

香川県内で分離された結核菌の分子疫学(VNTR)調査 (2020-2021)

Molecular epidemiology (VNTR) survey of *Mycobacterium tuberculosis* detected
in Kagawa Prefecture (2020-2021)

目黒 響子 岩下 陽子 関 和美 福田 千恵美
Kyoko MEGURO Yoko IWASHITA Kazumi SEKI Chiemi FUKUDA

要 旨

2020年1月から2021年12月の間に香川県内で分離され、当センターに搬入された結核菌株53株の反復配列多型(Variable Number of Tandem Repeat: VNTR)解析を行った。DNA鋳型を抽出し、JATA(12)-VNTRでPCRを実施し、アガロースゲル電気泳動法により反復数の算出を行った。VNTR解析結果よりJATA12領域で反復数に一致が見られた6株についてはJATA(15)-VNTR、HV領域、国際標準領域を追加して24領域で解析を行ったが、反復数が一致した株は見られなかった。また、VNTR解析結果を用いた遺伝系統推定結果では、県内の分離傾向は北京型が2020年66.7%、2021年70.6%であった。北京型の内、祖先型は2020年79.2%、2021年83.3%で、新興型は2020年20.8%、2021年16.7%であった。感染伝搬・発病力が強く注意が必要な新興型は、若年層で出現頻度が高いとされているが、県内ではその傾向はみられなかった。また、世界では祖先型に比べて新興型の分離比率が高く、その8割を占めているが、県内での分離比率は全国の18.3%と同様で諸外国に比べ少ない傾向にある。今後在留外国人の増加に伴い新興型が増加する可能性もあるため、引き続き県内の菌株の解析を行い、動向を把握していきたい。

キーワード：結核菌 VNTR 解析 反復数 北京型 祖先型 新興型

I はじめに

結核は、結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex ただし *Mycobacterium bovis* BCGを除く)による感染症であり、感染症法における届出対象疾患の二類に分類され、診断後ただちに届出なければならない全数報告の疾患である¹⁾。我が国では、2021年の結核罹患率(人口10万対)は9.2であり、2020年と比べ0.9ポイント減少している²⁾。結核罹患率が10未満は低まん延国、10~99は中まん延国、100以上は高まん延国とされ、我が国は目標としていた低まん延国となった。

香川県では、平成31年4月1日より施行された香川県結核菌分子疫学的調査事業実施要領³⁾に基づき、感染源・感染経路等の究明と、結核の発生予防並びに感染拡大防止対策の資料とすることを目的とし、結核患者から分離された結核菌について反復配列多型(Variable Number of Tandem Repeat: VNTR)解析を実施している。

今回、2020年1月から2021年12月の間に当センターに搬入された結核菌株のVNTR解析を行ったので、その結果を報告する。

II 方法

1 試供菌株

2020年1月から2021年12月の間に香川県内で分離され、当センターに搬入された結核菌株53株(2020年36株、2021年17株)を対象とした。

2 検査方法

(1) VNTR解析及びクラスター解析

結核菌VNTRハンドブック⁴⁾に準じて行った。

① 結核菌株からのDNA鋳型の抽出

菌体を500 μ lの蒸留水に懸濁して、95 $^{\circ}$ C、10分加熱し、遠心後上清をDNA鋳型とした。

② JATA(12)-VNTRにおけるPCR

③ アガロースゲル電気泳動による反復数の算出

泳動により得られた増幅産物サイズ(bp)を、反復数換算表と照らし合わせ反復数を算出した。

④ 24領域におけるPCR

JATA(12)-VNTRで反復数の一致が見られた株について追加で実施した。

⑤ MSTによるクラスター解析

MLVA 情報集計・可視化システム MLVA-mate により Minimum Spanning Tree(MST)を作成し⁵⁾、クラスター解析を行った。

(2) 遺伝系統の推定

得られた VNTR 反復数データを用いて、最大事後確率推定法による結核菌遺伝系統推定プログラム⁶⁾により遺伝系統を推定した。

III 結果

1 VNTR 解析

JATA12 領域の解析結果を表1に示す。今回対象とした53株中、2株ずつ3組で反復数の一致が見られた。また、JATA12 領域での反復数が一致した計6株について、24 領域の結果を表2に示す。24 領域で反復数が一致した株はなかった。

