

VNTR 法を用いた結核菌分子疫学解析確立のための調査研究
-平成 27 年度報告及びまとめ-

○川又祐子 中本有美 深谷節子 増子京子

要旨

本研究は、県内で分離される結核菌を分子疫学解析法により解析し、データベースを作成することを目的として、平成 25 年度～平成 27 年度までの 3 年計画で実施した。

近年主流となっている結核菌の分子疫学解析法は VNTR(Variable numbers of tandem repeats)法である。平成 27 年度は、VNTR 法の中でも解析度の高い 24 領域 VNTR 法を用いて、本県で分離された結核菌株を解析しデータを収集・蓄積した。前年度までに解析した株と合わせて、平成 24 年度～平成 27 年度に搬入された結核菌株計 193 株についてデータベースを作成し、本データベースの活用法について考察したのでその概要を報告する。

キーワード：結核，分子疫学解析，VNTR 法

はじめに

茨城県における結核罹患率は平成 26 年の統計で人口 10 万対 13.3 (全国 15.4)であり、387 人の新規登録患者が発生している¹⁾。当所では保健所の依頼を受けて、疫学調査に基づいた集団感染等の見極めに科学的根拠を加えるため、患者間に関連の疑われた結核菌の分子疫学解析を行っている。

結核菌の分子疫学解析法として、近年主流となっているのは VNTR 法である。VNTR 法には解析する領域数によって複数の方法があり、日本で検出される結核菌の大半を占める北京型結核菌に対応した JATA12VNTR 法²⁾(以下 JATA12)が主流となっている。また、JATA12 に多変領域を加えた JATA15VNTR 法³⁾(以下 JATA15)、JATA12・15 に超多変領域である HV (Hypervariable)領域⁴⁾を追加したもの、さらに国際標準領域を追加した 24 領域 VNTR 法⁵⁾(以下 24VNTR)などがあり、領域数に応じて解析度も異なっている。現在、他の地方衛生研究所

等における VNTR 法の実施状況は、採用している領域数が自治体ごとに異なり統一されていない。

本研究では、県内で分離される結核菌の遺伝子パターンを解析し、データベースを作成することを目的として、VNTR 法による解析データの蓄積を実施している。平成 26 年度には、複数の分子疫学解析法の解析結果を比較検討し、その中でも解析度が高く、また領域数の異なる方法を採用している他施設とも比較を行うことができる、24VNTR の有用性を確認し、この方法での県内分離株の解析を開始した。

平成 27 年度は、平成 26 年度～平成 27 年度に搬入された結核菌 122 株について解析を行い、前年度までに解析した株と合わせて、平成 24 年度～平成 27 年度に搬入された結核菌株計 193 株についてデータベースを作成した。

さらに、作成した本データベースを用いてパターンの比較を行い、解析した分離株の傾向把握を行ったのでその概要を報告する。

平成 27 年度における取り組み

材料・方法

1. 24VNTR：平成 26 年度及び平成 27 年度に当所に搬入された結核菌株 122 株（同一患者から複数分離された株を除く）を材料とし、INSTAGENE マトリックス(Bio-Rad)を用いて DNA 抽出を行った。これらの材料について、JATA12 (Mtub4, miru10, Mtub21, Mtub24, QUB11b, VNTR2372, miru26, QUB15, miru31, QUB3336, QUB26, QUB4156)²⁾, JATA15 (QUB18, QUB11a, ETRA)³⁾, HV 領域 (QUB3232, VNTR3820, VNTR4120)⁴⁾及び国際標準 6 領域 (Mtub39, miru40, miru4, Mtub30, miru16, ETRC)⁵⁾の計 24 領域について VNTR 解析を行った。PCR 増幅は TaKaRa Ex Taq HS (タカラバイオ), GC buffer I (タカラバイオ) 及び蛍光プライマーを用いた。蛍光色素及びプライマー配列は平成 25 年度地研協議会精度管理時に配布されたものを使用した。増幅条件は結核菌 VNTR ハンドブック⁶⁾に準拠した。増幅産物のサイズをシークエンサー 3500xLGenetic analyzer (ABI)で測定し、GeneMapper® (ABI)ソフトウェアにより測定値を算出してレポート数を換算した。

