

広島市の結核患者由来菌の VNTR 遺伝子型別

青田 達明 田内 敦子* 千神 彩香 坂本 綾
松室 信宏 石村 勝之

2014 年以降に広島市内医療機関において本市在住の結核患者 74 名から分離された結核菌 75 株を対象とし、分子疫学的解析法である Variable Number of Tandem Repeats 法を実施した。解析結果を比較したところ、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のうち、集団感染が疑われる事例があった。また、その他の患者からの分離菌株はクラスターを形成せず、散発事例であることが示唆された。VNTR パターンによる系統推定による年齢階級別系統分布をみると、若年層では感染伝播性及び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った。

キーワード：結核，VNTR，結核菌遺伝子型別，新興型北京株

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する感染症法第 15 条の規定に基づく調査として、結核菌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 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 パターンと系統分類について検討したので報告する。

方 法

1 供試菌株

2014 年以降、市内医療機関において本市在住の結核患者 74 名から分離同定された結核菌 75 株(TB-1~TB-75)を対象とした。年齢階級別患者数内訳を表 1 に示す。

2 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⁾及び結核菌 VNTR ハンドブック(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 産物をアガロースゲル電気泳動又はシークエンスによりアリルを求め反復数を算定した。アガロース電気泳動は、0.5×TBE 緩衝液を用いた 2%SeaKem Gold(Lonza)で行った。シークエンスは 3500 Genetic Analyzer(ABI)で行い、得られたデータは Gene Mapper(ABI)を使用しアリルを算出した。解析領域は、北京型の識別に優れる領域を含む 24_{Beijing}-VNTR²⁾とした。

3 クラスター解析及び系統分類解析

Minimum Spanning Tree 法(以下 MST 法)によるクラスター解析は、BioNumerics(Applied Maths)を用いて行った。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³⁾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。

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-21 と TB-33, TB-25 と TB-58, TB-35 と TB-64, そして同一患者から分離された TB-47 と TB-48 を含め、8 株 4 組であった(表 2)。また、多発性大規模感染株(putative expanding cluster types, pECTs)⁴⁾と VNTR 反復数が一致したものは、TB-7 が pECT05 と、TB-70

*：現 健康福祉局保健部食品指導課

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	11	9	15	40	75

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-21	2	3	4	7	5	3	4	4	3	3	4	3
TB-33	2	3	4	7	5	3	4	4	3	3	4	3
TB-25	2	3	3	7	5	3	4	4	4	3	2	3
TB-58	2	3	3	7	5	3	4	4	4	3	2	3
TB-35	2	1	3	5	5	3	4	4	4	3	4	3
TB-64	2	1	3	5	5	3	4	4	4	3	4	3

	QUB11b	QUB26	QUB4156	Mtub24	QUB11a	QUB15	QUB18	QUB3232	QUB3336	VNTR3820	VNTR4120	VNTR2372
TB-21	7	2	5	4	8	5	10	12	7	12	11	3
TB-33	7	2	5	4	8	5	10	12	7	12	11	3
TB-25	3	10	4	3	8	4	14	12	7	15	14	3
TB-58	3	10	4	3	8	4	14	12	7	15	14	3
TB-35	8	8	5	2	8	4	10	15	7	14	15	4
TB-64	8	8	5	2	8	4	10	15	7	14	15	4

が pECT04 とそれぞれ一致した。その他の株の VNTR 反復数は pECTs と一致しなかった。

2 クラスタ解析

解析した 24 領域について、MST 法によりクラスタ解析を実施した。その結果を図 1 に示す。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-21 と TB-33、TB-25 と TB-58、TB-35 と TB64、TB-47 と TB-48 の 4 組のみであった。うち、TB-21 と TB-33 の 2 株は同一事業所に勤務する患者から分離された株であり、集団感染事例として報告されている。一方、その他の株はクラスターを形成しなかった。

3 系統分類

VNTR パターンによる系統推定の結果を図 2 に示す。祖先型北京株が 38 株 (50.7%)、非北京株が 24 株 (32.0%)、新興型北京株が 13 株 (17.3%) であった。また祖先型北京株の内訳は、ST25/19, ST3, STK, ST11/26 の順に多く、国内の他地域の傾向³⁾と同様であった。年齢階級別系統分布をみると、新興型への感染割合は 80 歳以上が 5% であるのに対し、その他の年齢層では約 22%～36% であった。年齢が若くなるにつれ新興型北京株への感染割合が高くなる傾向がみられた (図 3)。

24^{Beijing}-VNTR に基づいた解析により同一クラスターを形成した TB-21 と TB-33 の 2 株は、集団感染事例として報告されているものであった。同一クラスターを形成したその他の 2 組 (TB-25 と TB-58, TB-35 と TB-64) については、患者に関する疫学情報は得られなかったため、事例間の関連性を示すに至らなかった。一方、クラスターを形成しなかったその他の株については、これらの事例間に関連性はなく、散発事例である可能性を科学的に示すことが出来た。これらの結果より、VNTR 法が集団感染事例の解析に有用¹⁾であることが本市でも示された。得られた VNTR パターンに基づいた系統解析では、若年層において、感染伝播性及び発病性の高い新興型北京株への感染割合が比較的高い傾向にあり、分離割合の増加やその他の年齢層への広がり等、本系統の今後の動向を注視する必要がある。

今回用いた供試菌株数は 75 株と限定的ではあるが、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。引き続き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。また、収集する株に関する疫学情報を同時に入手出来れば、集団感染等の解析に役立つものと考えられる。これら蓄積したデータから、本市において検出頻度の高い VNTR 型を把握

することで、珍しい型の出現による新規流行株の早期発見につながると考えられる。また、クラスター解析を活用することで、実地疫学調査では探知が困難であった関連性のある感染の探知に寄与する可能性が考えられる。更に、VNTR パターンに基づく遺伝系統解析では、感染力の強い結核菌株の分離傾向を把握することが可能である。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られる。そのためにも、更なる解析データの蓄積が必要である。

謝 辞

調査を担当された保健医療課及び各保健センターの皆様、菌株の分与にご協力いただきました市内医療機関の皆様、多くの技術的ご指導・ご助言をいただきました千葉県衛生研究所 横山栄二先生に深謝いたします。

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, 83 (10), 673~678 (2008)
- 2) Iwamoto T et al.: Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru, PLoS ONE, 7 (11), e49651 (2012)
- 3) 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)
- 4) 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)

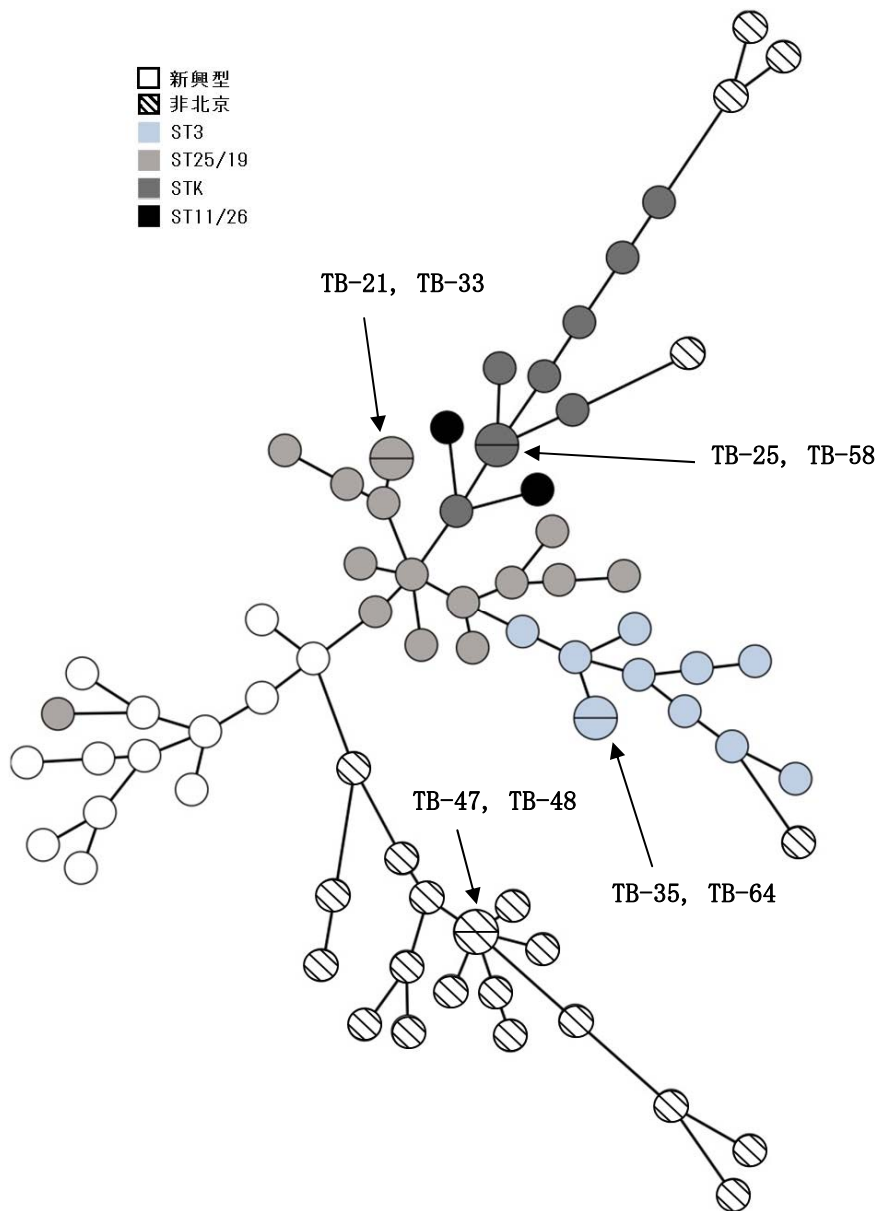


図1 MST法によるクラスター解析

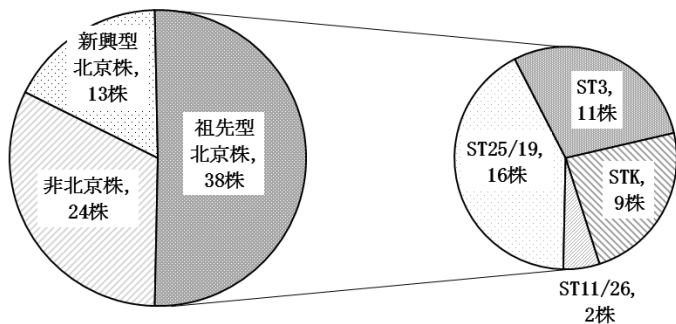


図2 分離菌株の系統推定 (n=75)

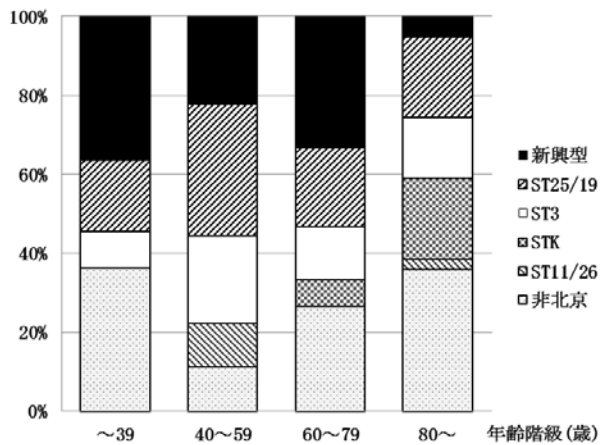


図3 年齢階級別系統分布 (n=74)