

JATA(12)-VNTR結核菌型別解析法の検討と京都府分離菌株の解析結果

浅井 紀夫 平田 佐知 真田 正稔 鷺見 舞^{*1} 堀 忍^{*1} 中村 清康^{*2}
和田 崇之^{*3} 長谷 篤^{*4}

Examination of JATA(12)-VNTR Method on Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from People in Kyoto Prefecture

Norio ASAI Sachi HIRATA Masatoshi SANADA Mai SUMI^{*1} Shinobu HORI^{*1}
Kiyoyasu NAKAMURA^{*2} Takayuki WADA^{*3} Atsushi HASE^{*4}

京都府保健環境研究所における行政検査としてJapan Anti-Tuberculosis Association(12)-VNTR(以下「JATA(12)-VNTR」という。)型別解析を実施するための手法を検討し、完成したプロトコルに基づき、京都府で分離された60菌株について解析し、さらに実地疫学調査を行うことにより、JATA(12)-VNTRが結核行政に有用であることを報告してきた¹⁾²⁾。しかし、このプロトコルでは、反復数が多い場合には高分子量領域における解析が困難であり、結果の信頼性についての課題が残った。そこで、アガロースゲル電気泳動槽の検討を行った結果、バイオラッド製Sub-Cell[®]GT泳動槽を用い、泳動時間を360分とすることで全領域を正しく解析できることが確認された。修正したプロトコルに基づき、2013年4月～2014年3月に当所で分離・保存した菌株43株(山城北保健所管内31菌株、丹後保健所管内12菌株)について解析を行った。既報²⁾で報告した60菌株のデータとも併せて検討した結果、10菌株で構成されるクラスターが1つ、5菌株で構成されるクラスターが1つ、4菌株で構成されるクラスターが3つ、3菌株で構成されるクラスターが3つ、2菌株で構成されるクラスターが8つ、およびクラスターを構成しない菌株に分類された。本報で試験した43株に関連する10個のクラスター型について実地疫学調査を行った。山城北保健所管内および丹後保健所管内の両方の菌株で構成されるクラスターは5つあり、いずれも和田らの分類した阪神地区において出現頻度の高いJATA(12)-VNTR型別に一致したが、個別の感染経路については解明できなかった。一方、山城北保健所管内あるいは丹後保健所管内のいずれか一方のみの菌株で構成されるクラスターも5つあり、これらは地域特性が高いと推測された。このうち2事例については感染経路が判明し、感染症対策に結びついた。

キーワード：結核菌、VNTR、JATA(12)-VNTR、分子疫学、反復数、実地疫学調査

key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Variable Number of Tandem Repeats, Japan Anti-Tuberculosis Association(12)-VNTR, Molecular epidemiology, Repeat number, Field epidemiological survey.

はじめに

菌の潜伏期間が長く、早期発見が困難な結核感染症の対策において、分子疫学的手法が感染経路の解明に重要視されることから、著者らは行政検査としてJapan Anti-Tuberculosis Association (12)-VNTR (以下「JATA (12)-VNTR」という。)結核菌型別解析法を導入するためのプロトコルを検討し、2004年4月～2012年3月に当所で分離・保存した菌株および2012年4月～2013年3月に新たに入手した菌株の合計60菌株について解析を行い、得られた結果に基づいて実地疫学調査し、感染拡大防止対策などの結核行政に有用な科学的根拠を与えられることを見出した²⁾。使用したプロトコルは、Supply^ら³⁾がメカニズムを提唱し、前田^ら⁴⁾が日本で分離される菌株に適用可能な方法として確立したものを京都府保健環

境研究所で行うために工夫したもの²⁾である。しかし、この方法では反復数が多い場合には高分子量域における解析が困難となり、結果の信頼性に問題が見られた。判別不能時には測定後のゲルの再泳動、再染色、再解析を行い、正しい結果が得られるまでこの操作を繰り返す必要があった。実験系は複雑になり、エチジウムブロマイドによる危険性も危惧された。これらを回避するために1検体に数台の電気泳動槽を用い、同じ検体を様々な泳動時間で泳動し、結果を得てから最も解析に適したデータを選択する方法を検討したが、同じ検体を異なった泳動時間で多通りの泳動を行うと、作業量が極端に増え、業務の混乱に繋がる恐れのあることが判明した。さらに、検体数が増加した場合にはそれに見合った泳動槽の追加補充と検査担当者の増員が必須であると考えられた。多くの検体を処理するために、電気泳動の代わりにシーケンサーや自動電気泳動装置を使用することで検査体制を保持している研究所もあるが、これらの方法は多額の初期投資等の負担が必要となっている。

