

図1 菌株のバンド数の分布

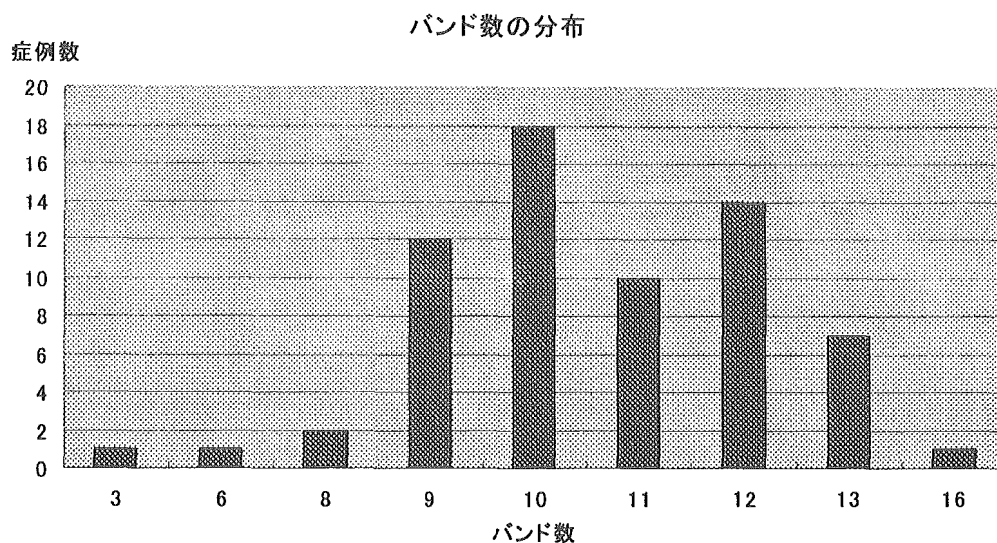


表3 クラスタ形成率 100%一致

Cluster size	No. of cluster	No. of patients with clustered cases	*1	*2
4	1	4	3	0
2	8	16	10	3
合計	9	20	13	3

表4 クラスタ形成率 90%以上一致

Cluster size	No. of cluster	No. of patients with clustered cases	*1	*2
7	1	7	6	0
5	1	5	0	4
4	1	4	-	-
3	4	12	9	3
2	7	14	6	5
合計	14	42	21	12

表5 クラスター形成率（サウナ、パチンコ等施設利用者、ホームレス）

	100%一致	90%以上一致
サウナ、パチンコ等施設利用者のクラスター形成率	46.4%	75.0%
ホームレスのクラスター形成率	11.5%	46.2%

#### 4. まとめ

平成13年度以降、名古屋市衛生研究所にて行われた66例のRFLP分析結果を検討した。全体のクラスター形成率は30.3%、特にサウナ、パチンコ店等を介して感染したと思われる症例では46.4%の高いクラスター形成が見られた。

また、ホームレスの症例では各々居住地も違い、疫学的調査においては接点が見出せなかったにもかかわらず、RFLPパターンが90%以上の類似を示した症例が46.2%であった。

今後、名古屋市衛生研究所疫学情報部において、事例の積極的疫学調査結果とPFLP分析結果を経年的に蓄積し、名古屋市の結核対策に活用してゆくつもりである。

### XⅢ. 名古屋市における不特定多数者が利用する施設を介しての結核感染 (続報)

名古屋市健康福祉局 明石 都美

#### 1. はじめに

平成12年度研究報告書において、サウナ等不特定多数者が利用する施設において発生したと思われる、RFLP同一パターンを示した感染事例を報告した。その後のRFLP分析の結果について報告したい。尚、名古屋市全体のRFLP分析の結果については、「名古屋市における結核菌のRFLP分析の現状と結核対策」を参考とされたい。

#### 2. 事例の概要・経過

平成12年度の報告と重複するが、概要については以下のようなものである。

平成11年、2月と3月にa地区のサウナの利用客から結核による死亡が相次いで確認された。この事例は、たまたま同じ医療機関への入院となったため、主治医からの報告により同一感染が疑われたものである(表パターンI-1・2)。

同じく3月末にa地区サウナ内で利用客が他疾患で倒れ救急車で搬送されたところ肺結核であった事例が続いた(表パターンI-3)。

a地区管内保健所で関連する施設での定期外検診を準備している中、a地区サウナ、パチンコ店従業員から有症状受診による結核患者も相次ぎ報告された(表パターンI-4・5パターンII-1)。

平成11年6月から7月にかけて3回、関連施設の駐車場、保健所において定期外検診を実施した。対象者は、アルバイトを含む職員を始め、長期利用者へもポスター掲示により検診を呼びかけた。A、C施設においては90%を越える受診であったが、B施設においては、1割程度の受診であり、結核に対する理解、危機感に差があった。また、長期利用者については受診者はなかった。検診の結果A施設から2名の結核患者が発見され、1名は菌陽性でRFLPパターンIであった(表パターンI-6)。

尚、検診については、受診場所や時間等配慮しての複数回の実施により、高い受診率が確保されたものである。また、健康状態のよくないと思われる者ほど遅い時期の受診となる傾向がみられ、発見された結核患者も4、5回目に設定された検診受診者であった。

定期外検診以外の対策として、市内の同様の施設利用者への広がりを見るため、サウナ、パチンコ等頻回利用者で菌陽性である者に対しRFLP検査を実施するよう、保健所に依頼すると共に、結核研究所での検査依頼の協力をお願いした。また、問診において同施設の利用が判るよう、問診項目の追加を保健所、一部の医療機関に依頼した。

また、感染に大きく影響すると思われる換気能力等環境面での調査も実施した。平成12年度研究報告書で前田が報告したが、感染の機会、サウナを有する施設内の仮眠室が疑われた。

その後、RFLP分析結果が出るまでの間のタイムラグもあり状況が落ちついたかに思えたが、表パターンⅠ-7から19、表パターンⅡ-2から4、表パターンⅢ-1と2が平成12年中に報告されている。従業員からの結核患者の報告は、表パターンⅡ-9は有症状受診により、時期は平成14年であるが、表パターンⅡ-5は職場の定期検診で要精検になったにも係わらず、放置により有症状受診となったものである。

