

結核疫学調査における結核菌DNA解析データベースの活用

大島律子, 狩屋英明, 中嶋 洋 (細菌科)

【調査研究】

結核疫学調査における結核菌DNA解析データベースの活用

Application to epidemiological investigation with
DNA database of *Mycobacterium tuberculosis*

大島律子, 狩屋英明, 中嶋 洋 (細菌科)

Ritsuko Ohata, Hideaki Kariya and Hiroshi Nakajima

要 旨

岡山県では、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染の予防など結核対策に役立てるため、平成11年度から県内の結核新登録患者から分離された結核菌のDNAをRestriction fragment length polymorphism (RFLP)解析し、菌株情報と併せてデータベース化している。平成20年度は、RFLP解析の他、菌の死滅等によりRFLP解析に必要なDNA量が得られなかった菌株等について、少量のDNAでも解析可能なVariable Number Tandem Repeats (VNTR)法を適用し、感染源究明を試みた。

[キーワード：結核菌, RFLP解析, VNTR法, データベース, 感染源]

[Key words : *M.tuberculosis*, RFLP analysis, VNTR analysis, database, source of infection]

1 はじめに

岡山県では、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染予防を目的に、結核菌DNAのRFLP解析を行い、菌株情報と融合させたデータベースを構築し、感染事例の疫学調査に活用している¹⁾。平成20年度は34株をRFLP解析してデータベースに加えるとともに、2つの感染事例についてVNTR法を用いて感染源究明を試みたのでその概要を報告する。

2 材料および方法

(1) 平成20年度のDNA解析対象株

県内の医療機関または検査機関において分離された結核菌のうち、以下の条件に該当した41株が搬入され、重複やDNA抽出不能株を除いた35株をRFLP法またはVNTR法で解析した。

- i) 60歳以下の塗抹陽性患者(結核予防法第29条適用者)の菌株
- ii) 保健所から依頼のあった菌株
 - ・社会福祉施設等(集団生活等)で発生した患者(利用者, 職員)の菌株
 - ・接客業・看護師・保健師・保育士・教員・医師等の菌株

・その他保健所長が必要と判断した患者の菌株

(2) 安全対策

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成10年法律第114号)(以下「感染症法」と略す)第56条の25, 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則(平成10年厚生省令第99号)(以下「感染症法施行規則」と略す)第31条の36及び特定病原体等の運搬に係る容器等に関する基準(平成19年厚生労働省告示第209号)に従って菌株が運搬された。

搬入された菌株の管理は、感染症法第56条の24, 25および感染症法施行規則第31条の29, 30に適合した施設で管理した。

結核菌のDNA抽出は、バイオセーフティーレベル3の施設内でN95微粒子用マスクを装着し、クラスIIの安全キャビネットを使用して行った。

(3) 菌株からのDNA抽出

DNA抽出は、小川培地上の菌体からDNA抽出キットISOPLANT(ニッポンジーン)を用いて行った。

(4) RFLP解析

DNA解析対象株35株のうち、菌死滅により十分なDNA量が得られなかった1株を除いた34株をRFLP

解析した。RFLP解析は、定法^{2),3)}に従い、RFLPパターンのクラスター解析は、解析ソフトFingerprinting II (Bio Rad)を用い、UPGMA法で行った。RFLP解析結果は、保健所からの菌株情報と併せてデータベースに記載した。データベースには、今回解析した34株を含め、平成20年度末現在、1031株が登録された。

(5) VNTR法

DNA解析対象株35株中、RFLP解析が不可能であった1株およびその関連株1株でVNTR法を実施した。また、中国人労働者分離株1株およびその関連株1株でVNTR法を実施した。さらに、平成17～19年度に搬入されたデータベース中の中国人労働者分離株5株についてもVNTR法を実施した。VNTR法は、前田らの方法⁴⁾に従い、結核菌ゲノムの12ヶ所の繰り返し配列のコピー数を調べ、結核菌の型別を行うJATA(12)-VNTR分析法を用いた。

(6) 事例の感染源究明

中国人労働者間での感染が疑われた事例(表1, 事例1)および家族内感染が疑われた事例(表1, 事例2)の2事例について、DNA解析により感染源を検討した。ここで、事例1の患者A～Hのうち、D分離株については以前の調査でC分離株とRFLPパターンが一致し、患者間の接触も確認されていたのでVNTR法を省略した。

