

【資 料】

## 結核菌DNA解析調査事業報告（平成28～30年度）

Report of Investigation with DNA Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* (Fiscal Years 2016～2018)

河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 中嶋 洋, 狩屋英明 (細菌科)

KAWAI Hisahiro, MORIMOTO Koji, NAKA Atsushi, NAKAJIMA Hiroshi, KARIYA Hideaki  
(Bacteriology Section)

### 要 旨

当県では、結核まん延状況の把握及び感染源・感染経路の究明、二次感染の予防等結核対策に資するため、県内の新登録結核患者から分離された結核菌のDNA解析を実施している。今回、平成28～30年度の3年間に収集した患者由来株171株についてVariable number of tandem repeats (VNTR) 解析法により解析を行った。サーベイランスとして解析を行ったところ、クラスターが5組見られたが、そのうち調査等で疫学的関連性が確認できたのは3組であった。さらに、疫学情報から患者間での感染が疑われた4事例について解析を行ったところ、2事例で患者由来株の遺伝子型がそれぞれ一致し、関連性が考えられた。また、収集した菌株の遺伝系統分布では、北京型が121株と全体の71.3%を占め、その中で新興型が若年者層で高く分離される傾向が示された。

[キーワード：結核菌, VNTR解析, 疫学調査, 北京型]

[Key words : *Mycobacterium tuberculosis* , VNTR analysis, epidemiological investigation, Beijing type]

## 1 はじめに

厚生労働省「平成29年 結核登録者情報調査年報集計結果について」(<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095.html>)によると、平成29年(2017)の全国の新登録結核患者数は16,789人であり、罹患率(人口10万人対)は13.3であった。年々減少傾向が見られているものの、罹患率を諸外国と比較すると、近隣アジア諸国よりは低い水準にあるが、欧米諸国と比べると未だ高く、中まん延国に位置づけられる。また、岡山県では新登録結核患者数は212人で、罹患率は11.1と全国の数値よりは低く減少傾向も見られているが、未だ注意を要する状況である。

このような中、当県では、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染予防等結核対策に資することを目的に「結核菌DNA解析調査事業実施要領」(以下「要領」という。)を定め、これを基に現在、Variable number of tandem repeats (以下「VNTR」という。)解析法を用いた分子疫学解析を行っており、各菌株についてデータベースを作成し感染事例の疫学調査に活用している。結核菌株の分子疫学解析を行うことは、疫学調査で感染が疑われた患者由来株間の遺伝子型が一致した場合にはその関連性の証明に役立ち、また、サーベイランスとして解析した患者由来株間で遺伝子型が一致した場合には、追加調査

等の実施によって、当初は疫学的に考えられなかったような新たな感染経路の発見の可能性も期待できる。今回、平成28～30年度の3年間に収集した患者由来株171株を用い、サーベイランスとしてこれらの菌株内でのクラスター解析を行った。併せて、これらの菌株のうち疫学情報から患者間で感染が疑われた4事例について解析を行ったので報告する。

また、結核菌は検出される遺伝系統の割合が地域により異なるが、日本では、北京型(Beijing genotype strain)が7～8割を占めると言われている<sup>1)</sup>。北京型は、感染伝播力が強く、薬剤耐性と関係が大きいことが報告されており<sup>2)</sup>、結核対策上重要である。県内で分離された結核菌の系統を把握するため、収集した菌株について北京型及び非北京型に分類し、さらに北京型については祖先型、新興型の分類を行い、系統の解析を実施したので報告する。

## 2 材料及び方法

### 2.1 解析対象株

県内の医療機関又は検査機関において分離された結核菌のうち、要領に定められた以下の項目のいずれかに該当し、かつ保健所所長が必要と判断した菌株171株(平成28～30年度収集株：疫学情報から感染が疑われた4事例9

株及び散発事例162株)をVNTR解析の対象とした。

- (1) 60歳以下の塗抹陽性患者(感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第19条適用者)の菌株
- (2) 社会福祉施設等(集団生活等)で発生した患者(利用者, 職員)の菌株
- (3) 接客業, 看護師, 保健師, 保育士, 教員, 医師他多集団との接触がある患者の菌株
- (4) その他, 事業の目的から調査が必要と認められる患者の菌株

## 2.2 菌株からのDNA抽出

DNA抽出は, 結核菌VNTRハンドブック(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1版)の「菌懸濁液の加熱死菌上清の作成方法」に準じて行った。

