

茨城県における結核菌分子疫学解析について（平成29年～令和3年）

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

要旨

平成29年～令和3年に県内で発生した結核患者の分離株を収集し、VNTR検査および全ゲノム解析を実施した。VNTR検査の結果、日本出生患者は北京型が多く、外国出生患者は非北京型の割合が高い傾向にあった。また、北京型を細分類すると、65歳以上の日本出生患者では祖先型が、外国出生患者は新興型の割合が高く、出生国と遺伝系統に特徴がみられた。また、全ゲノム解析の結果、複数の菌株で薬剤耐性遺伝子が検出されており、今後の動向に注意が必要である。

キーワード：結核菌 分子疫学解析 VNTR 全ゲノム 薬剤耐性

1.はじめに

茨城県における2020年の結核罹患率は、人口10万対10.0（全国10.1）と年々減少しているが、感染症の中では依然として報告数が多く、2020年の新登録患者数は287人報告されている。¹⁾

我が国における結核の特徴としては、過去に結核に罹患した高齢者が多く、近年は外国生まれの患者が増加している。^{2) 3)} 本県でも2020年における新登録結核患者中の65歳以上の割合は63.1%であり、外国出生割合は16.4%（全国11.1%）と、5年前の2015年の7.5%と比べ約2.2倍に増加している。⁴⁾

結核の予防の総合的な推進を図ることを目的とした、本県の第三次結核予防計画では、結核患者から分離された結核菌について、積極的疫学調査の一環としてVNTR

（Variable Number of Tandem Repeat）解析等の分子疫学調査を行うことにより、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ることとしている。⁵⁾

当所でも平成29年度より、24領域VNTR

検査を導入し、より詳細な解析を実施している。また、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、関連が疑われる株や散発事例など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29年～令和3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た一部の散発事例の菌株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29年1月～令和3年12月までの5年間で当所に搬入された、計513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、24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。解析した結果は、瀬戸らの方法⁶⁾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。

2-2.全ゲノム解析

過去に搬入され、研究の同意が得られた一部の散発事例39菌株について、全ゲノム解析を実施し、遺伝系統の推定および薬剤耐性遺伝子保有状況を調査した。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（感染研）を使用し、解析を実施した。

3.結果

3-1.VNTR検査

検査を実施した菌株の年齢の中央値は、76歳（平均69歳）であり、80歳代が最も多かった（図1）。65歳以上では352株あり、全体の68.6%を占めていた。若年層では、外国出生患者が多く、20歳代では全体の75.6%、30歳代では36.7%、40歳代では38.2%を占めていた。

遺伝系統分類結果は、全体で北京型が61.2%検出され、非北京型が31.2%であった。出生国別に見ると、65歳以上の日本出生患者は、北京型が65.9%、非北京型が28.1%であり、65歳未満の日本出生患者は、北京型が66.7%、非北京型が29.5%であった。外国出生患者は、北京型が21.4%、非北京型が53.6%であった（図2）。

また、北京型を細分類すると、日本出生患者は65歳以上では、祖先型が78.4%、新興型が21.6%、65歳未満では北京型が57.1%、新興型が42.9%と、65歳以上では祖先型の割合が高い結果となった。一方、外国出生患者は祖先型が8.3%、新興型が91.7%であり、日本出生患者と比べ新興型の割合が高い結果となった（図3）。

