

福島県内の結核菌分子疫学的調査研究の発展 (2015年度の解析から)

菅野奈美 菊地理慧 二本松久子 熊田裕子 風間秀元
微生物課

要 旨

2002 年度から 2015 年度までに搬入された全結核菌株について国際標準領域 (Mtub30, MIRU40, Mtub39, MIRU16, MIRU4, ETR C) 及び高頻度変異領域 (3232, 3820, 4120) の VNTR 分析を実施し, JATA(15)-VNTR に加え計 24 領域で実施した結果をデータベースに蓄積した.

さらに, 高頻度変異領域についてはキャピラリー電気泳動シーケンサーを用いたフラグメント解析による VNTR 分析法の構築も実施したので報告する.

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 年度は結核菌 67 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 323 株の菌株情報を用い, 比較解析を実施した.

なお, 現在用いているアガロースゲル電気泳動法では, コピー数換算の際正確に判読するため, PCR 産物を希釈しバンドの幅を最適化しながら, 複数回の泳動によってコピー数の換算を行っている. そこで, 再現性がよく, 数 bp の差を検出することが可能なキャピラリー電気泳動シーケンサー法によるフラグメント解析を構築した.

材 料

2015 年度に当所に搬入された結核菌 67 株を用いた.

67 株の保健所別搬入数を表 1 に示す.

患者年齢階級別及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	20
県中	10
県南	0
会津	21
南会津	7
相双	4
郡山市	2
いわき市	3
計	67

表 2 患者年齢階級別及び男女別菌株数

年齢階級	男	女	総数
0 ~ 19	0	0	0
20 ~ 29	2	2	4
30 ~ 39	0	1	1
40 ~ 49	3	2	5
50 ~ 59	5	1	6
60 ~ 69	4	3	7
70 ~ 79	4	4	8
80 以上	18	18	36
計	36	31	67

方 法

1 DNA抽出

結核菌からの 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 B3 のバイオ

セーフティキャビネットを使用して行った。菌株を滅菌した超純水に懸濁後 95℃ 10 分の加熱処理にて DNA を抽出した。

2 VNTR分析

VNTR 分析は、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。コピー数の換算が不可能だった分子量の場合は「>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方法で実施した。

3 フラグメント解析

VNTR を実施し、既にコピー数が把握できている菌株の DNA を供し、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℃ 3 分間のヒートショック後に氷上で急冷し、キャピラリー電気泳動シークエンサーで泳動した結果を GeneMapper ソフトウェアを用いてコピー数を解析した。

結果及び考察

67 株の JATA(15)-VNTR 分析結果を表 3 に示す。

1 関連調査事例 1

No.328, No.344, No.357 及び No.365 は同じ施設の入所者で、2014 年度に結核患者登録となった同施設内の結核患者菌株 No.323 との関連を調べる目的で依頼された菌株である。5 株は 24 領域の結果全て一致し、患者

間の感染または同一の感染源からの感染であることが明らかとなった。保健所の接触者検診及び VNTR 分析の結果、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。

2 関連調査事例 2

No.338, No.339 及び No.340 は初発患者 No.338 と医療スタッフ 2 名の菌株である。No.339 と No.340 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ことが明らかになったが、初発患者と思われる No.338 の菌株とは JATA(15)-VNTR で 12 領域異なり、同一の感染源ではないことが明らかとなった。医療スタッフの結核については、2010 年度の事例²⁾においても初発患者と担当看護師の関連調査のために結核菌遺伝型別解析を実施しているが、結果は不一致となった。複数の結核患者と接する機会のある医療スタッフの結核関連調査においては、疫学調査だけに留まらず、分離菌株の結核菌遺伝型別解析による科学的根拠に基づいた判断が必要不可欠であると思われる。

データベースとの比較解析では、2 パターンの VNTR 分析結果と一致する株は認められなかった。

3 関連調査事例 3, 4

No.353, No.388 は過去に搬入された各患者本人の菌株との比較のために解析依頼があった。24 領域の結果全て一致したことから、再燃の可能性があると思われる。

