

# 長崎県における結核菌の分子疫学解析(2020～2023)

右田 雄二、山口 結奈、吉川 亮

## Molecular epidemiological study of *Mycobacterium tuberculosis* in Nagasaki Prefecture (2020～2023)

Yuji MIGITA, Yuina YAMAGUCHI and Akira YOSHIKAWA

キーワード：結核菌、VNTR、遺伝系統、分子疫学

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Variable numbers of tandem repeats, Genetic lineage, Molecular epidemiology

### はじめに

結核は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)によって引き起こされる感染症で「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」において、二類感染症に指定されている。2016年11月の「結核に関する特定感染症予防指針」<sup>1)</sup>の改正では2020年までに日本の結核罹患率を低蔓延の水準(罹患率10以下)まで引き下げる目標が示された。2022年の新規登録結核患者数は10,235人で、罹患率(人口10万対)は8.2<sup>2)</sup>まで低下し、わが国もついに低蔓延国となった。本県においても罹患率は年々低下しているが、国内では罹患率の高い地域であり、同年の新登録結核患者数137人、罹患率10.7<sup>3)</sup>であった。

本県では2012年から感染症法第15条の積極的疫学調査の一環として、長崎県結核菌分子疫学調査実施要領に基づき、VNTR(Variable Numbers of Tandem Repeats)法による遺伝子型別を実施している。今回、2020年4月～2024年3月までに長崎県内において発生した結核患者のうち結核病床を有する医療機関から収集した176株(長崎市分は長崎市保健環境試験所が実施)について、VNTR法による遺伝子型の解析を実施した。このうち疫学的関連性が確認された事例を中心に報告する。

### 対象および方法

#### 1 VNTR分析の方法

県内の結核病床を有する医療機関から分離された結核菌株176株(熱処理済み:95～105℃、10分)を分析対象とした。鋳型DNAはフェノールクロロホ

ルム処理後、エタノール沈殿法により精製した。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」<sup>4)</sup>に準拠し、JATA12領域にJATA(15)3領域(QUB-11a, ETR A, QUB-18)<sup>5)</sup>および超可変3領域(QUB-3232, VNTR3820, VNTR4120)<sup>6)</sup>を加えた合計18領域のプライマー対を使用した。PCRの反応条件は、95℃で2分加熱後、95℃30秒、63℃30秒、72℃90秒のサイクルを35回実施し、最後に72℃で7分加熱した。PCR増幅産物は0.5×TBE緩衝液を用いた2% Nusieve 3:1 Agarose(Lonza社)のアガロースゲルを使用し、Mupid@-One(Mupid社製)を用いて、100V 60～120分間の条件下で電気泳動を行った。サイズマーカーにはO' RangeRuler 100bp+500bp DNA Ladder(Thermo Fisher Scientific社)を使用した。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色した後に紫外線照射下で撮影した。こうして得られた各領域それぞれのPCR増幅産物の分子量サイズから反復配列回数を算定した。

#### 2 遺伝系統

分析した各菌株のVNTRプロファイルを山形県衛生研究所より提供された最大事後確率(maximum a posteriori: MAP)推定法による解析プログラムを用いて、北京型株5型〔祖先型4型(ST11/26, STK, ST3, ST25/19)および新興型〕と非北京型株<sup>7)</sup>に分類した。これら解析結果をサーベイランス対象地域(県南、県央、長崎市、県北・佐世保市)別、年齢階級別に整理した。

3 分子疫学解析事例

VNTRプロファイルが同じ菌株群については、患者の発生届や保健所による患者間の行動歴等の疫学調査結果と照合し、感染経路の解析を試みた。

結果および考察

1 遺伝系統

解析した176株のうちサーベイランス対象4地域164株の系統解析結果を地域別(表1-1)、年齢層別(表1-2)に示した。全地域では、北京型(Bj)が125株(76%)、北京型のうち祖先型(Ancient)が84株(67%)、新興型(Modern)が41株(33%)であった。この結果は、わが国の北京型株の7~8割は祖先型との報告<sup>8,9)</sup>と概ね合致した。しかし2012年4月~2019年3月集計結果<sup>10)</sup>と比較すると、新興型87株(23%)に対して、直近3年では41株(33%)と新興型の検出割合が増加していた。地域別では、県北・佐世保市で新興型が20株(39%)、長崎市で非北京型(nBj)が14株(33%)と、他の地域よりも高い割合であった。年齢層別では、81歳以上で祖先型53株(71%)、61-80歳で祖先型24株(65%)と若い年齢層よりも高い傾向にあった。一方、41-60歳では新興型が4株(57%)、41歳未満では非北京型が5株(45%)と高い割合であった。非北京型5株については、

