

〔短 報〕

石川県で分離された結核菌の分子疫学解析 (第1報)

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部

石川県健康福祉部健康推進課

塩本 高之・小坂 恵・木村 恵梨子
谷村 睦美
北川 恵美子

〔和文要旨〕

2016年～2017年度の2年間に石川県で分離された結核菌株128株について、Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-Variable Numbers of Tandem Repeat (VNTR) 分析法による解析と遺伝系統解析を行い、同一由来株による事例の有無、性別や患者年齢と遺伝系統との関連について検討した。その結果、18株6組においてVNTRプロファイルの一致が認められた。また、性別と遺伝系統との間に関連を示唆する傾向は認められなかった一方、患者年齢と遺伝系統の間には一定の傾向が認められ、低年齢層では北京新興型が、高年齢層では北京祖先型の割合が高かった。

キーワード：感染症、結核菌、北京株

1 はじめに

結核は、主に *Mycobacterium tuberculosis* を原因とした感染症で、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」では二類感染症に指定されており、診断した医師は届出の義務がある。主な感染経路は空気感染で、感染者が生涯で結核を発症するリスクは通常5～10%である¹⁾。現在、世界中に年間100万人以上の死亡者がいるとされており¹⁾²⁾、その大半は低所得国および中所得国が占める。

わが国における結核の人口10万対罹患率（以下、罹患率）は、戦後の定期健診やBCG接種の普及等が功を奏し、激減した。近年も僅かながらも減少を続け、2017年時点では、13.3³⁾となった。しかし、低まん延国の指標「罹患率10以下」は果たせておらず、未だ、結核はわが国における最大の感染症の1つである⁴⁾。石川県（以下、本県）においては、結核罹患率は、2013年の13.1から減少が続き、2016年には10.9となったものの、2017年では増加に転じ、12.0となった³⁾。

分子疫学的解析は、低まん延化に向けた有用なリスク

分析法として位置付けられており、その手法の1つに Variable Numbers of Tandem Repeat (VNTR) 分析法がある。

当センターでは、2004年より、金沢市を除く県内で届出のあった患者から分離され、患者の協力が得られた結核菌株を県の事業として収集保管している。2016年4月からは、当センターで収集保管された結核菌株に加え、金沢市保健所管内にて分離された結核菌株の一部を対象に、調査研究事業としてVNTR解析を実施している。

今回、本研究における、2016年4月から2018年3月までの2年間の解析結果をまとめたので報告する。

2 材料と方法

2.1 材 料

供試菌株は、2016年4月から2018年3月までの2年間に県内医療機関で分離され、当センターへ搬入された結核菌株128株である。なお、患者年齢と性別に関する情報は県保健所および金沢市保健所から収集した。

2.2 方 法

結核菌VNTRハンドブック（以下、ハンドブック⁵⁾）に

A Molecular Epidemiological Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated in Ishikawa, Japan (1st Report). by SHIOMOTO Takayuki, KOSAKA Megumi, KIMURA Eriko, KITAGAWA Emiko and TANIMURA Mutsumi (Health and Food Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : Infectious Disease, *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing Strain

則り、以下のとおり解析を実施した。

(1) DNA抽出

小川培地に発育した結核菌株をNuclease-Free Waterに懸濁し、95℃で10分間加熱した。その後、13,000rpmで10分間遠心し、上清をDNA抽出液として回収した。

(2) VNTR領域のPCR

JATA(12)-VNTRに用いたプライマーは、ハンドブックに記載されたものを用いた。PCR条件は、95℃で5分加熱後、95℃30秒、60℃30秒、72℃90秒のサイクルを40回実施し、72℃で7分加熱する方法とした。

(3) ゲル電気泳動

泳動用ゲルとして2%アガロースゲル(0.5×TBE buffer)、泳動用バッファーとして0.5×TBE buffer、泳動槽としてMupid®-One(Mupid社製)を用いた。電気泳動の条件は50V、80~120分間である。サイズマーカーにはO'RangeRuler 100bp+500bp DNA Ladder, ready to use(Thermo Fisher Scientific社製)を用いた。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで約10分間染色し、十分に水洗した後、紫外線照射下で撮影した。

(4) リピート数の算出

各VNTR領域におけるリピート数は、サイズマーカーを指標とし、得られたバンドの大きさにより算出した。各領域のリピート数を列記した、12個の数字から成るパターンを各菌株のVNTRプロファイルとした。

