

埼玉県における結核菌分子疫学調査の実施状況

(平成28年度～令和4年度)

伊藤由加里 石井明日菜 吉澤和希 近真理奈 福島浩一

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Saitama prefecture (2016.4-2023.3)

Yukari Ito, Asuna Ishii, Kazuki Yoshizawa, Marina Kon and Hirokazu Fukushima

はじめに

結核は、結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex ただし *Mycobacterium bovis* BCG を除く) による感染症であり、感染症法における届出対象疾患の二類に分類され、診断後ただちに届出しなければならない全数報告の疾患である。新型コロナウイルス感染症が影響した可能性があるが、日本における2021年の結核罹患率(人口10万対)は、9.2であり、前年と比べ0.9減少し、結核低まん延国となった¹⁾。日本の結核罹患率は、米国等の先進国の水準に年々近づき、近隣アジア諸国に比べても低い水準にある。

結核に関する特定感染症予防指針²⁾においては、都道府県等は結核菌が分離された全ての結核患者について、結核菌を収集するよう努め、分子疫学的手法からなる病原体サーベイランスの構築に努める必要があるとしている。埼玉県衛生研究所(以下、当所)では、平成28年4月から、埼玉県結核菌分子疫学調査実施要領³⁾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、反復配列多型分析(Variable numbers of tandem repeats: VNTR)法による遺伝子型別を実施している。本調査の目的は、集団感染における感染源の究明、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科学的根拠を保健所等に提供することである。今回は、平成28年度から令和4年度までの結核分子疫学調査の実施状況について報告する。

対象及び方法

1 対象

対象は、平成28年4月から令和5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1,362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7株を除く1,351株とした。

2 検査方法

(1) DNAの抽出: DNA抽出物は、滅菌蒸留水に結核菌株を懸濁し、加熱抽出により抽出した。

(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⁴⁾に、JATA(15)-VNTR分析法で追加されている3領域⁵⁾、超多変(Hypervariable:HV)領域に属する3領域(QUB3232, V3820, V4120)⁵⁾、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)⁵⁾の計24領域でVNTR解析を実施した。各菌株のDNA抽出物をテンプレートに、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) 北京型別: Warrenらの方法⁶⁾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⁷⁾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1,351株の患者診断時の年齢分布は6歳から102歳、平均年齢は66.5歳であった。男女別は、男性894株(66.2%)、女性457株(33.8%)であった(図1)。また、1,351株のうち102株は外国出生者由来の株であった。

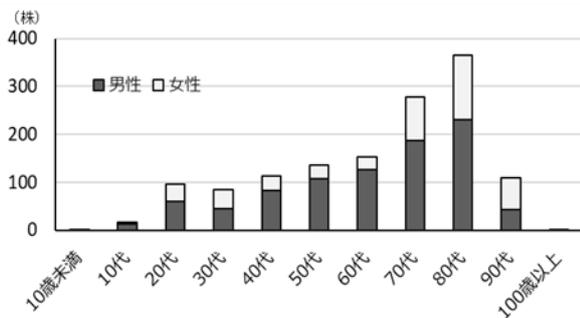


図1 年齢群別VNTR検査件数

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 948 株 (70.2%), 非北京型株は 392 株 (29.0%), 判定できなかったもの (型別不能) が 11 株 (0.8%) 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, 688 株 (72.6%) が祖先型, 236 株 (24.9%) が新興型, 推定できなかったものが 24 株 (2.5%) であった (表 1).

表 1 北京型別・系統推定結果

型別	株数 (%)	系統 (推定)	株数 (%)
北京型	948 (70.2)	祖先型	688 (72.6)
		新興型	236 (24.9)
		推定不能	24 (2.5)
非北京型	392 (29.0)		
型別不能	11 (0.8)		
計	1,351		

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) 70.7 歳, 北京型 (新興型) 56.3 歳, 非北京型 64.6 歳であった.