## 2.3 VNTR解析

VNTR解析は, 国内標準法として提唱されているJATA(12)-VNTR解析法<sup>3)</sup>, さらに, JATA(12)-VNTRの型別能力を補うために, JATA(12)-VNTRに3領域を加えたJATA(15)-VNTR解析法と3つの多型性に富んだ領域を解析する超多変(hypervariable, HV)領域のVNTR解析法を加えた計18領域で行った<sup>4), 5)</sup>。PCR法及びアガロースゲル電気泳動法で得られた増幅産物のサイズ情報から各領域のリピート数を決定し, 18領域のリピート数の組み合わせを遺伝子型(以下「VNTR型」という。)とした。VNTR解析及びデータベース作成には, 解析ソフトBioNumerics ver 7.6 (APPLIED MATHS)を用いた。1か所のVNTR領域で複数の明瞭なバンドを検出した菌株(以下「複数バンド株」という。)は, それぞれのリピート数のVNTR型を作成した。すなわち, 1か所の領域で2本の明瞭なバンドを検出した場合は, 1株の菌株で2パターンのVNTR型を割り当てた。また, クラスタ解析は, 18領域でリピート数が完全に一致, 又はこれに

準ずる程度に酷似した株を同一クラスターとした。

## 2.4 系統分類解析

各菌株の北京型(祖先型, 新興型)及び非北京型の系統分類は, Setoら<sup>6)</sup>の最大事後確率推定法(以下「MAP推定法」という。)を用いVNTR型から推定した。MAP推定法で推定確率が低くなり判定が困難となった株, また複数バンド株でそれぞれのリピート数で割り当てたVNTR型についてMAP推定法で解析した結果, 複数の型と判定された株については, 北京型と非北京型の区別をWarrenらによる方法<sup>7)</sup>, 祖先型と新興型の区分は, Mokrousovらによる方法<sup>8)</sup>に準じて実施し確認を行った。

# 3 結果

## 3.1 解析した菌株

収集した菌株の患者年齢階層別・男女別菌株数を表1に示す。解析を行った171株の患者の年齢分布は21～99歳, 平均年齢は68歳であった。年代別で見ると80代が一番多く52人(30.4%), 次いで70代が33人(19.3%)で, 70代以上が60.2%を占め高齢者が多かった。男女別では男性99人(57.9%), 女性72人(42.1%)であった。

## 3.2 VNTR解析結果 サーベイランスとしてのクラスター解析

171株についてクラスター解析を実施した結果, 10株が5組のクラスターA～Eに分類された(クラスター形成率5.9%) (表2)。クラスターA, B, Dはそれぞれ18領域のリピート数が完全に一致した菌株が2株ずつ分類された。クラスターCは, No.1839が領域V4120における複数バンド株であったが, そのうちの1つのバンド(リピート数)がNo.1819と一致したことからVNTR型が酷似するものと考え, 同一クラスターとした。また, クラスタEは, 感染が疑われた事例4の2株が分類されたが, 共に領域Q11aで1500 bpより大きい高分子量側の位置にバンドが見られリピート数の判定が不能であった。両株の増幅

表1 年齢階級別・男女別菌株数

年齢階級	男		女		計	
	株数	%	株数	%	株数	%
20代	11	11.1 %	7	9.7 %	18	10.5 %
30代	6	6.1 %	5	5.1 %	11	6.4 %
40代	5	5.1 %	5	5.1 %	10	5.8 %
50代	9	9.1 %	0	0.0 %	9	5.3 %
60代	10	10.1 %	10	10.1 %	20	11.7 %
70代	23	23.2 %	10	10.1 %	33	19.3 %
80代	29	29.3 %	23	23.2 %	52	30.4 %
90代	6	6.1 %	12	12.1 %	18	10.5 %
計	99		72		171	

産物を並べて電気泳動したところ、概ね同じ位置にバンドが出現したため、これら2株のVNTR型は極めて酷似しているものと考え、同一クラスターとした。

これらのクラスターのうち、クラスター B, D, Eは、保健所の調査で疫学的関連性が確認できたが、クラスター A,Cは不明であった。

### 3.3 事例の検討結果

疫学情報から感染が疑われた4事例についてVNTR解析を行ったが、その結果は表3に示すとおりであった。事例2は接触者検診対象であった同一通所施設利用者が発病した事例であったが、両株のVNTR型が一致したことから両者間での感染が示唆された。また、事例4は職場での接触者検診対象者が発病した事例であったが、先述したとおり両患者由来株は酷似したVNTR型であったことから関連性が考えられ、両者間での感染の可能性が示された。一方、事例1は、病院で同室であった患者間での感染が疑

われたが、患者由来株のVNTR型を比較したところ不一致であり、また、事例3は、職場において2人への感染が疑われた事例であったが、それぞれの株間でVNTR型が不一致という結果であった。

