

埼玉県における結核菌分子疫学解析（令和 5 年度）

伊藤由加里 石井明日菜^{*1} 榎本雄太 中川佳子 吉澤和希^{*2} 近真理奈 福島浩一

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Saitama prefecture (2023. 4-2024. 3)

Yukari Ito, Asuna Ishii, Yuta Enomoto, Keiko Nakagawa, Kazuki Yoshizawa, Marina Kon and Hirokazu Fukushima

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、感染症法における二類感染症に分類され、診断後ただちに届け出なければならない全数報告の疾患である。日本における 2022 年の結核罹患率 (人口 10 万対) は、8.2 であり、前年と比べ 1.0 減少し、2 年連続で結核低まん延国であった¹⁾。日本の結核罹患率は、米国等他の先進国の水準に年々近づき、近隣アジア諸国に比べても低い水準にある。

結核に関する特定感染症予防指針²⁾ においては、都道府県等は結核菌が分離された全ての結核患者について、結核菌を収集するよう努め、分子疫学的手法からなる病原体サーベイランスの構築に努める必要があるとしている。埼玉県衛生研究所 (以下、当所) では、平成 28 年 4 月から、埼玉県結核菌分子疫学調査実施要領³⁾ に基づき、県内で発生した患者から分離された結核菌株について、反復配列多型分析 (Variable numbers of tandem repeats: 以下 VNTR) 法による遺伝子型別を実施している。本調査の目的は、集団感染における共通感染源の究明、並びに、県内の結核患者菌株のデータベースを作成し、長期間及び広域的な伝播経路を推定する科学的根拠を保健所等に提供することである。今回は、令和 5 年度の結核分子疫学調査について報告する。

対象及び方法

1 対象

対象は、令和 5 年 4 月から令和 6 年 3 月までに当所に搬入された県内 (さいたま市を除く) 発生患者由来結核菌株 191 株のうち、検体不良のため検査不能であった 2 株を除く 189 株とした。

2 検査方法

(1) DNA の抽出: DNA 抽出物は、滅菌蒸留水に結核菌株を懸濁し、加熱抽出により抽出した。

(2) VNTR 解析: 多重反復配列領域のうち、Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR 分析法に用いられている 12 領域⁴⁾ に、JATA (15)-VNTR 分析法で追加されている 3 領域⁵⁾、超多変 (Hypervariable:HV) 領域に属する 3 領域 (QUB3232, V3820, V4120)⁵⁾、並びにその他の領域として国際的に広く用いられている 6 領域 (MIRU4, MIRU16, MIRU40, ETR-C, Mtub30, Mtub39)⁵⁾ の計 24 領域で VNTR 解析を実施した。各菌株の DNA 抽出物をテンプレートに、それぞれ片側に蛍光標識したプライマーと ExTaq HS version (Takara) を用いた PCR 法で増幅を行った。得られた PCR 産物を適宜希釈し、Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて電気泳動を行った。PCR 産物の増幅サイズは Gene Mapper ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて測定し、それをもとに反復配列数を算出し、VNTR 型を決定した。

(3) 北京型別: Warren らの方法⁶⁾ に従い、北京型結核菌同定プライマー (5'-TTCAACCATCGCCGCTCTAC-3', 5'-CACCTCTACTCTGCGCTTTG-3') と非北京型結核菌同定プライマー (5'-GGTGCAGATTGAGGTTCCC-3', 5'-TCTACCTGCAGTCGCTGTGC-3') を用いて PCR を行い、北京型及び非北京型に分類した。

(4) システム推定: 北京型別によって北京型と判別された株について、結核菌 VNTR ハンドブック追補版⁷⁾ に従い、VNTR 型から祖先型又は新興型のシステム推定を行った。

(5) クラスタ解析: 菌株間の VNTR 型を比較し、24 領域すべての反復数が一致する菌株を同一クラスターと判定した。また、クラスターを形成した菌株の母数に占める割合をクラスター形成率とした。

