

福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究（2013年度）

菅野奈美 千葉一樹 菊地理慧 二本松久子 小黒祐子 吉田学
微生物課

要 旨

2013年度は結核菌 19 株が当所に搬入された。今年度からは、検査法を VNTR 分析法に絞って実施し、結果をデータベースに蓄積した。

VNTR 分析法によって患者間及び過去の事例との関連性を明らかにすることができた。

キーワード：結核菌，VNTR 分析法

はじめに

2002 年度から 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）分析法を導入している。

2013 年度は VNTR 分析法に絞り、結核菌 19 株について分子疫学的検査を実施した。また、データベースとして当所に保存してある 254 株の菌株情報を用い、比較解析を実施したので報告する。

方 法

1 結核菌から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 VNTR分析

JATA(15)-VNTR 法で実施し、ローカスの増幅は、抽出 DNA を PCR 法により前田ら¹⁾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。

JATA15 で一致または 1 カ所異なる結果となった場合は、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）（以下“追加領域”とする）を追加し分析した。

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方法で実施した。

材 料

2013 年度に医療機関等で同定された結核菌 19 株を用いた。

19 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	8
県中	0
県南	1
会津	4
南会津	0
相双	0
郡山市	0
いわき市	6
計	19

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
10～19	0	0	0
20～29	0	0	0
30～39	0	0	0
40～49	2	2	4
50～59	1	0	1
60～69	5	0	5
70～79	0	2	2
80以上	5	2	7
計	13	6	19

結果

19株のVNTR分析結果を表3に示す。

1 関連調査事例1

No.261とNo.262は初発患者と接触者検診で発見された看護師の菌株である。JATA15の結果は全て一致し、追加領域においても一致した。この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ことが明らかになった。

データベースとの比較解析では、JATA15で一致株が1株、1カ所異なる株が4株あった。一致した菌株は疫学調査において関連は認められなかったが、追加領域においても完全に一致したため、該当保健所に連絡した。

JATA15で1カ所異なった株は追加領域でさらに3～4カ所異なり、評価は不一致となった。

2 関連調査事例2

No.268とNo.269は初発患者とその義父の菌株である。JATA15の結果は全て一致し、追加領域においても一致した。この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ことが明らかになった。

データベースとの比較解析では、JATA15で1カ所異なる株が2012年度搬入菌株の中に1株あったが、追加領域で3カ所異なり、評価は不一致となった。

3 関連調査事例3

No.270とNo.271は同じ医療機関に入院中に結核が発覚した患者の菌株である。初発患者が結核を発症し転院後、二人目の患者が入院し結核を発症しているため、関連性が無いことを確認する目的で菌株が搬入された。JATA15で8カ所異なる結果となり、別の株であることは明らかで、No.271は結核の既往歴もあることから再燃による発症の可能性が考えられた。

データベースとの比較解析では、No.270(感受性株)と追加領域においても一致する株

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.256	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	7	4	10	8	2
No.257	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	4	4
No.258	3	3	3	4	7	4	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.259	4	3	4	3	5	3	7	4	5	5	8	3	8	20	4
No.260	2	2	2	4	3	2	5	4	3	7	8	3	5	20	3
No.261	4	1	3	2	7	5	7	4	5	7	7	5	10	9	4
No.262	4	1	3	2	7	5	7	4	5	7	7	5	10	9	4
No.263	4	3	3	3	3	2	7	3	5	8	8	4	11	8	4
No.264	4	1	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5	10	8	4
No.265	4	3	3	3	3	3	7	4	2	4	6	4	10	8	4
No.266	2	3	1	3	4	2	4	4	3	13	5	3	5	2	3
No.267	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4
No.268	3	3	3	4	4	3	7	5	5	7	2	5	8	8	4
No.269	3	3	3	4	4	3	7	5	5	7	2	5	8	8	4
No.270	4	1	3	2	5	4	7	4	5	7	8	5	10	7	4
No.271	4	3	5	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4
No.272	4	3	4	4	6	3	6	5	5	6	9	3	5	8	4
No.273	4	1	3	2	5	4	7	4	5	7	8	5	8	9	4
No.274	2	3	1	4	2	2	5	4	3	11	5	3	5	4	2

(2012 年度に同じ保健所管内から搬入された多剤耐性結核菌株)があり、他に JATA15 で 1 カ所異なり、追加領域で 1 カ所異なった株が 2 株あったが、疫学情報からは関連がなく、総合して不一致と推定した。

No.271 のデータベースとの比較解析では、別の関連調査事例²⁾の 2 株が JATA15 で 1 カ所異なったが、追加領域で 4 カ所異なり、不一致となった。

4 関連調査事例 4

No.272 と No.273 は過去の関連調査²⁻⁴⁾で搬入された菌株との比較のため搬入された。

No.272, No.273 共に過去に搬入された株と JATA15 で 8 ～ 9 カ所異なり不一致となった。No.272 はデータベースとの比較で JATA15 で一致する株があったが、追加領域で 2 カ所異なり、疫学情報からも関連がみられなかった。しかし、2 カ所異なった追加領域は高頻度変異領域であったため、変異も考慮し“不一致”と断定せず“不一致と推定”とした。No.273 はデータベースで一致する株はなかった。

5 関連調査事例 5

No.263 と No.274 は友人関係にあり、No.263 の患者が結核を発症した 2011 年に No.274 は接触時期があった。なお、No.263 の菌株は感受性株であるが、No.274 の菌株は多剤耐性株で患者は血痰などの自覚症状を有してから約半年後に結核で死亡している。JATA15 の結果 13 カ所異なり、別株であることが明らかとなった。

