

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)

菅野奈美 富田望 菊地理慧 二本松久子 小黒祐子¹⁾ 吉田学²⁾
微生物課 ¹⁾ 前福島県衛生研究所 ²⁾ 県南保健福祉事務所

要 旨

2014年度は結核菌 50 株の VNTR 分析依頼があった。2014 年度からは、JATA(15)-VNTR 法に加え国際標準領域 (Mtub30, MIRU40, Mtub39, MIRU16, MIRU4, ETR C) および高頻度変異領域 (3232, 3820, 4120) の分析も実施し、計 24 領域で実施した結果をデータベースに蓄積した。24 領域の 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，24 領域

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 分析法に絞り分析してきた。

2014 年度は結核菌 50 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 273 株の菌株情報を用い、比較解析を実施したので報告する。

材 料

表 1 結核菌の保健所管内別搬入数

保健所名	菌株数
県北	32
県中	2
県南	5
会津	6
南会津	0
相双	5
郡山市	0
いわき市	0
計	50

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	1	1
20～29	2	1	3
30～39	0	5	5
40～49	3	1	4
50～59	4	2	6
60～69	1	2	3
70～79	8	4	12
80以上	9	7	16
計	27	23	50

2014 年度に医療機関等で同定された結核菌 50 株を用いた。

50 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。

方 法

1 結核菌からの DNA 抽出

DNA の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。菌株を滅菌蒸留水に懸濁後 95℃ 10 分の加熱処理にて DNA を抽出した。

2 VNTR 分析

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。

また、2014 年度より国際標準領域 (Mtub30, MIRU40, Mtub39, MIRU16, MIRU4, ETR C) 及び高頻度変異領域 (3232, 3820, 4120) の分析も常用し、計 24 領域での解析を実施した。

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。

結果及び考察

50 株の VNTR 分析結果を表 3 に示す。

1 関連調査事例 1

No.277 は 2012 年度に結核患者登録となった同居家族 (義母) の結核菌株 No.255 との関連を調べる目的で依頼された菌株である。No.255 の患者は同居していた患者 A の接触者健診で発見されたが、既に塗抹陽性であり、結核の既往歴があった。No.277 は患者 A の接触者健診時、QFT 検査が 2 回陰性であったが、約 1 年後発症となった。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になった。

2 関連調査事例 2

No.275, No.281 および No.290 は初発患者と同居していた家族の菌株である。No.275 と No.281 は 24 領域で一致し、No.290 は MIRU4 が異なり、23 領域一致となった。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、関連調査事例 1 の No.255, No.277 と No.275, No.281 が一致し、No.290 は 1 カ所異なる結果となった。他にデータベース内で一致した菌株は

なかった。解析の結果一致した 2 家族は疫学調査において直接の関連は認められなかったが、居住地が近く飲食店の経営や旅館勤務など接客も多い事から今後の地域的な感染拡大に注意が必要である。

3 関連調査事例 3

No.282 と No.283 は初発患者と同室に入院し、接触者健診で結核と診断された患者である。24 領域中 18 カ所で異なり、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、一致する株はなかった。

4 関連調査事例 4

No.300 の患者は 2013 年 6 月に千葉県在住中に結核を発症し、治療終了した後に 2014 年 5 月から福島県に除染作業に来ていた。再燃か再感染かを調べる目的で、千葉県衛生研究所で実施していた VNTR 結果と照合し、24 領域全て一致したことから、再燃の可能性が高いと思われた。他の除染作業員との共同生活も送っていたことから、今後の感染拡大に注意が必要である。

データベースとの比較解析では、2009 年度および 2010 年度に搬入された福島県内で発生した職場内感染事例²⁾の 1 クラスター (3 株) と 23 カ所一致したが、疫学関連は認められなかった。

5 関連調査事例 5

No.278 と No.320 は同一人物の結核菌株である。フィリピンで結核を治療後、日本で結核を再発し投薬治療終了後に再び喀痰培養で結核菌が陽性となった。既に実施している菌株と比較解析をすることで、同一菌による悪化であることを証明する目的で VNTR を実施した。24 領域の結果は全て一致し、同一菌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 の菌株と 23 領域一致した。直接的な疫学関連は認められなかったが、この患者もフィリピン出身である。

