

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

2008年度は結核菌 35 株が当所に搬入された。Restriction fragment length polymorphism (制限酵素断片長多型：RFLP) 分析の結果、いくつかの事例において感染経路について知見を得た。また、Variable numbers of tandem repeats(反復配列多型：VNTR) 分析法を取り入れることで、より精度の高い分析が可能となった。

菌株及び菌株情報のデータベースを活用し、結核菌の分子疫学検査の有用性が示された。

キーワード：結核菌，VNTR 分析，RFLP 分析，系統樹，疫学情報

はじめに

福島県内で発生した結核について、科学的根拠を付与された結核対策の立案に資することを目的として、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、その有用性を示した¹⁾。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実施している。

2008 年度は、結核菌 35 株が搬入され、その多くが関連調査であった。また、RFLP 分析の系統樹解析をした結果、VNTR 分析が必要となり実施した事例があった。それらについて報告する。

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を集菌し、リゾチーム処理後、DNA 抽出キット ISOPLANT(ニッポンジーン) を用いて行った。また、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^{2, 3)}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、UV 固定を行い、次いで 65 °C 4 時間のプレハイブリダイゼーション後、プローブ DNA を加え、65 °C 15 時間の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、メンブレンを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン液と室温で 20 分間反応後、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。解析条件は、Jaccard の計算式で各菌株間の近似度を計算し、UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmeric averages) 方式によるクラスター分析によって系統樹を作成した。

4 VNTR分析

前田らの方法⁴⁾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⁴⁾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⁴⁾を用いてコピー数に換算した。

材 料

2008 年度に医療機関等で同定された結核菌 35 株を用いた。また、データベースとして当所に保存してある 100 株の菌株情報を用いた。なお、1 株は結核菌として搬入されたが、*Mycobacterium avium* であったため、結核菌としてのデータベースは 99 株である。

35 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	15
県中	3
県南	0
会津	11
南会津	2
相双	2
郡山市	1
いわき市	1
計	35

対象とした 35 株の患者の年齢階級および男女別菌株数を表 2 に示す。

表 2 年齢階級および男女別菌株数

年齢階級	男	女	総数
10～19	0	1	1
20～29	0	2	2
30～39	4	1	5
40～49	4	2	6
50～59	4	1	5
60～69	3	1	4
70～79	5	3	8
80以上	2	2	4
計	22	13	35

結果及び考察

1 RFLP分析

患者間の関連調査および集団感染事例とその RFLP パターンを図に示す。なお、図の M は DNA マーカーを示している。

図 1 は家族内感染とその関連調査事例である。レーン No.100 と No.103 の患者は、きわめて接触の少ない家族であり、レーン No.113 の患者はレーン No.100 の患者と接触があった。3 株とも同一の RFLP パターンを示し、患者間の感染か同一の感染源からの感染が明らかになった。

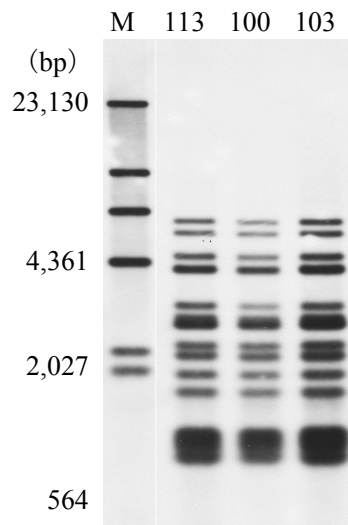


図 1 家族内感染とその関連調査

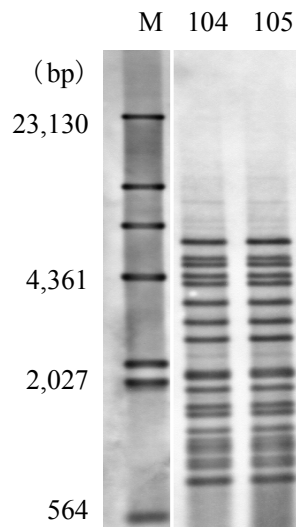


図 2 家族内感染

図 2 は家族内感染事例である。レーン No.104 とレーン No.105 の患者は家族である。分析の結果 RFLP パターンが一致した。

図 3 も家族内感染事例である。レーン No.108 の患者が登録されてから 6 年後にレーン No.109 の患者が登録された。RFLP パターンは一致し、家族内感染が明らかになった。