いずれも20代でフィリピン、ネパールおよびインドネシアの外国出生者由来であった。

新興型は国内では若年層に多く、祖先型よりも感染伝播・発病しやすい型、非北京型株は都市部において外国人患者から多く分離される型と報告<sup>8,9)</sup>されている。本県においても同様な傾向がみられた。

2 分子疫学解析事例

本研究期間に解析した176株のVNTRプロファイルを2012年4月以降に解析した菌株のVNTRプロファイルと照合した結果、31クラスターが確認されたが、過去10年を超えるVNTRプロファイルとの照合であるため、多くの疫学的関連性は不明であった。患者間で疫学的関連性が確認された事例を示す(表2)。その内訳は施設内感染(疑い含む)3事例(No.1、No.2、No.4)と家族・職場間感染1事例(No.3)の合計4事例であった。No.1は高齢者施設内における入所者間感染事例、No.2は医療機関併設型の介護医療院における再感染事例、No.4は障害者施設における入所者から職員への感染事例であった。No.3は夫婦間感染と扱われたが、その後発症した職場の同僚も同じVNTRプロファイルであった。

表1-1 サーベイランス対象地域における遺伝的特徴

地域区分 n=164	平均 年齢	北京型株					非北京型株		
		祖先型 (Ancient)				新興型 (Modern)	合計(%)*	合計(%)*	
		ST11/26	STK	ST3	ST25/19				合計(%)**
県南	81	3	1	6	4	14 (74)	5 (26)	19 (83)	4 (17)
県央	82	2	4	5	9	20 (74)	7 (26)	27 (73)	10 (27)
長崎市	80	1	4	5	9	19 (68)	9 (32)	28 (67)	14 (33)
県北・佐世保市	77	5	7	4	15	31 (61)	20 (39)	51 (82)	11 (18)
合計		11	16	20	37	84 (67)	41 (33)	125 (76)	39 (24)

合計(%)\*: 全株内で占める割合      合計(%)\*\*: 北京型株内で占める割合

表1-2 各年齢階級における遺伝的特徴

年齢区分 n=164	北京型株					非北京型株		
	祖先型 (Ancient)				新興型 (Modern)	合計(%)*	合計(%)*	
	ST11/26	STK	ST3	ST25/19				合計(%)**
41歳未満	1	0	0	3	4 (67)	2 (33)	6 (55)	5 (45)
41-60歳	0	0	2	1	3 (43)	4 (57)	7 (100)	0 (0)
61-80歳	2	4	5	13	24 (65)	13 (35)	37 (88)	5 (12)
81歳以上	8	12	13	20	53 (71)	22 (29)	75 (72)	29 (28)
合計	11	16	20	37	84 (67)	41 (33)	125 (76)	39 (24)