アガロースゲル電気泳動にはアドバンスト製Mupid-2plus電気泳動槽を使用し、通常120分の泳動時間を設定していた。この電気泳動槽は安価ではあるがゲルトレイ長が6cmしかなく、長時間の電気泳動に対応できない欠点がある。そこで、

(平成26年6月10日受理)

*1 京都府山城北保健所

*2 京都府丹後保健所

*3 長崎大学熱帯医学研究所

*4 大阪市立環境科学研究所

我々はゲルトレイ長が15cmのバイオラッド製Sub-Cell[®]GT電気泳動槽を用いて、360分間の泳動を行うことによりアドバンスト製Mupid-2plus電気泳動槽では解析できなかった高分子量域の解析の可能性について検討した。

改良した方法を用いて2013年4月～2014年3月に新規登録された結核患者から入手した43菌株（山城北保健所管内31菌株、丹後保健所管内12菌株）について解析を行った。

材料と方法

1. 供試菌株

2013年4月～2014年3月に新規登録された結核患者から入手した43菌株（山城北管内31菌株、丹後管内12菌株）を用いた。

2. 実験方法

2-1. Template DNAの調製

既報²⁾と同様にして Template DNAの調製を行った。

2-2. 使用プライマー

既報³⁾と同様のプライマーを使用した。

2-3. PCR

既報³⁾と同様にしてPCRを行った。サーマルサイクラーはPerkin Elmer製 GeneAmp PCR9700を用い、20 μ Lスケールで実験を行った。

2-4. アガロースゲル電気泳動

アガロースゲルは3.0%アガロースゲル（Nusieve 3:1 Agarose, Lonza製）を用いた。電気泳動後、エチジウムブロマイド染色後、UV照射下でJATA1～JATA12の領域におけるバンドの分子量を算出し、前田ら⁴⁾の示した表を用いて反復数を算出した。泳動槽にアドバンスト製Mupid-2plus電気泳動槽を用いる場合は検体ごとに50V、120分および50V、240分の電気泳動を行った。一方、バイオラッド製Sub-Cell[®]GT電気泳動槽を用いる場合は、50V、360分電気泳動した。

3. 実地疫学調査

実地疫学調査は各クラスター型別に、発症時期、発症地域、患者の個人情報や行動等から、患者同士の接触について調査し、感染経路を検討した。調査・検討には既報¹⁾で報告した60菌株との関連についても行った。

結果

1. 電気泳動槽の検討

高分子量領域の判定が課題となった菌株のうち菌株番号63の泳動結果を示す。アドバンスト製Mupid-2plus電気泳動槽を用いて120分アガロースゲル電気泳動した結果を写真1に、240分泳動した結果を写真2に、バイオラッド製Sub-Cell[®]GT電気泳動槽を用いて泳動した結果を写真3にそれぞれ示す。アドバンスト製Mupid-2plus電気泳動槽を用い、120分泳動した時に

