

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 (5)

大島律子・河合央博・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 (5)

Application to epidemiological investigation with
DNA database of *Mycobacterium tuberculosis* (5)

大畠律子・河合央博・中嶋 洋 (細菌科)

Ritsuko Ohata, Hisahiro Kawai and Hiroshi Nakajima (Department of Bacteriology)

要 旨

岡山県では、平成11年度から結核蔓延状況の把握及び感染源・感染経路の究明、二次感染の予防等、結核対策に資するため、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24年度は、Variable number of tandem repeats (VNTR) 解析法により、散発事例や家族内感染疑い1事例および大学内の感染疑い1事例について、感染源究明のための解析を行った。

[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

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)}。結核菌の遺伝子型別法については、JATA(12)-VNTR解析法（以下JATA(12)-VNTR）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）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）が報告されている^{4), 5)}。本県でも平成20年度にJATA(12)-VNTRを導入し、平成23年度には JATA(15)-VNTRとHV-VNTRを導入して、JATA(12)-VNTRで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を確認した²⁾。

今回、VNTR解析結果のデータベースを活用して、結核の散発事例や、家族内感染疑い1事例および大学内の感染疑い1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24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、大学内の感染疑い事例の2株および家族内感染疑い事例の2株と、以下の条件に該当した散発事例50株の

計54株が搬入され、VNTR解析を実施した。

- (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

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」と略す）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54株でJATA(12)-VNTR³⁾を実施し、JATA(12)-VNTR型が54株中または723株のJATA(12)-VNTR型が登録されているデータベース中の株と一致した場合は、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。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

表1に平成24年度に調査した事例の概要について示した。

家族内感染疑い1事例(事例1)および大学内の感染疑い1事例(事例2)の2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24年度に解析した結核菌54株のVNTR型を、図1に示した。

54株のVNTR解析の結果、JATA(12)-VNTRでは2～5株を含む6組のクラスターが形成され、15株が含まれた(クラスター形成率27.8%) (図1 ①～⑥)。これらのクラスターを、JATA(15)-VNTR及びHV-VNTRで解析したところ、JATA(15)-VNTRのみではクラスター②と⑤で一部増幅されない部位があった他は全て一致したが、HV-VNTRを加えると、クラスター③と⑤が異なった(クラスター形成率20.4%)。なお、クラスター②(事例1)に含まれるNo.1461は、JATA(12)-VNTRのprimer 5領域、JATA(15)-VNTRのprimer QUB 11aおよびETRA領域が増幅されなかったが、HV-VNTRで一致し、No.1460とNo.1461が分離された患者は家族であるという疫学的背景から、同一型株と判断した。

54株のVNTR型をデータベース中の他株と比較したところ、JATA(12)-VNTRでは54株中14組16株で一致する株があったが、JATA(15)-VNTR及びHV-VNTRを加えて解析すると、クラスター⑤と⑥を含む6組7株がデータベース中の13株と一致した(図1 矢印i～vi)。これらの解析により、平成24年度末現在のデータベース登録株数は、JATA(12)-VNTR型が777、JATA(15)-VNTR型及びHV-

VNTR型が421となった。

i～viの中で、特にiとivは、大阪市などで報告されている多発性大規模感染株のJATA(12)-VNTR型と一致した⁴⁾。iは発病当時県南部に居住していた54歳の患者から分離された結核菌株であるが、いずれも県南部に居住していた平成17年発病の45歳患者分離株及び平成21年発病の46歳患者分離株と一致した。ivは発病当時県南部居住の86歳の患者分離株であるが、同じ市内に居住していた平成12年発病の62歳患者分離株と一致した。iiは発病当時県北居住の59歳の患者分離株であるが、平成17年発病の34歳患者分離株及び平成20年発病当時県南部居住の55歳の患者分離株と一致した。iiiは発病当時県南部居住の54歳の患者分離株であるが、平成16年発病当時県南部居住の73歳の患者分離株と一致した。vは発病当時県北部居住の82歳と83歳の患者分離株であるが、平成17年発病当時県南居住の28歳の患者分離株と一致した。viは発病当時県南部居住の55歳の患者分離株であるが、いずれも県南部に居住していた平成15年発病の58歳、平成15年発病の50歳、平成15年発病の年齢不詳、平成18年発病の56歳、平成19年発病の45歳および平成23年発病の81歳患者分離株の計6株と一致した。これらi～viの6組7株と一致したデータベース中の13株とは、いずれも菌が分離された患者間の接点を見出すことができなかった。

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は家族内感染が疑われた事例で、患者a、bから分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したため、家族内感染と推測された。事例2は、同じ大学で学年・学部も同じ学生c、dが同時期に結核を発病し、大学内での感染が疑われたため、両者から分離された結核菌DNAのVNTR解析を実施したところ、VNTR型が一致した。しかし、疫学調査からは両者の接点を見出すことはできなかった。

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	1460	K	a	88	2011/2/15	2011/1/4	一致	患者aとbは家族で、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。
	1461		b	62	2011/6/21	不明		
2	1476	O	c	22	2012/2/23	不明	一致	患者cとdは同じ大学の学生で学年・学部が同じで、両者から分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したが、他に接点が見つからず、両者間の感染と断定することはできなかった。
	1477	O	d	23	2012/5/23	症状無し		

