

12. 長野県における結核菌分子疫学解析状況

関口真紀（長野県環境保全研究所）

キーワード：結核菌、VNTR 解析

要旨：長野県では、平成 26 年度から分子疫学的手法である Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法による解析を開始した。平成 28 年度までに 137 株の結核菌解析を行い、VNTR 型別が完全に一致した菌株は 19 株で 9 種類のパターンに分類され、そのうち 13 株 6 クラスターの菌株由来患者には家族等の疫学リンクや地域性がみられた。また遺伝系統分布は若年層においては北京型新興型が多く見られた一方、高齢者では北京型祖先型が多く見られた。若年者は新規に新興型結核菌の感染を受けて発症するのに対し、高齢者は若い頃に感染した祖先型結核菌を持ち続け、年齢とともに発症に至った内因性再燃が多いためと類推される。

A. 目的

長野県では「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」に基づき、分子疫学的手法のひとつである Variable Numbers of Tandem Repeats (以下「VNTR」という。)法による解析を用いた感染源および感染経路の究明を行い、結核の二次感染予防等結核対策に役立てることを目的とした結核分子疫学調査実施要領を定め、平成 26 年 10 月から対策事業を開始した。

今回は、事業開始から平成 29 年 3 月までに当所に搬入された結核菌の VNTR 解析状況について概要を報告する。

B. 方法

① 材料

平成 26 年 10 月から平成 29 年 3 月までに、保健所から結核分子疫学調査実施要領に基づき VNTR 解析のため当所に搬入された患者由来の結核菌株 137 株を対象とした。

なお、搬入された菌株のうち 6 株は、同一患者 3 名の初発時および再発時に分離された菌株であった。患者の年齢は、80 歳以上が 65 名 (47.4%)、60~79 歳が 36 名 (26.3%)、40~59 歳が 22 名 (16.1%) および 20~39 歳が 14 名 (10.2%) であった。

② 方法

当所に搬入された当該菌株は VNTR 法により遺伝子解析を行い、得られた繰り返し配列数のパターンで比較を行った。検査方法は前田ら¹⁾の方法に従い、国内の標準法として提唱されている JATA (12) の 12 領域に、識別能を高めるため 3 領域を追加し (JATA (15))、更に超可変領域 (Hypervariable) である QUB3232、VNTR3820、および VNTR4120 の 3 か所の領域を加えた計 18 領域について実施した。

得られた VNTR パターンに基づきクラスター解析

をするとともに、瀬戸ら²⁾の方法により系統分類 (北京型の祖先型 (ST11/26、STK、ST3、ST25/19) と新興型、および非北京型) を行った。

C. 結果

① クラスター解析

供試菌株 137 株のうち、解析した 18 領域で完全に一致したのは 19 株で、9 種類 (クラスター A~H と同一患者①) のパターンに分類され、クラスター形成率は 12.9% であった (表 1、2)。

一致した菌株のうちクラスター B、C、D、G に含まれる由来患者、およびクラスター E のうち菌株番号 T15-26 と T16-29 が検出された患者は、家族や職場等の疫学情報から関連性が認められた。またクラスター A、E に分類された菌株の由来患者は共通した疫学情報は認められなかったが、クラスター内の患者は同一保健所管内に在住していた。しかし、クラスター F、H においては関連する疫学情報や地域性は認められなかった (表 1)。

表 1 VNTR 解析においてクラスター形成 (18 領域一致) した菌株

クラスター	菌株番号	保健所記号	検体採取年月	性別	年齢	系統分類	疫学情報等	備考
A	T15-15	k	2011/11	男	62	非北京型	同一地域	
	T15-23	k	2014/12	女	85	非北京型		
B	T15-29	i	2015/3	女	71	北京型、新興型	同一医療機関の受診歴あり	
	T15-41	i	2015/6	女	69	北京型、新興型		
C	T16-11	a	2012/4	男	80	非北京型	家族	
	T16-13	a	2016/1	男	56	非北京型		
D	T16-12	a	2015/12	男	51	非北京型	同一職場	
	T16-14	a	2013/10	男	51	非北京型		
E	T16-25	d	2015/7	男	54	北京型、新興型	家族	同一地域
	T15-26	d	2015/5	女	36	北京型、新興型		
F	T16-29	d	2013/1	男	35	北京型、新興型	同一施設	
	T15-28	c	2013/1	女	71	北京型、祖先型		
G	T16-37	i	2016/3	女	84	北京型、祖先型	同一施設	
	T17-11	h	2016/7	男	82	非北京型		
H	T17-13	h	2016/12	女	58	非北京型	同一施設	
	T17-15	d	2016/12	男	74	非北京型		
	T15-04	b	2014/11	男	73	非北京型		

同一患者で初発時と再発時に採取された菌株は、解析の結果から患者①は VNTR パターンが一致し、患者③は 1 領域のみ相違していた。一方、患者②は相違していた (表 2)。

