

# 県内結核菌の DNA 解析データベースを用いた分子疫学的研究

阿波野祥司 福留智子 山田亨 萩平敦朗 元明秀成

## Molecular epidemiological studies using DNA analysis database of *M.tuberculosis* isolated in Miyazaki Prefecture.

Shoji AWANO, Tomoko FUKUDOME, Tohru YAMADA, Atsurou HAGIHIRA, Hidenari GANMYO

### 要旨

県内の結核患者から分離された結核菌株 246 株について、Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)法を用い結核菌の DNA 解析を実施した。その結果を実地疫学情報と融合させてデータベース化し、県内における結核菌の型別分布状況、集団発生時等における菌の異同判定、感染源や感染経路の究明や未知の感染経路の確認など結核対策に活用している。

結核菌を北京型と非北京型に分類したところ、県北部で非北京型の割合が多いことがわかったが原因は不明であった。また、北京型を祖先型と新興型に分類したところ、60 歳以上と比べて 60 歳未満で新興型の割合が高いことがわかった。このことは、若年層で新興型の北京型株の感染が広がっていることが推測される。さらに細かく系統分類した結果、県内 4 ブロックにおいて各系統群の割合が異なることもわかった。

施設内感染・家庭内感染、散発事例について VNTR 解析を実施し、同一感染源由来菌株か否かの判定に実施した。疫学的関連のある症例同士については、同一感染源由来菌株と推定されるものがあったが、散発事例等で疫学的な関連が不明な症例同士については同一感染源由来菌株と推定される症例は無かった。

キーワード：VNTR 法，北京型・非北京型，同一感染源由来菌株

### はじめに

本県では平成 24 年度に宮崎県結核菌検査実施要領が施行され、分子疫学的解析法が実施できる体制が確立された。分子疫学解析法は、菌株間の遺伝子レベルでの違いを調べ、その異同や近似性から結核の伝搬や蔓延状況を究明することが可能である。

公衆衛生領域では、接触者健診等実地疫学調査において感染源がある程度推定されている事例に対し、対象となる菌株の異同を調査することで科学的裏付けを得る場合や、地理的に異なる場所から収集された不特定多数の菌株を解析し、未知の伝搬経路を調査する場合などでの活用が期待できる<sup>1)</sup>。

結核菌の遺伝子型別法は、Variable Number of Tandem Repeats(VNTR)法という手法が確立され、日本においては JATA(12)-VNTR 解析法が国内の結核菌を対象とした標準法として提唱されている<sup>2)</sup>。さらに、JATA(12)-VNTR 解析法の型別能力を補う方法として、3 領域を追加した JATA(15)-VNTR 解析法や 3 つの多型性に富んだ領域を解析する超多変(hypervariable,HV)領域解析法(HV-VNTR)が報告されている<sup>3)</sup>。

今回、VNTR 解析データベースを用いて、県内での結核菌の型別分布状況調査及び感染源調査を実施したので報告する。

### 材料と方法

## 1 材料

平成24年10月から平成28年3月末までに当所に搬入された、結核菌246株を検査材料とした。

## 2 VNTR解析法

JATA(12)-VNTR解析法(以下、VNTR12領域)を実施し、VNTR型が登録されているデータベース中の株と一致した場合、JATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を追加し解析(以下、VNTR18領域)を実施した。

## 3 結核菌型別分布状況調査等

結核菌を、Warrenらの方法<sup>4)</sup>を用いPCR法で北京型(以下BJ)と非北京型(以下NB)に分類した。さらにBJについては、VNTR各領域の反復配列から5つの系統群(G1/2,G3,G4,G5/6及びModern)に分類した(表1)(表2)<sup>5)</sup>。

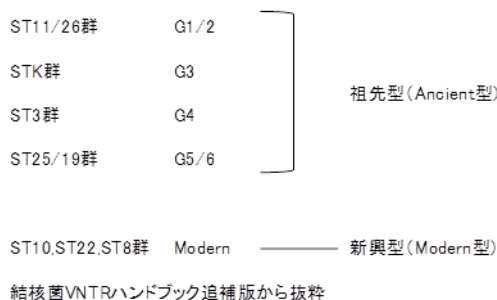
このBJ5系統群とNBを合わせた6系統群について、県内各ブロックごとに解析を実施し、型別傾向を調査した。

