

福島県内の結核菌分子疫学的調査研究の発展  
(2016年度の解析から)

菅野奈美 菊地理慧 二本松久子<sup>1)</sup> 熊田裕子 風間秀元  
微生物課 <sup>1)</sup> 前衛生研究所

要 旨

2002 年度から 2016 年度までに搬入された全結核菌株 460 株について、高頻度変異領域 (3232, 3820, 4120) の分析をキャピラリー電気泳動シークエンサーを用いたフラグメント解析で実施した。アガロースゲル電気泳動のコピー数と比較した結果、アガロースゲル電気泳動では確定不能のコピー数がフラグメント解析では全て明確になった。今後 24 領域による広域的解析に有用なデータベースとなり、近隣県のみならず全国的な結核菌分子疫学解析に活用可能となる。

キーワード：結核菌，VNTR 分析法，フラグメント解析

はじめに

2002 年度から 2007 年度まで結核菌の 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きた。

2008 年度からは Variable numbers of tandem repeats (以下，“VNTR”とする。) 分析法を導入し、2013 年度以降は VNTR 分析法に絞り実施してきた。

2015 年度からはキャピラリー電気泳動シークエンサー (以下，“CES”とする。) 法によるフラグメント解析を構築している。

2016 年度は結核菌 70 株について VNTR を実施し、高頻度変異領域においてはアガロースゲル電気泳動法で得たコピー数を CES 法によるフラグメント解析結果と比較した。さらに、データベースとして当所に保存してある 390 株の菌株情報を用い、分子疫学解析を行った。

材 料

2016 年度に当所に搬入された結核菌 70 株を用いた。

70 株の保健所別搬入数を表 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 結核菌の保健所別搬入数

保健所名	菌株数
県北	27
県中	6
県南	1
会津	9
南会津	0
相双	6
郡山市	0
いわき市	21
計	70

表 2 患者年齢階級別および男女別菌株数

年齢階級	男	女	総数
0～19	1	1	2
20～29	0	0	0
30～39	5	6	11
40～49	4	4	8
50～59	5	2	7
60～69	6	4	10
70～79	6	3	9
80以上	15	8	23
計	42	28	70

方 法

1 DNA抽出

結核菌からの DNA 抽出はバイオセーフテ

イレベル 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。菌株を超純水に懸濁後 95 °C 10 分の加熱処理にて DNA を抽出した。

## 2 VNTR分析

JATA (15) -VNTR 法，国際標準領域 (Mtub30, MIRU40, Mtub39, MIRU16, MIRU4, ETR C) 及び高頻度変異領域 (3232, 3820, 4120) の計 24 領域を実施し，ローカスの増幅は，抽出 DNA を PCR 法により前田ら<sup>1)</sup>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，換算表を用いてコピー数に換算した。分子量が大きくコピー数の換算が確定不能だった場合は「>20」と表記した。

精度管理株は，*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv を用いた。

過去に搬入された結核菌株との比較解析は，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」の講習会で示された解析システムで実施した。

## 3 フラグメント解析

片側に蛍光標識したプライマーにて PCR を実施した。PCR 産物を超純水で希釈後，HiDi formamide 及び LIZ 1200 マーカーを事前に分注しておいた 96 穴プレートへ添加した。95 °C 3 分間のヒートショック後に氷上で急冷し，CES で泳動した結果を GeneMapper ソフトウェア (Ver.5) を用いてコピー数を解析した。

### 結果及び考察

70 株の JATA (15) -VNTR 分析結果を表 3 に示す。関連調査事例の結果及び考察は，家族内感染以外の事例について以下にまとめる。

#### 1 関連調査事例 1

No.397 と No.408 は商業施設の職員と利用客の結核菌株である。No.397 の利用客が結核を発症した後に，No.408 の職員が発症し

た。2 株は 23 領域一致し，疫学調査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可能性が高いことが明らかとなった。

商業施設における結核感染については，規模や商業内容により利用客が不特定多数の場合と会員制等で特定可能の場合がある。この事例の場合は常連客であったため，VNTR 依頼時に既に保健所で関連性を導き出していた。しかし，利用客が不特定多数の場合は依頼前に関連が特定できない場合も多いため，VNTR 分析により一致した場合は再度疫学調査を実施し，関連の有無を確認する必要があると思われる。

なお，データベースとの比較解析では，一致する株は認められなかった。

#### 2 関連調査事例 2

No.411, No.412, No.413 および No.414 は初発患者 No.411 の結核患者と同じ事業所の作業員 3 名の菌株である。1 名は初発患者と 23 領域一致し，2 名は 24 領域一致したため，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。他に潜在性結核感染症 (以下，“LTBI”とする。) が 4 人確認され，厚生労働省が報告を求める結核集団感染の定義に該当する事例となった。