### 3.4 系統分類解析

系統分類解析の結果は、171株中、北京型は122株（71.3%）、非北京型は49株（28.7%）であり、北京型の内訳は祖先型が97株（79.5%）、新興型が25株（20.5%）であった（図1）。また、祖先型と新興型の割合を年齢階級別に見ると、30代、40代でそれぞれ57.1%、50.0%と新興型の割合が他の年代に比べ高かった（図2）。

## 4 考察

今回、平成28～30年度に収集した171株についてVNTR法によるクラスター解析を実施したところ、10株が5組のクラスターに分類された。これらのクラスターは

表2 クラスター解析結果

クラスター	菌株No.	年代	性別	検体採取年月	居住地(市町村)	疫学情報等	系統解析	VNTR型																	
								JATA12							JATA15							HV			
								J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	Q18	Q11a	EA	V3232	V3820	V4120
A	1766	90代	男	2017.2月	同一市町村	不明	非北京型	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	10	11	4	1	8	4
	1849	50代	男	2018.3月	同一市町村	不明	非北京型	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	10	11	4	1	8	4
B (事例2)	1788	90代	女	2017.4月	同一市町村	同一の通所施設	非北京型	2	5	1	1	2	3	1	2	3	15	8	4	7	7	3	5	6	4
	1804	80代	女	2018.1月	同一市町村			2	5	1	1	2	3	1	2	3	15	8	4	7	7	3	5	6	4
C	1818	60代	女	2017.7月	同一市町村	不明	北京型祖先型	4	3	3	3	6	3	7	4	5	7	8	3	10	8	4	15	13	6
	1839-2	70代	男	2017.7月	同一市町村			4	3	3	3	6	3	7	4	5	7	8	3	10	8	4	15	13	6
D	1824	60代	男	2018.2月	同一市町村	友人	北京型祖先型	4	1	3	2	6	2	6	4	5	7	7	5	10	9	4	15	14	9
	1846	50代	男	2018.7月	同一市町村			4	1	3	2	6	2	6	4	5	7	7	5	10	9	4	15	14	9
E (事例4)	1866	20代	男	2018.9月	隣接する市町村	同一の職場	北京型祖先型	4	3	3	5	6	3	6	4	5	7	7	3	10	>19	4	19	14	8
	1871	20代	女	2018.12月				4	3	3	5	6	3	6	4	5	7	7	3	10	>19	4	19	14	8

\*「>19」:1500 bpより大きい増幅産物

表3 感染が疑われた事例

事例No.	菌株No.	年代	性別	疫学情報等	VNTR型																	
					JATA12							JATA15							HV			
					J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	Q18	Q11a	EA	V3232	V3820	V4120
1	1731	80代	女	病院で同室	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	8	9	4	16	14	15
	1734	80代	女		4	3	3	3	6	3	7	4	5	7	8	3	10	8	4	15	14	5
2	1788	90代	女	同一の通所施設 1804は1788の接触者検診対象者	2	5	1	1	2	3	1	2	3	15	8	4	7	7	3	5	6	4
	1804	80代	女		2	5	1	1	2	3	1	2	3	15	8	4	7	7	3	5	6	4
3	1815	20代	女	1815が1744及び1805と職場で接触	4	3	3	3	4	2	7	4	5	7	8	5	10	9	>17	22	18	9
	1744	90代	男		4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	6	9	4	17	6	11
	1805	80代	女		4	3	3	3	3	7	4	5	7	9	4	14	8	4	13	15	7	
4	1866	20代	男	同一の職場 1871は1866の接触者検診対象者	4	3	3	5	6	3	6	4	5	7	7	3	10	>19	4	19	14	8
	1871	20代	女		4	3	3	5	6	3	6	4	5	7	7	3	10	>19	4	19	14	8