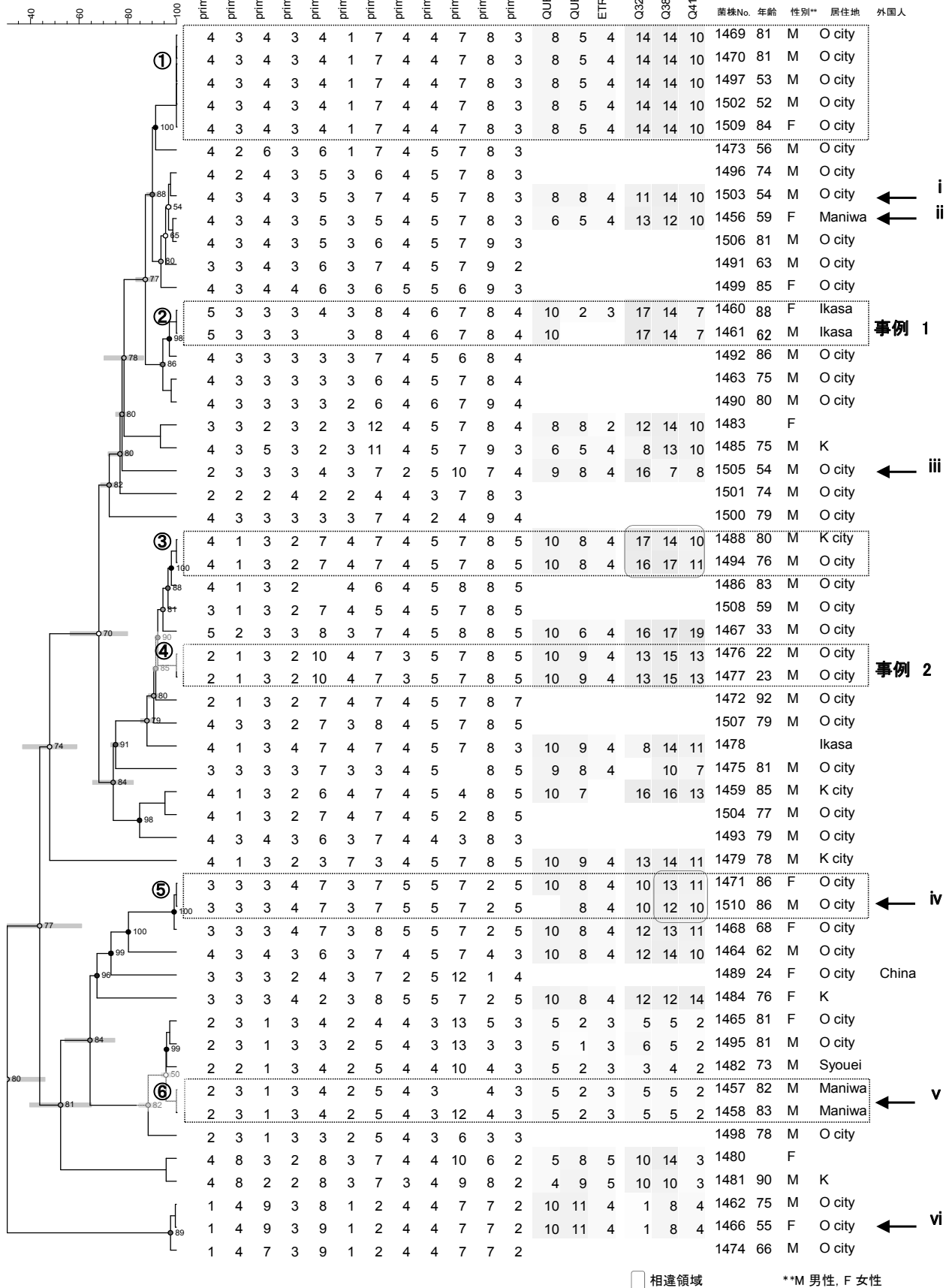


図1 平成24年度に解析した結核菌54株のVNTR型

4 考 察

54株のVNTR解析の結果、JATA(12)-VNTR単独ではクラスター形成率は27.8%であったが、JATA(15)-VNTRとHV-VNTRを加えると20.4%になったことから、JATA(12)-VNTRにJATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加える方法の有用性が再確認された。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、事例1および2を除いたクラスター①と⑥では、患者間の関連性が不明であった。これらの患者はクラスター①の2名以外は80歳以上の高齢者であり、過去の再燃なども考えられ、感染源は不明であった。

54株のVNTR型とデータベース中の他株との比較について、i～viの6組7株とデータベース中の13株とが一致し、いずれも患者間の接点が見出せなかったが、ivで高齢の患者同士であった以外は、20～50歳代の患者を含んでおり、これらの患者は過去の再燃ではなく最近感染したと考えられるため、何等かの接点が潜んでいる可能性が考えられた。しかし、空気感染という特殊な感染様式をとり、感染から発病までの期間が長い結核では、このような潜在的な接点を見出して感染源を究明することの困難さが改めて認識され、疫学調査の大きな課題であると思われた。

感染事例の感染源を究明した結果、事例1ではVNTR型が一致して家族内感染が裏付けられたが、事例2では、VNTR型一致により保健所の疫学調査で詳細な検討がなされたにもかかわらず、患者間に同じ大学の学年・学部が同じという以外の接点が見出せず、患者間の感染を確定できなかった。この事例についても、何等かの共通の感染源が潜んでいる可能性が高いが、空気感染という感染様式が感染源究明を困難にさせていると思われた。

以上のことから、結核菌のDNA解析では、JATA(12)-VNTRにJATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加える方法の有用性が再確認されたが、この方法でVNTR型が一致しても、患者間の関連性を見出すことはかなり難しいことが判った。この課題を克服するためには、結核の特殊な感染様式を考慮に入れた実地疫学調査が重要であると思われた。

今後も、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(4), 岡山県環境保健センター年報, 36, 75-78, 2012
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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