

徳島県における VNTR 法を用いた結核菌 DNA 解析調査 (2017)

徳島県立保健製薬環境センター

篠原 礼・飛梅 三喜・市原 ふみ*・嶋田 啓司

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* using VNTR analysis in Tokushima Prefecture (2017)

Aya SHINOHARA, Miki TOBIUME, Fumi ICHIHARA and Keiji SHIMADA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

2017 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 44 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。過去に実施した株を含め、12 領域 (JATA (12) - VNTR) について菌株の同一性を解析した結果から 10 のグループが形成された。次に、6 領域を追加し解析したところ、10 グループのうち 3 グループ内の株間において 18 領域すべてが一致した。保健所による疫学調査結果を併せた分析の結果、1 グループ内では同一施設における集団感染事例と確定された。もう 1 グループは同一施設内感染と推定され、他は株間において疫学的な関連性は確認できず散発事例と推察された。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

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、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」において二類感染症に指定されている。厚生労働省の結核登録者情報調査年報集計結果¹⁾によると、日本における2017年の新登録結核患者数は16,789人、結核による死亡数は2,303人であった。

また、罹患率 (人口10万対) は2020年までに10以下を目指しているところ、2017年の罹患率は13.3であった。菌喀痰塗抹陽性肺結核患者数は6,359人で、前年より283人減少しており、菌喀痰塗抹陽性肺結核罹患率 (人口10万対) は5.0であった。

徳島県においては、2008年から2017年にかけて、新登録結核患者数は180人から118人へ、罹患率は22.7から15.9へ漸減、同様に菌喀痰塗抹陽性肺結核患者数は61人から36人へ、菌喀痰塗抹陽性肺結核罹患率は7.7から4.8へ漸減している (図1)。

しかし、都道府県別の結核罹患率では全国5位で、まだ高い

水準となっている。

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数多型 (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っている。

本報では、2017年4月～2018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 東部保健福祉局 (吉野川)

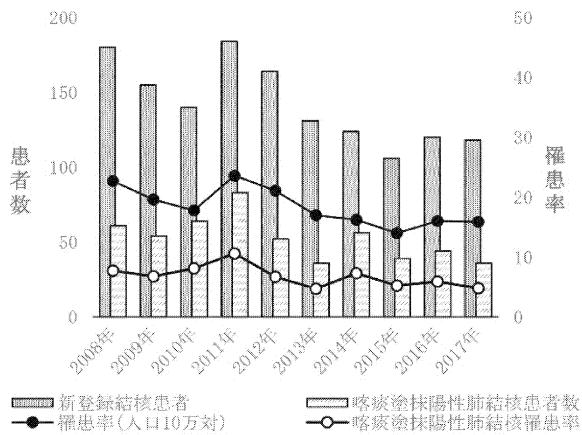


図1 徳島県における結核患者年次推移

II 材料と方法

1 材料

2017年4月から2018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44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^{2,4)}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「BioNumericus 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

2017年度に解析した44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^{2,4)}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44菌株のうち18株が2株以上からなるグループに含まれ、10のグループ(A~J)に分かれた。

次に、この10グループの株について、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。Dグループは7株から形成され、うち4株(2017_70, 2017_117, 2017_118,

2017_120)は、すべての領域で一致し、他の3株は1~2領域の繰り返し数が異なっていた。Fグループは4株から形成され、2株(2017_102, 2015_136)はすべての領域で一致したが、他の2株は2~4領域が異なっていた。Jグループ2株(2017_3, 2017_62)は、すべての領域で一致した。グループA, B, C, E, G, H及びIは、2017年度に解析した株とグループ内の株で一致するものはなく、1~4領域の繰り返し数が異なっていた。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の同一性を識別した。

