

短報

神奈川県において分離された結核菌のVNTR法による遺伝子型別について (2008-2011)

高橋智恵子¹, 近内美乃里², 古川一郎¹, 浅井良夫¹,
大屋日登美¹, 黒木俊郎^{1*}, 古屋由美子¹

Genotyping by variable numbers of tandem repeats (VNTR) analysis for *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Kanagawa from September, 2008 to February, 2011

Chieko TAKAHASHI, Minori KONNAI, Ichiro FURUKAWA, Yoshio ASAI, Hitomi OHYA,
Toshiro KUROKI and Yumiko FURUYA

緒言

全世界の人口の3分の1が結核に感染していると言われ、2008年におけるWHOの推定によれば940万人が発症し、130万人が死亡している。日本における2009年の結核の統計¹⁾では、24,170人が発症し、2,155人が死亡しており、罹患率（人口10万人当たり）は19.0となっている。罹患率からみた我が国の結核は、統計が確立された1961年の高蔓延期（罹患率：445.9）から1980年代以降の中蔓延期（罹患率：50）へと移行して順調に低下したものの、低下が鈍化し、現在も先進諸国の3～5倍の罹患率を示し、中蔓延状況が続いている。このような状況の中で、国はもとより、各地方自治体においても、保健予防担当所管課、保健所および地方衛生研究所等において、現状に沿ったより効果的な結核対策の実施が求められているところである。

最近の法的な結核対策としては、2008年に従来の結核予防法が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（感染症法）へ統合されたことにより、より効果的に推進するための法的背景が整備された。また、

¹神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087茅ヶ崎市下町屋1-3-1
Chieko.vvme@pref.kanagawa.jp
^{1*}神奈川県衛生研究所 現企画情報部
²神奈川県衛生研究所 企画情報部

この法律に基づく結核の接触者健康診断の手引き（改訂第4版2010年）においては、積極的な結核感染経路の解明が奨励されており、その手段として、restriction fragment length polymorphism (RFLP)法やvariable numbers of tandem repeats (VNTR)法による結核菌分離株の分子疫学的解析を実施すべきことが明記されている。

今回、著者らは、神奈川県（以下、県域と略す）における集団感染疑い事例や散発事例において分離された結核菌株を収集し、VNTR法による結核菌の遺伝子型別を実施し、さらに分子疫学的解析（Minimum spanning trees；MST）を試みたので報告する。

材料と方法

(1) 散発事例から菌株を収集するシステムの構築

結核菌株収集については、各保健福祉事務所の保健予防課、関係医療機関および県健康危機管理課と連携を図りながら結核菌株収集のシステムを構築した。菌株の使用については患者から書面による同意を得ることとし、倫理審査委員会の承認を受けた。

県域における2009年の結核新規登録患者は584名であり、これらの患者から分離された全結核菌株の遺伝子型別検査を行うことは困難であるため、収集する菌株には一定の条件を付けた。最近の感染による発症例の動向を探るために、既感染率の低い50歳以下とし、その上で、初回治療患者に絞ることにより、再感染例を除外した。また、塗抹陽性患者からの分離株とすることで、感染を広く伝播させると予測される株に絞った。つまり、このシステムにおいて収集する菌株は、県域の結核登録患者のうち初回治療、塗抹陽性、50歳以下に該当する菌株とした。この条件を満たすのは年間100株程度と推定されたが、菌株収集システムを構築するために日数を要したことから、実際にこのシステムで収集した菌株は、6株に留まった。

(2) 供試菌株

システムにより収集した6株のほかに、2008年9月から2011年2月までに保健福祉事務所から遺伝子型別検査を依頼された結核菌（集団感染疑い事例を含む）30株および対照株として2株（標準株37Ra、首都圏を中心に流行している通称M株²⁾）の計38株を用いた。