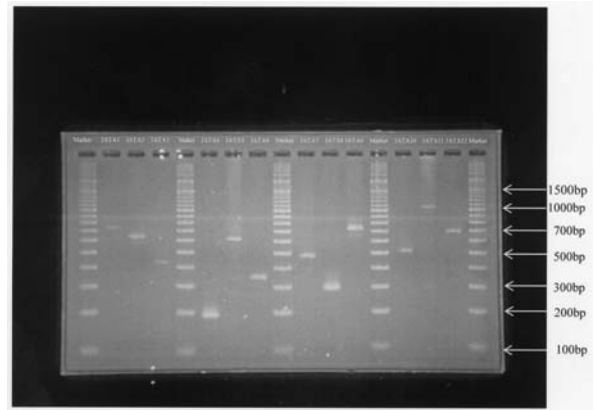


写真1. 菌株番号63のミュピッド製電気泳動槽を用いた泳動結果（120分泳動）

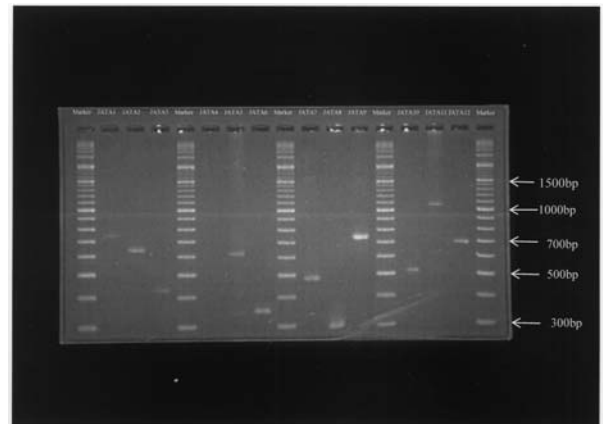


写真2. 菌株番号63のミュピッド製電気泳動槽を用いた泳動結果（240分泳動）

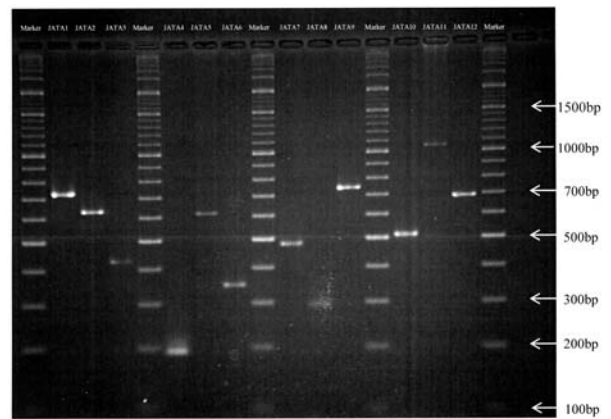


写真3. 菌株番号63のバイオラッド製サブセル[®]GT電気泳動槽を用いた泳動結果（360分泳動）

はJATA11の高分子量領域の解析が困難であった。写真1からはJATA11の反復数が8（1056bp）であるか、9（1167bp）であるかの判断が困難である。泳動時間を240分とした場合には、反復数を8と決定することはできたが、低分子量領域のバンドは消失しており、マーカーも300bpより高分子量領域バンドしか残らなかった。一方、バイオラッド製Sub-Cell[®]GT電気泳動槽では低分子量領域から高分子量領域までのすべての領域で正確な反復数の判定が可能であった。

上記のように、両方の電気泳動槽を用いて菌株番号61～74について比較・検討した結果、いずれもバイオラッド製Sub-

Cell[®]GT電気泳動槽を用いた方が正確な解析が可能であったため、菌株番号75以降はバイオラッド製Sub-Cell[®]GT電気泳動槽のみで実験を行った。

2. JATA (12)-VNTR型別と事例解析

アガロースゲル電気泳動槽にバイオラッド製Sub-Cell[®]GT電気泳動槽を用いたプロトコルで、供試菌株43菌株についてJATA (12)-VNTR型別を行った結果を菌株番号、発生地域、JATA (12)-VNTR型別の反復数、およびクラスター型を表1に示す。菌株番号は既報¹⁾で報告した菌株番号に続きNo61～No103とした。発生地域は菌株の患者所在地を管轄する保健所名で示した。JATA (12)-VNTR型別の反復数はJATA1～

JATA12の各領域の反復数を「,」で区切り列挙した。クラスター型はJATA1～JATA12の全領域で反復数が一致した菌株を同じクラスター型として分類した。既報²⁾で報告した60菌株と併せて検討し、既報で分類したクラスター型と同一型の場合は既報で定義したクラスター型に、異なる型の場合は既報で報告したアルファベットに続いてj～pで示した。11領域で反復数が一致した場合はアルファベットの右肩にダッシュあるいはダブルダッシュをふり、同じアルファベットのクラスター型に準ずる菌株とした。

10菌株で構成されるクラスターが1つ、5菌株で構成されるクラスターが1つ、4菌株で構成されるクラスターが3つ、3菌株で構成されるクラスターが3つ、2菌株で構成されるクラス