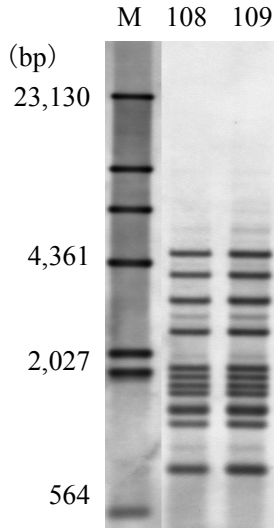


図 3 家族内感染

図 4 のレーン No.110 の患者はレーン No.41 の患者と接触があった。分析の結果、異なる RFLP パターンを示し、感染源が異なることが明らかになった。

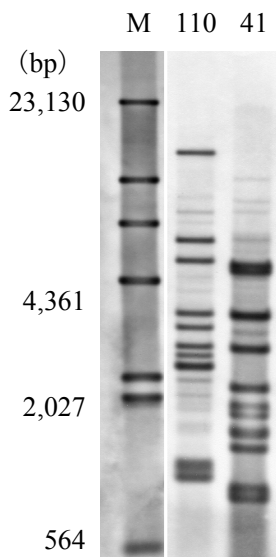


図 4 関連調査

図 5 は家族内感染である。患者の居住地が異なるため、レーン No.114 とレーン No.115 の結核菌株は異なる保健所から搬入された。しかし、RFLP パターンが一致し、家族内感染であることが明らかになった。

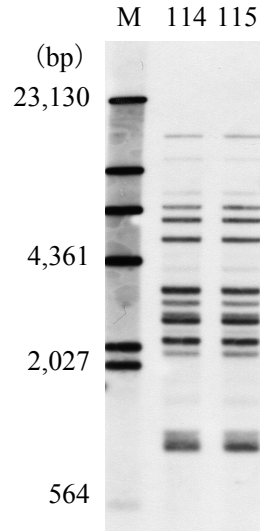


図 5 家族内感染

図 6 のレーン No.116 の患者はレーン No.107 の患者と接触があった。またレーン No.117 の患者はレーン No.116 の患者と接触があった。さらにレーン No.118 の患者はレーン No.116 の患者と接触があった。分析の結果、それぞれが異なる RFLP パターンを示し、感染源が異なることが明らかになった。

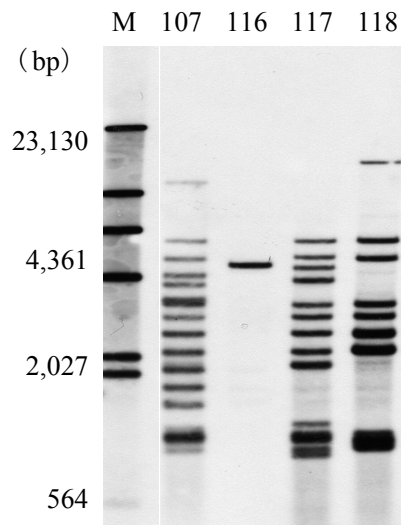


図 6 関連調査

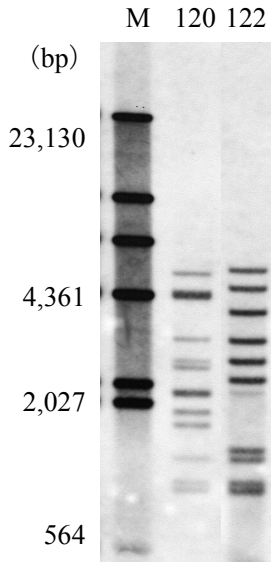


図7 関連調査

図7のレーン No.120 とレーン No.122 の患者は接する機会が非常に多いと思われる家族である。分析結果は異なる RFLP パターンを示し、家族内感染は否定され、異なった感染源からの感染であることが明らかになった。

