

## 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(6)

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 (6)

Application to epidemiological investigation with  
DNA database of *Mycobacterium tuberculosis* (6)

大島律子, 河合央博, 中嶋 洋 (細菌科)

Ritsuko Ohata, Hisahiro Kawai, 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 25 年度は、Variable number of tandem repeats (VNTR) 解析法により、散发事例や家族内感染疑い 1 事例について、感染源究明のための解析を行った。また、感染伝播力の強さや薬剤耐性との関連から注目されている北京遺伝子型株の分離状況についても調査した。

[キーワード：結核菌，データベース，VNTR解析，北京型]

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

### 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<sup>1), 2)</sup>。結核菌の遺伝子型別は、国内標準法として提唱されている JATA (12)-VNTR 解析法 (以下「JATA (12)-VNTR」という。)を用いて実施し<sup>3)</sup>、さらに、JATA (12)-VNTR の型別能力を補うために、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。)と 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。)を加えて精度の向上を図っている<sup>4), 5)</sup>。今回は、結核の散发事例や家族内感染疑い 1 事例について、感染源の究明を行った。

結核菌の遺伝子型については、東アジアの分離株の多くを占め、世界の分離株の約 3 割が属し<sup>6)</sup>、我が国でも分離株の 7~8 割が属する北京型株 (Beijing genotype strain) が、結核対策上重要である<sup>7)</sup>。北京型株は、感染伝播力が強く、薬剤耐性との関連性が高いことが報告されており<sup>8)</sup>、さらに、新興型 (modern type) と祖先型

(ancient type) に区分され、新興型株は、祖先型株よりも感染伝播力が強く発病し易いと言われている<sup>9)</sup>。我が国の北京型株分離状況の特徴としては、他の国では新興型株が 7 割以上を占めているのに対して、祖先型株が 8 割程度を占めていることと<sup>7)</sup>、若年者層の結核患者から新興型株が多く分離されることがあげられる<sup>10)</sup>。若年者層の結核患者では、その発病のほとんどが、過去の再燃ではなく現在の流行状況を反映しているため、特に新興型株の動向に注目する必要がある。これらのことから、平成 25 年度は、従来の遺伝子型の異同による型別に加えて、北京型株の検出及び新興型と祖先型の区分も実施し、データベースに追加した。

### 2 材料及び方法

#### 2.1 平成 25 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、家族内感染疑い事例の 2 株と、以下の条件に該当した散发事例 53 株の計 55 株が搬入され、重複する 1 株を除く 54 株で 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及び第56条の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, 結核菌VNTRハンドブック(地研協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループ編 第一版2012年)の「菌懸濁液の加熱死菌上清の作成方法」に準じて行った。

## 2.4 VNTR解析

全54株でJATA(12)-VNTR<sup>3)</sup>を実施し, JATA(12)-VNTR型が54株中または945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 ver 7.1(APPLIED MATHS)を用いた。

## 2.5 事例の感染源究明

家族内感染疑い1事例(事例1)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(表1)。

## 2.6 北京型と他の遺伝子型の区別

北京型と他の遺伝子型の区別は, Warrenらの方法<sup>11)</sup>に従って実施した。

## 2.7 北京型株における新興型と祖先型の区分

新興型と祖先型の区分は, Mokrousovらの方法<sup>12)</sup>に従って実施した。

## 3 結果

### 3.1 VNTR解析結果

平成25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2~3株を含む4組のクラスターが形成され(①~④), 9株が含まれた(クラスター形成率16.7%)。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のみでは全て一致したが, HV-VNTRを加えると, クラスター②が異なった(クラスター形成率11.1%)。

54株のVNTR型をデータベース中の他株と比較したところ, 7組9株がJATA(12)-VNTR, JATA(15)-VNTR及びHV-VNTR全てで一致した(矢印i~vii)。i~viiの中で, iとviはそれぞれデータベース中の1株と一致しており, 患者の居住地が同じ地域であったため, 現在関連性が調査されているところである。iiは, 50歳代の患者由来株2株と80歳代の患者由来株2株の4株と一致したが, これらの患者6名は同じ市内に居住し, 1年程度の間に届出がされており, 20歳代の患者も含まれていたことから, 患者間に関連性が疑われたが, 接点を見出すことはできなかった。iiiとvは, それぞれデータベース中の2株と一致したが, 双方とも流行株の遺伝子型であり, 発病時期が離れていることや居住地が遠いことなどから偶然一致の可能性が高いと思われた。ivは, 20歳代の患者2名から分離された2株と一致したが, これら4名の患者はいずれも20歳代で県南部に居住し,