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。

4 関連調査事例 5

No.370 は 2014 年 5 月に結核患者登録となった患者家族の結核菌株である。24 領域の結果は全て一致し、患者間の感染または同一の感染源からの感染であることが明らかとなった。

データベースとの比較解析では、高頻度変異領域で 1 カ所異なる株と 2 カ所異なる株が

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.325	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	7	4	10	7	2
No.326	2	3	1	3	2	2	3	4	2	14	4	3	5	2	3
No.327	3	3	3	3	5	3	7	4	3	7	8	3	8	5	4
No.328	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	11	5	10	5	4
No.329	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	9	3	8	8	4
No.330	3	3	3	4	5	3	7	5	5	4	2	5	10	8	4
No.331	4	3	4	3	3	3	7	4	5	7	9	4	13	8	4
No.332	4	3	3	3	3	3	7	4	5	5	7	4	10	>20	2
No.333	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	10	8	4
No.334	4	3	3	3	3	3	5	4	5	4	7	4	10	5	2
No.335	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	9	4	13	>20	4
No.336	2	3	1	3	3	2	5	4	3	13	4	3	5	2	3
No.337	4	3	3	2	-	3	7	4	5	7	10	5	10	>20	-
No.338	1	3	1	3	4	2	4	4	3	12	3	3	5	2	3
No.339	2	5	2	1	2	2	1	2	3	9	8	4	7	7	3
No.340	2	5	2	1	2	2	1	2	3	9	8	4	7	7	3
No.341	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	7	4	10	8	2
No.342	2	3	1	3	2	2	5	4	3	12	5	3	5	2	2
No.343	4	3	4	3	6	3	7	4	5	8	9	3	8	8	4
No.344	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	11	5	10	5	4
No.345	4	1	3	2	5	4	7	2	5	7	8	5	10	>20	4
No.346	1	3	2	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	8	4
No.347	2	5	2	1	2	3	1	2	3	4	3	4	7	7	3
No.348	2	3	2	3	2	4	5	2	2	6	7	3	2	4	2
No.349	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	6	3	5	2	3
No.350	4	8	3	2	8	3	7	4	4	9	8	2	4	9	5
No.351	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	4	9	7	4
No.352	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3	8	8	4
No.353	4	3	3	3	3	3	6	4	5	7	8	4	10	8	4
No.354	4	3	3	3	3	3	7	4	5	11	9	4	14	8	4
No.355	5	3	4	3	6	3	7	4	5	7	6	3	8	8	4
No.356	4	3	4	3	6	3	7,8	4	5	8	9	3	8	8	4
No.357	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	11	5	10	5	4
No.358	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	3	3	5	2	3
No.359	4	1	3	2	6	4	7	4	5	4	8	5	10	7	4
No.360	2	3	3	3	3	4	7	4	2	4	8	4	9	7	4
No.361	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	3	3	5	2	2
No.362	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	14	8	4
No.363	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	3	3	5	2	3
No.364	2	2	2	4	3	2	5	4	3	9	7	3	5	>20	3
No.365	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	11	5	10	5	4
No.366	4	3	4	3	-	5	7	4	5	7	8	3	8	-	-
No.367	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4	10	8	4
No.368	2	3	1	3	4	2	5	5	3	13	5	3	5	4	2
No.369	4	1	3	2	6	2	6	4	5	7	8	5	10	9	4
No.370	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.371	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4
No.372	2	3	1	3	3	2	5	4	3	12	4	3	5	2	3
No.373	2	3	1	3	3	2	5	4	3	13	4	3	5	2	3
No.374	2	3	2	3	2	2	4	4	3	10	10	3	1	3	2
No.375	3	3	3	4	8	3	7	5	5	7	2	5	10	4	4
No.376	2	3	1	2	3	2	3	4	2	14	4	3	5	2	3
No.377	4	1	3	2	7	5	7	4	5	10	8	5	8	9	4
No.378	4	3	4	4	4	3	7	4	5	7	8	3	5	8	4
No.379	3	3	3	3	5	3	7	4	2	4	8	4	10	8	4
No.380	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	10	8	4
No.381	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	4	3	5	2	3
No.382	2	4	2	1	2	3	1	2	3	10	6	6	7	7	3