その後、名古屋市においても平成13年から、名古屋市衛生研究所においてRFLP検査が実施されるようになり、平成12年度までのRFLP検査実施件数は31件、平成13年以降の検査件数は66件となっている。平成13年度からは、「名古屋市における結核菌のRFLP分析の現状と結核対策」の報告にあるように、対象者をサウナ等利用者から住所不定者等に広げ実施しているが、そのような中で報告されてきた5例以上同一パターンを示した事例が表のとおりである。

### 3. 考察

サウナで発生した結核感染の事例については、中西等<sup>①</sup>の報告によるものが詳しいが、今回の事例は、一施設等での集団感染という捉え方では説明しきれず、大都市における感染経路の一つとしての捉え方が的をえていると考える。すなわち、サウナ等不特定多数の人が集まる場所、また、閉鎖的な空間で一定時間以上人と人とが接する場所は、特に人の出入りの激しい大都市においては、感染症である結核感染がお

こりうるハイリスクな場所であるという実感である。

ただ、今回の事例中、一施設においては従業員から有症状による患者が同じ時期に複数報告されており、定義どおり職場内の集団感染事例である。従業員の実際の感染の時期は不明であるが、感染源になりうることは明らかであり、職場検診の徹底、要精検者の受診の徹底が基本であることは無論である。

発端者は特定できないが、今回報告の事例も例えば表パターンⅠ－１０については、定期外検診により、同僚（表パターンⅠ－１３）家族、生徒を含めた要治療者４名、予防内服７８名の集団感染となった（安藤等<sup>(2)</sup>により報告されている）。また、表パターンⅡ－２は友人がサウナ利用者であり、結核性胸膜炎であったが菌検査ができていないため、友人からの感染かどうかは不明である。当然のことながら、ここに掲げた事例個々に、次ぎへの感染の輪がおきている。

このような事例への対策はなかなか困難であるが、これまでの名古屋市における対策については「名古屋市における結核菌のRFLP分析の現状と結核対策」に述べた。

#### 4. まとめ

今回、個々の事例について、聞き取り調査等十分な疫学調査がなされていないため、接点等の解明が不十分であり、結果的にサウナやパチンコをよく利用している人で菌検査が可能であった事例の中で、RFLPが同一であったケースの集積の結果としての報告となった。しかしながら、一定期間同じ空間で過ごす不特定多数の者が集まる場が、結核感染のおこるハイリスクの場であることは確認され、大都市における結核対策上重要なことであると考え、不十分なままではあるが経過として報告することとした。

今後は、個々の事例の追跡、定期検診の徹底等図る中で、RFLP検査を継続実施し、どのように収束してゆくのか経過報告をしたい。

#### <参考文献>

(1) 中西好子、大山泰雄、高橋光良、他；サウナでの結核多発の分子疫学的解明－大都市のホームレスの結核問題に関連して、日本公衆衛生誌、1997;44;769-777

(2) 安藤勝也、山中克己、明石都美；一集団結核発生事例におけるツ反検査の意義。結核。2002;77:589-595

表1 RFLP 分析結果同一パターン一覧

RF LP	No	患者	性	年齢	診断月日	排菌	職業	地区及び利用施設	その他
パターン I	1	利用客	男	45	H11. 3.	G9	住所不定	a(S)	H11.2.4.入院 H11.1.3.死亡
	2	利用客	男	54	H11. 3.	G3	運転手	aA(S)B(S)	H11.3.3.入院 H11.3.4 死亡
	3	利用客	男	65	H11. 3.	G3	住所不定	aB(S)	B サウナで脳梗塞で倒れる
	4	従業員	男	36	H11. 7.	—	サービス業	aC(P)(S)	(P)従業員(S)利用客有症状受診
	5	従業員	男	30	H11. 6.	—	サービス業	aA(S)	有症状受診
	6	従業員	男	46	H11. 7.	—	サービス業	aA(S)	定期外検診で受診
	7	利用客	男	58	H12. 6.	G5	運転手	aF(P)	タクシー運転手
	8	利用客	男	20	H12. 3.	G8	住所不定	aAC(S)	フリーター女友達の家で
	9	従業員	男	23	H12. 2.	G2	サービス業	aC(P)	有症状受診
	10	利用客	男	27	H12. 1.	G8	教師	a(P)	H11.秋頃から症状あり
	11	利用客	男	40	H12. 1.	G4	サービス業	a(S)(P)	住所不定?
	12	利用客	男	49	H12. 1.	—	住所不定	c(S)	D カプセルホテルを利用
	13		男	36	H12. 4.	—	教師		No10 の同僚
	14	利用客	女	58	H12. 5.	G2	店員	aC(P)	e 地区で弁当販売
	15	利用客	男	49	H12. 6.	G9	住所不定	a(P)c(S)	
	16	利用客	男	42	H12. 6.	G3	自営業	a(P)	
	17	利用客	男	52	H12. 8.	G2	公務員	abf(S)	
	18	利用客	男	58	H12. 8.	G2	自営業	aB(S)	
	19	利用客	男	38	H12.10.	G1	会社員		
	20	利用客	男	36	H13. 4.	G6	自営業		
	21	利用客	男	63	H13. 5.	G7	無職		宿泊状態
	22	利用客	男	59	H13. 7.	G2	サービス業	aC(S)(P)	
	23	利用客	男	59	H13. 9.	G8	無職	aC(P)	H13.8 から無職、毎日パチンコ
	24	利用客	男	33	H14. 3.	G9	会社員	a(S)	週 2 回以上利用
	25	利用客	女	65	H14. 2.	G3	無職	a(P)	週 2 回以上利用
	26	利用客	男	51	H14. 7.	G8	サービス業		
	27	利用客	男	28	H14. 8.	G8	アルバイト	a(S)(P)	週 1~2 回利用。居酒屋でバイト
パターン II	1	従業員	男	55	H11. 6.	G8	サービス業	aA(S)	有症状受診(注)1 参照
	2		男	20	H12. 4.	—	アルバイト	aA(S)	利用客友人(注)2 参照
	3	利用客	男	56	H12. 7.	G8	住所不定	市内複数(S)	
	4	利用客	男	53	H12. 8.	G10	住所不定	e(S)	
	5	従業員	女	27	H14. 3.	G8	サービス業	cA(S)	H13.9 職場検診「要精検」放置
	6		男	69	H14. 6.	G6	無職		65 歳までサウナ食堂勤務
パターン III	1	利用客	男	56	H12.10.	G5	警備会社	c(S)	
	2	利用客	男	51	H12.11.	G8	道路工事	(S)	
	3	利用客	男	52	H14. 7.	G9	溶接工	dD(S)	
	4	利用客	男	59	H14. 6.	G2	運転手	dE(S)	宿泊状態 7 年間 トラック運転
	5	利用客	男	50	H14. 6.	G9	会社員	aF(P)	週 2~3 回利用

