

徳島県における VNTR 法を用いた結核菌 DNA 解析調査 (2018)

徳島県立保健製薬環境センター

河野 郁代・佐藤 豪・篠原 礼・飛梅 三喜*

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* using VNTR analysis in Tokushima Prefecture (2018)

Ikuyo KAWANO, Go SATO, Aya SHINOHARA and Miki TOBIUME

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

2018 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 60 株の反復配列数多型 (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 13 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、13 グループのうち 3 グループ内において、18 領域すべてが一致する株が見られた。保健所による疫学調査結果を併せた分析の結果、1 グループは家庭内感染と確定された。もう 1 グループからは、2017 年に集団感染事例と確定された施設を利用する患者由来株が 2018 年にも見つかった。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*, 反復配列数多型 (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 (2018)¹⁾によると、国内の 2018 年の新登録結核患者数は 15,590 人、結核による死亡数は 2,204 人であった。

また、国は結核罹患率 (人口 10 万対) を 2020 年までに 10 以下にすることを目指しており、2018 年の結核罹患率は 12.3 であった。菌喀痰塗抹陽性肺結核患者数は 5,781 人で、前年より 578 人減少し、罹患率 (人口 10 万対) は 4.6 であった。

徳島県においては、2009 年と 2018 年を比較すると、新登録結核患者数が 155 人から 106 人へ、罹患率は 19.6 から 14.4 と漸減傾向を示しているが、全国的にはまだ高い水準となっ

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に菌株からの情報を加えることによって、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役立っている。

本報では、2018 年 4 月～2019 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 西部県民局保健福祉環境部 (美馬保健所)

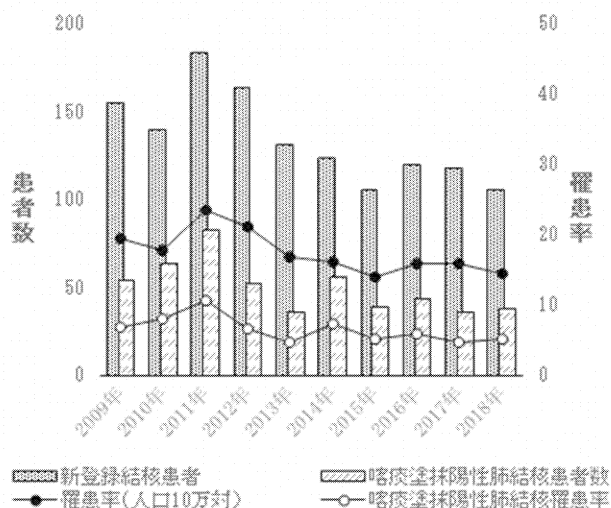


図1 徳島県における結核患者年次推移

II 材料と方法

1 材料

2018年4月から2019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60株を対象とした。

さらに、2018年3月以前に解析を行った結核菌株については系統解析の対象とした。

2 方法

(1) テンプレートDNAの抽出

DNAの抽出は前報²⁶⁾と同様の方法で行った。

(2) VNTR解析

前田ら⁷⁾およびMuraseら⁹⁾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V3232, 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。系統樹については、解析ソフト「BioNumerics ver 7.1」(APPLIED MATHS)を用いてWard法を用いて解析した。

(3) 結核菌の北京型、非北京型分類

Warrenら⁹⁾が確立したプライマーセットのうち、Set1と4を用い、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

2018年度に解析した60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²⁶⁾と併せて系統解析を行った。

はじめに、JATA(12)-VNTRの系統解析結果を図2に示した。今回新たに解析した60菌株のうち19株が2株以上からなるグループに含まれ13のグループ(A~M)に分かれた。

また、グループA, Dは徳島市で、グループMは鳴門市で診断された株から形成されていたが、このほかのグループに地域特異性は見られなかった。

この13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。Bグループは3株から形成され、2株(2018_105, 2017_31)はすべての領域で一致したが、他の1株は1領域が異なっていた。Cグループは9株から形成され、うち5株(2018_55, 2017_70, 2017_117, 2017_118, 2017_120)は、すべての領域で一致し、他の4株は1~2領域の繰り返し数が異なっていた。Kグループ2株(2018_203, 2013_113)は、すべての領域で一致し、他の2株は2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遺伝子型を識別した。