(3) VNTR法による遺伝子型別と型別結果の解析

結核菌からのDNA抽出はインスタジーンマトリックス（Bio-Rad）を用いた。結核菌DNA上の遺伝子解析部位は、前田ら³⁾の報告した12か所（JATA 12）、即ち、Mtub 04, MIRU 10, Mtub 21, Mtub 24, QUB 11 b, VNTR 2372, MIRU 26, QUB 15, ETR-E, VNTR

を示す株である²⁾。また、医療機関からの情報ではSM単剤耐性の株は図に示したNo.372, 373, 374, 376, 397の5株で、1株(No.373)を除いては比較的M株に近いところに位置していた。また、システムにより収集した6株(No.387, 388, 389, 390, 397, 398)の内、1株(No.388)を除いてはM株の周辺に位置しており、遺伝子型のパターンがM株に類似していることから、近年の流行遺伝子型と推察できた。特に、No.389, 397, 398の3株のそれぞれが係わる感染事例は、管轄保健福祉事務所が異なり患者の居住地が離れていることなど、疫学上の共通点も見られなかったにもかかわらず、遺伝子型は完全に一致していた。これら3株の提供患者の年齢は20代、30代、50代と異なっており、50歳以下は結核既感染率が低いこと、社会的な活動範囲が広いことなどから、この遺伝子型の結核菌が現在蔓延している可能性があり、今後の動向を注視する必要があると考えられた。

また、SM耐性株のNo.372および374は同じ保健福祉事務所依頼の菌株であったが、感染源患者情報および保健福祉事務所結核担当者からの情報においては疫学上の共通点は見られなかった。No.374は20代の患者からの分離株で、患者は都内にある学校に通学しており、当該患者を感染源患者とした接触者健診において14名にQFT検査を実施したところ、陽性が1名、判定保留が2名との結果であり、周囲に感染を広めていたことが示唆され、さらに、他へ伝播する可能性も考えられた。

これらのように、これまで疫学的関連が把握できなかった結核菌が、分子疫学的解析により関連性を推測できるようになった。No.372および374の株は流行株のひとつと考えられ、多発性大規模感染⁴⁾の可能性も視野に入れて結核対策を実施する必要があると思われる。

一方、疫学的に関連が濃厚であった院内感染事例の分離菌株(No.367, 368, 369)および老人ホーム感染事例の分離菌株(No.383, 384, 391, 399)は、いずれも集団感染疑い例で、各事例で分離された結核菌の遺伝子型がそれぞれにおいて同一型を示したことより、集団感染として厚生労働省に報告された。MSTにおいてM株を含む近年の流行株と考えられる株らからはやや距離を置いてクラスターを形成した。老人ホーム事例の初発患者は88歳と高齢であることから、若い頃に感染を受け、最近になって発症した再燃例と推察された。その初発患者から排出された菌の感染力が強く、施設内に感染を伝播させた可能性があり、老人ホームのような施設においては、過去の病歴の把握も必要と考える。この事例における接触者健診として、当所で57名についてQFT検査を実施した結果、陽性が16名、判定保留が10名であった。その後も、陽性者の中から発症者が3名も出現して

いることから、今後も継続的な経過観察が必要であると考えられた。

No.365および385は、外国籍(中国・フィリピン)の患者由来で、これら2株は38株のMSTの末端に位置したことより、患者が母国で感染した後、日本で発症した可能性も考えられる。今後は、中国、フィリピンの流行株を加えて解析していきたい。

当所において、VNTR法を導入し始めた当時は、結核菌DNA上の解析部位をMIRUの12か所とETRの4か所とし、必要に応じて解析部位を追加(7か所)して合計23か所で実施してきた^{5,6)}が、今回はそれらと6か所の共通解析部位をもつJATA12を使用した。JATA12は、国内分離株を広く集めて検討され、特に集団感染事例における菌株の遺伝学的異同を判定する際に高い信頼性が報告されている³⁾。Supplyら⁷⁾のVNTR法(15か所)は国際標準法として認識されつつあるが、国内株の解析についてはクラスター率が高く出るため、日本ではJATA12の方が有用である。しかしながら、JATA12のみで解析すると、地域によってはクラスター率が高くなることが示唆されており⁸⁾、解析部位を追加することにより広域的な結核の伝播や監視の調査に用いることが提案されている。

