

## 茨城県における結核菌分子疫学解析について（平成30年～令和4年）

○梅澤美穂、永田美樹、石川加奈子、相澤志保、織戸優、伊師拓哉、小川郁夫、金崎雅子

### 要旨

平成30年～令和4年に県内で発生した結核患者の分離株を収集し、VNTR（Variable Number of Tandem Repeat）検査および次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を実施した。VNTR 検査による遺伝系統推定の結果、日本出生患者は北京型が多く、外国出生患者は非北京型が多かった。また、クラスター形成率は16.0%であった。VNTR 検査においてクラスターを形成した事例について全ゲノム解析を実施した結果、菌株間の関連が明らかになった事例が確認された。また、全ゲノム解析を実施した菌株の9.2%で薬剤耐性遺伝子が検出された。

キーワード：結核菌 分子疫学解析 VNTR 全ゲノム解析 薬剤耐性

### 1 はじめに

茨城県における結核罹患率は年々減少傾向にあり、令和3年は人口10万対7.7(全国9.2)と低まん延状態といわれる10を下回った<sup>1)</sup>。

本県においては、結核対策事業として結核予防計画を策定している。平成29年度からの第三次計画<sup>2)</sup>においては、積極的疫学調査の一環として、新規結核患者から分離された全ての結核菌についてVNTR解析等の分子疫学調査を行うことになった。これにより、感染源・感染経路の究明を行い、集団感染の有無や感染源の特定に努めているところである。なお、当所では結核予防第三次計画にあわせ平成29年度より24領域VNTR検査を実施している。

VNTR検査は、結核菌の遺伝系統の推定や、菌株間のパターンを比較することで集団感染等の見極めにつながるが、疫学的関連がみられない場合にも偶発的に型が一致する場合があり、分子疫学解析の目的の一つである感染源・感染経路の究明にはより詳細な遺伝子情報が必要である。そこで、平成30年度には結核菌の分子疫学に関する研究事業を立ち上げ、次世代シーケンサーを導入し、一部の菌株につい

て全ゲノム解析を実施している。

今回は、平成30年～令和4年の5年間に検査を実施したVNTR解析結果および過去に搬入されVNTR型が一致した一部の事例(以下、「VNTR型別一致クラスター」とする)並びに研究への同意が得られた菌株(以下、「散発事例」とする)を用いた全ゲノム解析の結果について報告する。

### 2 材料および方法

#### 2-1 VNTR 検査

平成30年1月～令和4年12月までの5年間で当所に搬入された計482株の結核菌についてVNTR検査を実施した。

VNTR検査は、結核菌VNTRハンドブックに準拠し、解析領域を蛍光プライマーで増幅後、3500xL Genetic Analyzerによりフラグメント解析を実施した。VNTR領域は、JATA(12)-VNTR法の領域<sup>3)</sup>にJATA(15)-VNTR3領域、超多変(hypervariable, HV)3領域および国際標準6領域を加えた24領域とした。解析した結果は、瀬戸らの方法<sup>4)</sup>により、北京型と非北京型に分類し、さらに北京型については、祖先型と新興

型に細分類し、遺伝系統の推定を実施した。また、24 領域すべてが一致したものを同一クラスターと定義し、菌株間の VNTR 型を比較した。

### 2-2 全ゲノム解析

平成 23 年度以降に搬入された VNTR 型別一致クラスター（一部一領域違いを含む）112 株（20 事例）および散発事例 73 菌株の計 185 株について全ゲノム解析を実施した。全ゲノム解析には Illumina 社の Miseq を使用し、得られたデータは TGS-TB（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）<sup>5)</sup> を使用し、解析を実施した。

## 3 結果

### 3-1 VNTR 検査

VNTR 検査から遺伝系統を推定した結果は、北京型が 61.2%、非北京型が 30.1%、解析不能が 8.7%であった。出生国別に見ると、日本出生患者は北京型が 66.7%、非北京型が 27.0%と北京型が多いのに対し、外国出生患者は、北京型が 19.6%、非北京型が 53.6%と非北京型が多い結果であった（図 1）。日本出生患者を年齢別に分類した結果、年齢による遺伝系統に偏りはみられなかった（図 2）。

