

結核菌感染事例における VNTR 法を用いた 分子疫学解析 (2011)

永井佑樹, 岩出義人, 伊東抄代子*,
三浪綾子*, 島田晃秀*, 坂井温子**, 片山正彦, 山口哲夫

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* using VNTR analysis (2011)

Yuhki NAGAI, Yoshito IWANE, Sayoko ITO, Ayako MINAMI,
Akihide SHIMADA, Haruko SAKAI, Masahiko KATAYAMA, and Tetsuo YAMAGUCHI

H23年県内で発生した結核菌感染2事例において反復配列多型(Variable Numbers of Tandem Repeats; VNTR)法を用いた分子疫学解析を実施した。その結果, 事例1では異なる保健所管内でH20年とH23年に発症した患者2名のVNTRデータが同一パターンを示し, 分子疫学解析により疫学的関連性を裏付ける結果となった。また, 事例2では, 疫学的に関連性が高いと考えられた外国人2名の由来菌株が, それぞれ異なるパターンを示し, この2名の患者は異なる感染源由来であることが明らかとなった。今回実施したVNTR法は, 迅速性と簡便性に優れ, デジタル化情報として再現性や互換性もあることから, 迅速な行政対応が求められる集団感染発生時等において極めて有用な方法であると思われる。

キーワード: 結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*), 分子疫学, VNTR

はじめに

結核患者が発生した時の感染源の追求や感染経路の解明には, 接触者検診等の積極的疫学調査が実施されるが, 個々の患者から結核菌が分離された場合, それぞれの菌の同一性が重要な問題となる。同一の菌による感染かどうかを判定するには遺伝子型別が実施されるが, 結核菌では近年, 結核菌の遺伝子中に存在する反復配列の数を株同士で比較するVNTR法が利用されるようになってきている。このVNTR法は制限酵素断片長多型(Restriction fragment length polymorphism; RFLP)法に比べ, 簡便で迅速に結果が得られ, 非常に有用な方法とされている。また近年, 日本国内の株を型別するのに有用な方法として, (Japan Anti-Tuberculosis Association) JATA-VNTR法が標準法として提唱されており, 全国的な普及が期待されている^{1, 2)}。そこで今回, 我々はH23年に県内で発生した2事例においてVNTR法を用いた分子疫学解析を実施したので報告する。

方 法

1. 結核感染事例発生の経緯

事例1: 患者A(56歳男性)は, H20年3月に体調不良にて医療機関を受診し, 肺結核(G10号)と診断され治療を開始した(鈴鹿保健所登録)。H21年4月に治療を終了し, その後再発はない。患者B(46歳男性)は患者Aと同じ職場勤務で, H20年6月の接触者健診で胸部所見はなかったがQFT(±)となり潜在性結核として治療を開始した(四日市市保健所登録)。その後, 治療を自己中断していたが, H23年3月に風邪症状により, 医療機関を受診し, 肺結核(G3号)と診断され治療を再開した。その時の調査により, 患者Bは患者Aと兄弟でもある事が判明し, 発病時期は異なるが, 双方の疫学的関連が強く疑われたため, 遺伝子解析を実施した。

事例2: 患者C(31歳女性)はH23年1月頃から咳などの症状がみられ, 症状が悪化したため5月に松阪市内の医療機関を受診し肺結核(G2号)と診断された。患者D(27歳女性)は, 6月の職場健診で要精検となり, 7月に肺結核(気管支洗浄液培養陽性)と診断された。患者Cと

*松阪保健所

**鈴鹿保健所

表1. 事例1,2における各菌株(A)~(D)のコピー数

JATA No.	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	J13	J14	J15
locus	Mtub	MIRU	Mtub	Mtub	QUB	VNTR	MIRU	QUB	MIRU	QUB	QUB	QUB	QUB	QUB	ETR-
	04	10	21	24	11b	2372	26	15	31	3336	26	4156	18	11a	A
(A):2008274	4	1	3	2	7	4	7	4	4	7	8	2	9	9	4
(B):2011082	4	1	3	2	7	4	7	4	4	7	8	2	9	9	4
(C):2011105	2	2	0	3	3	2	5	4	2	7	8	3	0	5	4
(D):2011106	4	3	3	3	7	4	7	4	5	4	8	4	10	8	4

additional loci	2401	3690	802	4348	1644	2531	580	3007	577	3239
	Mtub	Mtub	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	MIRU	ETR-	ETR-
	30	39	40	39	16	23	4	27	C	F
(A):2008274	4	3	3	3	3	5	2	3	4	3
(B):2011082	4	3	3	3	3	5	2	3	4	3
(C):2011105	2	1	2	2	3	5	4	2	4	3
(D):2011106	4	3	3	3	3	2	2	3	4	3

