

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

濱本紀子 石井明日菜 福島浩一 青木敦子

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Saitama prefecture

Noriko HAMAMOTO, Asuna ISHII, Hirokazu FUKUSHIMA and Atsuko AOKI

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、ならびに、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29年3月までに当所に搬入された219株の解析結果について報告する。

対象および方法

1 検体

平成28年4月から29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で、VNTR解析が可能であった株 (219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13000rpm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。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。

(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'-GGTGCAGATTGAGGTTCCC-3', 5'-TCTACCTGCAGTCGCTGTGC-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

解析した219株の患者の年齢分布は16歳から98歳で、平均年齢は67歳だった。男女別は、男性148例 (67.6%)、女性71例 (32.4%) だった (図1)。

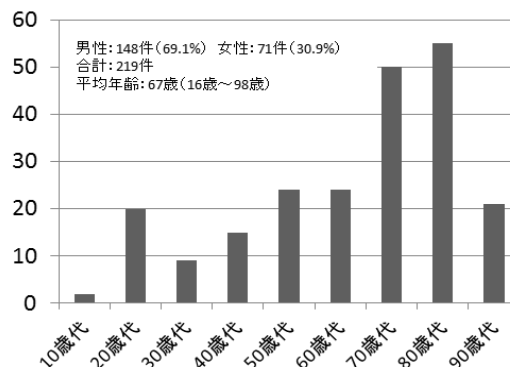


図1 VNTR検査件数 (年齢別: H28年4月~29年3月)

VNTR法で解析を実施した結果、201型に分類された。クラスター数は6で、その内訳は、2株で構成されたものが3、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であり、全体のクラスター形成率は11.0%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7株だった。

表1 クラスター解析結果

クラスター	形成株数	疫学的関連のあった株数
S1	4	3
S2	2	—
S3	6	2
S4	8	2
S5	2	—
S6	2	—

解析菌株数: 219株
 クラスター形成率: 11.0%

PCRによる北京型別の結果、北京型株は154株(70.3%)、非北京型株は61株(27.9%)、判定できなかったものが4株であった(表2)。北京型株患者の平均年齢は65.5歳、非北京型株患者の平均年齢は69.2歳だった。また、北京型、非北京型におけるクラスター形成率はそれぞれ15.6%(24/154)、0%(0/61)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、116株(75.3%)が祖先型、33株(21.4%)が新興型、推定できなかったものが5株であった(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	祖先型	61	27.9
	新興型	—	—
北京型	祖先型	116	53.0
	新興型	33	15.1
	推定不能	5	2.3
型別不能		4	

祖先型の平均年齢は68.5歳、新興型の平均年齢は54.2歳だった。また、60歳未満では、北京型株のうち58.5%が祖先型だったのに対し、60歳以上では、88.5%が祖先型であり(図2)、祖先型罹患者の年齢が新興型罹患者の年齢より高い傾向にあった。

クラスターを形成した菌株はすべて北京型株であり、18

株(S2, S4, S5, S6)が祖先型、6株(S1, S3)が新興型だった。クラスター形成率はそれぞれ15.5%(18/116)、18.2%(6/33)だった。

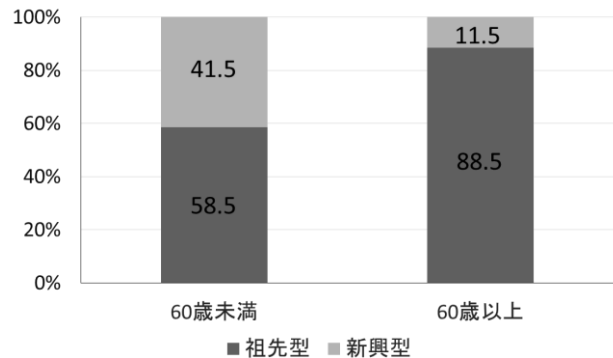


図2 北京型株における祖先型と新興型の割合(年代別)

考察

平成28年度にVNTR解析を行った結核菌株219株のうち、クラスターを形成したものは24株(11.0%)であり、このうち保健所による実地疫学調査において明らかな関連性が確認できたものは7株のみであった。この結果から、今回収集した株のほとんどが散発事例であり、埼玉県において大規模な患者発生を起している菌株は現時点では少ないと推測される。

北京型別を行った結果、約70%が北京型株だった。また、クラスターを形成した株はすべて北京型株だった。北京型株は、ほかの遺伝子系統と比べ、感染伝播力が優れ、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。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、新興型のほう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、60歳未満の患者では約4割が新興型だったのに対し、60歳以上の患者では新興型は1割程度にとどまった。また、クラスター形成率は新興型の方がやや高かった。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、感染症法改正の初年度に行われたもので

あり、埼玉県在住者の感染結核菌全体を経年的に把握してはいない。結核菌の潜伏期間が長いことを考慮すると、特にクラスター形成率に関しては実態を正確に反映していないことも考えられる。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、患者間の共通原因特定や早期治療、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