

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)

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

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Saitama prefecture (2016.4-2021.3)

Fumina Kokuzawa, Kazuki Yoshizawa, Asuna Ishii, Kyoko Tomioka, Takayuki Kurazono and Hirokazu Fukushima

はじめに

感染症の発生に際しては、原因病原体を同定するとともに、原因病原体の型別検査を実施し、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3年3月までの結核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3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1,145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1,135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

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 Bio-systems) 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'-GGTGCAGATTGAGGTTCCC-3', 5'-TCTACTGCAGTCGCTTGGC-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 型から祖先型か新異型かの系統推定を行った。

(5) クラスター解析: 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詳細を調査した。

結果

1 患者の内訳

解析した1,135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66.3歳であった。男女別は、男性754株(66.4%)、女性381株(33.6%)であった(図1)。

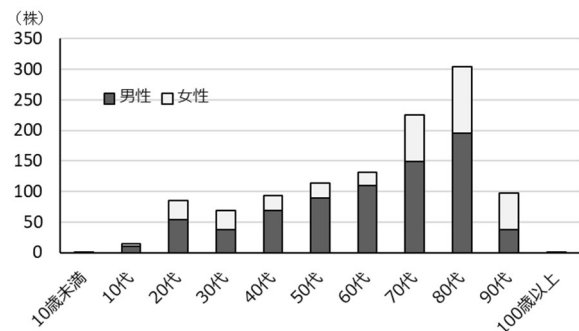


図1 年齢群別 VNTR 検査件数

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800株(70.5%)、非北京型株は324株(28.5%)、判定できなかったもの(型別不能)が11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、579株(72.4%)が祖先型、200株(25.0%)が新興型、推定できなかったものが21株(2.6%)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	579	72.4	70.5
	新興型	200	25.0	
	推定不能	21	2.6	
非北京型		324		28.5
型別不能		11		1.0
計		1,135		

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)70.3歳、北京型(新興型)56.0歳、非北京型64.6歳であった。

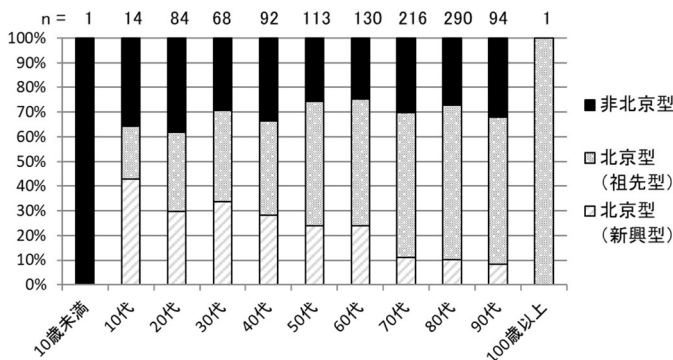


図2 年齢群別北京型別・系統推定結果

3 クラスタ解析

VNTR法で解析を実施した結果、1,135株中、クラスターを形成した株は294株で、クラスター形成率は25.9%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28.3%(164/579)、北京型(新興型)が40.0%(80/200)、非北京型が14.8%(48/324)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	全体
	祖先型	新興型		
解析菌株数	579	200	324	1,135*
クラスター形成菌株数	164	80	48	294*
クラスター形成率	28.3%	40.0%	14.8%	25.9%
クラスター数	40	22	17	80*

*北京型別不能、系統推定不能の株を含む

4 外国出生患者

解析した外国出生患者87名の年齢分布は、6歳から87歳で、平均年齢は31.9歳、年齢別では20代~40代が多かった。男女別は、男性54株(62.1%)、女性33株(37.9%)であった(図3)。

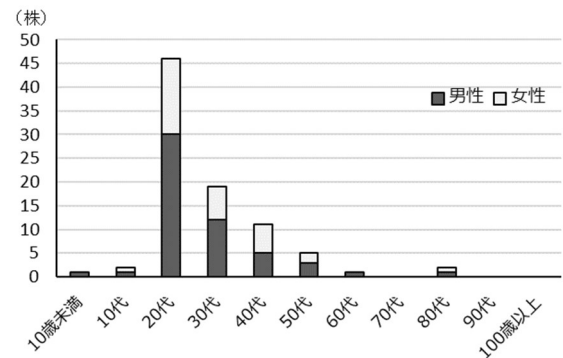
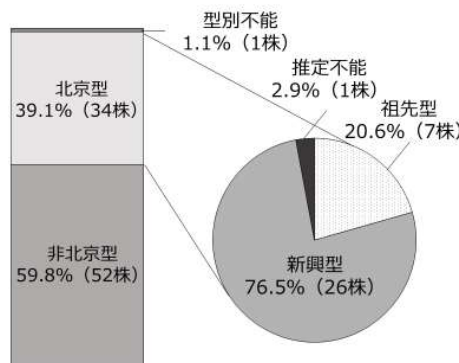


図3 外国出生患者における年齢群別VNTR検査件数

外国出生患者 (n = 87)



日本出生患者 (n = 1,048)

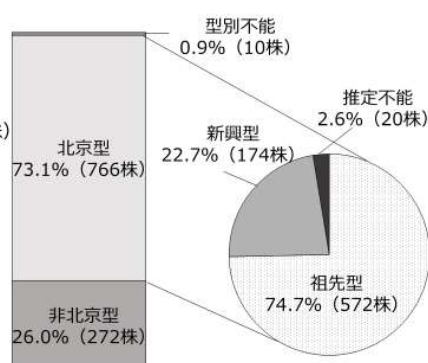


図4 出生国別における北京型別・系統推定結果

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合わせて(図4)に示した。PCRによる北京型別の結果、北京型株は34株(39.1%)、非北京型株は52株(59.8%)、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割近くを占めた。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、7株(20.6%)が祖先型、26株(76.5%)が新興型、推定できなかったものが1株(2.9%)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)40.1歳、北京型(新興型)31.6歳、非北京型31.2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。残るひとつは非北京型で、国内出生患者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2年度にかけて、結核菌1,135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割が新興型であり、この5年間ほぼ同様の傾向になっていた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代以上の患者では祖先型が多く、年齢群が若い方が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た。

また、クラスター形成率は北京型(新興型)が40.0%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。

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、国内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。

今回の調査は感染症法改正後、5年にわたって行われたものであるが、患者全体では検体数が増加しても、過去に得られた調査結果^{8,11,12)}とほぼ同じ傾向が見られた。外国出生患者の調査に関しては、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るため、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2021-7-2)
- 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) 富岡恭子, 小林匠, 石井明日菜, 石澤文菜, 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~令和元年度). 埼玉県衛生研究所報, 54, 63-65, 2020
- 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_00003.html (参照2021-6-28)
- 11) 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
- 12) 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