

秋田県内で分離された結核菌の分子疫学的性状の解析とRFLPパターンのデータベース化に関する調査研究

八柳 潤 齊藤志保子 今野貴之

県内で分離された結核菌の RFLP パターンのデータベース化について検討した。業務担当課からあらかじめ承認を得て、これまでに当センターに RFLP 解析を依頼した経緯がある市立秋田総合病院、大館市立総合病院、平鹿総合病院から分与された結核菌、本事業実施以前に当センターに送付された結核菌保存株、合計 91 株について RFLP パターンを解析した。X 線フィルム上に記録された RFLP パターンの画像を可視光線で透過し、Geldoc 2000 (Bio-Rad) 画像取り込み装置を使用して TIFF ファイルに変換し、Fingerprinting II Software を使用してデンドログラムを作成した。個々の実験で得られた外部標準株のバンドの相対的位置関係は比較的再現性良く一致することが確認され、データの標準化が可能であった。91 株を使用して小規模ではあるが結核菌 RFLP パターン画像データベースの骨格を構築し得たことから、本調査研究の当初目標はほぼ達成されたものと考えられた。今後も医療機関等から依頼された解析の結果を追加することにより、将来的にデータベースが充実するものと考えられ、結核対策に係る行政ニーズ、および医療機関からのニーズに対して、より適切に支援することが可能となるものと考えられた。

1. はじめに

厚生労働省は平成 11 年に結核緊急事態宣言を発令し、その対策に取り組んだ。特に、学校や事業所、その他不特定多数の人間が接触する場を介しての集団感染の発生が問題となっている。結核による集団感染事例については、食中毒のように同時多発しない限り散発例として見逃されてしまう傾向にあり、その場合には感染予防策が講じられないために新たな健康被害が発生する可能性が高い。県内で発生した患者から分離された結核菌の分子疫学的性状を掌握しておくことにより、感染源・感染ルートの迅速な把握が可能となり、通常であれば見逃される可能性が高い集団事例を迅速に探知することが可能となるケースがでてくるものと考えられるが、これまで、県内で分離された結核菌について、分子疫学的性状は解析・記録されていなかった。本県においては、年間 180 名程度の結核新規患者が登録されており、これらの患者の約半数程度からは菌が分離されているものと推定される。

結核菌の分子疫学的性状の解析手法としては RFLP 分析法が国際標準法として確立¹⁾しており、当センターにおいても平成 12 年から 13 年に実施した調査研究において解析技術を導入した。これまでに行政や医療機関から平成 12 年度

6 件 23 株、平成 13 年度 2 件 6 株、平成 14 年度 6 件 20 株、平成 15 年度 2 件 5 株、平成 16 年度 3 件 6 株、平成 17 年度 2 件 4 株の RFLP パターン解析依頼があり、このことは RFLP パターン解析にコンスタントな行政や医療機関からのニーズが存在することを示している。本調査研究は、県内で分離された結核菌の RFLP パターンを画像処理してデンドログラム解析をする技術を導入するとともに、画像処理した分離株の RFLP パターンを保存することにより、県内で分離された結核菌の RFLP パターンをデータベース化するための技術を確立することを目的として実施した。

2. 方法

2.1 結核分離株の収集と供試株

調査研究提案に先立ち、業務担当課である健康推進課（旧健康対策課）からあらかじめ調査研究の実施の承認を得た。県内で結核病棟を保有する医療機関のうち、これまでに当センターに RFLP 解析を依頼した経緯があり、県央、県北、県南に位置する市立秋田総合病院、大館市立総合病院、平鹿総合病院に結核菌分離株の分与を公文書により依頼した。その際、個人情報保護のために患者氏名は記載せず、任意の番号

またはアルファベットにより菌株の識別をするよう依頼した。分与された分離株は当所の菌株名簿に記載すると共に、小川培地に接種・培養して RFLP パターン解析を実施するとともに保存に供した。

なお、本調査研究には平成 12 年度から 15 年度（本事業実施以前）に当センターに送付された結核菌保存株の一部も供試した。供試株数は平成 12 年度から 15 年度分 22 株、平成 16 年度から 17 年度分 69 株、計 91 株である。

