

広島市の結核患者由来菌株の VNTR 遺伝子解析 (平成 28 年度)

青田 達明 千神 彩香 栗林 智早 坂本 綾
松室 信宏

はじめに

広島市では平成 27 年度から、広島市結核菌分子疫学調査実施要領に基づき、結核感染症の感染源、感染経路の究明、接触者健診の範囲の設定等、結核予防対策に資することを目的として感染症法第 15 条の規定に基づく調査として、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) 遺伝子型別手法の一つである Variable Number of Tandem Repeats 法(以下 VNTR 法)による結核菌株の DNA 解析を実施している。

本市の平成 27 年における新登録結核患者数は 116 人で罹患率(人口 10 万人対)は 9.7¹⁾であり、低蔓延の数値である。分離された結核菌株の VNTR 型とその傾向を網羅的に把握し実地疫学調査等と融合することで、本市の結核予防対策に寄与できると考えられる。昨年度に引き続き、市内医療機関で分離された結核菌株の VNTR パターンと系統分類について調査したので報告する。

方 法

1 供試菌株

平成 27 年及び平成 28 年の間に本市在住で新規登録された結核患者のうち、市内医療機関において 28 名の患者(平成 27 年登録 1 名、平成 28 年登録 27 名)から分離同定された *M. tuberculosis* 28 株(TB-76~TB-103)を対象とした。表 1 に年齢階級別患者数の内訳を示す。

表 1 年齢階級別患者内訳

患者年齢	～39	40～59	60～79	80～	計
株数内訳	3	2	6	17	28

表 2 VNTR 反復数の一致した菌株とその数値

菌株	MIRU4	MIRU10	MIRU16	MIRU26	MIRU31	MIRU40	ETR-A	ETR-C	Mtub04	Mtub21	Mtub30	Mtub39
TB-94	2	3	3	7	5	3	4	4	4	1	4	3
TB-98	2	3	3	7	5	3	4	4	4	1	4	3
	QUB11b	QUB26	QUB4156	Mtub24	QUB11a	QUB15	QUB18	QUB3232	QUB3336	VNTR3820	VNTR4120	VNTR2372
TB-94	6	9	3	3	8	4	8	14	5	14	9	3
TB-98	6	9	3	3	8	4	8	14	5	14	9	3

2 VNTR 型別解析

M. tuberculosis の発育した小川培地を 95℃10 分間加熱処理し、回収した粗抽出液を鋳型として、前田らの方法²⁾及び結核菌 VNTR ハンドブック(地研協議会保健情報疫学学会マニュアル作成ワーキンググループ編)に準拠した PCR 法により VNTR 領域の増幅を行った。得られた PCR 産物は自動シーケンサーによるフラグメント解析又はアガロースゲル電気泳動による分析によって反復数を算定した。シーケンスは 3500 Genetic Analyzer (ABI) で行い、得られたデータは Gene Mapper (ABI) を使用しアリアルを算出した。アガロースゲル電気泳動は、0.5×TBE 緩衝液を用いた 2% SeaKem Gold (Lonza) で行った。解析領域は、北京型の識別に優れる領域を含む 24_{Beijing}-VNTR³⁾とした。

3 系統分類解析及びクラスター解析

各株の系統分類は、得られた VNTR パターンに基づき瀬戸らの方法⁴⁾により、非北京株、祖先型北京株(ST11/26, STK, ST3, ST25/19)、新興型北京株に分類した。Minimum Spanning Tree 法(以下 MST 法)によるクラスター解析は、BioNumerics Ver. 7.5 (Applied Maths) を用いて行った。

結 果

1 VNTR 反復数

供試した菌株のうち、解析した 24 領域で反復数

が完全に一致したものは、TB-94 と TB-98 の 2 株 1 組であった(表 2)。なお、この 2 株は昨年度 VNTR 検査を実施した菌株 TB-73 とともに 24 領域で反復数が完全に一致した。一方、多発性大規模感染株 (putative expanding cluster types, pECTs)⁵⁾ と VNTR 反復数が一致した菌株は無かった。なお、TB-90 はどの領域も増幅しなかった。

