

徳島県における VNTR 法を用いた結核菌 DNA 解析調査 (2020)

徳島県立保健製薬環境センター

角宮 由華・佐藤 豪・河野 郁代・川上 百美子

Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Using VNTR Analysis in Tokushima Prefecture (2020)

Yuka KAKUMIYA, Go SATO, Ikuyo KAWANO, and Yumiko KAWAKAMI

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

2020 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 40 株の反復配列数多型分析法（以下「VNTR 法」という。）による解析を試みた。解析ができなかった 2 株を除き、計 38 株の VNTR を決定した。過去に実施した株も含めて系統解析を行った結果、12 領域（JATA1～12）について、遺伝子配列の反復数が一致する 11 のグループが形成された。次に、この 12 領域にさらに 6 領域を追加し解析したところ、5 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。保健所による疫学的調査結果を併せた分析の結果、1 グループは同一施設内における集団感染事例であった。その他 1 グループは家庭内感染であった。その他のグループでは、疫学上関連は見られず、散発的な事例と考えられた。

Key words : 結核菌 *Mycobacterium tuberculosis*, 反復配列数多型分析法 (Variable Numbers of Tandem Repeats)

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 2020 年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 2020 年の新登録結核患者数は 12,739 人、結核による死亡数は 1,909 人であった。2020 年の結核罹患率（人口 10 万対）は 10.1 で、前年より 1.4 ポイント減少した。喀痰塗抹陽性肺結核患者数は 4,615 人で、前年より 616 人減少し、喀痰塗抹陽性肺結核罹患率は 3.7 であった。徳島県においては、2011 年から 2019 年にかけて、新登録結核患者数は漸減傾向にあったが、2020 年にはわずかながら増加しており（図 1）、2020 年の結核罹患率および喀痰塗抹陽性肺結核罹患率はいずれも全国平均を上回っている。

結核集団感染事例の感染経路などを解明するための遺伝子型別法として、VNTR 法が多用されている。これは結核菌ゲノム上にある複数の遺伝子領域における特定の塩基配列のリピート（反復）数によって菌株の系統を推定する手法である。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、2020 年 4 月から 2021 年 3 月までに搬入された結核菌株について、VNTR 法を実施したので報告する。

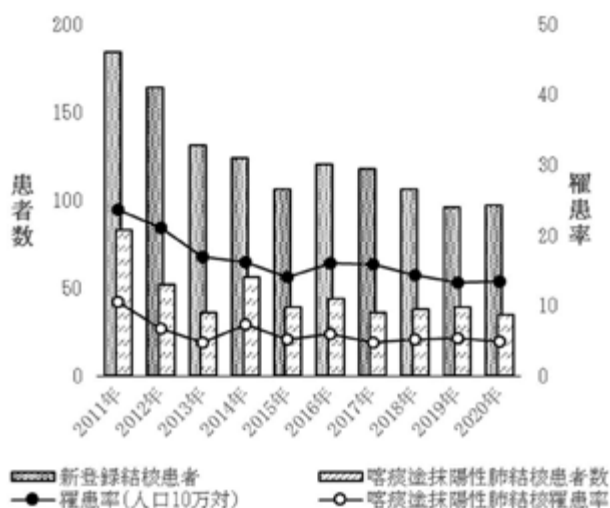


図1 徳島県における結核患者年次推移

II 材料と方法

1 材料

2020年4月から2021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40株の検査を行った。さらに2020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²⁸⁾と同様の方法で行った。

(2) VNTR解析

前田ら⁹⁾およびMuraseら¹⁰⁾の方法に従いJATA1~12の12領域およびJATA15で用いられている15領域に超多変領域(higher variable region, HV)であるQUB3232, V3820, V4120の3領域を加えた18領域について、ゲル電気泳動により各遺伝子領域のサイズを確認し、換算表から反復数を推定した。系統樹については、解析ソフト「BioNumerics ver 7.1」

(APPLIEDMATHS)を用いてWard法を用いて解析した。なお2020年3月以前に解析を行った結核菌株について、2020年度に搬入された株とグループを形成しない株については表記を割愛する。

(3) 結核菌の北京型、非北京型分類

Warrenら¹¹⁾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

40株のうち、1株(2020-20)はコンタミネーションのため検査はできなかった。1株(2020-184)は菌株の発育が認められず検査できなかった。18領域の反復数が決定できたの

は38株であり、うち1株(2020-178)において、1つの領域に2つのバンドが見られた。得られた18領域の解析結果、および昨年度までに実施した結果²⁸⁾と併せて系統解析を行った。

