

資 料

岐阜県における反復配列多型 (VNTR) 分析法を用いた結核菌の遺伝子型別
(2014-2018 年度)

越勝男, 亀山芳彦

要 旨

岐阜県では、平成 27 年度から結核菌の分子型別による分子疫学調査事業を開始し、平成 30 年度までに搬入された 397 株の結核菌株について VNTR 分析法による遺伝子型別を行った。その結果、VNTR 型別が完全に一致した菌株が 16 のクラスタ（内因性再燃を含む）を形成し、44 株検出された。またそのうち 3 クラスタ、9 株では家族などの疫学的関連が確認された。遺伝系統の推定において若年層で、非北京型および北京型（新興型）の検出が多く、特に外国籍患者で若年層患者の割合と非北京型および北京型（新興型）の検出が多いことが確認された。非北京型と推定された株の VNTR 型別について系統樹解析を行った結果、外国籍患者由来株の一部に集積と地域性が認められた。このことから、本調査事業は、実地疫学調査による疫学的関連性を科学的に裏付けることだけでなく、地域における結核発生動向の把握に有用であると考えられた。

キーワード：結核菌, VNTR, 外国籍患者

1 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およ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。

結核の国内患者数および罹患率（人口 10 万人に対する新登録結核患者数）は減少傾向にあるものの、平成 30 年の新登録結核患者数は 15,590 人、罹患率（人口 10 万対）は 12.3 であり国際的には結核中蔓延国に位置付けられている¹⁾。岐阜県における平成 30 年の新登録結核患者数は 279 人（前年 313 人）、罹患率は 14.6（前年 15.6）であり減少傾向にあるが全国値を上回っている。

都道府県などは、結核に関する特定感染症予防指針により、積極的疫学調査および発生動向の把握などへの活用のため、分子疫学的手法からなる病原体サーベイランスの構築に努める必要があり、分子疫学的手法として、結核菌の遺伝子型別法の一つである反復配列多型 (Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR)) 解析による結核菌の遺伝子型別が、各地方衛生研究所を中心に行われている。

岐阜県では、結核の発生動向の把握およびその発生対策に資すると共に、感染源の究明と感染経路の調査を行う際のデータ集積を目的とし、結核菌の分子型別による分子疫学調査事業要領を定め、平成 27 年 6 月

から調査事業を開始した。

本報告では、事業の開始から平成 31 年 3 月までに当所に搬入された結核菌の VNTR 分析状況についてその概要を報告する。

2 材料と方法

2.1 供試菌株

平成 27 年 6 月から平成 31 年 3 月までに、保健所から結核菌の分子型別による分子疫学調査事業実施要領に基づき VNTR 型別のため当所に搬入された結核菌株 397 株を対象とした。なお、これらの調査・分析は、岐阜県保健所等倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号：岐保倫 016）。

2.2 DNA 抽出

2% 小川培地 (S) (極東製薬工業) に培養された結核菌をマイクロチューブでかきとり、300 μ l の滅菌蒸留水に浮遊し、100°C で 10 分間加熱処理後、10 分間遠心分離 (10,000 \times g) を行い、その上清を DNA 抽出液とした。

2.3 VNTR 分析法

VNTR 領域は Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12) -VNTR 分析法²⁾に用いられている 12 領域に、識別能を高めるために 3 領域 (JATA (15) -VNTR 分析法³⁾と超多変 (hypervariable, HV 領域⁴⁾に属する 3 領域を加え、計 18 領域を対象とした。

得られたPCR産物はアガロース電気泳動を行い、各領域の反復数を算定した。

2.4 遺伝系統の推定

遺伝子系統の推定には「結核菌反復配列多型(VNTR)パターンから遺伝系統を推定するための最大事後確率(MAP)推定法マクロプログラム」⁵⁾を用いた。また系統樹は、西森らの方法⁹⁾によりに変化したVNTRの領域数による距離計算を行い作成した。

菌株数の内訳を表1に示した。平成27年度～平成30年度に保健所から当所に搬入された患者由来の結核菌株397株を対象とした。

表1 患者年齢階級別菌株数(平成27～30年度)

年齢	～39	40～49	50～59	60～69	70～79	80～	計
男性	19	14	11	23	52	125	244
女性	25	7	7	4	13	97	153
計	44	21	18	27	65	222	397

患者の年齢は、80歳以上が222名(56.0%)、60～79歳が92名(23.2%)、40～59歳が39名(9.8%)および39歳以下が44名(11.1%)であった。

