

【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 (4)

Application to epidemiological investigation with
DNA database of *Mycobacterium tuberculosis* (4)

大畠律子・石井 学・中嶋 洋 (細菌科)

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

要 旨

本県では、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、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活用している。平成23年度は、Variable number of tandem repeats (VNTR) 解析により、集団感染を含む6つの感染事例の感染源究明を行った。

[キーワード：結核菌，データベース，VNTR解析]

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

1 はじめに

本県では、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染予防を目的に、Restriction fragment length polymorphism (以下「RFLP」という。)解析法及びVariable number of tandem repeats (以下「VNTR」という。)解析法を用いて結核菌の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)}。従来、RFLP解析法が世界的標準法であったが、操作が簡単で結果を数値化できるVNTR解析法であるJATA (12) -VNTR解析法 (以下「JATA (12) -VNTR」という。)が平成20年に確立され³⁾、現在の国内標準法として提唱されている。さらに、JATA (12) -VNTRの型別能力を補う方法として、JATA (12) -VNTRに3領域を加えたJATA (15) -VNTR解析法 (以下「JATA(15)-VNTR」という。)や3つの多型性に富んだ領域を解析する超多変 (hypervariable, HV) 領域のVNTR解析法 (以下「HV-VNTR」という。)が報告されている^{3)・4)}。本県でも、平成20年度にJATA (12) -VNTRを試験的に実施し、平成21年度と22年度はRFLP解析結果との比較によりその有用性を確認し、平成23年度はJATA (15) -VNTR及びHV-VNTRを導入して、RFLP解析法からVNTR解析法に完全移行した。

今回、VNTR解析結果のデータベースを活用して、集団感染事例を含む6つの感染事例について感染源の究明を行ったので、その概要を報告する。

2 材料及び方法

2.1 平成23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102株が搬入された。

- (1) 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
- (2) 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

これらのうち、搬入時に菌の増殖が認められなかった1株を除く101株でVNTR解析を実施した。

2.2 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」という。)に基づき通知されている「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。

また、搬入された菌株の管理は、感染症法第56条の24, 25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。

2.3 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。

2.4 VNTR解析

全101株でJATA (12) -VNTR⁵⁾ を実施し、さらに詳細な型別が必要な場合は、JATA (15) -VNTR及びHV-VNTRを追加し、解析結果をデータベースに登録した。平成23年度末現在、540株のJATA (12) -VNTR型が登録された。VNTR解析及びデータベース作成には、解析ソフトBioNumerics ver6.5 (APPLIED MATHS) を用いた。

2.5 事例の感染源究明

平成23年度に調査した事例の概要を表1に示した。集団感染の2事例（事例1と事例2）、同居人同士の感

染の1事例（事例3）、家族内感染の1事例（事例4）、院内感染が疑われた1事例（事例5）及び施設内感染が疑われた1事例（事例6）の計6事例について、患者から分離された結核菌のVNTR解析により感染源を究明した。

3 結果

3.1 VNTR解析結果

平成23年度に解析した結核菌101株のVNTR型を図1に示した。

101株のVNTR解析の結果、JATA (12) -VNTRでは2～4株を含む9組のクラスターが形成され、23株が含まれ

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	VNTR型	事例概要
1	1285*	K	a	75	20101028	20100700	一致	患者a,b,cは同じ施設の入所者で、2年前の初発患者発病後相次いで発病し、3名から分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したため施設内感染と考えられた。さらに、施設内には感染者3名の存在も判明しており、集団感染**に該当する事例となった。 2011年3月に届出があった患者dはa,b,cと同じ施設の入所者で、初発患者及びbと同室であった。患者d分離株のVNTR型はa,b,cと一致したため、集団感染に含まれる症例と考えられた。
	1287*		b	41	20090714	20090700		
	1342*		c	61	20101224	不明		
	1354		d	51	20110323	不明		
2	1361	O	e	61	20110325	20101000	一致	2011年3月にX病院に長期入院中だった患者eが結核を発病したため、入院患者や通院患者、病院職員等を対象に接触者健康を実施したところ、患者f, gを含む5名の発病と38名の感染が判明した。患者e, f, gから分離された結核菌DNAのVNTR型は一致し、集団感染に該当する事例となった。
	1410	Bt	f	62	20110613	20110531		
	1435	O	g	63	20110930	不明		
3	1316*	O	h	66	20100927	不明	一致	患者hとiは同居人で、両者から分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したため、両者間の感染が判明した。
	1375		i	64	20110303	不明		
4	1377	O	j	48	20110531	20110530	一致	患者kとlは夫婦でjはその子である。患者kの結核登録後、jとkが相次いで結核登録され、3名から分離された結核菌DNAのVNTR型は一致したため家族内感染と判明した。
	1378		k	83	20110312	不明		
	1437		l	75	20110719	不明		
5	1351*	K	m	32	20110301	不明	相違	患者mは届出以前から結核症状があり、届出時には喀痰塗抹ガフキー5号の状態であった。患者nはmと同じ病院に通院歴があったため、mからの感染が疑われたが、両者から分離された結核菌DNAのVNTR型が異なっていたため、それぞれ別染源と判った。
	1431		n	26	20110902	不明		
6	1407	Bz	o	84	20110611	20110600	一致	2011年12月に患者pが結核と診断され、調査の結果、2011年6月頃結核を発病した患者oと同じ施設で同室であった事が判明した。両者から分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したため、患者oからpに感染したと考えられた。
	1436		p	87	20111231	20111200		

