

福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究

小黒祐子 千葉一樹 渡邊奈々子¹⁾ 菅野奈美 二本松久子 佐藤弘子²⁾
微生物課¹⁾ 福島県立総合衛生学院²⁾ 前福島県衛生研究所

要 旨

2012年度は、結核菌42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、RFLP分析と共に有用性が確認できたVNTR分析法について領域を追加し菌株間の比較解析を行った。更に識別を高めるために追加領域の検討を行った。

キーワード：結核菌，VNTR分析，RFLP分析，クラスター形成率，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。

2012年度は、多剤耐性結核菌1株を含む42株について分子疫学的検査を終了し、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212株の菌株情報を用い、関連調査等ならびに菌株間の比較解析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 系統樹解析

RFLPパターンの解析には、解析ソフト BioNumerics (Applied Maths社) を使用し系統樹解析を行った。

4 VNTR分析

前田らの方法³⁾に従い、2012年度は従来の12領域に3領域を追加してJATA(15)-VNTR法で実施した。JATA-VNTR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

2012 年度に医療機関等で同定された結核菌 42 株を用いた。

42 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	29
県中	1
県南	2
会津	5
南会津	0
相双	3
郡山市	0
いわき市	2
計	42

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	0	0	0
20～29	2	1	3
30～39	2	1	3
40～49	3	1	4
50～59	1	0	1
60～69	7	0	7
70～79	6	2	8
80以上	10	6	16
計	31	11	42

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.234, 240, 190, 208, 211 の患者は同

じ施設にいた。No.190 は、2011 年に初発患者として当所に搬入された菌株である。No.211 の患者は初発患者と接触があり、3 ヶ月後の接触者検診実施期間中に発病した。No.208 の患者は初発患者とは接触はなかったが、初発患者の発病 1 ヶ月後に発病した。2012 年に搬入された菌株は No.234, No.240 である。No.234 の患者は No.190, 211 の患者とは接触がなく No.208 の患者とは発症前から接触があった。また、No.240 の患者は No.208 と No.234 と接触があった。No.190, 208, 211 については、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⁾。図 1 および表 3 に示すとおり、No.234, No.240 についても No.190, 208, 211 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。

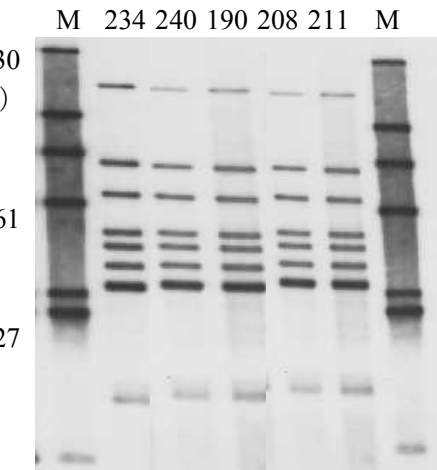


図 1 関連調査事例 1 (RFLP分析)

2 関連調査事例 2

No.233, No.252 は、職場内感染の関連調査で菌株が搬入された。No.233 の患者の職場を含む関連組織においては、2006 年(H18)

表 3 関連調査事例 1

JATA No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
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	QUB 18	QUB11a	ETR A
Locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156	1982	2163a	2165
No.234	4	1	3	2	6	4	7	4	6	7	8	5	4	9	4
No.240	4	1	3	2	6	4	7	4	6	7	8	5	4	9	4
No.190	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	4	9	4
No.208	4	1	3	2	6	4	7	4	6	7	8	5	4	9	4
No.211	4	1	3	2	6	4	7	4	6	7	8	5	4	9	4

表4 関連調査事例2

JATA No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	RFLP パターン	分析結果
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	QUB 18	QUB11a	ETR A		
Locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156	1982	2163a	2165		
No.233	4	1	3	2	7	2	7	4	5	7	8	5	10	9	4	A	A
No.252	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	C	C
No.93	4	1	3	2	7	2	7	4	5	7	8	5	10	9	4	A	A
No.134	4	1	3	2	7	2	7	4	5	7	8	5	10	9	4	A	A
No.138	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	8	5	4	B	B
No.139	4	1	3	2	7	2	7	4	5	7	8	5	10	9	4	A	A
No.166	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	C	C
No.167	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	C	C
No.168	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	C	C
No.169	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	C	C
No.182	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	C	C
No.189	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	4	10	8	4	C	C
No.196	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	C	C
No.197	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	C	C