3 結果と考察

3.1 検体内訳

表2 患者年齢階級別推定遺伝系統(平成27～30年度)

	非北京型	ST11/26	STK	ST3	ST25/19	新興型	計
80歳～	67(30.2)	6(2.7)	37(16.7)	55(24.8)	44(19.8)	13(5.9)	222
70歳～79歳	14(21.5)	1(1.5)	9(13.8)	21(32.3)	16(24.6)	4(6.2)	65
60歳～69歳	8(29.6)	1(3.7)	3(11.1)	6(22.2)	7(25.9)	2(7.4)	27
50歳～59歳	5(27.8)	1(5.6)	0	2(11.1)	6(33.3)	4(22.2)	18
40歳～49歳	7(33.3)	0	1(4.8)	1(4.8)	2(9.5)	10(47.6)	21
～39歳	24(54.5)	0	1(2.3)	1(2.3)	6(13.6)	12(27.3)	44
計	125	9	51	86	81	45	397

※ 括弧内は年齢階級別の各遺伝子系統のパーセンテージを示す。

表3 クラスタ形成株の内訳(平成27～30年度)

No	遺伝子型	株数	管轄保健所	疫学情報	クラスタ形成株
1	非北京型	5	岐阜市, 東濃, 可茂, 飛騨	疫学関連不明	28kamo-9, 28city-14, 28tono-14, 30city-6, 30hida-3
2	非北京型	4	西濃, 東濃, 恵那	疫学関連不明	28tono-7, 28tono-10, 29ena-1, 30seino-18
3	非北京型	2	西濃	疫学関連不明	28seino-4, 28seino-15
4	非北京型	2	岐阜, 可茂	疫学関連不明	29kamo-3, 30gifu-5
5	非北京型	2	岐阜市, 岐阜	疫学関連不明	30gifu-3, 30city-24
6	非北京型	4	東濃	同居家族	28tono-6, 28tono-15, 28tono-16, 29tono-11
7	北京型(ST25/19)	2	可茂	同一人物(再燃)	30kamo-4, 30kamo-6
8	北京型(ST25/19)	2	岐阜, 飛騨	疫学関連不明	27hida-1, 29gifu-3
9	北京型(ST25/19)	4	岐阜市, 西濃, 可茂	一部同居家族	28city-7, 28seino-5, 28kamo-13, 28kamo-17
10	北京型(ST25/19)	2	西濃, 可茂	疫学関連不明	30seino-8, 30kamo-8
11	北京型(ST25/19)	2	関	疫学関連不明	29seki-5, 30seki-1
12	北京型(ST25/19)	2	西濃	同一人物(再燃)	28seino-20, 30seino-15
13	北京型(ST25/19)	2	岐阜, 西濃	疫学関連不明	28gifu-16, 28seino-11
14	北京型(新興型)	4	岐阜市, 西濃	疫学関連不明	29city-7, 29city-13, 29seino-6, 29seino-7
15	北京型(新興型)	2	岐阜, 可茂	疫学関連不明	28gifu-7, 28kamo-6
16	北京型(新興型)	3	岐阜市	外国人と同一住所 [※] の日本人	29city-18, 29city-19, 30city-22

