

福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究

渡邊奈々子 千葉一樹 菅野奈美 遠藤嘉子 小黒祐子 佐藤弘子
微生物課

要 旨

2011年度は、結核菌 35 株について RFLP 分析法および VNTR 分析法を実施し、データベースに蓄積した。

今回の検査では、両法の有用性を確認すると同時に、RFLP 分析法による判定の限界及び VNTR 分析領域の追加の必要性が認められた。よって、今後の VNTR 分析については分析領域を追加して分析を行うこととした。

キーワード：結核菌，VNTR 分析，RFLP 分析，疫学

はじめに

2002 年度より 2007 年度まで結核菌の Restriction fragment length polymorphism (以下“RFLP”とする)分析による分子疫学的調査研究事業を実施してきた。

2008 年度からは Variable numbers of tandem repeats (以下“VNTR”とする)分析法を取り入れた福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究事業を行っている。

2011 年度は、結核菌 35 株について分子疫学的検査を実施し、データベースに蓄積した。また、すでにデータベースとして当所に保存してある 177 株の菌株情報を用い、関連調査等を行ったのでその概要を報告する。

方 法

1 結核菌からの DNA 抽出

DNA の抽出は小川培地上の菌体から DNA 抽出キットを用い、バイオセーフティレベル 3 の施設内でクラス II B3 のバイオセーフティーキャビネットを使用して行った。

2 RFLP 分析

高橋の方法^{1, 2)}に従い、結核菌 DNA を制限酵素 *Pvu* II で消化後、0.8 %アガロースゲル電気泳動、メンブレンへのトランスファー後、ハイブリダイゼーションを行った。メンブレン上の DNA の検出は、ペルオキシダー

ゼ標識ストレプトアビジン液と反応後、化学発光物質を加え、フィルムに感光させて検出した。プローブは、結核菌群特異的挿入配列 IS6110 由来 245bp の PCR 産物を Random primer DNA labeling kit (コスモバイオ社)でビオチン標識して用いた。DNA マーカーは、ベクター社の Biotynylated DNA molecular weight markers を用いた。

3 VNTR 分析

前田らの方法³⁾に従い、型別法は JATA (12)-VNTR 法で実施した。この方法は前田らが日本国内全域で分離された結核菌を解析対象モデルとして構築したものであり、ゲノム上の 12 カ所について分析をするものである。

ローカスの増幅は、抽出 DNA を PCR 法により前田らの方法³⁾と同様の条件で実施した。PCR 増幅産物は、TBE 緩衝液を用いた 2.0 %アガロースゲルで電気泳動を行い、その分子量を算出し、前田らが示した換算表³⁾を用いてコピー数に換算した。

また、精度管理株として *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv を用いた。

材 料

2011 年度に医療機関等で同定された結核菌 35 株を用いた。

35 株の保健所管内別搬入数を表 1 に示す。患者年齢階級別および男女別菌株数を表 2 に

示す。

表1 結核菌の保健所管内別搬入数

保健所名	菌株数
県北	15
県中	4
県南	1
会津	2
南会津	0
相双	5
郡山市	3
いわき市	5
計	35

表2 年齢階級別および男女別菌株数

年齢階級	男	女	総数
10～19	1	0	1
20～29	3	5	8
30～39	2	1	3
40～49	4	0	4
50～59	7	2	9
60～69	0	1	1
70～79	1	1	2
80以上	6	1	7
計	24	11	35

結果及び考察

患者間の関連調査等を図および表に示す。なお、図の M は DNA マーカーを示している。

1 関連調査事例 1

No.179, 153, 154 の患者は同じ医療機関に勤務していた。2011 年度に搬入された菌株は No.179 である。No.153, 154 については 2009 年度に関連調査の依頼があり、RFLP 及び VNTR の分析結果が一致していたことを報告している⁴⁾。

表3 関連調査事例1 (VNTR分析)

JATA No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Alias	Mtub 04	MIRU 10	Mtub 21	Mtub 24	QUB 11b	VNTR 2372	MIRU 26	QUB 15	MIRU 31	QUB 3336	QUB 26	QUB 4156
Locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156
No.179	2	3	1	3	4	2	5	4	4	11	3	3
No.153	2	3	1	3	4	2	5	4	4	11	3	3
No.154	2	3	1	3	4	2	5	4	4	11	3	3