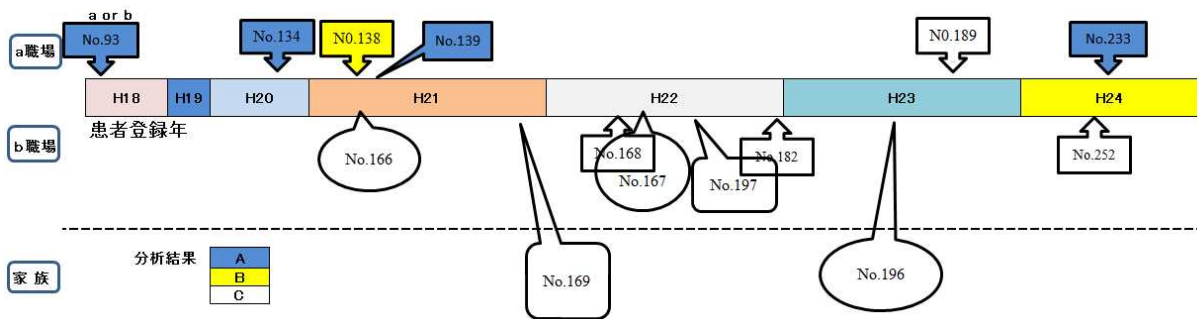


図3 疫学情報による分類と分析結果

に1名、2008年(H20)に1名、2009年(H21)に3名、2010年(H22)に4名、2011年(H23)に1名患者が発生しており、その家族においても感染が見られた。分析結果については年次報告している⁴⁻⁶⁾。図2にRFLPパターンをA、B、Cで示す。今回No.233、No.252と共に分析を行ったNo.138、No.139、No.182は関連組織で発生している3通りのRFLPパターンの代表株である。No.233はNo.139とNo.252はNo.182とパターンが一致した。表4にJATA(15)-VNTRとRFLPパターンの結果を示したが、No.233はNo.139とNo.252はNo.182とVNTR分析においても結果が一致した。よって、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。

また、表4で分析結果をグループ分けしたところ、No.93、No.134、No.139、No.233はA、No.138はB、No.252、No.166、No.167、No.168、No.169、No.182、No.189、No.196、No.197はCであった。

次にRFLP分析検査依頼時に添付される書類の疫学情報を元に疫学情報による分類と分析結果について図3にまとめた。各職場に勤務する者だけではなく出入り業者も含め、また職場間にはつながりがあるため関連組織とした。

パターン A C B A C
M 233 252 138 139 182

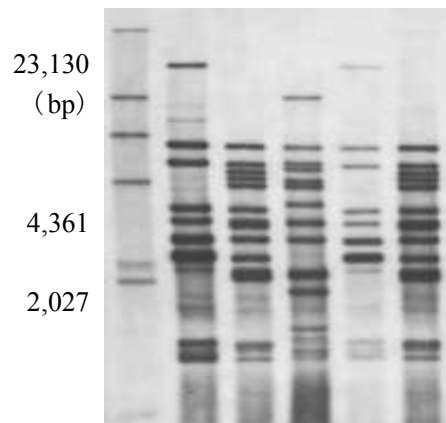


図2 関連調査事例2 (RFLP分析)

表5 関連調査事例3

JATA No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
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	QUB 18	QUB11a	ETRA
Locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156	1982	2163a	2165
No.249	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	7	8	3
No.121	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	7	8	3

a 職場に勤務または出入りしたことのあるのは、No.134, No.138, No.139, No.189, No.233 の患者であり、分析結果は A, B, C と様々であった。一方、b 職場に勤務または出入りしたことのあるのは No.166 (No.167 は同人物), No.168, No.182, No.197, No.252 の患者であり分析結果はすべて C であった。また、No.166 (No.167 は同人物) の患者と No.196 の患者、No.197 の患者と No.169 の患者はそれぞれ家族であり、分析結果は b 職場同様 C であり、b 職場が感染源である可能性が高いと推測される。

3 関連調査事例3

No.249 の患者は、2008 年に集団感染事例の初発患者 No.121 と同じ職場で勤務していた。2009 年の接触者健診、2011 年の健診においても異常は認められなかったが、2012 年 12 月に症状が発現し、喀痰検査において陽性となった。