患者Dは共に中国の湖北省出身でH21年9月に一緒に来日し、同じ寮で生活し職場も同じであった。

2. 検体およびDNA抽出

H23年に発生した2事例(事例1,2)において分離された結核菌株を用い、高橋らの方法³⁾に従いISOPLANT(NIPPON GENE)によりDNA抽出を行い検体とした。

3. VNTR解析

多重反復配列領域のうち、JATA12およびJATA15-VNTR法で用いられている15領域を対象とした^{1,4)}。さらに追加領域として当所で実施している10領域(MIRU4, 27, 40, 39, 16, 23, ETR-C, F, Mtub30, 39)と超多変(HV: Hyper-variable)領域(QUB3232, V3820, V4120)を加え、計28領域でVNTR解析を実施した⁵⁾。方法は各菌株のゲノムDNAをtemplateに、それぞれのプライマーとEx Taq HS version(Takara)を用いたPCR法で増幅を行い、PCR産物の増幅サイズから、コピー数を測定した。

4. 北京型、非北京型の分類

Warrenらの方法⁶⁾に従い、PCRにより北京型および非北京型の分類を実施した。さらに北京型に分類された株を対象にWadaらの方法⁷⁾に従ってNTF regionへのIS6110挿入の有無によりancientあるいはmodern typeに細分類した。

結果

事例1: 事例1における分子疫学解析の結果、これら2名の菌株A, BにおいてJATA15の15領域でコピー数が一致し、さらに25領域の解析でもコピー数が全て一致した(表1, 図1)。また超多変領域であるHV領域でもコピー数が一致

したことから、この2名の菌株は同一由来の株である可能性が極めて高いと判断された。さらに系統分類の結果A, Bの株はともに北京型であり、その中でも日本に多いとされるancient typeであることが確認された。

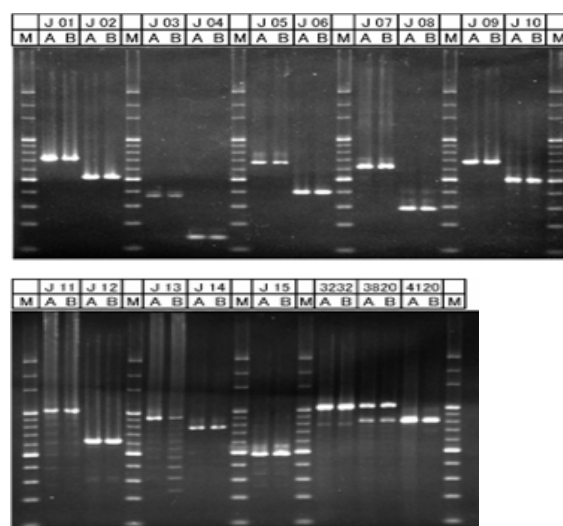


図1. 事例1における各VNTR領域の泳動結果

事例2: 本事例の分子疫学解析の結果、患者2名由来の菌株C, Dにおいて15領域でコピー数が一致したのはJ4(Mtub24), J8(QUB15), J11(QUB26), J15(ETR-A)の4領域のみであり、28領域での解析の結果でも7領域でのみの一致であった(表1, 図2)。

その結果、疫学的には関連性が高いと思われたこれら2名の菌株は、異なる株である可能性が高い結果となった。またCの株は非北京型であったのに対して、Dの株は北京型のancient typeであり、系統分類においても異なるタイプであることが明らかとなった。