表1 JATA(12)-VNTR型別における各領域の反復配列と北京型結核菌の系統群の関係性

VNTR領域	G1/2	G3	G4	G5/6	Modern	北京株の頻出型	多様度
t04(J01)						4	低
M10(J02)			1			3	低
t21(J03)					4	3	低
t24(J04)			2			2~4	中
Q11a(J05)		2~3				5~8	高
2372(J06)						3~4	低
M26(J07)		一部2				7	中
Q15(J08)	2					4	低
M31(J09)						5	中
3336(J10)						7	中
Q26(J11)				一部2		8~10	高
4156(J12)	4	4	5	5	3	3~5	低

結核菌VNTRハンドブック追補版から抜粋

表2 北京型結核菌系統群



## 4 VNTR解析データベースを用いた感染源調査

VNTR解析データが一致した株同士について、実地疫学情報等を参考に同一感染源由来菌株か否かの判定を実施した。

## 結果

### 1 VNTR12領域の多様性について

VNTR12領域の多様性については、Hunter Gastn Discrimination Index(HGDI値)で表記した<sup>6)</sup>。

各領域の多様性を調査した結果、JATA05(QUB11b)のHGDI値が0.85と最も高く、続いてJATA11(QUB26)、JATA12(QUB4156)の領域で0.7以上の値を示し、多様性が高い結果となった。

一方、JATA08(QUB15)の領域ではコピー数が4の株が大半であり(HGDI値0.40)多様性が低い結果になった(表3)。

JATA05の領域は遺伝子が欠落しやすい領域であり、陰性率は3.7%であった。

表3 Copy number of repetitive unit(s)

JATA	Alias	Total	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	>20	N	HGDI値
1	Mtub 04	246	1	10	60	41	129	4	1																	0.64
2	MIRU 10	246		53	25	139	14	8	2	2	2	1														0.62
3	Mtub 21	246	2	25	34	140	38	4		1		2														0.62
4	Mtub 24	246		13	75	140	18																			0.58
5	QUB11b	246		2	25	31	26	31	42	64	8	4			1								3	9	0.85	
6	V2372	246		8	46	135	50	3	3	1																0.62
7	MIRU 26	246		12	3	1	9	42	14	146	9	5	4	1												0.61
8	QUB 15	246	1	1	35	5	187	16			1															0.40
9	MIRU 31	246			8	53	25	156	4																	0.54
10	QUB 3336	246				1	5	7	3	137	14	11	28	6	11	8	13				2					0.67
11	QUB 26	246			18	4	9	15	16	38	113	25	7	1												0.74
12	QUB 4156	246		5	15	77	49	96	1	3																0.71

## 2 北京型、非北京型の鑑別

国内で分離される結核菌の7から8割がBJに属し、残りがNBに属すといわれている<sup>7)</sup>。

県全体では、BJが72.0%、NBが28.0%でほぼ全国と同じ割合となった。さらに、県内を4ブロックに分けて解析すると、県北(BJ64.6%,NB

35.4%)、県央・児湯(BJ79.1%,NB20.9%)、県西(BJ71.4%,NB28.6%)、県南(BJ70.0%,NB30.0%)で、県北でNBの割合が高いことが分かった(図1)。

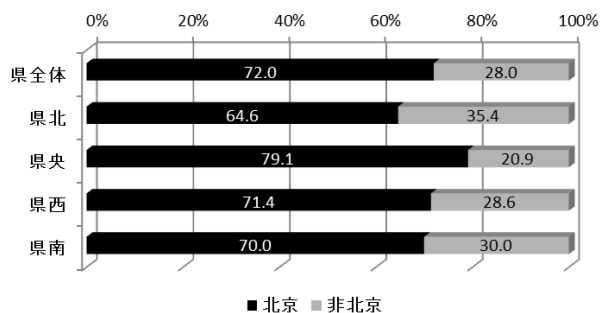


図1 北京型・非北京型鑑別(地域別)(%)

