

原 著

## 三重県における結核菌分子疫学解析事業について 結核菌 VNTR データベース解析結果から

永井佑樹, 小林章人, 赤地重宏

### Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* using VNTR Analysis in Mie Prefecture; Database of VNTR Analysis

Yuhki NAGAI, Akihito KOBAYASHI and Shigehiro AKACHI

三重県では平成 26 年度より VNTR 法を用いた結核菌分子疫学的解析事業を実施している。事業の対象となった結核菌 133 株を JATA15-VNTR で解析したところ 8 つのクラスター (クラスター形成率: 16.5%) が確認され, 追加領域を加えた 24 領域の解析では 4 つのクラスター (クラスター形成率: 7.5%) が確認された。また MAP estimation により系統群を推定した結果, 北京型では ST3 が 29 株 (21.8%) と最も多く, 次いで ST25/19 が 24 株 (18.0%), STK が 19 株 (14.3%) となった。一方, 60 歳以下の就労世代に限ると Modern 型が 7 株 (25.9%) と最も多くを占めており, ST25/19 や STK は高齢者に偏在していることが確認された。VNTR 解析の結果は感染対策における科学的エビデンスとなるものであり, 今後も県内分離株の VNTR データを蓄積し, 現場へフィードバックしていくことで, より実効性の高い結核対策を展開していけるものと考えられる。

キーワード: 結核菌 *Mycobacterium tuberculosis*, 分子疫学, VNTR

#### はじめに

感染症の発生に際し, 原因微生物の型別を実施し, 感染源, 感染経路, 感染の広がりなどを明らかにすることは, 公衆衛生対策を推進する上で非常に重要である。結核菌では近年, PCR 法により少量の DNA から迅速・簡便に, そして再現性高く遺伝子型別を実施できる VNTR (Variable number of tandem repeat) 解析法が開発され, 広く利用されている。この VNTR 法は, 結核菌のゲノム上に存在する反復配列領域の多様性を利用した遺伝子型別法であり, 解析結果をデジタル情報として管理できるため, 施設間でのデータの比較や長期間におよぶ継続的なデータ蓄積が容易となる。また近年, 日本国内の株を型別するのに有用な方法として, 結核研究所の JATA-VNTR (Japan Anti-Tuberculosis Association) 法が標準法として提唱されており, 地方衛生研究所等で全国的な普及が始まっている<sup>1, 2)</sup>。

三重県でも, 平成 26 年度より結核に関する特定感染症予防指針に基づき, 「三重県結核菌分子疫学的解析事業」が開始され, VNTR 解析によるデ

ータベースの構築を目指している。この事業は県内で結核病床を有する 3 病院において, 新たに登録された結核患者から分離された菌株を対象として実施している。そこで今回, これまでの VNTR 解析結果の概要について報告するとともに, 系統群解析を含めた詳細な解析を実施したのであわせて報告する。

#### 方 法

##### 1. 検体

平成 26 年および 27 年度に事業の対象となった菌株のうち当所に搬入され, VNTR 解析が可能であった 133 株を対象とした。

##### 2. DNA 抽出

固形培地に発育した菌体を数コロニー相当ディスプレイスプーザブルの白金耳で採取し, 200  $\mu$ l の滅菌水を入れた 1.5ml のスクリュウキャップチューブ内に懸濁した。菌懸濁液を含んだ 1.5ml チューブをヒートブロックにて 100°C で 10 分間加熱した。13,000 rpm, 10 分間遠心分離し, その上清を新たな

Table 1. Profiles of variable number of tandem repeat (VNTR) recognized as cluster type in Mie Prefecture (2014–2015)

