

IS6110 DNA 指紋法少コピー数結核菌による 精神病院での集団感染事例

¹⁾ 国立病院機構西甲府病院内科, ²⁾ 国立病院機構新潟病院内科, ³⁾ 国立国際医療センター感染症制御研究部

高 原 誠¹⁾²⁾ 切 替 照 雄³⁾

(平成 19 年 5 月 18 日受付)

(平成 19 年 8 月 23 日受理)

Key words: restriction fragment length polymorphism (RFLP), IS6110, (CGG)₅

序 文

今回我々は、山梨県内の精神病院の同一病棟で 5 年間に 4 人の結核患者が発病した、という事例を経験した。4 例中 3 例の菌株を得て RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析を施行、IS6110 指紋法では三者のパターンが一致したのだが、バンド数は 2 本であり、本法での感染伝播の確認は困難であった。しかし、他のタイピング法を併用することにより、院内感染伝播の確認が可能であった。文献も含めて考察して行きたい。

症 例

症例 1: Index case で、平成 12 年 2 月現在 50 歳女性、躁鬱病、精神発達遅滞で 17 歳時より山梨県 A 市の精神病院 B 病院の C 病棟に入院中だった。同時期、発熱と咳を主訴に国立療養所西甲府病院 (後の国立病院機構西甲府病院、以下同様) に入院、胸部 X 線で空洞病変を認め、日本結核病学会の病型・拡がり (以下学会分類) は bII3、検痰で塗抹はガフキー 6 号、培養 (小川培地上、以下同様) は 3+、薬剤耐性はなかった。家族歴は祖父が肺結核で死亡、姉も 3 歳時に結核の治療を受けた。菌株の保存はない。

症例 2: 平成 13 年 6 月現在 46 歳の女性、統合失調症、精神発達遅滞にて 10 年前から C 病棟入院中で、発熱と胸部異常陰影 (学会分類 rII2rpl) のため当院に紹介された。検痰で塗抹 3+、培養 4+、薬剤耐性はなく、胸水中 Adenosine deaminase (ADA) は 80.5 IU/L に上昇していた。平成 11 年に症例 1 と同室だった。

症例 3: 平成 13 年現在 78 歳男性、統合失調症にて 44 歳時より C 病棟入院中だったが、健康診断で胸部

異常陰影 (学会分類 bIII1) の指摘を受け、検痰で塗抹 1+、培養 3+ (薬剤耐性なし) であり、症例 2 と同時期に当院に入院した。

症例 4: 平成 16 年 3 月現在 53 歳の男性、15 歳時より統合失調症にて C 病棟入院中で、症例 1~3 と面識があった。平成 16 年 2 月中旬より発熱を認め、胸部 X 線で右下肺野に浸潤影があったが、一般抗生剤投与で改善せず陰影は右肺全体に及び (学会分類 bII3)、呼吸不全が進行した。3 月下旬に肺結核と判明し、当院に転院した。入院時の検痰では塗抹 2+、培養 3+、薬剤耐性は認めなかった。

以上の症例 1~症例 4 の結核発病の時間経過は、Fig. 1 に示す通りである。

RFLP 解析: 平成 14 年の段階で B 病院 C 病棟の院内感染と推定され、結核研究所に症例 2, 3 の菌株を送り、RFLP 解析を依頼した。IS6110 をプローブとした DNA 指紋法でバンドパターンは一致したが、バンド数が 2 つに止まったため、解析不能であった。平成 17 年に今度は国立国際医療センター感染症制御研究部において、症例 2~4 の菌株の RFLP 解析を行った。まず IS6110 法で三者のパターンが一致 (Fig. 2 A)、次に (CGG)₅¹⁾ をプローブとして解析、同様に三者の指紋法が一致し (Fig. 2B)、しかもバンド数は 15 だった。

Table 1 に症例 2~4 の主要薬剤耐性関連遺伝子上の変異を示す。F1 は症例 2、F2 は症例 3、F3 は症例 4 である。既報²⁾の方法に準拠し、ダイレクトシーケンス法により、主要抗結核剤 5 剤を含む 7 剤に対する耐性遺伝子の変異の有無を解析した。それぞれの菌株より抽出した結核菌ゲノム DNA を鋳型とし、耐性遺伝子に特異的な 8 組のプライマーペアを用いて、リファンピシン耐性遺伝子 (*rpoB*)、イソニアジド耐性

別刷請求先: (〒945-8585) 新潟県柏崎市赤坂町 3 の 52

国立病院機構新潟病院内科

高原 誠

平成19年11月20日

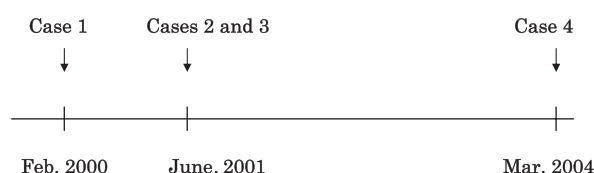
Table 1 Analysis of amino-acid mutations conferring resistance to rifampicin, isoniazid, ethambutol, pyrazinamide, streptomycin, kanamycin, and levofloxacin (2)