図 1 および表 3 に示すとおり、No.179 についても No.153, 154 と RFLP パターン及び VNTR 分析結果が一致し、患者間の感染または同一の感染源からの感染であることが明らかになった。No.179 は No.153, 154 の発症から 1 年以上経過してからの発症であった。

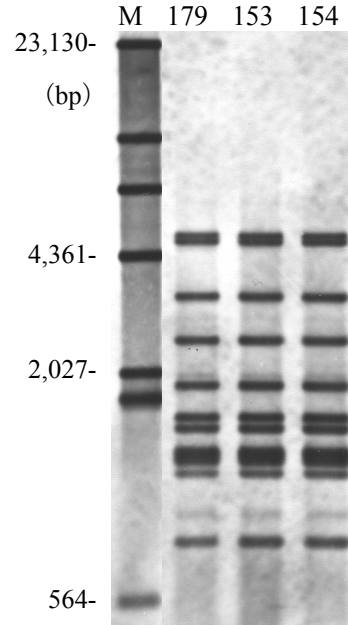


図 1 関連調査事例 1 (RFLP分析)

2 関連調査事例 2

No.184, 140, 141, 183 の患者は同じ医療機関に勤務していた。2011 年度に搬入された菌株は No.184, 183 である。No.140, 141 は 2009 年度に搬入されている。

図 2 および表 4 に示すとおり、RFLP パターンは No.184, 140 が一致し、また、VNTR 分析結果についても No.184, 140 が一致した。よって、No.184, 140 は患者間の感染または同一の感染源からの感染であることが明らかになった。No.141 と No.183 は、No.184, 140 とは RFLP パターン、VNTR 分析結果ともに

表4 関連調査事例2 (VNTR分析)

JATA No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Alias	Mtub 04	MIRU 10	Mtub 21	Mtub 24	QUB 11b	VNTR 2372	MIRU 26	QUB 15	MIRU 31	QUB 3336	QUB 26	QUB 4156
Locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156
No.184	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3
No.140	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3
No.141	4	1	3	2	7	4	7	4	4	7	8	5
No.183	4	3	3	3	3	3	6	4	3	7	7	4

異なっていた。通常、同じ職場における発症という疫学的関連があれば、事例1のように同一感染源の可能性を考えるが、この事例では3つの感染源の存在が示唆された。

ことが明らかになった。この事例ではNo.209の患者の診断が遅れ、集団感染事例となった。今後もさらに患者が発生する可能性があり、注意が必要である。

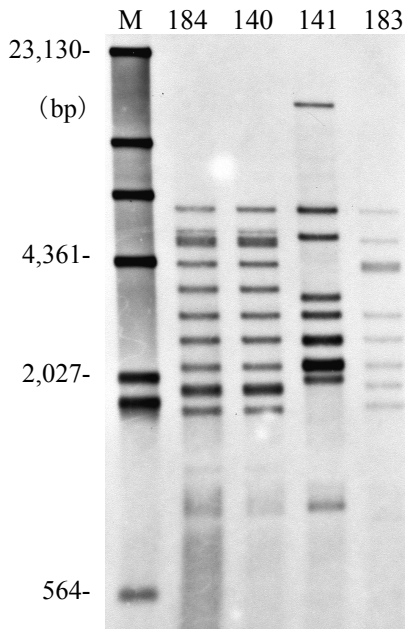


図2 関連調査事例2 (RFLP分析)

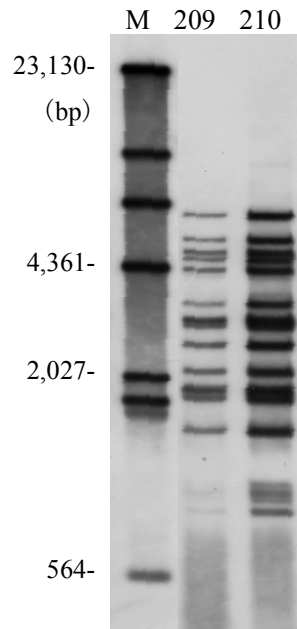


図3 関連調査事例3 (RFLP分析)

