

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)

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(3)

Application to epidemiological investigation with
DNA database of *Mycobacterium tuberculosis* (3)

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、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22年度は、Restriction fragment length polymorphism (RFLP)解析およびVariable number of tandem repeats (VNTR)解析を実施し、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、RFLP解析法およびVNTR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)}。RFLP解析法は、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。VNTR解析法は、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。従来、解析能力の高いRFLP解析法が世界的標準法であったが、操作が煩雑で長時間を要し、解析結果が画像で示されるため検査機関間でのデータの比較が難しいことが欠点であった。そのため、操作が簡単で結果を数値化できるVNTR解析法の標準化が検討され、RFLP解析法と同等の解析能力を持つ標準法として、2008年にJATA(12)-VNTR解析法が確立された³⁾。当県でも、平成20年度からJATA(12)-VNTR解析法の導入を開始し、平成22年度は、78株を解析してRFLP解析結果との比較によりその有用性を検討し、集団感染事例を含む4つの感染事例の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22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78株が搬入された。

- 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

これらのうち、十分なDNA量が得られた67株でRFLP解析を行い、全株でVNTR解析を実施した。

(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

67株のRFLP解析は定法^{4),5)}に従って実施し、RFLPパターンのクラスター解析は、解析ソフトBioNumerics ver6.5 (APPLIED MATHS)を用いてUPGMA法で行った。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登録した。平成22年度末現在、1126株が登録されている。

(5) VNTR解析

全78株でVNTR解析を実施した。VNTR解析は、

前田らの方法³⁾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解析法を用いた。

(6) 事例の感染源究明

2つの集団感染事例(表1 事例1と事例2)、院内感染が疑われた1事例(表1 事例3)および施設内感染が疑われた1事例(表1 事例4)の4事例について、患者から分離された結核菌のDNA解析により感染源を検討した。

3 結果

(1) RFLP解析結果

67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18株(26.9%)であった(図1)。

67株中、パターンが一致したのは⑤および事例2の2組5株であった。

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、4株が一致した(図1 ①, ②, ③, ④)。

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	616	K	a	68	20020516	不明	一致	未実施	2010年3月に発病した患者cは、2002年5月に結核登録され、同年6月に死亡した患者bの接触者健診対象者であった。患者c分離株の遺伝子型をデータベース中のb分離株と比較したところ一致し、cの感染源は8年前接触したbと推測された。一方、患者aはbの家族でbからの感染と判明しており、他にbの接触者1名が発病し、2名が感染していた。従って、cの発病により、集団感染*の定義に該当する事例となった。
	630	K	b	63	20020515	不明			
	1277	O	c	73	20100511	20100300			
2	1285		d	75	20101028	20100700	一致	一致	患者d,e,f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、分離株の遺伝子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。
	1287	K	e	41	20090714	20090700			
	1342		f	61	20101224	不明			
3	1279		g	64	20100629	不明	相違	相違	患者g,h,i,jはX病院から転院後、転院先で相次いで結核発病が判明したため、X病院での院内感染が疑われた。しかし、4名からの分離株の遺伝子型は全て異なっていたため、それぞれ別の感染源と考えられた。
	1343	K	h	86	20101102	不明			
	1344		i	91	20101117	20101025			
	1347		j	75	20100823	不明			
4	1246	T	k	85	20100403	20090300	一致	一致	患者kとlはY病院またはY病院関連施設内で接触があった。また、患者mはk,lとY病院関連施設内の同じフロアで食事する等の接触があった。3名からの分離株の遺伝子型が一致したため、3名はY病院またはY病院関連施設内で感染したと考えられた。
	1247	M	l	92	20100525	不明			
	1353	M	m	86	20110201	不明			