表1. JATA(12)-VNTR型別とクラスター型分類

| 菌株番号(No.) | 発生地域 | JATA(12)-VNTR型別 | クラスター型* |
|-----------|------|------------------------------------|---------|
| 61 | 山城北 | 4, 3, 2, 2, 7, 3, 7, 4, 5, 7,10, 5 | |
| 62 | 山城北 | 4, 3, 1, 3, 4, 5, 7, 3, 5, 8, 7, 4 | j |
| 63 | 山城北 | 4, 3, 3, 3, 4, 5, 7, 3, 5, 8, 7, 4 | j' |
| 64 | 山城北 | 2, 5, 1, 1, 1, 3, 1, 2, 3,12, 9, 4 | |
| 65 | 山城北 | 2, 3, 2, 3, 2, 4, 6, 2, 2,10, 7, 4 | |
| 66 | 山城北 | 4, 1, 3, 2, 7, 4, 7, 4, 5, 7, 5, 5 | |
| 67 | 山城北 | 4, 3, 4, 3, 6, 3, 4, 4, 5, 7, 8, 3 | |
| 68 | 山城北 | 4, 4, 3, 2, 7, 3, 7, 4, 5, 7, 6, 6 | |
| 69 | 山城北 | 4, 1, 3, 2, 6, 4, 7, 4, 5, 7, 8, 5 | k, h' |
| 70 | 丹後 | 4, 1, 3, 2, 6, 3, 7, 4, 5, 4, 6, 3 | |
| 71 | 丹後 | 4, 1, 3, 2, 7, 4, 7, 4, 5, 7, 8, 4 | h'' |
| 72 | 丹後 | 4, 3, 3, 3, 7, 3, 5, 4, 5, 7, 8, 3 | |
| 73 | 丹後 | 2, 2, 2, 4, 3, 2, 5, 4, 3, 3, 6, 3 | l |
| 74 | 丹後 | 2, 2, 1, 3, 4, 2, 5, 3, 4,12, 4, 3 | c |
| 75 | 山城北 | 4, 3, 2, 3, 3, 3, 7, 4, 5, 7, 9, 4 | |
| 76 | 山城北 | 4, 3, 3, 3, 5, 3, 8, 4, 5, 7, 8, 5 | |
| 77 | 山城北 | 4, 3, 4, 3, 7, 3, 8, 4, 5, 7, 8, 3 | |
| 78 | 丹後 | 4, 3, 5, 3, 3, 3, 7, 4, 5, 3, 8, 5 | m |
| 79 | 山城北 | 3, 3, 1, 3, 6, 3, 5, 2, 6,11,10, 4 | |
| 80 | 山城北 | 4, 1, 3, 2, 6, 4, 7, 4, 5, 7, 8, 5 | k, h' |
| 81 | 山城北 | 4, 3, 3, 2, 7, 3, 7, 4, 5, 7, 7, 5 | |
| 82 | 山城北 | 4, 3, 4, 3, 8, 3, 7, 4, 5, 7, 8, 3 | e |
| 83 | 丹後 | 4, 1, 3, 2, 6, 4, 9, 4, 5, 7, 8, 5 | k' |
| 84 | 丹後 | 2, 2, 2, 4, 3, 2, 5, 4, 3, 3, 6, 3 | l |
| 85 | 山城北 | 2, 3, 1, 3, 3, 2, 5, 4, 3,10, 5, 3 | |
| 86 | 山城北 | 4, 3, 3, 3, 7, 3, 7, 4, 4, 7, 8, 5 | n |
| 87 | 山城北 | 2, 3, 1, 3, 3, 2, 5, 4, 2,11, 5, 3 | |
| 88 | 山城北 | 4, 1, 3, 2, 7, 4, 7, 4, 5, 7, 8, 5 | h |
| 89 | 山城北 | 4, 3, 3, 3, 7, 3, 7, 4, 5, 7, 8, 5 | n' |
| 90 | 山城北 | 4, 2, 3, 3, 3, 3, 7, 4, 4, 7, 8, 4 | |
| 91 | 山城北 | 3, 2, 3, 3, 3, 2, 7, 4, 2, 4, 8, 4 | |
| 92 | 山城北 | 4, 3, 4, 3, 6, 3, 7, 4, 4, 7, 8, 3 | o |
| 93 | 山城北 | 4, 3, 4, 3, 5, 3, 7, 4, 5, 7, 8, 3 | e' |
| 94 | 山城北 | 2, 2, 1, 3, 4, 2, 5, 4, 3,12, 4, 3 | |
| 95 | 山城北 | 4, 1, 3, 2, 7, 4, 6, 3, 5, 7, 8, 5 | p |
| 96 | 山城北 | 4, 9, 3, 2, 4, 3, 7, 4, 4,10, 7, 2 | |
| 97 | 丹後 | 4, 3, 4, 3, 6, 3, 7, 4, 4,10, 8, 3 | o' |
| 98 | 山城北 | 2, 3, 1, 3, 4, 2, 5, 4, 3,11, 5, 3 | |
| 99 | 山城北 | 4, 3, 3, 3, 2, 3, 6, 4, 3, 7, 7, 4 | |
| 100 | 山城北 | 4, 1, 3, 2, 8, 4, 7, 4, 5, 7, 8, 3 | |
| 101 | 丹後 | 2, 2, 2, 2, 3, 2, 3, 4, 3, 7, 8, 3 | |
| 102 | 丹後 | 3, 3, 3, 3, 5, 3, 7, 2, 5,10, 6, 4 | |
| 103 | 丹後 | 3, 3, 3, 3, 3, 2, 7, 3, 2, 4, 8, 4 | |