MST の結果を図1に示す。

2 遺伝系統推定及びクラスター解析

推定結果を図2に示す。2020年においては北京型が66.7% (24株)、非北京型が33.3% (12株)、2021年においては北京型が70.6% (12株)、非北京型が29.4% (5株)であった。

北京型はさらに祖先型と新興型に分類され、北京型のうち2020年は祖先型が79.2% (19株)、新興型が20.8% (5株)で2021年は祖先型が83.3% (10株)、新興型が16.7% (2株)であった(図3)。結核菌遺伝系統推定プログラムでは、祖先型はさらに4つの遺伝子型(ST25/19, ST3, STK, ST11/26)に分類が可能である。2020年と2021年の分類の結果を表3に示す。

年齢分布を表4に示す。北京型の平均年齢は2020年79.0歳、2021年78.6歳であり、非北京型の平均年齢は2020年68.4歳、2021年72.4歳であった。北京型のうち、祖先型の平均年齢は2020年80.1歳、2021年80.0歳であり、新興型は2020年74.8歳、2021年71.5歳であった。

表1 JATA12 領域解析結果

菌株No.	JATA12											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3
2	4	3	3	3	5	3	7	4	5	7	8	5
3	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5
4	2	5	2	1	2	3	1	2	2	13	8	4
5	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
6	4	3	3	3	6	3	7	4	5	7	8	3
7	5	3	4	3	5	3	7	4	5	7	9	3
8	2	4	4	3	2	2	2	4	4	7	6	2
9	3	3	3	2	4	3	7	5	5	7	2	6
10	4	1	3	2	11	4	7	4	5	7	8	5
11	4	3	3	4	2	3	7	4	5	7	8	5
12	4	1	3	2	7	3	7	4	5	7	6	5
13	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3
14	2	3	1	3	2	2	5	4	3	12	5	3
15	3	3	1	3	3	2	6	3	3	11	5	3
16	4	2	3	3	6	4	7	4	5	7	8	3
17	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5
18	5	3	3	2	6	3	7	4	5	9	8	5
19	4	8	3	2	7	4	8	4	4	14	8	2
20	2	1	3	2	7	4	7	4	5	3	8	5
21	2	3	1	3	5	3	7	2	5	7	9	4
22	1	4	11	1	1	1	2	6	4	8	8	4
23	4	3	1	3	3	3	7	4	5	7	8	4
24	4	1	3	2	7	5	7	4	5	7	9	5
25	4	3	3	4	7	3	7	4	5	7	7	5
26	2	2	2	4	3	2	4	3	3	8	8	3
27	4	3	3	3	2	3	6	4	5	6	8	4
28	2	3	1	3	4	2	5	4	3	8	4	3
29	2	2	2	2	3	2	5	4	3	7	8	3
30	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5
31	4	3	4	3	4	3	1	4	3	7	8	3
32	2	5	2	1	2	3	1	2	5	12	5	2
33	1	4	2	3	8	1	2	4	4	7	7	2
34	2	3	1	3	3	2	4	4	3	12	2	3
35	3	3	3	4	4	3	6	6	5	7	2	5
36	2	3	3	3	3	3	7	4	2	4	8	4
37	3	3	3	4	5	3	7	5	5	7	2	5
38	3	3	3	4	5	3	7	5	5	7	2	5
39	2	2	2	3	2	1	5	4	3	12	5	2
40	4	2	3	3	3	4	6	4	4	7	8	4
41	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5
42	2	3	0	3	1	2	5	2	2	11	7	3
43	4	3	3	3	5	3	7	4	5	7	8	3
44	2	8	4	3	2	2	6	3	4	8	7	2
45	2	4	6	3	9	2	2	4	5	6	6	2
46	4	6	3	3	2	4	5	4	5	9	7	5
47	4	1	3	2	7	4	4	4	6	9	9	5
48	4	3	3	3	3	1	7	4	5	7	6	4
49	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3
50	2	3	3	3	3	3	7	4	3	7	7	4
51	1	3	1	3	4	2	4	3	3	12	2	3
52	4	3	3	3	2	3	7	4	3	9	7	4
53	3	3	3	4	2	3	7	5	5	7	2	5

