

福島県内の結核菌の分子疫学的調査研究

菅野奈美 千葉一樹 横山博子 小黒祐子 須釜久美子¹⁾ 佐藤弘子
微生物課 ¹⁾ 県中支所

要 旨

2010年度は結核菌 21 株が当所に搬入された。昨年同様、RFLP 分析による結核菌の分子疫学検査に VNTR 分析法を加えて実施し、データベースに新たな遺伝子情報の蓄積を行った。

今回の検査では、RFLP 分析の系統樹解析から RFLP 分析法の限界と VNTR 分析法の有用性が示唆されると同時に、従来の疫学調査と結核菌分子疫学調査との総合的な解析が非常に重要であることをあらためて実感した。また、検討課題として各 VNTR 領域のコピー数換算における精度管理や、VNTR の追加領域解析の必要性などが明らかとなった。

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。

2010 年度は、結核菌 21 株について分子疫学的検査を実施した。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 156 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 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。

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

材 料

2010 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。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	6
県中	2
県南	0
会津	2
南会津	0
相双	7
郡山市	0
いわき市	4
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	0	0	0
30～39	1	1	2
40～49	5	2	7
50～59	3	0	3
60～69	2	0	2
70～79	1	1	2
80以上	4	1	5
計	16	5	21

結果及び考察

RFLP 分析および VNTR 分析による患者間の関連調査の結果を図 1～7 および表 3～9 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 は医療機関内の関連調査事例である。No.157 と No.159 の患者は結核と診断される前に同じ医療機関に入院していた。No.157 の菌株は 2009 年度に依頼があり、2010 年度に搬入された。図 1 に示すとおり、No.157 と No.159 の RFLP は異なるパターンを示した。また表 3 に示すとおり VNTR 分析結果のプロファイルも異なるパターンを示した。この結果から、No.157 と No.159 は、感染源が異なることが明らかになった。しかし、同室患者及び看護職等の接触者もいるため、今後の感染拡大に注意が必要である。

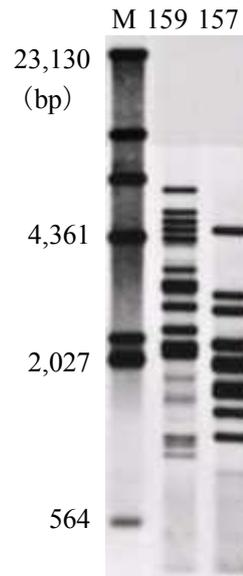


図 1 関連調査 (RFLP分析)

表3 関連調査(VNTR分析)

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.157	1	4	9	3	8	1	2	4	4	7	7	2
No.159	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5

図2 および表4のNo.147, No.163 およびNo.177の患者は以前同じ職場の同僚であった。なお, No.147は2009年度に搬入された菌株である。No.163の患者は2010年に, No.177の患者は2011年に結核と診断された。図2に示すとおり, RFLPパターンは一致した。また, 表4に示すとおり, VNTR分析も一致し, 職場内感染であったことが明らかになった。

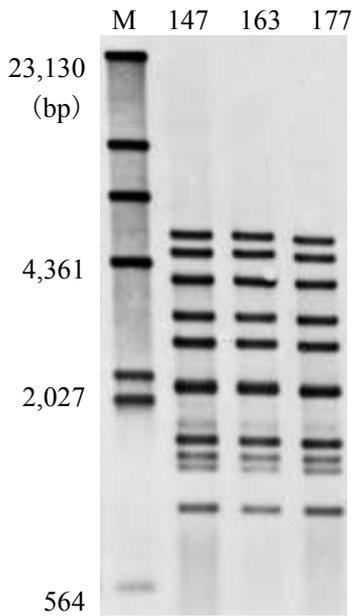


図2 関連調査 (RFLP分析)

図3 および表5のNo.166とNo.167は同一人物から分離された結核菌株である。初発は平成21年3月に登録され, 平成22年5月に再登録された。再燃か再感染の確認と, 感染経路の探求等の目的で検査依頼された。図3に示すとおり, RFLPパターンは一致した。また, 表5に示すとおり, VNTR分析も一致し, 再燃であったことが明らかになった。

