

徳島県における VNTR 法を用いた結核菌 DNA 解析調査 (2016)

徳島県立保健製薬環境センター

市原 ふみ・片山 幸*・嶋田 啓司

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* using VNTR analysis in Tokushima Prefecture (2016)

Fumi ICHIHARA, Miyuki KATAYAMA and Keiji SHIMADA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

2016年度に結核菌 DNA 解析調査事業で当センターに搬入された結核菌 48 株の反復配列多型 (variable numbers of tandem repeats, VNTR) 分析法による解析を試みた。過去に実施した株も含めてクラスター分析を行った結果、12 領域 (JATA (12) - VNTR) の解析結果から形成された 11 個のクラスターのうち 3 つのクラスターにおいては、クラスター内の株は 18 領域 (JATA (15) + HV (3) - VNTR) の解析結果も一致した。これらの 3 つのグループについて、保健所の実地疫学調査も併せた分析の結果、いずれも散発事例としての対応となった。また、他の 1 つのクラスター内の 2 株においても 18 領域の解析結果が一致した。この 2 株は同じ患者であり、新たな感染ではなく再発であることが確認された。

今後も徳島県における結核予防対策として、VNTR 法による分子疫学解析と保健所の実地疫学調査を組み合わせた分析を継続することは、感染拡大防止に役立つと考えられる。

Key words : 結核菌 *Mycobacterium tuberculosis*, 反復配列多型 (VNTR) 分析法

I はじめに

結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) によって引き起こされる感染症で、感染症法において二類感染症に指定されている。厚生労働省の平成28年結核登録者情報調査年報集計結果 (概況)¹⁾によると、日本における平成28年の新登録結核患者数は17,625人、結核による死亡数は1,889人であった。また、結核罹患率 (人口10万対) は平成32年までに10以下を目指しているところ、平成28年の結核罹患率は13.9であった。いずれも年々減少しているが、世界的にみると日本はまだ結核の低まん延国ではない。徳島県においては、平成19年から平成28年にかけて、新登録結核患者数は177人から120人へ、罹患率は22.1から16.0へ漸減している (図1)。

近年、結核集団感染事例の感染経路などを解明するために、結核菌の遺伝子型別法として反復配列多型 (variable

numbers of tandem repeats, VNTR) 分析法 (以下VNTR法という。) が用いられている。これは、結核菌ゲノム上にある遺伝子の繰り返し領域での繰り返し数を測定することによって分類する方法である。本県では、2013年度に一部の結核患者を対象にVNTR法による分子疫学解析を開始し、2014年度から県内全域の結核患者から分離された結核菌について実施している。これにより、従来の患者調査を主体とした実地疫学調査と菌株からの情報を合わせることによって、感染源・感染経路の究明や結核の二次感染予防等の結核対策に活用し、結核の感染拡大防止において役立つ。