3 結果

(1) 34株の解析結果

RFLPパターンのクラスター解析の結果、平成12～15年度に見られた類似性の高い流行株グループI～IIIに属すると思われる株は20株(58.8%)であった(図1)。

データベース中の他株との比較では、3組4株が一致した(図1 ①～③, ②は事例1)。これらの中で、①は

表1 事例の概要

事例	No.	所管保健所	患者	届出時年齢	届出	発病	RFLP一致*	VNTR一致	事例概要
1	1043	O	A	33	2005/2/1	不明	1043-1204で一致		2004年11月～2005年5月までに、県の中心地で隣接するO市とK市で20～33歳の4名の中国人労働者等が結核を発病した。4名の患者分離株のRFLPパターンを比較したところ、C・D 2名のパターンが一致した。疫学調査の結果、C・Dは来日前に一定期間同じ集団研修を受けており、そこで感染した可能性が示唆された。
	1045	K	B	23	2005/2/21	2004/11/7	無		
	1064	K	C	20	2005/6/3	2005/5/-	一致	無	
	1069	O	D	28	2005/7/6	2005/3/-		未実施	
	1129	K	E	28	2006/1/23	2006/1/11	実施不能	無	Gの疫学調査でFとの接触が疑われたが、RFLP・VNTR共に一致せずG-F間の感染は否定された。また、Gの発病約3ヶ月後にGと職場および居住地を同じくするHが結核を発病したため、GからHへの感染が疑われたが、RFLP・VNTR共に一致せず感染は否定された。
	1182	O	F	19	2007/5/19	2007/4/-	無		
	1204	Z	G	23	2008/1/13	2007/11/-	1043-1204で一致		さらに、G・F・Hと同様に若い世代の中国人労働者で結核を発病したA～Eについて、分離株のRFLP解析またはVNTR法を実施し、患者間の関連性を調べたところ、AとGでRFLP・VNTR共に一致した。O保健所とZ保健所が情報交換してAとGの接点を調査したが、日本国内での接触は認められず、中国での接触は不明であった。
	1205	Z	H	29	2008/2/25	2008/2/-	無		
2	1206	K	I	36	2007/6/23	不明	実施不能	一致	IとJは親子であり家族内感染が疑われたが、Iの接触者健診でJはQFT(-)であった。両者の感染の有無を確認するためVNTR法を実施したところ、一致したのでIからJへの感染が支持された。
	1207	K	J	62	2008/2/28	不明	無		

* RFLPデータベース内の他の株も含む

データベース中の2株と一致したが、関連性は不明であった。②は感染事例1に含まれる株であるが、データベース中の1株と一致した。両者の共通点は患者が共に県南部で働く若い中国人労働者という点であったが、日本国内での接点は見い出せず、中国での接触も明確に出来なかった。③は、菌株No.1226およびNo.1238が一致した他、データベース中の3株とも一致した。これら5株が分離された患者はいずれも30～50歳代の男性であり、居住地は4名が同一保健所管内で1名が隣接する保健所管内であったが、患者間の接点は見い出せなかった。

(2) 事例の検討結果

事例1は、患者Gの疫学調査によりFとの接触が判

明し、また、Gの発病3ヶ月後に同じ職場・居住地のHが発病したため、患者間の感染が疑われたが、分離株のDNA解析により、3名間での感染は否定された。これら3名は、いずれも県南部で働く若い中国人労働者であったため、過去に搬入された同様の中国人労働者A～Eの分離株についてもDNA解析を実施したところ、GとAで一致した。このため、両者を所管するO保健所とZ保健所が情報交換して両者の接点を調査したが、日本国内での接触は認められず、中国での接触は不明であった。