*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患者数を計算する。

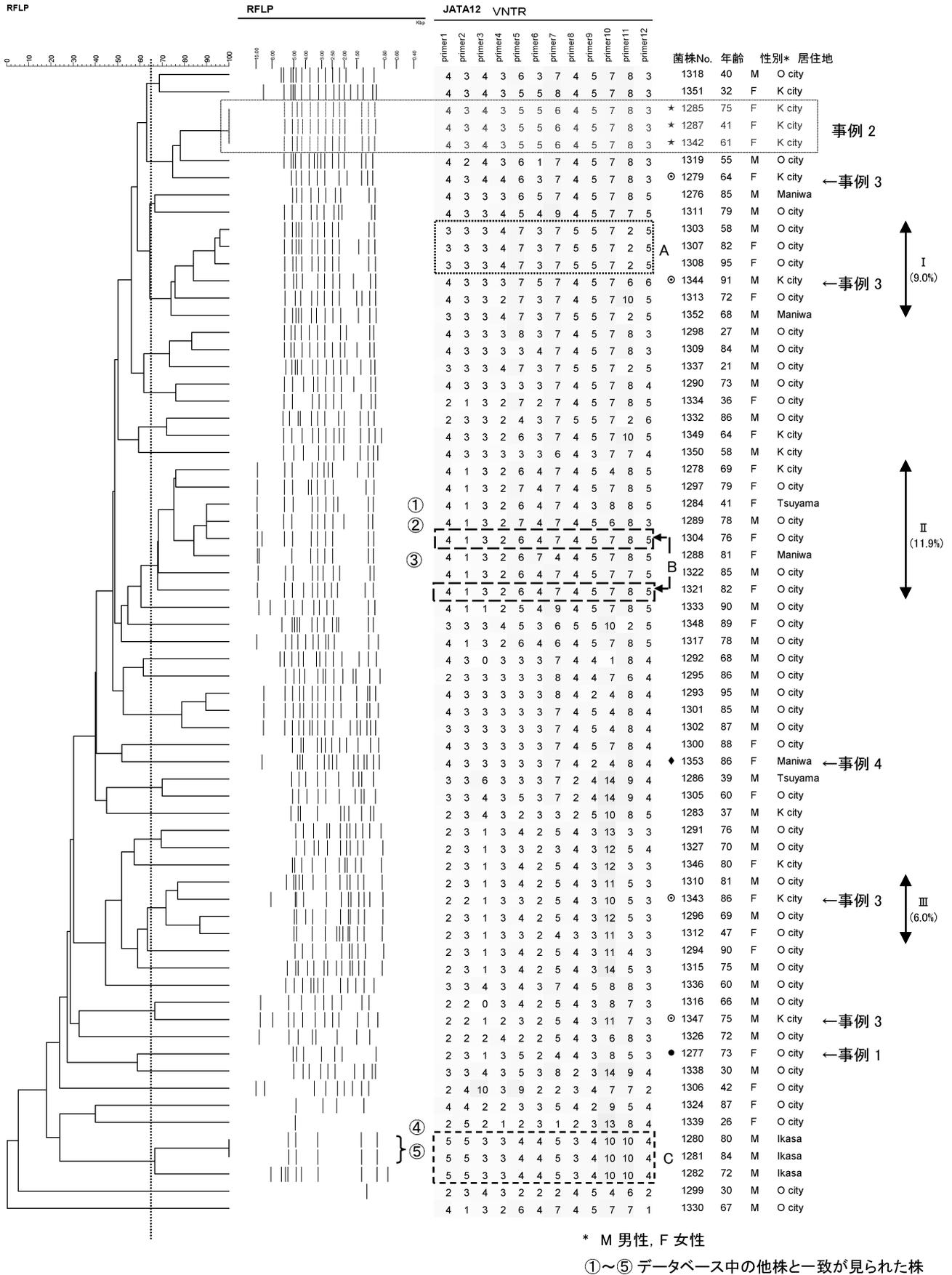


図1 H22年度に解析した結核菌67株のRFLPパターンの系統樹およびVNTR型

(2) VNTR解析結果

78株のVNTR解析の結果、集団感染事例(表1 事例2)を含む5組15株が一致した。78株のうち、RFLP解析ができた67株では、RFLPパターンが一致した⑤および事例2ではVNTR型も一致したが、VNTR型が一致した株間でRFLPパターンが異なった株も3組8株認められた(図1 A, B, C)

