

## 【資 料】

## 結核菌DNA解析調査事業報告（令和元年度～3年度）

Report of DNA Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Okayama Prefecture  
(Fiscal Years 2019～2021)

梶原知博, 岡田達郎\*, 河合央博

\*現 備北保健所

KAJIHARA Tomohiro, OKADA Tatsuro\*, KAWAI Hisahiro

## 要 旨

本県では、結核の感染源、感染経路の究明及び二次感染予防等結核対策に資するため、県内の新登録結核患者から分離された結核菌の分子疫学解析を実施している。今回、令和元年度～3年度の3年間に収集した患者由来株176株についてVariable number of tandem repeats (VNTR) 解析法によりクラスター解析を行った。その結果14組のクラスターが形成されたが、そのうち調査等で疫学的関連性が確認できたのは7組であった。また、収集した菌株の遺伝系統分布では、北京型が116株と全体の65.9%を占め、その中で若年層において、新興型が高く分離される傾向が示された。一方で、今回、70代以上の高齢者における新興型の割合が前回の調査（平成28年度～30年度）時より増加（11.7%→18.3%）した。今後の結核対策として、若年層だけでなく高齢者の新興型の発生状況にも注視する必要があると考えられた。

[キーワード：結核菌, VNTR解析, 疫学, 北京型]

[Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, VNTR analysis, epidemiology, Beijing type]

## 1 はじめに

結核は、結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex ただし *Mycobacterium bovis* BCG を除く) による感染症で、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において二類感染症に分類される。令和3年、国内の結核り患率（人口10万人当たりの新登録結核患者数）が9.2と初めて10人を下回り<sup>1)</sup>、結核低まん延国の水準に達した。しかしながら、近年減少傾向は見られるものの、令和3年の国内新登録結核患者数は11,591人、本県では183人と、患者数は他の感染症と比べ未だ多く、結核はわが国において注意を要する主要な感染症の一つであることは変わらない。

本県では、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染予防等、結核対策に資することを目的に「結核菌DNA解析調査事業実施要領」を定め、県内で分離された患者由来株を収集し、Variable number of tandem repeats (以下「VNTR」という。) 解析法を用いた分子疫学調査を継続して行っている。

今回、令和元年度～3年度の収集株を対象に疫学情報と併せたクラスター解析を行い、県内の流行状況等調査を行ったので報告する。また、併せて遺伝系統解析を行ったので報告する。

## 2 材料及び方法

## 2.1 解析対象株

県内の医療機関又は検査機関において分離された結核菌のうち、令和元年度～3年度に収集した176株を対象に解析を行った。菌株の患者年齢階層別・男女別菌株数を表1に示す（年齢分布：20歳～105歳、平均年齢：75.2歳）。また、患者の疫学情報については、保健所から提供を受けた。

## 2.2 菌株からのDNA抽出

DNA抽出は、結核菌VNTRハンドブック（地方衛生研究所全国協議会 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 第一版）の「菌懸濁液の加熱死菌上清の作成方法」に準じて行った。

表1 年齢階層別・男女別菌株数

年齢	男		女		計	
	株数	%	株数	%	株数	%
20代	9	9.2%	5	6.4%	14	8.0%
30代	1	1.0%	3	3.8%	4	2.3%
40代	2	2.0%	5	6.4%	7	4.0%
50代	5	5.1%	2	2.6%	7	4.0%
60代	9	9.2%	3	3.8%	12	6.8%
70代	16	16.3%	14	17.9%	30	17.0%
80代	36	36.7%	22	28.2%	58	33.0%
90代以上	20	20.4%	24	30.8%	44	25.0%
計	98		78		176	

