

香川県内で分離された結核菌の分子疫学(VNTR)調査(2022-2023)と 5年間のVNTR解析のまとめ(2019-2023)

Molecular epidemiology investigation (VNTR) of *Mycobacterium tuberculosis* detected in Kagawa Prefecture (2022-2023) and summary of 5-year VNTR analysis (2019-2023)

目黒 響子 多田 郁美* 岩下 陽子 関 和美** 福田 千恵美
Kyoko MEGURO Ikumi TADA Yoko IWASHITA Kazumi SEKI Chiemi FUKUDA

要 旨

2022年1月から2023年12月の間に香川県内で分離され、当センターに搬入された結核菌株33株の反復配列多型(Variable Number of Tandem Repeat : VNTR)解析を行った。DNAを抽出し、JATA(12)-VNTRでPCRを実施し、アガロースゲル電気泳動法により反復数の算出を行った。VNTR解析結果よりJATA12領域で反復数に一致もしくは1ローカス違いが見られた6株についてはJATA(15)-VNTR、HV領域、国際標準領域を追加して24領域で解析を行ったが、24領域が一致する株はなかった。

2019年から2023年の遺伝子系統推定について、北京型と非北京型の分離比率は2019年に北京型が78.9%であったが、2023年には58.8%となり20.1%減少した。北京型のうち新興型の分離比率は2020年から2023年まで20%程度で推移していた。年齢別遺伝子系統推定結果からは、70代以上の高齢者は北京型のうち祖先型の比率が高く、20代は非北京型の比率が高かった。諸外国で高い比率を占めるとされる新興型の増加は見られなかったが、新登録結核患者に占める外国出生者の割合は増加傾向にあり、今後も県内の動向を把握していく必要がある。

Abstract

Between January 2022 and December 2023, we performed variable number tandem repeat (VNTR) analysis on 33 instances of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Kagawa Prefecture and delivered to our center. DNA was extracted, PCR was performed with JATA(12)-VNTR, and the number of repeats was calculated by agarose gel electrophoresis. For six strains in which the number of repeats matched or differed by one locus in the JATA12 region, analysis was performed in 24 regions, adding JATA(15)-VNTR, HV region, and international standard region, but no strains matched in all 24 regions.

Regarding genetic lineage estimates from 2019 to 2023, the isolate percentage of the Beijing genotype was 78.9% in 2019, and decreased 20.1% to 58.8% by 2023. The isolate percentage of new strains within the Beijing genotype shifted to around 20% from 2020 to 2023. Separating results by age showed that the proportion of older strains of the Beijing genotype was higher in people aged 70 and over, while the proportion of non-Beijing strains was higher in people in their 20s. There was no observable increase in the proportion of new strains, which account for a high proportion in various other countries, but the proportion of new tuberculosis patients who were born overseas is increasing, and it is necessary to continue to monitor trends.

キーワード : 結核菌 VNTR 解析 北京型 祖先型 新興型

* 香川県立中央病院中央検査部

** 退職

I はじめに

結核は、結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex ただし *Mycobacterium bovis* BCG を除く) による感染症であり、感染症法における届出対象疾患の二類に分類され、診断後ただちに届出なければならない全数報告の疾患である¹⁾。我が国では、2023 年の結核罹患率 (人口 10 万対) は 8.1 であり、前年と比べ 0.1 ポイント減少している²⁾。結核罹患率が 10 未満は低まん延国、10 ~99 は中まん延国、100 以上は高まん延国とされ、我が国は 2021 年より低まん延国となった。

香川県では、平成 31 年 4 月 1 日より施行された香川県結核菌分子疫学的調査事業実施要領³⁾に基づき、感染源・感染経路等の究明と、結核の発生予防並びに感染拡大防止対策の資料とすることを目的とし、結核患者から分離された結核菌について反復配列多型 (Variable Number of Tandem Repeat : VNTR) 解析を実施している。

今回、2022 年 1 月から 2023 年 12 月の間に当センターに搬入された結核菌株の VNTR 解析を行った。また、VNTR 解析を開始した 2019 年から 2023 年の 5 年間の VNTR 解析のまとめを行ったので、その結果を報告する。