2.2 RFLP解析, 画像処理, デンドログラムの作成およびRFLPパターンの保存

2.2.1 標準株の入手

RFLP パターンの画像処理・デンドログラムの作成には標準株が必要である。国内においては *M. bovis* BCG TOKYO, *M. tuberculosis* H37RV 株などがこの目的に使用されている。一方、結核菌の RFLP 解析技術を最初に確立・普及させた National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands が 1999 年に出版した RFLP 解析のマニュアルである Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of Mycobacteria においては, *M. tuberculosis* Mt14323 株が標準株として推奨されている。この株を標準株とすることにより、秋田県で得られるデータが国内だけではなく海外で得られたデータとも比較可能となることから、我々は *M. tuberculosis* Mt14323 株を標準株に使用することとし、National Institute of Public Health and the Environment から正規に輸入した。

2.2.2 RFLP解析

RFLP 解析の操作手順の概要を図 1 に示す。供試株を小川培地に接種し、37℃で十分な量の菌苔が発育するまで、通例、3 週間から 4 週間、培養した（図 1 ①）。得られた被検結核の菌苔から ISO Plant (WAKO) を使用して DNA を抽出した（図 1 ②）。抽出した DNA の量を紫外分光法により定量し、2 µg を 30 µl の反応系で *Pvu* II により 37℃で 1 時間以上消化した（図 1 ③）。制限酵素消化が終了した DNA 溶液を 0.8 % 1 DNA agarose (TAKARA BIO) を使用して 50V 定電圧で約 15 時間電気泳動した（図 1 ④）後、ナイロンメンブレンに分離された DNA を転写した（図 1 ⑤、⑥）。あらかじめ合成しておいた IS6110 プローブを使用してハイブリダイゼーシ

ョンし（図 1 ⑦、⑧）、化学発光法により IS6110 を含む断片を X 線フィルム上で可視化することにより（図 1 ⑨）、RFLP パターンを得た。

2.2.3 RFLPパターン画像のTIFFファイルへの変換

X 線フィルム上に記録された RFLP パターンの画像を可視光線で透過し、Geldoc 2000 (Bio-Rad) 画像取り込み装置を使用して TIFF ファイルに変換した。

2.2.4 画像解析ソフトへの取り込みと標準化, デンドログラムの作成

TIFF ファイルを Fingerprinting II Software に取り込み、腸管出血性大腸菌 O157 の解析方法に準じて各 RFLP パターンの類似度を示すデンドログラムを作成した。なお、異なる実験で得られた RFLP パターンを相互に比較するための外部標準として、実験毎に *M. tuberculosis* Mt14323 株をゲルの左右外側と中央部で泳動し、得られた RFLP パターンをレファレンスレーンとして使用した。

3. 結 果

3.1 結核菌のRFLPパターン

図 2 に X フィルム上に得られた結核菌の RFLP パターンの例を示した。各 RFLP パターンは 10 本から 15 本程度のバンドから構成され、バンドの位置と数は菌株により異なっていた。図 2 の例では 13 株を同時に解析しており、81, 83, 87 番の結核菌の RFLP パターンは類似しているが、バンド位置と数には違いが認められ、同一パターンではなかった。同様に、88 と 89 番の結核菌の RFLP パターンも極めて類似しているものの同一ではなかった。このように、結核菌の RFLP パターンは極めて多彩であった。

3.2 RFLPパターン解析の標準化

異なる実験で得られた RFLP パターンを相互に比較するためには、それぞれの実験毎に外部標準株の解析も実施し、外部標準株の RFLP パターンを基準とする必要がある。外部標準株のバンドの位置は画像解析ソフトの標準化過程で完全に一致するように補正されるが、補正の精度向上のためにも X 線フィルム上での外部標準株の RFLP パターンのバンドの相対的な位置は、異なる実験同士で可能な限り一致していることが望ましい。このことは、RFLP パターンのデータを将来的に相互の比較が可能な状態でデータベースに蓄積していく上で重要である。この