ンを示し、感染源が異なることが明らかになった。

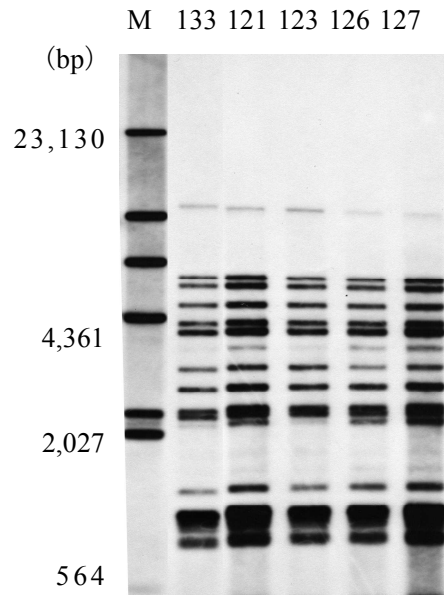


図9 集団感染事例

図9は集団感染事例である。レーン No.121 が初発患者であり、関連調査のレーン No.123, No.126, No.127, 及び No.133 はすべて同一の RFLP パターンを示し、初発患者からの感染が明らかになった。

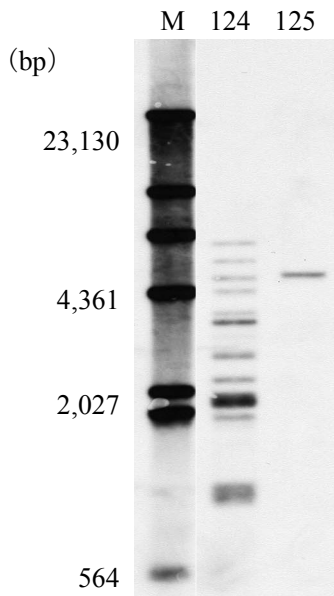


図8 関連調査

図8のレーン No.125 の患者は2006年に登録されている。レーン No.124 の患者はその当時接触があり、2年後の2008年に発病した。RFLP 分析の結果、異なる RFLP パター

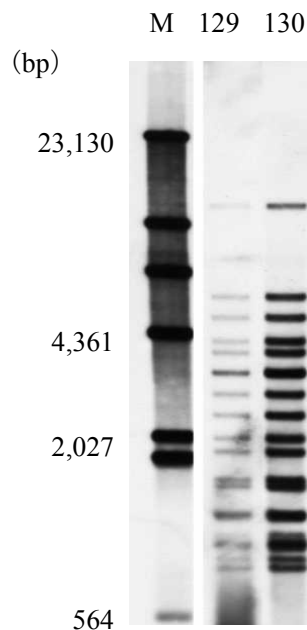


図10 家族内感染

図 10 は家族内感染事例である。レーン No.129 とレーン No.130 は RFLP パターンが一致し、家族内感染が明らかになった。

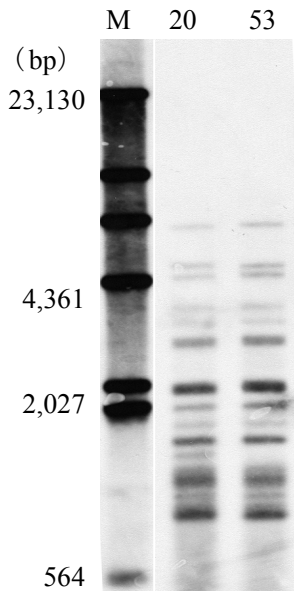


図 1 1 関連調査

図 11 のレーン No.20 の菌株は 2004 年に搬入され、レーン No.53 の菌株は 2005 年にレーン No.20 の患者の関連調査として搬入された。レーン No.53 の菌株は、搬入時水滴状のコロニーであり、結核菌の確認はできたが RFLP 分析はできなかった⁵⁾。この菌株について 2 回培養を繰り返したが、水滴状のコロニーの発育のみであった。この菌株を 2008 年 7 月からピルビン酸入りの小川培地で培養をした結果、12 月に水滴状のコロニーとともに結核菌様のコロニーが観察された。そのコロニーとレーン No.20 の菌株について RFLP 分析を実施した結果、図 11 に示すとおりほぼ同一のパターンを示したが 1 本のバンドが異なっていた。

2 系統樹解析

図 12 に結核菌 134 株の系統樹解析による RFLP パターンの相同性の比較を示した。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間で高い相同性がみられたため、同一の条件で RFLP 分析を実施した結果、RFLP パターンが一致した事例があった。