本報では、2016年4月～2017年3月までに結核菌DNA解析調査事業で搬入された菌株について、VNTR法を実施し解析を試みたので報告する。

*現 環境管理課

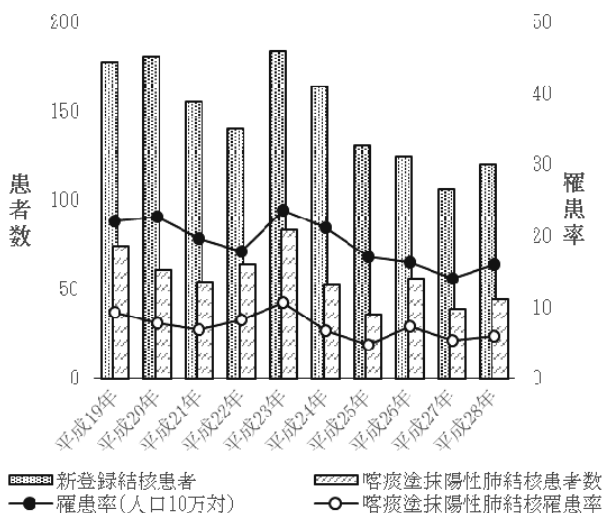


図1 徳島県における結核患者年次推移

II 材料と方法

1 材料

2016年4月から2017年3月までに結核菌DNA解析調査事業により搬入された結核菌48株を対象とした。

2 方法

(1) テンプレートDNAの抽出

DNAの抽出は前報^{2),3),4)}と同様の方法で行った。

(2) VNTR解析

前田ら^{5),6)}の方法に従いJATA12の12領域(JATA(12)-VNTR)およびJATA15で用いられている15領域に超多変領域(HV)であるQUB3232, V3820, V4120の3カ所の領域を加えた18領域(JATA(15)+HV(3)-VNTR)について実施し、換算表からコピー数を算出した。結果については、解析ソフト「BioNumerics ver 7.1」(APPLIED MATHS)を用いて解析した。

(3) 結核菌の北京型, 非北京型分類

Warrenら⁷⁾の方法に従い、PCR法により北京型及び非北京型の分類を行った。

III 結果及び考察

1 県内で分離された結核菌株のVNTR法による解析

2016年度に解析した48株について各領域の繰り返し数を算出し、昨年度までに実施した結果^{2),3),4)}と併せて検討した。はじめに、JATA(12)-VNTRの実施結果についてWard法により解析した(図2)。今回新たに解析した48菌株のうち14株が2株以上からなるクラスターを形成し、11個のクラスター(A~K)に分かれた。この11個のクラスターの株についてJATA(12)-VNTRに6領域追加したJATA(15)

+HV(3)-VNTRを実施し、追加した領域の結果を表1に示した。C, HおよびJグループは、グループ内の株において追加した領域もすべて一致した。Iグループは12株から形成され、追加した領域を比較すると10株は1~5領域の繰り返し数が異なっていたが、他の2株(2014_157, 2015_68)についてはすべて一致した。他のグループ(A, B, D, E, F, GおよびK)は、追加した領域を比較すると、グループ内の株は1~4領域の違いであった。このように、18領域(JATA(15)+HV(3)-VNTR)の解析は、12領域(JATA(12)-VNTR)の解析より詳細に菌株を識別した。

次に、11グループ(A~K)について、VNTR法による解析結果(⑦)と保健所の実地疫学調査(⑧)を組み合わせた分析(⑨)を行った。分析パターンは主に4つ(①~④)が考えられ、該当するグループを表2に示した。C, HおよびJグループは、JATA(15)+HV(3)-VNTRによる18領域の結果が一致したが、保健所の実地疫学調査において明らかな関連性は確認できず③に該当した。③のパターンは、VNTR法の限界(異なる菌株であるが同一と判定した可能性)あるいは実地疫学調査における限界(患者間に接触があったが見つけることが出来なかった可能性)が考えられるが、C, HおよびJグループにおいて追加の疫学調査を実施後も関連性は確認されなかったため、VNTR法の限界と考え、散发事例としての対応となった。Iグループの2株(2014_157, 2015_68)は同じ患者であり、①に該当した。18領域の結果が一致し、新たな感染ではなく再発であることが確認された。その他のグループ(A, B, D, E, F, G, KおよびI(①以外の10株))は④に該当した。これらのうち、Eグループの2株は1領域(V4120)の違いで不一致と判定されたが、同一由来株でも偶発的な変異により不一致と判定される可能性を考慮し、保健所に情報を伝えた。

このように、VNTR法による解析結果と保健所の実地疫学調査を組み合わせた分析は感染源・感染経路を検討することに役立った。

2 県内で分離された結核菌株の北京型, 非北京型数

県内で分離された48株について、北京型, 非北京型の分類を行ったところ、北京型40株(83.3%)、非北京型8株(16.7%)であった。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、BCG接種による免疫の影響を受けにくいとの研究報告⁸⁾もあり、県内分離株とこれらの特性との関係については今後の検討課題である。