2 系統分類

VNTR パターンによる系統推定の結果を図 1 に示す。祖先型北京株が 21 株 (77.8%)、非北京株が 2 株 (7.4%)、新興型北京株が 4 株 (14.8%) であった。また祖先型北京株の内訳は、ST3 が 8 株、STK が 6 株、ST25/19 が 5 株、ST11/26 が 2 株であった。年齢階級別系統分布をみると、80 歳以上は祖先型北京株への感染率が 94.1% と高く、また新興型北京株への感染が認められなかった。一方、ほかの年齢層では特定の系統への大きな偏りは認められなかったが、79 歳以下の年齢階級では、感染伝播性及び発病性の高い新興型北京株への感染が確認された(図 2)。

3 クラスター解析

解析した 24 領域について、MST 法によりクラスター解析を実施した。昨年度 VNTR 検査を実施した菌株 75 株 (平成 26 年～平成 27 年新規登録患者) を含めた計 102 株 (TB-90 を除く TB-1～TB-103) を解析に供した(図 3)。検査年度をまたいで VNTR パターンが完全に一致し、同一クラスターを形成したものは TB-73、TB-94、TB-98 の 3 株 1 組のみであった。

考 察

解析した 28 株のうち、VNTR 反復数が完全に一致したものは TB-94 と TB-98 の 2 株のみであり、その他の株は同一の反復数となるものはなかった。また、この 2 株は昨年度 VNTR 検査を実施した菌株 (TB-73) とともに VNTR 反復数が完全に一致した。患者に関する詳細な疫学情報は得られていないため、VNTR 反復数が完全に一致した 3 人の患者らに疫学的関連性があるかは不明であった。

得られた VNTR パターンに基づいた系統分類では、感染伝播性及び発病性の高い新興型北京株について、80 歳以上の年齢層での感染は認められなかったが、79 歳以下の年齢層では感染が見られた。昨年度解析を実施した菌株においても、79 歳以下での感染率が高い傾向が同え、引き続き本系統の各年齢層における分離割合の増加等の動向に注視

する必要がある。

VNTR 反復数が一致し、MST 法により同一クラスターを形成した TB-73、TB-94、TB-98 の 3 株は、系統分類により新興型北京株であることが判明した。また、3 人の患者らは約 8 ヶ月の間に新規登録されていることから、この患者らの疫学的関連性の有無を踏まえた追加疫学調査が実施可能であれば、適切な蔓延防止対策や伝播経路の解明に繋がる可能性がある。この様に同一クラスター形成の有無は、追加疫学調査の必要性を検討する一助となり、結核感染症対策に活用できると考える。

今回解析した供試菌株数は 28 株と限定的ではあるが、過去の菌株との VNTR パターンの一致や、系統分類における各年齢層での特徴的な系統分布が明らかになる等、VNTR 法による分子疫学解析の行政上の有用性が示唆された。収集する株に関する疫学情報と併せて検討すれば、集団感染の解析や流行株の探知等に役立つものと考えられる。引き続き幅広い年齢層を対象とした積極的な菌株の収集を行い解析に供することで、比較可能なデータの蓄積が期待される。これらの得られた解析データを結核行政対応の科学的疫学情報の一つとして使用することにより、感染源や感染経路の解明、接触者健康診断や追加疫学調査の実施等、結核感染症対策に活用することができると考える。

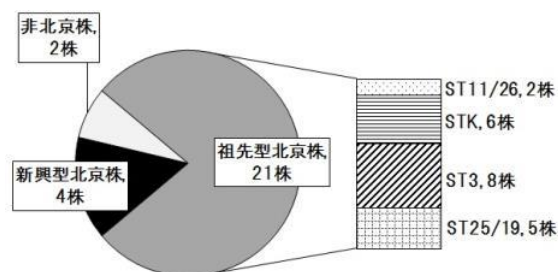


図 1 分離菌株の系統推定 (平成 28 年度)

