

長崎県における結核菌の分子疫学的解析(2014 年度)

右田 雄二、森本 コヤノ*、田栗 利紹

Molecular epidemiological study of *Mycobacterium tuberculosis* in Nagasaki Prefecture (2014)

Yuji MIGITA, Koyano MORIMOTO and Toshitsugu TAGURI

key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Variable numbers of tandem repeats, Cluster, Polymerase Chain Reaction

キーワード: 結核菌、縦列反復配列多型(VNTR)、クラスター、PCR

はじめに

これまでの結核対策は、患者の接触調査による実地疫学で伝播経路の推定や集団感染の探知を行ってきたが、近年、この実地疫学に結核菌の遺伝型別を加味した分子疫学調査が普及し始めている。わが国においてもその積極的な活用が期待されており、2011年5月に「結核に関する特定感染症予防指針」(厚生労働省)が一部改正され、遺伝型別を活用した分子疫学的サーベイランスの構築や研究推進の必要性が明記された。

長崎県においても、感染症法第15条の積極的疫学調査の一環として、2011年以降、県南・県央保健所管轄地域を対象に結核病床を有する医療機関から分与された結核菌のVNTR(Variable numbers of tandem repeats)法による遺伝型別分析を実施している。

本法は、結核菌のゲノム上に数多く存在する縦列反復配列多型のうち国内結核菌株の識別に優れたJATA(Japan Anti-Tuberculosis Association)12領域に追加領域(JATA15(3) + 超可変領域(3))を加えた計18領域についてPCR(Polymerase Chain Reaction)法を行い、得られた増幅産物の分子量サイズを反復配列回数に換算し、その反復回数を遺伝型コードとするものである。

今回、我々は長崎県内の結核患者から分離された121株の分析結果と実地疫学調査結果とを照合し、一部知見が得られたので報告する。

調査方法

2011年12月から2015年3月までの結核発生届に基づき収集された121株(県南:50株、県央:50株、西彼:2株、佐世保市:11株、長崎市:8株)を解析対象とした。試験に供試する鋳型DNAは、小川培地(凝固水も含む)ごと熱

処理した結核菌DNA粗抽出液をフェノール・クロロホルム処理後、エタノール沈殿により作製した。VNTR領域ごとの反復回数の測定方法は「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。

結核菌株の系統分類の解析については、熱帯医学研究所に依頼した。本研究では、菌株間の反復回数が18領域中1領域違いまでを同一の遺伝型(クラスター)と判定し、保健所の実地疫学との関連性を調査した。

結果及び考察

結核菌121株のVNTR分析を実施した結果、41株(30.6%)が15クラスターを形成した(表1)。対象者の平均年齢は74.6歳であった。患者間で関連性が判明した事例は3事例あり、宿泊施設内感染1事例(クラスターNo.6)、院内感染1事例(クラスターNo.8(S64~S71))及び高齢者施設内感染1事例(クラスターNo.15)であった。院内感染事例については、接触可能性が疑われた患者1名は遺伝子型が集団と異なることで関連性が否定された。この他、国内で殆どみられないEAI(East-African-Indian)型(S29)が1株みられた。出生国で感染し日本に渡航後、発症したと推察される。

本県の結核罹患率¹⁾は全国でも高く(平成25年:19.9)、県内では県南保健所管轄(平成25年:36.5)が最も高い地域となっている。県南地域はサーベイランス対象地域としており、収集可能な株はすべて分析している。本地域の分析対象者は、高齢者(平均79.5歳)が多く、高い罹患率に反してクラスター形成率18.0%(50株中9株)が低いといった特徴があり、本地域には多様な遺伝型が存在することが分かった。このことは、本地域内における特定菌株の流

* 長崎市保健環境試験所

行、拡散がなかったことを意味しており、県南地域の高い罹患率は高齢者の再燃によるものと推察される。

VNTR 解析に基づく遺伝型の系統分類(図 1)を示した。国内データ²⁾と比較すると、長崎県では北京株の割合が低く、非北京株が高い傾向がみられた。亜種系統別では G1/2 の割合が低く、G5/6 が高い傾向にあることが特徴的であった。このようにサーベイランス解析を行うことで地域内における VNTR 型の出現頻度が分かり、地域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となると思われる。

日本の結核対策は地域 DOTS やクオンティフェロン等の導入で成果を上げているが、外国人及び都市部での結核患者は増加傾向にある。今後、日本が低蔓延化へ移行するにあたっては、これらの対策に VNTR 分析による遺伝型別を加えたきめ細かな対策が重要になると思われる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、医療政策課、保健所の関係諸氏、結核菌株の提供に御協力頂いた長崎原爆諫早病院、諫早総合病院及び長崎川棚医療センターの検査部の方々、並びに結核菌の系統分類解析を分担して頂いた長崎大学熱帯医学研究所の和田崇之博士に感謝する。

参 考 文 献

- 1) 長崎県福祉保健部医療政策課: 長崎県の結核(2014)
- 2) Seto J and Wada T et al: Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates by homoplastic genotypes based on maximum a posteriori estimation in Japan, submitted.

