

徳島県における VNTR 法を用いた結核菌 DNA 解析調査 (2022)

徳島県立保健製薬環境センター

吉田 知位子・角宮 由華*・北山 朝樹

Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Using VNTR Analysis in Tokushima Prefecture (2022)

Chiiko YOSHIDA, Yuka KAKUMIYA and Tomoki KITAYAMA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

2022 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 28 株について反復配列数多型 (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 8 グループが形成された。さらに、この 8 グループについて、6 領域 (JATA13~15 及び HV3 領域) を追加し解析したところ、5 グループ内において、18 領域全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。その他 1 グループは同じ徳島市での感染事例であったが、疫学上関連は見られなかった。その他のグループでも、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」(平成 10 年法律第 114 号) において二類感染症に指定されている。厚生労働省の 2022 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 2022 年の新登録結核患者数は 10,235 人、結核による死亡数は、1,664 人であった。2022 年の結核罹患率 (人口 10 万対) は 8.2 で、前年より 1.0 ポイント減少した。喀痰塗抹陽性肺結核患者数は 3,703 人で、前年より 424 人減少し、喀痰塗抹陽性肺結核罹患率 (人口 10 万対) は 3.0 であった。徳島県においては、2013 年から 2022 年にかけて、新登録結核患者数は 131 人から 75 人へ、結核罹患率は 17.0 から 10.7 へ漸減している (図 1) が、2022 年の結核罹患率は全国平均を上回っている。

結核集団感染事例における感染経路などを解明するための遺伝子型別法として、反復配列数多型分析法 (以下「VNTR 法」という。) 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が加わり、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することで、結核の感染拡大防止に役立っている。

本報では、2022 年 4 月から 2023 年 3 月までに搬入された結核菌株について、VNTR 法による分子疫学解析を実施したので報告する。

*現 徳島県立中央病院

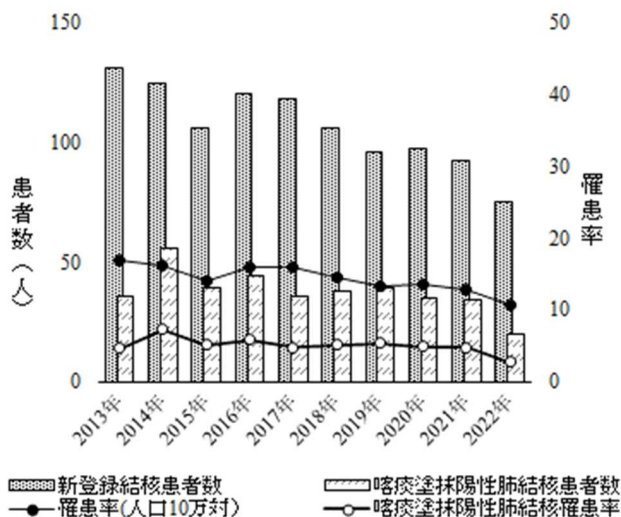


図1 徳島県における結核患者年次推移

II 材料と方法

1 材料

2022年4月から2023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28株の検査を行った。さらに2022年3月以前に解析を行った結核菌株についても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²⁻¹⁰と同様の方法で行った。

(2) VNTR解析

前田ら¹¹及びMuraseら¹²の方法に従い、JATA12で用いられている12領域及びJATA15で用いられている15領域に超多変領域 (higher variable region, 以下「HV」という。)であるQUB3232, V3820, V4120の3領域を加えた18領域について、ゲル電気泳動及び自動電気泳動装置 (MultiNA) 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法にて解析を行った。なお、2022年3月以前に解析した結核菌株について、2022年度に搬入された株とグループを形成しない株は表記を割愛する。

(3) 結核菌の北京型及び非北京型分類

Warrenら¹³が確立したプライマーセットのうち、Set1とSet4を用いて、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

得られた18領域の解析結果及び昨年度までに実施した結

果²⁻¹⁰と併せて系統解析を行った。

はじめに、JATA12の系統解析結果を図2に示した。12領域の完全一致が見られたのは8グループ(A~H)であった。

グループB, Cは、2022年度に解析された株のみで構成されており、居住地はいずれも徳島市であった。この他のグループに明確な地域特異性や分離された年による特徴は見られなかった。