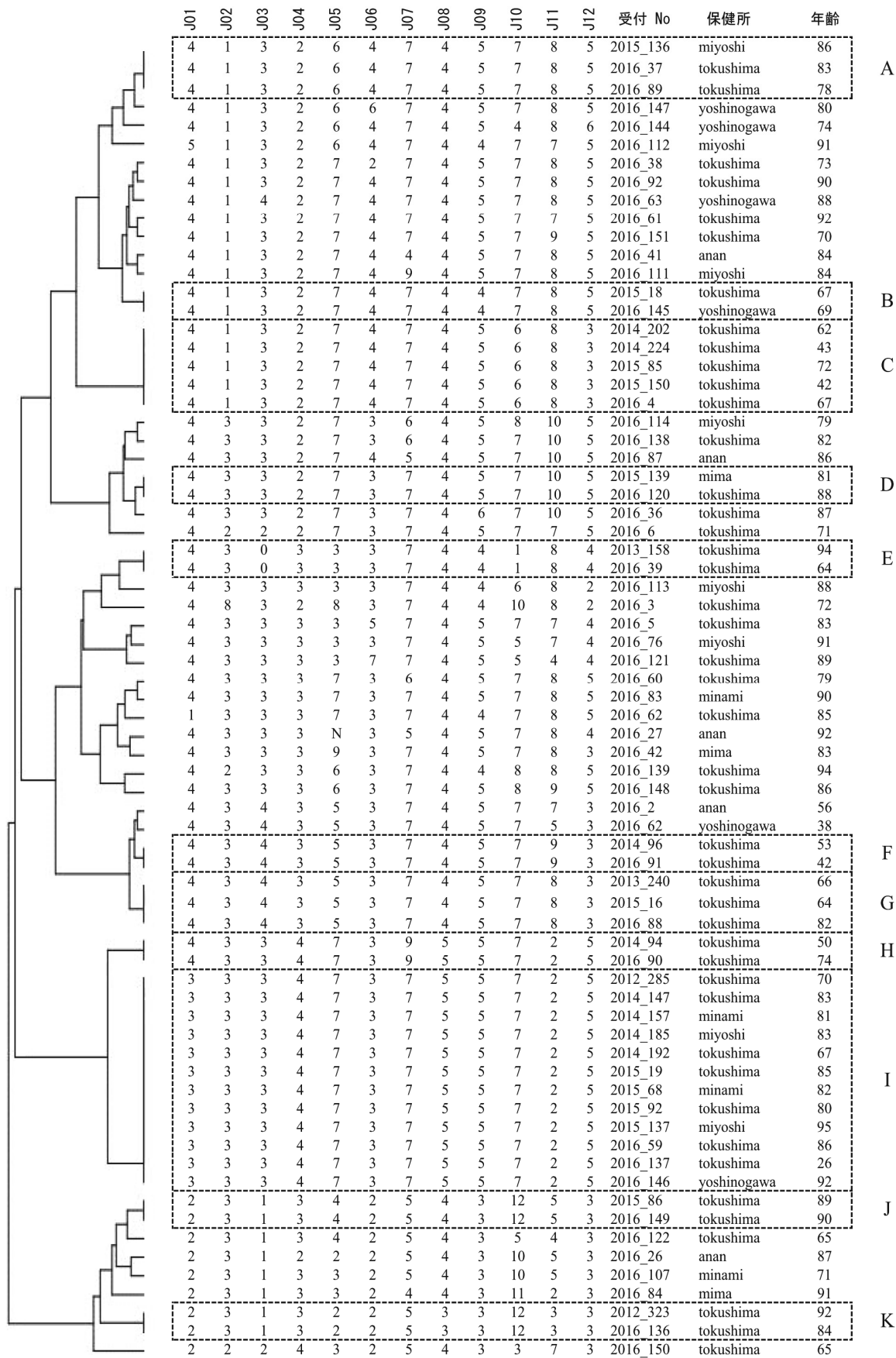


図2 JATA (12) - VNTR 法による解析結果(過去の株についてはクラスターを形成したもののみ記載)