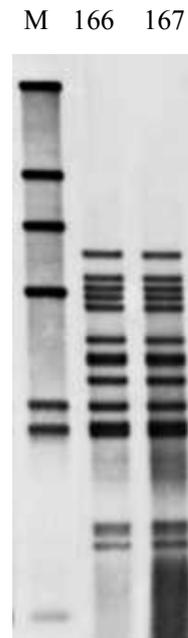


図3 関連調査 (RFLP分析)

表4 関連調査 (VNTR分析)

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.147	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4
No.163	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4
No.177	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4

表5 関連調査 (VNTR分析)

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.166	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.167	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5

図4および表6のNo.168とNo.169の患者は初発患者(No.168)とその同僚の妻(No.169)である。なお、No.169の夫もQuanti FERON TB-2G(QFT)陽性、胸部レントゲンで結核性陰影がある。また、No.169の義理の弟が結核患者として2008年に登録されている。図4に示すとおりRFLPパターンは一致した。表6のVNTR分析も一致し、同一の感染源であることが明らかになった。

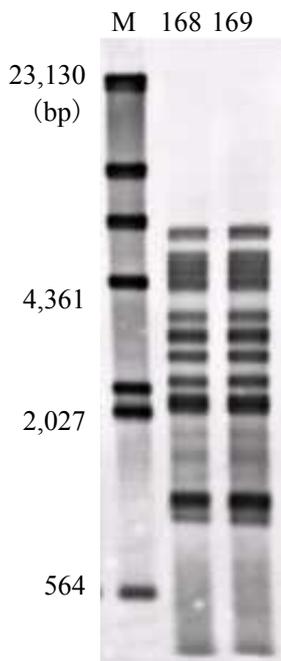


図4 関連調査 (RFLP分析)

図5および表7のNo.170とNo.171の患者は肺炎疑いで医療機関に入院していた患者と、患者を担当していた看護師である。図5に示すとおりRFLPパターンは一致した。VNTR分析では1カ所のみ不一致であった。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していないが、少なくとも2~3カ所以上コピー数が異なる場合、別株と判定すべきとの考えを報告³⁾している。この点を踏まえると、No.170とNo.171のVNTR分析も一致の可能性が高いと考えられる。しかし、さらに確認のため高頻度変異領域の

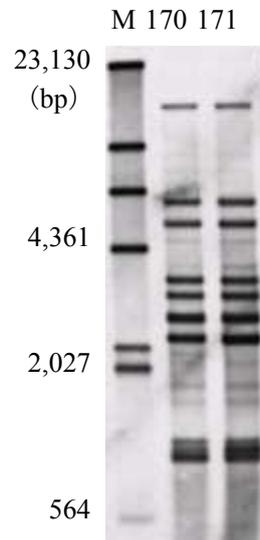


図5 関連調査 (RFLP分析)

表6 関連調査(VNTR分析)

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.168	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.169	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5

表7 関連調査(VNTR分析)

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.170	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5
No.171	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5

VNTR を 4 カ所追加した結果、2 カ所不一致であった。当所で実施した過去の関連調査で、RFLP パターンが一致し、VNTR 分析で 3 カ所不一致となった例はなく、VNTR 分析の精査のため大阪市立環境科学研究所に検査を依頼した。新たに 8 カ所の領域追加して精査した結果、通常あまり変化しない 2 カ所の領域について相違が認められた。疫学情報や RFLP 分析の結果からは同一感染源と思われたが、VNTR 分析の結果から異なる株である可能性が高いことが明らかとなった。

図 6 および表 8 の No.175 と 176 の患者は、肺結核と診断される前に医療機関に入院していた患者と、その患者と同室していた患者である。図 6 に示すとおり RFLP パターンは一致した。表 8 の VNTR 分析も一致し、同一の感染源であることが明らかになった。