3 関連調査事例3

No.209, 210の患者は家族である。

図3および表5に示すとおり、RFLPパターン及びVNTR分析結果が一致し、患者間の感染または同一の感染源からの感染である

4 関連調査事例4

No.166, 168, 182, 189, 197の患者は仕事として共通の職場に出入りしていた。直接の接触が確認されているのはNo.168, 197の患者のみである。また、No.169, 196の患者

表5 関連調査事例3 (VNTR分析)

JATA No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Alias	Mtub 04	MIRU 10	Mtub 21	Mtub 24	QUB 11b	VNTR 2372	MIRU 26	QUB 15	MIRU 31	QUB 3336	QUB 26	QUB 4156
Locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156
No.209	3	3	3	4	6	3	7	5	5	7	2	5
No.210	3	3	3	4	6	3	7	5	5	7	2	5

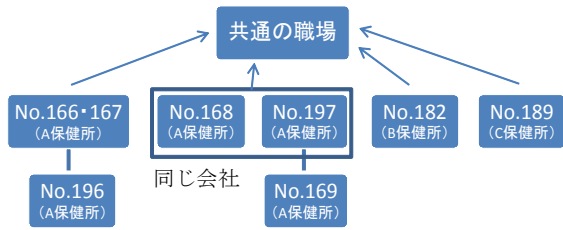


図4 関連調査事例4の相関図

はそれぞれ、No.197, 166 の患者の家族である。この事例の相関図を図4に示した。2011年度に搬入された菌株はNo.182, 189, 196, 197である。No.166, 167については同一人物から分離された結核菌株であり、2010年度に搬入され、報告している⁵⁾。同じくNo.168, 169についても、2010年度に関連調査の依頼があり、RFLP及びVNTRの分析結果が一致していたことを報告している⁵⁾。

図5および表6に示すとおり、RFLPパターンはすべての株が一致し、VNTR分析結果についても、No.189のみ1カ所異なるがほぼ一致した。なお、確認のためにVNTR分析領域を3カ所追加してJATA15とし、さらに高頻度変異領域も追加して、計6カ所の分析を新たに行った。その結果、すべての株が一致した。よって、これらの株は患者間の感染または同一の感染源からの感染であることが明らかとなった。

この事例については複数の保健所から菌株が搬入されていたため、異なる保健所間の菌株情報・関連性等はわかっていなかった。今回の結果は、分子疫学的調査の有用性を改めて示したものと考える。今後の接触者調査等

に役立てられる事を期待したい。

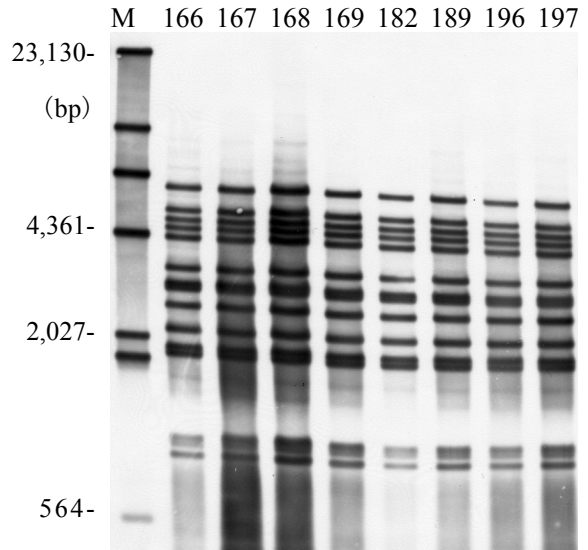


図5 関連調査事例4 (RFLP分析)

5 関連調査事例5

No.190, 208, 211の患者は同じ時期に同じ収容所にいた。まずNo.190の患者が発症し、その接触者検診実施中(約3ヶ月後)にNo.211の患者が発症した。No.208の患者は接触者検診の対象ではなかったが、No.211の患者の約1ヶ月後に発症している。

