

## 結核菌 DNA 解析調査モデル事業における VNTR 法を用いた解析

徳島県立保健製薬環境センター

石田 弘子・嶋田 啓司

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* using VNTR analysis

Hiroko ISHIDA and Keiji SHIMADA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

### 要 旨

徳島県では2013年1月から結核対策に役立てることを目的として「結核菌 DNA 解析調査モデル事業」が開始された。そこで、2014年3月までに搬入された結核菌20株のVNTR法による解析結果についてまとめた。さらに、VNTR結果が完全に一致、あるいは1領域違いであった2グループについて、保健所の実地疫学調査と併せて検討を行った。

Key words : 結核菌 *Mycobacterium tuberculosis*, 反復配列多型分析 VNTR

### I はじめに

結核は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)によって引き起こされる感染症で、感染症法において二類感染症に指定されている。国内では、未だに年間2万人の新規患者の届出や集団感染事例の報告もあり問題となっている。

徳島県における結核罹患率は全国平均よりも高く、平成24年の厚生労働省の統計では全国で4番目に多い県となっている<sup>1)</sup>。結核の制圧には感染の連鎖を断ち切ることが重要である。そのため、患者調査を主体とした疫学調査に加え、結核菌の遺伝子型別を行うことによって感染源・感染経路の究明を行い、結核対策へ活用することが、結核の低蔓延状況さらには根絶へとつながることが期待される。

徳島県では、2013年1月から結核患者から分離された結核菌について、VNTR法による分子疫学的解析を行うことで感染源・感染経路の究明を行い、結核の二次感染予防等結核対策に役立てることを目的として、結核菌DNA解析調査モデル事業をスタートさせた。本事業では、図1に示す医療機関・行政・保健製薬環境センターの連携を確認し全県実施に向けて体制を整備するため、対象は県内の結核医療機関1施設と管轄保健所で実施した。

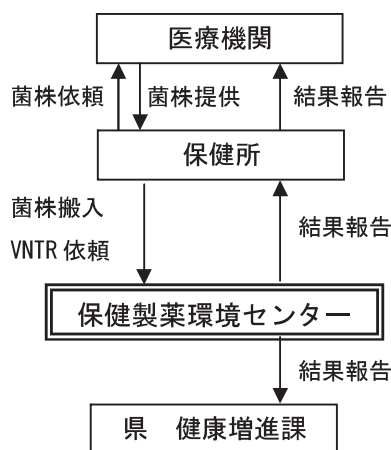


図1 モデル事業における各機関との連携

本報では、結核菌DNA解析調査モデル事業で搬入された菌株について、VNTR法を実施し解析を試みたので報告する。

### II 材料と方法

#### 1 材料

2013年1月から2014年3月までに結核菌DNA解析調査モデル事業により搬入された結核菌20株を対象とした。

## 2 方法

### ① テンプレートDNAの調整

小川培地で搬入された菌株については、1コロニーを蒸留水200 µlに懸濁し、100°C、10分間の加熱処理後、10000 rpmで5分間遠心した上清をテンプレートDNAとした。

発育インジケーター付液体培地で搬入された検体については、小川培地で培養した後、上記と同様に処理しテンプレートDNAを作製した。

### ② VNTR法

前田ら<sup>2),3)</sup>の方法に従い、JATA12 および JATA15 で用いられている15領域に超多変領域(HV)である QUB3232、V3820、V4120 の3カ所の領域を加えた18領域についてVNTR法を実施し、換算表からコピー数を算出した。

### ③ 結核菌の北京型、非北京型分類

Warren ら<sup>4)</sup>の方法に従い、PCR法により北京型及び非北京型の分類を行った。

## III 結果及び考察

### 1 県内で分離された結核菌株のVNTR法による解析

県内で分離された20株について、各領域の繰り返し数を解析結果として表1に示した。はじめに、JATA12の12領域(JATA(12)-VNTR)を比較したところ、20菌株のうちV7・V8グループ、V13・V15グループの2組で一致した。さらに、追加領域を加えた18領域(JATA(15)+HV(3)-VNTR)を比較したところ、V7・V8グループでは完全に一致、V13・V15グループでは1領域(HV3232)違いであった。このように、18領域(JATA(15)+HV(3)-VNTR)の解析は、12領域(JATA(12)-VNTR)の解析より詳細に菌株を識別した。このことから、VNTR法では、はじめに12領域(JATA(12)-VNTR)を比較し、必要に応じて18領域を実施する手順が効率的と思われる。