はじめに、JATA12領域の系統解析結果を図2に示した。今回新たに解析した38菌株のうち15株が他の株と完全一致を示した。12領域の完全一致が見られたグループは11(A~K)であった。

分離された年に特異的なグループは認められなかった。また地域特異性については、グループA, Gは徳島市在住の患者株から形成されていたが、その他のグループに明確な地域特異性は認められなかった。

この11グループの株について、JATA13~15およびHV3領域の反復配列数を表1に示した。図2で示した12領域の結果と併せ、18領域全ての反復数が一致する株で構成されるグループはGのみであった。さらにグループC, D, H, Jにも、18領域が一致する株が含まれていた。

この18領域の解析結果と、保健所の疫学調査結果から、①集団発生、②偶発的な複数の感染、③散发事例、またはVNTR法あるいは疫学調査の限界、④散发事例の4つ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に該当したグループC内の2株(2017_31, 2018_105)は家庭内感染であった。またグループG内の2株(2020_143, 2020_150)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同一施設を利用する患者由来株であった。②に該当したグループはなかった。③に該当したグループC内の1株、グループD内の3株、グループH, J内のそれぞれ2株は、18領域の反復数は一致したが、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, B, C, D, E, F, H, I, J及びK)の株は、18領域において1つ以上の領域が異なっており、疫学調査からも関連性が見いだせ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。

