

徳島県における VNTR 法を用いた結核菌 DNA 解析調査 (2014)

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 in Tokushima Prefecture (2014)

Hiroko ISHIDA and Keiji SHIMADA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

徳島県では、結核の感染拡大防止において結核菌の分子疫学情報を結核対策に役立てることを目的として、2013年度から「結核菌 DNA 解析調査モデル事業」として variable numbers of tandem repeats (VNTR)法による解析を試みている。2014 年度には、結核患者の対象を一部の地域から県内全域に広げ、本格的に結核菌の分子疫学解析を開始した。そこで、2014 年度に搬入された結核菌 42 株の VNTR 法による解析結果についてまとめた。さらに、VNTR 結果が一致したグループについては、保健所の実地疫学調査も併せて、感染源・感染経路の検討を行った。

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。厚生労働省の平成26年結核登録者情報調査年報集計結果(概況)¹⁾によると、国内では未だに約2万人の新規結核患者の登録があり、結核により2000人を超えて命を落としている。徳島県の新規結核登録患者数は、平成17年の195名から平成26年の124名へと漸減してきているが、喀痰塗抹陽性肺結核患者は年間60名前後で推移している。(図1)

近年、結核集団感染事例の感染経路などを解明するために、結核菌の遺伝子型別法としてVNTR が用いられている。これは、結核菌ゲノム上にある遺伝子の繰り返し領域での繰り返し数を測定することによって分類する方法である。本県では、2013年度に一部の結核患者を対象にVNTR法による分子疫学解析を開始し、2014年度から県内全域の結核患者から分離された結核菌について実施している。これにより、従来の患者調査を主体とした実地疫学調査と菌株からの情報を合わせることによって、感染源・感染経路の究明や結核の二次感染予防等の結核対策に活用し、結核の感染拡大防止において役立

っている。

本報では、2014年4月～2015年3月までに結核菌DNA解析調査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。

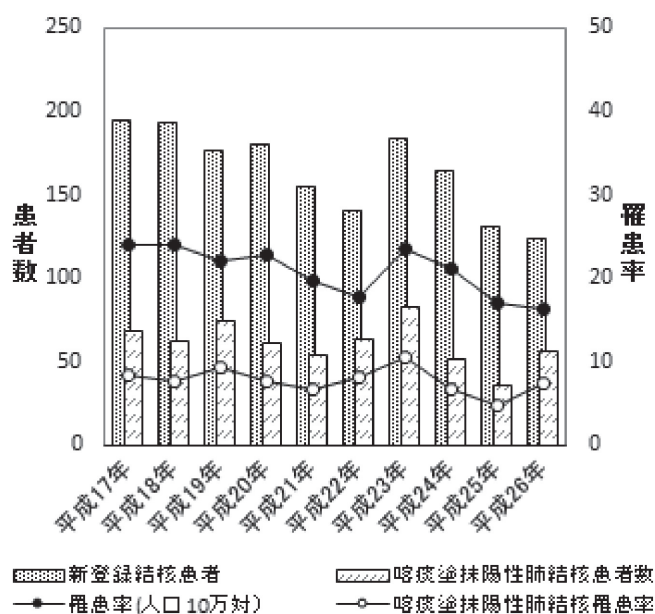


図1 結核患者年次推移

II 材料と方法

1 材料

2014年4月から2015年3月までに結核菌DNA解析調査事業により搬入された結核菌42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 μ lに懸濁し、100℃、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 結核菌の北京型、非北京型分類

Warren ら²⁾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。

③ VNTR解析

前田ら^{3),4)}の方法に従い、JATA12の12領域(JATA(12)-VNTR)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(JATA(15)+HV(3)-VNTR)について実施し、換算表からコピー数を算出した。結果については、解析ソフト「BioNumerics ver 7.1」を用いて解析した。

III 結果及び考察

1 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42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35株、非北京型7株であった。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⁵⁾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。

2 県内で分離された結核菌株のVNTR法による解析

平成26年度に解析した42株について各領域の繰り返し数を算出し、昨年実施した結果⁶⁾と併せて検討した。

はじめに、JATA(12)-VNTRの実施結果についてWard法により解析した(図2)。今回新たに解析した42菌株のうち7株が2株以上からなるクラスターを形成し、3グループ(A,B,C)に分かれた。この3グループの株についてJATA(12)-VNTRに6領域追加したJATA(15)+HV(3)-VNTRを実施し、追加した領域の結果を表1に示した。Aグループは5株から形成されたが、追加した領域を比較すると2~3領域の繰り返し数が異なっていた。Bグループは2株から形成され追加した領域を比較すると一致した。Cグループは3

株から形成され追加した領域を比較すると1株(No. 2013_112)は1領域(HV3232)違いであったが、他の2株については一致した。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。

次に、JATA(15)+HV(3)-VNTRによる18領域の結果が一致したB,Cグループについて、保健所の実地疫学調査から感染源・感染経路について検討した。B,Cグループの患者はすべて同じ保健所管内の居住者であったが、明らかな関連性は確認できなかった。この要因として、実地疫学調査における限界(患者間に接触があったが見つけることが出来なかった可能性)とVNTR法の限界(異なる菌株であるが同一と判定した可能性)が考えられた。

IV まとめ

2014年度に結核菌DNA解析調査事業で搬入された結核菌42株についてVNTR法を実施し、過去に実施した株も含め解析を試みた。今後、VNTR法による解析を継続して実施し、県内の結核罹患率減少を図るため、実地疫学調査に菌株からの分子疫学的情報を加え伝播経路を分析するツールとして活用し、将来の結核対策に役立てたい。