注：1 A、B、C、D、E、Fは施設名を、a、c、d、eは地区名を、(S)はサウナを(P)はパチンコ店を示す。  
 なお施設名、地区名については特定できたものについて記載した。  
 2 (注1) 現 A サウナ c 地区店勤務、食事係を担当、治療を放置したため H12.9.再燃した。  
 3 (注2) No 2 の友人は、28 歳男、a 地区 A サウナ利用客であり H12.6.結核性胸膜炎と診断された。

## XIV. 大阪市で分離された結核菌のRFLP解析

大阪市立環境科学研究所 長谷 篤

### 1. はじめに

大阪市は国内の大都市の中で目立って結核の患者数が多く、様々な結核対策が行われてきているにもかかわらず、ここ数年患者数に大きな減少は見られていない。2001年度統計では、人口10万人に対する罹患(りかん)率は大阪市全体で82.6であり、全国平均(27.9)の約3倍となっており、この傾向はここ数年かわっていない。患者は西成区および隣接する浪速区とその周辺地域に集中しているが、大阪湾岸地域にも高い罹患(りかん)率が見られている。市内24区中19区で罹患率が全国平均を2倍近く超え、さらに3区では100を超えており、市全域が高蔓延状態であることは明らかである。

西成区、浪速区周辺に患者が集中している原因としては、行旅患者が多いことがあげられるが、行旅患者を除いた一般住民の患者でも他都市と比べると明らかに多く、罹患率を高くしている原因が行旅患者以外にもあることが考えられている。

本年度は最終年であるので、2000年までに市内で分離された結核菌株について行ったIS6110を用いたRFLP解析データから、市内の高罹患地域における蔓延状況と他地域への感染の広がりについて検討した。

### 2. 材料と方法

#### 1) 使用菌株

1996年から2000年までに市内在住患者より分離された結核菌について調べた。菌株の内訳は、107株は1996年から1997年に、312株は1999年に、293株は2000年にそれぞれ分離された計692菌株について調べた(ただし、IS6110コピーが5以下の20株は解析から除く)。

#### 2 RFLP解析

IS6110を用いたRFLP型別はEmbdenらの方法にしたがって行った。クラスター解析はMolecular Analyst / Fingerprinting Plus and Fingerprinting DST software (Bio Rad)により行い、同一RFLPパターンを持つ2株以上をクラスターとした。

菌株のクラスター形成は由来患者間における最近の感染の可能性を示し、クラスター非形成は再燃性もしくは他集団からの感染を示唆すると言われている。

### 3. 結果と考察

1996年から2000年に市内で分離された712株におけるIS6110コピーは1から17で、10から13コピーの菌株が462株（64.9%）あった（Fig 1）。

Fig. 1 市内分離株（712株、1996-2000）のIS6110コピー数

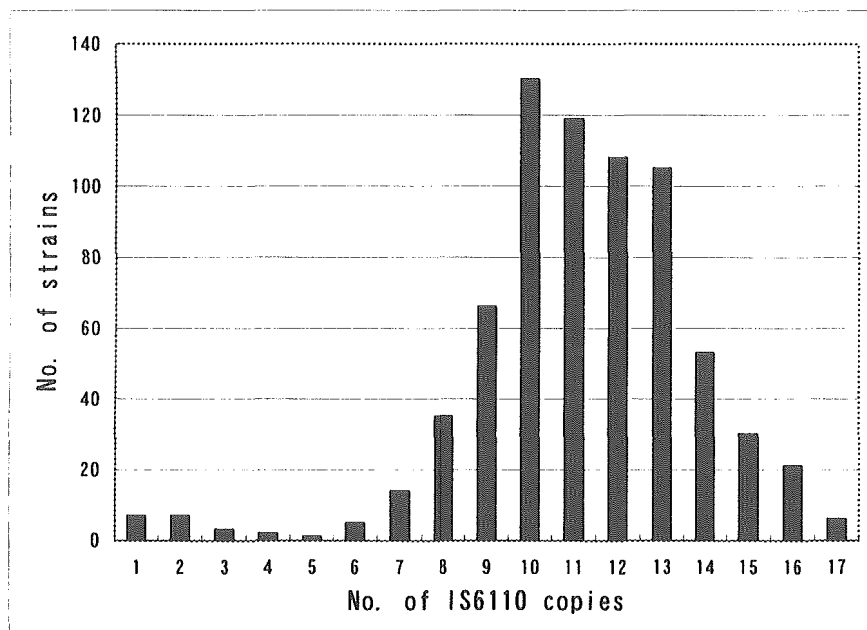
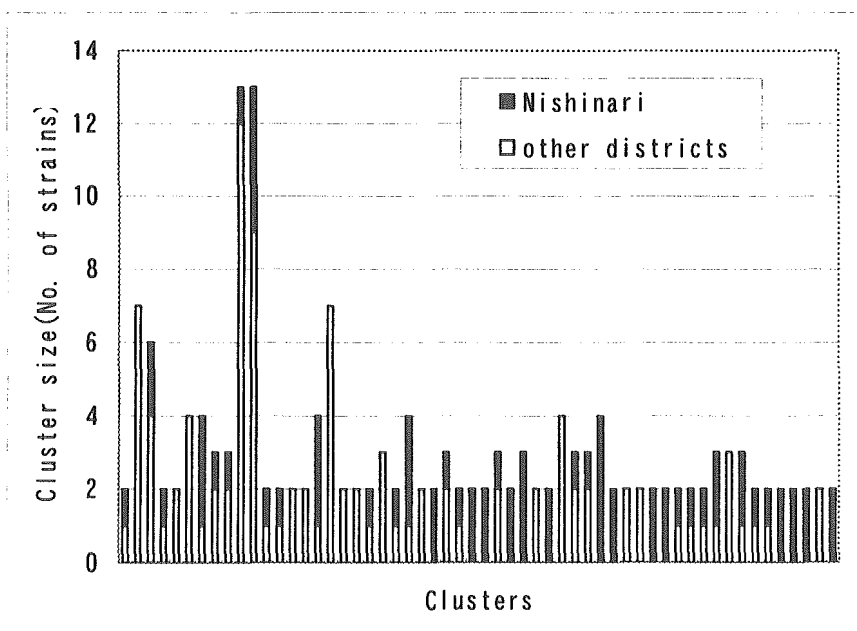