II 方法

1 試供菌株

2022 年 1 月から 2023 年 12 月の間に香川県内で分離され、当センターに搬入された結核菌株 33 株 (2022 年 16 株、2023 年 17 株) を VNTR 解析対象とした。

5 年間の VNTR 解析まとめには、2019 年 1 月から 2023 年 12 月の間に香川県内で分離され、当センターに搬入された結核菌株 105 株 (2019 年 19 株、2020 年 36 株、2021 年 17 株、2022 年 16 株、2023 年 17 株) を対象とした。

2 検査方法

(1) VNTR 解析及びクラスター解析

結核菌 VNTR ハンドブック⁴⁾に準じて行った。

① 結核菌株からの DNA 鋳型の抽出

菌体を 500 μ L の蒸留水に懸濁して、95°C、10 分加熱し、遠心後上清を DNA 鋳型とした。

② JATA (12)-VNTR における PCR

③ アガロースゲル電気泳動による反復数の算出

泳動により得られた増幅産物サイズ (bp) を、反復数換算表と照らし合わせ反復数を算出した。

④ 24 領域における PCR

JATA (12)-VNTR で反復数の一致が見られた株について追加で実施した。

(2) 遺伝系統の推定

得られた VNTR 反復数データを用いて、最大事後確率推定法による結核菌遺伝系統推定プログラム⁵⁾により遺伝系統を推定した。

III 結果

1 VNTR 解析

今回対象とした 33 株中、JATA12 領域で一致した株が 2 株ずつ 2 組、1 ローカス違いの株が 2 株あった。また、JATA12 領域での反復数が一致した株および 1 ローカス違いの株計 6 株について、24 領域で反復数が一致した株はなかった。

2 遺伝子系統推定

2022 年においては北京型が 56.3 % (9 株)、非北京型が 43.8 % (7 株)、2023 年においては北京型が 58.8 % (10 株)、非北京型が 41.2 % (7 株) であった。

北京型はさらに祖先型と新興型に分類され、北京型のうち 2022 年は祖先型が 77.8 % (7 株)、新興型が 22.2 % (2 株) で 2023 年は祖先型が 80.0 % (8 株)、新興型が 20.0 % (2 株) であった。

2022 年と 2023 年の年齢分布を表 1 に示す。北京型の平均年齢は 2022 年 82.9 歳、2023 年 64.1 歳であり、非北京型の平均年齢は 2022 年 58.4 歳、2023 年 48.6 歳であった。北京型のうち、祖先型の平均年齢は 2022 年 85.3 歳、2023 年 72.8 歳であり、新興型は 2022 年 80.5 歳、2023 年 55.5 歳であった。

結核菌遺伝系統推定プログラムでは、祖先型はさらに 4 つの遺伝子型 (ST3, STK, ST25/19, ST11/26) に分類が可能である。2022 年と 2023 年の分類の結果を表 2 に示す。

表1 年齢分布

2022年		20代	30代	40代	50代	60代	70代	80代	90代	計	平均	
北京型	祖先型						1	5	1	7	85.3	82.9
	新興型						1	1		2	80.5	
非北京型		2		1		1		3		7	58.4	

2023年		20代	30代	40代	50代	60代	70代	80代	90代	計	平均	
北京型	祖先型	1	1				1	2	3	8	72.8	64.1
	新興型	1						1		2	55.5	
非北京型		4					2	1		7	48.6	

表2 祖先型の遺伝子型別

2022年		20代	30代	40代	50代	60代	70代	80代	90代	計
北京型 (祖先型)	ST3						1	1		2
	STK							1		1
	ST25/19							3	1	4
	ST11/26									0

2023年		20代	30代	40代	50代	60代	70代	80代	90代	計
北京型 (祖先型)	ST3						1	1	1	3
	STK								1	1
	ST25/19	1						1	1	3
	ST11/26		1							1