事例2は、家族内感染が疑われたが、患者Iの接触者健診で患者JはQFT(-)であったため、DNA解析により詳細な検討が必要となった。菌株搬入時にIか

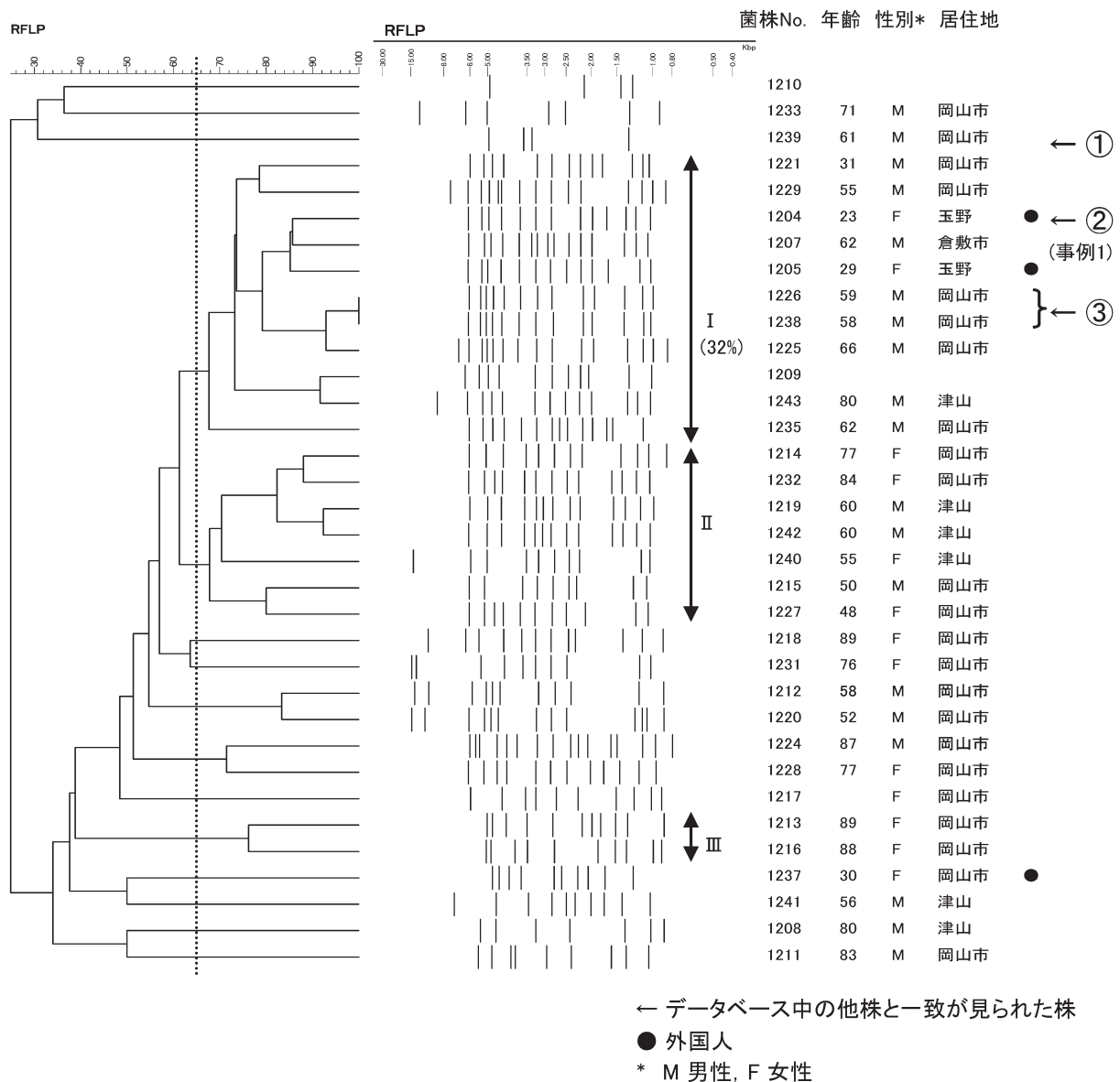
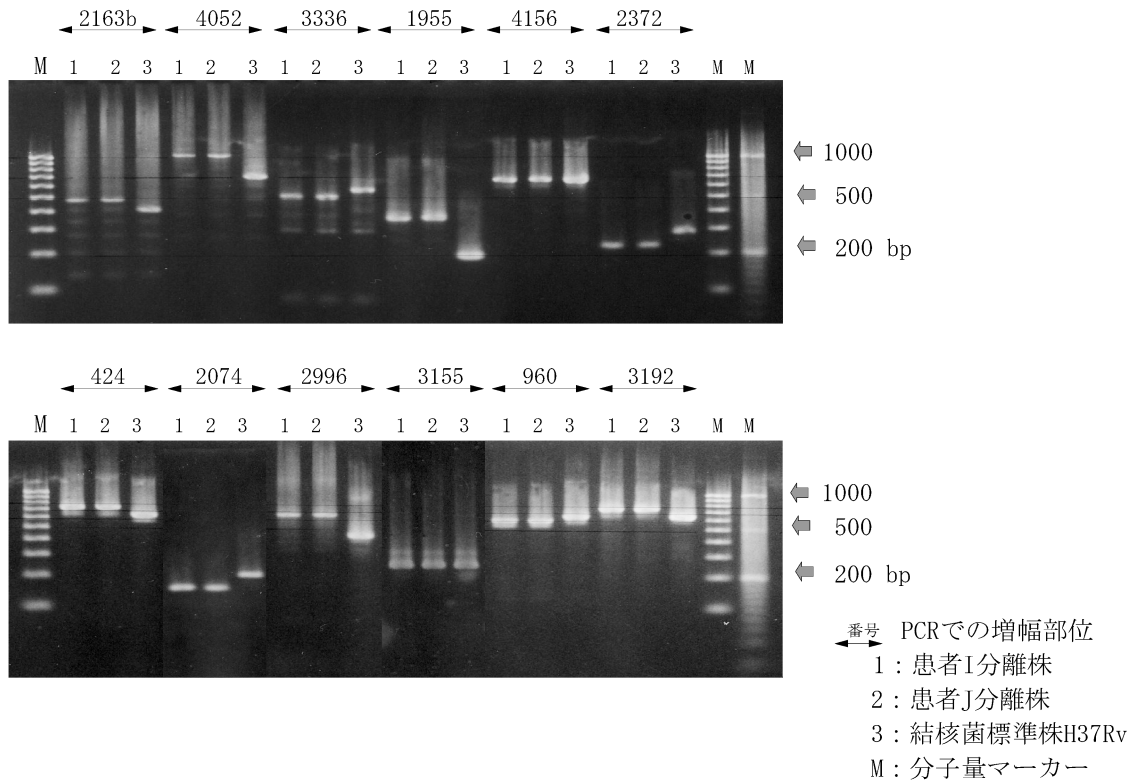