### 2.3 VNTR解析及びクラスター解析

VNTR解析は、国内標準法として提唱されているJATA(12)-VNTR解析法<sup>2)</sup>、さらに、JATA(12)-VNTRの型別能力を補うために、JATA(12)-VNTRに加えられたJATA(15)-VNTR解析法と3つの多型性に富んだ超多変(Hypervariable, HV)領域を解析するVNTR解析法を加えた計18領域で行った<sup>3), 4)</sup>。PCR法により各領域の増幅を行い、アガロースゲル電気泳動法により得られた増幅産物のサイズから各領域のリピート数を決定し、18領域のリピート数の組み合わせを遺伝子型(以下「VNTR型」という。)とした。クラスター解析は、解析ソフトBioNumerics ver 7.6 (APPLIED MATHS)を用い、VNTR型が完全に一致した株を同一クラスターとした。また、収集菌株全体の関連を可視的にとらえるため同ソフトを用いてMinimum spanning treeを作成した。

### 2.4 遺伝系統分類解析

各菌株の遺伝系統分類は、Setoらの方法<sup>5)</sup>に従い、VNTR型から最大事後確率推定法(MAP推定法)を用いて、北京型(祖先型, 新興型)及び非北京型を推定した。

## 3 結果及び考察

今回、令和元年度～3年度に収集した176株についてクラスター解析を実施した結果、14組のクラスターA～Nが形成され、30株が分類された(クラスター形成率17.0%) (表2, 図1)。これらのクラスターはいずれもVNTR型が一致した菌株が2株又は3株ずつ分類された小さなクラスターであり、今回の収集株からは大きな集団発生や県内で流行している株の傾向は示されなかった。

クラスターのうち7組のクラスターA, B, F, I, J, L及びMには、家族や同一施設利用者等、保健所の疫学調査で患者間の関連性が把握された事例がそれぞれ別のクラスターとして分類された。結核菌株のVNTR解析は、疫学調査で感染が疑われた事例で患者由来株間の遺伝子型が一致した場合、その関連性の証明や科学的裏付けとなり得るが、今回の結果からもこのことが示された。一方で、その他の7組のクラスターC, D, E, G, H, K及びNに分類された事例では、患者間の関連性は不明であった。網羅的に菌株を収集しサーベイランスとして実施するVNTR解析では、その解析結果(VNTR型の一致)を基に追加疫学調査を実施することで、新たな感染経路や伝播様式が発見されることも期待され、また、流行株や集団感染等の早期探知にも有用になる。そのため、今後も継続して結核菌のVNTR解析を行い、解析結果や流行状況を迅速に保健所へ情報提供することが重

要と考える。

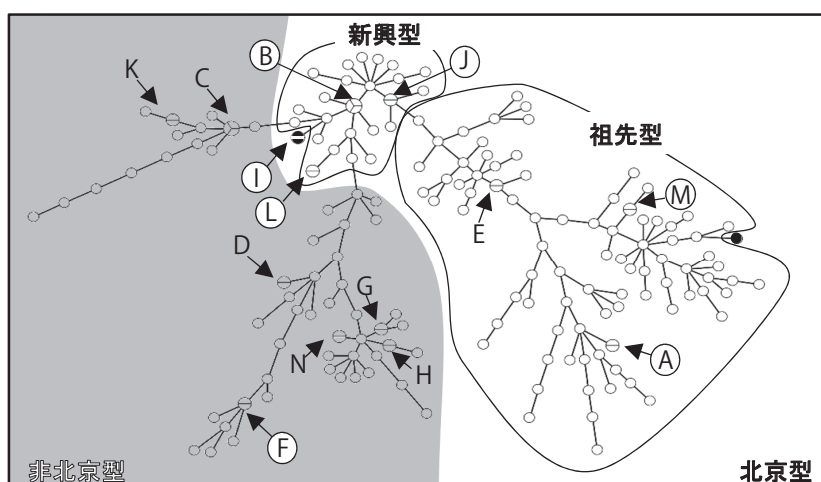
収集株176株について遺伝系統分類解析を実施した結果、北京型は116株(65.9%)、非北京型は59株(33.5%)、推定不能が1株(0.6%)で、北京型の内訳は、祖先型が86株(74.1%)、新興型が28株(24.1%)、推定不能が2株(1.7%)であった(図2)。また、年齢階層別の祖先型と新興型の割合では、特に20代で新興型が62.5%と他の年代に比べて高かった(図3)。結核菌では、遺伝系統の割合は地域によって異なる。わが国では北京型が7～8割を占めると言われており<sup>6)</sup>、今回の結果でもおおむね同様な傾向が見られた。また、北京型は感染伝播力が強く、薬剤耐性との関連性が高いことが報告されている<sup>7)</sup>。今回のクラスター解析では、疫学的関連性が確認された7事例(クラスターA, B, F, I, J, L及びM)の遺伝系統を調べると、5事例(71.4%)が北京型であり、北京型の感染伝播力の強さを裏付ける結果であった。

