平成10年度. 155-159.
- 15) Hermans PWM, 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
- 16) 高橋光良, 鹿住祐子, 平野和重, 他. 低蔓延時代の若年結核の対策—RFLP 分析による結核感染の疫学. *結核* 1995; 70: 553-559.
- 17) 大畠律子, 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* 2002; 77: 629-637.
- 18) 大畠律子, 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: 629-637.
- 19) 大畠律子, 中嶋 洋, 岩本真弓, 他. 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. *日本公衆衛生雑誌* 2002; 49: 790-794.
- 20) van Soolingen D, Qian L, de Haas PEW, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3234-3238.
- 21) 沖縄県結核サーベイランス検討委員会. 沖縄県の結核患者管理における結核菌遺伝子型同定の有用性. *日本公衆衛生雑誌* 2003; 50: 339-348.
- 22) Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 1994; 330: 1710-1716.
- 23) Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330: 1703-1709.
- 24) 小倉 肇, 大畠律子, 徳山雅之, 他. 結核をモデルとした地域における健康危機管理システムを構築する研究. 平成15年度厚生科学研究 地研の危機管理における地域連携体制の構築に関する研究報告書. 2004; 97-110.
- 25) 佐藤敦夫. 高齢者結核. 泉 孝英, 網谷良一 編. 結核 第3版. 東京: 医学書院, 1999; 263-269.

SIGNIFICANCE OF RFLP ANALYSIS FOR COMMUNITY-BASED CONTROL AGAINST TUBERCULOSIS

Ritsuko OHATA* and Hiroshi NAKAJIMA*

Key words : tuberculosis, RFLP analysis, Okayama prefecture, prevalent situation of tuberculosis, prevalent strains, database

Purpose The purpose of this study is to obtain an index for measures against tuberculosis by elucidation of the source/route of infections and prevention of secondary infection by RFLP analysis in Okayama.

Methods A total of 474 strains isolated in Okayama prefecture from April 2000 to March 2004 were subjected to RFLP analysis. Analysis was only performed for mycobacterial strains from patients whose ages and places of residence were known. The prevalent situation of tuberculosis was analyzed by the distribution of IS6110 copy numbers, and the prevalent strains were examined by cluster analysis of RFLP patterns. To speculate regarding the mode of infections, annual change of RFLP patterns and differences in RFLP patterns with the age group and area were examined. A database was made with the results of RFLP analysis and information about bacterial strains from a public health center and monitored in order to discover latent links to outbreak or sporadic cases.

Results The RFLP patterns for the 474 strains reflected past tuberculosis in highly prevalent times. Among 37 sets of clusters which showed the same pattern (110 strains), relationships were recognized between the patients in 20%. Most of the patients were younger than 60 years of age. By classification according to the similarity of RFLP patterns, three prevalent strain groups were recognized, to which about 40% of all strains belonged. Judging from the RFLP pattern distribution, there was no obvious annual change. The age groups of the patients and the areas where they lived did not influence the RFLP patterns of mycobacteria. Therefore, it was concluded that infection of the various age groups occurred with mycobacteria from reactivated older generation. Accordingly, prevention of tuberculosis reactivation in the aged can be considered the most important measure against tuberculosis.

Conclusions We obtained basic data on the prevalence for tuberculosis and the prevalent strains in Okayama by RFLP analysis. Together with conventional epidemiological investigation the resulting database allows scientific analysis of cases, although latent links to outbreak or sporadic cases were not revealed in this study. Further analyses with the database should contribute to measures against tuberculosis.

* Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health