

## 福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究 —結核菌の RFLP 法による分子疫学的解析—

須釜久美子 小澤奈美 渡邊奈々子 小黒祐子 大竹俊秀  
微生物グループ

### 要 旨

2002年4月から2008年3月までに搬入された結核菌100株を用いて系統樹解析を実施した。その結果、2事例において、疫学的関連が報告されていなかった患者由来株間で高い相同性がみられた。同一の条件で改めてRFLP分析を実施した結果、2事例ともにRFLPパターンが一致した。

キーワード：結核菌，RFLP分析，系統樹解析，疫学情報

### はじめに

福島県内で発生した結核について、科学的根拠を付与された結核対策の立案に資することを目的として、2002年4月より結核菌の Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析による分子疫学的調査研究事業を実施している。

結核菌株が搬入されたのは2003年からであり、2008年3月までに100株が搬入された。それらの菌株のRFLP分析パターンについて解析ソフトを用いて系統樹解析を実施した。その結果高い相同性を示した菌株に、改めて同一条件でRFLP分析を実施した。系統樹解析の結果及びRFLPの再分析結果について報告する。

### 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を集菌し、リゾチーム処理後、DNA抽出キットISOPLANT(ニッポンジーン)を用いて行った。また、DNA抽出はバイオセーフティレベル3の施設内でクラスII Bの安全キャビネットを使用して行った。

#### 2 RFLP分析

高橋の方法<sup>1,2)</sup>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、ナイロンメンブレンへのトラン

スファー、UV固定を行い、次いで65℃4時間のプレハイブリダイゼーション後、プローブDNAを加え、65℃15時間の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、ハイブリダイゼーション後のメンブレンを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン液と室温で20分間反応後、化学発光物質を加え、X線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分析パターンの解析には、解析ソフトBioNumerics(Applied Math社)を使用し系統樹解析をした。解析条件は、Jaccardの計算式で各菌株間の近似度を計算し、UPGMA(Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages)方式によるクラスター分析によって系統樹を作成した。

相同性の高いものについて、同一条件でRFLP分析を実施した。

### 材 料

医療機関等で結核菌と同定された100株を用いた。保健所管内別菌株搬入数を表1に示

表1 保健所管内別菌株搬入数

保健所名	菌株数
県北	41
県中	6
県南	2
会津	26
南会津	3
相双	16
郡山市	4
いわき市	2
計	100

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	3	4
20～29	6	6	12
30～39	7	1	8
40～49	4	3	7
50～59	14	2	16
60～69	6	2	8
70～79	12	8	20
80以上	13	12	25
計	63	37	100

す。また、対象とした100株の患者の年齢階級別および男女別菌株数を表2に示す。

なお、100株中1株は結核菌として搬入されたが *Mycobacterium avium* であり、他の1株は結核菌であることは確認できたが、水滴状のコロニーのため RFLP 分析ができなかった<sup>3)</sup>。その結果、今回の系統樹解析の対象は98株である。

### 結果

図1に結核菌98株の系統樹解析による RFLP パターンの相同性の比較を示した。

図2は系統樹解析により、疫学的関連が報告されていなかった患者由来株間でクラスターを形成した事例である。その事例について、同一条件で RFLP 分析を実施した結果を図3に示した。RFLP パターンは一致した。