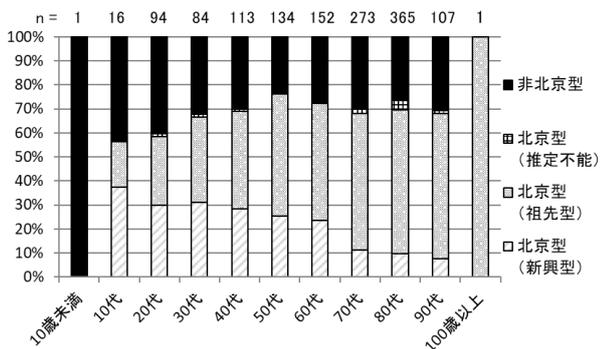


図 2 年齢群別北京型別・系統推定結果

3 クラスター解析

VNTR 法で解析を実施した結果, 1,351 株中, クラスターを形成した株は 333 株で, クラスター形成率は 24.6% であった. 北京型別ごとのクラスター形成率は, 北京型 (祖先型) が 26.5% (182/688), 北京型 (新興型) が 40.3% (95/236), 非北京型が 13.8% (54/392) 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 株による 1 クラスターのみであった.

クラスター形成株の平均年齢は, 北京型 (祖先型) 60.0 歳, 北京型 (新興型) 51.8 歳, 非北京型 62.2 歳であった.

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			
株数	688	236	24	392	11	1,351
クラスター形成株数 (%)	182 (26.5)	95 (40.3)	0	54 (13.8)	2 (18.2)	333 (24.6)
クラスター数	43	24	0	18	1	86

4 外国出生患者

解析した外国出生患者 102 名の年齢分布は, 6 歳から 87 歳で, 平均年齢は 31.9 歳, 年齢群別では 20 代が最も多かった (図 3). 男女別は, 男性 65 名 (63.7%), 女性 37 名 (36.3%) 出生国別北京型別・系統推定結果を図 4 に示した. 外国出生患者では PCR による北京型別の結果, 北京型株は 37 株 (36.3%), 非北京型株は 64 株 (62.7%), 型別不能が 1 株 (1.0%) 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 割以上を占めた. 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, 8 株 (21.6%) が祖先型, 29 株 (78.4%) が新興型であった. 日本人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 8 割近くを占めた. 外国出生患者における各型の平均年齢は, 北京型 (祖先型) 38.1 歳, 北京型 (新興型) 31.6 歳, 非北京型 31.4 歳であった.

外国出生患者株の中でクラスター形成株は 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.

