

福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究

須釜久美子 菅野奈美 渡邊奈々子 小黒祐子 大竹俊秀
微生物課

要 旨

2009年度は結核菌 21 株が当所に搬入された。結核菌の分子疫学検査に従来実施していた PRLP 分析法に加えて新たに VNTR 分析法を導入した。2009 年度に搬入された結核菌 21 株について分子疫学検査を実施した。それらの結果及び遺伝子情報 (PFLP 分析法) の系統樹解析から患者間の感染の関連性を明らかにし得た。

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を導入している。

2009 年度は、多剤耐性結核菌 1 株を含む結核菌 21 株について分子疫学検査を実施した。その結果を報告する。また、データベースとして当所に保存してある 134 株の菌株情報を用い、関連調査として RFLP 分析を実施した菌株について VNTR 分析を実施した。

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^{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 Biotinylated 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 Math 社) を使用し、系統樹解析をした。

4 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。

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

材 料

2009 年度に医療機関等で同定された結核菌 21 株を用いた。

21 株の保健所管内別搬入数を表 1 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	9
県中	3
県南	0
会津	0
南会津	0
相双	7
郡山市	0
いわき市	2
計	21

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	1	3	4
30～39	2	2	4
40～49	2	2	4
50～59	3	1	4
60～69	0	0	0
70～79	1	1	2
80以上	2	1	3
計	11	10	21

対象とした 21 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。

結果及び考察

患者間の関連調査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。

図 1 および表 3 は職場内感染とその関連調

査事例である。No.93, No.134, No.138, No.139 の患者は同じ職場に勤務していた。No.93 の菌株は 2006 年度に、No.134 の菌株は 2008 年度に、No.138 および No.139 の菌株は 2009 年度に搬入された。No.134 の菌株は他の菌株と異なる保健所から搬入された。図 1 に示すとおり、No.93, No.134, No.139 の RFLP パターンが一致した。また表 3 に示すとおり No.93, No.134, No.139 の VNTR 分析結果のプロファイルも一致した。この結果から、No.93, No.134, No.139 は、患者間の感染か同一の感染源からの感染であることが明らかになった。しかし、図 1 の No.138 は、他の 3 株とは異なる RFLP パターンを示し、表 3 の VNTR 分析結果も、他の 3 株とは 12 カ所のうち 6 カ所のコピー数が異なり、感染源が異なることが明らかとなった。

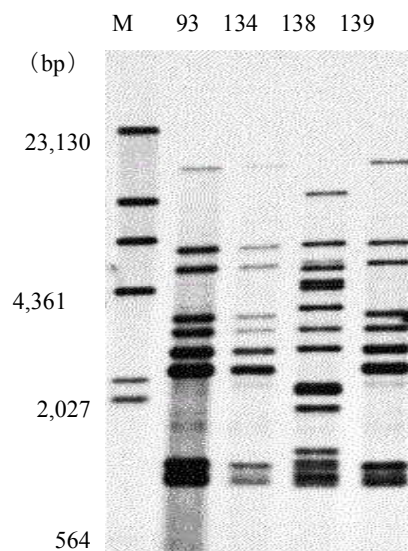


図 1 職場内感染とその関連調査

表 3 職場内感染とその関連調査

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.93	4	1	3	2	7	2	7	4	5	7	8	5
No.134	4	1	3	2	7	2	7	4	5	7	8	5
No.138	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3
No.139	4	1	3	2	7	2	7	4	5	7	8	5

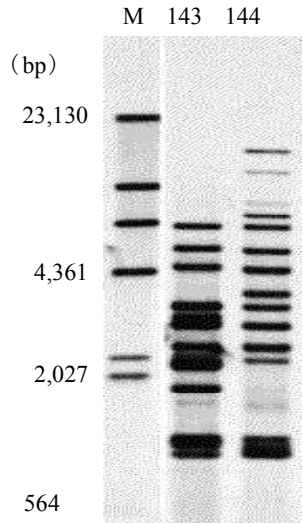


図2 関連調査

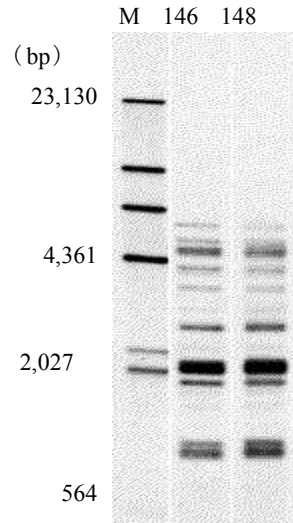


図3 家族内感染

図2および表4のNo.143とNo.144の患者は同じ医療機関に入院していた。図2に示すとおり、異なるRFLPパターンを示した。また、表4に示すとおり、VNTR分析も12カ所のうち5カ所のコピー数が異なり、感染源が異なることが明らかになった。