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Bグループ2株及びCグループ5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Bは家族間、Cは同一施設を利用する患者由来株であった。③に該当したK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、分離された年が1年以上離れた株間における疫学的関連性を見いだすことは困難であり、また、由来が異なる菌株であるが遺伝子型が同一であった可能性がありVNTR法の限界と考えられた。④に該当したグループ(A, D, E, F, G, H, I, J, L及びM)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発事例と推察された。今回②のグループに該当する株は見られなかった。

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、限界もあるが、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。

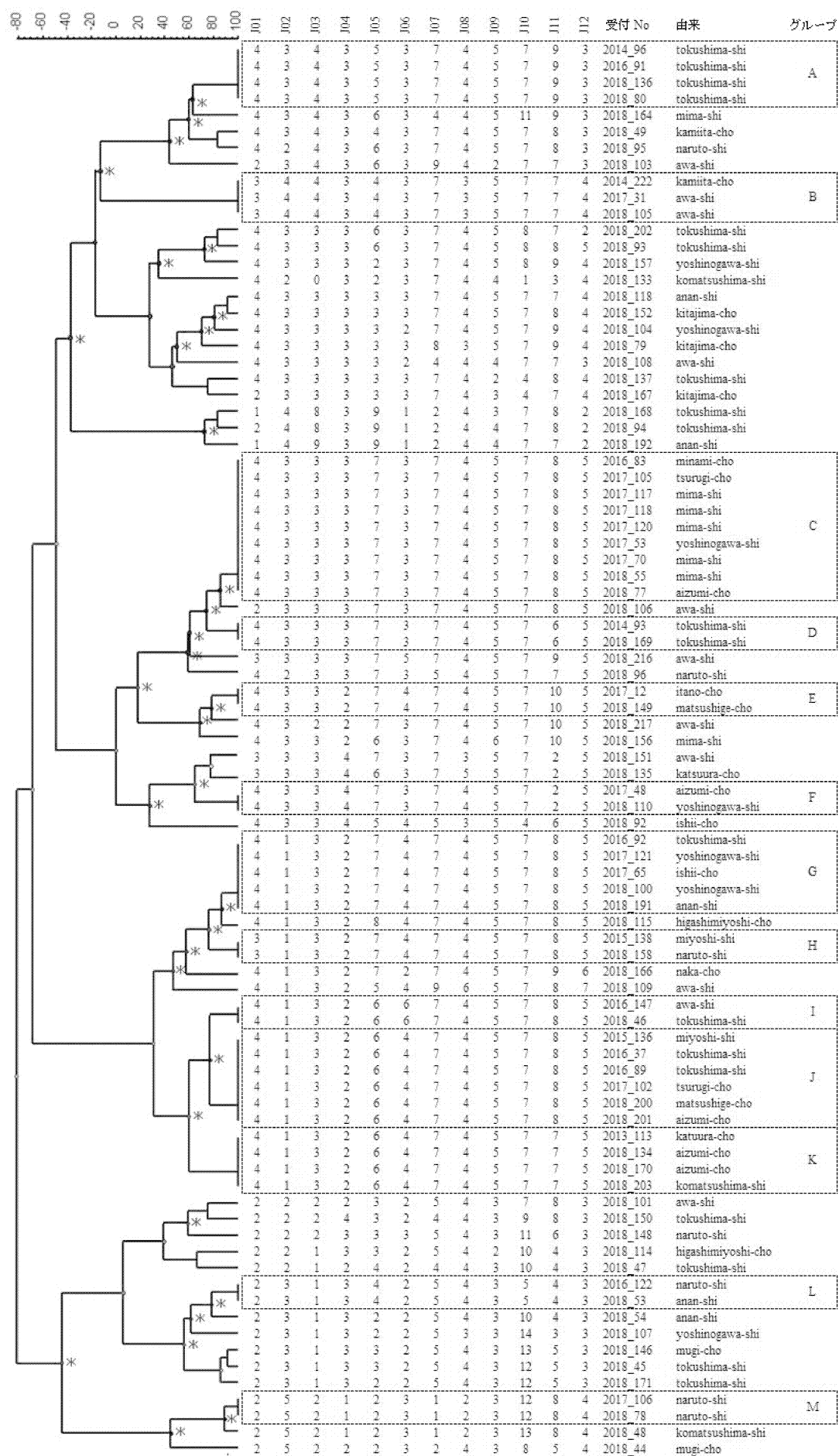


図2 JATA (12) -VNTR 法による解析結果 (*はブートストラップ値が 90 を超えたものを表記)