合計(%)\*: 全株内で占める割合      合計(%)\*\*: 北京型株内で占める割合

表2 疫学的関連性が確認された事例

事例 No.	菌株 No.	JATA (12)										JATA (15)				超可変領域		亜種系統	発症年	疫学関連		
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	QUB-11a	ETR-A	QUB-18	3232				v3820	v4120
1	S0418	4	3	3	3	3	3	5	4	5	7	8	4	20↑	20↑	4	13	18	15	STK	2020	施設内感染疑い (入所者間)
	S0476	4	3	3	3	3	3	5	4	5	7	8	4	20↑	20↑	4	13	18	15			
	S0555	4	3	3	3	3	3	5	4	5	7	8	4	20↑	20↑	4	13	18	15			
2	S0634	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	11	12	11	ST25/19	2022	施設内感染疑い (患者⇒看護師⇒患者)
	S0687	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	10	8	4	11	12	11		* S0687は2014年にnBjに感染歴あり 今回、ST25/19型に再感染	
3	S0057	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8	ST25/19	2013	家族内感染(夫婦間) 職場内感染疑い
	S0090	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	12	8			
	S0694	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	10	5	4	15	15	8			
4	S0430	4	3	7	3	5	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	14	14	9	Modern	2018	施設内感染疑い (入所者⇒職員)
	S0718	4	3	7	3	5	3	7	4	5	7	8	3	8	8	4	14	14	9			

3 再感染事例について

医療機関併設型の介護医療院における再感染事例(No.2)について示す(図1)。当該施設で勤務する看護師Cが2022年1月に発症した後、入所者Aが2023年4月に発症した。両名ともST25/19型でVNTRプロファイルは完全に一致したが、看護師Cと入所者Aは、感染性期間において接触歴がまったくなかったことから、双方とも結核と診断されない別の入所者から感染した可能性が高いと考えられた。入所者Aについては、2014年8月に非北京型株への感染履歴があり、同時期に同じ施設にいた入所者Bも非北京型株に感染していた。この両名の接触歴は不明であるが、VNTRプロファイルが超可変領域1領域(VNTR3820)違いで類似しており感染の可能性が考えられた。入所者Aについては再燃を疑っていたが、異なる遺伝子型の結核菌による再感染であることが判明した。

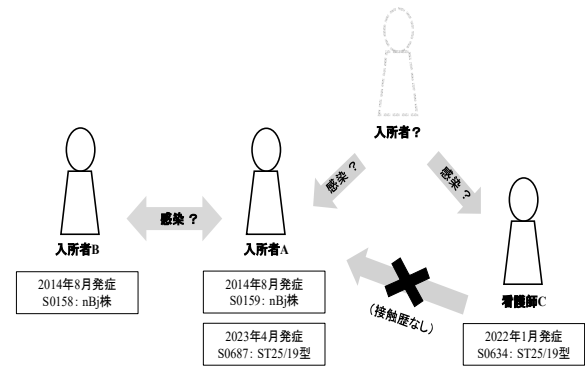


図1 再感染事例について

さらに、これまで高齢者は再燃が多く、再感染事例は少ないと考えられていたが、VNTR法による分子疫学解析により再感染事例が明らかとなった。

最後に、本報告による分子疫学解析事例を通して、これまでの実地疫学だけでは推定の域を出なかった感染経路の証明、未知の感染経路の発見、再燃・再感染の鑑別および散发事例の確認がある程度可能となった。このように分子疫学解析による事例検討を進めることで、保健所は接触者健診の適正な範囲を選択し、重点的に取り組むべき対策を明確にする根拠になり得ると思われる。

謝辞

本事業を遂行するにあたり、疫学情報、解析データおよび菌株の提供等にご協力いただきました県地域保健推進課、各保健所、長崎市保健環境試験所並びに協力医療機関の関係諸氏にお礼を申し上げます。

参考文献

1) 厚生労働省: 結核に関する特定感染症予防指針

- の一部改正について(平成28年11月25日)
- 2) 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター<http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/> (2024.6.5アクセス)
  - 3) 長崎県：長崎県の結核（2023）：<https://www.pref.nagasaki.jp/shared/uploads/2024/02/1708913907.pdf> (2024.6.5アクセス)
  - 4) 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)
  - 5) 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**, 755-759(2009)
  - 6) Iwamoto T et al.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family, *FEMS Microbiol., Lett.*, **270**, 67-74(2007)
  - 7) Seto J. et al.: Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation, *Infect. Genet. Evol.*, **35**, 82-88(2015)
  - 8) 岩本朋忠：世界的感染拡大傾向が危惧される結核菌北京型株, 複十字, **329**(2009)
  - 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**, 755-759(2009)
  - 10) 右田 雄二, 他：長崎県における結核菌の分子疫学解析(2012～2019), 長崎県環境保健研究センター所報, **65**, 53～59(2019)