この8グループの株について、JATA13~15及び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、今回新たに解析した28菌株のうち7株が、18領域全ての反復数で同グループ内の他の株と完全一致を示した。完全一致する株で構成されるグループはB, C, Hで、さらにグループE, G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散发事例又は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解析を行った(表2)。

①に該当したグループC内の2株(2022_47, 2022_49)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家庭内感染であった。②については保健所の疫学調査の結果、該当したグループはなかった。③に該当したグループB, グループE内の2株、グループG内の2株及びグループH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。これまでの調査では、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、グループBも分離された年は1年以上離れていた。また、由来が異なる菌株であるが、今回調べた遺伝子型が同一であった可能性があり、当センターで用いているVNTR法の限界と考えられた。今後、クラスター分析の分解能向上のため、24領域の分析やNGSの活用等の検討が必要であると考えられた。④に該当したグループ(A, D, E, F及びG)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。

2 県内で分離された結核菌株の北京型及び非北京型数

北京型は国内で分離される結核菌の約7~8割を占めており、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¹⁴⁾¹⁵⁾がある。解析を行った28株について、北京型及び非北京型の分類を行ったところ、北京型20株(71%)、非北京型8株(29%)であり、国内と同様の傾向であった。

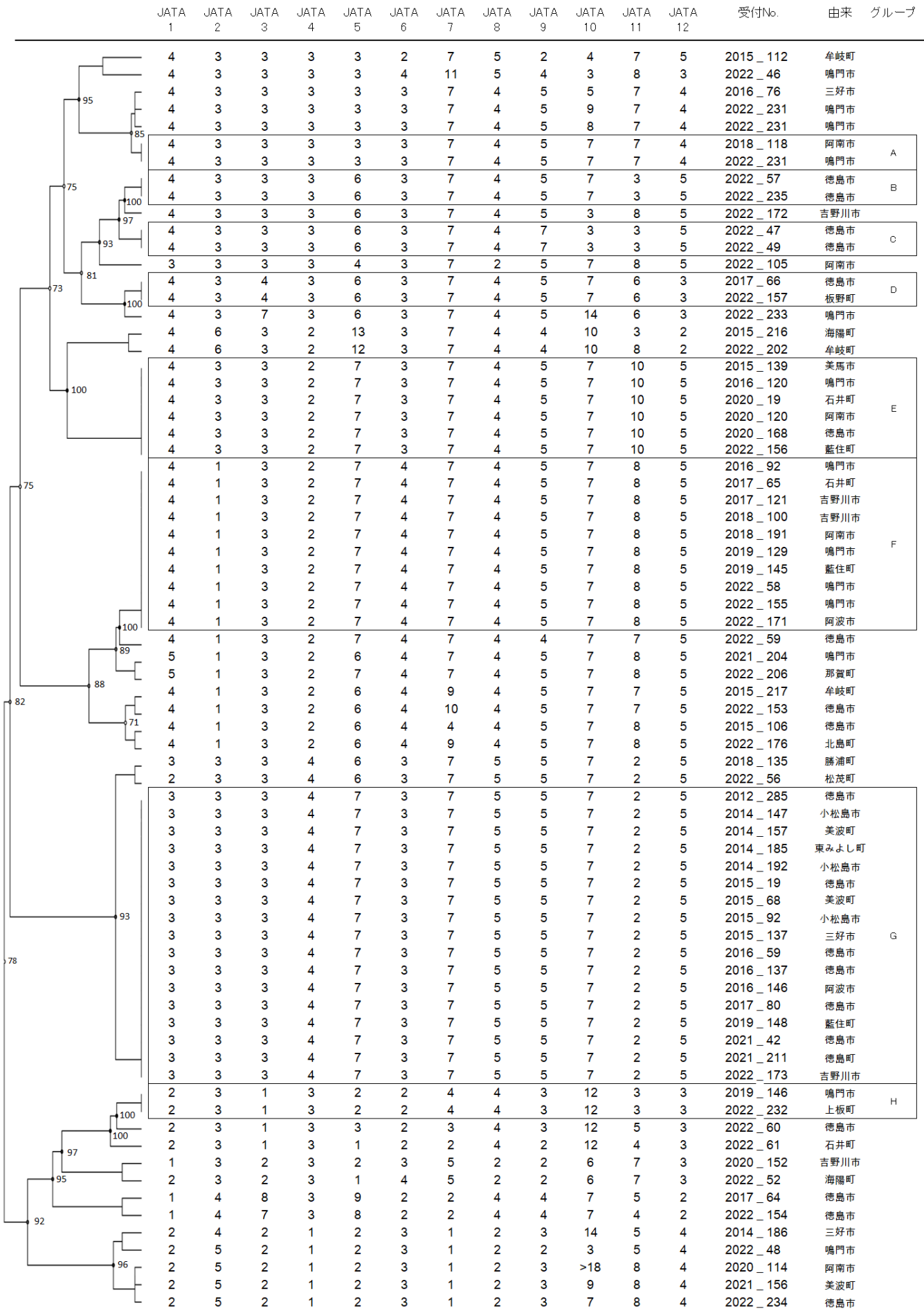


図2 JATA1~12のVNTR法による解析結果

表1 JATA13～15+HV3 領域の6領域の反復数

グループ	受付No.	JATA14	QUB3232	V3820	V4120	JATA13	JATA15
A	2018_118	>20	10	12	9	10	2
	2022_231	8	10	15	10	10	2
B	2022_57	8	17	16	5	10	4
	2022_235	8	17	16	5	10	4
C	2022_47*	8	17	16	5	10	4
	2022_49*	8	17	16	5	10	4
D	2017_66	8	14	18	3	8	4
	2022_157	8	15	18	3	8	4
E	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
	2022_156	5	15	12	8	10	4
F	2016_92	9	15	17	17	8	4
	2017_65	5	18	12	9	9	4
	2017_121	9	14	14	12	10	4
	2018_100	9	16	12	11	10	4
	2018_191	>20	15	15	12	10	4
	2019_129	9	16	14	12	10	4
	2019_145	9	17	14	12	10	4
	2022_58	9	18	14	10	10	4
	2022_155	9	15	14	11	7	4
2022_171	9	14	14	6	10	4	
G	2012_285	8	10	12	12	10	4