点について検討するために、異なる時期に実施した4回の実験でX線フィルムに出現した *M. tuberculosis* Mt14323 株の RFLP パターンを無補正の状態と比較した。その結果、図3に示すとおり、異なる実験で得られた外部標準株のバンドの相対的位置関係は比較的再現性良く一致することが確認された。但し、最上部のバンドは再現性がやや劣るため、補正には使用しないこととした。

3.3 供試91株のRFLPパターンから作成したデンドログラム

図4に今回供試した91株の結核菌の RFLP パターンから作成したデンドログラムを示した。デンドログラムは RFLP パターンの相対的な類似度を示すチャートであり、同一パターンを示した結核菌の類似度は100%と表示される。図4に示すデンドログラムで類似度が100%となった菌株が9組認められた。これらのうち、112と117、107と108、31と138、77と80、85と86と133の組は、それぞれ同一医療機関において分離された結核菌であった。また、83と84、73と76と82の組は同一患者から異なる時期に分離された結核菌であった。一方、9と10の組は過去に当センターで実施した解析において、同一パターンが得られていた組であった。その他の結核菌のパターンは多彩であった。

4. 考 察

病原菌の分子疫学的性状を比較・解析して得られる知見は、従来の方法により実施された疫学調査の結果から推定された感染事例の本質や感染源に関する知見を裏付けるものであるとされている。このことは実際、病原性大腸菌 O157 による種々の感染事例、イカ菓子の原因とするサルモネラオラニエンブルグによる全国的な広域集団感染事例、輸入カキを原因とする赤痢菌による広域集団感染事例などの事例においてこれまでに実証されてきた。結核に関しても、近年、集団感染や院内感染事例がしばしば発生しており、その際、分離された結核菌の分子疫学的性状を比較することにより、通常の疫学調査により得られた知見が裏付けられるとされている。特に、結核の場合は感染してから発症するまでの潜伏期間が通常の腸管系細菌などと比較して極端に長いため、疫学調査において正確な

情報を収集することが困難な場合がある。その事例が、不特定多数の人間が接触する「サウナ」などで発生した集団感染事例である。このような事例では、散発患者が何ら相互に関連無く五月雨式に発生する状況となるため、通常の疫学調査手法のみでは、それが集団感染事例であることを証明することは困難である。一方、結核による院内感染もしばしばマスコミで報道されているが、さらなる感染者の発生予防のために、あるいは補償問題を適切に処理するために、院内感染であることを客観的に証明するデータが求められる場合がある。このような場合、分離された結核菌の分子疫学的性状を比較検討することにより問題の解決に有益な知見が得られる場合が多い。

結核菌の分子疫学解析手法としては、RFLP 分析法が国際的に確立し、普及している。当センターではこの手法を既に導入し、医療機関や行政からの解析依頼に対応してきた。しかし、特に新鮮分離された結核菌と、数ヶ月から数年前に分離された結核菌の関連を調べようとする場合、過去に分離された株は状態が悪い場合が多く、解析に必要な菌苔を得るまでには相当の培養時間を要することをしばしば経験してきた。また、直近の実験により得た RFLP パターンと、過去に実施した解析で得られた RFLP パターンを比較する必要が生じた場合、異なる実験で得られた X 線フィルム上のパターンを直接比較することが不可能であったために、実験を菌の培養からあらためて実施しなければならず、結果が得られるまでに相当の時間が必要であった。このような局面においても、結核菌の RFLP 解析結果をできるだけ迅速に得ることができるようにするための試みとして、本調査研究では病原性大腸菌の DNA パターン解析に実用化されている画像処理システムを結核菌の RFLP 解析に応用し、異なる実験で得られた RFLP パターンを画像処理し、お互いに補正・標準化して相互の比較を可能とした。さらに、得られた標準化画像はコンピュータに保存され、随時比較検討することが可能となることに加えて、結核菌の RFLP パターンの類似度をデンドログラムとして表現することも可能となった。