表1 JATA (15) +HV (3) -VNTR における 6 領域の反復配列

グループ	受付No	J13	J14	J15	V3232	V3820	V4120
A	2014_96	8	8	4	14	13	10
	2016_91	8	8	4	13	15	10
	2018_80	8	8	4	14	15	11
	2018_136	8	8	4	15	15	10
B	2014_222	10	7	4	12	17	13
	2017_31※	10	8	4	12	17	13
	2018_105※	10	8	4	12	17	13
C	2016_83	10	8	4	13	12	5
	2017_53	9	8	4	16	12	5
	2017_70※	10	8	4	16	13	5
	2017_105※	10	8	4	15	13	5
	2017_117※	10	8	4	16	13	5
	2017_118※	10	8	4	16	13	5
	2017_120※	10	8	4	16	13	5
	2018_55※	10	8	4	16	13	5
	2018_77	10	8	4	15	12	5
D	2014_93	9	5	4	13	12	5
	2018_169	10	6	4	13	12	5
E	2017_12	10	5	4	15	12	8
	2018_149	6	5	4	15	12	8
F	2017_48	7	7	3	5	8	4
	2018_110	10	11	4	10	12	11
G	2016_92	8	9	4	15	17	17
	2017_65	9	5	4	18	12	9
	2017_121	10	9	4	14	14	12
	2018_100	10	9	4	16	12	11
	2018_191	10	>20	4	15	15	12
H	2015_138	10	9	4	16	14	12
	2018_158	10	9	4	13	14	14
I	2016_147	10	9	4	16	14	11
	2018_46	10	7	3	14	16	12
J	2015_136	10	7	4	16	14	12
	2016_37	10	9	4	18	12	11
	2016_89	10	9	4	16	14	13
	2017_102	10	7	4	16	14	12
	2018_200	10	7	4	14	14	12
	2018_201	10	9	4	14	14	12
K	2013_113	10	7	4	18	14	12
	2018_134	10	7	4	17	14	18
	2018_170	10	7	4	17	14	17
	2018_203	10	7	4	18	14	12
L	2016_122	5	2	2	3	5	2
	2018_53	5	2	2	5	5	2
M	2017_106	6	7	3	5	8	4
	2018_78	7	>20	3	5	8	4

■ 2018 年度の株と 18 領域が完全一致した株 ※ 集団感染事例 □ 2018 年度の株

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類

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	B (2018_105, 2017_31), C (2018_55, 2017_70, 2017_117, 2017_118, 2017_120)
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 (散发事例) 疫学調査の限界	K (2018_203, 2013_113)
④	不一致	患者間の関連性	無	散发事例	A (2018_80, 2018_136), D (2018_169), E (2018_149), F (2018_110), G (2018_100, 2018_191), H (2018_158), I (2018_46), J (2018_200, 2018_201), L (2018_53), M (2018_78)

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60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43株(71.7%)、非北京型17株(28.3%)であった。北京型株は他の遺伝系統と比べ、感染伝播力が強く、薬剤耐性と関連性が高いとの研究報告¹⁰⁾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。

IV まとめ

2018年度に結核菌DNA解析調査事業で搬入された結核菌60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。2030年までに結核を終結させるモスクワ宣言が採択され、世界が丸丸となって結核流行の終息に向けた対策を強化していくことが求められている。

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、将来の結核終息の対策に役立てたい。

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30年結核登録者情報調査年報集計結果について、https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00002.html (2019年8月27日現在)
- 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)
- 篠原礼，飛梅三喜，市原ふみ，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 (2017)，徳島県立保健製薬環境センター年報，**8**,11-15 (2018)
- 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)
- Murase Y., Mitarai S., Sugawara I., et al. : Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Medical Microbiology*, **57**, 873-880 (2002)
- 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-Beijing family strains. *Trends in Microbiology*, **10**,45-52 (2002)