

# 結核菌の DNA シークエンスに基づいた分子疫学解析法と薬剤耐性の迅速診断法に関する調査研究－某施設で発生した結核集団事例における JATA12 法の応用実例等について－

八柳 潤      田中貴子      千葉真知子      齊藤志保子

結核菌の分子疫学解析法である Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) 12 法と、リファンピシン耐性の迅速遺伝子診断方法を導入した。電気泳動条件を最適化することにより、JATA 12 プロファイルの算定が容易且つ確実となった。一方、供試した 121 検体のうち 1 検体がリファンピシン耐性変異を有することが確認された。DNA シークエンス解析により、早い場合は検体受領の翌日、遅くとも数日以内にリファンピシン耐性変異の有無を決定することが可能となり、従来の培養法と比較して著しく迅速化した。秋田市内で発生した結核集団事例において分離株を JATA12 法により解析した結果、感染者集団の中で特定の菌株に感染しているグループを識別することが可能であることが示され、JATA12 法が集団感染事例の感染疫学を詳細に知る上で極めて有効であることが実証された。

## 1. はじめに

秋田県の年間の結核新登録患者数は平成 10 年の 311 名から平成 23 年の 127 名まで漸減傾向にあるものの、他者に結核菌を感染させる危険性が大きい喀痰塗沫陽性肺結核患者数は年間約 60 名で横ばい状態にあり、継続した対策が必要である。結核集団感染事例は、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可能性があり、感染が拡大する危険性が高い。結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の分子疫学的性状解析は、集団感染事例における特定菌株の拡散規模を把握するうえで特に有用な方法である。また、菌株同士の性状を比較することにより、見逃されやすい diffuse outbreak, いわゆる「隠れた集団感染事例」の探知も可能となることから、感染拡大防止上有用である。結核菌の分子疫学的性状の解析手法としては RFLP 分析が国際標準法として確立しており、当センターにおいても平成 12 年から 13 年に分析技術を導入した。しかし、RFLP 分析により得られるデータはアナログ的な画像 (バーコード様) であることから多数のデータを比較すること、あるいは異なる機関で得たデータを比較することは困難である。これらの難点を解決する方法として、近年、国内で分離される結核菌の 80% を占める「北京型株」の解析に最適化された

Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) 12 法が国内標準法として普及しつつある。JATA12 法で得られる結果はデジタル的な数値であることから、データベース化に適し、且つ、異なる機関で得られたデータとの比較が容易である。しかしながら、分子疫学解析は微生物学的な専門技術に立脚しているために、結核対策を直接担う行政担当者や医療機関の結核担当者には、これまで、その内容と有用性が十分に認識されているとは言い難い状況にあった。

一方、国内には結核治療の障害となる薬剤耐性結核菌が一定数存在している。薬剤耐性結核菌に感染した際には、適切な薬剤を使用した治療を行わないと治療不可能となるばかりではなく、患者が感染源となり耐性結核菌の感染が拡大する可能性がある。従って、結核菌の薬剤耐性を確認することは重要であるが、培養法に基づいた従来法では結果が得られるまでに長い時間を要することが問題である。

本研究は、結核分子疫学解析技術である JATA12 法を導入すること及び耐性遺伝子の DNA シークエンス変異を指標にした、薬剤耐性結核菌の迅速診断法を導入することを目的として実施した。また、先般、秋田市内の某施設で結核の集団感染事例が発生し、患者から分離された結核菌について JATA12 法により分子疫学

性状を解析する機会を得たことから、当該事例の解析結果を結核菌分子疫学解析の実例として報告する。

## 2. 方法

### 2.1 供試 DNA 溶液と結核菌

JATA12 法とリファンピシンの耐性の遺伝子診断法の検討には、当センターに保存しておいた結核菌 DNA 抽出溶液 121 検体を供試した。

集団感染事例の解析には、平成 23 年 4 月 15 日に報告された初発患者から平成 24 年 2 月 20 日までに報告された患者 14 名のうち、12 名から分離された結核菌を供試した。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 JATA12 法