諸外国における北京型の祖先型及び新興型の分離状況は、新興型が7割以上占めているのに対し、わが国の特徴としては祖先型が8割程度を占めるものの<sup>6)</sup>、若年層では新興型の割合が高いことが挙げられる<sup>8)</sup>。新興型は祖先型よりも感染伝播力が強く発病しやすいと言われ<sup>7)</sup>、さらには集団感染に関与する遺伝系統であることが示唆されている。今回の結果では、本県でも20代の新興型の割合が高かった。一方で、今回、70代以上の高齢者における新興型の割合が前回の調査<sup>9)</sup>(平成28年度～平成30年度)時より増加(11.7%→18.3%)した。また、70代以上の高齢者を含む新興型のクラスターが3事例(クラスターB, J及びL)認められた。高齢者結核の大部分は、結核高まん延期の青年時代に感染した結核の内因性再燃とされる<sup>10)</sup>が、今回、高齢者が新たに新興型に感染した可能性も否定できない。

国内の結核罹患率は低下し、低まん延国になったが、その一方で、り患率や新興型の分離比率が高い近隣アジア諸国からの流入等を背景とした、新興型の分離やクラスターの割合が増加することが懸念されている。このことから、今後の結核対策として、若年層だけでなく高齢者の新興型の発生状況にも注視する必要があると考えられた。

表2 クラスター解析結果

クラスター	菌株No.	年齢	性別	検体採取年月	居住地(市町村)	疫学情報等	遺伝系統
A	1876	80代	男	2019年2月	同一市町村	家族	北京型祖先型
	1888	60代	男	2019年3月			
B	1879	60代	男	2019年1月	同一市町村	同一施設利用者	北京型新興型
	1919	80代	男	2019年6月			
C	1920	50代	男	2019年9月	同一市町村	散発	非北京型
	1885	80代	男	2018年12月			
	1946	90代以上	女	2020年3月			
D	2051	80代	男	2021年9月	隣接する市町村	散発	非北京型
	1886	90代以上	男	2019年1月			
E	1894	80代	女	2018年11月	隣接する市町村	散発	北京型祖先型
	1897	20代	女	2019年5月			
F	2037	50代	男	2021年8月	同一市町村	同一施設利用者	非北京型
	1924	90代以上	男	2019年8月			
G	1927	90代以上	女	2019年12月	隣接する市町村	散発	非北京型
	1933	90代以上	男	2019年10月			
H	1938	90代以上	女	2019年5月	同一市町村	散発	非北京型
	1934	90代以上	男	2019年8月			
I	2016	70代	女	2021年3月	同一市町村	家族	推定不能
	1961	50代	女	2020年5月			
J	1962	80代	女	2020年5月	同一市町村	家族	北京型新興型
	1991	80代	女	2020年7月			
K	1992	90代以上	男	2020年4月	同一市町村	散発	非北京型
	1994	50代	男	2020年10月			
L	2002	50代	男	2021年2月	同一市町村	家族	北京型新興型
	1995	80代	男	2020年10月			
M	2000	70代	女	2021年1月	同一市町村	家族	北京型祖先型
	2001	70代	女	2021年1月			
N	2031	70代	男	2021年6月	同一市町村	散発	非北京型
	2038	80代	男	2021年9月			
	2043	80代	男	2021年9月			



