

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 (2)

大島律子, 石井 学, 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 (2)

Application to epidemiological investigation with
DNA database of *Mycobacterium tuberculosis* (2)

大島律子, 石井 学, 中嶋 洋 (細菌科)

Ritsuko Ohata, Manabu Ishii and Hiroshi Nakajima (Department of Bacteriology)

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解析を実施し、その結果を菌株情報と融合させてデータベース化している。平成21年度は、従来のRestriction fragment length polymorphism(RFLP)解析に加え、Variable Number Tandem Repeats(VNTR)解析を実施し、解析結果を感染源究明に活用した。

[キーワード：結核菌，データベース，RFLP解析，VNTR解析]

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

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、結核菌のDNA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て感染事例の疫学調査に活用している^{1),2)}。平成21年度は、31株を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解析結果を感染源究明に活用したのでその概要を報告する。

2 材料および方法

(1) 平成21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31株が搬入され、菌死滅等により十分なDNA量が得られなかった3株を除いた28株でRFLP解析を行い、さらに全株でVNTR解析を実施した。

- 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)に従って菌株を運搬した。

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に適合した施設で行った。

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

RFLP解析は定法^{3),4)}に従い、RFLPパターンのクラスター解析は、解析ソフトBioNumerics ver 6.0 (APPLIED MATHS)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28株を含め、平成21年度末現在、1059株を登録した。

(5) VNTR解析

全31株でVNTR解析を実施した。VNTR解析は、前田らの方法⁵⁾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て結核菌の型別を行うJATA(12)-VNTR分析法を用いた。また、繰り返し配列のPCR増幅産物の電気泳動および解析は、DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 MultiNA(島津製作所)(以下「MultiNA」)を使用した。

(6) 事例の感染源究明

院内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B分離株は、搬入時には1コロニーしか増殖しておらず、RFLP解析に必要なDNA量が得られなかったため、少量のDNAでも解析可能なVNTR解析を先行して行い、菌増殖が見られた1ヶ月後にRFLP解析を実施した。

3 結果

(1) RFLP解析結果

RFLP解析は、結核菌遺伝子に特異的に存在し、出現する場所や個数が菌株毎に異なる塩基配列を検出し、その電気泳動パターンの違いで型別する方法であるが、28株のRFLP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～III¹⁾に属すると思われる株は10株(35.7%)であった(図1)。

データベースに登録されている過去の菌株との比較では、7組9株が一致した(図1①～⑦, ②は事例2)。①と一致したのは1株であったが、その株が分離された患者の発病は①の患者発病の約8年前であり居住地も離れていたため、同一感染源の可能性は低いと思われた。②は感染事例2の2株であるが、②の株が分離された1～6年前に分離された6株と一致した。8株のRFLPパターンは流行株グループIIに属し、患者の居住地も離れていたため、偶然一致の可能性が高く患者間の接点は解明できなかった。③は2年前に分離された1株と一致した。これら2株のRFLPパターンは特徴的であり、両患者の年齢は結核未感染者が70%以上を占める60歳前後⁶⁾であったため、同一感染源の可能性が示唆されたが、患者間の関連性は見いだせなかった。④は1株のみと一致したが、患者間の居住地が遠く④の患者が結核既感染者が約70%を占める年齢⁶⁾であったことから、同一感染源の可能性は低いと考えられた。⑤は居住地が同一市内の患者分離株3株と一致したが、RFLPパターンが流行株グループIに属したこと、菌分離時期および患者年齢が、2年4ヶ月前(菌分離時73歳)、約8年前(同85歳)および約9年前(同51歳)であったことから、患者間の関連性は低いと思われた。⑥は同一市内に居住し約5年前に41歳で発病した患者分離株と一致した。2株のRFLPパターンは特徴的で患者の年齢が両者とも若いため、同一感染源の可能性が示唆されたが、疫学調査の結果、患者間の接点は見いだせなかった。⑦は20株と一致したが、これら22株は全国的に多く見られる1本バンドのパターンで、RFLP解析では解析能が低い5本以下のバンドパターンに相当しており、患者間の関連性は不明であ

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パターン	VNTR型	事例概要
1	1246	T	A	85	2009/4/3	不明	一致	一致	AとBは同じ病院の患者で、院内感染が疑われた。RFLP解析およびVNTR解析の結果、パターンが一致したため、院内感染であることが支持された。
	1247	M	B	92	2009/5/25	不明			
2	1248	T	C	46	2009/4/6	不明	一致	一致	DとCは親子であり、Cは咳・痰・発熱等の症状やX線所見から肺結核と診断されていたが、Dは無症状だったため、CからDへの家族内感染が疑われた。RFLP解析およびVNTR解析の結果、パターンが一致したため、家族内感染が支持された。
	1249	T	D	76	2009/4/16	2009/3/-			