表1. VNTR 解析においてクラスタが形成された結核菌

クラス No.	菌株 No.	年齢	性別	管轄 HC	JATA (12)												JATA (15)			超可変領域			亜種系統 分類
					J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	Q11a	EA	Q18	3232	3820	4120	
1	S19	82	男	県央	3	3	3	3	5	3	7	2	5	10	6	4	10	8	4	12	7	8	G1/2 (ST11/26)
	S36	58	女	県央	3	3	3	3	5	3	7	2	5	10	6	4	10	8	4	12	7	8	
	S08	76	男	県南	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	12	12	11	
2	S09	76	男	県南	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	12	12	14	
	S92	85	女	県央	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	12	12	11	
3	S08	76	男	県南	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	12	12	11	
	S74	82	女	県央	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	10	12	11	
4	S74	82	女	県央	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	10	12	11	
	S92	85	女	県央	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	12	12	11	
5	S74	82	女	県央	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	10	12	11	
	S105	89	女	県央	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	9	4	10	12	11	
6	S32	40	男	県南	4	3	1	2	7	3	7	4	5	7	8	5	6	8	4	16	10	9	
	S44	37	男	西彼	4	3	1	2	7	3	7	4	5	7	8	5	6	8	4	16	10	9	
	S85	37	男	県南	4	3	1	2	7	3	7	4	5	7	8	5	6	8	4	17	10	9	
7	S45	77	男	県央	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	7	8	3	12	12	11	
	S88	63	男	県央	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	7	8	3	12	12	11	
8	S57	43	男	県央	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	
	S64	53	女	佐世保	4	3	2	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	
	S65	71	男	佐世保	4	3	2	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	
	S66	61	男	佐世保	4	3	2	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	
	S67	45	男	佐世保	4	3	2	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	
	S68	57	男	佐世保	4	3	2	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	
	S69	78	男	佐世保	4	3	2	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	
	S70	57	女	佐世保	4	3	2	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	
	S71	54	男	佐世保	4	3	2	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	
	S90	42	女	県央	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	
9	S20	67	男	県南	4	3	4	3	5	4	7	4	5	5	6	3	9	5	4	12	14	10	
	S83	76	男	県南	4	3	4	3	5	4	7	4	5	5	6	3	9	5	4	12	14	10	
	S93	79	男	県南	4	3	4	3	5	4	7	4	5	5	6	3	9	5	4	12	14	10	
10	S21	89	男	県央	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	14	14	10	
	S51	82	男	県南	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	14	14	11	
11	S15	87	男	県央	2	2	2	1	3	2	5	4	3	12	8	3	3	20	3	9	5	4	
	S17	63	男	長崎	2	2	2	1	3	2	5	4	3	11	8	3	3	20	3	9	5	4	
12	S25	71	男	県央	2	3	2	3	2	4	5	2	2	6	6	3	2	4	2	5	6	4	
	S55	93	女	県央	2	3	2	3	2	4	5	2	2	6	6	3	2	4	2	5	6	4	
13	S47	89	男	県南	2	2	2	4	3	2	5	4	3	7	8	3	5	20	3	14	4	4	
	S56	87	男	県央	2	2	2	4	3	2	5	4	3	7	8	3	5	20	3	14	4	4	
14	S61	80	女	県南	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	5	3	5	2	3	5	5	2	
	S62	79	男	県南	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	2	3	5	2	3	5	5	2	
15	S121	36	女	県央	2	3	1	3	3	2	5	4	3	10	4	3	4	5	3	10	5	2	
	S122	88	男	佐世保	2	3	1	3	3	2	5	4	3	10	4	3	4	5	3	10	5	2	

:同じ分子量サイズ

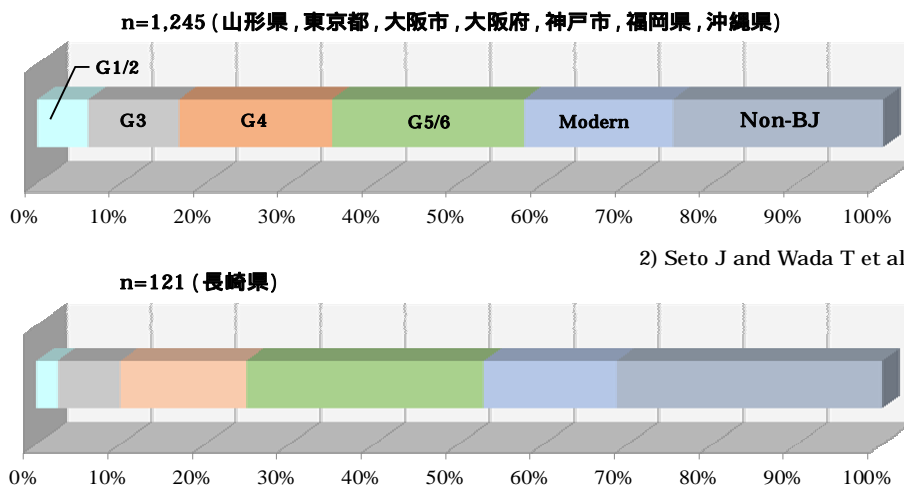


図1. 長崎県において分離された結核菌の系統分類