※ 保健所の追加疫学情報

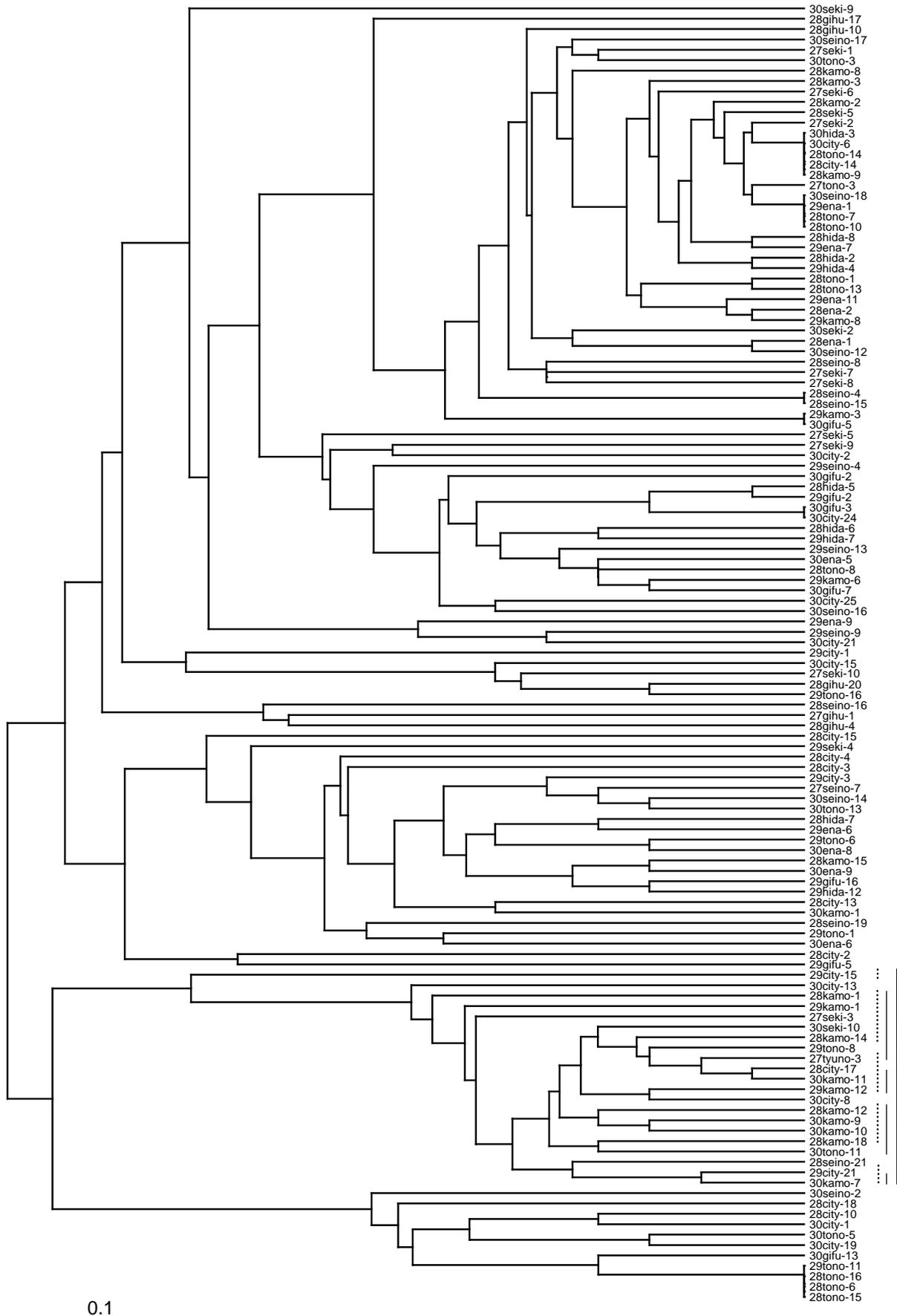


図1 JATA (15) およびHV (3) 領域のVNTR 型別による系統樹解析
 太線は外国籍患者由来株の集積部位, 細線は可茂地域および隣接市町村, 点線は外国籍患者由来株 (29city-15 (カンボジア国籍) 以外はフィリピン国籍) を示す.

3.2 VNTR 型別と遺伝系統の推定

結核菌 397 株の 18 領域 VNTR 型別と遺伝系統の推定の結果、非北京型と推定された株が 125 株 (31.5%)、北京型が 272 株 (68.5%) であった。

また北京型 (新興型) が 45 株 (11.3%) であり、全国⁷⁾での報告とほぼ同様の傾向であった。北京型の内、諸外国では新興型の分離率が高いのに対し、わが国では逆に祖先型の分離比率が高いことが知られている。北京型 (新興型) は、感染伝播性および病原性が高く、特に若年層に多いことが報告されているが、当県においても、若い年齢層ほど北京型 (新興型) の割合が高率であった (表 2)。

結核菌 397 株の 18 領域 VNTR 型別の結果、44 株 (11.1%) が 16 クラスタを形成した。各クラスタ内の構成菌株数は、2 株が最も多く 10 クラスタであった。次いで、4 株が 4 クラスタ、3 株と 5 株がそれぞれ 1 クラスタであった。また、クラスタ形成株について、遺伝系統を推定したところ、16 クラスタの内、非北京型の株により構成されるものが 6 クラスタ、北京型が 10 クラスタ (祖先型 (ST25/19) が 7 クラスタ、新興型が 3 クラスタ) であった (表 3)。クラスタ番号 1~5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 は実地疫学調査でクラスタ内の患者間について接触歴は確認できなかった。クラスタ番号 6 は同居家族およびその接触者で構成されている事例であった。またクラスタ番号 7, 12 は同一人物の再燃によるものであった。クラスタ番号 14 の一部 (夫婦 : 29city-7, 29city-13, 同一人物 : 29seino-6, 29seino-7) と 16 (外国人と同一住所の日本人) にそれぞれ疫学的関連が認められた。