さらに、18領域(JATA(15)+HV(3)-VNTR)の解析結果と保健所の疫学調査結果から、4つ(①~④)のパターンに分類し、それぞれのパターンについて分析を行った(表2)。①に該当したDグループ4株及びJグループ2株は、VNTRの解析結果が完全に一致し、保健所の疫学調査において、DとJそれぞれのグループ間で同一施設を利用する患者由来株であった。また、②に該当したDグループ1株は、①のDグループ4株とHVの1領域(V3232)が異なっていたため、VNTRの解析結果は不一致となった。しかしながら、疫学調査結果により、同一施設を利用する患者由来株であったことから、これら①及び②のDグループ5株は、同じ集団感染事例と確定された。これにより、パターン①は集団発生、②は菌株の偶発的な変異と推察された。③に該当したFグループ2株は、18領域の結果が一致したが、保健所の疫学調査において明らかな関連性は確認できなかった。これまでの調査からも、1年以上離れた株間における疫学的関連性を見出すことは困難であり、また、異なる菌株であるが同一と判定した可能性がありVNTR法の限界と考えられた。④に該当したグループ(A, B, C, E, G, H及びI)の株は、18領域において1~4領域が異なっており、疫学調査からも関連性がないことから散发事例と推察された。

このように、VNTR法による解析結果と保健所の疫学調査を組み合わせた分析は、感染源・感染経路の解明等、結核感染症対策に有効と考える。

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44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30株(68.2%)、非北京型14株(31.8%)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。

