

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～令和元年度)

富岡恭子 小林匠 石井明日菜 石澤文菜 福島浩一

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Saitama prefecture (2016.4-2020.3)

Kyoko Tomioka, Takumi Kobayashi, Asuna Ishii, Fumina Kokuzawa and Hirokazu Fukushima

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、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2年3月までに当所に搬入された984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月から令和2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 (991株) のうち、同一人物の2度目の検査依頼 (2株) と、検査不能だった株 (5株) を除く984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'-TTCAACCATCGCGCTCTAC-3', 5'-CACCTCTACTCTGCGCTTTG-3') と非北京型結核菌同定プライマー (5'-GGTGCAGATTGAGGTTCCC-3', 5'-TCTAC-CTGCAGTCGCTGTGC-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。

(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型から祖先型か新興型か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。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。

結果

1 患者の内訳

解析した984株の由来する患者の年齢分布は6歳から102歳で、平均年齢は66.0歳であった。男女別は、男性650件 (66.1%)、女性334件 (33.9%) であった (図1)。

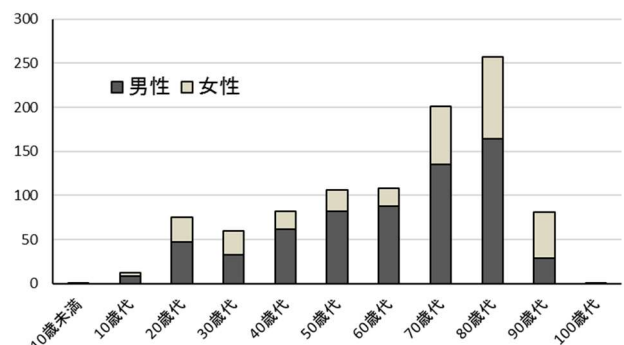


図1 年齢群別VNTR検査件数

表1 年度別北京型別・系統推定結果

	北京型			非北京型	型別不能	計
	祖先型	新興型	推定不能			
平成28年度	129 (54.0%)	34 (14.2%)	5 (2.1%)	66 (27.6%)	5 (2.1%)	239
平成29年度	126 (47.2%)	57 (21.3%)	7 (2.6%)	75 (28.1%)	2 (0.7%)	267
平成30年度	125 (51.7%)	38 (15.7%)	4 (1.7%)	74 (30.6%)	1 (0.4%)	242
令和元年度	117 (49.6%)	49 (20.8%)	4 (1.7%)	64 (27.1%)	2 (0.8%)	236
計	497 (50.5%)	178 (18.1%)	20 (2.0%)	279 (28.4%)	10 (1.0%)	984

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695株(70.6%)、非北京型株は279株(28.4%)、判定できなかったもの(型別不能)が10株(1.0%)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、497株(50.5%)が祖先型、178株(18.1%)が新興型、推定できなかったものが20株(2.0%)であった(図2)。北京型(祖先型)が最も多く、次いで非北京型、北京型(新興型)の順となっており、この傾向はどの年度でも同様であった(表1)。

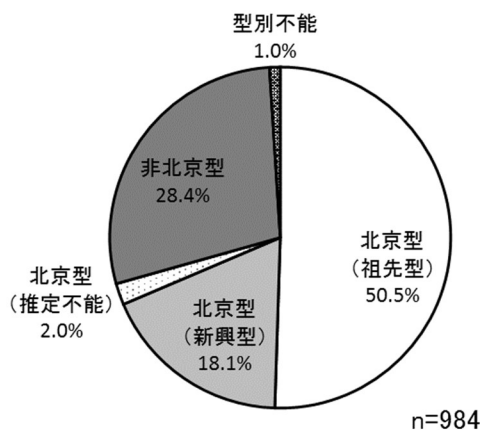


図2 北京型別・系統推定結果

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3)。各型の平均年齢は、北京型(祖先型)70.2歳、北京型(新興型)55.7歳、非北京型64.0歳であった。

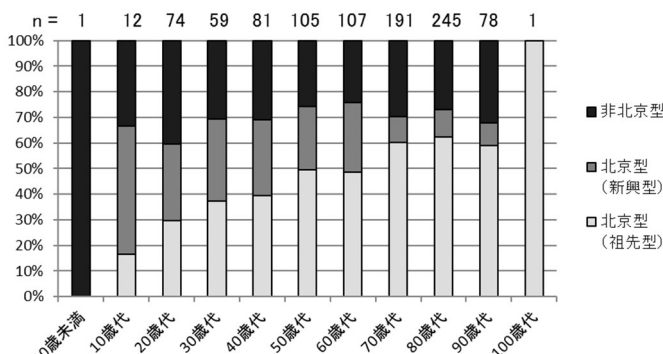


図3 年齢群別北京型別・系統推定結果

3 クラスタ解析

VNTR 法で解析を実施した結果、984株中、クラスターを形成した株は254株で、クラスター形成率は25.8%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27.2%(135/497)、北京型(新興型)が42.7%(76/178)、非北京型14.7%(41/279)であった(表2)。また、北京型別は型別不能であったが VNTR 型が一致した株が2株1クラスターあった。

表2 系統別クラスター形成率

	北京型		非北京型	全体
	祖先型	新興型		
解析菌株数	497	178	279	984*
クラスター形成菌株数	135	76	41	254*
クラスター形成率	27.2%	42.7%	14.7%	25.8%
クラスター数	34	21	15	71*

* 北京型別不能、系統推定不能の株を含む

考察

平成28年度から令和元年度にかけて、結核菌984株について VNTR 解析及び北京型別を行った。

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、発病や再発を起こ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 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。系統推定の結果、結核菌株全体のうちの約5割が祖先型、約2割が新興型だった。この傾向は、この4年間でほぼ同様となっている。

年齢群別では、患者数が1人だった10歳未満と100歳代を除き、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歳代以上の患者では祖先型が多く、年齢群が若いほど新興型が多くなっていた。

これは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北京型（新興型）が42.7%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、集団感染を起こしやすく、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⁾。今回の結果でも、年齢群が若い世代ほど新興型の占める割合が大きくなっており、新興型の感染伝播に対する対策が求められる。

今回の調査は、感染症法改正後4年間にわたり行われたものであるが、ほとんどが散发事例である点や、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、3年目までに得られた調査結果^{9,10)}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系統軍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) 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, 近真理奈, 福島浩一, 倉園貴至: 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). 埼玉県衛生研究所報, 52, 90-92, 2018
- 10) 石井明日菜, 濱本紀子, 石澤文菜, 近真理奈, 砂押克彦, 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28~30年度). 埼玉県衛生研究所報, 53, 75-77, 2019