Fig. 2 クラスタと菌株の由来、1996-2000





この傾向は国内の他地域や韓国などの報告とよく似ている。RFLP解析した692株において577のRFLPタイプと56クラスターが見られた。クラスター形成株は171株（クラスター形成率：24.7%）で、クラスターサイズ（菌株数）は2から13であったが、小さいクラスターサイズ（2または3）の菌株が多かった（59.1%）。サイズ4のクラスターは6種類、サイズ6のクラスターは1種類、サイズ7のクラスターは2種類、そしてサイズ13のクラスターが2種類あった（Fig 2）。

患者の性別、年齢、および居住地別のクラスター形成率をTable 1に示した。男性患者におけるクラスター形成率（23.9%）は女性患者（7.4%）にくらべて非常に高かった。年齢では50歳代（18.6%）、50歳未満（13.1%）が70歳以上（9.1%）および60歳代（9.2%）に比べてクラスター形成率が明らかに高いことがわかった。

Table 1. 性別、年齢、居住地におけるクラスター形成率

項目	菌株数	クラスター形成率(%)
性別		
男(罹患率 <sup>a</sup> :167.3)	570	23.9
女(罹患率:50.3)	122	7.4
年齢		
70歳以上(罹患率:254.3)	121	9.1
69-60歳(罹患率:202.2)	141	9.2
59-50歳(罹患率:168.2)	188	18.6
50歳未満(罹患率:54.1)	222	13.1
不明	20	—
居住地		
西成区(罹患率:534.6)	256	18.8
行旅 Yes(罹患率:1306.7 b)	188	21.8
No(罹患率:252.2)	68	5.9
その他区	436	19.5
行旅 不明	—	—
蔓延状況		
低蔓延地域(罹患率:70未満)	142	20.4
中蔓延地域(罹患率:70-200)	286	16.4
低蔓延地域(罹患率:200以上)	264	18.6

a. 人口10万人あたりの新登録患者数

b. 行旅人口を30000人と見積もった推定数

居住地では、最も罹患率の高い西成区では18.8%であり、他地域とほとんど変わらなかった。高蔓延地域（罹患率200以上、西成区および浪速区）では18.6%、中蔓延地域（罹患率70-200、14区）では16.4%、そして低蔓延地域（罹患率70未満、8区）では20.4%であり、高蔓延地域では高くはなく、むしろ低蔓延地域に比べわずかにク

クラスター形成率は低かった。西成区内の行旅患者におけるクラスター形成率は21.8%であり、同区内の一般患者(5.9%)と比べると高いが、西成区以外の23区(19.5%)と比べてもわずかに高いだけであった。

欧米や国内のこれまでの報告では、罹患率の高い集団では菌株のクラスター形成率は高く、集団内での頻繁な感染が示されることが多い。しかしながら、市内での高罹患率地域におけるクラスター形成率は高くなかったことから、罹患率の高さは感染の広がりによるものではなく、患者の再燃による可能性が高いと考えられた。すなわち、あいりん地区などの特に罹患率の高い地域では、新しい感染に加え、すでに感染を受けた患者(50歳代を中心に)が市内在住中に結核を再発している可能性が示唆された。

一方、西成区とそれ以外の地域において、小さいクラスター(サイズ2、3)はそれぞれ19(84%)および18(44.7%)あった。大きいクラスター(サイズ7、9、12)は西成区ではみられず、他地域でみられた(Fig 2)。しかしながら、全クラスター中26クラスター(46.4%)は西成区由来株を含んでいた(Fig 2)。すなわち、集団感染事例は西成区よりも他の地域で起こっており、しかもクラスターの約半数には西成区由来株が含まれていることから、西成区由来株は他地域の集団感染事例を引き起こしている可能性が考えられた。

これまで西成区や浪速区の特に行旅患者での罹患率の高さは、患者間での感染の広がりによるものが主であると推測されていたが、本研究での菌株レベルでの解析では感染の広がりというよりむしろ、すでに感染を受けた患者が市内に集まり、在住中に結核を再発することによる可能性が示唆された。さらに、これらの地域から他の地域へ感染の広がりも推測された。

結核菌株のRFLP解析は集団感染事例の感染源解明だけでなく、従来の患者接触調査ではわからなかった新たな患者接触を発見できる利点がある。さらに、経年的、地理的な感染の流れを把握できることは、結核予防対策上大いに有用である。今後は市内外の医療機関のさらなる協力を仰ぎ、市内で分離される全結核菌株を解析し、市の結核予防対策に寄与していきたい。

## XV. 堺市在住新規登録結核患者由来株のRFLP解析

大阪府立公衆衛生研究所微生物課 田丸亜貴  
 堺市保健所 西牧謙吾、安井良則  
 国立療養所近畿中央病院研究検査科 富田元久

### 1. はじめに

堺市在住新規登録結核患者由来株についてIS6110をプローブとしたRFLP分析を実施し、堺市での結核菌広域疫学調査を実施した。1999年～2000年6月分については前年の報告書にまとめたが、今年度は1999年～2001年6月の2年半の菌株について全体をまとめて解析した結果と、各年ごとにまとめた結果を報告する。

### 2. 材料と方法

堺市在住結核新規登録患者由来株227株について、van Soolingenらの方法をもとにIS 6110をプローブとしたRFLP分析を実施した。得られたRFLPパターンはMolecular Analyst Fingerprinting software (version 1.6; Bio-Rad)によりDice coefficientを用いたUPGMA clustering algorithm (position tolerance:1.2%)で解析した。患者情報は性別・年齢・患者住所が属する地域(保健所の管轄毎に分類)のみを解析に使用した。

### 3. 結果および考察

#### 1) 1999年～2001年6月のRFLP解析結果

##### ①菌株の由来について

表1に被験227株の患者性別、住所地域、年齢ごとの内訳を示した。被験株の男女比は2.7:1で、2000年の結核統計による全国結核患者の男女比2.4:1と大きな違いは見られなかった。

表1. 被験株の患者性別・住所地域別内訳

	合計	男	女	患者住所					
				東	西	南	北	堺	中
全被験株	227	166 (73.1%)	61 (26.9%)	26 (11.5%)	43 (18.9%)	28 (12.3%)	46 (20.3%)	57 (25.1%)	27 (11.9%)