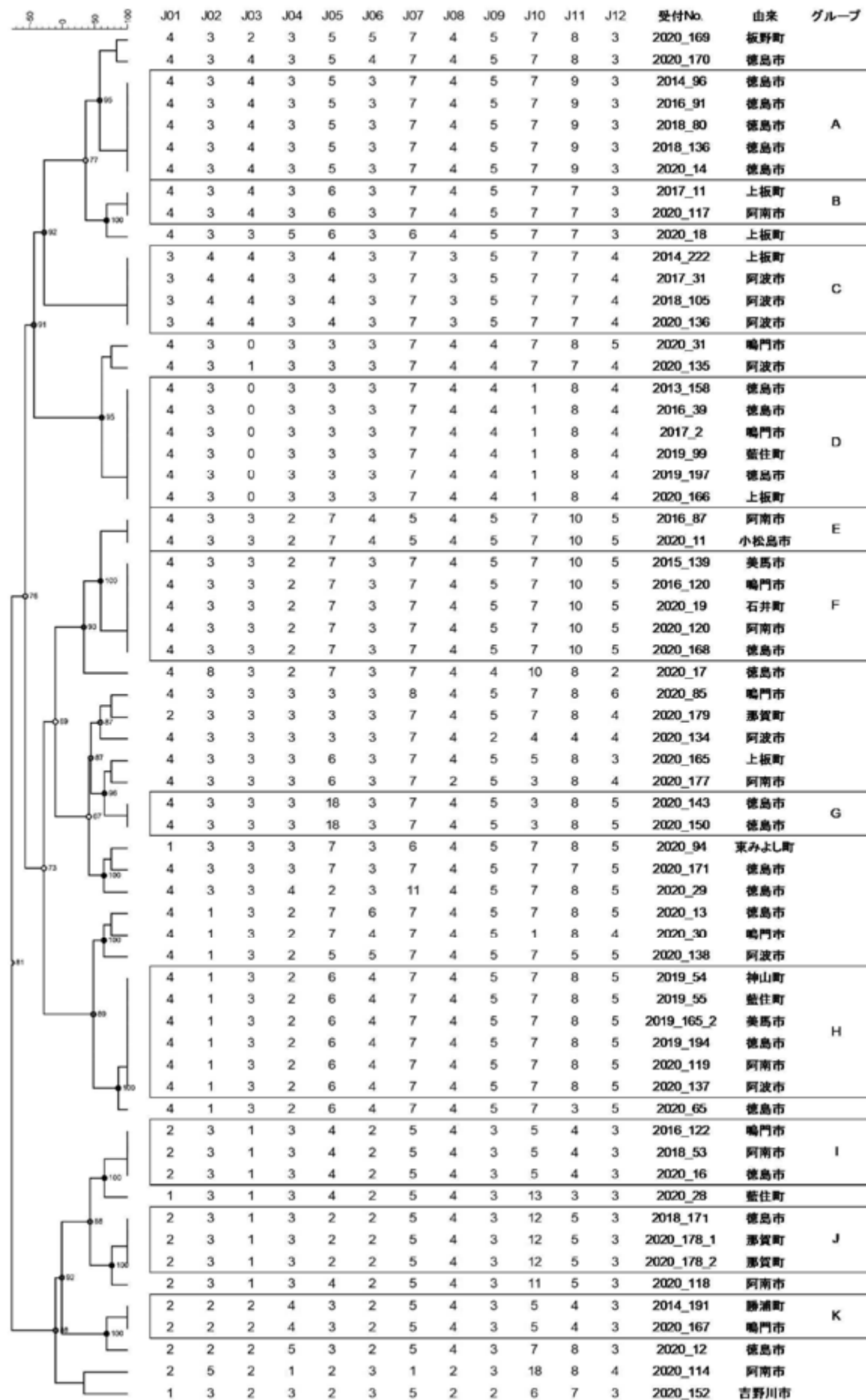


図2 JATA12領域のVNTR法による解析結果

表1 JATA15（JATA12 領域を除く 3 領域）+HV3 領域の 6 領域の反復数

グループ	受付No.	J14	QUB3232	V3820	V4120	J13	J15
A	2014_96	8	14	13	10	8	4
	2016_91	8	13	15	10	8	4
	2018_80	8	14	15	11	8	4
	2018_136	8	15	15	10	8	4
	2020_14	5	14	14	9	8	4
B	2017_11	5	14	19	8	8	4
	2020_117	8	14	14	8	8	4
C	2014_222	7	12	17	13	10	4
	2017_31*	8	12	17	13	10	4
	2018_105*	8	12	17	13	10	4
	2020_136	8	12	17	13	10	4
D	2013_158	8	15	>24	10	10	4
	2016_39	8	14	>24	10	10	4
	2017_2	8	16	>20	10	10	4
	2019_99	8	17	>20	10	10	4
	2019_197	8	17	>20	10	10	4
	2020_166	8	17	>20	10	10	4
E	2016_87	3	14	12	8	6	4
	2020_11	3	15	12	8	6	4
F	2015_139	4	15	12	8	10	4
	2016_120	>20	19	12	10	10	4
	2020_19	5	15	12	8	10	4
	2020_120	5	15	12	5	10	4
	2020_168	5	15	12	8	10	3
G	2020_143*	8	18	19	19	9	4
	2020_150*	8	18	19	19	9	4
H	2019_54	9	15	12	14	10	4
	2019_55	9	15	12	14	10	4
	2019_165_2 ¹⁾	9	16	14	12	10	4
	2019_194	7	14	15	12	10	4
	2020_119	9	16	14	9	10	4
I	2020_137	7	16	14	13	8	4
	2016_122	2	3	5	2	5	2
	2018_53	2	5	5	2	5	2
J	2020_16	2	5	1	2	5	2
	2018_171	2	5	5	2	5	3
	2020_178_1	2	5	5	2	5	3
K	2020_178_2	2	5	5	2	5	4
	2014_191	>20	14	5	4	5	3
	2020_167	>18	14	5	4	5	3

■2020 年度の株と 18 領域が完全一致した株 *集団感染事例

1) 解析領域（18 領域）においてダブルバンドが見られた株

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	該当する結核菌株 及びグループ
①	一致	患者間の関連性 有	集団発生	C(2017_31,2018_105) G(2020_143,2020_150)
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	偶然の一致（散发事例）またはVNTR法・疫学調査の限界	C(2020_136),D(2019_99, 2019_197,2020_166) H(2019_54,2019_55) J(2018_171,2020_178_1)
④	不一致	患者間の関連性 無	散发事例	A, B, C(2014_222) D(2013_158,2016_39,2017_2) E,F,H(2019_165_2,2019_194, 2020_119,2020_137),I J(2020_178_2),K

2 県内で分離された結核菌株の北京型、非北京型数

解析を行った38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28株（73.7%）、非北京型9株（23.7%）、北京型・非北京型の分類ができなかった株が1株であった（2.6%）。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¹²⁾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

2020年度に結核菌DNA解析調査事業で搬入された結核菌40株についてVNTR法を実施し、うち38株の系統解析を試みた。2030年までに結核を終結させるモスクワ宣言が採択され、世界が一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：2020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_00003.html（2021年9月6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）

- 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) 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）
- 6) 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）
- 7) 河野郁代，佐藤豪，篠原礼，飛梅三喜：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年報，9, 49-53（2019）
- 8) 佐藤豪，河野郁代，川上百美子，篠原礼：徳島県におけるVNTR法を用いた結核菌DNA解析調査（2019），徳島県立保健製薬環境センター年報，10, 57-61（2020）
- 9) 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）
- 10) 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）
- 11) 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）

- 1 2) 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)