結果を図6および表7に示す。RFLPパターンはNo.208, 211については完全に一致したが、No.190とNo.208, 211とでは2~3本異なっていた。VNTR分析結果についてはすべて一致した。なお、確認のために、事例4と同じようにVNTR分析領域を6カ所追加して分析を行った。その結果、すべての株が

表6 関連調査事例4 (VNTR分析)

JATA No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Alias	Mtub 04	MIRU 10	Mtub 21	Mtub 24	QUB 11b	VNTR 2372	MIRU 26	QUB 15	MIRU 31	QUB 3336	QUB 26	QUB 4156
Locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156
No.166	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.167	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.168	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.169	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.182	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.189	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	4
No.196	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.197	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5

表7 関連調査事例5 (VNTR分析)

JATA No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Alias	Mtub 04	MIRU 10	Mtub 21	Mtub 24	QUB 11b	VNTR 2372	MIRU 26	QUB 15	MIRU 31	QUB 3336	QUB 26	QUB 4156
Locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156
No.190	4	1	3	2	6	4	7	4	6	7	8	5
No.208	4	1	3	2	6	4	7	4	6	7	8	5
No.211	4	1	3	2	6	4	7	4	6	7	8	5

一致した。通常、RFLP 分析では 2 本バンド以上異なる場合は別株と判定される³⁾が、この事例では疫学的関連が明白であり、VNTR 分析結果は完全に一致していることから、患者間の感染または同一の感染源からの感染であると判断するべきと考える。

RFLP 分析は工程が繁雑で、かつ、画像データであるため、それぞれの菌株の DNA 量や泳動条件等によりパターン of 現れ方が変化する場合や、パターン of 判読に熟練と経験を要する場合がある。今回の事例では濃いバンドは概ね一致しているものの、薄いバンドの判定に苦慮した。バンドの濃さについては、「個々のコロニーに分離した結核菌の RFLP 解析を行うと、おのおの少しずつ異なった RFLP パターンをもつ結核菌が存在し、そして菌株全体の RFLP パターンは、その中に含まれる個々の結核菌の RFLP パターンの重なりである。バンドが濃い場合は、そのバンドを持つ結核菌の数が多いことを表し、バンドが薄い場合はそのバンドを持つ結核菌の全体に対する割合が少ないことを表すことが多い。」という考え方⁶⁾もあり、No.190 が No.208, 211 に比べてそのバンドを持つ結核菌の割合が少なかった可能性もある。いずれにしても、RFLP 分析法による判定には限界があり、それを補うためには VNTR 分析法が必要不可欠である事を再確認した事例であった。

6 VNTR分析領域追加事例

2011 年度に搬入された菌株 No.180, 184 の患者は疫学的関連は報告されていない。図 7 および表 8, 9 に示すとおり、RFLP は異なるパターンを示したが、VNTR 分析結果は 1 カ所のみ不一致であった。VNTR 分析において、少なくとも 2~3 カ所以上コピー数が異なる場合は別株と判定すべき、との考えを前

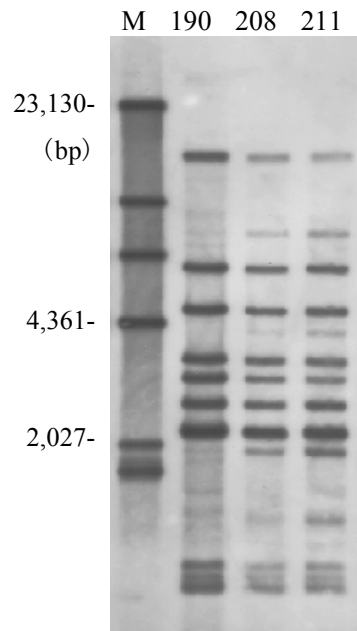


図6 関連調査事例5 (RFLP分析)