	2014_147	8	13	12	10	10	4
	2014_157	8	13	12	11	10	1
	2014_185	8	10	12	11	9	4
	2014_192	8	13	12	9	7	4
	2015_19	8	10	12	11	10	4
	2015_68	8	13	12	11	10	1
	2015_92	8	9	12	7	10	4
	2015_137	8	10	13	11	10	4
	2016_59	7	13	12	11	10	4
	2016_137	8	10	9	7	9	4
	2016_146	8	9	12	10	10	4
	2017_80	8	12	12	15	10	4
	2019_148	8	13	12	11	10	4
2021_42	8	10	12	12	10	4	
2021_211	8	12	12	14	10	4	
2022_173	8	10	12	11	10	4	
H	2019_146	2	5	5	2	5	3
	2022_232	2	5	5	2	5	3

■ 2022年度の株と18領域が完全一致した株

*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(2022_47,2022_49)
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）又はVNTR法・疫学調査の限界	B(2022_57,2022_235),E(2020_19,2022_156),G(2015_19,2022_173),H(2019_146,2022_232)
④	不一致	患者間の関連性	無	散发事例	A,D,E(2015_139,2016_120,2020_120,2020_168),F,G(2012_285,2014_147,2014_157,2014_185,2014_192,2015_68,2015_92,2015_137,2016_59,2016_137,2016_146,2017_80,2019_148,2021_42,2021_211)

IV まとめ

2022年度に結核菌DNA解析調査事業で搬入された結核菌28株についてVNTR法を実施し、系統解析を試みた。菌株からの分子疫学的情報は、疫学調査により見出された患者間の関連性への科学的な裏付けを与えるものである。今後も、VNTR法による解析を継続して実施するとともに、クラスター分析の分解能向上のため24領域の分析やNGSの活用等の検討が必要であると考えられた。

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：2022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_00010.html (2023年9月4日現在)
- 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) 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) 角宮由華，佐藤豪，河野郁代，川上百美子：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年報，**11**，69-74 (2021)
- 10) 角宮由華，佐藤豪，河野郁代：徳島県におけるVNTR法を用いた結核菌DNA解析調査 (2021)，徳島県立保健製薬環境センター年報，**12**，49-54 (2022)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 岩本朋忠：世界的感染拡大傾向が危惧される結核菌北京

型株, 複十字, **329**, 20-21 (2009)

- 15) 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)