また RFLP 分析の結果、4 菌株が一本バンドであり、ほぼ同じ位置にあった。

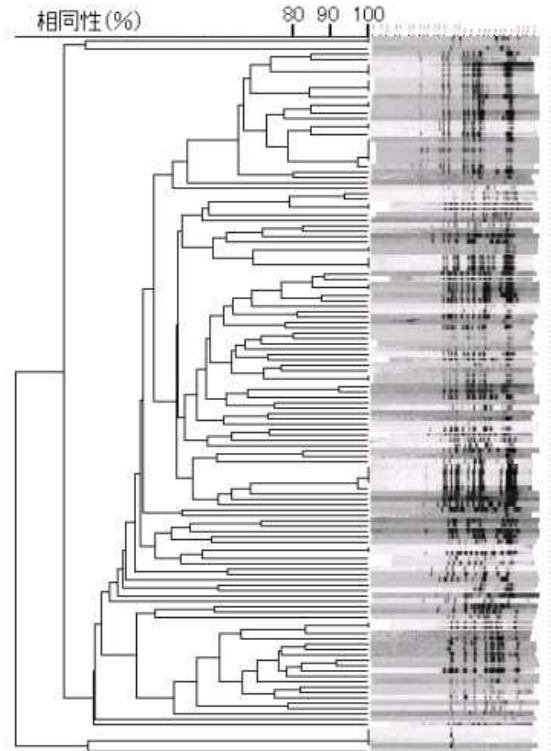


図 1 2 RFLPパターンの相同性の比較

3 VNTR分析

図 11 のレーン No.53 の菌株は、レーン No.20 と 1 本のバンド違いであった。これは、菌株を植えかえたり、菌株に栄養を与えたりしたため変異した可能性もある。遺伝子の違いを確認するため、VNTR 分析を実施した。結果を表 3 に示す。JATANo.5 のローカスのみで 1 コピー異なった。このため結核研究所で QUB11a, QUB3232, VNTR3820, VNTR4120 の 4 カ所について実施することになった。その結果、4 カ所のプロファイルが一致し、患者間の感染または同一の感染源と推定された。結核研究所において実施した QUB11a, QUB3232, VNTR3820, VNTR4120 の 4 カ所は、高頻度変化部位 (ハイパーバリアブル) であり、識別能が非常に高いと報告されている⁴⁾。レーン No.20 とレーン No.53 はこの 4 カ所のコピー数が一致したため同一株の可能性が高いという結果であった。

図 6 のレーン No.116 と図 8 のレーン No.125 は一本バンドであり、図 12 の系統樹

表3 VNTR分析結果

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
レーンNo.20	4	3	4	3	6	3	7	4	5	8	4	3
レーンNo.53	4	3	4	3	5	3	7	4	5	8	4	3

表4 VNTR分析結果

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
A	2	5	2	1	2	4	1	2	4	14	8	4
B	3	5	2	1	1	3	1	2	3	10	9	4
レーンNo.116	2	5	3	1	2	3	1	2	3	13	8	4
レーンNo.125	3	3	2	1	2	3	1	2	3	13	8	4

解析で同じクラスターであった。また、これらの患者は同じ保健所管内であった。さらにデータベースに一本バンドを示す菌株が2株あった。RFLP分析でバンドが数本以下の場合、他の分析法で確認する必要があるためVNTR分析を実施した。結果を表4に示す。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⁴⁾と述べ、少なくとも2～3カ所以上コピー数が異なる場合、別株と判定すべきと考える⁴⁾と報告している。表4に示すとおり、レーン No.116、レーン No.125、他の2株(表中A及びB)の4菌株はそれぞれ別株であることが明らかになった。

今回、結核菌のVNTR分析法を取り入れることで、より精度の高い感染経路についての情報を示すことができたと考える。

県内では結核病棟を有する医療機関が減少し、医療機関では結核菌検査の外注化が進み、結核菌株の確保が困難になりつつある。このような状況下、医療機関と行政が連携を進め、菌株を集めるとともに菌株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ると考えられる。

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へ深謝いたします。

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) 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.
- 2) 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.
- 3) 高橋光良. 結核分子疫学の成果と展望. 結核 2002; 77: 741-752.
- 4) 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.
- 5) 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.