2・3 解析

(1) VNTR解析

VNTRプロファイルを基に、菌株の相同性について検討した。検討には、宮城県保健環境センターより提供されたプログラムを用いた⁶⁾。

(2) 遺伝系統解析

VNTR解析によって得られたVNTRプロファイルから、山形県衛生研究所より提供されたプログラムを用いて、最大事後確率推定法による解析を行い、各菌株を北京祖先型(Ancient Bj型)/北京新興型(Modern Bj型)/非北京型(nBj型)の3遺伝系統に分類した⁶⁾⁷⁾。

2・4 倫理的配慮

本調査は平成27年度石川県保健環境センター医学倫理審査委員会の承認を得て実施した。

3 結果

3・1 患者の性別および年齢構成

患者の男女別年齢分布を図1に示す。男女別の人数は、男性：75人、女性：53人であった。年齢の中央値は、男性：81歳、女性：84歳で、患者は高い年齢層に集中していた。男女での年齢分布の比較では目立った違いは見られなかった。

今回解析対象とした患者と本県における2016~2017

年度の結核届出患者(無症状病原体保有者および疑似症患者を除く)を各年齢層(20~29歳, 30~39歳, 40~49歳, 50~59歳, 60~69歳, 70~79歳, 80~89歳, 90~99歳)に分類し、年齢構成を図2に比較した。80~89歳の層が占める割合にやや違いがあったものの(前者：37.4%, 後者：48.4%), 今回解析対象とした患者の年齢構成は、本県における結核届出患者の年齢構成を概ね反映していると思われた。

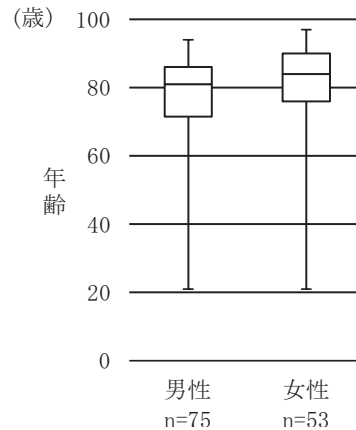


図1 患者の男女比とその年齢分布

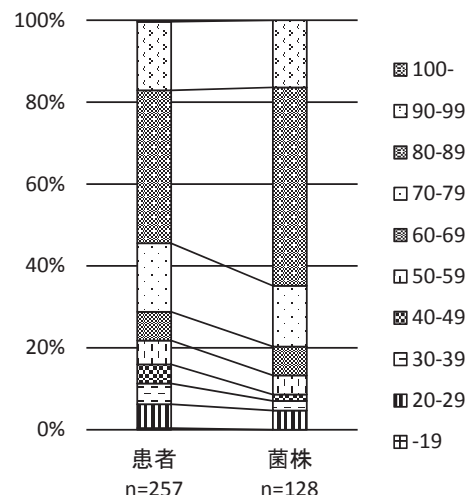


図2 2016~2017年度における本県での結核届出患者(無症状病原体保有者および疑似症患者を除く)と解析対象患者の各年齢構成割合

3・2 VNTR解析

128株のVNTR解析の結果、VNTRプロファイルが一致したのは、18株6組であった。一致した株間において、患者年齢や性別、分離地域についての偏りや傾向は認められなかった。

3・3 遺伝系統解析

(1) 全体および男女別の遺伝系統

128株の遺伝系統の内訳は、北京型(Bj型)：88株(68.8%), nBj型：40株(31.2%)であった(図3)。Bj型88株の内訳は、Ancient Bj型：72株(81.8%),

Modern Bj型：16株 (18.2%) であった。Bj型、特に Ancient Bj型が占める割合が他遺伝系統に比べて高い傾向がみられた。また、VNTRプロファイルが一致した 6 組の遺伝系統は、Ancient Bj型：5 組、Modern Bj型：1 組であった。

男女別では、男性では Ancient Bj型：44 株 (58.7%)、Modern Bj型：8 株 (10.7%)、nBj型：23 株 (30.6%) で、女性では Ancient Bj型：28 株 (52.8%)、Modern Bj型：8 株 (15.1%)、nBj型：17 株 (32.1%) であった (図 3)。Modern Bj型の割合が女性の方がやや高い傾向にあった。