異なる実験で得られた RFLP パターンの画像を補正・標準化できるかどうかは本調査研究で

最も重要なポイントであった。補正・標準化は外部標準として個々の解析に標準株を加え、そのパターンを基準として実施するために、ある程度の相対誤差が存在しても解析ソフトの標準化機能により補正は可能である。しかし、標準株のパターンの実験毎の誤差は可能な限り小さいことが解析精度を高くする上で重要であることはいままでのない。特に、病原性大腸菌 O157 の DNA パターン解析の場合と異なり、結核菌の RFLP パターン解析の場合にはアガロースゲルで電気泳動した DNA を一度ナイロンメンブランに転写するという実験プロセスが存在するために、そのナイロンメンブラン自体の伸縮や転写過程での圧力によるアガロースゲルの歪みなどが標準株のパターンの相対誤差を増加させる不可避な要因となる。そのため、今回の検討ではそのような歪みによる悪影響を可能な限り小さくするために、標準株を1回の泳動につきゲルの両外側端だけではなく、中央部でも泳動して同一ゲル内での歪みによる誤差も補正可能とした。異なる実験で得られた標準株の RFLP パターンの相対的な誤差は、図4に示すように予想よりも小さく、解析ソフトの標準化機能により十分に補正可能であることが確認された。その際、標準株をゲルの両端と中心で泳動することにより同一ゲル内での歪みによる誤差も、目視した限り十分に補正されることが確認された。これらのことから、本調査研究の目的であった結核菌 RFLP パターンの相互比較とデータの保存・蓄積が可能であるものと考えられた。

今回供試した91株の結核菌の RFLP パターンをデンドログラムから(図4)、過去に実施した解析に再現性が認められること(9と10)、同一人から分離された結核菌の類似度が100%として表現されること(83と84、73と76と82)が確認された。これらのことは、本システムが適切な精度を持つことを示唆しているものと考えられるが、解析の再現性と同一株が100%の類似度を示す点は解析システムの精度を評価する上で重要なポイントと考えられることから、今後も標準株を用いて定期的に解析を実施する必要があるものと考えられた。なお、本法が結核菌の国際的な標準解析法に位置づけられている理由の1つはその解析力が高いことである。実際、図4からも明らかのように、本法では極め

て多彩なパターンが得られる。

以上のように結核菌 RFLP 解析を画像解析によりシステム化する当初の目的はほぼ達成され、小規模ではあるがデータベースの骨格を構築することができた。結核菌の収集はこれまで当所に RFLP パターンの解析を依頼した医療機関を対象に実施し、これらの医療機関からは今後も RFLP パターンの解析依頼が寄せられるものと推察され、その結果を本システムに追加保存することにより将来的にデータが充実するものと考えられる。実際、平成18年7月にこれらの医療機関のひとつから5株の結核菌 RFLP 解析依頼があった。これらの株の解析結果は依頼先の医療機関に既に還元してあり、菌株の収集と併せて結果の還元ルートもほぼ確立したと考えられる。今回の解析では認められなかったが、異なる時期に実施した解析結果を比較した際に同一 RFLP パターンを示す複数の結核菌が認められるなど、集団感染事例の発生が示唆される結果が得られた場合には、その結核菌を提出した医療機関に迅速に情報提供する必要があるものと考えられる。

現在、細菌の分子疫学解析手法の主流はフラグメント解析であり、病原性大腸菌 O157 の DNA パターン解析や結核菌の RFLP 解析もこのフラグメント解析に該当する。しかしながら、最近、フラグメント解析の技術上の限界がしばしば指摘されるようになった。フラグメント解析手法全てに共通する問題は、解析がアナログの画像解析であるという本質に起因する、再現性の限界である。実際、O157 の DNA パターン解析においては異なる研究室で得られた画像データを相互に解析した場合の再現性がかならずしも100%とはならず、このことが全国ネットワークでの解析ネットワークを構築する上での大きな障害となっている。このような問題を克服するために、最近、シーケンス解析技術に立脚した分子疫学的解析技術が試行されるようになってきた。その代表的な技術が MLVA 法であり、結核菌の解析にも世界的に試行されてきている。シーケンス解析においては得られるデータが塩基配列などのデジタルデータであるために、結果の相互比較が極めて容易且つ確実に実施可能であるという、フラグメント解析にはない特徴を有する。秋田県の結核対策をより良く支援