表2. 被験株の患者年齢別内訳

	合計	患者年齢						
		30歳未満	30歳代	40歳代	50歳代	60歳代	70歳代	80歳代
全被験株	227	25 (11.0%)	26 (11.5%)	28 (12.3%)	47 (20.7%)	46 (20.3%)	33 (14.5%)	22 (9.7%)

患者住所地の内訳では、堺地区が最も患者数が多く、次いで北地区、西地区の順であった。患者年齢別では50歳代、60歳代の患者が最も多く、両年代をあわせると全患者の41.0%を占めた。全国の結核統計によると1999～2001年の新規登録結核患者のうち約40%が70歳以上で高齢者の結核が問題になっているが、堺市では70歳以上の患者は24.2%で、高齢者よりも50～69歳の患者の多さが目立っていた。

## ②IS6110コピー数分布 (図1)

被験株227株のIS6110コピー数分布を示した。IS6110コピー数分は1～22本で、1本、14本、16本にピークがみられ、180株(79.3%)がコピー数11～17本であった。14本のピーク内には14株からなる同一RFLPパターンのクラスターが含まれているが、そのクラスターを差し引いても最も高いピークを形成していた。

図1 IS6110コピー数分布

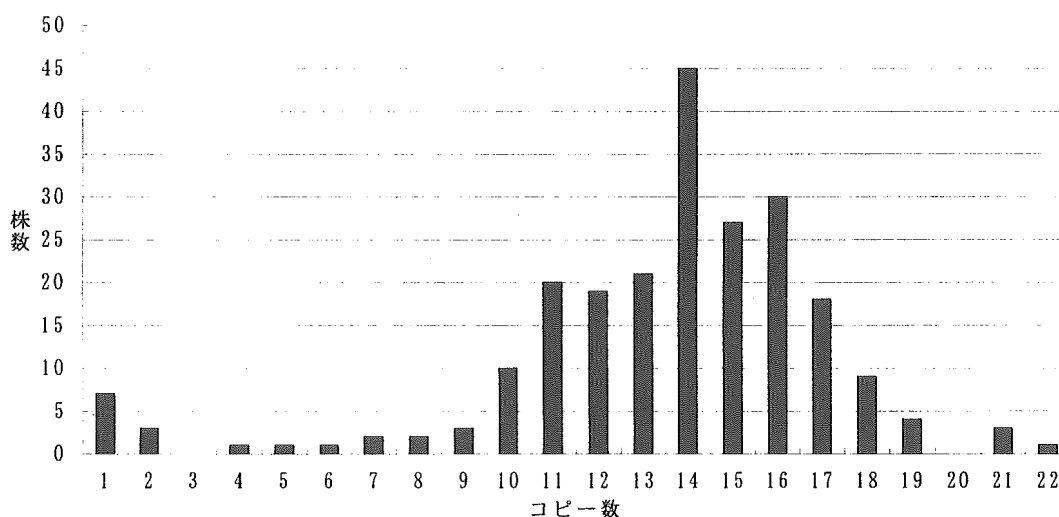


図1. 堺市在住新規登録結核患者由来株のIS6110コピー数分布

堺市でのコピー数の分布と大阪府下で分離された結核菌株266株(データ示さず)を比較すると、コピー数11～17本の菌株が多いという点では堺市と大阪府下で一致していた。しかし、大阪府下ではコピー数1本の菌株は4株(1.5%)であったが堺市では7株(3.1%)あり、堺市ではコピー数1本の菌株の占める割合が府下全体より高かった。

## 3. RFLPパターンの解析

図2に227株のRFLPパターンのデンドログラムを、表2に同一パターンを示したクラスター(同一クラスター)と類似係数80以上を示したクラスター(類似クラスター)それぞれの数と大きさを示した。同一クラスターは20個形成され、各クラスターを形

成する菌株数は2~14株で、合計67株(29.5%)であった。類似クラスターは21個形成され、各クラスターを形成する菌株数は2~44株、合計171株(75.3%)であった。

図2 RFLPパターンのデンドログラム

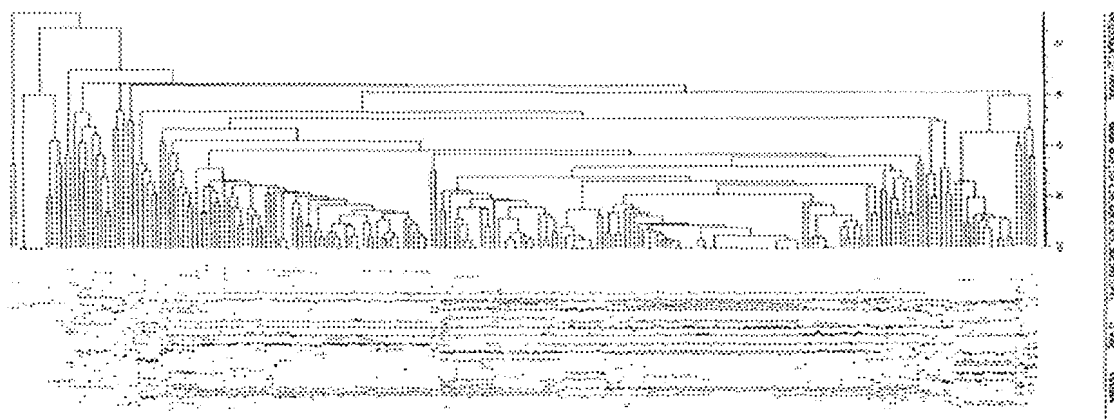


表2 1999~2001年6月までの同一クラスター、類似クラスター

		同一 クラスター	同一クラスター の大きさ	類似クラスター*	類似クラスターの大きさ
全被 験株	227	67 (29.5%)	14, 6, 5x2, 4x2, 3, 2x13	171 (75.3%)	44, 28, 24, 14, 11, 10, 6, 4x 2, 3x2, 2x10