3 5年間のまとめ

(1) 北京型と非北京型の分離比率の推移

過去に報告した2019年から今回報告した2023年までの北京型と非北京型の分離比率を示す。(図1) 2019年は北京型が78.9%、非北京型が21.1%であったが、2023年は北京型が58.8%、非北京型が41.2%であり、北京型が約20.1%減少した。

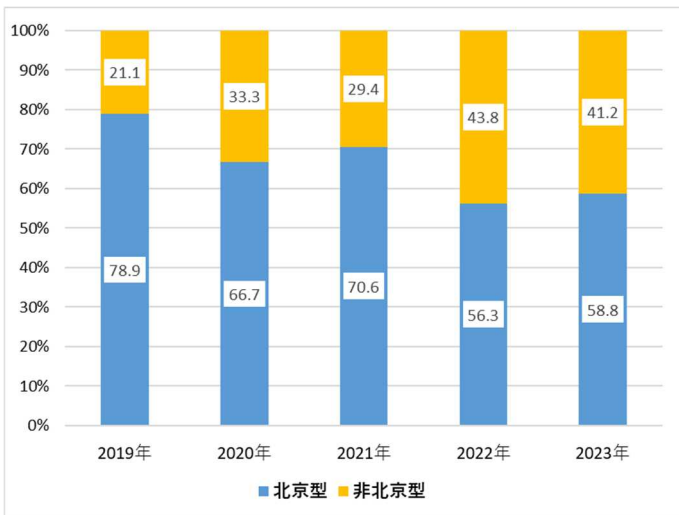


図1 北京型と非北京型の分離比率推移

(2) 祖先型と新興型の分離比率の推移

(1)と同様に5年間の祖先型と新興型の分離比率を示す。(図2) 2019年は祖先型が93.3%、新興型が6.7%であったが、2023年は祖先型が80.0%、新興型が20.0%であった。

