

結核菌RFLP分析による千葉県内で発生した結核感染事例の検討

岸田 一則, 小岩井健司

Molecular Epidemiological Study of Tuberculous Infections in Chiba Prefecture

Kazunori KISHIDA and Kenji KOIWAI

I. はじめに

結核の統計2001(財団法人結核予防会発行)によると国内の結核罹患率は過去の流行期に比べ激減しその後も順調に減少していたが、1997年には前年より微増(10万対33.9)に転じ、厚生労働省が結核緊急宣言を発表する事態となった。その後2年上昇(33.7, 38.2)し2000年から再び減少傾向(35.0)となっているが、1998年と同レベルである。また集団発生の増加、薬剤耐性菌の出現等社会的状況の変化により新たな問題も発生している。今後公衆衛生上深刻な問題となる可能性もあり、その対策は、急務である。感染源の追求や対策の評価は結核対策上不可欠であるが、従来は結核菌の有効な型別法が無く、患者接触状況等の調査にたよっていた。近年、細菌感染症においてその感染源、感染経路追及に原因菌のDNAをパルスフィールドゲル電気泳動法等で分析する分子疫学的手法が利用されるようになった。結核においても結核菌特有の挿入配列IS6110を指標とした Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析法が開発され標準法として利用されるようになった¹⁾。IS6110は菌株ごとにその数、位置が異なっている。この性状は比較的安定に遺伝するので、RFLP分析により患者と別の患者から分離された菌株の相同性を検討することが可能である。われわれは千葉県内で発生した結核のうち、疫学的に密接な関連を有する複数の患者が認められた事例についてRFLP分析を実施し、興味ある知見を得たので報告する。

II. 方法

菌株：1997年から2002年にかけて千葉県内の結核患者から分離された結核菌について検査した。

DNAの抽出と精製：工藤PD培地に増殖した結核菌をベンジルクロライド法とフェノール/クロロホルム法を併用して抽出、精製した。

ISプローブ：IS6110由来の245bpのPCR産物をオリゴラベリング法によりジゴキシゲニン標識したものをプローブとした。

RFLPパターンの検出：結核菌DNA 1 µgを制限酵素Pvu IIで消化後に0.8%アガロースで150V、4時間電気泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーした。UVクロスリンクングによりDNAをメンブレンに固定後ISプローブで65°C一晩ハイブリダイゼーションした。フィルターは洗浄後、アルカリフォスファター

ゼ標識抗ジゴキシゲニンFabフラグメントと10分間反応後に化学発光基質を加えた。RFLPパターンは、デジタルカメラ(Fuji: LAS1000)を使用して撮影した。

III. 成績と考察

事例1：F保健所管内のサウナ施設において数ヶ月のうちに複数の患者発生が認められた。F保健所の調査では、この施設は宿泊可能であり、一般客の利用のほか、簡易宿泊所のように長期利用する者や住所不定者の利用も認められた。図1に利用者や従業員から分離された結核菌8株のRFLPパターンを示す。当初集団発生を疑ったが、すべての菌株のRFLPパターンが異なるため、患者間の関連性は低く、サウナ施設内での感染は認められなかった。すでに感染している者の発見がこの時期に集中したことも考えられる。都内でも結核患者の多発したサウナ施設が複数報告されており²⁾、宿泊可能なサウナ施設において、住所不定者等の経済的弱者における結核の蔓延が問題となっている。そのなかにはRFLP分析により施設内での感染が疑われた事例も報告されている³⁾。本施設は所管の保健所が調査、対策を行っているが、児童、高齢者等幅広く利用する施設であるので、今後とも関係機関の連携した対策が必要であろう。(本事例の一部は病原微生物検出情報Vol.20 No.10に掲載した。)

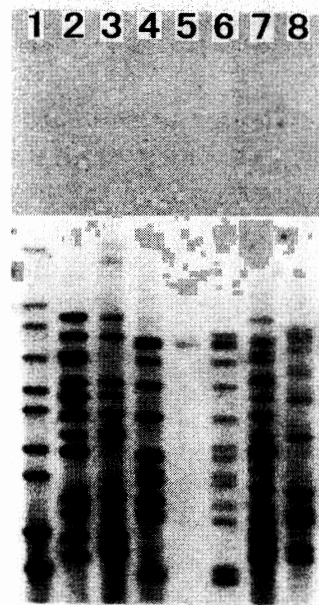


図1. 事例1由来結核菌RFLPパターン—サウナ利用者、従業員間に発生した事例—

千葉県衛生研究所

(2002年1月18日受理)