④同一クラスターを形成する菌株について

表3に各同一クラスターを形成する菌株の患者住所地、年齢、菌株採取年についてまとめた。最も大きい同一クラスターa1は14株中6株の患者住所が西地域、4株が南地域で構成菌株に地域的な集積が見られた。今回解析に使用した患者情報からは、クラスターa1を形成する菌株間の疫学的つながりは証明できなかったが、クラスターa1は西、南地域を中心に起こった集団感染の可能性が考えられた。クラスターa1の患者年齢は20歳代から60歳代にほぼ均一に分布し、患者年齢の偏りは見られなかった。菌株採取年は1999年が6株、2000年が7株であったが、2001年の株は1株しか含まれていなかった。結核は感染後1年以内に発症する可能性が高いので、クラスターa1が集団感染とすると、1998~99年に初発患者が発生したと考えられる。3株以上から形成される同一クラスターについて構成菌株が地域に集積しているものは、a1, a6, c, d1, f, lの6個であった。一方、構成菌株がある年代に集積しているクラスターはa2, c,

d1の3個であった。このことから、最近数年間の感染は患者の住居地を中心に起こっている可能性が示唆された。

表3 同一クラスターの患者由来別内訳

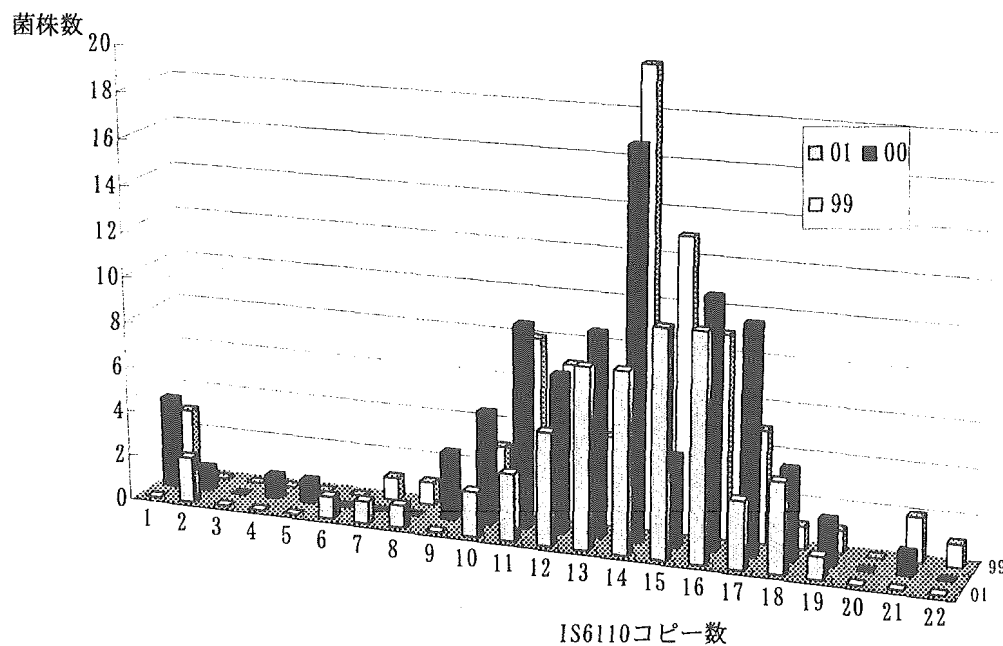
クラスター	a1	a2	a3	a4	a5	a6	b	c	d1	d2	e1	e2	e3	f	g	h	I	j	k	l	合計	クラスター関与率*	
株数	14	5	2	2	2	5	2	4	4	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	6	67	
患者住所	東	1		1			1	3						2	1							10	7/20
	西	6	2				1					1		1							2	13	6/20
	南	4	1	1		2			2		1									1	1	13	8/20
	北	1	1			1			1					1		2	1	1				9	8/20
	堺	1				2			2	1	1	1					1	1	1	3		14	10/20
	中	1	1		2	1		1	1	1												8	7/20
患者年齢	20歳代	4	3					1						1					1	2		12	6/20
	30歳代	3			1	2				1	2					1		1		1		12	8/20
	40歳代	1		2		1								1							1	6	5/20
	50歳代	3	1		1		1	3	1	1		1	1	1		1	2					17	12/20
	60歳代	3	1			2	1		3			1	1								1	13	8/20
	70歳代														2					1	1	4	3/20
	80歳代					1	1													1		3	3/20
菌株採取年	99年	6	1	2	1	2	3	2	4	3	1	2	1		1	2					2	29	15/20
	00年	7	3		1				1	1				3	1		1	2			4	28	10/20
	01年	1	1			2				1	1		1				1			2		10	8/20

\*: 該当住所（年齢、菌株採取年）の菌株が含まれている同一クラスター数 / クラスター総数

同一クラスター数は3年間で20個であったが、同じ患者住所内、または同じ患者年代で形成された同一クラスターはそれぞれ3個（15.0%）と低いことから、堺市内では異なる住所地域や年代間での感染が多いと考えられる。次に、異なる住所地域・年代間での感染の中心について考察する。該当住所・年齢・菌株採取年の菌株が含まれている同一クラスター数をクラスター総数で割った値をクラスター関与率とすると、クラスター関与率が高いほど他の地域、年齢との感染を起こしている割合が高いと推測される。住所地域では堺地域のクラスター関与率が最も高く10/20であった。他地域では6/20～8/20で特に関与率の低い地域は見られなかった。患者年代では50歳代のクラスター関与率が12/20と突出して高く、50歳代を中心に異なる年代間の感染が起こっていると考えられた。一方、70歳代、80歳代の高齢者の関与率は3/20と他の年代と比べて低いが、関与が全くないわけではないことが示された。図3に患者年代を39歳以下、40～69歳、70歳以上の3グループに分けてRFLPパターンを解析したデンドログラムを示した。それぞれの類似クラスターに注目すると、39歳以下と70歳以上に共通した類似クラスターはないが、70歳以上と40～69歳では共通した類似クラスターAがあり、39歳以下と40～69歳では共通した類似クラスターBがみられる。このことから、

高齢者と中年層での感染、若年層と中年層で感染が起こっているが、高齢者と若年層での感染は起こっていないと推測される。デンドログラムの比較とクラスター関与率から考察して、堺市内では中年層、特に50歳代が感染の中心的役割を果たしているのではないかとと思われる。

図3 採取年毎の IS6110 コピー数分布の違い



## 2) 菌株採取年ごとのRFLP解析結果の比較

### ①採取年ごとのIS6110コピー数分布の違いについて

図3に1999年から2001年の各年ごとのIS6110コピー数分布を示した。3年間を通して10～19本のコピー数が多いという共通点が見られた。1999年と2000年はコピー数1本に小さなピークがあり、14本に大きなピークが見られる共通した分布を示した。しかし、2001年はコピー数1本の菌株がない、14本に大きなピークが見られない、コピー数15、16本にピークが移っているなど、前2年と異なるコピー数分布であった。