前田ら<sup>1)</sup>が報告したプロトコールに従い実施した。泳動ゲルには 1.2% アガロースゲルと 2.0% アガロースゲル (いずれも Nusieve 1:3 : TakaraLO3=1 : 2) を使用し、泳動バッファーには ×0.5 TBE を使用した。1.2% ゲルでは JATA1, 2, 7, 9, 11, 12 を、2.0% ゲルでは JATA3, 4, 5, 6, 8, 10 を泳動した。PCR 産物のサイズ (bp) からコピーナンバーを算出した。

#### 2.2.2 リファンピシン耐性遺伝子診断法の検討

リファンピシン耐性に関与する *rpoB* 遺伝子内部の 81 bp hot spot の DNA シークエンスを決定するために、365 bp 断片を増幅する *rpo105*<sup>2)</sup> と *rpoBPR2*<sup>3)</sup> プライマーを使用し PCR を行い、得られた 365 bp 増幅断片の DNA シークエンスをダイレクトシークエンスにより決定した。シークエンスプライマーには PR17<sup>3)</sup> を使用した。

#### 2.2.3 北京型株の鑑別

当該集団事例で分離された、JATA12 パターンが異なる 3 株 (表 : 分類 A, B, C) について、北京型株に該当するかどうかを Warren らの方法<sup>4)</sup>により検討した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 JATA12 法とリファンピシンの耐性の遺伝子診断法の検討

供試した 121 検体の DNA 溶液全てから JATA12 法により PCR 増幅断片が得られ、繰り返

返しナンバーを算定することにより JATA12 プロファイルを得ることが可能であった。しかし、泳動後のアガロースゲル上での増幅断片の形態、とりわけそのバンドの太さが locus により大きく異なる傾向が認められたことから、正確な断片サイズの決定が困難な例がみられた。そのため、JATA locus 毎に使用アガロースゲル濃度とゲルにアプライする増幅液の量を最適化した結果、各 JATA locus についてシャープな泳動像が得られるようになり、繰り返しナンバーの算定が容易且つ確実となった。

一方、121 株についてリファンピシン耐性に関与する *rpoB* 遺伝子のシークエンスを決定したところ、耐性変異を有する株 1 株が確認された。耐性結核菌のうち、最も問題視される多剤耐性結核菌はリファンピシン耐性を示すことから、リファンピシンの有無を迅速に判定することは、治療と薬剤耐性結核菌の拡散防止上、非常に重要である。今回導入した方法によると、リファンピシン耐性変異の有無を、早い場合は検体受領の翌日、遅くても数日以内に決定することが可能であり、従来の培養法では 2 週間程度の長期間を要することと比較して、著しい迅速化が可能となった。

### 3.2 JATA12 法による結核集団感染事例解析の実例

#### 3.2.1 事例の概要

平成 23 年、秋田市保健所管内の某施設で咳、痰、発熱、呼吸困難の症状を呈した患者が市内の医療機関において塗抹検査、PCR、画像診断の結果から肺結核 (ガフキー 9 号) と診断されたことにより事例が探知された。調査の結果、初発患者を含み患者が 14 名、感染者 (QFT 陽性) が 35 名の大規模な施設内結核集団感染事例であることが明らかとなった。

患者 14 名中 12 名から結核菌が分離された。

#### 3.2.2 結核菌分離株の JATA12 法による解析結果

表に供試した結核菌 12 株の菌株番号、報告月日、JATA12 プロファイルと分類を示す。JATA12 プロファイルは、12 桁の数値で表現される。初発患者 (TB204 : インデックスケース) と同じプロファイルを分類 A とし、その他のプロファイルを分類 B, C とした。なお、これらの 3 種