データベースとの比較解析では、No.263 は 2008 年度に家族内感染事例で搬入された菌株と一致したが、追加領域において 3 カ所異なり、疫学関連もないことから不一致とした。No.271 の多剤耐性結核菌はデータベースで一致する株はなかった。

6 散発患者株

No.256 の患者は介護老人保健施設に入所中に発症したため、今後、関係者で発症者が出た際の基礎データとする目的で搬入された。現在の JATA15 データベースとの比較解

析では、2006 年度搬入の 1 株と一致し、2012 年度搬入の 1 株と 1 カ所異なった。追加領域の結果、2006 年度の菌株とは 3 カ所、2012 年度の菌株とは 2 カ所異なり、疫学関連もないことから不一致と推定した。

No.257 の患者は発病していると思われる時期に、訪問介護、デイサービス、通院等により接触者が多いことから、No.256 と同じ目的で搬入された菌株である。2009 年度、2011 年度に搬入された関連調査事例の 2 株と JATA15 で 1 カ所のみ異なったため、追加領域を実施した結果、3 カ所異なり不一致となった。

No.258 の患者は医療機関に入院中に結核を発症している。JATA15 で 13 株からなるクラスターと一致し、さらに 4 株と 1 カ所異なる結果となった。追加領域では、完全一致した株が 1 株あり、他は高頻度変異領域で 1 ～ 2 カ所異なった。疫学関連があれば一致と推定される結果であるが、すべての菌株の疫学調査を一つ一つ確認しても関連するものはなく、現段階では不一致と推定した。

No.259 は医療機関で長期療養中に発症し、結核と診断されるまでに時間がかかった患者の株である。データベースで一致する株はなかった。

No.260 の患者は特別養護老人ホームに入居中に発病し、スタッフや同室者との接触があるため搬入された。JATA15 で 2005 年度の株と一致し、追加領域では高頻度変異領域で 2 カ所異なる結果となった。疫学関連があれば一致と推定される菌株であるが、疫学関連はなく、現段階では不一致と推定した。

No.264 は肺炎疑いで入院となり、その後結核と診断され、家族や病棟スタッフと接触があるため搬入された患者菌株である。JATA15 で 1 カ所異なる株が 2012 年度に 1 株あり、追加領域の結果、3 カ所異なり不一致と推定された。

No.265 も入院後、結核と診断されるまで時間が経過し、家族や病棟スタッフと接触があるため搬入された患者菌株である。データベースで一致する株はなかった。

No.266 の患者は自宅ではぼ寝たきりの状態で、ADA 高値のため結核と診断され、約 1

ヶ月後に塗抹陽性となった。JATA15 で 2006 年度に 1 カ所異なる株があったが、追加領域で 3 カ所異なり不一致となった。

No.267 の患者は除染作業のため、震災後に兵庫県から南相馬市、仙台市、二本松市の順に移動しながら短期生活を送っていた。結核の既往歴あり。JATA15 で 4 株と 1 クラスター (2 株) と一致し、12 株と 1 クラスター (3 株) で 1 カ所異なる結果となった。追加領域でほとんどが 2 カ所から 4 カ所異なる結果となった。現在、疫学調査で関連が認められる株はない。

考 察

2011 年の東日本大震災後、震災被害による仮設住宅生活に加え、原子力発電所の放射能漏れによる避難生活で住民が県内外に移動した。さらに復興支援、除染作業等で県外から大勢の人が出入りし、震災前には無かった新たなコミュニティが確立している。日々の避難生活における心身の疲労の蓄積や復興支援の激務の中で、結核に感染し発症した患者や再燃と思われるケースがあった。今後も疫学情報の重要性は益々高まり、特に行動範囲が広域だった患者や接触者が多い患者の場合、発病前の行動範囲をどれだけ綿密に情報収集できるかが、感染ルート発見の要である。また、他県との VNTR 分析データの比較解析が結核感染対策の大きな一助になるものと思われる。

結核レファレンスセンター北海道・東北・新潟ブロックでは、2012 年に宮城県、山形県、福島県で JATA15 による試行的比較解析を実施し、一致するパターンが複数あることが明らかとなった。さらに、ブロック内の結核菌遺伝子情報の共有化に向け、宮城県を中心にシステムを構築中である。これにより、近隣県との比較解析が可能になるため、広域的結核対策の飛躍に貢献できると考える。

2013 年度からは VNTR 分析法に絞り、今年度搬入株を含めた 273 株のデータを用いて

解析を実施した。RFLP 分析法では苦慮していた全データを用いての比較解析が容易になり、疫学調査だけでは見えてこなかった散発患者の新たな感染ルート発見に期待が高まった。しかし、今年度搬入された菌株の患者は、5 割近くが 70 歳以上の高齢者で、結核の発症は再燃の可能性が高く、今後の発症者出現時の初発患者データとしての情報蓄積が中心となった。

現在は疫学調査を基に、関連があると思われる株や、今後感染が拡大する恐れがある株が主に搬入されている。今後は、さらなる結核対策の推進のために、散発発症した結核患者も含め、より多くの結核菌株を収集し、データベースに蓄積することが必要である。長期的にデータをとり続けることで、地域特有の株群や、感染拡大が進行している株群、さらには既往歴のある患者の再燃か否かを判断する有益な情報となり、疫学情報と照合することで感染ルートの早期発見及び解明に役立つものと考えられる。

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) 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.
- 3) 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.
- 4) 小黒祐子, 千葉一樹, 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 2012 ; 48-52.