* JATA(12)-VNTR反復数が一致した株を同じアルファベットで分類し、同一のクラスター型とした。また、11領域で一致したものはアルファベットの右肩にダッシュあるいはダブルダッシュの記載をし、同じアルファベットのクラスター型に準ずる株とした。クラスター型は既報¹⁾で報告した60菌株と併せて検討し既報で分類したクラスター型と同一の場合は既報で定義したクラスター型を示した。

ターが8つ、およびクラスターを構成しない菌株に分類された。今回、実験に用いた43株が関連するクラスター型c、e、h、j、k、l、m、n、o、pについて菌株番号、発生地域、患者間の関連性および和田ら⁹⁾の分類した阪神地区において出現頻度の高いJATA (12)-VNTR型別 (以下「和田らの分類」という)の調査を行った。結果を表2に示す。

クラスター型e、h、k、nおよびoはいずれも山城北管内および丹後管内の両管内の菌株が含まれており、和田らの分類のJ₁₂-0006、J₁₂-0003、J₁₂-0007、J₁₂-0004、およびJ₁₂-0016に一致した。実地疫学調査の結果、クラスター型hの中でNo40とNo56が感染関係の疑いのあることが判明した以外、いずれのクラスター型においても、患者間の関連性は解明されず、感染経路は把握できなかった。

一方、クラスター型c、j、l、mおよびpについてはいずれも、丹後管内あるいは山城北管内の一方の菌株で構成されており、和田らの分類のどの型にも一致しなかった。これら5クラスター中の2クラスターにおいて、実地疫学調査により感染経路が解明され結核対策へ結びついた。以下に詳細を示す。

クラスター型lの事例では、2人が同室にいた期間が2日間のみであったため、当初、当該保健所は感染が成立する状況ではないと判断し、それぞれの感染経路について調査を続けていた。しかし、JATA (12)-VNTR型別の結果、2人の中で感染の疑いが濃厚になったため、急遽追跡方針を変更し、当時、

同室にいた患者6名、看護師26名、医師5名についてクオンティフェロン検査、Tスポット検査およびレントゲン検査等を用いて感染状況の調査を始めた。その結果、感染者3名、感染疑い8名が判明し院内感染の恐れが示唆された。No73とNo84はわずか2日間の接触で感染が成立したことがうかがわれた。

クラスター型mの事例では、夫婦とも大正生まれであり、妻が施設で寝たきりで、2人の接触はほぼ皆無であったため、当初、別々の再燃によるものと認識していた。JATA (12)-VNTR型別により2人の間に感染疑いのあることが判明したため、同居家族3名、No78が利用している施設の職員6名等を対象として追跡調査を開始した。その結果、家族2名、施設職員2名が感染疑いのあることが確認され、No48とNo78の間で感染が成立していることが強くうかがわれた。

考察

アガロースゲル電気泳動においてバイオラッド製Sub-Cell[®]GT 電気泳動槽を用いることにより、反復数にかかわらず同一条件下での泳動が可能となり、操作は容易で手法の統一が行いやすく、全領域も正しく解析できることが確認された。シーケンサーや自動電気泳動装置と比較しても行政検査として導入しやすいと期待される。