Cluster type	Strain No	MAP estimation	JATA12										JATA15				HV loci				International loci						
			J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	Q11a	EA	Q18	3232	3820	4120	M04	M16	M40	EC	t30	t39	
14M-1	2014007	ST3	4	1	3	2	2	6	2	7	4	5	7	8	5	9	4	10	19	14	12	2	3	3	4	4	3
	2014008	ST3	4	1	3	2	2	6	2	7	4	5	7	8	5	9	4	10	19	14	12	2	3	3	4	4	3
	2014009	ST3	4	1	3	2	2	6	2	7	4	5	7	8	5	9	4	10	19	14	12	2	3	3	4	4	3
	2014023	ST3	4	1	3	2	2	6	2	7	4	5	7	8	5	9	4	10	19	14	12	2	3	3	4	4	3
14M-2	2014019	non-Beijing	1	4	9	3	8	1	2	4	4	7	7	7	2	11	4	10	1	11	4	5	3	0	4	2	2
	2014161	non-Beijing	1	4	9	3	8	1	2	4	4	7	7	7	2	11	4	10	1	11	4	5	3	0	4	2	2
15M-1	2015008	STK	4	3	3	3	2	3	2	3	6	4	3	7	4	8	4	8	13	17	13	2	3	3	4	2	4
	2014173	STK	4	3	3	3	2	3	2	3	6	4	3	7	4	8	4	8	13	17	13	2	3	3	4	2	4
15M-2	2014036	ST3	4	1	3	2	2	7	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	9	15	11	2	3	3	4	2	3
	2015057	ST3	4	1	3	2	2	7	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	12	14	12	2	3	3	4	4	3
	2015045	ST3	4	1	3	2	2	7	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	18	14	9	2	3	3	4	4	3
	2015109	ST3	4	1	3	2	2	7	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	14	12	6	2	3	3	4	4	3
	2015176	ST3	4	1	3	2	2	7	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	15	14	14	3	3	3	4	4	3
	2015107	ST25/19	4	3	3	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	5	8	4	10	13	12	5	2	3	3	4	4
15M-3	2014162	ST25/19	4	3	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	5	8	4	10	13	12	5	2	3	3	4	4	3
	2015046	ST3	4	1	3	2	2	6	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	13	12	2	3	3	4	4	3
15M-4	2015112	ST3	4	1	3	2	2	6	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	12	14	2	3	4	4	4	3
	2015182	ST3	4	1	3	2	2	6	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	12	2	3	5	4	4	3
15M-5	2014138	ST3	4	1	3	2	2	6	4	7	4	5	4	8	5	7	4	10	16	14	12	2	3	3	4	4	3
	2015128	ST3	4	1	3	2	2	6	4	7	4	5	4	8	5	7	4	10	16	14	10	2	3	3	4	4	3
15M-6	2014143	STK	2	3	3	3	3	3	3	7	4	2	4	8	4	8	4	10	16	12	13	2	3	3	4	2	3
	2015178	STK	2	3	3	3	3	3	3	7	4	2	4	8	4	8	4	10	14	12	12	2	3	3	4	2	3

チューブに分取し、PCR 用 template とした。

### 3. VNTR 解析

多重反復配列領域のうち、JATA12 および JATA15 の VNTR 法で用いられている 15 領域を解析対象とした<sup>1,3)</sup>。さらにクラスターを形成した株については、追加領域の解析を実施した。追加領域としては国際的に広く用いられている 6 領域 (international loci ; MIRU4, MIRU16, MIRU40, ETR-C, Mtub30, Mtub39) および超多変領域 (HV: Hyper-variable ; QUB3232, V3820, V4120) の計 24 領域で VNTR 解析を実施した。方法は各菌株のゲノム DNA を template に、それぞれのプライマーと Ex Taq HS version (Takara)を用いた PCR 法で増幅を行い、PCR 産物の増幅サイズからコピー数を測定した。VNTR 解析での分子量測定はアガロースゲル電気泳動法にて実施した。電気泳動は My-Run (Cosmo Bio)を使用し 2%アガロースで 100v, 120 分間行った。また HV 領域の泳動には分子量マーカーとして O'Range Ruler 100+500 bp DNA ladder (Thermo Scientific)を使用した。本研究では、2 株以上の菌株において解析した領域の反復配列数が全て一致した場合、その菌株群をクラスターとして定義した。

### 4. 北京型結核菌の分類

著者らが開発した RD207 をターゲットにした Beijing-identifying LAMP 法を用いて北京型の分類を実施した<sup>4)</sup>。

### 5. MAP estimation による系統分類

MAP (maximum a posteriori) estimation は最大事後確率を用いて結核菌の ST 型を推定する方法である。Seto らの方法<sup>5)</sup>に従い、VNTR の profile から菌株の遺伝系統 (Modern, ST11/26, ST25/19, ST3, STK)を推定した。