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26年結核登録者情報調査年報集計結果(概況)
- 2) Warren R.M. *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
- 3) 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*, 83, 673-678, 2008
- 4) 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*, 85, 845-852, 2010
- 5) Bifani PJ, *et al.*: Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.*, 2002, 10, 45-52.
- 6) 石田弘子, 嶋田啓司：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年報, 4, 19-21, 2014

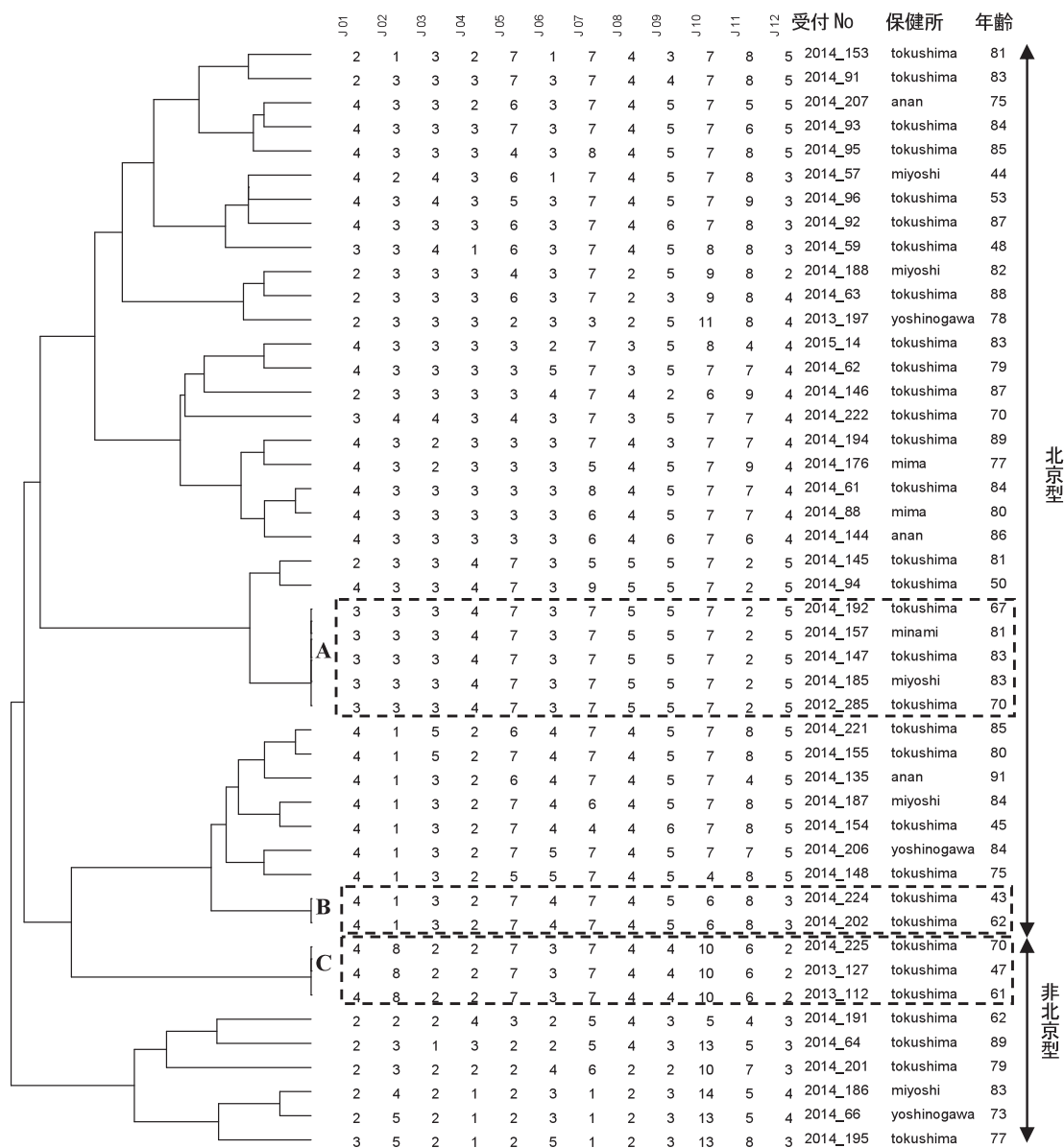


図2 JATA (12)-VNTR 法による解析結果

(* 昨年分については、クラスターとなった株のみ記載)

表1 JATA (15)+HV (3)-VNTR 法による解析結果

(A)	受付 No	J13	J14	J15	V3232	V3820	V4120	(C)	受付 No	J13	J14	J15	V3232	V3820	V4120
	2014_147	10	8	4	10	12	12		2014_225	5	9	5	10	13	3
	2014_157	10	8	4	13	12	10		2013_112	5	9	5	11	13	3
	2014_185	10	8	1	13	12	11		2013_127	5	9	5	10	13	3
	2014_192	9	8	4	10	12	11								
	2012_285	7	8	4	13	12	9								
(B)	受付 No	J13	J14	J15	V3232	V3820	V4120								
	2014_202	10	9	4	16	14	12								
	2014_224	10	9	4	16	14	12								

(A) : A グループ, (B) : B グループ, (C) : C グループ

(JATA (12)-VNTR と共通の領域については省略)