*H23年度より前に搬入された結核菌株

**結核集団感染（厚生労働省定義）

同一の感染源が、2家族以上にまたがり、20人以上に結核を感染させた場合をいう。
ただし、発病者1人は6人が感染したものとして患者数を計算する。

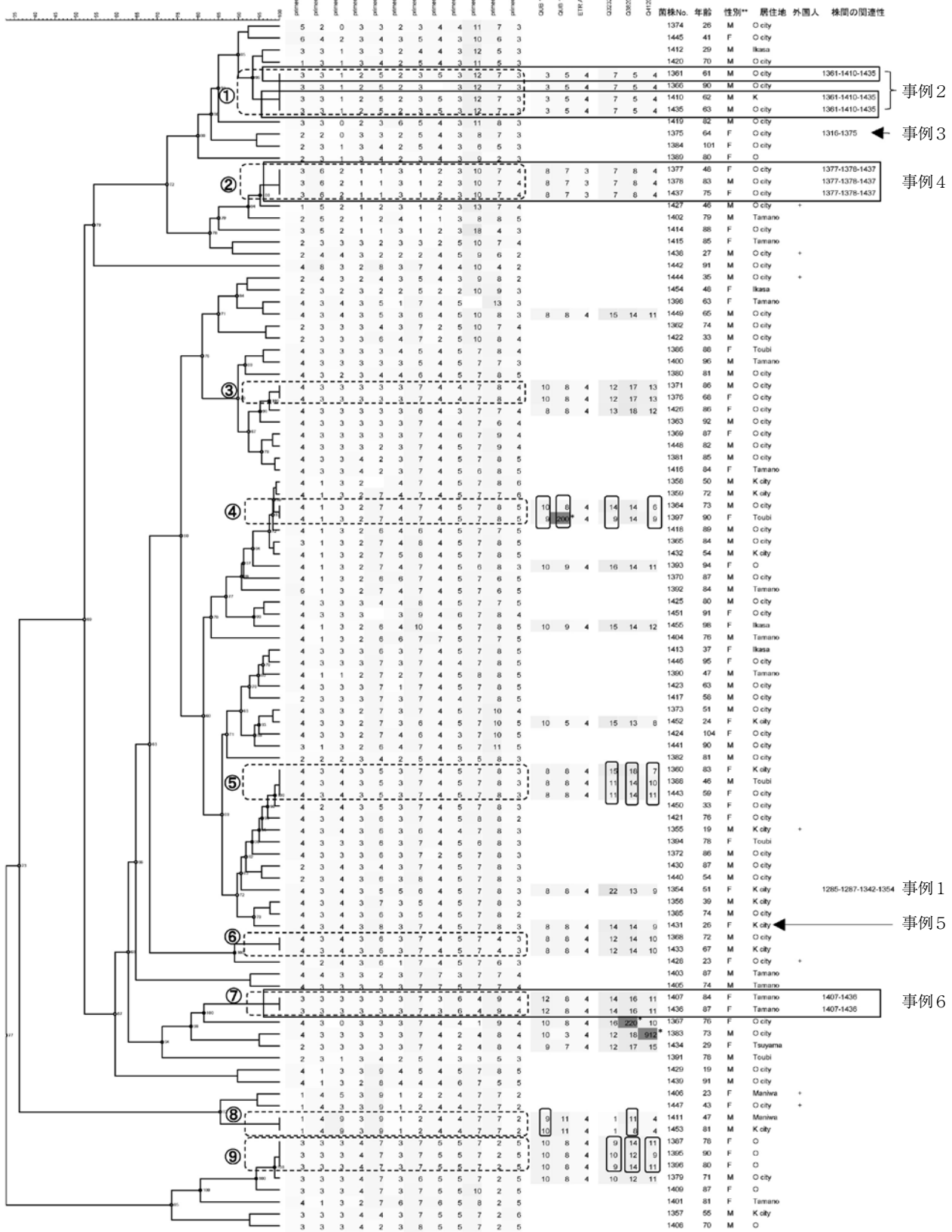


図1 H23年度に解析した結核菌101株のVNTR型

た(クラスター形成率22.8%) (①~⑨)。これらのクラスターを、JATA(15)-VNTR及びHV-VNTRでさらに解析したところ、JATA(15)-VNTRのみではクラスター④と⑧の4株が異なり19株が一致し(クラスター形成率18.8%)、JATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加えると、クラスター④、⑤、⑧の全株と⑨の1株を含む8株が異なり、それぞれ事例2、4、6を含むクラスター①、②、⑦とクラスター③、⑥の全株及び⑨の2株(No.1387と1396)を含む15株が一致した(クラスター形成率14.9%)。なお、クラスター①に含まれるNo.1366は、JATA(12)-VNTRのprimer 8領域が増幅されなかったが、JATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法で結果がクラスター①の他の3株と一致したため、同一型株と解釈した。

3.2 事例の検討結果

結果は、表1に示すとおりであった。

事例1は平成22年度に集団感染が判明していた事例で、患者dは接触者健診対象者であった。d分離株のVNTR型は患者a、b、c分離株と一致したため、dは集団感染の患者と判った。事例2は院内感染の事例であり、初発患者eの濃厚接触者を対象とした血液検査により高い感染率が認められ、対象者を拡大した接触者健診の結果、厚生労働省の集団感染の定義を上回る人数の感染者が確認され、集団感染と判断された事例であった。判断後に実施されたVNTR解析の結果、患者e、f、g分離株のVNTR型は一致し、集団感染を支持する結果となった。事例3は同居人hとiの間で感染が疑われた事例であり、両者分離株のVNTR型が一致したため、h・i間の感染と考えられた。事例4は家族内感染が疑われた事例で、患者j、k、l分離株のVNTR型が一致した。kが初発患者でjはkから感染し、lはkとjのいずれかから感染したと推測された。事例5は通院患者間の院内感染が疑われた事例であったが、患者mとn分離株のVNTR型が異なり、それぞれ別の感染源と判明した。事例6は施設内感染が疑われた事例であり、患者oとpからの分離株のVNTR型が一致した。施設で患者pと同室であった患者oは、結核届出時には喀痰塗抹陽性で排菌状態にあったと考えられ、oからpへ感染したと推測された。

4 考察

