

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年度～令和3年度)

吉澤和希 牟田萌枝子 石澤文菜 石井明日菜 富岡恭子 福島浩一

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Saitama prefecture (2016.4-2022.3)

Kazuki Yoshizawa, Moeko Muta, Fumina Kokuzawa, Asuna Ishii, Kyoko Tomioka, and Hirokazu Fukushima

はじめに

結核は世界中で年間約1,000万人が発病し、依然として病原性の強い細菌性疾患のひとつである。患者のほとんどは開発途上国に集中しているが、近年では日本でもグローバル化に伴い、感染源や感染経路が多岐に渡ってきている。そのため、菌株の型別を実施し、感染源や感染経路を明らかにすることは公衆衛生対策を推進するうえで非常に重要である。結核菌に対しては種々の遺伝子型別法が利用されており、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月から令和4年3月までの結核菌分子疫学調査の実施状況について報告する。

対象および方法

1 対象

平成28年4月から令和4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 1,230株のうち、同一人物の2度目の検査依頼であった4株と、検査不能だった6株を除く1,220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 μLの蒸留水に懸濁して95°C、10分間加熱した。その後13,000 rpm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⁾、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 Bio-systems) 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) 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'-CACCTCTACTCTGCGCTTG-3') と非北京型結核菌同定プライマー (5'-GGTGCAGATTGAGGTCCC-3', 5'-TCTACCTGCAGTCGCTGTGC-3') を用いてPCRを行い、北京型及び非北京型に分類した。
- (4) 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、結核菌VNTRハンドブック追補版⁵⁾に従い、VNTR型から祖先型又は新興型の系統推定を行った。
- (5) 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ーと判定した。また、クラスターを形成した菌株の母数に占める割合をクラスター形成率とした。
- (6) 外国出生患者について、年齢分布及び北京型別・系統推定を調査し、日本出生患者と比較した。

結果

1 対象者の内訳

解析した1,220株の患者診断時の年齢分布は6歳から102歳で、平均年齢は66.3歳であった。男女別は、男性812株 (66.6%)、女性408株 (33.4%) であった (図1)。また、1,220株のうち94株は外国出生者由来の株であった。

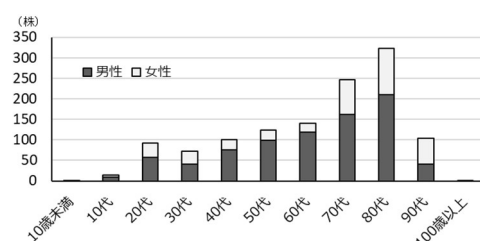


図1 年齢群別VNTR検査件数

2 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860株(70.5%),非北京型株は349株(28.6%),判定できなかったもの(型別不能)が11株(0.9%)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,620株(72.1%)が祖先型,216株(25.1%)が新興型,推定できなかったものが24株(2.8%)であった(表1).

表1 北京型別・系統推定結果

型別	系統(推定)	株数	割合(北京型)(%)	割合(%)
北京型	祖先型	620	72.1	70.5
	新興型	216	25.1	
	推定不能	24	2.8	
非北京型		349		28.6
型別不能		11		0.9
計		1,220		

北京型(祖先型),北京型(新興型)及び非北京型の構成割合を年齢群別に示した(図2).各型の平均年齢は,北京型(祖先型)70.4歳,北京型(新興型)56.1歳,非北京型64.6歳であった.

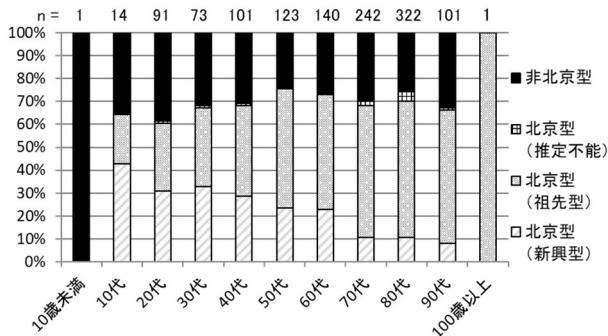


図2 年齢群別北京型別・系統推定結果

3 クラスタ解析

VNTR法で解析を実施した結果,1,220株中,クラスターを形成した株は314株で,クラスター形成率は25.7%であった.型別ごとのクラスター形成率は,北京型(祖先型)が27.9%(173/620),北京型(新興型)が40.3%(87/216),非北京型が14.9%(52/349)であった(表2).また,北京型別は型別不能であったがVNTR型が一致した株は2株1クラスターであった.