するためには、将来的に MLVA 法などのシーケンス解析技術の導入を検討する必要があるものと推察され、このことは結核対策に資する将来の研究テーマとなり得るものと考えられる。

一方、本調査研究の実施過程において、医療機関から多剤耐性結核菌の遺伝子診断の可否について照会された。これを受けて、現在実用化されている「リファンピシン」耐性遺伝子の遺伝子診断技術を導入した。薬剤耐性結核菌に感染した場合、治療が殆ど不可能であるために患者は死の転帰をとる場合が多い。2次感染による新たな感染者の発生予防対策を適切に講じるためにも多剤耐性結核菌の遺伝子診断による迅速な診断は重要である。この技術の導入についても、医療現場からの新たなニーズと捉えられることから、結核予防対策に資する将来の新たな研究テーマとなるものと考えられる。

供試結核菌 91 株を使用して小規模ではあるが結核菌 RFLP パターン画像データベースの骨格を構築し得たことから、本調査研究の当初目標はほぼ達成されたものと考えられた。今後も医療機関等から依頼された解析の結果を追加することにより、将来的にデータベースが充実するものと考えられ、結核予防対策に係る行政ニーズ、および医療機関からのニーズに対して、よ

り適切に支援を可能となるものと考えられた。

5. まとめ

- ・結核菌 RFLP 解析を画像解析によりシステム化することに成功し、小規模ではあるがデータベースの骨格を構築することができた。
- ・菌株の収集と併せて結果の還元ルートもほぼ確立した。
- ・当初の目標はほぼ達成されたものと考えられ、今後も医療機関等から依頼された解析の結果を本システムに追加保存することにより、将来的にデータが充実するものと考えられる。
- ・シーケンス解析に立脚した結核菌の分子疫学解析手法の導入と確立、並びに多剤耐性結核菌の遺伝子診断による迅速診断技術の導入と確立が結核予防対策に資する将来の新たな研究テーマとなるものと考えられた。

6. 文献

- 1) Soolingen, D., de Haas, P.E.D., and Kremer, K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands. Version September 1999

