

香川県内で検出された結核菌の分子疫学(VNTR)調査(2019)

Molecular epidemiology (VNTR) survey of *Mycobacterium tuberculosis* detected in Kagawa Prefecture (2019)

多田 郁美 岩下 陽子 関 和美 福田 千恵美
Ikumi TADA Yoko IWASHITA Kazumi SEKI Chiemi FUKUDA

要 旨

2019年1月から12月の間に香川県内で分離され、当センターに搬入された結核菌株19株のVNTR解析を行った。DNA鋳型を抽出し、JATA(12)-VNTRでPCRを行い、アガロースゲル電気泳動により反復数の算出を行った。VNTR解析結果より19株の反復数には一致がみられなかった。また、遺伝系統推定結果より県内の分離傾向は国内の傾向と同様で、北京型が8割を占めていた。その内祖先型が9割で、新興型は1株であった。感染伝播・発病力が強く注意が必要な新興型の結核菌株の県内での分離は少ない傾向にある。今後も引き続き、県内の菌株の解析を行い、動向を把握していきたい。

キーワード：結核菌 VNTR 解析 反復数 北京型 祖先型 新興型

I はじめに

結核とは、結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex ただし *Mycobacterium bovis* BCGを除く)による感染症である。結核は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なければならない全数報告の疾患である¹⁾。我が国では、平成30年の結核罹患率(人口10万対)は12.3であり、前年と比べ1.0ポイント減少している²⁾。結核罹患率が10未満は低まん延国、10~99は中まん延国、100以上は高まん延国とされ、我が国は欧米の水準である低まん延国となることを目標としている。

香川県では、平成31年4月1日より施行された香川県結核菌分子疫学的調査事業実施要領³⁾に基づき、感染源・感染経路等の究明と、結核の発生予防並びに感染拡大防止対策の資料とすることを目的とし、結核患者から分離された結核菌について反復配列多型(Variable Number of Tandem Repeat: VNTR)解析を実施している。

今回、2019年1月から12月の間に当センターに搬入された結核菌株のVNTR解析を行ったので、その結果を報告する。

II 方法

1 試供菌株

2019年1月から12月の間に香川県内で分離され、当センターに搬入された結核菌株19株を対象とした。

2 検査方法

(1) VNTR解析及びクラスター解析

結核菌VNTRハンドブック⁴⁾に準じて行った。

① 結核菌株からのDNA鋳型の抽出

菌体を500 μ lの蒸留水に懸濁して、95 $^{\circ}$ C、10分加熱し、遠心後上清をDNA鋳型とした。

② JATA(12)-VNTRにおけるPCR

③ アガロースゲル電気泳動による反復数の算出

泳動により得られた増幅産物サイズ(bp)を、反復数換算表と照らし合わせ反復数を算出した。

また、MLVA情報集計・可視化システムMLVA-mateによりMinimum Spanning Tree(MST)を作成し⁶⁾、クラスター解析を行った。

(2) 遺伝系統の推定

得られたVNTR反復数データを用いて、最大事後確率推定法による結核菌遺伝系統推定プログラム⁵⁾により遺伝系統を推定した。

III 結果

1 VNTR解析

解析結果を表1に示す。今回、対象とした19株には反復数が一致したものはなかった。菌株No4のJATA3領域では増幅産物が得られなかったためNと表記した。

MSTによりJATA12領域でクラスター解析をした結果、

クラスター形成は認められなかった(図1)。

2 遺伝系統推定及びクラスター解析

推定結果を図2、3に示す。北京型が79% (15株)、非北京型が21% (4株)となった。また北京型は祖先型が93% (14株)、新興型が7% (1株)に分類された。