次に、これらのVNTR結果と保健所の実地疫学調査から感染経路について検討したところ、V7・V8グループでは、子(40才代)から親(80才代)への家族内感染の可能性が高いと推測されたが、子の感染源については特定できなかった。

また、1領域(HV3232)違いであったV13・V15についても検討したが関連性は見出せなかった。

### 2 県内で分離された結核菌株の北京型、非北京型数

県内で分離された20株について、北京型、非北京型の分類を行ったところ、北京型15株、非北京型5株であった(表1)。

今回解析を行った菌株数は少ないが、国内における結核菌の遺伝的系統では結核菌北京型株が7~8割を占めるとの報告<sup>5)</sup>があり、県内においても北京型株が多い傾向となった。北京型株は他の遺伝系統と比べて、感染伝播力が優れている、薬剤耐性と関連性が高い、BCG接種による免疫の影響を受けにくいとの研究報告<sup>6)</sup>もあり、県内分離株とこれらの特性との関係については今後の検討課題である。

## IV まとめ

2013年より開始された結核菌DNA解析調査モデル事業で搬入された結核菌20株についてVNTR法を実施し解析を試みた。

今後、県内の結核罹患率減少を図るために分子疫学的解析を活用し、結核対策を効率的でかつ効果的に転換するために、県全域を対象としたVNTR法の検査体制およびデータベース化を確立していきたい。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、検体の提供、搬送にご協力いただいた医療機関及び保健所の関係者の方々に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省：平成24年結核登録者情報調査年報集計結果(概況)
- 2) 前田伸司,他：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,2008,83:673-678.
- 3) 和田崇幸,長谷篤：結核菌の縦列反復配列多型(VNTR)解析に基づく分子疫学とその展望.結核,2010,85:845-852.
- 4) Warren R.M. *et al.*:Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen,Am J Respir Crit Care Med. ,2004,169,610-614.
- 5) 岩本朋忠：結核菌北京型がファミリーの集団遺伝学的解析から推察される日本国内定着型遺伝系統群の存在と遺伝系統別薬剤耐性化傾向の違い.結核,2009,84:755-759.
- 6) Bifani PJ,*et al.*:Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. Trends Microbiol, 2002,10,45-52.

表1 VNTR法による各領域の繰り返し数

菌株 No.	JATA (12)												JATA (15)			HV			北京 型 別
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	3232	4120	3820	
V3	4	2	4	3	6	1	7	4	5	7	8	3	8	8	4	14	17	12	B
V4	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	10	12	12	B
V5	3	4	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	11	12	11	B
V6	2	3	1	3	2	2	5	3	3	12	3	3	5	2	3	5	6	2	N
V7	6	3	3	3	3	3	7	4	2	4	8	4	10	8	4	17	14	8	B
V8	6	3	3	3	3	3	7	4	2	4	8	4	10	8	4	17	14	8	B
V9	5	8	3	2	8	3	7	4	4	10	10	2	5	9	6	10	13	3	N
V10	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	3	10	8	4	16	14	10	B
V11	4	3	3	3	7	3	5	4	4	7	9	3	10	8	3	15	10	8	B
V12	4	3	2	3	6	3	7	3	4	7	9	3	8	N	4	12	19	10	B
V13	4	8	2	2	7	3	7	4	4	10	6	2	5	9	5	10	13	3	N
V14	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	7	5	10	7	4	18	14	12	B
V15	4	8	2	2	7	3	7	4	4	10	6	2	5	9	5	11	13	3	N
V16	4	3	0	3	3	3	7	4	4	1	8	4	10	8	4	15	>20	10	B
V17	1	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	8	4	17	15	5	B
V18	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	12	14	10	B
V19	2	3	4	3	6	3	8	4	5	7	8	3	8	8	4	>20	14	10	B
V20	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	8	5	3	12	14	10	B
V21	2	2	0	3	N	2	5	4	3	8	7	3	3	N	3	11	5	4	N
V22	2	3	3	3	9	3	7	2	5	10	9	4	10	8	4	12	9	8	B

B: 北京型 N: 非北京型