表2 24 領域解析結果

菌株No.	JATA12												JATA15			HV			Supply					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	3c22	3820	4120	3690	MIRU40	MIRU04	2401	MIRU16	ETR-C
3	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	14	12	8	3	3	2	4	3	4
41	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	14	8	3	3	2	4	3	4
5	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	13	13	11	3	4	2	2	4	4
17	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	11	13	16	3	3	2	4	4	4
37	3	3	3	4	5	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	9	13	11	3	3	2	4	4	4
38	3	3	3	4	5	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	12	13	11	3	4	2	2	4	4

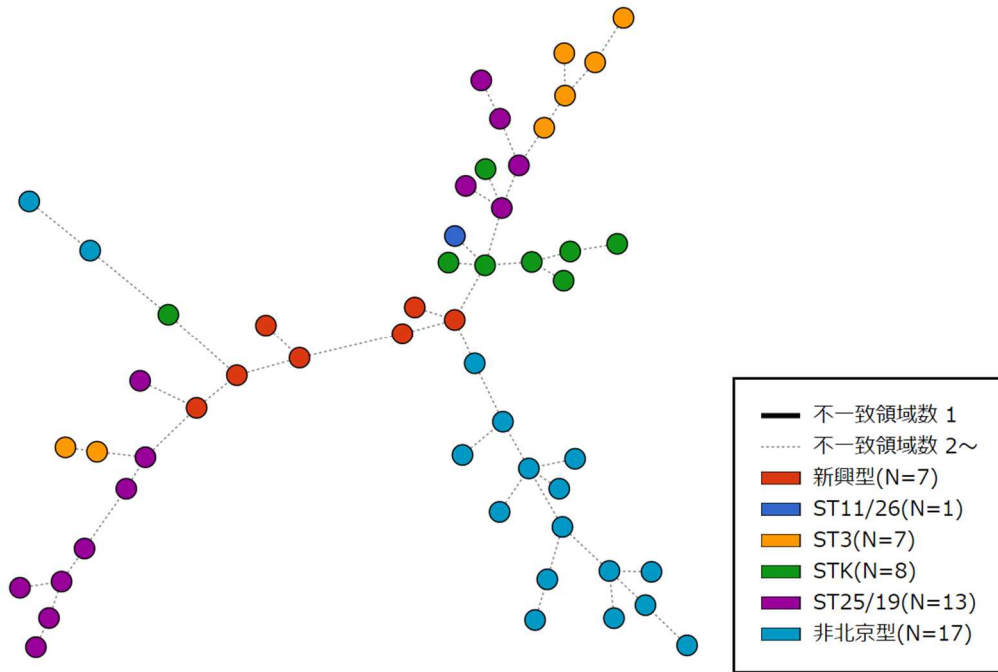


図1 VNTR 解析結果を用いた Minimum Spanning Tree

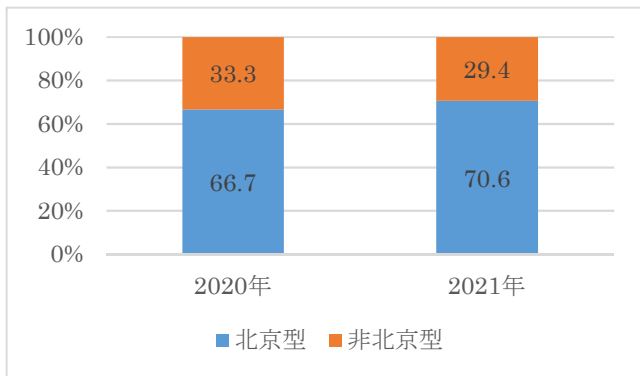


図2 北京型と非北京型の割合

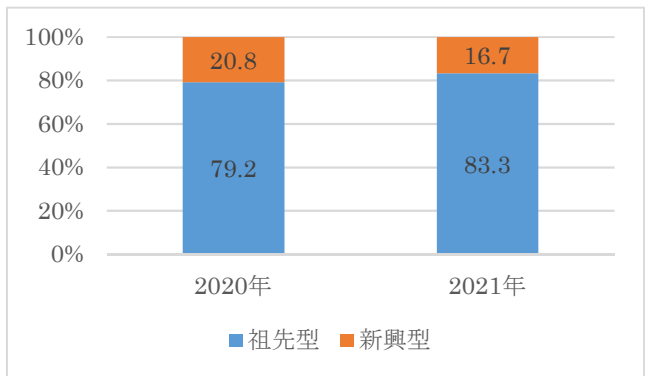


図3 祖先型と新興型の割合

表3 祖先型の遺伝子型別

遺伝子型別		ST3	STK	ST25/19	ST11/26	計
菌株数	2020年	6	3	9	1	19
	2021年	1	5	4		10

表4 年齢分布

2020年		40歳以下	41~50歳	51~60歳	61~70歳	71~80歳	81~90歳	91歳以上	平均
北京型	祖先型	1	1			3	10	4	80.1
	新興型	1				2		2	74.8
非北京型		2	1		2	2	4	1	68.4

2021年		40歳以下	41~50歳	51~60歳	61~70歳	71~80歳	81~90歳	91歳以上	平均
北京型	祖先型		1			3	5	1	80.0
	新興型			1			1		71.5
非北京型		1				1	2	1	72.4

IV 考察

VNTR 解析結果により 2020 年と 2021 年に県内で分離された 53 株のうち JATA12 領域で一致した株は 2 株ずつ 3 組あったが、24 領域の追加解析を行った結果、24 領域で一致した株はみられなかった。