表2 系統別クラスター形成率

	北京型			非北京型	型別不能	全体
	祖先型	新興型	推定不能			
解析菌株数	620	216	24	349	11	1,220
クラスター形成菌株数	173	87	0	52	2	314
クラスター形成率	27.9%	40.3%	0%	14.9%	18.2%	25.7%
クラスター数	41	23	0	18	1	83

4 外国出生患者

解析した外国出生患者94名の年齢分布は,6歳から87歳で,平均年齢は31.7歳,年齢別では20代が最も多かった.男女別は,男性59株(62.8%),女性35株(37.2%)であった(図3).

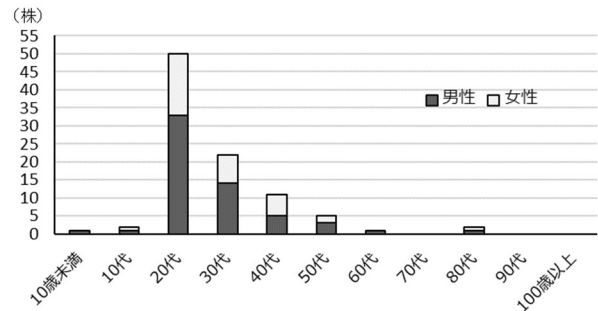
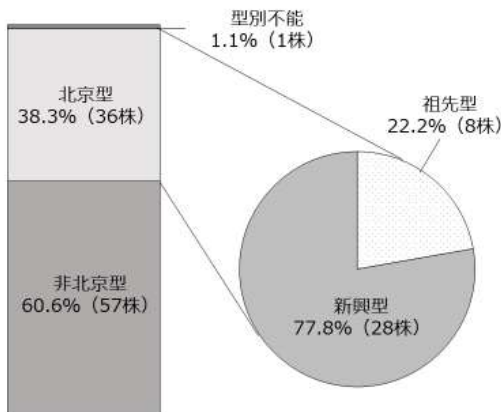


図3 外国出生患者における年齢群別VNTR検査件数

外国出生患者 (n=94)



日本出生患者 (n=1,126)

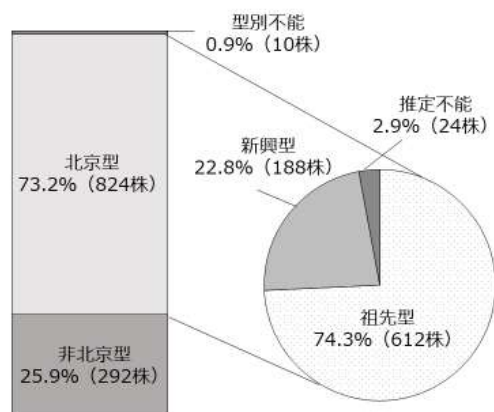


図4 出生国別における北京型別・系統推定結果

外国出生患者の北京型別・系統推定結果を、日本出生患者のものとは対比して(図 4)に示した。PCR による北京型別の結果、北京型株は 36 株 (38.3%)、非北京型株は 57 株 (60.6%)、判定できなかったもの(型別不能)が 1 株 (1.1%)であった。日本出生患者では北京型株が 7 割以上を占めたのに対し、外国出生患者では非北京型株が 6 割を占めた。外国出生患者の北京型株について VNTR 型をもとに系統推定を行ったところ、8 株 (22.2%) が祖先型、28 株 (77.8%) が新興型であった。日本出生患者では祖先型が 7 割以上を占めたのに対し、外国出生患者では新興型が 7 割以上を占めた。各型の平均年齢は、北京型(祖先型) 38.1 歳、北京型(新興型) 31.5 歳、非北京型 30.9 歳であった。