結果

1 対象者の内訳

解析した 189 株の患者診断時の年齢分布は 20 歳から 97 歳であった。平均年齢は、日本出生患者では 71.2 歳、外国出生患者では 34.9 歳、全体では 65.3 歳であった。男女別患者数は、男性 119 名 (63.0%)、女性 70 名 (37.0%) で

*1 現 食肉衛生検査センター

*2 現 熊谷保健所

あった。また、189名のうち31名(16.4%)は外国出生患者であった(図1)。外国出生患者の出身国は、フィリピン9名、インドネシア5名、ベトナム5名、ネパール4名、中国3名、ミャンマー2名、モンゴル2名、パキスタン1名であった。外国出生患者の日本滞在歴は、1年未満6名、1年以上3年未満7名、3年以上5年未満6名、5年以上10年未満4名、10年以上20年未満5名、20年以上3名であった。

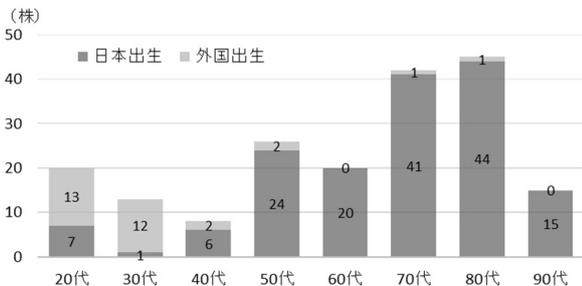


図1 年代別VNTR検査数

2 北京型別と系統推定

PCRによる北京型別検査の結果、北京型は136株(72.0%)、非北京型は53株(28.0%)であった。さらに、北京型株についてVNTR型をもとに系統推定を行ったところ、祖先型は90株(66.2%)、新興型は45株(33.1%)、系統が推定できなかった株は1株(0.7%)であった(表1)。

表1 北京型別・系統推定結果

型別	株数	(%)	系統(推定)	株数	(%)
北京型	136	(72.0)	祖先型	90	(66.2)
			新興型	45	(33.1)
			推定不能	1	(0.7)
非北京型	53	(28.0)			
計	189				

各型及び系統(推定)の平均年齢は、北京型(祖先型)71.8歳、北京型(新興型)61.1歳、非北京型58.8歳であった。北京型(祖先型)の日本出生患者株は88株(97.8%)、外国出生患者株は2株(2.2%)であった(図2)。北京型(新興型)の日本出生患者株は34株(75.6%)、外国出生患者株は11株(24.4%)であった(図3)。非北京型の日本出生患者株は35株(66.0%)、外国出生患者株は18株(34.0%)であった(図4)。

出生国別にみると、日本出生患者では、北京型は123株(77.8%)、非北京型は35株(22.2%)であった。北京型株の系統推定を行ったところ、祖先型が88株(71.6%)、新興型が34株(27.6%)、推定不能が1株(0.8%)であった。日本出生患者の各型及び系統(推定)の平均年齢は、北京型(祖先型)71.5歳、北京型(新興型)67.7歳、非北京型71.3歳であった。

外国出生患者では、北京型は13株(41.9%)、非北京型は18株(58.1%)であった。北京型の系統推定を行ったところ、祖先型が2株(15.4%)、新興型が11株(84.6%)であった。外国出生患者の各型及び系統(推定)の平均年齢は、北京型(祖先型)38.5歳、北京型(新興型)40.5歳、非北京型32.4歳であった。