類の株は全て北京型であり、リファンピシン耐性変異を保有しない、リファンピシン感受性株であることが確認された。

本事例ではインデックスケースがガフキー9号と多量の結核菌を排菌している状況であったこと、そして原因施設が特殊な閉鎖環境であったことから、他の11名の患者は全てインデックスケースから結核菌に感染したと推定され、結核菌分離株の JATA12 プロファイルはインデックスケースと同一であろうと予想された。しかしながら、予想に反して TB205 と TB206 の JATA12 プロファイルはインデックスケースのプロファイルと異なっていた(分類 B, 分類 C)。RFLP 分析によっても全く同じ分類結果が得られたことから、TB205 と TB206 が分離された患者は、当該施設内でインデックスケースから感染を受けたのではなく、施設外で感染して入所後に発病したものと考えられた。一方、TB215 は施設内でインデックスケースと全く接触がなかったことから、当初はこの集団事例とは無関係と考えられていた。しかしながら、TB215 の JATA12 プロファイルがインデックスケースと同じであったことから、この患者も集団感染の一部であることが判明した。これらの結果は、この患者がインデックスケースからの直接感染ではなく、インデックスケースから感染した他の患者を介して2次感染を受けた可能性を示すものと考えられた。

今回の集団感染事例において分離株を JATA12 法により解析した結果、集団内における特定菌株(インデックスケースが感染した株)の拡散規模を明確に把握することが可能であることが実証された。このように、JATA12 法により結核菌分離株を解析することにより、多数の感染者の中で特定の菌株に感染しているグループを識別することが可能となり、このことは結核集団感染事例の感染疫学を詳細に知る上で極めて有効であることが確かめられた。

今後も県内で結核の集団事例が発生した場合、分離株について JATA12 法を実施することにより、特定菌株に罹患している患者が集団発生しているのか、疫学的関連の無い患者が偶然多発しているのかを明確に判別することが可能となり、このことは、感染拡大防止策を決定する上で有用な情報となるものと考えられる。さらに、JATA12 プロファイルをデータベース化することにより、散发事例と判断された事例同士の関連を確認することも可能となり、隠れた Diffuse Outbreak の探知が容易になると考えられる。なお、本研究終了後に秋田市内の結核病棟保有医療機関において保存されている結核菌全て、約 100 株について JATA12 法を行う機会を得た。また、得られた JATA12 プロファイルについては、宮城県健康環境センターが開発したデータベース(エクセルマクロ)に登録し、今後の解析に備える予定である。

表 集団事例由来結核菌12株の菌株番号、報告月日、JATA12プロファイルと分類

菌株番号	患者	報告	JATA12プロファイル	分類
TB204	HK	4/15	4-3-3-4-7-3-7-5-5-7-2-6	A
TB205	YY	5/9	5-3-4-3-5-3-9-4-5-7-6-4	B
TB206	MK	6/22	6-3-3-3-6-3-7-4-5-6-7-6	C
TB207	SY	7/4	4-3-3-4-7-3-7-5-5-7-2-6	A
TB208	HY	6/1	4-3-3-4-7-3-7-5-5-7-2-6	A
TB209	HT	6/10	4-3-3-4-7-3-7-5-5-7-2-6	A
TB210	AM	7/20	4-3-3-4-7-3-7-5-5-7-2-6	A
TB211	MT	7/8	4-3-3-4-7-3-7-5-5-7-2-6	A
TB212	OA	8/11	4-3-3-4-7-3-7-5-5-7-2-6	A
TB213	SK	8/11	4-3-3-4-7-3-7-5-5-7-2-6	A
TB214	SM	2/7*	4-3-3-4-7-3-7-5-5-7-2-6	A
TB215	GT	2/20*	4-3-3-4-7-3-7-5-5-7-2-6	A

\*平成24年

TB204:インデックスケース

### 参考文献

- 1) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 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, *Kekkaku*, **83**, 2008, 673-678.
- 2) Williams D.L. et. Al.: PCR-Heteroduplex Detection of Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *CR Protocols for Emerging Infectious Diseases*. D.H. Persing ed., ASM Press. 1996.
- 3) Sekiguchi J. et. Al.: Detection of Multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2007, 179-192.
- 4) Warren R.M. et. al. :Patient with Active Tuberculosis Often Have Different Strains in the Same Sputum Specimen, *Amer. J. Respir. Critical Care Med.*, **169**, 2004, 610-614.