

精神科病院結核集団感染事例における全ゲノム解析の実施

○熊本有美, 相原義之, 山城彩花¹, 石川加奈子, 小川郁夫, 深谷節子¹現:日立保健所

要旨

平成 27 年度に県内で発生した精神科病院での結核集団感染事例において、VNTR 型が一致した結核菌 7 株（1 領域違い含む）について、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を実施した。その結果、5 株は非常に近縁であったが、残り 2 株は、5 株と比較してそれぞれ 10 か所と 13 か所の SNV（Single Nucleotide Variant, 一塩基変異）が見られ、やや異なっていた。この 2 株は治療中断歴のある既感染者由来であったため、本事例以前の感染の可能性が考えられた。

キーワード：結核菌 分子疫学解析 VNTR型別 次世代シーケンサー 全ゲノム解析

1.はじめに

茨城県の平成30年結核罹患率は人口10万人対10.6と、全国罹患率(12.3)を下回っているが、低蔓延状態と言われる10以下には届いていない。県内では集団感染事例も毎年発生しており、集団感染の見極めの際に結核菌分子疫学解析として24領域Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) 型別検査を実施してきた。平成29年度に改定された茨城県結核予防計画（第三次）では、県内新規結核登録患者由来の菌株をすべて収集し、分子疫学解析を実施することを目標の1つとしている。それに伴い解析数が増加した結果、疫学的関連性が不明であるが、VNTR型が一致する例が複数確認されるようになった¹⁾。

この疫学的関連性が不明なVNTR型一致例が偶発的なものか、または隠れた感染経路が存在するのかを解明するためには、より微細なゲノムの変化を検出して比較する必要がある。そこで、平成30年度から研究事業として次世代シーケンサー（Next Generation Sequencer, NGS）を用いた結

核菌全ゲノム解析を実施している。

今回、平成27年度に発生した集団感染事例について、詳細な感染伝播状況を明らかにすることを目的に、NGSを用いた全ゲノム解析を実施したので報告する。

2.事例概要

平成27年12月に精神科病院において結核集団感染が発生した。当初は、1か所の病棟からの患者発生であったが、他病棟からも患者発生が認められたため、入院患者由来結核菌10株（平成28年3月～平成30年2月搬入）について24領域VNTR型別検査を当所にて実施した。その結果、7株がVNTR型完全一致、1株は1領域違いであった。また、残り2株についてはVNTR型が異なっていた（表1）。このことから、1領域違い1株を含めた8株が同一集団と判断された。

VNTR型が一致した患者は4か所の病棟に分かれており、長期入院者や既感染者が多い状況であった（図1）。

表1：VNTR型別検査結果

菌株No.	24 VNTR																								入院病棟
	JATA 12																								
	MtuA4	miru10	MtuA21	MtuA24	QUB11b	VNTR232	miru26	QUB15	miru31	QUB336	QUB26	QUB456	QUB18	QUB11a	ETRA	QUB322	VNTR3820	VNTR4120	MtuA39	miru40	miru4	MtuA30	miru16	ETRO	
VNTR型不一致	2	3	1	3	3	2	3	4	2	12	5	3	5	2	3	5	5	2	6	1	2'	2	3	4	D
VNTR型不一致	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3	8	4	4	14	9	10	3	3	2	4	3	3	職員
保存菌株なし (搬入時に死菌)	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	16	14	10	3	4	2	4	3	4	A
患者1	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	16	14	10	3	4	2	4	3	4	A
患者2	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	16	14	10	3	4	2	4	3	4	A
患者3	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	16	14	10	3	4	2	4	3	4	B
患者4	4	1	3	2	7	4	7	4	5	9	8	5	10	9	4	16	14	10	3	4	2	4	3	4	C
患者5	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	16	14	10	3	4	2	4	3	4	D
患者6	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	16	14	10	3	4	2	4	3	4	A
患者7	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	10	9	4	16	14	10	3	4	2	4	3	4	D

※太枠内7株について全ゲノム解析を実施。
※□は1領域違い。

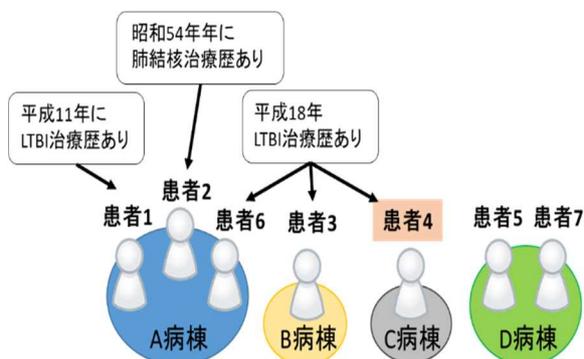


図1：保健所の調査及びVNTR型別による7株の比較結果

3.方法

良好な状態で-80℃保管されていた患者1～7由来の7株（1領域違い1株を含む）を2%小川培地で再培養した結核菌を、検体とした。

微細ガラスビーズ入りのマイクロチューブにクロロホルム 500 μL 及び TE Buffer 750 μL を分注し、小川培地上に発育したコロニーを採取し、ボルテックスにより菌体の破碎および不活化を行った。5000rpm 5分遠心後、上清から DNeasy Blood&Tissue Kits(QIAGEN)により DNA 抽出を実施した。