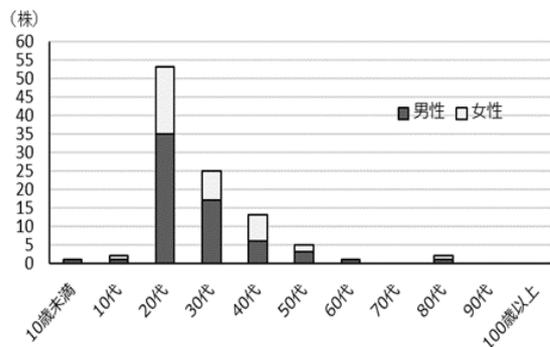


図 3 外国出生患者における年齢群別 VNTR 検査件数

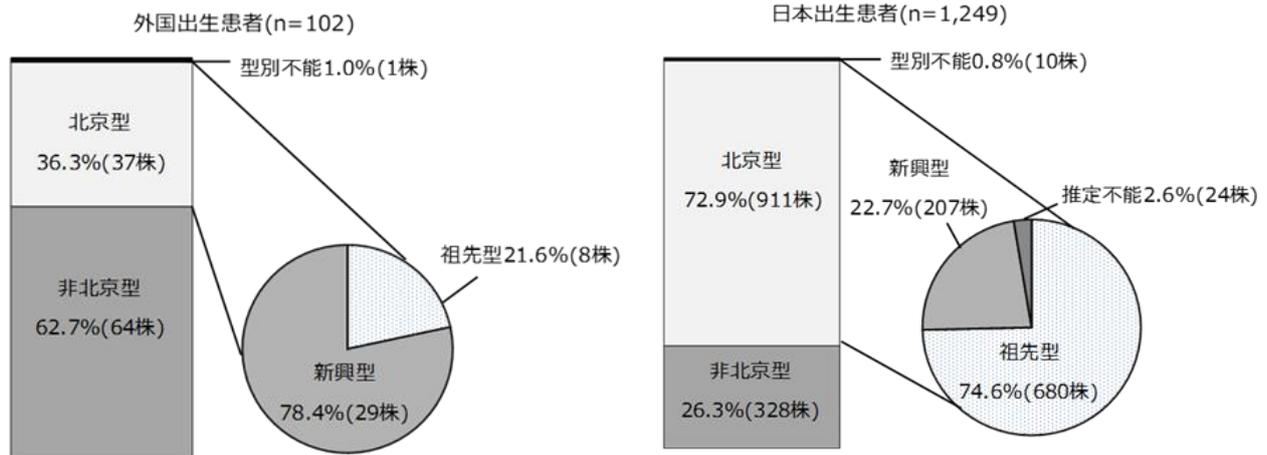


図4 出生国別北京型別・系統推定結果

考察

平成 28 年度から令和 4 年度までの北京型別の結果、北京型が占める割合は 70.2%であった。年齢群別では、患者数が 1 人だった 10 歳未満と 100 歳以上を除くと、10 代と 20 代の若年層では北京型の割合が約 6 割、その他の年齢群では北京型が約 7 割となっていた。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くとされている⁸⁾。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^{8) 9)}、今回の結果も同様であった。

さらに、北京型株は VNTR 型からの系統推定により新興型と祖先型に細分類される。北京型の新興型は、祖先型と比較して発症するまでの期間が短く、感染伝播力がより強く、発病しやすい傾向があり、特に都市部で勤労世代の感染が増加しているとされる^{10) 11)}。今回の系統推定の結果、70 代以上の患者では祖先型が 8 割以上と多かったが、年齢群が若くなるに従い新興型が多くなり、10 代では新興型が 6 割以上となっていた。若年層に新興型が多い傾向がみられたことは系統の特徴と一致していた。また、高齢者に祖先型が多い傾向がみられたことは高齢者結核患者の内因性再燃の影響⁹⁾が考えられた。

クラスター形成率を見ると、北京型は非北京型よりもクラスター形成率が高かった。また、北京型の新興型のクラスター形成率は 40.3%と高く、近年の感染伝播を反映していると推定された。クラスター形成率でも、新興型の割合は高齢層より若年層で高くなっており、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増加傾向にあり、20 代～40 代の若年層が多く、特に 20 代の患者は新登録結核患者全体の 7 割以上を占めており¹⁾、今回の調査でも同様な傾向がみられた。これは、若年層の在留外国人は、技能実習などの勤労や留学

など集団生活の機会が多いことが関係していると考えられる。

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割合が高く⁹⁾、今回の外国人出生患者の結果は世界的な傾向と一致していた。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関連性はほとんどないと考えられた。

近年、次世代シーケンサーの普及に伴い、結核菌ゲノムの全塩基配列を取得し、菌の近縁性を高精度に識別する結核菌ゲノム解析が行われ始めており、集団感染での感染経路の推定や、VNTR 解析ではクラスターを形成するにもかかわらず疫学的関連性が見つからない株についての精査が行われている¹²⁾。当所で実施した VNTR 解析で完全一致したクラスターの中には、7 年間にわたり一致する株が見つかったり、疫学的関連性が見つからなかったりする事例も多く、VNTR 法では分解能が不十分であると考えられた。今後は、このような株に対して次世代シーケンサーを用いて結核菌ゲノムの全塩基配列を取得し、高い分解能をもつ遺伝子解析を実施し、患者間の関連性をより詳細に解析する必要がある。また、次世代シーケンサーを用いた結核菌ゲノム解析では、感染伝播の順番、再発、再燃、複合感染、薬剤耐性遺伝子変異の検出など多くの情報を詳細に得られることから、より効果的な結核対策や治療への応用も期待できる。

文献

- 1) 厚生労働省：結核登録者情報調査年報集計結果.
- 2) 厚生労働省：結核に関する特定感染症予防指針.
- 3) 埼玉県感染症対策課：埼玉県結核菌分子疫学調査実施要領.
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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.
- 8) 加藤誠也, 瀧井猛将, 大角晃弘, 他：結核分子疫学調査の手引き第一版. 2017
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 瀬戸 順次, 和田 崇之, 阿彦 忠之, 他：山形県における結核菌ゲノム解析を用いた結核分子疫学調査. 感染症学雑誌 97, 6~17, 2023