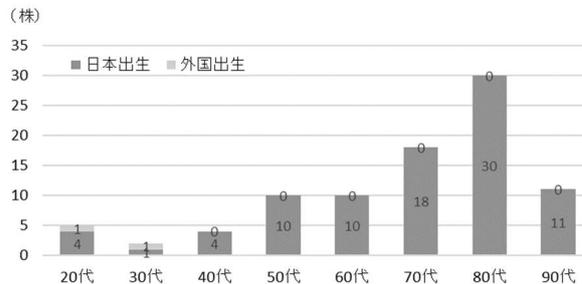


図2 年代別北京型(祖先型)検出数

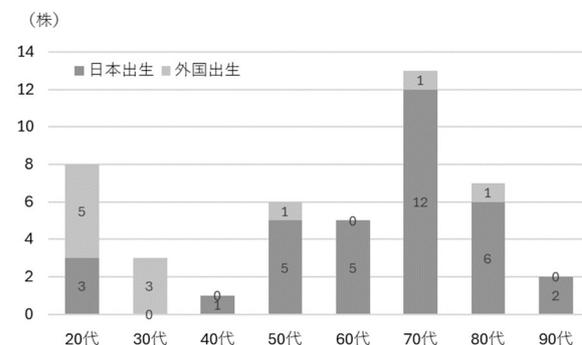


図3 年代別北京型(新興型)検出数

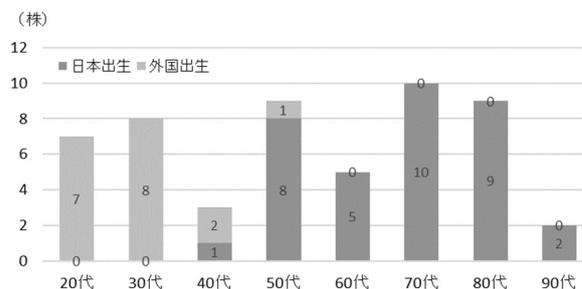


図4 年代別非北京型検出数

3 クラスタ解析

平成28年4月から令和5年3月31日までにVNTR法を実施した1351株を含み解析を実施した結果、189株中クラスターを形成した株は57株で、クラスター形成率は30.2%であった。各型及び系統(推定)のクラスター形成率は、北京型全体が36.8%(50/136)、北京型(祖先型)が33.3%(30/90)、北京型(新興型)が42.2%(19/45)、非北京型が13.2%(7/53)であった(表2)。

外国出生患者株の中でクラスター形成株は5株で、5クラスターに属していた。各クラスターの構成は、①同居人である外国出生患者2名/非北京型②同国出身の外国出生患者2名/非北京型、③高齢者福祉施設入所日本出生患者2名と同施設従事者1名の計3名/北京型(祖先型)及び疫学的関連性が確認されていない多数の株で構成される2クラスターであった。

表 2 北京型別・系統推定別クラスター形成数

	北京型			非北京型	合計
	祖先型	新興型	推定不能		
株数	90	45	1	53	189
クラスター形成株数	30	19	1	7	57
クラスター形成率(%)	(33.3)	(42.2)	(100)	(13.2)	(30.2)
クラスター数	23	11	1	6	41

考察

厚生労働省の 2022 年 結核登録者情報調査年報集計結果によると、2022 年の埼玉県の新規登録結核患者は 557 名であった¹⁾。また新規登録結核患者の約半数は、潜在性結核感染症であった¹⁾。調査の期間が違うので推定ではあるが、新規登録結核患者のうち潜在性結核感染症を半数と仮定すると、令和 5 年度は、本県の潜在性結核感染症を除く新規登録結核患者の 67.7% (189/279) の分子疫学解析を実施していたと考えられる。

全国的に新登録結核患者における外国出生患者の割合は増加傾向にあり、特に 20 代の患者では同年齢階級の新登録結核患者全体の 7 割以上を、30 代の患者では同年齢階級の 5 割以上を占めている¹⁾。

今回の調査菌株では、20 代の外国出生患者株は 65.0%、30 代の外国出生患者株は 92.3%であり、若齢層での外国出生患者が多いという全国的な傾向と一致した。外国出生患者の出身国は、フィリピン、インドネシア、ベトナム、ネパール、中国、ミャンマー、モンゴル、パキスタンであった。外国出生患者の中で日本に導入が予定されている入国前結核スクリーニング制度の対象国出身者は、9 割を占めていた。入国前結核スクリーニング制度の実施による結核対策上の効果を本県においても期待したい。