県北患者の平均年齢は 78.8 歳，県北以外の地域の患者の平均年齢は 72.7 歳だったのでスチューデントの  $t$  検定 ( $P < 0.05$ ) を実施したところ， $P = 0.02$  で有意に県北の年齢層が高いことが判明した。さらに細かく検定したが，県北 BJ (AV 78.5) と県北以外 BJ (AV 72.8) が  $P = 0.07$ ，県北 NB (AV 79.3) と県北以外 NB (AV 72.7) が  $P = 0.15$  でいずれも有意差はなく，なぜ県北に NB の割合が高いのかは不明であった(表 4)。

表4 結核患者年齢構成

	平均年齢		確率 ( $P$ )	$t$ 検定 $t$ 値	有意差
	県北	県北以外			
全株での比較	78.8	72.7	0.02	2.40	あり
北京型のみでの比較	78.5	72.8	0.07	1.83	なし
非北京型のみでの比較	79.3	72.7	0.15	1.46	なし

### 3 北京型系統別分類等

患者年齢を 60 歳以上と 60 歳未満に分けて BJ を祖先型 (Ancient) と新興型 (Modern) に分類した。結果，新興型の割合は 60 歳以上は 16.4% だったのに対し 60 歳未満は 41.9% と 60 歳未満で高い傾向が見られた(図 2)。さらに，BJ を 5 系統群に分類すると，高齢者に多いとされる G3 は 60 歳未満には見られず，若年層や中国国内で圧倒的に多いとされる Modern は 60 歳未満で高い結果になった(表 5)。このことから今後県内での結核は新興型が主流になっていくものと推測される。

次に，5 系統群を県内 4 ブロックに分けて解析すると，県北は G5/6 が高く，県央・児湯は韓国に多く多剤耐性結核の出現頻度が高い G1/2 が高く G3 が低い，県西・県南は G3，G4 が高い結果

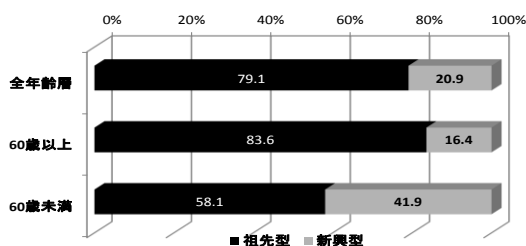


図2 北京型年代別区分(%)

になった(表 6)。

表5 結核菌年齢別系統分類(%)

	60歳以上	60歳未満
県全体	82.9	17.1
G1/2	86.7	13.3
G3	100.0	0.0
G4	89.9	11.1
G5/6	77.6	22.4
Modern	64.9	35.1
非北京	84.1	15.9

表6 北京型系統別分類(%)

系統群	県全体	県北	県央	県西	県南
G1/2	8.5	7.1	13.9	2.9	3.6
G3	13.6	14.3	5.6	20.0	25.0
G4	25.4	19.0	25.0	31.4	28.5
G5/6	27.6	38.2	25.0	28.6	17.9
Modern	20.9	19.0	22.2	17.1	25.0
不明	4.0	2.4	8.3		

### 4 感染源調査

疫学的な関連があると思われる VNTR18 領域一致は 12 例あり内訳は，家庭内感染が 7 例，施設内感染が 5 例と推定された(表 7)。系統別の特徴として，全 12 例中半数の 6 例が NB による感染であった。

疫学的な関連が不明の VNTR18 領域一致は 8 例認められた。これらについて追加調査を実施した結果，同一市町村居住，若年者同士及び結核発生届出が 2 年以内と，同一感染源由来株による感染が示唆されるケースもあった。しかし，疫学情報から患者間の接点は見いだせず，8 例とも患者間の関連は不明であり，偶然の一致あるいは過去の蔓延株と推定された。このような疫学的関連が不明な 18 領域一致例は，平均年齢が 61.6 歳で，60 歳未満の割合が 47% と若年層で多く見られることが判明した(表 8)。

VNTR12 領域での菌株間の比較では，19 クラスタを形成し，クラスタ形成率は 41.7% であった。最大クラスタは 9 菌株で形成されているものが 1 件で，以下 7 菌株によるもの 2 例，6 菌株，5 菌株によるものが 1 例ずつで，3 菌株によるものが 5 例，2 菌株によるものが 10 例であった。6 菌株以上で構成される 4 パターンについて，G4 と G5/6 がそれぞれ 2 例ずつで，県内にはこの 2 系統群がクラスタとしてよく見られることがわかった。以上の結果から県内でよく見られる VNTR12 領域パターンが判明した(表 9)。