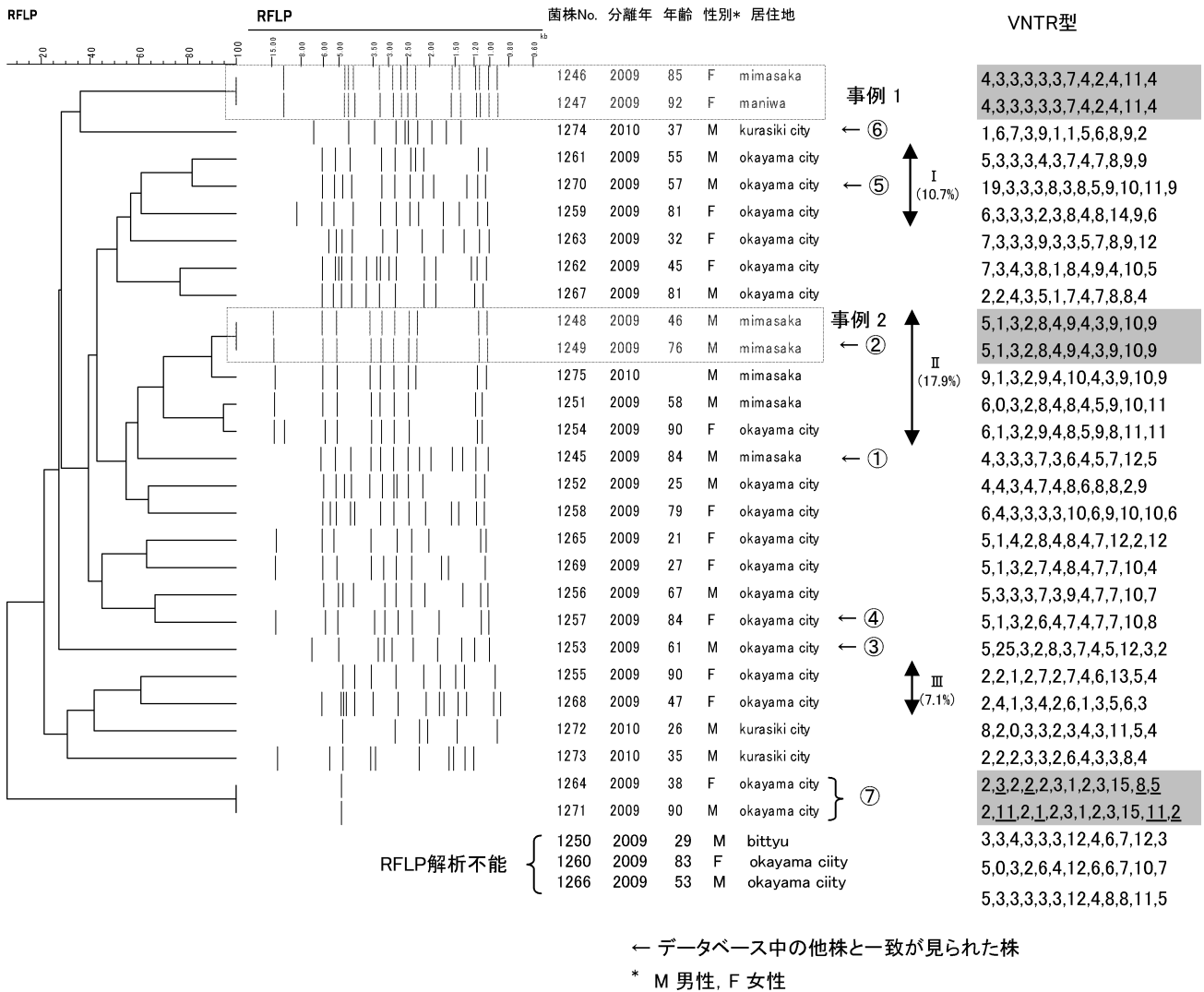


図1 H21年度に解析した結核菌28株のRFLPパターンの系統樹および31株のVNTR型

った。

(2) VNTR解析結果

VNTR解析は、結核菌遺伝子に存在する数十塩基のDNAの繰り返し配列の数を測定する方法であるが、31株のVNTR解析の結果、RFLP解析不能だった3株を含む全株で解析ができた(図1)。RFLPパターンとVNTR型は相関し、RFLPパターンが一致した事例1および事例2では、VNTR型も一致し、RFLPパターンが異なった株では全てVNTR型も異なっていた。また、1本バンドのRFLPパターンで一致した⑦については、VNTR型が異なり同一株ではないことが判明した。

(3) 事例の検討結果

事例1は、同じ病院の患者で院内感染が疑われ、患

者分離菌株のDNA解析の結果、VNTR型とRFLPパターンの両方で一致したため、院内感染が支持された。事例2は、家族内感染が疑われ、RFLPパターンとVNTR型の両方が一致したため、家族内感染が支持された(図1, 表1)。

4 考察

28株のRFLP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35.7%存在し、主要な感染源となっていることが推測された。

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①~⑦について、関連性は見い出せなかったが、③と⑥では、RFLPパターンの特徴や患者の年齢、居住地等から同一感染源の可能性が否定

できず、潜在的な患者間の接点が推測された。

これらのように、発病時期に2年以上の開きがある場合は、先に発病した患者から改めて情報を聴取することは難しいので、登録時に、勤務状況、通勤方法、よく利用する店舗や娯楽施設などの社会活動状況をできるだけ広範囲に聞き取っておく必要がある。このため、患者間の接点の発見に結びつく情報に関する疫学調査項目の検討が、重要な課題と思われた。

31株のVNTR解析の結果から、本法はRFLP解析結果と矛盾が無く、今後の新しいDNA解析データベースとして有用と思われた。さらに、RFLP解析では解析能が低い5本以下のバンドパターンの株について、RFLP解析以上の解析能があることも判った。また、事例1のように、少量のDNAしか得られなかった菌株でもVNTR解析は可能で、迅速な結果還元に繋がり、疫学調査上非常に有効な手段と思われた。今後は、全株についてVNTR解析を実施し、平成20年度以前の株はRFLPデータベースに順次VNTR解析結果を加え、VNTR解析結果から過去の株との照合が可能になるよう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) 大島律子, 狩屋英明, 中嶋 洋: 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, 岡山県環境保健センター年報, 33, 109-112, 2009
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 財団法人結核予防会編: 感染源の感染性評価, 改正感染症法における結核対策, 初版, 76-78, 財団法人結核予防会, 東京, 2007