抽出したDNAをQIaseq FX DNA Library Kit(QIAGEN)によりライブラリ調製を行い、MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) (illumina)を用いて、リードデータを取得した。データ解析はWebサービスとして公開されている分子疫学解析ツールであるTGS-TB（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター作成）により実施した²⁾。

4.結果

TGS-TB での比較結果を図2に示す。7株の起点(変異なしの地点)は、矢印の地点と推定され、ここから解析株はそれぞれ特異的なSNVを蓄積している。

患者1,6,7由来の3株は、特異的な5か所のSNVを蓄積し完全一致、患者2,5由来の2株は、それぞれ前述の3株とは1か所のSNVのみ異なっており、この5株は非常に近縁であった(以下、近縁グループ)。この近縁グループとなった患者5名(患者1,2,5,6,7由来)はA病棟及びD病棟に入院

していた。患者 4 由来の株については、特異的な 5 か所の SNV を蓄積しており、近縁グループとは異なる 10 か所の SNV が検出された。患者 3 由来の株については、特異的な 8 か所の SNV を蓄積しており、近縁グループとは異なる 13 か所の SNV が検出された。

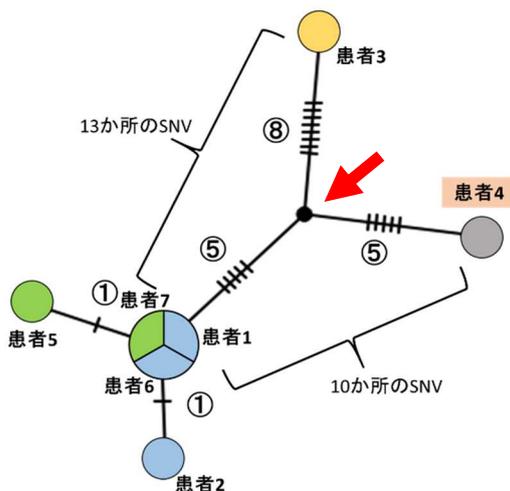


図 2：全ゲノム解析による 7 株の比較結果
※円の色は病棟を示す。

5. 考察

保健所の疫学調査によると、今回全ゲノム解析を実施した結核患者 7 名は、全員が長期入院者であり、既感染者も多く含まれていた。さらに、患者 3,4,6 の 3 名は、平成 18 年に同病院で発生した結核患者の接触者健診により潜在性結核感染症 (LTBI) 診断を受け、治療を開始したが、3 名とも肝機能

障害を理由に治療を中断していた (表 2)。

NGS による全ゲノム解析の結果、患者 3,4 は、近縁グループとは異なる 10 か所または 13 か所の SNV が検出され、近縁グループと異なることが明らかとなった。この 2 名については、平成 18 年の再燃の可能性が強く示唆された。

また、患者 3,4 と同じく平成 18 年に LTBI 診断を受けた患者 6 については、近縁グループと一致しており、初発患者から約 2 年遅れての診断であったことから、再燃ではなく、再感染の可能性が考えられた。

疫学情報と今回の解析結果から、7 株に共通する SNV 地点が平成 18 年の感染株と推定され、本事例内には今回の A,D 病棟感染例と再燃例が混在していることが明らかとなった。

6. まとめ

本事例は長期入院者と既感染者が多い非常に特殊な環境であったが、全ゲノム解析により、集団感染内の状況を明らかにすることができた。

結核の潜伏期間は数か月から数十年と長く、患者への聞き取り調査のみからは感染経路を明らかにすることが困難な場合が多い。

表 2：全ゲノム解析施した 7 株の疫学情報

	患者登録	入院病棟	入院年	治療歴
患者1	平成27年12月	A	昭和55年～	平成11年にLTBI治療歴あり
患者2	平成28年2月	A	昭和60年～	昭和54年に肺結核治療歴あり
患者3	平成28年5月	B	昭和46年～	平成18年にLTBI治療歴あり(中断)
患者4	平成28年8月	C	平成3年～(8回目)	平成18年にLTBI治療歴あり(中断)
患者5	平成28年11月	D	昭和63年～	
患者6	平成29年10月	A	平成23年～(4回目)	平成18年にLTBI治療歴あり(中断)
患者7	平成29年12月	D	平成23年～	

集団感染発生時や患者間の疫学的関連性が不明かつVNTR型の一致が確認された際に、疫学調査と並行して全ゲノム解析を進めることにより、より詳細な関連性を明らかにすることが可能となる。これにより、接触者健診の範囲や追加調査内容等に活用でき、感染拡大防止対策の大きな一助となると考えられる。

謝辞

結核菌全ゲノム解析を実施するにあたり、ご指導いただきました大阪市立大学生活科学研究科 和田崇之先生に深謝いたします。

参考

- 1)中本有美他,茨城県衛生研究所年報 57 号 (2019 年) ,34-37
- 2)Sekizuka T,et al. TGS-TB: Total Genotyping Solution for Mycobacterium tuberculosis Using Short-Read Whole-Genome Sequencing.PLoS One. 2015. 13;10(11)