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.383	2	3	1	3	3	2	4	4	3	8	5	3	5	5	3
No.384	2	5	2	1	2	3	1	2	4	10	8	4	7	7	3
No.385	1	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	8	4
No.386	4	3	3	3	-	3	7	4	5	5	8	4	9	-	-
No.387	3	3	3	3	3	1	7	4	5	7	9	4	13	8	4
No.388	4	3	1	3	3	3	8	4	5	4	8	4	10	8	4
No.389	1	4	9	3	8	1	2	4	4	7	7	2	10	11	4
No.390	4	3	3	3	-	3	7	3	5	7	7	4	10	>20	-
No.391	4	3	3	3	3	3	4	4	2	4	8	4	7	8	4

あったが、それぞれ疫学的関連は認められなかった。

5 関連調査事例 6

No.336 と No.373 は 2015 年 3 月に結核患者登録となった患者とその家族の結核菌株である。24 領域の結果は全て一致し、患者間の感染または同一の感染源からの感染であることが明らかとなった。

データベースとの比較解析では、JATA(15)-VNTR で 1 カ所異なる株があったが、疫学的関連は認められなかった。

6 関連調査事例 7

No.389 は 2014 年度解析した³⁾ No.317 の家族の結核菌株である。24 領域の結果は全て一致し、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.317 の患者と同じフィリピン出身の患者菌株と 23 領域一致した。

7 散発患者株のVNTR比較解析

No.327 は散発患者株として搬入されたが、2011 年度搬入の No.195 と 23 領域で一致し、疫学的関連があれば一致と推定された。2 人の患者は 2011 年の東日本大震災による影響で同じ施設に避難しており、No.195 の患者は避難所で結核を発症していることから関連がある可能性が考えられる。避難所利用時の患者の位置や接触度合いは不明であるが、同性で年齢も近いことから、共同生活の中で同じ空間を共有する機会は少なからずあったと思われる。No.195 の患者の発症から 4 年以

上経過しているが、今後の感染拡大に注意すると同時に、避難所生活を経験した結核患者の菌株は積極的に結核菌遺伝型別解析を実施すべきであると思われる。

さらに、時期は不明であるが共通のデイケア施設を利用していた高齢者 2 人が結核を発症し、VNTR 分析結果が一致した。明らかな関連性は不明であるが、患者間の感染または同一の感染源からの感染による可能性がある。

これらの解析結果により、散発患者の結核菌遺伝型別解析によって、初発と思われる患者以降の感染経路を追うばかりではなく、散発患者同士のつながりと新たな感染経路の把握の可能性が高まる。ただし、遺伝型別一致で安易に患者の結びつけをすることのないよう、地域的に高頻度に出現する VNTR パターンには注意すべきである。このため、感染源調査の精度を高める目的で、より多くの結核菌株の解析を実施し、サーベイランス分析によるデータの蓄積が必要であると考え⁴⁾。

8 データベースの構築

今回、JATA (15) -VNTR のみ実施した過去の保存菌株について 9 領域を追加実施し、データベース化した。これにより、常時 24 領域での比較が可能となり、識別能力の高い解析が実施可能となった。

9 フラグメント解析

VNTR 分析精度及び解析効率向上のため、特にコピー数換算が困難な高頻度変異領域の 3 領域についてフラグメント解析を構築し

た。bin 設定によって換算表を用いない自動アリル(リピート数)コールを可能にし、「2015 年度結核菌遺伝子型別外部精度評価」で結核研究所から配布された、内部精度管理用の DNA を用いてフラグメント解析を実施した。既知のコピー数と実施したアリルコールを比較し一致を確認した。今後、高頻度変異領域の 3 領域については、フラグメント解析による VNTR 分析が可能となったことから、有用性を検討しデータベースの構築を実施する。

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, 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.
- 3) 菅野奈美, 富田望, 菊地理慧, 他. 福島県内の結核菌分子疫学的調査研究の発展(2014 年度の解析から). 福島県衛生研究所年報 2014 ; 79-82.
- 4) 結核菌VNTRハンドブック 追補版(2014年3月編). 地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編