データベースとの比較解析では，一致する株は認められなかった。

#### 3 関連調査事例 3

No.422 は過去に搬入された No.317 と No.389 (No.422 患者の両親で 2 株は一致)<sup>2)</sup>の菌株と比較するため搬入された菌株であり，No.422 の患者にはフィリピンでの居住歴があった。結果は一致せず別株であった。No.317 と No.389 の 2 株は INH と RFP に感受性の株だったが，No.422 の菌株は INH と RFP に耐性の MDR-TB であった。このため，北京株・非北京株の分類を行い，JATA (15) -VNTR データベースと照合し，Minimum spanning tree (以下，“MST”とする。) 解析を実施した。結果を図 1 に示す。3 株はフィリピン出身結核患者に多く見られるグループに属する非北京株であったため，No.422 の患者はフィリピンでの結核感染後，日本で発

表3 VNTR分析結果

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	QUB18	QUB11a	ETR A
Locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156	1982	2163a	2165
No.392	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4
No.393	2	2	2	2	-	2	8	4	2	10	7	3	3	>20	3
No.394	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	9	9	4
No.395	3	3	3	3	3	3	8	4	5	7	8	4	10	8	3
No.396	3	3	>20	3	5	3	3	4	5	7	9	5	9	8	4
No.397	5	1	3	2	7	4	7	4	4	7	8	5	9	9	4
No.398	4	3	4	3	6	3	8	4	5	7	7	3	3	8	4
No.399	4	3	3	3	7	5	7	4	5	7	8	5	10	8	4
No.400	4	3	4	3	7	3	7	4	4	7	7	5	10	8	4
No.401	4	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5	10	8	4
No.402	4	1	3	2	7	2	6	4	5	7	8	6	6	9	4
No.403	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4
No.404	4	3	4	3	7	3	7	4	4	7	8	5	10	8	4
No.405	3	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4
No.406	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.407	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.408	6	1	3	2	7	4	7	4	4	7	8	5	9	9	4
No.409	4	4	3	3	2	3	7	4	2	7	7	4	10	8	4
No.410	2	3	1	3	4	2	5	4	3	13	3	3	5	1	2
No.411	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	9	8	4
No.412	4	3	5	3	7	3	7	4	5	7	8	5	9	8	4
No.413	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	9	8	4
No.414	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	9	8	4
No.415	4	1	3	2	7	6	6	3	5	7	8	5	10	9	4
No.416	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	13	8	4
No.417	2	4	1	4	4	3	4	3	3	8	8	4	8	6	3
No.418	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4
No.419	4	3	4	3	5	3	7	4	5	9	8	3	8	5	4
No.420	4	1	3	2	6	2	7	4	5	7	8,7	5	10	9	4
No.421	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	7	7	4
No.422	1	4	6	3	9	1	2	4	4	6	7	2	8	12	4
No.423	2	5	2	1	2	3	1	2	2	13	8	4	5	7	3
No.424	4	1	3	2	6	2	7	4	5	7	8	5	9	9	4
No.425	1	4	14	3	7	1	2	4	4	7	7	2	10	11	4
No.426	4	3	3	3	3	5	7	4	5	7	9	4	14	8	4
No.427	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3	8	8	4
No.428	4	2	3	3	6	3	7	4	4	7	8	5	8	>20	4
No.429	2	5	2	1	2	2	1	2	3	9	8	5	7	7	3
No.430	3	3	3	4	6	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.431	5	5	2	3	2	4	3	4	6	10	8	5	8	9	4
No.432	5	5	2	3	2	4	3	4	6	10	8	5	8	9	4
No.433	2	3	2	3	6	3	7	2	5	11	8	4	9	11	4
No.434	3	3	3	4	1	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.435	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	9	4	14	8	4
No.436	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	9	4	14	8	4
No.437	2	5	2	1	2	3	1	2	4	13	8	4	7	7	3
No.438	2	2	2	3	-	2	5	4	3	11	6	1	3	>20	3
No.439	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	3	3	4	2	3
No.440	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4	10	8	4
No.441	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	9	4	14	8	4
No.442	1	3	1	3	4	2	5	4	4	10	3	3	5	2	3
No.443	5	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5	7	8	4
No.444	4	1	3	2	6	4	7	4	5	4	8	5	10	7	4
No.445	2	3	1	3	3	2	5	4	3	12	3	3	5	2	3
No.446	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4
No.447	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	10	5	11	5	4
No.448	2	3	5	3	6	3	8	4	5	7	8	3	8	8	4
No.449	2	3	3	3	-	3	8	4	6	7	8	4	9	>20	-

No.450	4	3	1	2	7	3	6	4	5	7	10	5	10	5	4
No.451	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	6	2	13	8	4
No.452	1	4	13	3	7	1	2	4	4	7	7	2	10	11	-
No.453	2	3	3	3	3	3	9	2	5	10	7	4	7	8	4
No.454	3	3	3	3	4	4	6	2	5	10	8	4	7	8	4
No.455	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	7	8	4
No.456	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	9	4	14	8	4
No.457	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	9	4	14	8	4
No.458	4	1	5	2	6	6	7	4	5	7	8	5	10	7	-
No.459	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.460	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4	10	8	4
No.461	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4