また、北京型を細分類すると、全体で祖先型が 71.9%、新興型が 28.1%であった。出生国別に見ると、日本出生患者は祖先型が 74.3%、新興型が 25.7%と祖先型の割合が高い一方、外国出生患者は祖先型が 9.1%、新興型が 90.9%と新興型が大部分を占めた（図 3）。日本出生患者を年齢別に分類した結果、30 歳台までの若年層では祖先型と新興型がほぼ同率であり、年齢層が高くなるにつれて祖先型の割合が高くなっていった（図 4）。

収集した 482 株のクラスター形成率は 16.0%

（77 株）であり、30 パターン形成された。そのうち、疫学的関連性（地域内伝播等の疑いを含む）が確認されたのは 11 クラスター（36.7%）、関連性がみられなかったのが 19 クラスター（63.3%）であった。

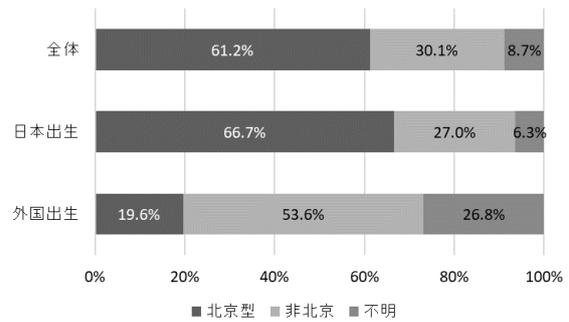


図 1：遺伝系統分類

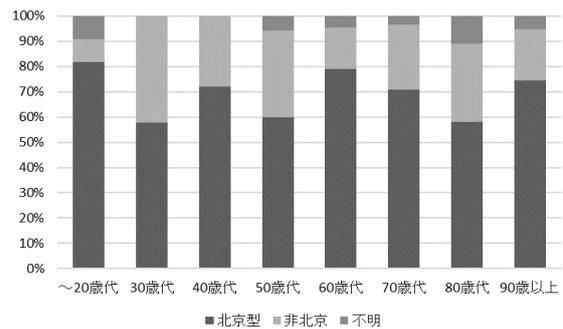


図 2：日本出生患者・年齢別遺伝系統分類

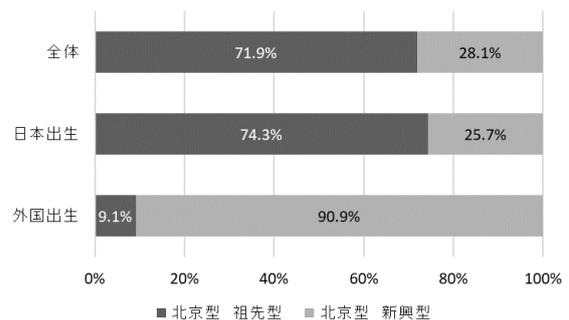


図 3：遺伝系統分類（北京型の細分類）

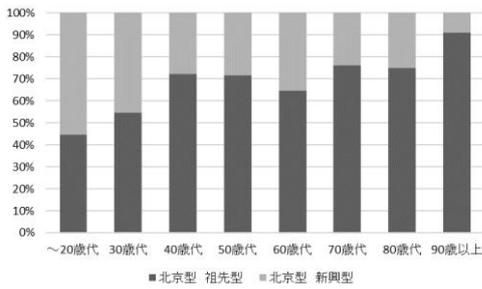


図4：日本出生患者・年齢別遺伝系統分類（北京型の細分類）

### 3-2 全ゲノム解析

#### 1) VNTR 型別一致クラスター解析結果

全ゲノム解析を実施した VNTR 型別一致クラスターのうち3事例について以下に示す。

#### 事例1

##### 【事例概要】

初発患者（患者1）、初発患者と同室の医療機関に入院した患者2名（患者2、3）、初発患者と同デイサービス利用者1名（患者4）および初発患者の家族・親族の2名（患者5、6）の計6名が半年の間に報告された。