Isolate	RFP	INH		EB	PZA	SM, KM		LVFX
	<i>rpoB</i> mutation	<i>katG</i> mutation	<i>inhA</i> promoter mutation	<i>embB</i> mutation	<i>pncA</i> mutation	<i>rpsL</i> mutation	<i>rrs</i> mutation	<i>gyrA</i> mutation
F1	WT	WT	WT	Ala1007Val ^a (GCC → GTC)	WT	Lys121Lys ^a (AAA → AAG)	WT	Glu21Gln ^a (GAG → CAG), Ser95Thr ^a (AGC → ACC)
F2	WT	WT	WT	Ala1007Val ^a (GCC → GTC)	WT	Lys121Lys ^a (AAA → AAG)	WT	Glu21Gln ^a (GAG → CAG), Ser95Thr ^a (AGC → ACC)
F3	WT	WT	WT	Ala1007Val ^a (GCC → GTC)	WT	Lys121Lys ^a (AAA → AAG)	WT	Glu21Gln ^a (GAG → CAG), Ser95Thr ^a (AGC → ACC)

Abbreviations: RFP, rifampicin; INH, isoniazid; EB, ethambutol; PZA, pyrazinamide; SM, streptomycin; KM, kanamycin; LVFX, levofloxacin; A, adenine; C, cytosine; G, guanine; T, thymine; Ala, alanine; Val, valine; Lys, lysine; Glu, glutamic acid; Gln, glutamine; Ser, serine; Thr, threonine; WT, wild type; ^aNatural polymorphism not to be associated with drug resistance.

Isolates: F1, Case 2; F2, Case 3; F3, Case 4.

Fig. 1 Four cases of pulmonary tuberculosis in a mental hospital in Yamanashi, Japan

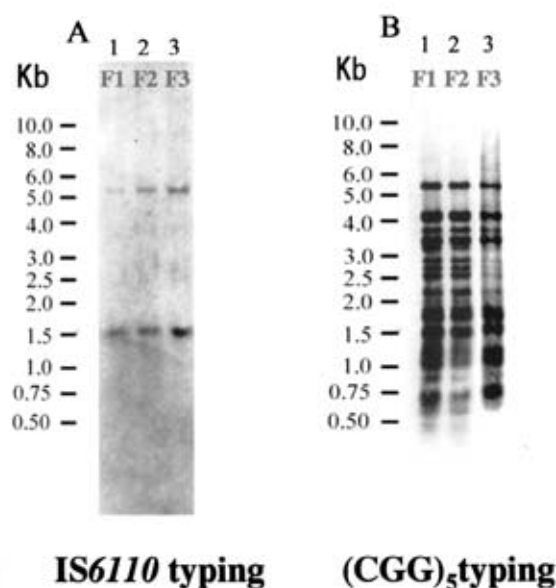


遺伝子 (*katG* 及び *inhA*), 塩酸エタンブトール耐性遺伝子 (*embB*), ピラジナミド耐性遺伝子 (*pncA*), 硫酸ストレプトマイシン及び硫酸カナマイシン耐性遺伝子 (*rpsL* 及び *rrs*), レボフロキサシン耐性遺伝子 (*gyrA*) を増幅した. これらの PCR 産物の塩基配列は, ABI3100 オートシーケンサーを用いて決定した. 結果としては, *embB*, *rpsL* 及び *gyrA* に変異は認められたが, すべて薬剤耐性とは関連のない変異²⁾であり, さらに 3 株の変異はすべて一致した.

以上より, 同一施設で 5 年間にわたり 4 例の発病がみられ (Fig. 1), 院内集団感染の定義にはあてはまらないものの, 菌株の同一性より施設内集団感染が強く疑われた.

考 察

症例 2~4 の菌株は RFLP 解析パターンが一致し (Fig. 2), 液体培地上で抗結核薬主要 5 剤に対する薬剤耐性は認めなかった. 主要薬剤耐性関連遺伝子上の変異は認めず, 耐性と関係のない変異もすべて一致した (Table 1). 症例 1 も含め 4 例は 10 年以上精神病院の同じ病棟で生活し, 疫学的関連も有する. IS6110 結核菌遺伝子タイピングの欠点は, DNA 指紋法でバンド数 5 以下の場合, 遺伝子多形性が乏しいため鑑別不能になることで, アフリカ及びアジアの菌株に多

Fig. 2 IS6110 (A) and (CGG)₅ (B) fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains in 3 cases. F1: Case 2, F2: Case 3, F3: Case 4. Both types of fingerprinting showed identical patterns for 3 isolates. The copy number of IS6110 printing was two (A), that of (CGG)₅ printing was 15.