### ②採取年ごとの同一クラスター、類似クラスターの形成について

表4に1999年から2001年の各年ごとの同一クラスター、類似クラスターの形成率、各クラスターの大きさをまとめた。1999年、2000年は同一クラスターを形成する菌株数、同一クラスター数が多く、1999年は被験菌株の32.9%、2000年には被験菌株の25.8%により同一クラスターが形成されており、クラスター数も1999年は10個、2000年は6

個であった。さらに、クラスターの大きさも1999年には6株、2000年には7株から形成される大きなクラスターが形成されていた。一方、2001年には同一クラスター形成菌株数は4株(6.8%)で、2株から成る小さな同一クラスターが2個形成されただけであった。類似クラスター形成についても1999年、2000年は被験株のそれぞれ73.4%、82.0%であり、被験株の遺伝的類似が非常に高かったが、2001年には54.2%に低下した。

### 3) 1999～2000年の解析結果と2001年の解析結果の相違についての考察

コピー数分布および同一、類似クラスターの形成率の違いから1999～2000年の2年間で2001年1～6月の半年間の堺市在住新規登録結核患者由来株にはなんらかの相違があると考えられた。この相違の原因を、菌株の由来（患者年齢、患者住所地域）および罹患率の変化から考察してみた。

表4 採取年ごとの同一クラスター・類似クラスターについて

	株数	同一クラスター	同一クラスターの大きさ	類似クラスター*	類似クラスターの大きさ
99年分	79	26 (32.9%)	6, 3x2, 2x7	58 (73.4%)	18, 12, 9, 4, 3, 2x6
00年分	89	23 (25.8%)	7, 4x2, 3x2, 2	73 (82.0%)	18, 11, 10, 9, 5, 4x3, 2x4
01年分	59	4 (6.8%)	2x2	32 (54.2%)	8, 7, 6, 3, 2x4
全被験株	227	67 (29.5%)	14, 6, 5x2, 4x2, 3, 2x1 3	171 (75.3%)	44, 28, 24, 14, 11, 10, 6, 4x2, 3x2, 2x10

\*：類似が80以上のクラスター

表5に被験株の採取年別の患者性別、患者住所地域別内訳を示した。性別に採取年による大きな差は見られなかった。患者住所地域では3年間とも堺地域由来株が最も多く、堺地域以外では1999年、2000年には西地域由来株、2000年、2001年には北地域由来株が多く、1999～2000年と2001年で明確な違いは見られなかった。表6に被験株の採取年別の患者年代別内訳を示した。1999年、2000年は50歳代由来株が最も多く被験株の20%以上を占めていたが、2001年で最も多いのは60歳代由来株であった。2001年の50歳代由来株は15.3%に減少していた。また、1999年、2000年では80歳代由来株は10%以下で全年代中最も少なかったが、2001年には80歳代由来株は15.3%に増加し60歳代、70歳代に次いで3番目に多かった。



表5 被験株の採取年別 患者性別・住所地域内訳

	合計	男	女	患者住所					
				東	西	南	北	堺	中
99年分	79	61 (77.2%)	18 (22.8%)	9 (11.4%)	18 (22.8%)	11 (13.9%)	12 (15.2%)	18 (22.8%)	11 (13.9%)
00年分	89	65 (73.0%)	24 (27.0%)	14 (15.7%)	18 (20.2%)	10 (11.2%)	19 (21.3%)	22 (24.7%)	6 (6.7%)
01年分	59	40 (67.8%)	19 (32.2%)	3 (5.1%)	7 (11.9%)	7 (11.9%)	15 (25.4%)	17 (28.8%)	10 (16.9%)

表6 被験株の採取年別 患者年齢内訳

	合計	患者年齢						
		30歳未満	30歳代	40歳代	50歳代	60歳代	70歳代	80歳代
99年分	79	7 (8.9%)	7 (8.9%)	9 (11.4%)	19 (24.1%)	23 (29.1%)	7 (8.9%)	7 (8.9%)
00年分	89	11 (12.4%)	10 (11.2%)	15 (16.9%)	19 (21.3%)	12 (13.5%)	16 (18.0%)	6 (6.7%)
01年分	59	7 (11.9%)	9 (15.3%)	4 (6.8%)	9 (15.3%)	11 (18.7%)	10 (16.9%)	9 (15.3%)

堺市の感染の中心と考えられる40～60歳代の中年層の占める割合は1999年は64.6%、2000年は51.7%であったが、2001年には40.7%と減少した。逆に、70歳以上の高齢者は1999年は17.7%、2000年は24.7%であったが、2001年には32.2%に増加した。このように1999～2000年の株と2001年の株では患者年齢内訳に相違があり、1999～2000年の株は中年層が多く高齢者が少ないが、2001年では中年層が減少し高齢者が増加した。これまでの報告で示してきたが、堺市の高齢者は同年代間、他年代間ともに感染に関する率が低く、同年代間の遺伝的類似も低い。そのため、高齢者の多い2001年には同一クラスター、類似クラスターの形成が少なかったと考えられる。

表7に1999年から2001年の堺市全体および地域別の罹患率の推移を示した。堺市全体では1999年から2001年にかけて罹患率は58.6から50.2にまで減少している。また、最も大きな同一クラスターa1の中心地と考えられた西地域と南地域、クラスター関与率から堺市での地域間感染の中心と考えられた堺地域とともに1999年から2001年にかけて罹患率が減少している。

表7 1999-2001年の堺市新規登録患者数および罹患率

		堺市全体	東	西	南	北	堺	中
1999	新規登録患者数	466	67	87	71	68	119	54
	罹患率	58.6	75.4	67.2	43.5	47.7	78.1	45.2
2000	新規登録患者数	448	57	92	61	79	104	55
	罹患率	56.9	64.3	71.5	37.7	55	70.5	46.9
2001	新規登録患者数	398	41	58	47	95	96	61
	罹患率	50.2	46.9	44.8	29.1	64.8	63.6	51.9

海外の結核高蔓延地域と低蔓延地域のRFLP分析結果の比較から、結核対策の行き届いた低蔓延地域では類似したRFLPパターンが少なく、同一クラスターも少ないといわれている。2001年の同一クラスター、類似クラスター形成の減少は被験株に高齢者由来株が多いことだけが原因でなく、堺市の結核対策が功を奏し罹患率が減少したためとも考えられる。