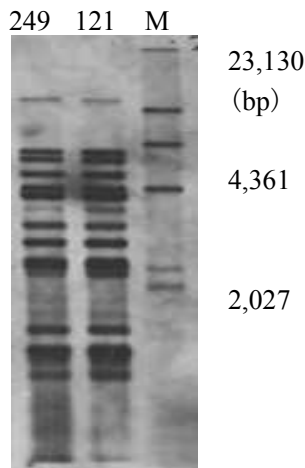


図4 関連調査事例3 (RFLP分析)

図4に示すとおり RFLP パターンは一致し、表5のVNTR分析においても一致し、同一の感染源であることが明らかになった。

4 VNTR分析について

2012 年は、当所保存菌株 236 株について菌株間の比較を行った。比較解析は、衛生微生物技術協議会 結核菌レファレンスセンター北海道・東北・新潟支部が開催した「結核菌分子疫学情報データベースの構築」の講習会の中で示された方法で行った。

JATA (12)-VNTR 法による菌株間の比較では、149 パターンに分類され、40 クラスタを形成しクラスタ形成率 53.8 %であった。最大クラスタは 13 菌株から形成されていた。一方3領域 (QUB18, QUB11a, ETRA) を追加した JATA (15)-VNTR 法においては、166 パターンに分類され、34 クラスタを形成しクラスタ形成率 44.1 %であった。最大クラスタは 12 菌株から形成されていた。3 領域を追加したことでクラスタ形成率が 9.7 %下がったことは、識別能の向上がみられたと評価出来る。

前田ら³⁾は全国から収集した 325 菌株について JATA (12)-VNTR 法で分析した結果、クラスタ形成率は 12.6 %と報告している。クラスタ形成率は菌株の収集条件に大きく左右され一概に評価することは出来ない。当所に搬入される菌株は、院内感染・集団発生疑いを含む関連調査での依頼が主であり、福島県内で分離された菌株であることを考慮すると JATA (12)-VNTR 法 53.8 %, JATA (15)-VNTR 法 44.1 %のクラスタ形成率は妥当であると考ええる。

次に JATA (15)-VNTR 法で分析した結果、最大クラスタを形成した 12 菌株の内訳は、関連調査事例2の関連組織内で発生した患者由来株 7 株と関連のない 5 株であった。この 5 株について識別するためにさらに領域を追加して VNTR 分析を行った。追加の領域は 9 領域 (Mtub30, MIRU40, MTUB39, MIRU16, MIRU4, ETRC, 3232, 3820, 4120) であ

る。前者の6領域は比較的安定領域であり、後者3領域は高頻度変異領域である。

表6に追加領域におけるVNTR分析結果を示した。最大クラスターの中で関連7株と関連のない5株は追加領域によって識別が可能となった。しかし、No.96, No.98, No.159, No.230は高頻度変異領域のみでの相違であり、今後は領域の特徴を把握した上で追加領域の検討が必要である。

永井ら⁷⁾は、JATA(15)領域にMIRU16, Mtub30, 39を加えた18領域の解析では、25領域と同じクラスター形成率(8.9%)を示し、18領域の解析は25領域と同等の識別能を有する可能性があると報告している。

VNTR分析法はRFLP分析法と異なり、領域を追加することで識別能を向上させることができる。また少量のDNAでも分析可能であり、迅速性も優れている等多くの利点がある。特に結果をデジタルデータで保存できることはデータベースを構築して県境をこえた広域における有効活用が可能となる。

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情報データベース」の構築に向けて地方衛生研究所での実施を進めている。東北地方においては、宮城県を中心にJATA(15)-VNTR法による分析結果で広域における遺伝子データベースの有効活用を検討している。

今後、データベースを充実させることにより科学的根拠の付与したより精度の高い解析が可能となり、福島県における結核対策の推進に大きく役立つものと考えられる。

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には深謝いたします。

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には深謝いたします。

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)渡邊奈々子, 千葉一樹, 菅野奈美, 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 2011; 42-47.
- 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)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.
- 7)永井佑樹, 坂井隆. 三重県におけるVNTR法を用いた結核菌の分子疫学解析. Kekkaku 2012; 87(3)

表6 追加領域におけるVNTR分析結果

Alias	Mtub30	MIRU40	Mtub39	MIRU16	MIRU4	ETR C	3232	3820	4120
Locus	2401	0802	3690	1644	580	0577	3232	3820	4120
関連7菌株	4	3	3	4	2	4	10	14	5
No.50	4	4	3	4	2	4	9	12	11
No.96	4	3	3	4	2	4	10	12	11
No.98	4	3	3	4	2	4	12	12	12
No.159	4	3	3	4	2	4	8	12	11
No.230	4	3	3	4	2	4	9	12	9