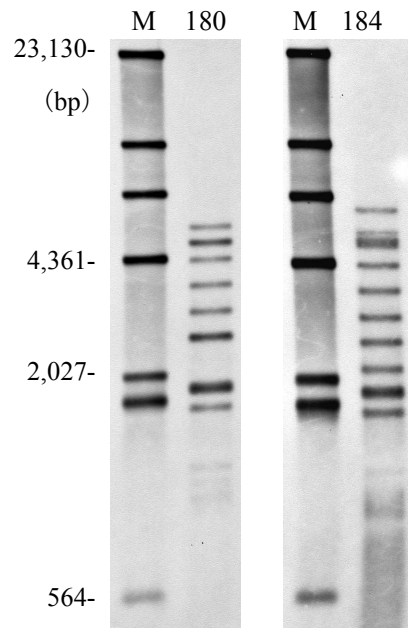


図7 VNTR分析領域追加事例 (RFLP分析)

表8 VNTR分析領域追加事例

JATA No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Alias	Mtub 04	MIRU 10	Mtub 21	Mtub 24	QUB 11b	VNTR 2372	MIRU 26	QUB 15	MIRU 31	QUB 3336	QUB 26	QUB 4156
Locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156
No.180	4	3	4	<u>4</u>	6	3	7	4	5	7	8	3
No.184	4	3	4	<u>3</u>	6	3	7	4	5	7	8	3

表9 VNTR分析領域追加事例（追加領域）

JATA No.	13	14	15
Alias	QUB 18	QUB 11a	ETR A
Locus	1982	2163a	2165
No.180	<u>5</u>	8	<u>5</u>
No.184	8	8	4

田らは報告³⁾しており、この点を踏まえると、No.180, 184 の VNTR 分析結果は一致の可能性が高いといえる。しかし、さらに確認のために分析領域を追加して JATA15 とした結果、2カ所不一致であった。よって、No.180, 184 は VNTR 分析結果においても異なるパターンを示し、それぞれ別の感染源であると推定された。

疫学的関連と分析結果が一致しない場合やさらに確認をしたい場合に、分析領域を増やしてより詳しい分析を進めることができる点は、RFLP 分析にはない VNTR 分析の大きな特徴である。現在 VNTR 分析法は、結核研究所を中心に「全国結核菌分子疫学データベース」構築に向けて、地方衛生研究所での実施が進められており、東北地方では 2008 年度より、宮城県を中心に広域における遺伝子データベースの有効的な活用方法を検討している。その結果、広域サーベイランス分析で VNTR 分析結果を使用する際、より正確に解析するためには、JATA12 から JATA15 へのプライマーの追加が不可欠であるとの報告を受けた。当所は今まで第 1 段階は JATA12 で行っていたが、今後は第 1 段階から JATA15 で行う予定である。加えて、さらに分析が必要となった場合に備え、新たな VNTR 分析領域を揃えて検討を行う必要があると考える。

最後に、2011 年は東日本大震災が起り、それに伴って結核患者数の増加が予想された

が、例年と比較して大きく数値が上がることはなかった。しかし当所に株が搬入された患者の中には、震災復興の激務や避難生活による疲れから発症したと思われる例がいくつかみられ、今後も結核患者数の増加、感染拡大に注意が必要であると思われる。感染拡大の防止には患者の早期発見と共に接触者調査が重要であり、当所の RFLP・VNTR 分析法がその調査の手助けとなるよう努力していきたい。

謝 辞

ご指導いただいた財団法人結核予防会 結核研究所 抗酸菌レファレンス部 結核菌情報科 前田伸司先生を始め、結核菌情報科の皆様へ深謝いたします。

また、疫学情報等の提供をいただいた、県内各保健所の皆様へ深謝いたします。

引用文献

- 1) 高橋光良. RFLP 分析を用いた結核菌の分析疫学. 日本細菌学雑誌 1998 ; 53 : 662-668.
- 2) 高橋光良. 結核分子疫学の成果と展望. 結核 2002 ; 77 : 741-752.
- 3) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他. 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム. 結核 2008 ; 83 : 673-678.
- 4) 須釜久美子, 菅野奈美, 渡邊奈々子, 他. 福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究. 福島県衛生研究所年報 2009 : 52-58.
- 5) 菅野奈美, 千葉一樹, 横山博子, 他. 福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究. 福島県衛生研究所年報 2010 : 43-50.
- 6) 松本智成. 結核菌の分子疫学. 結核 2007 ; 82 : 933-940.