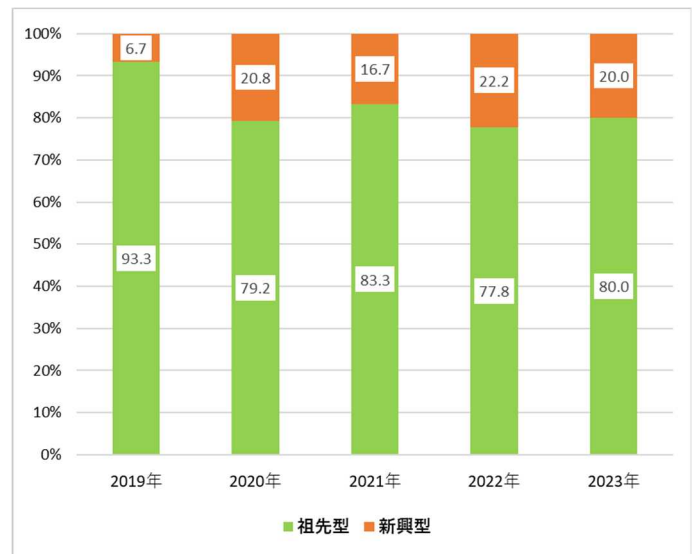


図2 祖先型と新興型の分離比率推移

(3) 年齢別遺伝子系統推定

5 年間に搬入された菌株の年齢別遺伝子系統推定結果を示す(図 3)。

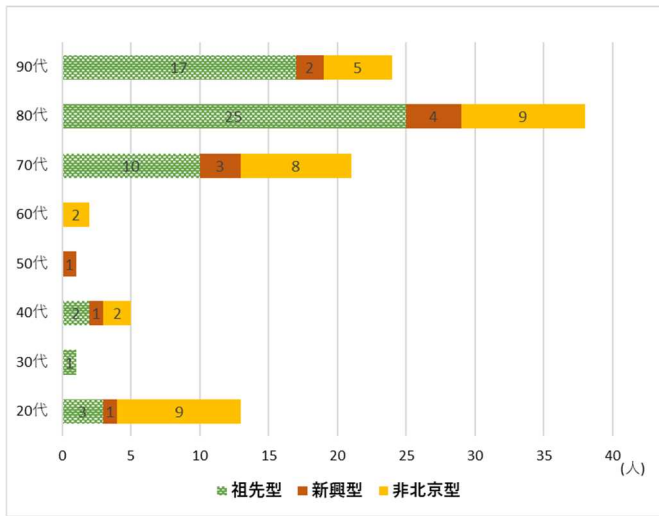


図 3 2019 年～2023 年 年齢別遺伝子系統推定結果

また、遺伝子系統推定における祖先型の年齢別推移、非北京型の年齢別推移を示す(図 4、図 5)。新興型については、各年における菌株数が少なかったため省略する。

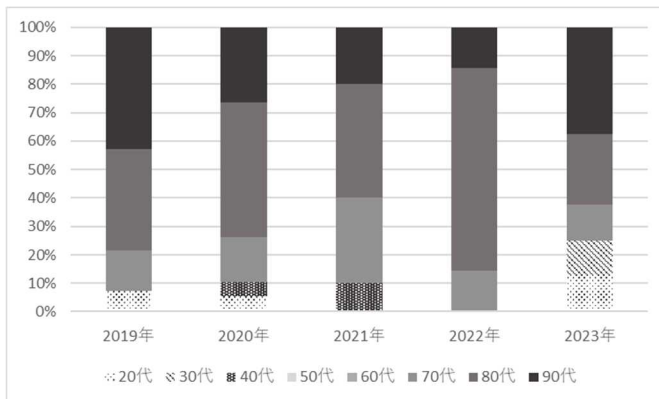


図 4 遺伝子系統推定における祖先型の年齢別推移

IV 考察

1 VNTR 解析

VNTR 解析結果により 2022 年と 2023 年に県内で分離された 33 株のうち JATA12 領域で一致した株は 2 株ずつ 2 組、1 ローカス違いの株が 2 株あったが、24 領域の追加解析を行った結果、24 領域で一致した株はみられなかった。2022 年と 2023 年の結果からは、県内でクラスターの発生は確認できなかった。

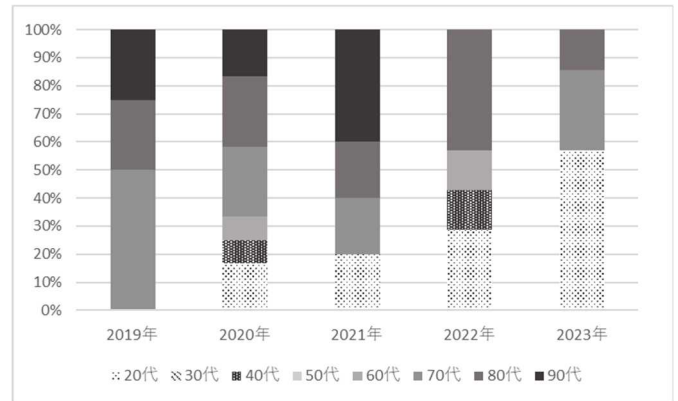


図 5 遺伝子系統推定における非北京型の年齢別推移

2 遺伝子系統推定

北京型の分離比率について、2022 年は 56.3%、2023 年においては北京型が 58.8%であり、この 2 年間は約 6 割の比率で推移していた。また、北京型をさらに祖先型と新興型に分類した結果、祖先型は 2022 年が 77.8%、2023 年は 80.0%と約 8 割で推移していた。

2022 年に比べ、2023 年は北京型の祖先型、新興型、非北京型すべての平均年齢が減少した。2023 年は祖先型、新興型、非北京型ともに 20 代、30 代の人数が増加したことが要因と推測される。

祖先型をさらに 4 つの遺伝子型に分類した結果、2022 年と 2023 年においては、ST3 群、ST25/19 群が多い結果となった。また、ST3 と STK は高齢者からの分離頻度が高いとされており⁶⁾、2022 年と 2023 年においてもすべての株が 70 代以上の患者から分離されていた。これらは過去の感染の再燃である可能性が推察された。