3.3 外国籍患者

菌株の遺伝系統を患者年齢階級別に検討すると (表 2)、非北京型と北京型 (新興型) の若年層での検出割合が高いことがわかった。

表 4 国籍別遺伝子系統の内訳 (平成 27~30 年度)

	非北京型	ST11/26	STK	ST3	ST25/19	新興型	計
外国籍	19 (17)	0	0	0	3 (3)	15 (10)	37
日本国籍	106 (7)	9 (0)	51 (1)	86 (1)	78 (3)	30 (2)	360
計	125 (24)	9 (0)	51 (1)	86 (1)	81 (6)	45 (12)	397 (44)

※ 括弧内は 39 歳以下の患者由来株数を示す。

また、国籍別に遺伝子系統を比較すると (表 4)、外国籍の患者由来株は日本国籍と比較し、39 歳以下の患者由来の株が多く、非北京型および北京型 (新興型) の遺伝系統の検出が多いことが確認された。

このことから、当県の若年層における非北京型と北京型 (新興型) の高い検出割合に、外国籍患者由来株が寄与していることが示唆された。

非北京型と推定された 125 株について系統樹解析を行った結果 (図 1)、外国籍患者由来菌株 19 株の内 16 株 (フィリピン国籍患者由来 15 株、カンボジア国籍

患者由来 1 株) は、日本国籍患者由来株を含むグループ (21 株) を形成した。当該グループにはクラスタの形成が確認できないため、これらの外国籍患者の感染は、居住地域ではなく出身国で生じたものであることが推察された。

また当該グループ 21 株の内、10 株は可茂地域、4 株は隣接市町村に居住する患者由来のものであった。これは当県の中南部に位置する可茂地域 (2 市 7 町 1 村、可茂保健所管轄) が外国籍の住民割合が 6.1% と高く (岐阜県 2.6%, 全国 2.1%)、結核新登録中外国出生者割合も高い (平成 29 年度 29.0%, 平成 30 年度 20.0%)^{8), 9)} ことを反映したものであると考えられる。また今後、社会情勢やコミュニティの変化に伴う感染機会の増加も想定されることから、本調査事業を通じたこれらの菌株の地域拡散について、継続的なモニタリングがより必要になってくるものと考えられる。

本県においては平成 27 年度から結核菌の分子型別による分子疫学調査事業が開始された。本調査より、網羅的な結核菌の VNTR 分析は、実地疫学調査による患者間の関連性を科学的に裏付けることのみでなく、新たなリスク集団の探知に寄与することが示された。VNTR 分析を有効に活用するために、結核菌株および VNTR 型別データの継続的な収集が重要であると考えられる。

謝 辞

本調査の実施にあたり、検体収集などにご協力いただきました県保健医療課および各保健所並びに協力医療機関の関係各位にお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省 : 平成 30 年結核登録者情報調査年報 https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00002.html
- 2) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 菅原勇, 加藤 誠也 : 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—JATA (12)-VNTR 分析法の実際, 結核, 83, 673-678, 2008.
- 3) 前田伸司, 和田崇之, 岩本朋忠 : 国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型 (VNTR) 分析法, 日本細菌学雑誌, 65, 201, 2010.
- 4) Iwamoto T., Yoshida S., Suzuki K., Tomita M., Fujiyama R., Tanaka N. et al.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on Mycobacterium tuberculosis strains

- 5) predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett., 270, 67–74, 2007.
- 6) Seto J., Wada T., Iwamoto T., Tamaru A., Maeda S., Yamamoto K. et al.: Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation. Infect Genet Evol, 35, 82-88, 2015.
- 7) 西森敬, 内田郁夫, 田中聖, 西森知子, 今井邦俊, 柏崎佳人, 村田典久, 神間清恵: VNTR 型別による結核菌群および鳥型結核菌の分子疫学解析マニュアル, 動物衛生研究所報告, 109, 25, 2003.
- 8) 岩本朋忠: 複十字, 329, 2009.
- 9) 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター: 「結核管理図」(平成 29 年度～平成 30 年度) <http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/>
- 10) 総務省: 「住民基本台帳に基づく人口, 人動態および世帯数調査 (2019)」を基に作成

Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Using VNTR Analysis in Gifu Prefecture (2014–2018)

Katsuo KOSHI and Yoshihiko KAMEYAMA

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan