

結核菌 VNTR 型別解析について

広島市衛生研究所 生物科学部

○田内 敦子 青田 達明 千神 彩香 坂本 綾 石村 勝之

1 はじめに

国は平成 23 年の「結核に関する特定感染症予防指針」の中で、その予防対策における結核分子疫学の必要性を明記しており、現在、全国的にその普及と活用への具体化が進められている。当所では、本年度から「広島市結核菌分子疫学調査実施要領」に基づき、結核菌遺伝子型別手法の一つである、Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) 解析を開始している。

本市の平成 26 年における新登録結核患者数は 135 人で罹患率（人口 10 万人対）は 11.4 であり、低蔓延の数値であることから、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予防対策に寄与できると考えられる。今回、市内で分離された結核菌株の VNTR 型別と系統分類について検討したので報告する。

2 対象及び方法

(1) 対象

平成 26 年以降、市内医療機関において本市在住の結核患者から分離同定された結核菌 53 株を対象とした。年齢階級別内訳を以下の表に示す。

表 患者年齢別菌株数内訳

患者年齢	~39	40~59	60~79	80~	計
株数内訳	8	6	12	27	53

(2) 方法

ア VNTR 型別解析

結核菌の発育した小川培地を 95°C10 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¹⁾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 産物をアガロースゲル電気泳動し、反復数を算定した。VNTR 解析領域は、国内標準法として提唱されている Japan Anti-Tuberculosis Association(JATA)(12)^{1),2)}の 12 領域を基本とした。これらのパターンが全て一致した菌株については、JATA(15)³⁾の 3 領域及び超可変 3 領域⁴⁾を追加した。

イ 系統分類解析

各株の系統分類（非北京株、祖先型北京株、新興型北京株）は、得られた VNTR パターンから瀬戸らの方法⁵⁾により推定した。

3 結果及び考察

解析した 18 領域の VNTR パターンが完全に一致し、同一のクラスターを形成したものは 53 株中 2 株のみで、クラスター率は 3.8%であった。この 2 株は同一事業所に勤務する患者から分離されたものであり、VNTR 解析が実地疫学調査を補完し、集団感染事例であることをより強く示した例となった。その他の株はクラスターを形成しなかったことから、これらの事例間に関連性はなく、散發事

例であることの科学的裏付けを示すことができた。

VNTR パターンによる系統推定では、非北京株が 17 株 (32.1%)、祖先型北京株が 26 株 (49.1%)、新興型北京株が 10 株 (18.9%) となり、国内の他地域の傾向⁵⁾と同様であった (図 1)。年齢階級別に系統分布をみると、若年層では感染伝播性、発病性の高い新興型北京株の割合が比較的高い傾向にあり (図 2)、今後の動向を注視する必要がある。

本邦では、より詳細な VNTR サーベイランスのために解析領域を増やすことが指摘されており、今後は解析領域を 24 領域を増やしてデータを蓄積していき、実地疫学に還元したい。

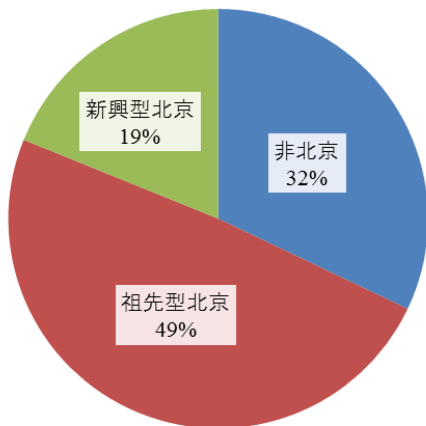


図 1 結核菌系統分布

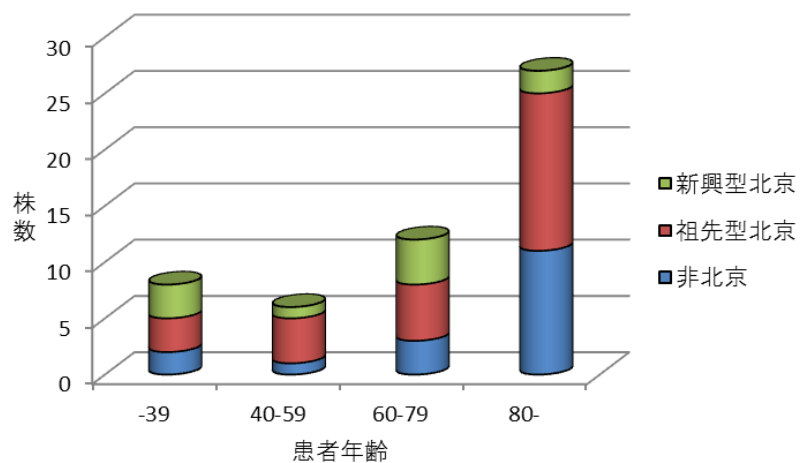


図 2 年齢階級別系統分布

4 参考文献

- 1) 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. 2008 ; 83 : 673-678
- 2) Murase Y et al.:Promising loci of variable number of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2008;57:873-880
- 3) 前田伸司 他: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. 2010 ; 65 : 201
- 4) Iwamoto T 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 predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 2007;270:67-74
- 5) Seto J et al:Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum *a posteriori* estimation. Infect Genet Evol.2015;35:82-88