② 系統分類

VNTR パターンによる系統推定を実施したところ、

表2 初発時および再発時分離株のVNTR解析結果

患者番号	菌株番号	保健所記号	性別	年齢	検体採取年月	初発再発	亜種系統分類	VNTRパターン
①	T14-1	i	男	70代	2012/3	初発	北京型、祖先型	一致
	T14-2				2014/2	再発	北京型、祖先型	
②	T16-49	k	男	50代	2010/10	初発	北京型、新興型	不一致
	T16-82				2016/5	再発	非北京型	
③	T16-26	d	男	80代	2015/8	初発	北京型、祖先型	1領域相違
	T17-4				2016/11	再発	北京型、祖先型	

供試菌株 137 株のうち北京型の祖先型が 64 株 (46.7%)、新興型が 27 株 (19.7%) で、非北京型が 46 株 (33.6%) であった。また、祖先型での亜型の内訳は、ST3 が 26 株 (40.6%)、ST25/19 が 20 株 (31.3%)、STK が 17 株 (26.6%)、ST11/26 が 1 株 (1.6%) であった (図1)。

年齢階級における系統分類では、若年層ほど新興型が高い傾向が認められた (図2)。

祖先型のうち特に問題視されている多剤耐性結核菌群で有意に出現頻度が高い遺伝系統である ST11/26 が 1 株分離されたが、薬剤耐性試験の結果、耐性を認めなかった。

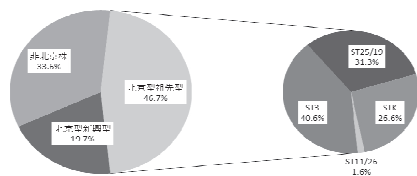


図1 菌株の系統分類推定

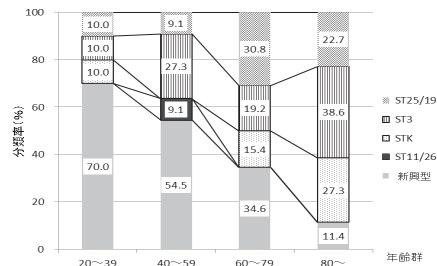


図2 北京型における年齢階級別系統分布

D. 考察

今回クラスター解析により完全一致した菌株は 137 株中 19 株で、その内同一患者から検出された 2 株を除き 17 株中 13 株の由来患者は、家族等何らかの疫学リンクや地域性が認められ、VNTR 解析の有用性が示唆された。一方、由来患者に疫学リンクや地域性が認められずプロファイル番号が一致した菌株が 2 クラスターあり、VNTR 解析のサーベイランスとして活用を考慮すると、必要に応じてより分離能を高めるために領域を追加 (24 領域) して VNTR を実施し、疫学情報の収集に努めることが効果的と思われる。今回、解析を実施した株のクラスター形成率は 13.9% と低く、同一クラスターを形成した菌株は最大でも 3 株であった。この傾向は本県と同様な低蔓延地域である他県で

も認められている。瀬戸ら³⁾は、年齢層が若いほどクラスター形成率が高く、しかも低蔓延地域では同一クラスター内の菌株数は、集団感染以外ではそれほど多くなると報告しており、本県は特に高齢結核患者が多いため、クラスター形成率およびクラスターを形成する菌株数が少ないものと思われる。逆にクラスター形成が少ないことから同一クラスター内菌株由来患者の関連性が強く示唆され、疫学調査の大きな裏付けとなるため、更なるデータの蓄積が重要と思われる。

今回再発患者 3 名の初発時と再発時に採取された菌株の VNTR 解析を実施しパターンを比較したところ、2 名は一致または 1 領域相違であったが一方では全く異なっていた。このことから前者は、初回感染した結核菌の内因性再燃で、後者は初感染の結核菌と別由来による再感染 (外来性再感染) と考えられた。結核既感染率が高いとされる高齢者層において多いと考えられている内因性再燃による発病以外に、最近の結核感染による発病も珍しくないと言われ、内因性再燃では治療内容等の検討、外来性再感染では新たに感染源の特定や感染経路の探知などが必要となり、その判定に VNTR 法による解析結果は極めて有用な情報を提供できる。

系統分類においては、北京型に分類された結核菌は 66.4%、そのうち新興型が 19.7% で、全国⁴⁾ とほぼ同様の傾向であった。新興型は感染伝播性および病原性が高く、特に若年層に多いと言われているが、今回も若い年齢層ほど新興型の割合が高率であった。

E. まとめ

結核菌の分子疫学検査は、集団感染事例の追跡等を行う場合は疫学調査と組み合わせることで患者間の関連性を科学的に裏付けることができ、疫学調査だけでは探知困難な未知の感染伝播経路の発見や新たなリスク集団の探知に活用できる可能性があるなど多くの有用性が期待される。本県においては平成 26 年度から結核分子疫学調査が開始されたが、今後県内における結核患者の菌株を網羅的に検査し、経年的にデータベースを充実させ構築することが、VNTR 解析を有効に活用するうえで必須であると考えられる。

F. 利益相反

利益相反なし

G. 参考文献

- 1) 前田伸司ら：結核、83、673-678 (2008)
- 2) Seto J et al.: Infect Genet Evol. 35, 82-88 (2015)
- 3) 瀬戸順次ら：結核、88、535-542 (2013)
- 4) 岩本朋忠：複十字 No.329 (9/2009)