令和 5 年度の北京型別の結果、北京型が占める割合は 72.0%であった。年齢群別では、最も北京型の割合が高かったのは 90 代で約 86.7%であった。一方、最も北京型の割合が低かったのは 30 代で約 38.5%であった。北京型は、ほかの遺伝子系統と比べ感染伝播力が強く、薬剤耐性との関連が高く、発病や再発を起しやすいとされている⁸⁾。日本で分離される結核菌の 7-8 割ほどが北京型株であるといわれており^{8) 9)}、今回の調査でも同様であった。しかし、出生国別にみると、日本出生患者の北京型は 77.8%であった。一方、外国出生患者の北京型は 41.9%であり北京型の割合が低く、出身国での流行状況を反映していると推測された。

さらに、北京型株の中でも新興型は、祖先型と比較して発症するまでの期間が短く、感染伝播力がより強く、発病しやすい傾向があり、特に都市部で勤労世代の感染が増加しているとされる^{10) 11)}。今回の系統推定の結果、40 代及び 80 代以上の患者では祖先型が 8 割以上であるのに対し、20 代及び 30 代では新興型が 6 割以上となっていた。出生

国別にみると、日本出生患者では祖先型が 71.5%だったのに対し、外国出生患者では新興型が 84.6%であった。北京型の系統推定でも出身国での流行状況を反映していると推測された。

世界では、結核の約 3 割が北京型であり、北京型の中では新興型の割合が高く⁹⁾、今回の外国出生患者の結果は世界的な傾向とほぼ一致していた。

また、高齢者に祖先型が多い傾向がみられたことは高齢者結核患者では内因性再燃の影響⁹⁾ が大きいことが考えられた。

クラスター形成率を見ると、北京型は非北京型よりもクラスター形成率が高かった。また、北京型の新興型のクラスター形成率は 42.2%とさらに高く、近年の感染伝播を反映していると推定された。出生国別のクラスター形成率をみると、日本出生患者は 33.0% (52/158)、外国出生患者は 16.1% (5/31) であった。今回の調査では、外国出生患者のクラスター形成率及び日本人とクラスターを形成した株は少なかったが、新型コロナウイルス感染症の 5 類移行に伴い、人の流れが増加かつ世界的に戻るであろうことから、今後も日本出生患者と外国出生患者間の分子疫学的関連性を注視していく必要があると考えられた。

近年、次世代シーケンサーの普及に伴い、結核菌ゲノムの全塩基配列を取得し、菌の近縁性を高精度に識別する結核菌ゲノム解析が行われ始めている。集団感染での感染経路の推定や、VNTR 解析ではクラスターを形成するにもかわらず疫学的関連性が乏しい事例も多く、そのような場合に結核菌ゲノム解析を用いた結核分子疫学の精査が行われている¹²⁾。当所で実施した VNTR 解析で完全一致したクラスターの中には、7 年間にわたり一致する株が見つかったり、保健所の調査において疫学的関連性が乏しかったりする事例もあり、VNTR 法では分解能が不十分であると考えられた。今後は、本県においてもこのような事例の株に対して結核菌ゲノム解析を実施し、患者間の関連性をより詳細に解析する必要がある。

文献

- 1) 厚生労働省：結核登録者情報調査年報集計結果。
- 2) 厚生労働省：結核に関する特定感染症予防指針。
- 3) 埼玉県感染症対策課：埼玉県結核菌分子疫学調査実施要領。
- 4) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他：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, 673-678, 2008
- 5) 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
- 6) Warren RM, Victor TC, Streicher EM, et al.: Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care*

Med. 169, 610-614, 2004

- 7) 和田崇之：VNTR 型別における反復数傾向. 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 追補版.
- 8) 加藤誠也, 瀧井猛将, 大角晃弘, 他：結核分子疫学調査の手引き第一版. 2017
- 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. 結核, 84, 755-759, 2009
- 10) Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, et al. : A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol.* 45, 1483-1490, 2007
- 11) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, et al. : Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during previous decades in Japan. *J Clin Microbiol.* 47, 3340-3343, 2009
- 12) 瀬戸順次, 和田崇之, 阿彦忠之, 他：山形県における結核菌ゲノム解析を用いた結核分子疫学調査. 感染症学雑誌 97, 6~17, 2023