図 7 および表 9 の No.174 は 2010 年に届出があった患者で、No.121 は 2008 年に集団感染事例の初発患者である。集団感染事例の株としては No.121 を含め 5 株 (No.121, No.123, No.126, No.127, No.133) 搬入され、RFLP パターンが一致した事を 2008 年に報告し⁴⁾、VNTR 分析結果も一致した事を 2009 年に報告した⁵⁾。図 7 に示すとおり No.174 と No.121 の RFLP パターンは一致した。表 9 に No.174 と集団感染の 5 株の VNTR 分析の結果を示す。VNTR 分析も一致し、同一の感染源であることが明らかになった。

本来、2008 年に集団感染事例として搬入された No.121 を含む 5 株と No.174 の株を同時に RFLP 分析にかけ、解析すべきであったが、保存していた DNA の量が不足しており、唯一 DNA 量が確保できた No.121 と RFLP 分析が実施可能であった。

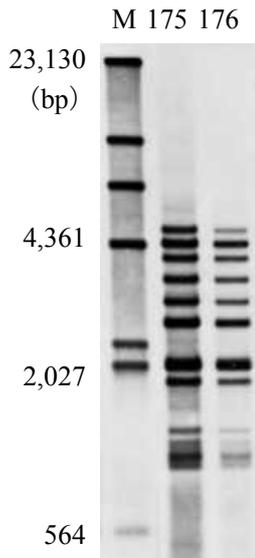


図 6 関連調査 (RFLP分析)

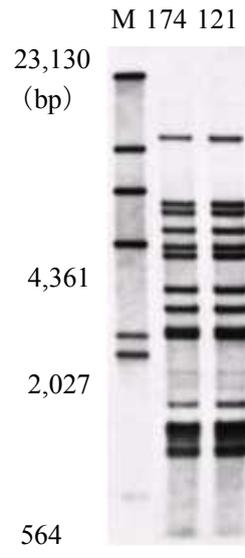


図 7 関連調査 (RFLP分析)

表 8 関連調査 (VNTR分析)

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.175	4	3	4	4	6	3	7	4	5	7	8	3
No.176	4	3	4	4	6	3	7	4	5	7	8	3

表9 関連調査(VNTR分析)

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.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
No.133	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4
No.174	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4

VNTR 分析は、RFLP 分析に比べ DNA の量が少量で済むため、RFLP 分析には不足な量でも十分に検査が可能である。また、コピー数の換算をし、デジタルデータとして保存をしておくことで、いつでも過去のデータと比較することができる。この利点は、検体確保の容易さと迅速な検査が可能であることを示唆しており、RFLP 分析にはない特徴である。

図 8 は系統樹解析により、複数の関連調査で搬入された結核菌がクラスターを形成した事例である。クラスター形成した 8 株のうち、既に VNTA 分析実施済みの表 5 および表 6 に記載した 4 株 (No.166, No.167, No.168, No.169) を除く No.68, No.96, No.98, No.159 の VNTR 分析結果を表 10 に示す。8 株とも

に JATA (12) の領域全てで一致したため、高頻度変異領域を含む 7 カ所の領域を追加解析した。疫学的関連が報告されていない No.68, No.96, No.98, No.159 は 2 ~ 3 カ所で相違が認められた。表 5 の同一患者から分離した No.166, No.167 の結核菌株と、表 6 の No.168, No.169 の菌株は全ての領域で一致したが、No.166, No.167 と No.168, No.169 の関連は報告されていない。

図 9 も系統樹解析により、複数の関連調査で搬入された結核菌株がクラスターを形成した事例である。8 株の VNTR 分析結果を表 11 に示す。各事例の詳細は 2004 年⁶⁾、2006 年⁷⁾、2009 年⁵⁾ に報告した。No.19, No.91, No.171 は全領域で一致した。No.1, No.170 も全領域で一致し、No.19 等とは一カ所のみ異なっ

