

埼玉県における結核菌分子疫学調査の実施状況について (平成28~29年度)

濱本紀子 石井明日菜 近 真理奈 福島浩一 倉園貴至

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Saitama prefecture (2016.4-2018.3)

Noriko Hamamoto, Asuna Ishii, Marina Kon, Hirokazu Fukushima and Takayuki Kurazono

はじめに

感染症の発生に際しては、原因微生物を同定するとともに、原因微生物の型別を実施し、感染源や感染経路などを明らかにすることが公衆衛生対策を推進するうえで非常に重要である。結核菌に対しても種々の遺伝子型別法が利用されており、近年では結核菌の遺伝子中に存在する反復配列領域の多様性を利用して分類する反復配列多型分析 (Variable numbers of tandem repeats: VNTR) 法が普及してきている。

埼玉県衛生研究所 (以下、当所) では、平成28年4月から、埼玉県が作成した埼玉県結核菌分子疫学調査実施要領¹⁾に基づき、県内で発生した患者から分離された結核菌株について、VNTR法による遺伝子型別を実施している。本調査の目的は、感染源の究明のため、集団感染疑いに対し菌株の遺伝子解析を実施して科学的根拠を提供すること、並びに、県内の結核患者菌株のデータベースを作成し、広域的な伝播経路を推定するうえで有用な知見を保健所等に提供することである。今回は、平成28年4月から30年3月までに当所に搬入された506株の解析結果について報告する。

対象及び方法

1 対象

平成28年4月から30年3月までに当所に搬入された県内 (さいたま市を除く) 発生患者由来結核菌株 (509株) の内、同一人物の2度目の検査依頼 (2株) と、検査不能だった株 (1株) を除く506株を対象とした。

2 検査方法

(1) DNAの抽出: 搬入された結核菌株を分取し、300 μ lの蒸留水に懸濁して95 $^{\circ}$ C、10分間加熱した。その後13,000rpmで10分間遠心し、上清をDNA抽出液として用いた。

(2) VNTR解析: 多重反復配列領域のうち、Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR分析法に用いられている12領域²⁾に、JATA (15)-VNTR分析法で追加されている3領域³⁾、加えて超多変 (Hyper-variable: HV) 領域に属する3領域 (QUB3232, V3820, V4120)³⁾、並びにその他の領域として国際的に広く用いられている6領域 (MIRU4、

MIRU16, MIRU40, ETR-C, Mtub30, Mtub39)³⁾の計24領域でVNTR解析を実施した。各菌株のDNA抽出液をテンプレートに、それぞれ片側に蛍光標識したプライマーとExTaq HS version (Takara) を用いたPCR法で増幅を行った。得られたPCR産物を適宜希釈し、Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて電気泳動を行った。PCR産物の増幅サイズはGene Mapper ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて測定し、それをもとに反復配列数を算出し、VNTR型を決定した。

(3) クラスタ解析: 菌株間のVNTR型を比較し、24領域すべての反復数が一致する菌株を同一クラスタと判定した。クラスタを形成した菌株の母数に占める割合をクラスタ形成率とした。

(4) 北京型別: Warrenらの方法⁴⁾に従い、北京型結核菌同定プライマー (5'-TTCAACCATCGCCGCTCTAC-3', 5'-CACCTCTACTCTGCGCTTTG-3') と非北京型結核菌同定プライマー (5'-GGTGCGAGATTGAGGTTCC-3', 5'-TCTACCTGCAGTCGCTGTGTC-3') を用いてPCRを行い、北京型及び非北京型の分類を行った。

(5) 系統推定: 北京型別によって北京型と判別された株について、VNTR型から祖先型か新興型かの系統推定を行った⁵⁾。

結果

1 患者の内訳

解析した506株の由来する患者の年齢分布は6歳から99歳で、平均年齢は66.1歳であった。男女別は、男性333

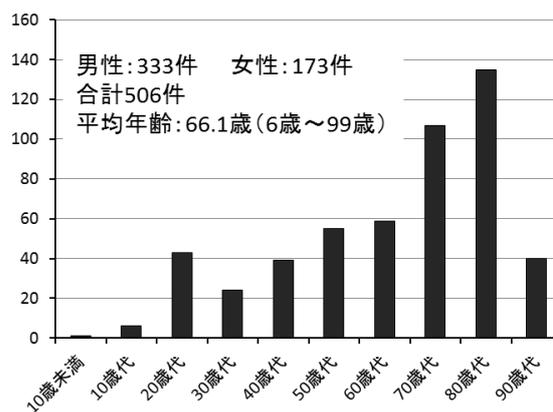


図1 VNTR検査件数
(年齢別: H28年4月~H30年3月)