遺伝子系統の解析では、解析を行った 53 菌株のうち、2020 年では 66.7%が、2021 年では 70.6%が北京型であると推定された。北京型株は、他の遺伝子系統と比べて、感染伝播力が強い、薬剤耐性と関連性が高い、発病・再発を引き起こしやすい、BCG 接種による免疫の影響を受けにくい⁷⁾とされている。全国の北京型の分離比率は 73.8%という報告⁷⁾があるが、県内における分離比率も同様の傾向であった。北京型はさらに祖先型と新興型に分類され、国内の分離比率は祖先型 81.7%、新興型 18.3%という報告⁷⁾があり、県内の分離比率も 2020 年、2021 年ともに同様の結果となった。祖先型はさらに四つの系統に分類され、2020 年と 2021 年で ST11/26 は 1 株のみで、残り ST25/19、ST3、STK であった。特に ST25/19 は総数としても最も多かった。国内、県内ともに祖先型の比率が高いが、世界的に多く分離されているのは新興型で、感染伝播・発病において祖先型よりも優れているとされており、北京型の 8 割を占めている。新興型は若年者層から多く分離されると報告⁷⁾されているが、2020 年と 2021 年の新興型 7 株のうち、40 歳以下は 1 人と少なく、県内では若年者層への感染は顕著ではなかった。

外国生まれの新登録結核患者数の割合は年々増加傾向にあり、2021 年は新登録者数の 11.4%を占めている²⁾。県内と全国の新興型の分離比率は、諸外国に比べて少ない傾向にあるが、今後新興型の割合の高い在留外国の増加に伴い、新興型の割合も増加する可能性があるため、引き続き県内の菌株の解析を行い、動向を把握していきたい。

謝辞

TB MAP estimation (遺伝系統推定マクロ) をご提供いただきました山形県衛生研究所微生物部 瀬戸順次先生に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) 結核予防会結核研究所：結核分子疫学調査の手引き 第一版, (2017 年 7 月)
- 2) 厚労省：2021 年結核登録者情報調査年報集計結果
- 3) 香川県健康福祉部薬務感染症対策課長通知：香川県結核菌分子疫学的調査事業実施要領の制定について, 30 薬感第 61533-3 号(平成 31 年 3 月 7 日)
- 4) 地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ：結核菌 VNTR ハンドブック 第一版, (2012 年 10 月)
- 5) 南須原亮, 他：MLVA (VNTR) 情報の集計・可視化システム MLVA-mate の開発, 東京都健康安全研究センター年報, 69, 279-284, (2018)
- 6) Seto J, 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) 岩本朋忠：結核菌北京型ファミリーの集団遺伝学的解析から推察される日本国内定着型遺伝系統群の存在と遺伝系統別薬剤耐性化傾向の違い, *結核* 84(12), 755-759, (2009).