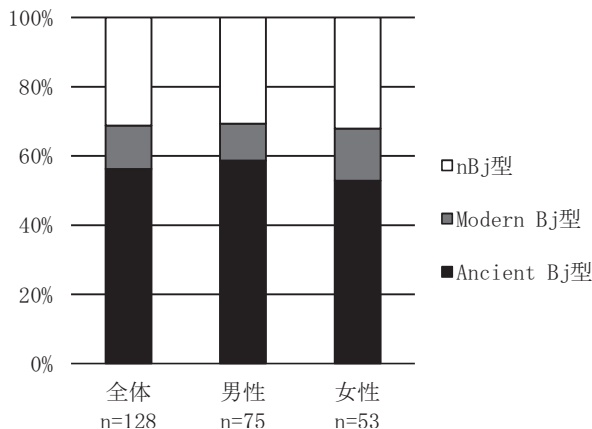


図 3 全体および男女別における各遺伝系統の割合

(2) 年齢と遺伝系統

各年齢層における各遺伝系統の菌株数並びに割合を図 4, 5 にそれぞれ示した。高い年齢層では Ancient Bj型の割合が高い傾向が認められた。Modern Bj型について、菌株数はどの年齢層においても概ね同程度であり、割合は低い年齢層にて高い傾向があった。一方、nBj型の割合は、30-39歳の層を除くと、どの年齢層においても概ね 30% を占める傾向がみられた。

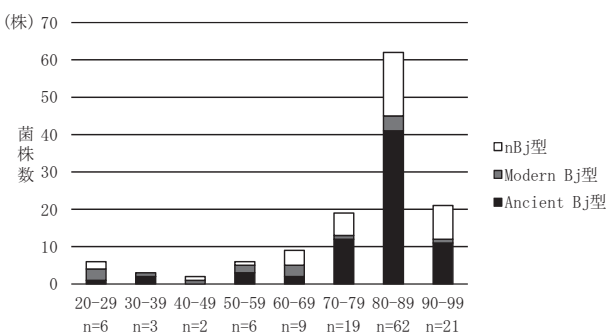


図 4 各年齢層における菌株数

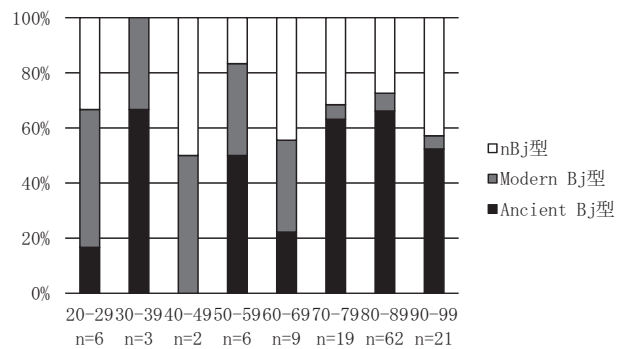


図 5 各年齢層における各遺伝系統の割合

4 考 察

今回の解析した 128 株のうち、18 株 6 組について VNTRプロファイルの一致が認められ、それぞれの組について同一由来株による感染が示唆された。しかし、今回は患者年齢や性別、分離地域以外の疫学的関連性については未検討であり、また、今回の解析に用いた VNTR領域は 12 領域のみであることから、菌株の相同性や未探知の疫学的関連性が存在する可能性については、VNTR領域を更に拡大した、より詳細な解析が必要であると思われる。

今回の結果において、Ancient Bj型が全 128 株のうち過半数 (56.3%) を占めていた。理由の 1 つに、高齢者からの分離株が多いことが挙げられた。また、70 歳以上の各年齢層において、Ancient Bj型の割合が過半数を占め、標本数の観点から更なる検討が必要であるが、70 歳以上の年齢層に比べ、70 歳未満の年齢層では Modern Bj型の割合が比較的高い傾向がみられた。これらのことから、概ね 70 歳を境界とし、遺伝系統の構成割合に変化が生じている可能性が示唆された。現在から 70 年前といえば、わが国で結核定期健診が義務化され、更に BCG 接種が普及し始めた頃と重なる。BCG 接種と Bj型の感染拡大の関連性については以前より報告されており⁸⁾⁻¹⁰⁾、標本数が少ないため言えることは限定的であるが、今回得られた結果からも、BCG 接種が Ancient Bj型或いは Modern Bj型の生存に対して何らかの影響を与えている可能性があると思われる。しかし、Bj型の広まりは BCG 接種開始より早期に始まったとする報告もあり¹⁰⁾¹¹⁾、単純に現在と 70 年前とはまん延している遺伝系統が異なるという可能性を否定できない。更に、Modern Bj型は日本を除くアジア諸国に多い傾向があり⁹⁾、今回若い年齢層で比較的高い割合で認められた Modern Bj型は国外からの持ち込み例である可能性も考えられることから、患者の国籍や BCG 接種による影響の有無も含めた、更なる疫学および分子生物学的検討が必要である。