表1 JATA (15) +HV (3) -VNTR 法による解析結果

Group	受付No	J13	J14	J15	V3232	V3820	V4120
A	2015_136	10	7	4	16	14	12
A	2016_37	10	9	4	18	12	11
A	2016_89	10	9	4	16	14	13
B	2015_18	9	9	4	14	15	9
B	2016_145	9	9	4	16	17	9
C	2014_202	10	9	4	16	14	12
C	2014_224	10	9	4	16	14	12
C	2015_85	10	9	4	16	14	12
C	2015_150	10	9	4	16	14	12
C	2016_4	10	9	4	16	14	12
D	2015_139	10	4	4	15	12	8
D	2016_120	10	>20	4	19	12	10
E	2013_158	10	8	4	14	>24	9
E	2016_39	10	8	4	14	>24	10
F	2014_96	8	8	4	14	13	10
F	2016_91	8	8	4	13	15	10
G	2013_240	8	5	3	12	14	10
G	2015_16	8	5	3	9	14	10
G	2016_88	8	8	N	15	7	10
H	2014_94	10	8	4	9	12	8
H	2016_90	10	8	4	9	12	8
I	2012_285	10	8	4	10	12	12
I	2014_147	10	8	4	13	12	10
I	2014_157	10	8	1	13	12	11
I	2014_185	9	8	4	10	12	11
I	2014_192	7	8	4	13	12	9
I	2015_19	10	8	4	10	12	11
I	2015_68	10	8	1	13	12	11
I	2015_92	10	8	4	9	12	7
I	2015_137	10	8	4	10	13	11
I	2016_59	10	7	4	13	12	11
I	2016_137	9	8	4	10	9	7
I	2016_146	10	8	4	9	12	10
J	2015_86	5	2	3	5	5	2
J	2016_149	5	2	3	5	5	2
K	2012_323	5	2	3	5	6	2
K	2016_136	5	2	3	5	5	2

表2 VNTR法による解析結果(㉞)と保健所の実地疫学調査(㉟)を組み合わせた分析(㊱)

	㉞	㉟	㊱	該当するグループ
①	一致	患者間の関連性 有	集団発生	I (2014_157, 2015_68)
②	不一致	患者間の関連性 有	偶発的な複数感染	—
③	一致	患者間の関連性 無	・VNTR法の限界(散発事例) ・疫学調査の限界	C, H, J
④	不一致	患者間の関連性 無	散発事例	A, B, D, E, F, G, K, およびI (①以外の10株)

IV まとめ

2016年度に結核菌DNA解析調査事業で搬入された結核菌48株についてVNTR法を実施し、過去に実施した株も含め解析を試みた結果、46株は散発事例であることが確認された。

今後もVNTR法による解析を継続して実施し、県内の結核罹患率減少を図るため、実地疫学調査に菌株からの分子疫学的情報を加え伝播経路を分析するツールとして活用し、将来の結核予防対策に役立てたい。

謝辞

本稿を終えるにあたり、検体の提供、搬送にご協力いただいた医療機関及び保健所の関係者の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省：平成28年結核登録者情報調査年報集計結果(概況)
- 2) 石田弘子, 嶋田啓司：結核菌DNA解析調査モデル事業におけるVNTR法を用いた解析, 徳島県立保健製薬環境センター年報, **4**, 19-21 (2014)

- 3) 石田弘子, 嶋田啓司：徳島県におけるVNTR法を用いた結核菌DNA解析調査(2014), 徳島県立保健製薬環境センター年報, **5**, 13-15 (2015)
- 4) 市原ふみ, 片山幸, 嶋田啓司：徳島県におけるVNTR法を用いた結核菌DNA解析調査(2015), 徳島県立保健製薬環境センター年報, **6**, 11-14 (2016)
- 5) 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)
- 6) 和田崇幸, 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)
- 7) 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)
- 8) Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, *et al.* : Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains, *Trends Microbiol*, **10**, 45-52 (2002)