3 5 年間のまとめ

(1) 北京型と非北京型

北京型株は、他の遺伝子系統と比べて、感染伝播力が強い、薬剤耐性と関連性が高い、発病・再発を引き起こしやすい、BCG 接種による免疫の影響を受けにくいとされている⁷⁾。2019 年は北京型が 78.9%と約 8 割であり、2020 年と 2021 年はそれぞれ 66.7%、70.6%と約 7 割に減少し、2022 年、2023 年はそれぞれ 56.3%、58.8%と約 6 割にまで分離比率が減少した。

(2) 祖先型と新興型

北京型はさらに祖先型と新興型に分類され、国内の分離比率は祖先型 81.7%、新興型 18.3%という報告があり⁷⁾、香川県の 2019 年の新興型の分離比率は 6.7%と全国より

やや少ない結果であったが、2020年から2023年は全国の報告と同様の分離比率が続いていた。国内の分離比率とは違い、世界的に多く分離されているのは新興型で、新興型は感染伝播・発病において祖先型よりも優れているとされている⁷⁾。外国出生者の増加に伴い、新興型の分離比率が増加するものと予想していたが、2019年から2023年の5年間ではその傾向は見られなかった。

(3) 年齢別遺伝子系統推定

2019年～2023年の年齢別遺伝子系統推定結果から、結核患者は80代、90代、70代の順に多く、次いで20代に多かった。2023年結核登録者情報調査年報集計結果²⁾の年齢階級別新登録結核患者数によると、全国においても70歳～90歳以上が多く、香川県も同様の傾向であった。また、30代、40代に比べ20代の結核患者が多いという点も、全国、香川県ともに共通していた。香川県の20代の患者は多くが外国出生者で、技能実習生や海外からの学生等の増加が20代の結核患者の増加に影響していることが考えられた。また、非北京型は20代の分離比率が他の年齢に比べて高いことが分かるが、遺伝子系統推定における非北京型の年齢別推移からも20代の患者の割合が年々増加していることが分かる。この20代の結核患者をはじめ60代以下の患者の増加が非北京型の増加に影響していると推察された。

外国生まれの新登録結核患者数の割合は年々増加傾向にあり、2023年は新登録者数の16.0%を占めている²⁾。特に20歳～29歳における新登録結核患者のうち、84.8%が外国生まれの新登録結核患者であり、集団感染を起こしやすいとされる新興型が増加する可能性も否定できないことから、今後も県内の動向を把握し、感染源・感染経路の究明やその拡大防止につなげていく必要があると考えている。

V まとめ

2022年、2023年に当センターに搬入された結核菌株のVNTR解析を行ったところ、クラスターの発生は確認されなかった。2023年は結核患者の平均年齢が低下したが、20代の患者の増加が原因と推察された。

2019年から2023年のVNTR解析結果を分析したとこ

ろ、北京型の分離比率が2019年の約8割から2023年には約6割に減少していた。増加した20代の患者は非北京型の分離比率が高いことが影響したと考えられた。集団感染を起こしやすい特徴のある新興型については、分離比率の増加が予想されたが、2023年までの時点では全国と同様であった。新登録結核患者に占める外国生まれの者の割合は増加傾向にあり、今後も県内の動向を把握し、感染拡大防止につなげていきたい。

謝辞

TB MAP estimation (遺伝子系統推定マクロ)をご提供いただきました山形県衛生研究所微生物部 瀬戸順次先生に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) 結核予防会結核研究所:結核分子疫学調査の手引き 第一版,2017年7月
- 2) 厚生労働省:2023年 結核登録者情報調査年報集計結果について, <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001295037.pdf> (2024/9/6 閲覧)
- 3) 薬務感染症対策課長:「香川県結核菌分子疫学的調査事業実施要領の制定について」(平成31年3月7日,30薬感第61533-3号)
- 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:結核菌 VNTR ハンドブック 第一版,(2012年10月)
- 5) 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)
- 6) 瀬戸順次, 鈴木裕, 和田崇之, 阿彦忠之:結核菌反復配列多型分析結果と遺伝子系統情報の組み合わせによる新たな分子疫学情報の提供, 山形衛生研究所報, No50, 15, (2017)
- 7) 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子系統群の存在と遺伝子系統別薬剤耐性化傾向の違い, 結核 84 (12), 755-759, (2009)