件 (65.8%), 女性 173 件 (34.2%) であった (図 1)。

2 クラスタ解析

VNTR 法で解析を実施した結果, クラスタを形成しなかった株が 421 株, クラスタを形成した株が 85 株で, 全体のクラスタ形成率は 16.8% であった (表 1)。クラスタ数は 29 で, その内訳は, 2 株で構成されたものが 18, 3 株で構成されたものが 7, 4 株で構成されたものが 1, 6 株で構成されたものが 1, 8 株で構成されたものが 1, 10 株で構成されたものが 1 であった (表 1)。このうち, 実地疫学調査によって関連性が指摘されていたのは 8 クラスタの 20 株であった (表 1)。

表 1 クラスタ解析結果

クラスタ番号	クラスタ形成株数	疫学的関連性が指摘された株数	型別及び系統推定
S1	4	3	北京型 (新興)
S2	6		北京型 (新興)
S3	8	2	北京型 (祖先)
S4	10	4	北京型 (祖先)
S5	2		北京型 (祖先)
S6	2		北京型 (祖先)
S7	2		北京型 (祖先)
S8	2		非北京型
S9	3		北京型 (新興)
S10	2		北京型 (新興)
S11	3		非北京型
S12	2	2	北京型 (祖先)
S13	3		北京型 (新興)
S14	2		北京型 (祖先)
S15	2	2	北京型 (新興)
S16	2		非北京型
S17	2		非北京型
S18	3		北京型 (祖先)
S19	3		北京型 (祖先)
S20	2		北京型 (新興)
S21	2	2	北京型 (新興)
S22	3		北京型 (祖先)
S23	2		北京型 (祖先)
S24	2		北京型 (新興)
S25	2	2	北京型 (祖先)
S26	2		北京型 (新興)
S27	3	3	北京型 (新興)
S28	2		北京型 (祖先)
S29	2		北京型 (祖先)

解析菌株: 506株
 クラスタ形成菌株: 85株
 クラスタ形成率: 16.8%

3 北京型別と系統推定

PCRによる北京型別の結果, 北京型株は 358 株 (70.8%), 非北京型株は 141 株 (27.9%), 判定できなかったもの (型別不能) が 7 株であった (表 2)。北京型株患者の平均年齢は 66.0 歳, 非北京型株患者の平均年齢は 65.7 歳であった。また, 北京型, 非北京型におけるクラスタ形成率はそれぞれ 21.2% (76/358), 6.4% (9/141) であった。

さらに, 北京型株について, VNTR 型をもとに系統推定を行ったところ, 255 株 (71.2%) が祖先型, 91 株 (25.4%) が新興型, 推定できなかったものが 12 株 (3.4%) であった (表 2)。

表 2 北京型別・系統推定結果

型別	系統 (推定)	株数	割合 (%)
非北京型		141	27.9
北京型	祖先型	255	50.4
	新興型	91	18.0
	推定不能	12	2.4
型別不能		7	1.4
計		506	

祖先型の平均年齢は 70.0 歳, 新興型の平均年齢は 53.7 歳であった。また, 系統を推定することができた北京型株 346 株の内, 70 歳未満の患者から分離された株では 162 株中 69 株 (42.6%) が新興型であったのに対し, 70 歳以上の患者からの北京型株 184 株では, 22 株 (12.0%) が新興型であり (図 2), 若い層で新興型罹患者の割合が高い傾向が見られた。

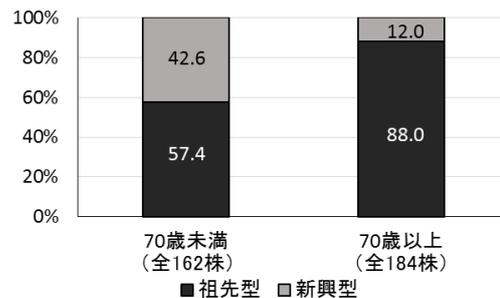


図 2 北京型株における新興型と祖先型の割合 (年代別)