図3および表5は家族内感染事例である。図3に示すとおり、RFLPパターンが一致した。また、表5に示すとおりVNTR分析結果も一致し、家族内感染が明らかになった。

表4 関連調査

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.143	4	3	3	3	7	3	7	4	6	7	8	5
No.144	4	1	3	2	6	4	7	4	4	7	8	5

表5 家族内感染

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.146	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3
No.148	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3

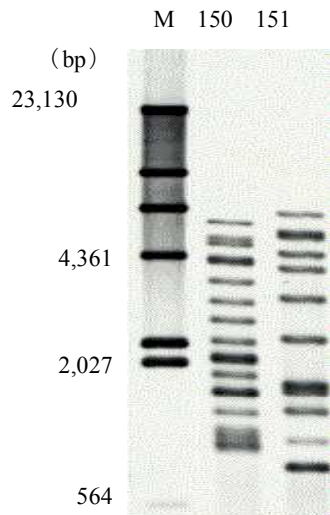


図4 関連調査

図4および表6のNo.150とNo.151の患者は同一国からの外国人研修生である。同じ研修場所で同時期に登録されている。図4に示すとおり異なるRFLPパターンを示し、表6のVNTR分析も10カ所が異なり、感染源が異なることが明らかになった。

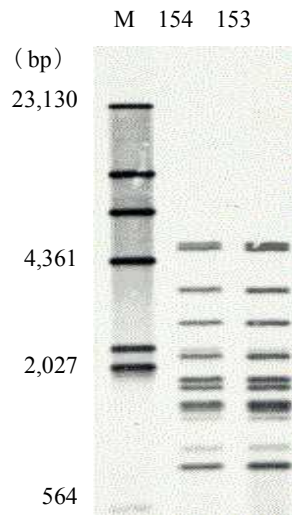


図5 関連調査

図5および表7のNo.154とNo.153の患者は同じ医療機関に勤務しており、No.153の患者が登録された2ヶ月後にNo.154の患者が登録されている。RFLPパターンおよびVNTR分析結果が一致し、患者間の感染が同一の感染源からの感染であることが明らかになった。

表6 関連調査

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.150	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3
No.151	3	2	0	2	7	2	5	4	3	11	7	3

表7 関連調査

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.154	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

図 6 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, No.35, No.64) がクラスターを形成した事例である。この事例の詳細は 2007 年に報告した⁴⁾。

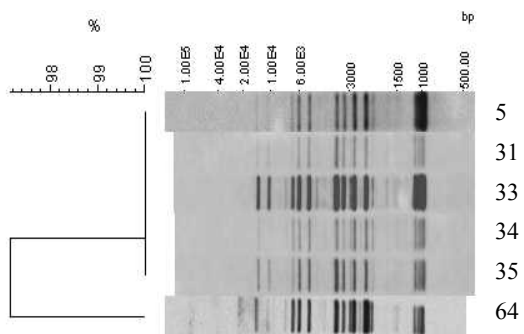


図 6 クラスター形成事例

これら 6 株の VNTR 分析結果を表 8 に示す。No.31, No.33, No.34, No.35, No.64 は、12 カ所のプロファイルが全て一致した。No.5 は他の 5 株と 3 カ所が異なった。

前田らは、VNTR 分析において何カ所コピー数が異なれば別株と判定すべきかの明確な基準は明らかにされていない³⁾と述べ、少なくとも 2 ~ 3 カ所以上コピー数が異なる場合、別株と判定すべき考えを報告している³⁾。表 8 に示すとおり、No.5 は他の 5 株と別の遺伝子を持った株であることが明らかになった。No.5 の患者は、No.31, No.33, No.34, No.35, No.64 の集団感染患者と疫学的関連が報告されていなかったが、RFLP 分析では同一の感染源と推定されていた。今回、VNTR 分析を実施したことにより、疫学調査の結果と同様に別の感染であることが明らかになり、RFLP

分析の限界と VNTR 分析の有用性が示されたと考える。

表 9 に、関連調査事例の RFLP 分析と VNTR 分析結果を示した。各事例の詳細は、2004 年⁵⁾、2005 年⁶⁾、2006 年⁷⁾、2007 年⁴⁾、2008 年⁸⁾に報告した。事例 11 と事例 12 を除く他の事例は、RFLP パターンが同じものは VNTR 分析のプロファイルも一致し、RFLP パターンが異なるものは VNTR 分析のプロファイルも異なった。ただし、事例 13 は RFLP パターンが 3 本異なったのに対し、VNTR 分析結果は 1 カ所のみが異なっていた。事例 13 については、別のローカスを追加する必要があると考えられる。事例 11 は RFLP 分析の系統樹解析により、クラスターを形成した事例である。患者間の疫学的関連は報告されていない。VNTR 分析結果は 2 カ所が異なり、別の遺伝子を持った株であることが明らかになった。事例 12 は RFLP パターンが一本異なり、同一系統の菌株と考えられた事例である。患者間の疫学的関連が報告されている。VNTR 分析結果は、12 カ所のプロファイルが全て一致した。これらのことから、表 9 に示した事例についても、RFLP 分析の限界と VNTR 分析の有用性が示されたと考える。