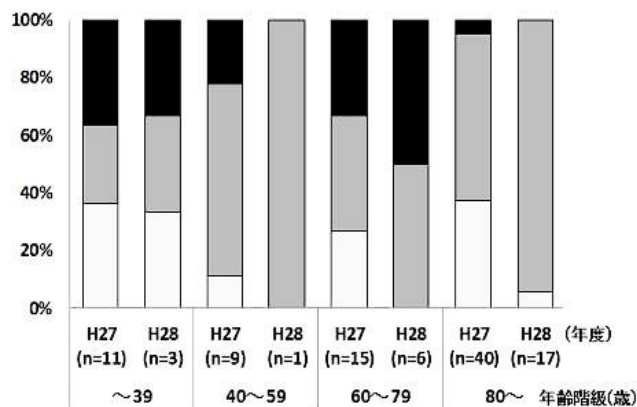


図 2 年齢階級別系統分布

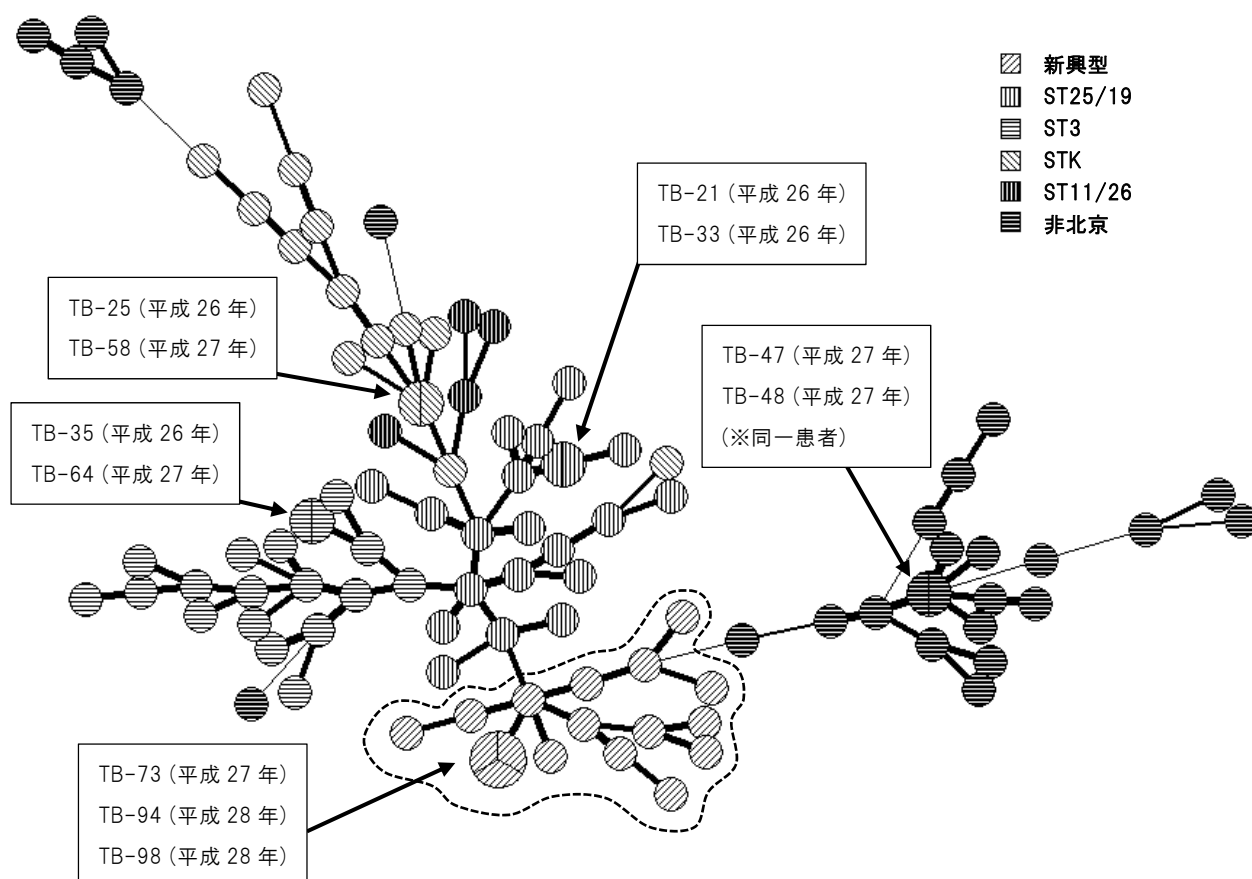


図3 MST法による結核患者由来 *M. tuberculosis* のVNTR反復数に基づくクラスター解析
(平成26年～平成28年登録患者株)

謝 辞

調査を担当された保健医療課及び各区保健センター各位、菌株の分与にご協力いただきました国家公務員共済組合連合会吉島病院関係者各位に感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省:平成27年結核登録者情報調査年報集計結果について
- 2) 前田伸司 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-JATA(12)-VNTR分析法の実際,結核,83(10),673～678(2008)
- 3) Iwamoto T et al.: Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru, PLoS ONE, 7(11), e49651(2012)
- 4) 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)
- 5) 和田崇之 他:結核菌の縦列反復配列多型(VNTR)解析に基づく分子疫学とその展望—大阪市の例,結核,85(12),845～852(2010)