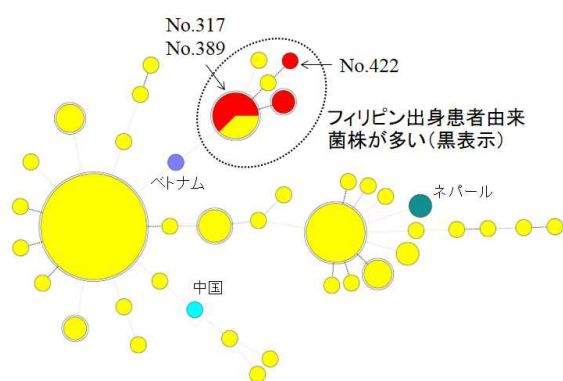


図1 関連調査事例3のMST解析結果

症した可能性が推定された。

今回、VNTRを実施したことにより、家族内感染とは別の新たな感染経路の存在を明確にし、系統の分類およびMST解析との組み合わせから国外での感染を導き出せる可能性を示した。

#### 4 関連調査事例4

No.435, No.436, No.441, No.456, No.457の患者菌株は同じ施設の職員と入所者である。5株は24領域で一致し、患者間の感染または同一の感染源からの感染である可能性が高いことが明らかとなった。調査により入所者1名と職員6名が発病、入所者2名と職員4名のLTBIが明らかとなり、厚生労働省が報告を求める結核集団感染の定義に該当する事例となった。

#### 5 散発患者株のVNTR比較解析

No.429は散発患者株として搬入されたが、2015年度に関連調査事例で報告<sup>2)</sup>したNo.339, No.340と23領域一致した。No.339, No.340は、No.429が週2回通所する医療機

関のスタッフであり、関連性が認められる。ただし、医療機関内での感染か否かは不明である。

No.430は散発患者株として搬入されたが、データベース内に23領域で一致した菌株が認められ、2011年度<sup>3)</sup>および2012年度<sup>4)</sup>に報告した職場内で発生した集団感染事例の関連株であった。当該保健所に疫学調査の再確認をしたところ、No.430の患者親族が集団感染により結核を発病（No.197）していたことが明らかとなった。No.197の患者発症からNo.430の患者発症まで約6年が経過しているが、VNTRの実施により感染経路が推定された。

#### 6 フラグメント解析

VNTR分析精度及び解析効率向上のため、2015年度からCES法を用いたフラグメント解析の構築を実施し、JATA(15)-VNTRを含む24領域の解析が可能となった。

コピー数換算が困難な高頻度変異領域の3領域については2014年度から2016年度までに搬入された結核菌株167株について再解析し、アガロースゲル電気泳動によるデータベース値と比較した。その結果、アガロースゲル電気泳動ではコピー数が確定不能でバンドの位置で一致・不一致を判断していた菌株が3232領域では22株(13.2%)、3820領域では15株(9.0%)、4120領域では12株(7.2%)存在したが、フラグメント解析では全て明確になった。この結果より、2002年度搬入の菌株まで遡りフラグメント解析を実施し、コピー数が確定不能であった菌株を含め全結核菌株440株のコピー数を確認した。得られた結果を用いてデータベースを更新し、

今まで JATA (15) -VNTR で運用していた解析システムを 24 領域で運用可能にした。なお、フラグメント解析においても、1,500bp を超える PCR 産物については、解析が困難であることから、コピー数「>20」は今後とも使用することとした。

現在他県との VNTR 比較解析においては、全国的に何領域比較すべきか明瞭なルールはなく、JATA (12) -VNTR を最小領域とし各自治体で実施してる VNTR により、比較可能な領域数が決まる。2014 年度および 2016 年度に関連調査事例で他県との VNTR 比較解析を実施しているが、自治体によって比較可能な領域数に差がみられた。当県においては、過去の調査研究から JATA (15) -VNTR で関連性を判断できた事例や、24 領域を必要とした事例まで幅広く解析してきた経験を活かし、今後 24 領域による解析を継続していくべきであると考え。さらに、今回のデータベースの更新により、今後 24 領域における全国との広域的解析の正確性と迅速性が高まるものと思われる。

### 謝 辞

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) 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.
- 2) 菅野奈美, 菊地理慧, 二本松久子, 他. 福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究の発展 (2015 年度の解析から). 福島県衛生研究所年報 2015 ; 63 - 67.
- 3) 渡邊奈々子, 千葉一樹, 菅野奈美, 他. 福島県内の結核菌分子疫学的調査研究. 福島県衛生研究所年報 2011 ; 42 - 47.
- 4) 小黒祐子, 渡邊奈々子, 千葉一樹, 他. 福島県内の結核菌分子疫学的調査研究. 福島県衛生研究所年報 2012 ; 48 - 52.