クラスタを形成した 85 株の内, 76 株が北京型株であり, 45 株が祖先型, 31 株が新興型であった。クラスタ形成率はそれぞれ 17.6% (45/255), 34.1% (31/91) であった (表 3)。各クラスタの型別および系統推定については, 表 1 に示した。クラスタを形成する株間の疫学的関連性が指摘された 8 クラスタの内, 4 クラスタが祖先型, 4 クラスタが新興型であった。

表 3 系統別クラスタ形成率

	北京型全体	祖先型	新興型	非北京型
解析菌株数	358	255	91	141
クラスタ形成菌株数	76	45	31	9
クラスタ形成率 (%)	21.2	17.6	34.1	6.4
クラスタ数	25	14	11	4

考察

平成28年度から29年度にかけてVNTR解析を行った結核菌株506株のうち、85株(16.8%)が29個のクラスターを形成していた。その内21クラスターでは、菌株間に明確な疫学的関連性は認められなかった。残りの8クラスターでは、1クラスター中2~4株の間で疫学的関連性が指摘されていた。この結果から、今回収集した株のほとんどが、同一クラスターを形成した株も含め、疫学的関連性のない散発事例であること、埼玉県において大規模な患者発生を起していることが確定できる菌株は現時点では無いことが推測される。

北京型別を行った結果、約70%が北京型株であった。また、クラスターを形成した株の約90%が北京型株であった。北京型株は、ほかの遺伝子系統と比べ、感染伝播力が強く、薬剤耐性との関連が高く、発病や再発を起しやすいとされている⁶⁾。日本で分離される結核菌の7-8割ほどが北京型株であるといわれており⁶⁾、今回の結果は、全国的な傾向と一致する。

さらに、北京型株は新興型と祖先型に細分類され、新興型の方がより感染伝播力が強く、発病しやすい傾向があると報告されており⁷⁾、両者の型別は接触者健診における対象者選定の一助になると考えられる。これまでのVNTR型別のデータ蓄積から、北京型の系統には全国的に共通したVNTR傾向があることがわかってきており、VNTR型からの系統の推定を行うことができるといわれている⁵⁾。北京型株について系統推定を行ったところ、70歳未満の患者では約4割が新興型だったのに対し、70歳以上の患者では新興型は1割程度にとどまった。高齢者の結核においては、結核高蔓延期の青年期に感染し、高齢になってから発症するケースが多い⁶⁾ことが関係していると考えられる。また、クラスター形成率は新興型の方が高かった。新興型の北京型株は祖先型と比較して、発症するまでの期間が短く、感染力が強く、集団感染を起しやすく、特に都市部で勤労世代の感染が増加しているとされる⁸⁾が、この結果はそれを裏付けるものであるといえる。

今回の調査は、感染症法改正後2年間にわたり行われたものであるが、ほとんどが散発事例である点や、北京型、新興型の占める割合、系統ごとのクラスター形成率の違いといった点について、1年目に得られた調査結果⁹⁾とほぼ同じ傾向が見られた。今後も保健所や医療機関との連携を図りながら、菌株の収集と解析、データの蓄積と信頼性向上を進め、患者間の共通原因の特定や、二次感染防止などにつなげていきたい。

文献

1) 埼玉県結核菌分子疫学調査実施要領。

<https://www.pref.saitama.lg.jp/a0701/kansen/documents/kekakujisshiyouryou280401.pdf>

- 2) 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. 結核, 83, 673-678, 2008
- 3) 和田崇之, 長谷篤: 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, 2010
- 4) Warren RM, Victor TC, Streicher EM, et al.: Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med.* 169, 610-614, 2004
- 5) 和田崇之: VNTR 型別における反復数傾向. 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 追補版. 2-4, 201
- 6) 岩本朋忠: 結核菌北京型ファミリーの集団遺伝学的解析から推察される日本国内定着型遺伝子系統軍の存在と遺伝子系統別薬剤耐性化傾向の違い. 結核, 84, 755-759, 2009
- 7) Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, et al.: A recently evolved sublineage of the Mycobacterium tuberculosis Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol.* 45, 1483-1490, 2007
- 8) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, et al.: Population structure dynamics of Mycobacterium tuberculosis Beijing strains during previous decades in Japan. *J Clin Microbiol.* 47, 3340-3343, 2009
- 9) 濱本紀子, 石井明日菜, 福島浩一, 青木敦子: 埼玉県における結核菌分子疫学調査の実施状況について. 埼玉県衛生研究所報, 51, 74-76, 2017