## 結 果

#### 1. 検体

解析した 133 株の患者の平均年齢は 73.5 歳 (20~99 歳, SD=20.77) であり、男性が 77 名、女性が 56 名であった。そのうち外国籍患者は 8 名 (6.0%) で、その平均年齢は 33.0 歳 (20~53 歳, SD=12.2) であった。国別ではフィリピンが 5 名と最も多く、次いで中国が 2 名、ベトナム 1 名であった。保健所管内別の患者数は桑名・四日市が 26 名、鈴鹿 19 名、津 22 名、松阪 25 名、伊勢 22 名、伊賀 14 名、熊野・尾鷲 5 名であった。

#### 2. VNTR 解析

Table 2. Lineage distribution of 133 strains of *M. tuberculosis*, Mie Prefecture, 2014–2015

Lineage	No. of strains (%)	No. of foreign nationals	Age years, Mean±SD
Modern	16 (12.0)	2	61.5±28.1
ST11/26	3 (2.3)	0	71±18.7
ST25/19	24 (18.0)	0	79.8±10.3
ST3	29 (21.8)	0	72.6±23.5
STK	19 (14.3)	0	82.7±10.4
Non-Beijing	42 (31.6)	6	71±21.8

JATA15 で VNTR 解析を実施した結果、8 つのクラスター (14M-1, 2, 15M-1, 2, 3, 4, 5, 6) が確認された (Table 1)。最も大きいクラスターは 15M-2 で 5 株で構成され、次いで 14M-1 の 4 株、15M-4 の 3 株となった。それ以外の 5 つのクラスターは 2 株で構成されていた。今回確認されたクラスターにおいて疫学的リンクがみられたのは、14M-1 のみであった。また各保健所管内別でのクラスター形成株を含む割合は、桑名・四日市で 23.1%、鈴鹿 26.3%、津 4.5%、松阪 16.0%、伊勢 18.2%、熊野・尾鷲 40%、伊賀 0%であった。

#### 3. 追加領域による解析

JATA15 の VNTR 解析でクラスターを形成した 22 株について、追加領域を用いて 24 領域での解析を実施した。その結果、JATA15 で形成された 8 つのクラスターのうち、4 つのクラスター (14M-1, 14M-2, 15M-1, 15M-3) では 24 領域でも完全に一致していたが、残りの 4 つのクラスターでは追加領域のうち 1 領域以上でコピー数の違いがみられた。

#### 4. 北京型結核菌の分類

北京型分類を実施した結果、北京型株が 91 株 (68.4%)、非北京型株が 42 株 (31.6%) に分類された。また北京型、非北京型におけるクラスター形成率はそれぞれ 22.0% (20/91)、4.8% (2/42) であった。

#### 5. MAP estimation による系統分類

VNTR の profile から菌株の遺伝系統を推定した結果、Modern 型が 16 株 (12.0%)、ST11/26 が 3 株 (2.3%)、ST25/19 が 24 株 (18.0%)、ST3 が 29 株 (21.8%)、STK が 19 株 (14.3%)、および非北京型が 42 株 (31.6%) に分類された (Table 2)。また 60 歳以下の就労世代に限ると、非北京型が 10 株 (37.0%) と最も多く、次いで Modern 型が 7 株 (25.9%)、ST3 が 6 株 (22.2%) となり、以上の 3 系統で 85.1% を占めていた (Table 3)。また Table 2 に示すように各系統における平均年

Table 3. Lineage distribution by age group of *M. tuberculosis*, Mie Prefecture, 2014–2015

Lineage	age group		
	~29	30~59	60~
Modern	4	3	9
ST11/26		1	2
ST25/19		1	23
ST3	3	3	23
STK		1	18
Non Beijing	4	6	32

年齢は、Modern 型が 61.5 歳、ST11/26 が 71 歳、ST 25/19 が 79.8 歳、ST3 が 72.6 歳、STK が 82.7 歳、非北京型が 71 歳であった。