●及び●は推定不能を示す。  
A～Nはクラスターを示す。また、囲い文字は疫学的関連性が確認されたものを示す。

図1 クラスター解析結果

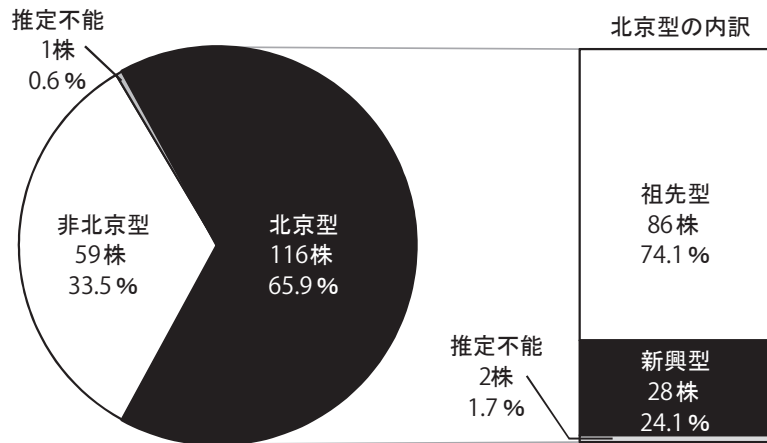


図2 遺伝系統分類解析

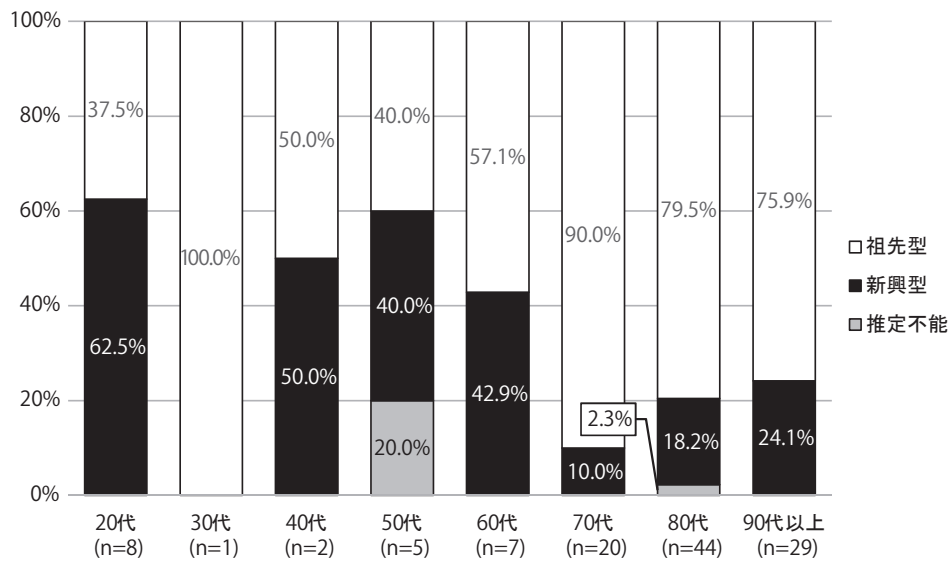


図3 年齢階級別北京型株における祖先型と新興型の割合

## 文 献

- 1) 厚生労働省：2021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\\_00007.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00007.html) (2023.5.17アクセス)
- 2) 前田伸司，村瀬良朗，御手洗 聡，菅原 勇，加藤 誠：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，83，673-678，2008
- 3) 和田崇之，長谷 篤：結核菌の縦列反復配列多型性 (VNTR) 解析に基づく分子疫学とその展望，結核，85，845-852，2010
- 4) 前田伸司，和田崇之，岩本朋忠：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，65，201，2010
- 5) Junji Seto, Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Aki Tamaru, Shinji Maeda, et al. : Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation, Infect. Gene. Evol., 35, 82-88, 2015
- 6) 岩本朋忠：結核菌分子疫学研究の将来展望，結核，84，789-791，2009
- 7) Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy C. R. E, et al. : A Recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is Associated with an increased ability to spread and cause disease, J. Clin. Microbiol., 45, 1483-1490, 2007
- 8) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, et al. : Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan, J. Clin. Microbiol., 47, 3340-3343, 2009
- 9) 河合央博，森本晃司，仲 敦史，中嶋 洋，狩谷英明：結核菌DNA解析調査事業報告（平成28～30年度）岡山県環境保健センター年報，43，93-97，2019
- 10) 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，84，755-759，2009