クラスターを形成した株は 3 株のみで、2 クラスターだった。クラスターのひとつは 2017 年に確認された北京型(新興型)で、外国出生患者 2 株のみで構成された。残るひとつは 2019 年に確認された非北京型で、日本出生患者 1 株との計 2 株で構成されていた。

考察

平成 28 年度から令和 3 年度にかけて、対象となった結核菌 1,220 株について VNTR 解析及び北京型別を行った。

北京型別の結果、北京型が占める割合は 70.5%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していた。

さらに、北京型株は VNTR 型からの系統の推定により新興型と祖先型に細分類される。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。今回の系統推定の結果、結核菌株全体のうち約 5 割が祖先型、約 2 割が新興型であった。この割合は、集計した 6 年間ほぼ同様の傾向になっている⁸⁾。

年齢群別では、患者数が 1 人だった 10 歳未満と 100 歳以上を除き、どの年齢群でも北京型が約 7 割、非北京型が約 3 割となっていた。北京型の内訳では、70 代以上の患者では 8 割以上が祖先型で、年齢群が若くなるにつれて新興型の割合が多くなっていった。これは若年層においては、外国出生患者の株が多く、高齢者においては、日本が結核高蔓延国であった 1970 年代以前に感染し、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北京型(新興型)が 40.3%と高かった。新興型は、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、特に都市部で勤務世代の感染が増加しているとされる⁹⁾。今回の結果でも、新興型が占める割合は高齢層より若年層で多くっており、新興型の感染伝播に対する対策が求められる。

外国出生患者においては、全国的に外国生まれの新登録

結核患者数は年々増加傾向であり、20 代~40 代の若年層が多くなっている。中でも 20 代の患者は、新登録結核患者全体の 7 割を占めるほど多くなっている¹⁰⁾。これは、在留外国人の在日目的に、技能実習などの勤労や留学などが多く、これらの職種では若年層が多いことが関係していると考えられる。今回の調査では 20 代~40 代が多く、全国的な結果とほぼ同じ傾向であった。

外国出生患者における北京型別の結果、約 6 割が非北京型であった。また、北京型の内訳では、新興型が約 8 割を占めた。外国出生患者と日本出生患者では、北京型別、北京型の系統推定ともに比率が異なる結果となった。世界では、結核の約 3 割が北京型であり、北京型の中では新興型の分離率が高いといわれていることから⁶⁾、外国出生患者における型別の比率は世界の傾向に沿ったものであると思われる。また、外国出生患者が、日本出生患者とクラスターを形成したのは 1 株のみであり、多くの株は県内で検出された株と一致しなかったことから、現状では県内における外国出生患者と日本出生患者との間で分子疫学的からみた関連性はほとんどないと考えられた。ただし、外国出生患者に関しては、全国的に新登録結核患者数が年々増加傾向である¹⁰⁾。さらに、今後は新型コロナウイルスの影響で制限されていた外国人の入国が緩和され、外国出生の新登録結核患者数が増加することが予想される。したがって、本県でも外国出生患者のデータを蓄積し分析することは今後の結核感染対策に有益であり、引き続き発生動向を注視する必要があると考える。

今後も保健所や医療機関との連携を強めながらデータを集積し続け、保健所と疫学的関連性について情報交換を行うことで、患者間の共通原因の特定や二次感染防止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/documents/52763/kekakujisshiyouryou280401.pdf> (参照 2022-7-8)
- 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系統群の存在と遺伝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) 石澤文菜 吉澤和希 石井明日菜 富岡恭子 倉園貴至 福島浩一: 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年度~令和2年度). 埼玉県衛生研究所報, 55, 73-76, 2021
- 9) 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
- 10) 厚生労働省 : 結核登録者情報調査年報集計結果. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00004.html (参照 2022-7-8)