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.275	4	3	3	3	3	1	8	2	5	7	8	4	12	8	4
No.276	4	1	3	2	4	4	7	4	5	7	7	5	6	9	4
No.277	4	3	3	3	3	1	8	2	5	7	8	4	12	8	4
No.278	1	4	10	3	8	1	2	4	4	7	7	2	10	11	4
No.279	3	3	3	4	-	3	7	5	5	7	2	5	10	7	4
No.280	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	11	4	10	7	2
No.281	4	3	3	3	3	1	8	2	5	7	8	4	12	8	4
No.282	4	4	3	3	-	3	8	4	6	7	8	4	8	-	4
No.283	3	3	4	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	6	4
No.284	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.285	2	3	1	5	4	3	5	4	3	8	2	3	3	5	3
No.286	3	3	3	4	6	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.287	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	8	2	11	11	4
No.288	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	11	4	10	7	2
No.289	4	3	5	3	5	3	7	4	2	7	8	3	8	5	4
No.290	4	3	3	3	3	1	8	2	5	7	8	4	12	8	4
No.291	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.292	2	3	1	4	4	2	5	4	3	12	3	3	5	2	3
No.293	3	3	3	4	4	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4
No.294	4	3	2	3	3	3	7	4	5	7	8	4	10	20	4
No.295	4	3	3	3	3	3	6	4	3	7	7	4	8	8	4
No.296	4	3	0	3	3	3	8	4	6	7	7	4	10	20	3
No.297	4	1	3	2	6	4	7	4	6	7	8	5	4	9	4
No.298	3	5	2	1	2	3	1	2	3	13	7	4	7	20	3
No.299	2	6	1	1	1	3	1	2	3	12	7	4	7	7	3
No.300	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4	10	8	4
No.301	4	3	4	3	5	3	5	4	5	8	8	3	8	5	4
No.302	4	3	3	3	3	3	7	4	2	4	8	4	10	8	4
No.303	4	4	3	3	3	3	7	4	5	5	8	1,4	10	20	2
No.304	3	3	4	3	5	3	7	2	4	16	9	4	13	8	4
No.305	4	3	3	3	3	3	5	4	3	7	7	4	8	8	4
No.306	4	3	3	3	3	3	6	4	3	7	7	4	8	8	4
No.307	4	3	3	3	3	3	8	4	5	7	7	4	10	8	4
No.308	4	3	4	3	3	3	8	4	5	4	8	5	9	8	4
No.309	4	4	4	3	5	3	6	4	5	8	8	3	8	5	4
No.310	1	3	3	3	7	5	7	4	5	7	8	5	10	8	4
No.311	3	3	3	4	5	3	7	4	5	7	2	5	10	7	4
No.312	2	4	5	3	2	2	2	2	5	10	5	2	5	11	7
No.313	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3	8	5	4
No.314	2	2	1	3	3	2	5	4	3	10	5	3	5	2	3
No.315	1	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	8	4
No.316	4	1	5	2	7	4	7	4	5	7	8	5	9	9	4
No.317	1	4	9	3	8	1	2	4	4	7	7	2	10	11	4
No.318	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	8	4
No.319	4	3	1	3	3	3	8	4	5	4	8	4	10	8	4
No.320	1	4	10	3	8	1	2	4	4	7	7	2	10	11	4
No.321	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	9	4	10	8	4
No.322	4	9	3	2	8	1	7	4	3	9	8	2	4	9	5
No.323	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	11	5	10	5	4
No.324	2	3	1	3	3	2	5	4	4	10	4	3	5	2	3

6 散発患者株のVNTR比較解析

今年度より 24 領域で VNTR を実施したため、関連調査株を除いた散発患者株 41 株で VNTR の領域追加によって識別能力にどれだけ変化が認められたかを確認した。1 カ所異なるパターンまで同クラスターとし、デ

ータベースとの比較解析によって JATA15 でクラスターを形成した菌株数は 26 株 (63.4%)、JATA15 に国際標準領域の 6 領域を追加した 21 領域でクラスターを形成した菌株数は 22 株 (53.7%)、JATA15 に国際標準領域と高頻度変異領域の 9 領域を追加した 24

領域でクラスターを形成した菌株数は 9 株 (22.0 %) であり、領域を追加することでクラスター形成率が減少し、識別能力の向上が確認できた。高頻度変異領域の場合は、変異のしやすさから 2 カ所異なる場合でも、“疫学情報があれば一致と推定する”と含みをおいているが、過去に高頻度変異領域が 2 カ所異なり、同一由来株であると判断されたケースは県内では確認されていない。

識別能力向上の他に、今年度は結核菌 VNTR の外部精度評価が結核研究所を中心に実施され、当所も参加した。判読が難しいとされる高頻度変異領域の判定も正確にでき、良好な結果を得られたが、増幅産物のサイズが比較的小さく、判定しやすいと思われるため、1,000bp を超えるサイズの判定には今後も正確な判読技術を構築する必要があると思われる。関連調査事例 4 の様に他施設と型別比較を実施する場合は精度管理は非常に重要であり、誤判定した結果で照合することのないよう十分な注意が不可欠である。現在はアガロースゲルによる電気泳動を実施しているが、今後は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も視野に入れ、解析技術の向上を図りたい。

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.