い^{3,4)}. Burman らは⁴⁾ヴェトナム等からの移民も含まれるデンバーにおける結核患者の菌株に RFLP 解析を施行し, IS6110 タイピング法単独でのクラスター形成率は, コピー数 5 以下が 82%, 6 以上が 32% であったが, IS6110 と Polymorphic G-C rich repetitive sequence (PGRS)⁵⁾を組み合わせでタイピングした場合, コピー数 5 以下が 32%, 6 以上が 25% であり, クラスターの疫学的関連性は 78% で認められた. IS6110 法少コピー例は, 指紋法一致例の 6 割以上が, 2 次タイピング法 (PGRS) で別菌種とされた計算になる. van

Soolingen³⁾は2次タイピングとしてスポリゴタイピング⁶⁾も推奨、使用例の報告も多く見られる。

日本におけるIS6110法少数コピー例の頻度に関する報告例として、阿野ら⁷⁾の大阪地区の検討では4.2%であった。高橋⁸⁾が1988年と1992年の北海道から九州までの結核菌株を集め、IS6110のコピー数の分布を集計した結果からは、5本以下の例の割合はグラフ上10%弱と考えられた。関東が中心で仙台から福岡に渡るHIV(+)患者の結核菌株33株のRFLP解析では⁹⁾、少コピー例は7株21.2%であった。

大塚らは¹⁾ヒトの遺伝子上で神経筋疾患患者などの疾患に存在することが知られているトリヌクレオチドリピートに着目し、細菌ゲノム上で同様なリピートが存在するか、検索した。その結果、結核菌に比較的特異的にDNA塩基CGGの5回の繰り返しが存在することを見出した。この(CGG)₅は、おもにPPE及びPEファミリー遺伝子上に存在し(PGRSも同部位に存在)、これを疫学指標としたRFLP解析が可能である¹⁾。結核親子感染事例では、(CGG)₅を用いたRFLP解析によりIS6110法とほぼ一致した結果が得られている¹⁰⁾。

(CGG)₅を用いたRFLP解析はとくにIS6110法でバンド数が少ない菌株のクラスター解析に有用である。日本におけるHIV(+)患者の結核菌株33株のRFLP解析では⁹⁾、(CGG)₅法では菌株のバンド数が8~16であり、少コピー例が7例存在したIS6110法とは異なり、全例でクラスター解析可能であった。今回の我々の報告においても、(CGG)₅がIS6110法でのコピー少数例の補助診断法として、PGRSやスポリゴタイピングと同様に有用であることが示された。

謝辞：稿を終えるにあたり、症例2, 3の菌株を平成13年~平成17年の長期間保存し、我々の求めに応じて送り下さった結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報課職員の方々に深謝致します。

文 献

- 1) Otsuka Y, Parniewski P, Zwolska Z, Kai M, Fujino T, Kirikae F, *et al.* : Characterization of trinucleotide repeat sequence (CGG)₅ and potential use in restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 3538—48.
- 2) Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-kope Z, Zwolska Z, Kirikae E, Toyota E, *et al.* : Detection of Multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2007 ; 45 : 179—92.
- 3) van Soolingen D : Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Intern Med 2001 ; 249 : 1—26.
- 4) Burman WJ, Reves RR, Hawkes AP, Rietmeijer CA, Yang Z, El-Hajj H, *et al.* : DNA fingerprinting with two probes decreases clustering of *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 1997 ; 155 : 1140—6.
- 5) Ross BC, Raio K, Jackson K, Dwyer B : Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. J Clin Microbiol 1992 ; 30 : 942—6.
- 6) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, *et al.* : Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 907—14.
- 7) 阿野裕美, 松本智成, 吉多仁子, 永井崇之, 田村嘉孝, 西森 敬, 他 : IS6110RFLP解析に基づく、結核の分子疫学的検討—2001~2003年—。結核 2006 ; 81 : 321—8.
- 8) 高橋光良 : 結核菌挿入断片 (IS) 6110 をプローブとした結核の分子疫学。資料と展望 1996 ; 17 : 43—53.
- 9) Otsuka Y, Fujino T, Mori N, Sekiguchi J, Toyota E, Saruta K, *et al.* : Survey of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive patients with mycobacterial infection in Japan. J Infect 2005 ; 51 : 364—74.
- 10) Takahara M, Yajima Y, Miyazaki S, Aiyoshi M, Fujino T, Otsuka Y, *et al.* : Molecular epidemiology of intra-familial tuberculosis transmission. Jpn J Infect Dis 2003 ; 56 : 132—3.

Mental Hospital Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* with Few Copies of IS6110 DNA FingerprintingMakoto TAKAHARA¹⁾²⁾ & Teruo KIRIKAE³⁾¹⁾Department of Internal Medicine, National Hospital Organization Nishi-Kofu Hospital,²⁾Department of Internal Medicine, National Hospital Organization Niigata Hospital,³⁾Department of Infectious Diseases, Reserch Institute, International Medical Center of Japan

We report a case of 4 patients with pulmonary tuberculosis in a mental hospital located in Yamanashi, Japan, between 2000 and 2004 in which 3 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were analyzed using IS6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP). DNA fingerprinting showed them to be identical and the copy number to be two. Additional RFLP using (CGG)₅ fingerprinting yielded the same result and a copy number of 15, suggesting a *M. tuberculosis* outbreak. (CGG)₅ analysis thus proved useful in supplementary typing method like polymorphic G-C rich repetitive sequence (PGRS) or spoligotyping.

[J.J.A. Inf. D. 81 : 741~744, 2007]