

平成29年度（第12回）秋田県健康環境センター研究発表会抄録

秋田県結核菌分子疫学調査事業（平成25年度～）

秋田県内で分離された結核菌株のVNTR法を用いた分子疫学解析

高橋志保 熊谷優子 今野貴之 鈴木純恵 鈴木忠之

1. はじめに

結核は、新登録患者数は漸減しているものの、年間約2万人の患者が発生しており、今なお国内最大の感染症である。結核統計を見ると、平成27年の日本の結核罹患率は人口10万人当たり14.4であり、欧米諸国と比較すると依然として高く、中まんに延国であるといえる。

患者から分離された結核菌株の分子疫学解析を行うことは、疫学調査から得られた情報に菌株そのものの遺伝子型という科学的根拠を付与し、感染源や伝播経路の推定に役立てることが可能となる。また、データを蓄積することにより、県内における流行状況の把握につながる。

秋田県では、平成25年7月より実施された秋田県結核菌分子疫学調査事業に基づき、各保健所管内で登録された結核患者から分離された結核菌株について、結核菌遺伝子中の反復配列多型（Variable number of tandem repeat : VNTR）解析を行ってきたので、その結果と、最大事後確率推定法を用いた遺伝系統解析結果を併せて報告する。また、現在実施しているVNTR解析法は、結核菌遺伝子中の12領域を解析しているが、結果が一致しても、関連性を解明するには至らないことが多い。そこで、これらの菌株を識別することを目的に、VNTR解析領域を追加して検討を行ったので、その結果も報告する。

2. 対象および方法

2.1 対象

平成25年以降に秋田県各保健所管内で登録された結核患者から分離され、平成25年7月から平成29年3月までに受領した結核菌株222株。

2.2 方法

2.2.1 結核菌DNAの抽出

QIAamp DNA Microを用いて、DNAテンプレートを作製した。

2.2.2 VNTR解析

前田ら（2008）が報告したJapan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR分析法に従った。VNTRプロファイルが一致した場合は、JATA (12)-VNTRに3領域を追加したJATA (15)-VNTR解析と、超可変

（Hypervariable : HV）領域の解析を行った。

2.2.3 最大事後確率推定法による遺伝系統解析

Seto, et al. (2015)の方法に従い、VNTRプロファイルから遺伝系統を推定した。

2.2.4 クラスタ分析

プロファイルが全領域一致した菌株同士を同一クラスタとし、JATA(12)、JATA(15)、JATA(15)+HV領域それぞれでのクラスタ形成率を比較した。

3. 結果と考察

222株中でVNTRプロファイルが一致したのは、JATA(12)-VNTR法では58株23組（5株2組、4株1組、3株4組、2株16組）であった。また、最大事後確率推定法による遺伝系統解析の結果から、北京型が150株（67.6%）、非北京型が72株（32.4%）であった（表1）。北京型株を系統分類すると、新興型が27株（18.0%）、祖先型が123株（82.0%）であり、祖先型はさらに4つの遺伝系統に分類され、ST3、ST25/19、STK、ST11/26の順に多かった（表2）。

北京型株は東アジアで多く分離される系統で、他の遺伝系統と比べて感染伝播力が高く、薬剤耐性との関連性もあり、高病原性が示唆されている。国内で分離される株の7～8割がこの遺伝系統に属しているとされ、秋田県内の分離株はやや非北京型が多いものの、ほぼ同様の傾向であった。また、遺伝子型についても、東アジアの他国とは異なり国内では北京型株の8割を祖先型が占める、という傾向も同様であった。祖先型のうち、県内で最も多く分離されているST3は、多剤耐性結核になりやすいという報告もあり、今後の分離状況や医療機関における薬剤感受性試験の結果等にも注視していく必要がある。

次に、解析領域の追加によるクラスタ形成率の比較を行った。JATA(15)-VNTR法では44株18組（4株2組、3株4組、2株12組）、JATA(15)-VNTR+HV法では22株10組（4株1組、2株9組）であった。解析する領域を追加することでクラスタ形成率が減少し、識別能が高くなった。さらに、遺伝系統ごとの各VNTR法のクラスタ形成率を比較すると、北京型は28.0%から6.7%に大きく減少したが、非北京

型のクラスター形成率はJATA(15)-VNTR法ではまったく変わらず、HV領域での違いのみで、それほど減少しなかった(表3)。

今回の解析から、JATA(12)-VNTR法で一致するプロファイルが得られた場合には、解析領域を追加することで、関連性の有無を推定するのに役立つデータが得られることがわかった。結核統計によると、平成27年の秋田県の結核罹患率は8.5と低まん延の状態にあるが、高齢化が進んでいる本県では、新登録結核患者中65歳以上が占める割合は80.5%と高い。高齢者の場合、過去に受けた感染が内因性再燃により発症することもあるため、患者の発生は今後も継続することが想定される。その際、早期の受診や診

断のほか、分離された菌株の分子疫学解析を実施することで迅速に関連性を見いだすことが、新たな患者の発生を抑えることにつながると考える。

今後は、JATA(15)+HV法でクラスターを形成した株については、本データを科学的根拠として還元し、疫学調査に活用してもらいたい。また、管轄する保健所の結核担当者とも連携し、可能な範囲でさらなる調査を行い、感染経路の解明につなげていきたい。

表1 北京型・非北京型の割合

遺伝子型	北京型	非北京型
株数	150	72
(%)	67.6	32.4

表2 北京型株の系統分類

遺伝子型別	新興型	祖先型			
	Modern	ST11/26	STK	ST3	ST25/19
株数	27	8	33	45	37
(%)	18.0	5.3	22.0	30.0	24.7

表3 各VNTR法によるクラスター形成率

VNTR法	計(n=222)			非北京型(n=72)			北京型(n=150)		
	クラスター数	クラスター形成株数	クラスター形成率(%)	クラスター数	クラスター形成株数	クラスター形成率(%)	クラスター数	クラスター形成株数	クラスター形成率(%)
JATA(12)	23	58	26.1	6	16	22.2	17	42	28.0
JATA(15)	18	44	19.8	6	16	22.2	12	28	18.7
JATA(15)+HV	10	22	9.9	5	12	16.7	5	10	6.7

4. まとめ

- ・秋田県内における結核菌株は、北京型が67.6%、非北京型が32.4%であった。
- ・北京型のうち、祖先型が8割を占め、多剤耐性化しやすいST3型の分離頻度が高かった。
- ・解析領域を追加することで識別能が高くなった。この解析結果の活用、疫学調査の実施により、感染経路等の解明につなげたい。