### 考 察

今回、事業の対象となった結核菌 133 株を JATA15-VNTR で解析したところ 8 つのクラスターが確認され、追加領域を加えた 24 領域の解析では 4 つのクラスター (14M-1, 14M-2, 15M-1, 15M-3) が確認された。14M-1 のクラスターは、鈴鹿保健所管内における病院での事例であり、患者の年齢層も若いことから、比較的近年の感染が疑われた事例であった<sup>6)</sup>。この事例では、保健所の的確な判断により行政検査で VNTR 解析を実施し、早期にクラスターを探知できたことから、それ以降の感染拡大を防ぐことができた事例である。それ以外のクラスターについては、疫学的関連性は明らかになっていないが、15M-1 のクラスターは、平成 20 年および 21 年に行政検査依頼のあったクラスター形成株と同一パターンを示していた。日本では、VNTR 解析法で用いる解析対象領域は、結核研究所より提案された JATA12 という 12 領域 (あるいは JATA15 という 15 領域) が一般的であり<sup>1,2)</sup>、必要に応じて追加領域の解析を組み合わせたという方法が取られている。ただ、わが国で分離される結核菌の大部分を占める北京型株は、遺伝的均質性の高い系統群であり、ほかの遺伝系統群と比べて VNTR による遺伝子型別分析の精度が劣ることが知られている<sup>7-9)</sup>。この問題に対応するため最近、国内の研究施設を含む国際共同研究が実施され、HV 領域を二次解析として用いることにより、北京型結核菌の型別分類の精度が大きく向上することが報告された<sup>10)</sup>。これらのことから三重県の分子疫学解析事業においても、まずは JATA15 の 15 領域で一次スクリーニングを行ったあとに、二次解析として HV 領域を含めた追加領域の解析を行うことにしている。今回の結果からも、二次解析によりクラスター形成率が 16.5% から 7.5% へと大きく低下したことから、サーベイランスにおいては二次解析を行うことが非常に有用であると考えられた。

また MAP estimation により菌株の遺伝系統を推定した結果、北京型では ST3 が 29 株 (21.8%) と最も多く、次いで ST25/19 (18.0%)、STK (14.3%) となった。一方、60 歳以下の就労世代に限ると Modern 型が 7 株 (25.9%) と最も多くを占めており、ST25/19 や STK は高齢者に偏在していることが確認された。今回解析した 133 株のうち Modern 型が 16 株 (12.0%) 確認されたが、その平均年齢が 61.5 歳となり他の系統群より低い傾向がみられた。また確認された Modern 型 16 株のうち外国人由来 (中国、フィリピン) の株が 2 株、さらに多剤耐性株が 1 株含まれていた。2007 年から 2010 年に我々が調査したときの Modern 型分離率の割合は 10.8% (17/158) であり<sup>7)</sup>、それほど増加はしていないが、Modern 型は、北京型結核菌のなかでも若年者に多く、集団感染を誘発するリスクが高いことから、今後も継続的に監視していくことが重要であると考えられた。また Table 2 に示すように、外国人由来の 8 株は Modern 型の 2 株を除いて全て non-Beijing に分類されたが、その要因としては、海外で分離される株は日本とは異なった系統群が多いこと、特にフィリピンでは EAI (East African Indian) とよばれる系統群が主流であることなどが原因と考えられる<sup>11)</sup>。従来、系統群の解析には MLST (multi locus sequence typing) や RD (region of difference) 解析など、一般的な実験室では実施するのが難しかったが、近年開発された MAP estimation では、VNTR の profile から北京型をより詳細に分類することが可能となった<sup>5)</sup>。これにより、VNTR のデータに系統群の情報を加えることで、より正確かつ詳細な菌株の異同判定が可能となり、感染源調査などへの活用も期待される。

事業開始後いくつかの課題もみえてきている。今回 24 領域で一致した 4 つのクラスターのうち 3 つで疫学的関連性が明らかにはならなかった。この要因が、VNTR 解析の分解能の低さによる (本来関連性のない株同士が同じ型になってしまう) ものなのか、あるいは実際の実地疫学調査では把握しきれない何らかの関連性が隠されているのか現段階で把握することは難しい。さらに VNTR 解析やクラスター解析の結果を、患者の人権と個人情報保護法も踏まえたうえで、どのように (どのような型で、どのタイミングで、どこまで) 還元していくか検討していく必要がある。