2. データベースの作成：平成 24 年度～平成 27 年度に当所に搬入された結核菌株計 193 株について、解析した各領域のレポート数、及び患者情報等の菌株情報を Excel ファイルに登録し、データベースを作成した。また、フィルタ機能を用いて、過去に蓄積したパターンの中から同一のパターンを迅速に抽出出来るようにした。

3. 解析結果の比較：193 株の解析結果について、BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths)を用いて Categorical 係数により系統樹を作成した(図 1)。同一のパターンを持つ株を検索し、集団感染株及び散発株に分けて比較した。

結果と考察

1. データベースの作成：本データベースの作成により、VNTR 解析結果を新規に登録するとともに、解析結果と患者情報等の菌株情報を一元的に管理できるようになった。
2. 解析結果の比較：解析結果について全領域一致を同一パターンとしたところ、193 株は 151 通りのパターンに分かれた(図 1)。

表 1 に同一パターンを持つ株数を集計した結果を示す。2 株以上で同一パターンを示し、クラスターを形成した株は全体で 23 パターン (65 株)であった。またその中で、集団感染株のみでクラスターを形成したパターンは 12 (35 株)、散発株のみでクラスターを形成したパターンは 9 (20 株)であった。さらに、集団感染株と散発株で同一クラスターを形成したパターンは 2 (10 株)であった。このことから、疫学情報不明の散発株での一致が複数存在することが分かった。このように、分子疫学解析によりパターン的一致を確認することで、散発に見えていた患者間の関連性を見出したり、散発株の判断に科学的裏付けを与えたりすることができる。

表 1. 同一クラスターの構成

	集団感染のみ	散発のみ	集団感染・散発混在
パターン数	12	9	2
内株数	35	20	10 (散発: 2)

本県では、疫学調査に基づいて集団感染の有無を判断した後で分子疫学解析を実施することが多いが、疫学情報が不明の菌に対して分子疫学解析を用いたいという保健所の要望が増えている。本県では、保健所の管轄を越えた疫学情報の共有は積極的に行われていないことから、県内で統一したデータベースを作成し、活用していくことが有用と考えられる。

一方で、県全体の傾向を把握するにはより多

くの菌株の収集と解析が必要である。本県では、例年約 400 人の活動性結核新規登録患者が存在している¹⁾が、当所に搬入される結核菌株は多い年でもその 2 割程度である。県内の分離株の傾向把握やサーベイランス、菌の伝播経路の推定、年齢別・地域別等の正確な統計には、搬入時点で偏りのない全数解析が最も有効であるため、今後も積極的に菌株を収集し、継続して情報を蓄積していく必要がある。

まとめ

本研究により、当所における VNTR 法の導入と、搬入菌株の解析・データベース作成を行い、結核菌株の分子疫学解析体制を整備した。

本データベースを活用することで、パターンの蓄積だけでなく、過去のパターンとの比較が容易になった。また、解析した分離株の傾向把握とともに、他県と情報共有する際にも利用できるようになった。

今後の取り組み

次回中期運営計画

平成 28 年度～平成 32 年度の 5 年間、本研究を引き継ぐ形で、県内分離株の 24 VNTR での解析及びデータベースの蓄積を行いながら次の 2 点を実施していく予定である。

1. 他施設との比較

本研究では県内分離株情報の収集・蓄積を行っているが、結核感染の場は県外の可能性も十分にある。今後は近隣の自治体等に協力を依頼し、他施設で解析された結果との比較を積極的に行っていく予定である。

2. 解析結果の比較・還元方法の検討

疫学情報がない場合、株同士のパターン一致は感染経路の関連に直結している訳ではなく、関連の推定は疫学情報を十分に考慮して判断する必要がある⁷⁾。本県でも、データベースを

蓄積し情報を還元していくにあたり、県内感染症対策に効果的な疫学情報の収集、及び比較・還元方法を検討していきたい。

謝辞

本研究にあたり、多くのご指導・ご助言をいただきました千葉県衛生研究所 横山栄二先生、蜂巢友嗣先生に深謝いたします。

参考・文献

- 1) 茨城県：茨城の結核統計 2014 年版
- 2) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 菅原勇, 加藤誠也：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: 673-378.
- 3) 前田伸司, 村瀬良朗：結核菌の反復配列多型(VNTR)標準分析法の確立と型別情報データベースの構築. 結核, 2009; 84(12): 784-786.
- 4) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, *et al.* : Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on Mycobacterium tuberculosis strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 2007; 270: 67-74.
- 5) Supply P, Allix C, Lesjean S, *et al.* : Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 4498-4510.
- 6) 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: 結核菌 VNTR ハンドブック, 第一版・追補版
- 7) 瀬戸順次, 阿彦忠之, 和田崇之, 長谷篤, 山田敬子: 結核低蔓延地域における網羅的な結核菌反復配列多型 (VNTR) 分析の有用性. 結核. 2013; 88: 535-542.