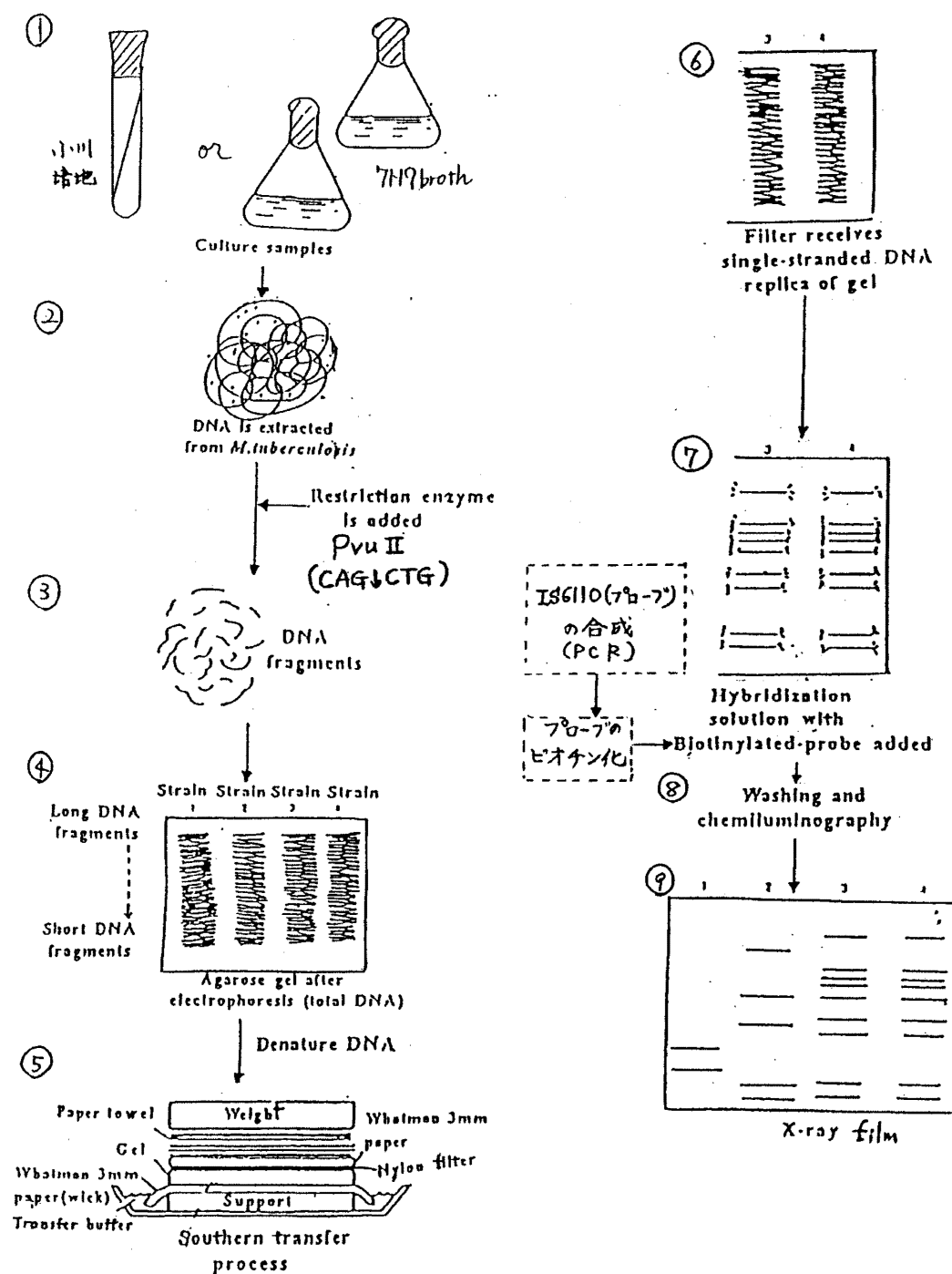


図1 結核菌 RFLP 解析の操作手順

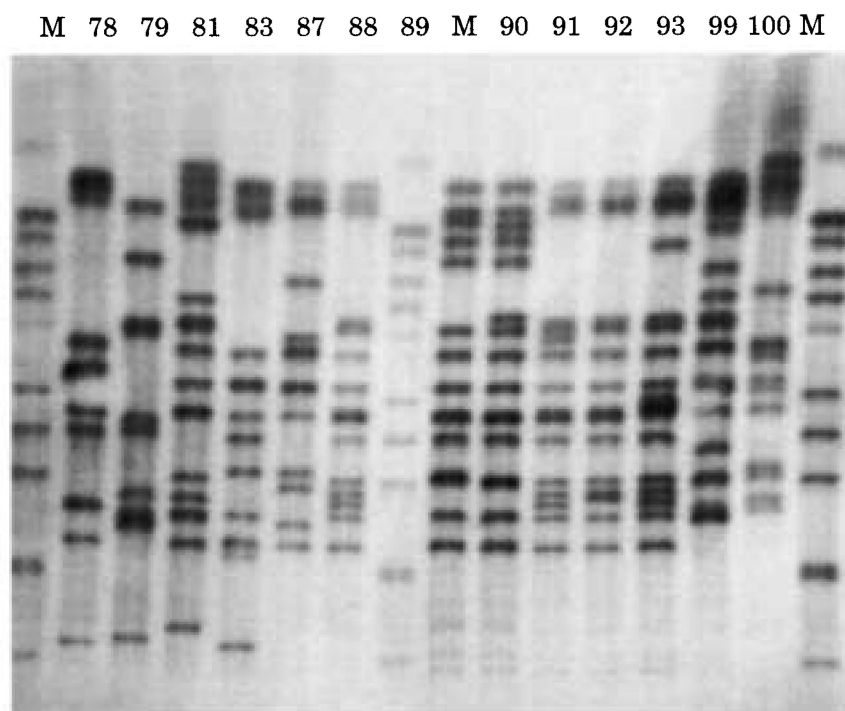


図2 結核菌の RFLP パターンの例

M : *M. tuberculosis* Mt14323株