図1 H20年度に解析した結核菌77株のRFLPパターン



※ 患者I分離株と患者J分離株は、VNTR法における12カ所の増幅部位で一致した

図2 事例2におけるVNTR解析結果

らの分離株は死滅しており、RFLP解析に必要なDNA量が得られなかったためVNTR法を実施したところ一致したので、IからJへの感染が支持された(図2)。

4 考察

34株の解析結果から、依然として流行株グループI～IIIに属する株が優性であったが、今回解析した株の多くは典型的な型とはやや異なっていた。I・II型については、菌が分離された患者の大部分が60歳代以下であり、過去の感染の再燃ではなく最近の感染と考えられ、過去からの流行株が遺伝子的に変化している事が推測された。

感染源究明のためのRFLPデータベースの活用に関しては、パターンが一致した①～③について、関連性は見い出せなかった。①と③では、患者の発病時期に約5～7年の差があり、疫学的再調査が困難であったことが大きな要因と思われた。②では、結核罹患率が高い国からの外国人の疫学調査においては、来日後だけでなく来日前の居住地、学校、職場、研修等への参加の有無等の詳細な聞き取り調査の重要性が示唆された。

事例の感染源究明におけるDNA解析の活用では、事

例2のように、菌の死滅等により少量のDNAしか得られなかった菌株について、VNTR法は非常に有用であった。また、VNTR法は、迅速にデジタル化された結果が得られる等メリットが大きいので、今後は、既存のRFLPデータベースを順次VNTR法での結果に置き換え、データベースの充実を図る予定である。

文 献

- 1) 大島律子, 中嶋 洋: 結核対策における地域ベースの結核菌RFLP解析の意義, 日本公衆衛生雑誌, 52, 736-745, 2005
- 2) 高橋光良, 阿部千代治: IS6110をプローブとしたRFLP分析による結核菌の亜分類, 日本細菌学雑誌, 49, 863-857, 1994
- 3) 高橋光良: 結核菌挿入断片IS6110をプローブとした結核の分子疫学, 資料と展望, No.17, 43-57, 1996
- 4) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原 勇, 加藤 誠: 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, 83, 673-678, 2008