表8 VNTR18領域一(疫学的関連不明)

系統群	計
G1/2	1
G3	1
G5/6	3
Modern	2
NB	1
計	8クラスター
平均年齢	61.6歳
60歳未満	47%

表7 VNTR18領域一致同一感染源由来

系統群	家庭内	施設内	計
G4	2	0	2
G5/6	1	1	2
Modern	1	1	2
NB	3	3	6
計	7	5	12

表9 県内でよく見られるVNTR12領域パターン(疫学的関連不明分)

菌株No	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	系統群	備考
1	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	G5/6	9菌株で構成
2	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	G4	7菌株で構成
3	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	G5/6	〃
4	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	G4	6菌株で構成
5	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	G5/6	3菌株で構成
6	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	Modern	〃
7	2	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	7	不明	〃
8	1	3	3	3	5	3	7	2	5	14	9	4	G1/2	〃
9	2	2	1	3	4	2	5	4	3	10	4	3	NB	〃
10	3	3	3	4	7	3	6	5	5	7	2	5	G5/6	2菌株で構成
11	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	Modern	〃
12	4	1	3	2	7	5	7	4	5	7	7	5	G4	〃
13	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	5	3	NB	〃
14	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4	G1/2	〃
15	2	3	1	3	3	2	5	4	3	14	5	3	NB	〃
16	3	3	3	3	5	3	7	2	5	14	9	4	G1/2	〃
17	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3	Modern	〃
18	4	2	4	3	6	1	7	4	5	7	8	3	Modern	〃
19	4	1	3	2	7	4	7	4	4	7	8	5	G4	〃

## まとめと考察

今回の解析で、県内各地域ごとの結核菌系統別分類での特徴がわかってきた。また、県内で多く見られるVNTR解析パターンもわかってきた。このようなサーベイランス解析を実施することで県内各地域のVNTR型の出現頻度がわかり、地域における蔓延株あるいは希少株の情報を得ることができる。さらに、未知の集団感染の探知も可能になるものと考えられる。

北京型結核菌の中でも、Modern Typeは感染力が強く、BCG接種によるワクチン効果からの回避能力に特に優れている<sup>7)</sup>。これが原因で60歳未満の世代でModern Typeの割合が高く出たものと推定される。このことから、Modern Typeが若年層へ蔓延し、結果として結核罹患率の低下

の鈍化にも関与しているものと推測される。

結核は空気感染という特殊な感染様式をとり、感染から発病までの期間も長く、潜在的な接点を見いだして感染源を究明することは困難であり、現在までに未知の感染経路を発見できたケースは無い。

高齢者の結核は、そのほとんどが過去の結核蔓延期の感染による再燃と考えられるため、VNTR18領域のデータが一致しても患者間の関連性を見いだすのは極めて困難であると言える。

今後はVNTR型別の出現傾向を把握し、若年者、外国人及び多剤耐性結核等意味のあるクラスターと高齢者の蔓延株等疫学的に意味の無いと思われるクラスターの差別化を図り、調査を継続していくことが重要と考えられる。

## 謝辞

今回の調査研究を実施するにあたり、疫学情報等の提供を頂いた県内各保健所の皆様、並びに菌株提供等に協力頂いた、各医療機関の皆様に深謝します。

## 文献

- 1) 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：結核菌 VNTR ハンドブック，第一版，(2012年10月編)
- 2) 前田伸司ら：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，結核 Vol.83, No.10, 673-678, (2008)
- 3) 和田崇之：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，結核 Vol 85, No.12, 845-852, (2010)
- 4) Warren らの方法：Warren R.M.,et al：Am. J.Respir Crit.care.MED.,169,610(2004)
- 5) 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：結核菌 VNTR ハンドブック，追補版，(2014年3月編)
- 6) Hunter P.R.and Gaston,M.A.:*J.Clin.Microbiol.*,26,2465-2466(2002)
- 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 Vol.84, No.12, 755-759, (2009)