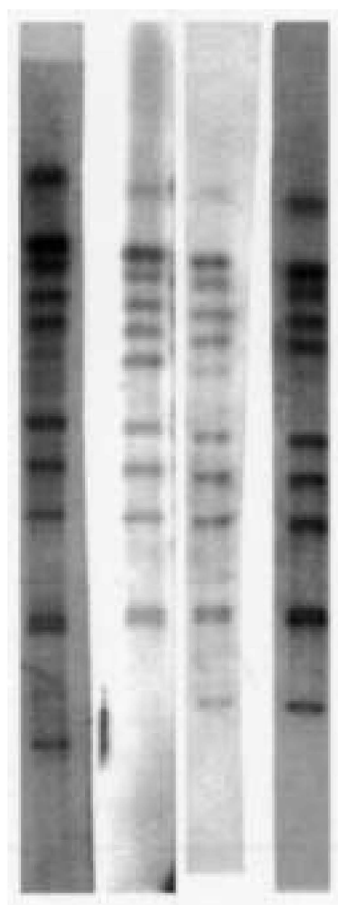


図3 異なる4回の実験で得られた *M. tuberculosis* Mt14323 株（外部標準）の RFLP パターン

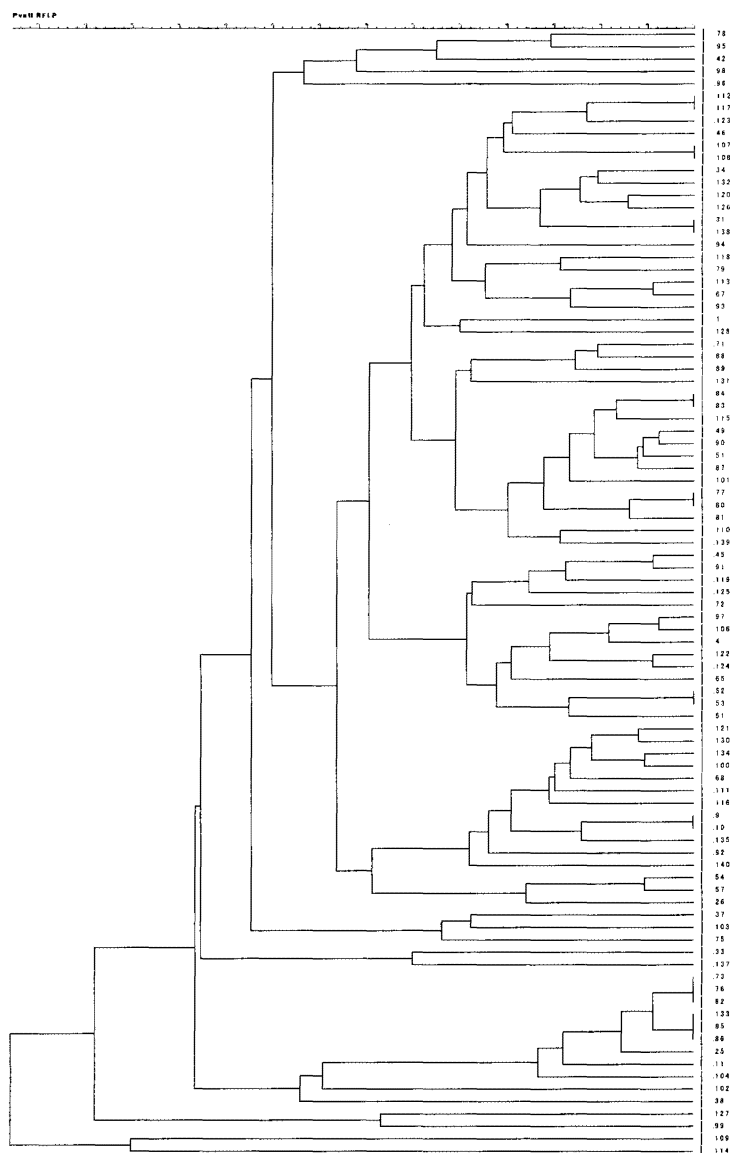


図4 供試した結核菌 91 株の RFLP パターンから作成したデンドログラム