今回 JATA (12)-VNTR 法で実施し、その識別能が高いことが明らかになった。しかし、地域内で分離した結核菌の全数分析をする場合は、さらに別のローカスを加える検討が必要と考えられる。

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い

表 8 クラスター形成事例

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.5	4	1	3	2	7	4	6	4	5	7	8	5
No.31	4	1	3	2	6	2	7	4	5	7	8	5
No.33	4	1	3	2	6	2	7	4	5	7	8	5
No.34	4	1	3	2	6	2	7	4	5	7	8	5
No.35	4	1	3	2	6	2	7	4	5	7	8	5
No.64	4	1	3	2	6	2	7	4	5	7	8	5

表9 関連調査事例の VNTR 分析と RFLP 分析

	JATA No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	RFLP パターン
事例 1	No.1	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5	同じ
	No.19	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	
	No.91	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	
事例 2	No.2	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	同じ
	No.17	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	
事例 3	No.26	4	1	3	2	7	4	7	4	5	5	8	5	同じ
	No.27	4	1	3	2	7	4	7	4	5	5	8	5	
事例 4	No.28	2	10	2	1	2	1	1	2	2	5	7	4	同じ
	No.29	2	10	2	1	2	1	1	2	2	5	7	4	
事例 5	No.100	4	3	3	3	3	2	7	4	5	7	8	4	同じ
	No.103	4	3	3	3	3	2	7	4	5	7	8	4	
	No.113	4	3	3	3	3	2	7	4	5	7	8	4	
事例 6	No.104	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	同じ
	No.105	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	
事例 7	No.108	2	3	1	3	4	2	4	3	3	12	5	3	同じ
	No.109	2	3	1	3	4	2	4	3	3	12	5	3	
事例 8	No.114	4	1	4	2	6	2	7	4	5	7	8	5	同じ
	No.115	4	1	4	2	6	2	7	4	5	7	8	5	
事例 9	No.133	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	同じ
	No.121	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	
	No.123	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	
	No.126	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	
	No.127	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	
事例 10	No.30	4	3	3	3	3	3	8	4	5	7	7	4	T-30とT-42は同じ。 T-45は異なる。
	No.42	4	3	3	3	3	3	8	4	5	7	7	4	
	No.45	4	3	3	3	3	3	7	4	5	5	7	4	
事例 11	No.39	4	1	3	2	6	4	7	4	5	4	8	5	同じ
	No.55	4	1	3	2	6	4	8	4	5	4	9	5	
事例 12	No.48	4	3	3	3	7	4	7	4	5	7	8	5	一本異なる
	No.52	4	3	3	3	7	4	7	4	5	7	8	5	
事例 13	No.89	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	3	3	異なる
	No.90	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	4	3	
事例 14	No.107	4	3	3	3	3	3	7	4	5	4	9	5	異なる
	No.116	2	5	3	1	2	3	1	2	3	13	8	4	
	No.117	4	3	4	3	4	3	6	4	5	8	8	5	
事例 15	No.118	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	異なる
	No.110	4	1	3	2	5	4	7	4	5	7	7	5	
事例 16	No.41	2	2	1	3	4	2	5	4	2	10	4	3	異なる
	No.120	2	3	3	3	2	3	3	2	5	6	7	2	
事例 17	No.122	3	3	3	3	5	3	7	2	4	15	9	4	異なる
	No.124	4	3	4	3	5	3	9	4	5	7	6	3	
事例 17	No.125	3	3	2	1	2	3	1	2	3	13	8	4	異なる

る。現在その技術の精査および標準化が図られており、今後さらに改良されていくものと思われる

結核菌の菌株情報と分子疫学情報のデータベースを充実させることにより、結核菌分子疫学調査の有用性がさらに高まり、福島県における結核対策に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。

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) 須釜久美子, 小澤奈美, 渡邊奈々子, 他. 福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究—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 2007 : 43-45.
- 5) 須釜久美子, 平澤恭子, 熊谷奈々子, 他. 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 2004 : 38-42.
- 6) 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.
- 7) 須釜久美子, 小澤奈美, 渡邊奈々子, 他. 福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究—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 2006 : 40-42.
- 8) 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 2007 : 57-62.