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	1543	K	a	50	2013/8/26	不明	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型が一致したので, aからbへの感染と考えられた。
	1544	K	b	56	2013/11/18	症状無し		

1年程度の期間内に結核と診断されているため、関連性が強く示唆されたが、接点は不明であった。viiは、届出当時40歳代～50歳代の5名の患者由来株を含む7株と一致した。これら8名の患者は10年程度の間に散発的に届出られており、接点は見出せなかった。

### 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。

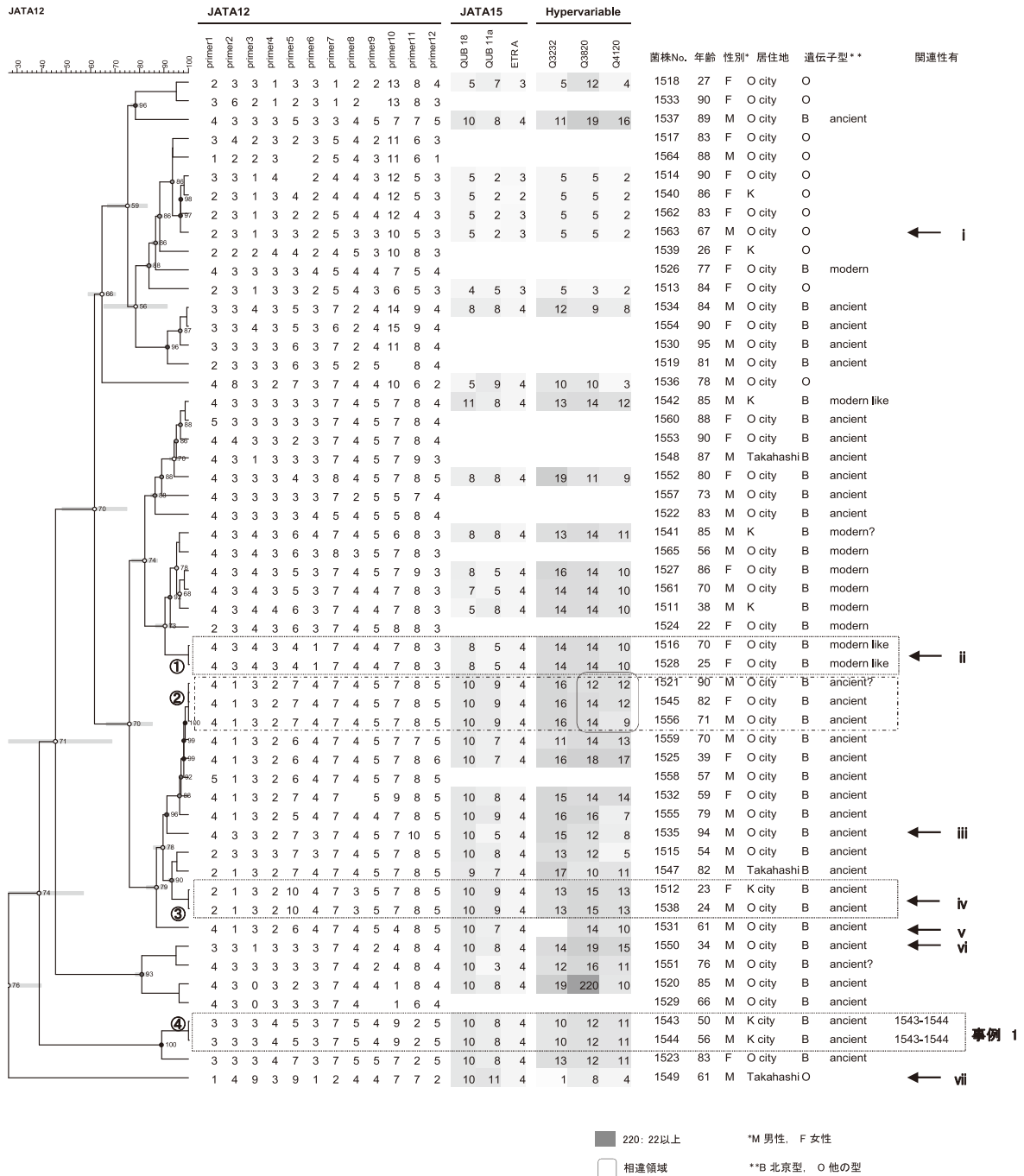


図1 平成25年度に解析した結核菌54株のVNTR型

### 3.3 北京型と他の遺伝子型の区別および北京型株における新興型と祖先型の区分

結果は、表2に示すとおりであった。

54株中42株が北京型を示し(77.8%)、うち、新興型が10株(23.8%)で祖先型が32株(76.2%)であった。北京型株の分離状況を患者の年齢別で見ると、60歳より若い患者では新興型が30.8%で60歳以上では20.7%であり(図2)、若年者層の患者において、祖先型よりも新興型の割合が高い傾向が見られた。