外国出生患者の出身国は、フィリピン、インドネシアと東南アジアが多く、入国前ス

クリーニング対象国となる6か国（フィリピン、ベトナム、中国、インドネシア、ネパール、ミャンマー）が約70%を占めていた（図4）。

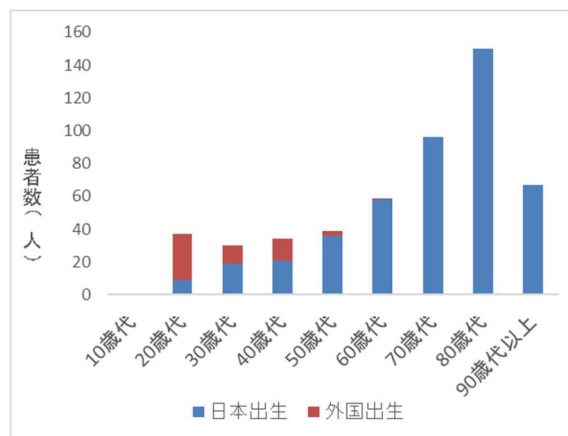


図1：年代別、出生国別の患者数

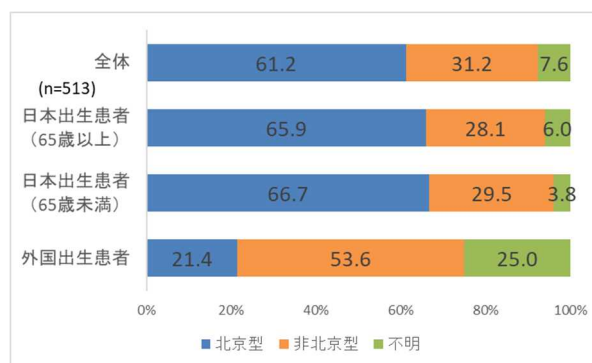


図2：遺伝系統分類

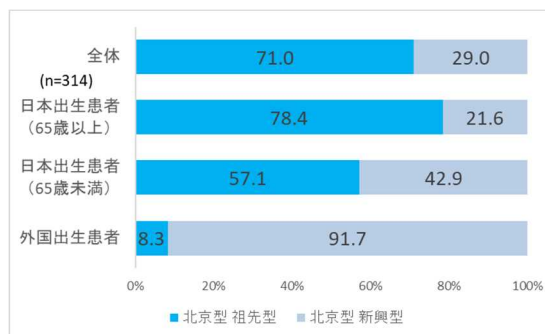


図3：遺伝系統分類（北京型の細分類）

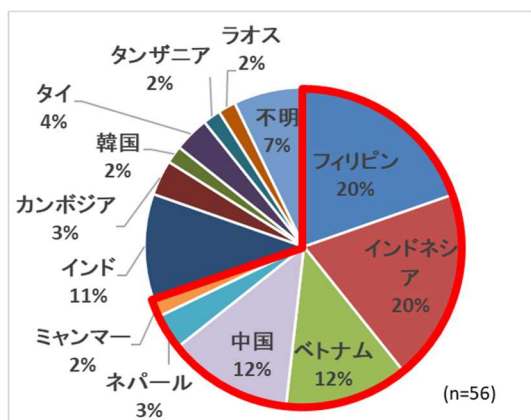


図 4：外国出生患者の出身国

3-2.全ゲノム解析

研究の同意が得られた散発事例 39 菌株は、日本出生患者が 36 株、外国出生患者が 3 株であった。年齢の中央値は 77 歳（平均 71.6 歳）であり、65 歳未満が 25.6%、65 歳以上が 74.4%であった。

遺伝系統は、Lineage 1 が 2 株、Lineage 2 が 1 株、Lineage 2/beijing sublineage が 27 株、Lineage 4 が 9 株であった。Lineage 2/beijing sublineage が 27 株中 1 株は、VNTR 検査で遺伝系統不明であった。また、薬剤耐性遺伝子を保有する菌株は 3 株あり、Streptomycin(SM) が 2 株（ともに Lineage 2/beijing sublineage）、Pyrazinamide(PZA)が 1 株（Lineage 4）であり、60 歳代～70 歳代の日本出生患者であった（表 1）。

表 1：遺伝系統別の薬剤耐性遺伝子保有状況

	lineage 1	lineage 2	lineage 2 (beijing sublineage)	lineage 4
薬剤耐性遺伝子なし	2	1	25	8
Streptomycin(SM)			2	
Pyrazinamide(PZA)				1
	2	1	27	9

4.考察

県内では結核の発生届け出数、検査依頼数は年々減少しているが、依然として日本出生高齢者の報告は多い状態が続いている。また、外国出生患者割合は増加しており、特に 20 代の若年層が増加していた。

VNTR のデータを遺伝系統分類すると、全国で分離される菌株の 70～80%が北京型である⁷⁾のに対し、本県で分離された菌株は 61.2%であり、全国と比べて低いことが判明した。日本出生患者は、65 歳以上または未満で分けた場合も、北京型が同様の割合で検出され、北京型の方が多かったが、細分類すると 65 歳未満は新興型の割合が高い傾向にあった。また、外国出生患者は、非北京型の割合が高いが、北京型を細分類した場合は、新興型の割合が高い傾向にあったことから、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。新興型は祖先型よりも感染伝播、発病において優れているとの報告⁸⁾があることから、若年層への結核に関する知識の普及啓発・注意喚起が必要である。

全ゲノム解析を実施することで、VNTR 検査では遺伝系統不明であった株、非北京型まで判明していた株を、より詳細に解析することが可能となった。また、本県では多剤耐性結核菌は検出されていないが、SM や PZA の薬剤耐性遺伝子保有株が検出されたことから、今後の動向に注意が必要である。北京型は薬剤耐性との関連が高いとの研究報告⁹⁾があり、世界的にも感染拡大傾向にあることから、引き続き検査を継続し、県内の状況を把握していく必要がある。

5.まとめ

結核は過去の疾患と思われがちであるが、現在も報告は多く、県内で流行している遺伝系統も変化している。

全ゲノム解析は、VNTR 検査よりも詳細なデータが得られ、解析できることから、疫学情報と組み合わせることで菌株間の関連性を明らかにすることが可能である。

薬剤耐性菌は世界的にも問題となっており、日本でも 2020 年における多剤耐性肺結核患者数は 46 人報告されている¹⁰⁾。薬剤耐性化を防止するためには、適切な治療および服薬が重要となるため、当所では県内の薬剤耐性遺伝子保有状況等を調査し、情報を発信していく必要があると考える。

今後も引き続き菌株および疫学情報を収集・解析し、関係機関へ情報を還元することで感染対策に役立てていきたい。

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 2020 年版
- 2) 岩本朋忠, Kekkaku Vol.84, No.12:755-759(2009)
- 3) 大角晃弘, 複十字 No.392:20-21(2020)
- 4) 茨城県：茨城の結核統計 2015 年版
- 5) 茨城県：結核予防計画(第三次)
- 6) Seto J, Wada T, et al., Infection, Genetics and Evolution 35 : 82-88(2015)
- 7) 岩本朋忠, 複十字 No.329:20-21(2009)
- 8) Hanekom M, et al., J Clin Microbiol.;45: 1483-90(2007)
- 9) Bifani P, et al., Trends Microbiol:10:45-52(2002)
- 10) 厚生労働省：2020 年 結核登録者情報調査年報集計結果について