表2より、北京型の平均年齢は83.3歳、非北京型は79.0歳であった。北京型のうち、祖先型は82.9歳であり、新興型は1株で89歳であった。

祖先型はさらに3つの遺伝系統に分類され、ST3群(7株)、ST25/19群(4株)、STK群(3株)であった(表3)。

表1 VNTR 解析結果

菌株No	JATA12											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	7	5
2	2	5	2	4	3	2	5	4	3	8	5	4
3	4	3	3	4	6	3	6	4	5	7	7	3
4	4	1	N	2	7	4	10	4	5	7	8	5
5	4	2	3	3	3	4	6	4	4	7	8	4
6	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5
7	4	3	3	3	3	3	1	4	5	7	8	4
8	4	1	3	2	6	2	5	4	5	7	8	5
9	2	5	2	1	2	4	1	2	3	9	8	5
10	2	3	1	3	3	2	5	4	3	12	3	3
11	4	2	3	3	2	3	7	4	5	7	9	4
12	3	3	3	4	9	3	7	5	4	7	2	5
13	3	3	0	2	5	4	5	4	2	12	7	3
14	4	3	3	2	7	4	7	4	5	7	11	5
15	1	3	3	3	7	3	7	4	4	7	8	5
16	4	3	3	2	7	5	7	4	5	7	6	5
17	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5
18	4	3	3	3	7	3	5	4	5	7	9	3
19	4	1	3	2	5	4	7	4	4	7	8	5