図4は系統樹解析により、疫学的関連が報告されていなかった患者由来株 (No.5) と集団感染患者由来株 (No.31, No.33, No.34,

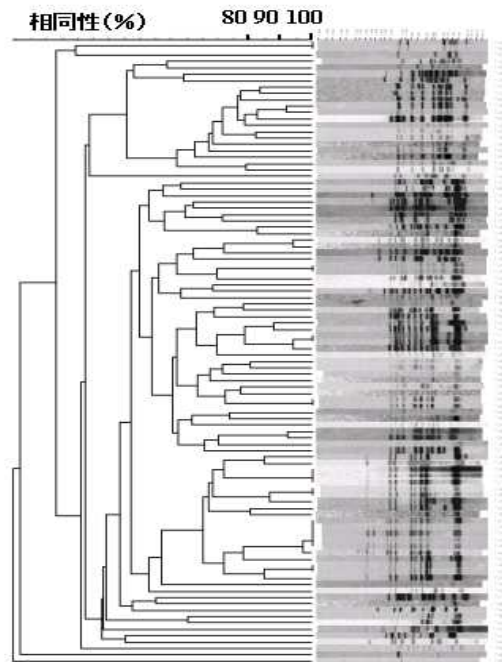


図1 RFLPパターンの相同性の比較

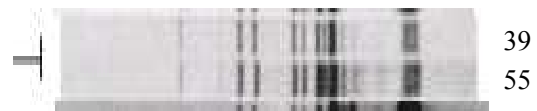


図2 クラスター形成事例

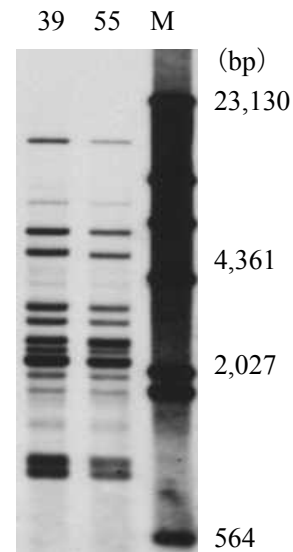


図3 同一条件でのRFLP分析



図4 クラスタ形成事例

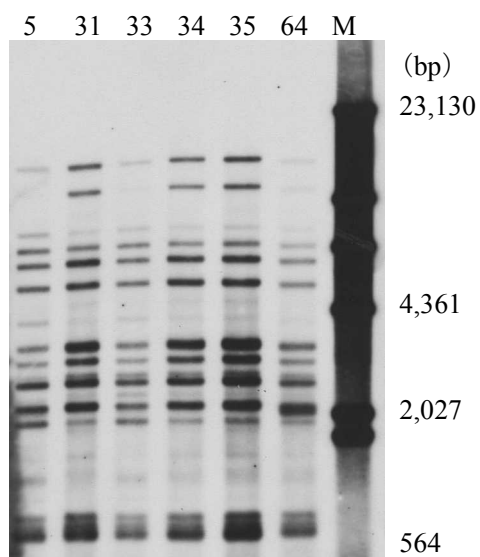


図5 同一条件でのRFLP分析

No.35, No.64) がクラスタを形成した事例である。それらの事例について、同一条件で RFLP 分析を実施した。結果を図 5 に示した。

No.5 は No.31, No.33, No.34, No.35 の RFLP パターンと一致し、No.64 は他の菌株と RFLP パターンが 97% 一致した。

### 考 察

図 2 に示した No.39 の菌株は 2004 年に搬入され、その約 1 年後に No.55 の菌株が異なる保健所から搬入された。患者間に疫学的関連はない。図 3 に示すように、同一条件で実施した RFLP パターンが一致したことから、患者間の感染か患者間に共通の感染源となった潜在的患者がいることが推測される。

図 4 の No.31, No.33, No.34, No.35, No.64 は集団感染事例である<sup>3)</sup>。No.64 の患者は他の患者の約 1 年半後に登録されている。No.64 は他の集団感染由来株と 97% の同一性があ

り、疫学的関連があった点を考慮すると、同一由来株と言える。

No.5 は集団感染と異なる保健所管内で発生しており、集団感染の初発患者の約 1 年前に登録されている。系統樹解析で No.5 は集団感染由来株とクラスタを形成した点を考慮すると、No.5 の患者と集団感染のいずれかの患者は、患者間に接触があったか他に共通の感染源となった潜在的患者がいることが推測される。

以上の結果から、今後、菌株および菌株情報のデータベースを充実させることにより、結核菌 RFLP 分析の有用性がさらに高まると考えられる。

最後に、疫学情報等の提供をいただいた、県内各保健所の皆様に深謝いたします。

### 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) 須釜久美子, 平澤恭子, 熊谷奈々子, 他. 福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究—結核菌の RFLP 法による分子疫学的解析—. 福島県衛生研究所年報 2005: 43-46.