(3) 事例の検討結果

事例1は、患者cからの分離株の遺伝子型が8年前の接触者bの分離株と一致し、感染源はbと推測された。この事例では8年前のbの接触者健診で患者aを含む2名の発病と2名の感染が確認されており、患者cの発病により、8年を経過して集団感染となった。事例2は、同一施設の入所者3名からの分離株の遺伝子型が一致し、施設内感染と考えられた。この施設では他に初発患者1名と感染者3名が確認されており、集団感染となった。事例3は、同じ病院から転院した患者4名がそれぞれ結核を発病したため院内感染が疑われたが、4名からの分離株の遺伝子型が異なり、それぞれ別の感染源と判明した。事例4は、同じ病院あるいはその関連施設で接触のあった3名からの分離株の遺伝子型が一致したため、3名の患者は同一感染源から院内感染または施設内感染したものと考えられた。(表1)

4 考察

67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18株(26.9%)存在し、主要な感染源となっていることが推測された。

67株中、データベースに登録されている過去の菌株とRFLPパターンが一致した①、②、③および④について、一致株との関連性を検討した。①は2組4株の家族内感染を含む8株と一致したが、県内で多く見られる流行株のパターンに含まれるため偶然一致の可能性もあり、関連性は不明であった。②と一致した株は、②の患者とは離れた地域に居住する高齢者から10年前に分離された株であり、③と一致した株も③の患者とは離れた地域に居住する高齢者から8年前に分離された株であった。④は、日本人に多く見られRFLP解析では解析能が低い1本バンドのパターンで、RFLPデータベース中の過去に解析した18株と一致したが、これらのうち、VNTR型が判明している11株とは型が異なった。また、

その他の7株はいずれも7年以上前に④の患者とは離れた地域に住む高齢者から分離された株であった。これらのことから、②、③および④では一致した株間の関連性は低いと考えられた。

67株中、パターンが一致した⑤は、同じ病院の患者からの分離株であり院内感染または検査室内汚染が疑われたが、保健所の疫学調査の結果、患者一人は寝たきりで病院内での両者の接点がないことと、検査センターでの菌検査では検体搬入日が1日異なり安全キャビネットは使用後消毒してUV照射していることから院内感染および検査室内汚染の両方とも否定された。⑤のRFLPパターンは、流行株とは異なり特徴的で、RFLPデータベース中の他株との一致も見られなかったため、共通の感染源の可能性が否定できず、患者の年齢(80歳と84歳)と居住地から、過去に同じ感染源から感染し年月を経て同一時期に発病したことが推測された。また、⑤とRFLPパターンが65%以上の類似性を示し、VNTR型が一致したNo.1282は、⑤と同一起源の菌が遺伝子変異した後にNo.1282に感染した可能性が考えられた。

78株のVNTR解析の結果、VNTR型が一致した5組15株では、集団感染事例(表1 事例2)を除く4組12株の患者の関連性は見いだせなかった。RFLP解析ができた67株との比較では、RFLPパターンとVNTR型は概ね相関していたが、RFLPパターンが一致した株間ではVNTR型も一致したのに反して、VNTR型が一致した株間でRFLPパターンが異なった株が見られたことから(図1 A, B, C)、RFLP解析法がVNTR解析法よりも僅かに解析能が高い可能性が示唆された。しかし、VNTR解析法は少量のDNAしか得られなかった菌株でも解析可能で迅速な結果還元につながり、疫学調査上非常に有効な手段であるため、今後、両法の比較株数を増やしてVNTR解析法の解析能について詳細な検討を行う予定である。

事例の感染源究明では、今回の4事例において遺伝子解析は非常に有用であった。特に、事例1は初発患者および接触者の感染・発病から8年を経過して「集団感染」に該当したが、遺伝子解析を実施しなければ感染源の究明には至らなかったと思われる。遺伝子解析の普及により今後このような事例が増えることが予想されるが、このような事例と多くの患者が2年以内に発病する通常の「集団感染」とでは疫学調査や患者への対応等も異なる

ため、結核の「集団感染」の定義を改めて検討する必要があると思われた。

文 献

- 1) 大畠律子, 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) 大畠律子, 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(2), 岡山県環境保健センター年報, 34, 69-72, 2010
- 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) 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, 853-857, 1994
- 5) 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