##### 【全ゲノム解析結果】

TGS-TB での比較結果を（図5）に示す。6株すべて完全一致であった。全員が短期間に報告されたこと、全ゲノム解析完全一致という結果から、初発患者からの感染伝播であると推定された。

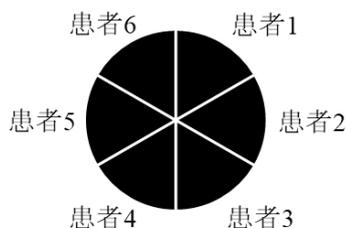


図5：事例1の全ゲノム解析結果

#### 事例2

##### 【事例概要】

同保健所管内において6か月差で報告された高齢男性2名（患者1、2）。保健所の調査による疫学的関連はみられなかった。

##### 【全ゲノム解析結果】

TGS-TB での比較結果を（図6）に示す。2株間には13箇所の SNVs（Single Nucleotide Variant, 一塩基変異）が検出された。結核菌は1年あたり0.5 SNVs 程度自然変異が生じる<sup>6)</sup>とされており、2例には疫学的関連もみられないことから、偶発的な VNTR 型の一致であったと推定された。

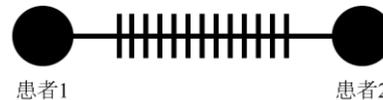


図6：事例2の全ゲノム解析結果

#### 事例3

##### 【事例概要】

事例の概要について表1に示す。患者は5名で、居住地や出身国（Z国）といった共通項目がみられた。

表1：事例3の疫学情報

患者 No.	登録年月	居住地	疫学情報
1	X年7月	A市 (B市隣)	勤務地はB市
2	X年8月	B市・C町 (E町隣)	妻はZ国出身、行きつけのスナックあり
3	X年5月	B市・D	Z国出身、E町スナック勤務
4	X+1年10月	B市・D	元Z国籍、患者3と同居歴あり
5	X+2年2月	B市・E町	自営業

##### 【全ゲノム解析結果】

TGS-TB での比較結果を（図7）に示す。3株が完全一致、残る2株は完全一致の3株とそれぞれ異なる1つの SNV がみられた。すべての株が非常に近縁であることから、疫学情報と照

らし合わせると、B市・E町を中心とした地域内伝播やZ国コミュニティ関連における感染伝播が発生した可能性が示唆された。

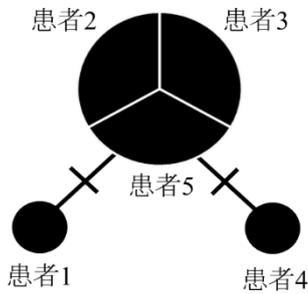


図7：事例3の全ゲノム解析結果

2) 遺伝系統および薬剤耐性遺伝子保有状況

全ゲノム解析を実施した185株のうち、日本出生患者は173株、外国出生患者は12株であった。

遺伝系統の解析結果を(表2)に示す。遺伝系統は、Lineage 1が8株、Lineage 2が2株、Lineage 2/beijing sublineageが128株、Lineage 3が5株およびLineage 4が42株であった。Lineage 2の1株、Lineage 2/Beijing sublineageの2株およびLineage 3の5株は、VNTR検査では遺伝系統不明であった。

薬剤耐性遺伝子の保有状況を表3に示す。薬剤耐性遺伝子を保有する菌株は17株(9.2%)あり、IsoniazidおよびRifampicinの2剤に対して耐性遺伝子を保有している株

が1株あった。この株はフィリピン国籍患者から分離された菌株であった。

表3：薬剤耐性遺伝子検出状況

薬剤耐性遺伝子	検出数
Isoniazid, Rifampicin	1
Streptomycin	12
Pyrazinamide	3
Isoniazid	1
<b>総計</b>	<b>17</b>