事例2：S保健所管内の建築現場作業員寮に居住する者の中から1ヶ月間で5人の排菌患者が発見された。RFLP分析を実施したところ、すべて異なるパターン（図2）を示し、患者間の感染は認められなかった。建築現場作業員は、日雇い労働形態の者も多く、地域を越えた移動が頻繁である。そのためそれぞれ異なる場所で感染し、今回5人同時に発見されたと考えられた。雇用情勢の悪化で飯場に寝泊りする住所不定者や日雇い労働者が増加している。労働者は狭い居住空間で長期にわたる集団生活、検診の不実施等により集団結核発症のハイリスクグループである。また収入減につながることから症状があっても申告しない患者もあり、検診すると患者がまとまって発見されることもある。現場の寮に寝泊りするような作業員の結核罹患率は、同年齢層の一般男性の罹患率の約30倍⁹⁾と高く事業主に対して定期健康診断の実施など監督、指導が必要である。

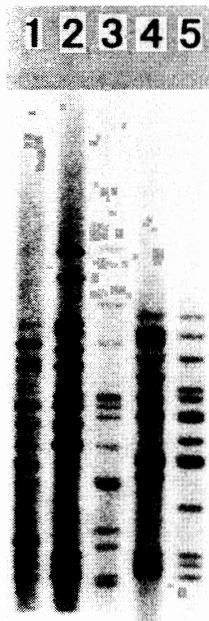


図2. 事例2 由来結核菌RFLPパターン
- 建築現場作業員寮に発生した事例 -

事例3：老人医療福祉施設で入所中の83才女性患者が結核を発症した。最初の患者から3ヶ月後に82才女性患者が発見された。結核菌は、潜伏期が10年以上の長期に渡る場合があるので、高齢者の場合、入所前の感染によるのか、入所後に感染したのか判定することは対策上重要である。この2名の患者は排出菌量が多くそれぞれが感染源になりうること、発見時期が近いことなど両者の感染関係を検討する必要があったためRFLP分析を実施した。その結果2株のRFLPパターン（図3）は異なり、それぞれ異なる感染経路を有することが示唆された。従来高齢者は過去の流行期の感染により免疫を獲得した者が多く、集団発生が起りにくい傾向にあった⁹⁾。しかし、高齢化社会を迎えて老人福祉施設等に人が集まる機会が増加すること、高齢者であっても感染経験が無く免疫をもたない者の割合が増加することなど、集団発生のリスクが高くなることが予想される。施設では入所前の検診やその後の定期的健康診断など日常の健康管理が重要と考えられた。



図3. 事例3 由来結核菌RFLPパターン
- 老人医療施設入院患者に発生した事例 -

事例4：腎臓病で入院中の患者（女性73才）が結核を発症した。同室者や医療関係者に対し検診等対策を実施したが、その半年後に看護師（女性23才）が結核を発症した。看護師は前記患者の担当経験があった。そのため、分離された菌株のRFLP分析を実施したところ、両者は同じパターン（図4）を示し、看護師は患者介護中に感染した可能性が示唆された。看護師の結核罹患率は一般女性の2倍以上⁹⁾である。高齢者の結核罹患率は若年層より高いこと、不規則な服薬による耐性菌の出現など、介護にあたる医療従事者は感染対策の必要性が高い。医療施設では患者早期発見、確実な治療、職員の健康管理が必要と考えられた。



図4. 事例4 由来結核菌RFLPパターン
- 患者と医療従事者が発生した事例 -

IV. まとめ

RFLP分析による分子疫学的検討は、患者間の感染関係を明らかにし予防対策上有意義であった。しかしRFLP分析法は技術的に繁雑であり、迅速性にかける欠点を有する⁸⁾。今日の、雇用不安等社会情勢の変化により増加している住所不定者の結核では、患者の移動が頻繁で、分析に長時間を要する本法では対応が困難である。今後は迅速、簡便な結核菌型別法の開発が望まれる。

参考文献

1) JAN D.A van EMBDEN, M.DONALD CAVE, JACK T. CRAWFORD JEREMY W. DALE, KATHLEEN D. EISENACH, BRIGITTE GICQUEL, PETER HERMANS, CARLOS MARTIN, RUTH McADAM, THOMAS M.

SHINNICK, and PETER M.SMALL : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by fingerprinting (1991), J. Clin. Microbiol.31, 406~409

- 2) 中西好子, 大山泰雄, 高橋光良, 森亨 (1997): サウナでの結核多発の分子疫学的解明, 日本公衛誌, 44, 769~777
- 3) 木村友子, 鈴木公展, 矢部勤, 角南佑子, 志村昭光, 猪狩英俊, 池上宏, 小倉敬一, 佐々木結花, 山岸文雄 (2002): 飯場における結核検診の検討, 結核, 77, 597~603
- 4) 阿彦忠之 (2000): 施設における結核の集団感染事例から, 第5回国際結核セミナー, 33~34
- 5) 遠藤和郎 (2000): 病院における結核院内感染対策の実際, 第5回国際結核セミナー, 37~38
- 6) 高橋光良, 伊藤佐生智 訳 (2002): 結核と他の抗酸菌感染症の分子疫学, 資料と展望, 41, 5~31