今後、県内の自治体が連携をして広域的な分子疫学調査への取り組みを進めるためには、これらの問題を認識した上で、解析部位の統一を含めたVNTR法の標準化が必要であり、それに向けた今後の検討が必要である。

結核におけるVNTR法などの分子疫学は、実地疫学により感染拡大を防いできた時代から科学的・実証的な分析を進めることを可能にした。さらに、VNTR法は迅速かつ簡便で、結果を数値化できることから、現在、国内各自自治体の保健所等においても、結核対策に利用されつつある。迅速な結果は、接触者健診などを効率化することが可能となるとともに、自治体間が連携して取り組むことで、結核の広域的な疫学的解明をも可能にすることが期待できる。

今回、VNTR解析結果を保健福祉事務所および健康危機管理課等へフィードバックし、保健福祉事務所で保有する患者情報と当所の遺伝子型別解析結果を共有するために報告会を開催した。このことにより、現在の流行株の把握、感染経路・感染源の解明および患者管理に役立つと考えられた。今後は、速やかに結果を保健福祉事務所等へ戻すとともに、継続して菌株の収集・解析を進めていくことが重要と思われた。

今後の取り組みとして、集積した結核菌株の遺伝子型別データで、県域のデータベース化を図る必要がある。データベースは県庁LANを使用し、保健福祉事務所お

よび健康危機管理課においても活用できるように今後検討を進める予定である。さらに、県域に止まらず生活圏を共用している周辺地域（横浜市、川崎市、横須賀市、相模原市、藤沢市）との情報交換を可能にすることにより、県全体の結核対策につなげていきたい。

謝 辞

最後になりましたが、本研究を進めるに当たり、結核菌株収集にご協力いただきました各保健福祉事務所保健予防課、関係医療機関および県健康危機管理課の皆様へ深謝します。

本研究は、地域保健推進特別事業および財団法人公衆衛生振興会特別研究助成により実施されたものである。

(平成23年8月5日受理)

参考文献

- 1) 結核予防会結核研究所疫学情報センター：結核の統計,
〈<http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/toukei/adddata/>〉
- 2) Ohkado, A., Y. Murase, M. Mori, N. Hasegawa, G. Otsuka and M. Nagamine : Transmission of specific genotype streptomycin resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in the Tokyo metropolitan area in Japan, *BMC Infect. Dis.*, **138**, 1-9 (2009)
- 3) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原 勇, 加藤誠也 : 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**, 673-378 (2008)
- 4) 岩本朋忠, 藤山理世, 白井千香, 前田信司, 松本智成, 和田崇之, 他 : 分子疫学情報の蓄積から示唆される多発性大規模感染事例の存在とその検証, *結核*, **85**, 411 (2010)
- 5) 高橋智恵子, 富岡敏昭, 綿貫祐司, 西森 敬, 岡崎則男 : VNTR法を利用した結核菌の遺伝子型別, *神奈川衛研報告*, **36**, 4-7 (2006)
- 6) 高橋智恵子, 近内美乃里, 大屋日登美, 渡辺祐子, 岡崎則男 : 結核集団感染事例におけるクオンティフェロンTB-2Gと結核分離菌株の遺伝子型別, *神奈川衛研報告*, **39**, 1-3 (2009)
- 7) Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rüsch-Gerdes, E. Willery *et al* : Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4498-4510 (2006)
- 8) 和田崇之, 長谷 篤 : 結核菌の縦列反復配列多型 (VNTR) 解析に基づく分子疫学とその展望, *結核*, **85**, 845-852 (2010)