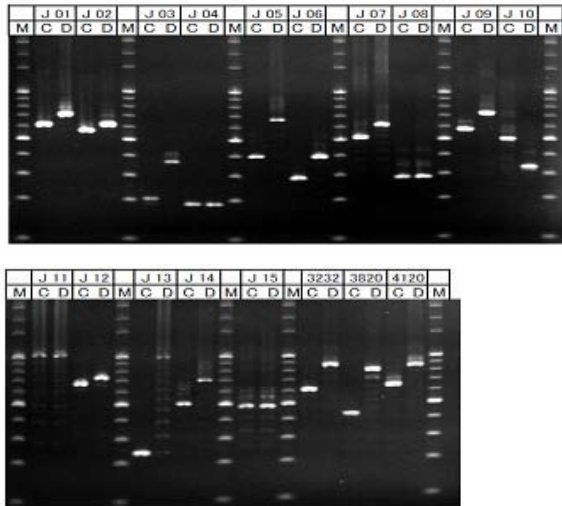


図 2. 事例 2 における各 VNTR 領域の泳動結果

考 察

事例 1 では、異なる保健所管内で H20 年と H23 年に発病した同一職場に勤務する兄弟（別居）が VNTR 解析により同一パターンを示し、疫学的関連性が裏付けられた。VNTR 解析は、過去の菌株との比較も容易となるため、発病時期が異なることが多い結核菌の遺伝子型別法として有用であることが明らかとなった。

事例 2 は、疫学的には関連性が高いと考えられた外国人患者の菌株がそれぞれ異なるパターンを示し、この 2 名の患者は異なる感染源由来であることが明らかとなった。中国のように罹患率の高い地域では、若年者の感染例も多く、感染源、感染経路の特定が非常に難しくなる。また、日本の北京型と異なり外国で分離される北京型は modern type が多く、このタイプは感染・伝播力が強いいため若年者で集団感染を起こしやすいことが報告されている⁷⁻¹⁰⁾。三重県でも県内分離株の約 70% が北京型に分類され、そのうち約 15% が modern type であることが明らかとなっている^{5, 11)}。これらはいずれも散発事例で、これまで県内では modern type の北京型による集団感染事例等は報告されていないが、今後も高蔓延国から、国内の株とは異なった新たなタイプの結核菌既感染者の流入も予想されるため警戒が必要である。

今回の事例では VNTR 法により 7~10 日で遺伝子型別解析が可能であった。従来の RFLP 法に比べ迅速性の高い VNTR 法は迅速な行政対応が求められる集団感染発生時等において極めて有用であると思われる。また、VNTR 法は系統分類のデータを加味することで、感染力や薬剤

耐性化傾向などの菌株の特徴をも推定しうることから、接触者健診等の積極的疫学調査への活用も期待できる。今後も県内分離株の VNTR データを蓄積し、現場へフィードバックすることにより、結核根絶を目指した新たな結核対策を展開することが可能になるものと思われる。まずは県全域での VNTR データの有効活用のため、医療機関、保健所、保健環境研究所が連携して、患者の人権と個人情報保護法も踏まえ、うえで VNTR 法の検査体制およびデータベース化を確立していくことが必要であると思われる。

文 献

- 1) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 菅原 勇, 加藤誠也 (2008) : 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.
- 2) Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, et al (2009): Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 57:873-880.
- 3) 高橋光良 (1999) : ISOPLANT による結核菌 DNA の簡易抽出. WAKO BIO WINDOW ; No19: 9.
- 4) 和田崇之, 長谷篤(2010) : 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.
- 5) Nagai Y, Iwade Y, Hayakawa E, et al., (2012): Molecular Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in Mie prefecture, Japan, using Variable Numbers of Tandem Repeats Analysis. Jpn J Infect Dis; 65:341-344.
- 6) Warren R M, Victor TC, Streicher EM, et al (2003): Patients with Active Tuberculosis often Have Different Strains in the Same Sputum Specimen. Am J Respir Crit Care Med ; 169: 610-614.
- 7) Wada T, Iwamoto T, Maeda S. (2009):Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. FEMS Microbiol Lett; 291:35-43.
- 8) Maeda S, Wada T, Iwamoto T, et al., (2010):Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* isolated from throughout Japan: phylogeny and genetic features. Int J Tuberc Lung Dis; 14:1201-1204.
- 9) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, et al.,

- (2009): Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. *J Clin Microbiol*; 47:3340-3343.
- 10) Mokrousov I, Ly HM, Otten T, et al., (2005): Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography. *Genome Res*; 15:1357-1364.
- 11) 永井佑樹, 岩出義人, 中野学, 坂井隆, 田沼正路, 片山正彦(2011) : VNTR法を用いた結核菌の分子疫学解析(2007-2009). 三重県保健環境研究所年報; No56: 30-33.