また、クラスター①は、データベース中の4株と一致して6株のクラスターを形成したが、6株とも全て新興型に属していた(図1)。

### 4 考察

54株のVNTR解析の結果、JATA(12)-VNTRにJATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加えて一致した株のうち、事例1以外は患者間の関連性が不明であった。それらの中で、特にiiとivは、両方とも1年程度の期間内に全ての患者が結核と診断されており、若年者層の患者が含まれていることや居住地域が広範囲ではないことから、何等かの接点が潜んでいると考えられたが、明らかにすることができなかった。このような潜在的な接点をいかにして見出して感染源を究明するかが、疫学調査の大きな課題であると思われた。これを克服するためには、空気感染という結核の特殊な感染様式を考慮に

表2 北京型株の分離状況

患者の年齢	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-	total	%
新興型	0	2	1	0	1	0	3	3	0	10 (23.8%)	
北京型 祖先型	0	2	2	0	5	2	5	11	5	32 (76.2%)	
小計	0	4	3	0	6	2	8	14	5	42 (100%)	77.8
他の型	0	2	0	0	0	2	1	5	2	12	22.2
合計	0	6	3	0	6	4	9	19	7	54	100.0

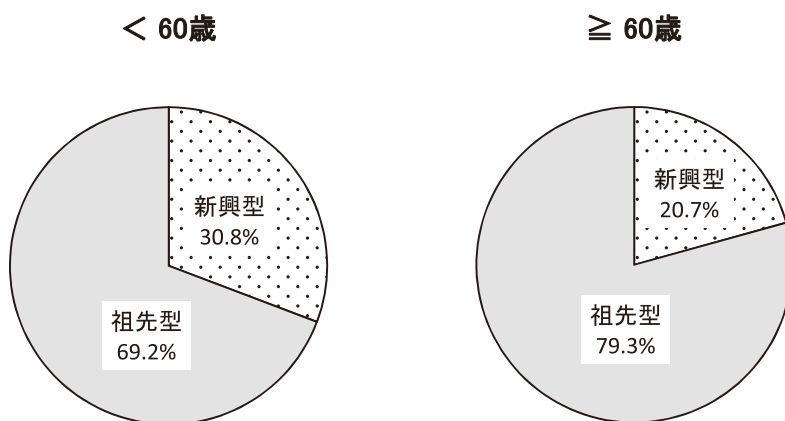


図2 患者の年齢別北京型株分離状況

入れ、どのような患者情報が有用であるかを十分検討する必要があると思われた。

北京型の分離状況では、77.8%が北京型に属しており、全国的な調査結果(73.8%)および過去に実施した県内の結果(72.5%)と大きな違いは無かった<sup>7), 13)</sup>。北京型株における新興型と祖先型の区分では、調査した株数が少ないものの、新興型は、若年者層の結核患者において多く分離される傾向を示した。また、データベース中の株とともに6株からなるクラスター①(ii)を形成していたことから、その感染力の強さも示唆された。従って、新興型の動向を調査することは、結核対策上重要であると考えられた。

今後も、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、併せて北京型株の分離状況を調査することでデータベースの充実を図り、結核対策に役立てる予定である。

## 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(5), 岡山県環境保健センター年報, 37, 89-92, 2013
- 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
- 6) Abebe F, Bjune G: The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low-level protection by bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccines: is there a link?, Clin Exp Immunol, 145, 389-397, 2006
- 7) 岩本朋忠: 結核菌分子疫学研究的将来展望, 結核, 84, 789-791, 2009
- 8) Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN: Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains, Trends Microbiol, 10, 45-52, 2002
- 9) Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy C. R. E, et al.: A Recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is Associated with an increased ability to spread and cause disease, J Clin Microbiol, 45, 1483-1490, 2007
- 10) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, et al.: Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan, J Clin Microbiol, 47, 3340-3343, 2009
- 11) Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, et al.: Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen, Am J Respir Crit Care Med, 169, 610-614, 2004
- 12) Igor Mokrousov I, Jiao WW, Valcheva V, Vyazovaya A, Otten T: Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-Based inverse PCR, J Clin Microbiol, 44, 2851-2856, 2006
- 13) 大島律子, 多田敦彦: 岡山地区で分離された結核菌におけるBeijing familyおよび他の遺伝子型, 結核, 79, 47-53, 2004