4 考察

VNTR 検査による本県の結核菌の遺伝系統は、北京型が61.2%と全国の70~80%<sup>7)</sup>より低い傾向にあった。出生国別では、日本出生患者は北京型が約7割を占めるのに対して外国出生患者は2割ほどであった。本県の新登録結核患者中外国出生割合は20.8と全国の11.4よりも高く、増加傾向にあることから、県内では外国出生患者由来株が遺伝系統に影響している可能性が考えられた。また、北京型を細分類した結果、日本出生患者においては、若年層では祖先型と新興型の割合に差がみられないのに対し、高齢になるほど祖先型の割合が高かつ

表2：全ゲノム解析による出生国別遺伝系統解析結果

出生国	lineage 1	lineage 2	lineage 2 (beijing sublineage)	lineage 3	lineage 4	総計
日本	2	1	127	3	40	173
インドネシア	2		1		1	4
フィリピン	3	1				4
韓国				2		2
ベトナム					1	1
ミャンマー	1					1
<b>総計</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>128</b>	<b>5</b>	<b>42</b>	<b>185</b>

た。日本で分離される北京型株は多くが祖先型であるが、若年層では新興型の比率が有意に上昇していると報告されており<sup>8)</sup>、本県でも同様の傾向がみられた。日本における結核患者の大部分を占めている高齢者の多くが内因性再燃である一方で、若年～中年患者から分離される株は現在の流行状況を示していると考えられ、今後は新興型の勢力が拡大すると考えられている<sup>7)</sup>。県内では外国出生患者の増加も著しいため、今後も引き続き菌株を収集・解析してデータを蓄積し、県内の状況を把握していく必要がある。

VNTR 検査によってクラスターを形成した事例を全ゲノム解析した結果、短期間の感染伝播であったことが確認できた事例、偶発的な VNTR 型の一致であった(関連する事例ではなかった)ことが確認できた事例など、VNTR 検査では明らかにならなかった詳細な情報を得ることができた。また、過去には、医療機関における集団感染疑い事例が再燃と集団感染の混在であったことが判明した事例もあった<sup>9)</sup>。さらに、全ゲノム解析によって、遺伝系統の詳細や薬剤耐性遺伝子の保有状況についても得ることができた。

## 5 まとめ

全国および本県における結核罹患率は令和3年に低まん延状態になったが、他の先進国と比較すると依然として高く、また、令和2年以降の減少に関しては新型コロナウイルス感染症の影響も考えられることから<sup>10)</sup>、結核は今後も引き続き注意が必要な感染症である。

全ゲノム解析は VNTR 検査と比較して詳細な遺伝子情報を得られる一方で、操作が煩雑であり、迅速性・コスト面等での課題も多い<sup>11)</sup>が、今後も VNTR 検査と全ゲノム解析を併用することで、感染拡大防止対策の一助になると考え

られる。

## 謝辞

本調査および研究事業にご協力いただいた医療機関をはじめ各保健所の皆様に深謝いたします。

## 参考

- 1) 茨城県：茨城の結核統計 2021 年版
- 2) 茨城県：結核予防計画（第三次）
- 3) 前田伸司、村瀬良朗、御手洗聡、菅原勇、加藤誠也，Kokkaku Vol.83,No.10:673-678,2008
- 4) Seto J, Wada T, et al.,Infection, Genetics and Evolution 35 : 82-88,2015
- 5) Sekizuka T, Yamashita A, Murase Y, et al.: TGS-TB: Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* Using Short-Read Whole-Genome Sequencing. PLoS One. 2015 ; 10 : e0142951.
- 6) Kay GL, Sergeant MJ, Zhou Z, et al,Nat Commun. 2015;6:6717.
- 7) 岩本朋忠 ,Kekkaku Vol.84,No.12:755-759, 2009
- 8) 岩本朋忠,複十字, No.329,20-21,2009
- 9) 熊本有美、他,茨城県衛生研究所年報 No.58,41-44,2020
- 10) 厚生労働省:2022 年結核登録者情報調査年報集計結果
- 11) 瀧井猛将, Kekkaku Vol.94,No.11-12:547-552, 2019