事例解析については、既報²⁾と同様で、菌株に該当する患

表2. JATA(12)-VNTR型別から分類したクラスター型ごとの疫学調査結果

| クラスター型 | 菌株番号 | 発生地域 | 患者間の関連性 | 和田らの分類型別* |
|--------|------|------|--|-----------------------|
| c | No4 | 丹後 | 4人の接触確認できず。 | 該当なし |
| | No23 | 丹後 | | |
| | No57 | 丹後 | | |
| | No74 | 丹後 | | |
| e | No27 | 丹後 | No4およびNo27が他県燃料供給関係の同施設に勤務していたが、型別は異なっていた。eクラスター型の3人の接触確認できず。 | J ₁₂ -0006 |
| | No52 | 山城北 | | |
| | No93 | 山城北 | | |
| h | No42 | 丹後 | No40とNo56 (No40の同級生)との関係以外10人の間で接触確認できず。また、No60(建築業)とNo88 (工務店経営)は生活圏を同一にするも仕事を通じての接触は確認できず。 | J ₁₂ -0003 |
| | No60 | 山城北 | | |
| | No88 | 山城北 | | |
| | No5 | 山城北 | | |
| | No69 | 山城北 | | |
| | No80 | 山城北 | | |
| | No31 | 山城北 | | |
| | No40 | 丹後 | | |
| No56 | 丹後 | | | |
| j | No62 | 山城北 | No62の通院している病院にNo63の受診経歴はあるが2人の接触確認できず。 | 該当なし |
| | No63 | 山城北 | | |
| k | No5 | 山城北 | 4人の接触確認できず。 | J ₁₂ -0007 |
| | No69 | 山城北 | | |
| | No80 | 山城北 | | |
| | No83 | 丹後 | | |
| l | No73 | 丹後 | 入院時、2人は2日間のみ同室(抗癌剤治療)で接触があった。 | 該当なし |
| | No84 | 丹後 | | |
| m | No48 | 丹後 | No78はNo48の妻、夫婦間の感染と判断した。 | 該当なし |
| | No78 | 丹後 | | |
| n | No39 | 丹後 | 3人の接触確認できず。 | J ₁₂ -0004 |
| | No86 | 山城北 | | |
| | No89 | 山城北 | | |
| o | No92 | 山城北 | 2人の接触確認できず。 | J ₁₂ -0016 |
| | No97 | 丹後 | | |
| p | No31 | 山城北 | 2人の接触確認できず。 | 該当なし |
| | No95 | 山城北 | | |

* 和田⁹⁾らの分類した阪神地区における出現頻度の高いJATA(12)-VNTR型別

者間の関連性が明白な場合には感染源や感染経路が特定され、感染拡大防止に繋がる追跡疫学調査に結びつけることができた。一方、患者間の関連性が明確でない場合には、追跡が途切れ、調査を断念せざるを得ず、有効な結核対策に結びつけることができなかった。特に山城北管内および丹後管内の両方の菌株で構成されるクラスターについて、詳細な実地疫学調査によっても、山城北管内の患者と丹後管内の患者との関係は、いずれのクラスターのどの菌株についても接触の糸口すら見い出せなかった。これらのクラスターは和田らの分類と一致し、阪神地区でも広域に流行している菌株と予想され、感染経路は複雑である可能性が高い。現段階では和田らのデータ⁶⁾は大阪府、大阪市、神戸市に限られているが、滋賀県、兵庫県、奈良県、京都市、姫路市等の自治体もJATA (12)-VNTR型別検査を開始しており、地方衛生研究所全国協議会近畿支部ではこれらのデータをまとめる方向を検討しているため、情報が集積し、比較・検討することによりさらに詳細な状況が解明され、結核対策上重要な知見が得られると考えられる。

一方、和田らの分類と一致せず、患者同士の関係が不明であったクラスターについては、当該菌株が地域特有に流行している可能性もあるため、構成される新たな菌株を追加し、患者データを入手し、詳細に解析することにより感染経路が判明し、感染拡大防止対策に繋がると推測できる。これら地域特性的な株についてのJATA (12)-VNTR型別検査およびデータ構築は行政対策に有用な科学的根拠を与えることができるものと期待される。

謝辞

本研究にあたり実地疫学調査に協力いただいた京都府保健所の職員の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 浅井紀夫, 杉浦伸明, 真田正稔, 和田崇之, 長谷篤. 2012. 結核菌の分子疫学解析におけるVariable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法の検討. 京都府保健環境研究所年報, 57, 11-15.
- 2) 浅井紀夫, 杉浦伸明, 真田正稔, 堀忍, 中村清康, 和田崇之, 長谷篤. 2013. 京都府分離結核菌株のJATA (12)-VNTR型別解析. 京都府保健環境研究所年報, 58, 6-11.
- 3) Supply P., Mazars E., Lesjean S. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome. Mol Microbiol, 36, 762-771.
- 4) 前田信司, 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.
- 5) 浅井紀夫, 杉浦伸明, 真田正稔, 和田崇之, 長谷篤. 2011. 結核菌の分子疫学解析におけるVariable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法の検討. 京都府保健環境研究所年報, 57, 18-21.
- 6) 和田崇之, 田丸亜貴, 岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子, 小向潤, 松本健二, 長谷篤. 2013. 複数自治体をまたぐ広域的結核分子疫学の基礎構築. 結核, 88, 393-398.