また今回の対象者のうち外国籍患者が 8 名 (6.0%) 含まれていたが、三重県の県内人口に占める外国人の割合 2.2% (平成 26 年末時点) と比べてもやや多い。しかも今回の外国籍患者 8 名の平均年齢は 33.0 歳と非常に若く、60 歳以下の患者に

おける外国人の占める割合が 29.6% (8/27) であったことから今後、外国人結核の対策を強化していくことがさらに重要になってくるものと思われる。

事業開始から2年が経過し、いくつかの課題も見えてきたが、この VNTR 解析の結果は行政が感染拡大防止策を実施するうえでの科学的エビデンスとなるだけでなく、この VNTR 分析結果をデータベースとして管理していくことで、高精度な結核菌サーベイランスシステムが構築できる。今後さらにデータを蓄積していけば、現段階では把握できない未知の伝播経路の解明や地域内蔓延株の特定ができるようになる可能性もある。これらのことから、今後も県内分離株の VNTR データを蓄積し、現場へフィードバックしていくことで、今まで以上に実効性の高い結核対策を展開していくものと考えている。

### 謝 辞

本研究は、三重県が実施している「三重県結核菌分子疫学的解析事業」(2014年4月1日～2016年3月31日)から得られたデータの一部を解析したものである。当該事業に携わる健康福祉部薬務感染症対策課、保健所、医療機関の各位に深謝致します。

### 文 献

- 1) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡 他 (2008) : 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.
- 2) Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, et al., (2009): Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. **57**:873-880.
- 3) 和田崇之, 長谷 篤 (2010) : 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.
- 4) Nagai Y, Iwade Y, Nakano M, et al., (2016): Rapid and Simple Identification of Beijing Genotype strain of *Mycobacterium tuberculosis* using Loop-mediated isothermal Amplification assay. Microbiol Immunol. **60**:459-467.
- 5) Seto J, Wada T, Iwamoto T, et al., (2015): Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation. Infect Genet Evol. **35**:82-88.
- 6) 高岡祐理佳, 太田茂治, 稲垣 香 他 (2015): VNTR 法により判断された病棟における職員の結核集団感染事例について. 第 67 回三重県公衆衛生学会抄録集 **67**:34-35.
- 7) Nagai Y, Iwade Y, Hayakawa E, et al.,(2012): Molecular Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in Mie prefecture, Japan, using Variable Numbers of Tandem Repeats Analysis. Jpn J Infect Dis. **65**:341-344.
- 8) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al., (2007): 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.
- 9) 永井佑樹, 岩出義人, 中野 学 他 (2011) : VNTR 法を用いた結核菌の分子疫学解析 (2007-2009). 三重県保健環境研究所年報 **56**: 30-33.
- 10) Allix-Béguec C, Wahl C, Hanekom M, et al., (2014): Proposal of a consensus set of hypervariable mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat loci for subtyping of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates. J Clin Microbiol. **52**: 164-172.
- 11) Montoya JC, Murase Y, Ang C, et al., (2013). A molecular epidemiologic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* among Filipino patients in a suburban community in the Philippines. Kekkaku. **88**:543-552.

## **Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* using VNTR analysis in Mie Prefecture; Database of VNTR analysis**

Yuhki NAGAI, Akihito KOBAYASHI, and Shigehiro AKACHI

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, molecular epidemiology, VNTR

In Mie Prefecture, molecular epidemiological project of TB using VNTR analysis has been started in 2014. We first analyzed 133 clinical isolates using JATA15-VNTR. The use of JATA15-VNTR generated 8 VNTR clusters, with a clustering rate of 16.5%. In contrast, use of 24 loci-VNTR generated 4 clusters, with a clustering rate of 7.5%. Furthermore, a total of 133 strains were subjected to the MAP estimation using VNTR profiles, and the results showed that ST3 was predominant (21.8%) among Beijing lineage, followed by ST25/19 (18.0%), and STK (14.3%). Meanwhile, the major lineage was modern lineage (25.9%) in patients under 60 years of age. This VNTR data support infection control practice based on scientific evidence. Therefore, as the local findings of VNTR analysis are accumulated, this technology will be increasingly effective and useful tool for the molecular epidemiology of TB in Mie Prefecture.