### 3. まとめ

- ①1999年から2001年6月までの堺市在住新規登録患者由来株227株についてIS6110をプローブとしたRFLP分析を実施した。
- ②堺市在住新規登録患者には高齢者より50～69歳の患者が多かった。
- ③IS6110コピー数はコピー数1本と14本にピークがありコピー数11～17本の菌株が多かった。
- ④2年半で67株（29.5%）から20個の同一クラスター、171株（75.3%）から21個の類似クラスターが形成された。
- ⑤同一クラスターの構成菌株の地域的集積から、堺市内では中心とした感染が起こっていることが示唆された。
- ⑦同一クラスター形成への関与の多さから、堺市では50歳代の患者が感染の中心になっていると考えられた。
- ⑧患者年代別の解析から高齢者と中年層での感染、若年層と中年層で感染が起こっているが、高齢者と若年層での感染は起こっていないと推測された。
- ⑨採取年別に解析すると、1999～2000年の2年間に比べて2001年採取株では同一クラスター、類似クラスター形成率が大幅に減少した。これは2001年には70歳以上の高齢者由来株が多かったこと、堺市の結核対策が功を奏し罹患率が減少したことが原因と思われる。

## XVI. 神戸市内分離結核菌における分子疫学的解析

### - IS6110 RFLPとMIRU-VNTRの比較 -

神戸市環境保健研究所 岩本朋忠、園部俊明  
神戸市保健所 白井千香、村上誠子

#### 1. 目的

神戸市で分離された結核菌について遺伝子型別分析を行い、市内結核菌の蔓延状況を考察する。また、現在の標準法である IS6110 RFLP の抱える問題点（操作の煩雑さ、高コスト、異なる施設間でのデータの互換性）を解決する手法として近年注目されている新規遺伝子型別分析手法 “Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable number tandem repeat (MIRU-VNTR)” の有用性を評価する。

#### 2. 検討項目

- (1) 市内分離株 100 株を IS6110 RFLP を実施し、神戸市における蔓延状況を考察する。
- (2) MIRU-VNTR と IS6110 RFLP の比較を行い、MIRU-VNTR の有用性を評価する。
- (3) 市内分離株より得た MIRU-VNTR プロファイルを海外での分離株と比較し、グローバルレベルでの疫学解析を行う。

#### 3. 材料および方法

1) 菌株：神戸市で分離された以下の 100 株を使用した。

(1) 慢性排菌患者（平成 12 年厚生省作成リストより）

1999 年年末時点で登録されている結核患者のうち 1999 年の 1 年間の間に培養陽性であり 1998 年 1 月 1 日以前に登録された患者からの分離株 19 株。

(2) 疫学的リンクが明らかな株(同一施設内感染、親子感染、等)、16 株

(3) 2002 年 1 月から 6 月に、同一地区内(Area H)で分離された株、39 株

(4) その他の分離株、26 株

2) IS6110 RFLP 分析：結核研究所高橋ら<sup>1)</sup>の方法に従った。RFLP パターンの解析には Phoretic 1D Professional (Nonlinear Dynamics Ltd)を用いた。バンドパターンの相同性計数は Jaccard、クラスタリングには UPGMA を用いた。

3) MIRU-VNTR：Supply ら<sup>2)</sup>の方法に従った。MIRU-VNTR データから Categorical 係数を用いて類似性を算出し、UPGMA によりデンドログラムを作成した。解析ソフトは、BioNumerics (Applied Maths BVBA)を使用した。

4) 統計学的解析：chi-square test と student t-test をもちいた。

#### 4. 結果と考察：

##### 1) IS6110 RFLP 解析

実施菌株 100 株の IS6110 RFLP パターンによる分析では、コピー数の分布は 1～25 の間で、10、11、12 コピーにピークがみられ、86 株 (86%) がコピー数 10～17 であった(Fig.2)。RFLP パターンが完全に一致した同一クラスターはクラスターサイズ (含まれる菌数) 2～5 で 11 種類みられ、100 株中 30 株(30%)がいずれかに属した(Fig.1)。慢性排菌患者株 19 株では、いずれの株もクラスターを形成しなかった。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ためバンド数の変化が乏しくなることが知られており<sup>3)</sup>、現在神戸市では結核が蔓延状態にあることが示された。また、これまでの疫学的調査で患者間のリンクが明らかにされた 16 株に加えて 14 株が新たにクラスターを形成し、未知の感染経路の存在が示唆された。今回の RFLP に用いた 100 株には集団感染事例や特定の患者集団 (慢性排菌患者など) など母集団として人為的バイアスのかかった株が含まれている。これらの株を除く 39 株 (同一地区にて 2002 年 1～6 月に分離された株) についてさらに解析を行った。コピー数の分布は 8～19 の間で、11、12、13 コピーにピークがみられ、25 株 (64%) がコピー数 11～15 であった(Fig.2)。RFLP パターンが完全に一致した同一クラスターはクラスターサイズ 2～5 種類みられ、39 株中 10 株(25.6%)がいずれかに属した。解析に用いた株数が少ないにもかかわらず、比較的高いクラスター形成率を示したことから、この地区においても結核が流行状態にあるものと考えられる。これら 39 株についてクラスター形成に関わる要因を患者年齢について検討した。クラスター形成患者集団と非形成患者集団との間で平均年齢、75、60、40、30 歳未満の患者数について比較したところ(Table1)、30 歳未満の患者に占める割合でクラスター形成患者のほうが有意に高い値( $P=0.035$ )を示し、若年層での蔓延が示唆された。今後、継続して RFLP 解析を実施し、解析菌株の数を増やすことで、より信頼性の高い疫学的データが得られるものと期待される。

##### 2) MIRU-VNTR 法の有用性評価

MIRU-VNTR 法は結核菌ゲノム DNA 上の 12 の領域にみられる数十塩基からなる繰り返し配列の反復数が各菌株に固有の数を示すことを利用した遺伝子型別分析手法であり 2001 年に Mazars ら<sup>4)</sup>により報告された。操作が簡便 (PCR と電気泳動のみ) で安価、結果が 12 桁の数字で表示できるためデータ管理が容易 (パターンの一致、不一致の検索が Excel ワークシート上で可能) であり、また他施設のデータとの比較が可能、微量の DNA 量で解析できることから作業従事者への安全性を確保しやすいなどの特徴があげられる。今回、我々は、2002 年 1 月から 6 月の間に同一地区内で分離された 39 株を用いて本手法の菌株レベルでの型別分離能を評価した。さらに、同一施設内感染を引き起こした株 (2 事例、各 3 株が RFLP パターン一致) について本手法を適用した。39 株に対する MIRU-VNTR 解析結果および IS6110 RFLP パターンの一致・