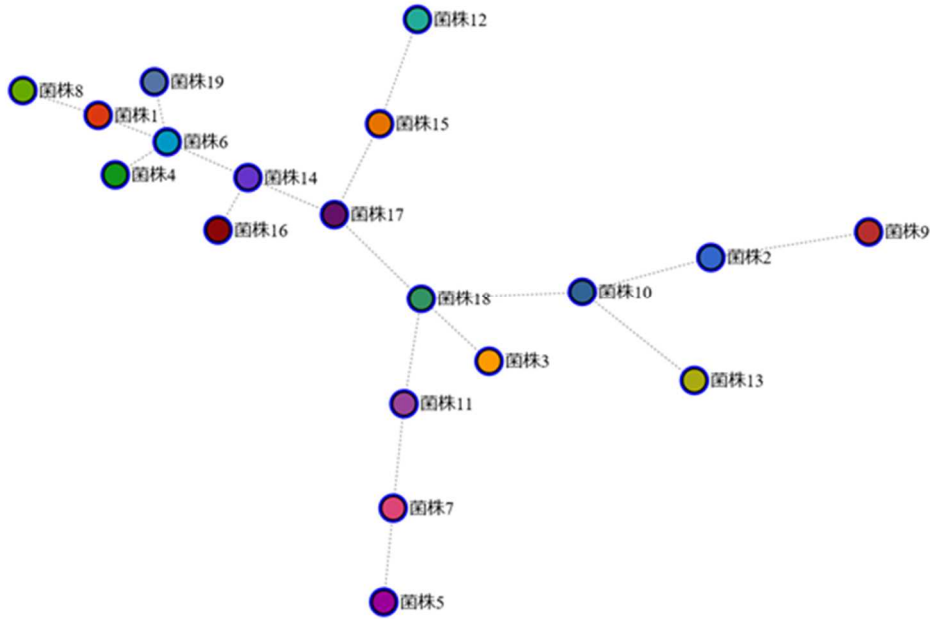


図1 MSTによるクラスター解析

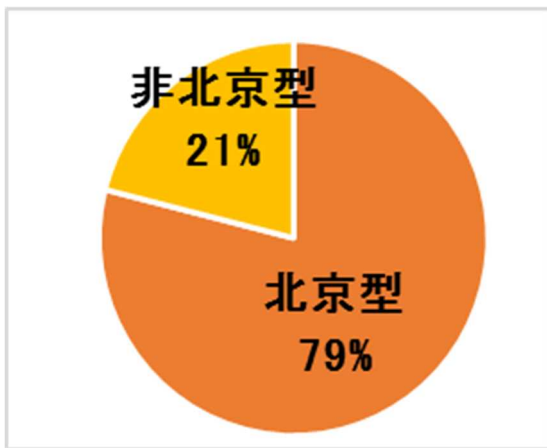


図2 北京型と非北京型の割合

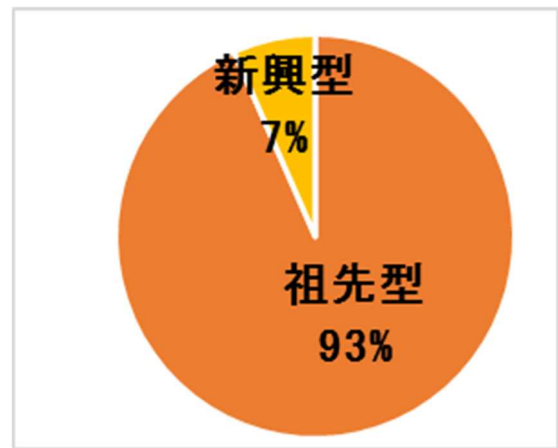


図3 祖先型と新興型の割合

表2 年齢分布

		70歳以下	71~80歳	81~90歳	91歳以上	平均	
北京型	祖先型	1	2	5	6	82.9	83.3
	新興型			1		89	
非北京型			3	1		79.0	

表3 祖先型の遺伝子型別

遺伝子型別	ST3	STK	ST25/19
菌株数	7	3	4

IV 考察

VNTR 解析結果より今回県内で分離された 19 株の反復数には一致がみられなかった。

東アジアで分離される結核菌の多くが特徴的な遺伝子型を示し、この遺伝子型に属する株を結核菌北京型株という⁷⁾。北京型株は他の遺伝系統と比べて、感染伝播力が強い、薬剤耐性と関連性が高い、発病・再発を引き起こしやすい、BCG 接種による免疫の影響を受けにくいとされており、我が国の臨床分離株の 7~8 割が属している。北京型をさらに、その遺伝子型の違いによって新興型と祖先型に細分類すると、世界的に蔓延している株は新興型で、祖先型に比べ若年者層で出現頻度が高く、感染伝播・発病力が強いとされている。しかし、我が国では祖先型がその約 8 割を占めている⁸⁾。県内では、北京型が 79% を占め、さらに北京型では祖先型が 93% であった。これは国内の分離傾向と同様であった。年齢分布より、祖先型の多くは 71 歳以上で、新興型は 89 歳の 1 株のみで、平均年齢にはほぼ差がみられなかった。新興型は若年者層で多く出現し、感染伝播力が強いとされているが、2019 年には県内では若年者層に感染が確認されていない。祖先型をさらに分類すると ST3 群、STK 群が多かった。これらは高齢者からの分離頻度が高いとされ、高齢者の過去の感染の再燃が示唆される。

今後も引き続き、県内の菌株の解析を行い、動向を把握し、感染源・感染経路等の究明と結核の発生予防並びに感染拡大防止対策につなげていきたい。

謝辞

TB MAP estimation (遺伝系統推定マクロ) をご提供いただきました山形県衛生研究所微生物部 瀬戸順次様に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) 結核予防会結核研究所：結核分子疫学調査の手引き 第一版, 2017 年 7 月
- 2) 厚生労働省：平成 30 年結核登録者情報調査年報集計結果について
- 3) 「香川県結核菌分子疫学的調査事業実施要領の制定について」(平成 31 年 3 月 7 日, 30 薬感第 61533-3 号, 薬務感染症対策課長通知)
- 4) 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 第一版, 2012 年 10 月
- 5) Seto J, et al.: Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation, *Infect Genet Evol*, 35, 82-88 (2015)
- 6) 南須原亮, 他: MLVA (VNTR) 情報の集計・可視化システム MLVA-mate の開発, 東京都健康安全研究センター年報, 69, 279-284 (2018)
- 7) Van Soolingen D, et al: Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia, *J Clin Microbiol*, 33, 3234-3238 (1995)
- 8) 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 (12), 755-759 (2009).