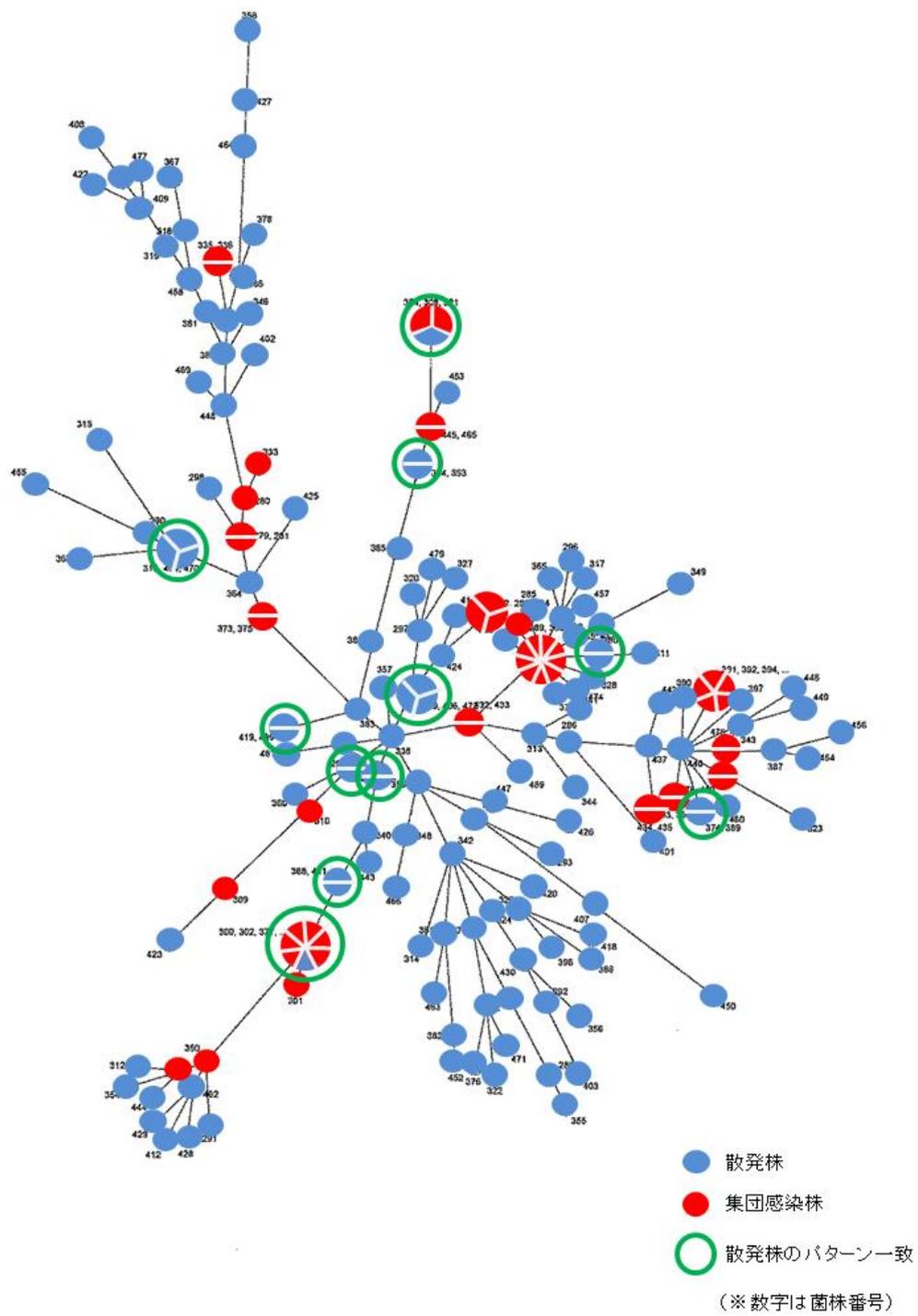


図1. 県内193株から作成した系統樹