101株のVNTR解析の結果、JATA(12)-VNTR単独ではクラスター形成率は22.8%であったが、JATA(15)-VNTRを加えると18.8%に低下し、さらにHV-VNTRを加えると14.9%になった。従って、最初にJATA(12)-VNTRを実施し、VNTR型が一致した場合、JATA(15)-VNTRとHV-VNTR

の両法を追加することにより、精度の高い解析ができることが確認できた。ここで、JATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加えてもVNTR型が一致した株のうち、クラスター③と⑥の全株、①の1株(No.1366)及び⑨の2株(No.1387と1396)を含む7株(6.9%)は、クラスター内の患者間で関連性が発見できなかった。これらの患者はいずれも67~90歳と高齢であり、過去の再燃などで感染源が不明なためと考えられた。このように、VNTR解析においては、JATA(12)-VNTRにJATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加えた結果が一致しても、患者間の関連性が見いだせない場合があることを念頭に置く必要があると思われる。

感染事例の感染源を究明した結果、事例1から4及び6でVNTR型が一致し、保健所の実地疫学調査結果を裏付ける科学的根拠となった。また、事例5は患者mとnの接触が濃厚ではなく実地疫学調査だけでは感染の判断が難しかったが、VNTR型が異なったことでmからnへの感染ではないことが判明した。これらのことから、VNTR解析は感染事例の感染源究明において非常に有用な疫学指標と考えられた。

今後は、VNTR解析を結核対策に役立てるため、県内の結核菌分離株について、JATA(12)-VNTRにJATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加えた方法で解析を行い、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, 石井 学, 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(3), 岡山県環境保健センター年報, 35, 73-77, 2011
- 3) 和田崇之, 長谷 篤: 結核菌の縦列反復配列多型性(VNTR)解析に基づく分子疫学とその展望, 結核, 85, 845-852, 2010
- 4) 前田伸司, 和田崇之, 岩本朋忠: 国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型(VNTR)分析法: 日本細菌学雑誌, 65, 201, 2010
- 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