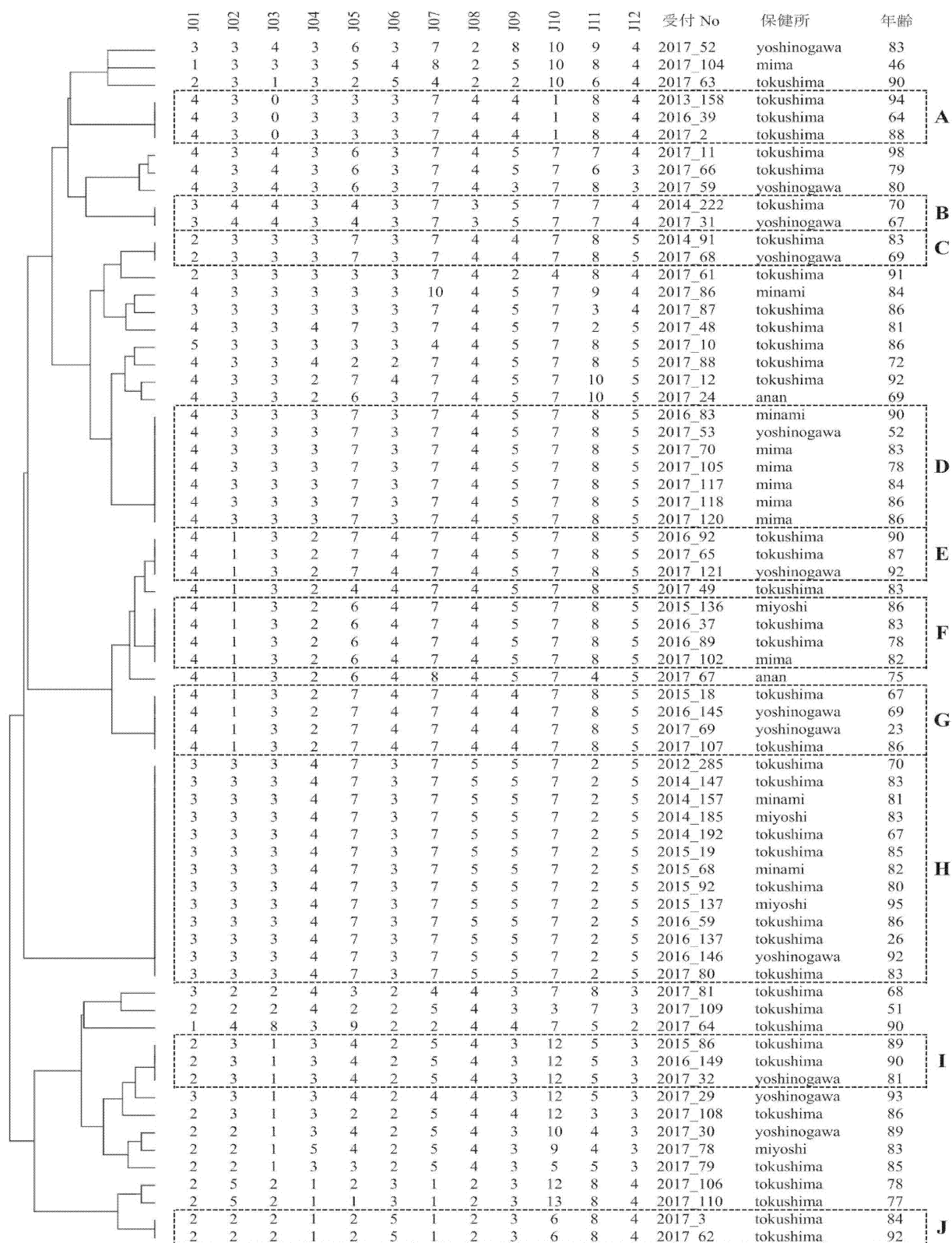


図2 JATA (12) -VNTR 法による解析結果 (過去の株については2017年度の株と一致したもののみ記載)

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	2013_158	10	8	4	14	>24	9
A	2016_39	10	8	4	14	>24	10
A	2017_2	10	8	4	16	>24	10

B	2014_222	10	7	4	12	17	13
B	2017_31	10	8	4	12	17	13

C	2014_91	5	8	4	13	10	5
C	2017_68	5	8	4	15	12	3

D	2016_83	10	8	4	13	12	5
D	2017_53	9	8	4	16	12	5
※ D	2017_70	10	8	4	16	13	5
※ D	2017_105	10	8	4	15	13	5
※ D	2017_117	10	8	4	16	13	5
※ D	2017_118	10	8	4	16	13	5
※ D	2017_120	10	8	4	16	13	5

E	2016_92	8	9	4	15	17	17
E	2017_65	9	5	4	18	12	9
E	2017_121	10	9	4	14	14	12

F	2015_136	10	7	4	16	14	12
F	2016_37	10	9	4	18	12	11
F	2016_89	10	9	4	16	14	13
F	2017_102	10	7	4	16	14	12

G	2015_18	9	9	4	14	15	9
G	2016_145	9	9	4	16	17	9
G	2017_69	9	9	3	16	3	9
G	2017_107	9	9	4	16	14	9

H	2012_285	10	8	4	10	12	12
H	2014_147	10	8	4	13	12	10
H	2014_157	10	8	1	13	12	11
H	2014_185	9	8	4	10	12	11
H	2014_192	7	8	4	13	12	9
H	2015_19	10	8	4	10	12	11
H	2015_68	10	8	1	13	12	11
H	2015_92	10	8	4	9	12	7
H	2015_137	10	8	4	10	13	11
H	2016_59	10	7	4	13	12	11
H	2016_137	9	8	4	10	9	7
H	2016_146	10	8	4	9	12	10
H	2017_80	10	8	4	12	12	15

I	2015_86	5	2	3	5	5	2
I	2016_149	5	2	3	5	5	2
I	2017_32	5	2	3	5	4	2

J	2017_3	5	>20	3	6	8	5
J	2017_62	5	>20	3	6	8	5

18 領域完全一致 ※ 集団感染事例

表2 VNTR 法による解析結果と保健所の疫学調査結果による分析結果

VNTR 法の 解析結果	保健所の 疫学調査結果	分析結果	該当するグループ
① 一致	患者間の関連性 有	集団発生	D (2017_70, 2017_117 , 2017_118, 2017_120) J (2017_3, 2017_62)
② 不一致	患者間の関連性 有	偶発的な変異	D (2017_105)
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	F(2017_102, 2015_102)
④ 不一致	患者間の関連性 無	散発事例	A (2017_2) , B (2017_31) , C (2017_68) , D (2017_53) , E (2017_65, 2017_121) , G (2017_69, 2017_107) , H (2017_80) , I (2017_32)

IV まとめ

2017 年度に結核菌 DNA 解析調査事業で搬入された結核菌 44 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。

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、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

- 厚生労働省：平成 29 年結核登録者情報調査年報集計結果 (2018)
- 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)
- 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)

- 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)
- 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 (2016) ,徳島県立保健製薬環境センター年報，**7**, 11-15 (2017)
- 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)
- 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)
- Warren R.M., Victor T.C., Streicher E. M., et al. :Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **169**, 610-614 (2004)
- Bifani P.J., Mathema B, Kurepina N.E., et al. : Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beiging family strains. *Trends in Microbiology*, **10**, 45-52 (2002)