\*「>17」及び「>19」:1500 bpより大きい増幅産物

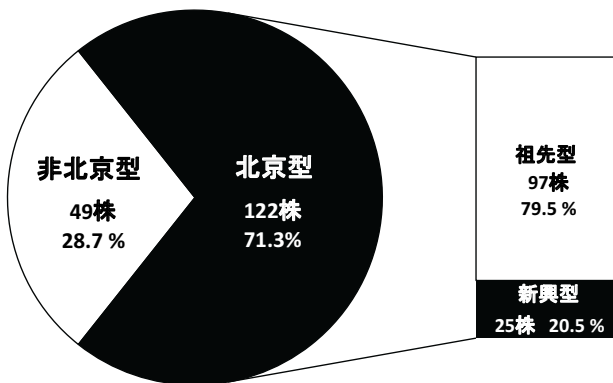


図1 系統分類解析

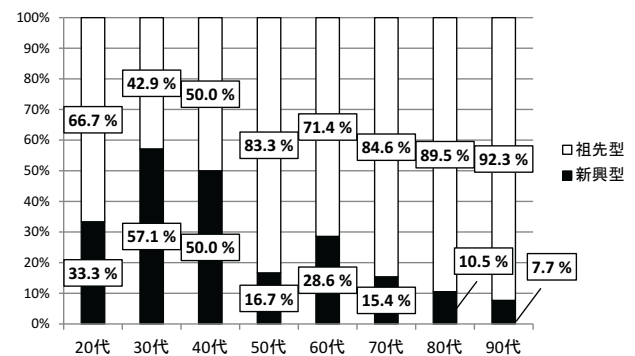


図2 北京型における祖先型・新興型の年齢階級別割合

それぞれ2株ずつ分類された小さいクラスターであり、収集した菌株内では大きな集団発生や県内で流行している株の傾向等は推察されなかった。クラスターを個々に見ると、クラスター B, D, Eは疫学情報から同一の通所施設の利用等何らかの関連性が見られた。一方、クラスター Aの患者は、ともに居住地（市町村）が同じであったが、検体採取時期が1年近く離れていたこともあり、疫学情報からは患者間の関連性は不明であった。また、クラスター Cの患者は、ともに居住地（市町村）が同じで検体採取時期も近かったため、何らかの接点があった可能性が考えられたが、疫学情報では関連性は不明であった。クラスター CのNo.1839は領域V4120における複数バンド株であり、複数バンドのうち1つがNo.1819とリピート数が一致していたことで同一クラスターと判断された。複数バンドとなった原因として、単一の株が増殖する際に起きたVNTR 領域の複製エラーによって生じたものと考えられた。結核は空気感染という特殊な感染様式を取ることから、クラスター A, Cともに今回の疫学情報では解明できなかった隠れた接点が存在した可能性も考えられる。

事例解析では、事例2及び4はVNTR解析から関連性が見られ、それぞれ通所施設、職場での接触による感染であると考えられた。一方、事例1, 3は、ともに株間のVNTR型が異なり、VNTR解析から関連性は考えられなかった。このように疫学調査で感染が疑われた事例検討でVNTR解析を活用することにより、推定された感染経路の科学的な裏付けができることが示された。

クラスター解析結果は、疫学情報と併せて解析すれば感染源・感染経路の発見や究明の一助となり、さらには集団感染や流行株の探知等にも有用になるため、今後も積極的に菌株を収集して解析を行い、引き続き行政側へ情報提供を行うことが重要と考えられる。

系統分類解析の結果では、71.3 %の菌株が北京型に分類された。北京型が73.8 %とする全国的な調査結果<sup>1)</sup>があるが、当県でも同様の結果となった。北京型のうち新興型は祖先型よりも感染伝播力が強く発病しやすいと言われており<sup>1), 9)</sup>、さらには集団感染に関与する遺伝系統であると示唆されている。北京型の分離状況の特徴として、他国では新興型が7割以上を占めているのに対して、日本では祖先型が8割程度を占めている一方で<sup>1)</sup>、若年者層の結核患者から新興型が分離される割合が高いことが挙げられる<sup>10)</sup>。今回の結果でも30代及び40代での新興型の割合が高く、他の年代、特に50代以上と比べると割合が高いことから、当県でも若年者層の新興型の割合が高い傾向が示された。若年者層の結核患者は、その発病の

ほとんどが高齢者の患者で多く見られる内因性再燃ではなく、現在の流行状況が反映されているものと考えられる。今回のクラスター解析では新興型のクラスターは見られなかったが、今後の結核対策には特に新興型について、そして若年者層の発生状況に注視する必要があると考えられた。

## 文 献

- 1) 岩本朋忠：結核菌分子疫学研究の将来展望，結核，84，789-791，2009
- 2) Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN：Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains, Trends Microbiol., 10, 45-52, 2002
- 3) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原 勇, 加藤 誠：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
- 4) 和田崇之, 長谷 篤：結核菌の縦列反復配列多型性（VNTR）解析に基づく分子疫学とその展望，結核，85，845-852，2010
- 5) 前田伸司, 和田崇之, 岩本朋忠：国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型（VNTR）分析法，日本細菌学雑誌，65，201，2010
- 6) Junji Seto, Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Aki Tamaru, Shinji Maeda, et al.：Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation, Infect. Gene. Evol., 35, 82-88, 2015
- 7) Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, 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
- 8) Igor Mokrousov I, Jiao WW, Valcheva V, Vyazovaya A, Otten T：Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-Based inverse PCR, J. Clin. Microbiol., 44, 2851-2856, 2006
- 9) Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy C. R. 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

- 10) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, et al. : Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan, J. Clin. Microbiol., 47, 3340-3343, 2009