また、非常に興味深いことに、Modern Bj型とAncient Bj型の割合が患者年齢ごとに変化していることが示唆された一方、nBj型が、30-39歳の層を除く全ての年齢層において30%程度を占めていた。男女間の比較においても同様であった。Bj型が世界的な広がりをみせる中、nBj型が一定の割合を占める理由は不明であり、このことについても今後の検討が待たれる。

今回得られた結果の再現性確認も含め、今後も検討を続け、結核の予防および拡大防止のために結果を還元したいと考えている。

5 まとめ

- (1) 解析した結核菌128株のうち、約70%がBj型であり、そのうちの約80%がAncient Bj型で残りはModern Bj型であった。
- (2) VNTRプロファイルが一致したのは、128株中18株6組で、全てBj型であった。
- (3) 患者の性別と遺伝系統との間に関連を示唆する傾向は認められなかった。
- (4) 患者の年齢と遺伝系統との間に関連がある可能性が示唆された。

菌株の収集にご協力いただきました、県健康推進課、県保健所および金沢市保健所の皆様、解析にあたり解析プログラムを提供くださいました、宮城県保健環境センターおよび山形県衛生研究所の皆様にご心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) World Health Organization, Tuberculosis, <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>, 2018年8月10日
- 2) ABEL Laurent, FELLAY Jacques, HAAS David W, SCHUN Erwin, SRIKRISHNA Geetha, URBANOWSKI Michael, CHATURVEDI Nimisha, SRINIVASAN Sudha, JOHNSON Daniel H, BISHAI William R. :Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: present knowledge and future perspectives. *Lancet Infect Dis.*, **18**(3), e64-e75 (2018)
- 3) 厚生労働省, 平成29年結核登録者情報調査年報集計結果について, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00001.html, 2018年12月7日
- 4) 厚生労働省健発1125第2号: 結核に関する特定感染症予防指針, 平成28年11月25日
- 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 (2012)
- 6) 加藤誠也, 瀧井猛将, 大角晃弘, 藤山理世, 玉井清子, 岩本朋忠, 村瀬良朗, 山本香織, 瀬戸順次, 阿彦忠之: 結核分子疫学調査の手引き第一版 (2017)
- 7) SETO Junji, WADA Takayuki, IWAMOTO Tomotada, TAMARU Aki, MAEDA Shinji, YAMAMOTO Kaori, HASE Atushi, MURAKAMI Koichi, MAEDA Eriko, OISHI Akira, MIGITA Yuji, YAMAMOTO Taro, AHIKO Tadayuki.: Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation. *Infect Genet Evol.*, **35**, 82-88 (2015)
- 8) VAN SOOLINGEN Dick, QIAN Lishi, DE HAAS Petra E W, DOUGLAS James T, TRAORE Hamadou, PORTAELS Françoise, QING Huang Z, ENKHSaikan D, NYMADAWA P, VAN EMBDEN Jan D A.: Predominance of a Single Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.*, **33**, 3234-3238 (1995)
- 9) 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, *Kekkaku*, **84** (12), 755-759 (2009)
- 10) PARWATI Ida, VAN CREVEL Reinout, VAN SOOLINGEN Dick.: Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis.*, **10**(2), 103-111 (2010)
- 11) WIRTH Thierry, HILDEBRAND Falk, ALLIX-BÉGUEC Caroline, WÖLBELING Florian, KUBICA Tanja, KREMER Kristin, VAN SOOLINGEN Dick, RÜSCH-GERDES Sabine, LOCHT Camille, BRISSE Sylvain, MEYER Axel, SUPPLY Philip, NIEMANN Stefan.: Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog.*, **4**(9), e1000160 (2008)