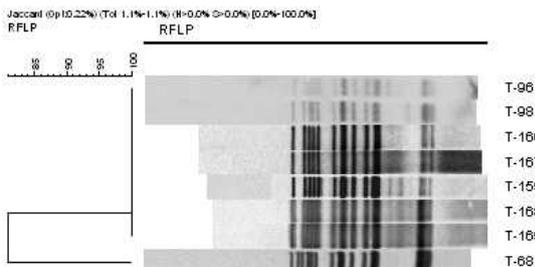


図 8 クラスター形成事例

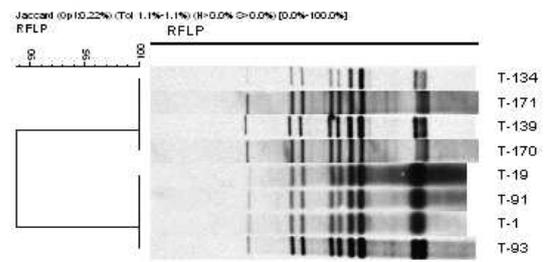


図 9 クラスター形成事例

表 10 クラスター形成事例 (VNTR分析)

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.68	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.96	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.98	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
No.159	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5

表 11 クラスター形成事例 (VNTR分析)

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.1	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5
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
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.139	4	1	3	2	7	2	7	4	5	7	8	5
No.170	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5
No.171	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5

ていた。No.93, No.134, No.139 も全領域で一致し、No.1 等とは異なった一カ所のみで No.19 等と異なっていた。大阪市立環境科学研究所に高頻度変異領域を含む 12 カ所の領域を追加して精査依頼した結果、疫学的関連があった No.19 と No.91 は全て一致した。No.1 とは 1 カ所のみで相違であったが、疫学敵関連は報告されていない。No.93, No.134 および No.139 の結果も疫学情報同様一致していた。表 7 に記載した No.170 と No.171 について追加した領域で、他の菌株とは明らかな相違が認められ、疫学情報と同じ結果であった。

図 10 は系統樹解析により、関連調査として依頼されていなかった患者由来株がクラスターを形成した事例である。

表 12 の VNTR 分析でも結果が一致した。各患者の過去の入院歴等の情報を詳細に調べた結果、3 名とも同じ医療機関で入院時期が重なっていた。また、この医療機関では集団感染の発生事例もあり、何らかの関連性があるものと思われた。今回の 3 例のクラスター形成事例から、従来の疫学調査と、結核菌分子疫学調査との総合的な解析が非常に重要で

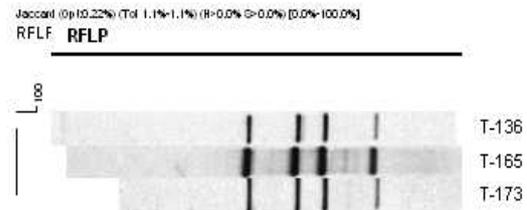


図 10 クラスター形成事例

るものと思われた。

これらのクラスター形成事例の解析結果から、RFLP 分析の限界と VNTR 分析の有用性が示唆された。しかし、当所の VNTR 分析については、JATA (12)-VNTR 分析を実施しているが、JATA (12)-VNTR 分析のみでは判断がつかない事例もあり、詳細な解析を行うための追加領域の検討など、今後の課題があげられた。

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る。東北では宮城県を中心に遺伝子データベースの広域における有効的活用方法を

表 12 クラスター形成事例 (VNTR分析)

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.136	4	4	2	2	3	1	5	4	2	10	4	4
No.165	4	4	2	2	3	1	5	4	2	10	4	4
No.173	4	4	2	2	3	1	5	4	2	10	3/4	4

検討しており、将来的には福島県内での比較だけではなく、近隣の県や全国との比較が可能になるものと思われる。

結核菌分子疫学調査の有用性が高まる中、今後ますます重要となってくるのは、より精度の高い検査である。和田らは多施設間の型別比較では、各 VNTR 領域の反復数換算における精度管理は重要な検討課題であると述べている⁸⁾。VNTR 分析は結果をデジタルデータとして保存できるために、一旦保存したデータを再検査する機会は少なく、誤判定に気づかない場合もある。当所でも誤判定を未然に防ぐための分析法の精度管理を実施しているが、さらに十分な検討を行う必要があると考える。

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、大阪市立環境科学研究所の和田崇之先生に深謝いたします。

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, 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 2008 : 57-62.
- 5) 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
- 6) 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.
- 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) 和田崇之, 長谷篤. 結核菌の縦列反復配列多型 (VNTR) 解析に基づく分子疫学とその展望—大阪市の例—. 結核 2010 ; 85 : 845-852.