

JATA(12)-VNTR結核菌型別法による2014年京都府分離菌株の解析

浅井 紀夫 平田 佐知 真田 正稔 鷺見 舞^{*1} 堀 忍^{*1}
中村 清康^{*2} 和田 崇之^{*3} 長谷 篤^{*4}

Analysis by JATA(12)-VNTR Method on Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*
from People in Kyoto Prefecture at 2014

Norio ASAI Sachi HIRATA Masatoshi SANADA Mai SUMI^{*1} Shinobu HORI^{*1}
Kiyoyasu NAKAMURA^{*2} Takayuki WADA^{*3} Atsushi HASE^{*4}

京都府保健環境研究所における行政検査としてJapan Anti-Tuberculosis Association(12)-VNTR結核菌型別解析法を実施するための手法を検討し、行政検査として導入しやすい実用的なプロトコルを完成した¹⁻³⁾。このプロトコルに基づき、2014年4月～2014年12月に当所で分離・保存した菌株24株（山城北保健所管内18菌株、丹後保健所管内6菌株）について型別を調べた。過去に報告した2004年4月～2014年3月に分離された103菌株^{1,2)}と合わせて127菌株についてクラスター分類を行った。今回解析した24菌株のうち5菌株が関連するクラスターは1つ、2菌株が関連するクラスターは3つ、1菌株が関連するクラスターは5つ、合計9クラスターに分類され、16菌株がクラスターに含まれた。4クラスターは前報^{1,2)}で報告したクラスターであり、5クラスターは前報^{1,2)}で報告した103株ではクラスターを形成しなかったが、今回解析した24菌株とクラスターを形成したものであった。なお、今回解析した24菌株のみで新たなクラスターが構成されることはなかった。分類したクラスターについて個別に実地疫学調査を行った結果、管轄する保健所のうち、二つ以上の管内の菌株で構成されるクラスターは7つあり、このうち3つのクラスターについては和田ら⁴⁾の分類した阪神地区において出現頻度の高いJATA(12)-VNTR型別に一致し、広域に分布している可能性が推測され、個別の感染経路については解明できなかった。一方、和田らの分類に一致せず、山城北保健所管内のみの菌株で構成されるクラスターは2つあり、地域特性が高いと推測されたが、感染経路解明には至らなかった。前報^{1,2)}および本報で報告した全てのクラスターのうち構成する菌株数の多いものは、和田ら⁴⁾が、阪神地区で流行しているとしたJATA(12)-VNTR型別と一致する傾向が見られた。

キーワード：結核菌、VNTR、JATA(12)-VNTR、分子疫学、反復数、実地疫学調査

key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Variable Number of Tandem Repeats, Japan Anti-Tuberculosis Association (12)-VNTR, Molecular epidemiology, Repeat number, Field epidemiological survey.

はじめに

菌の潜伏期間が長く、早期発見が困難な結核感染症の対策において、分子疫学的手法は感染経路の解明に重要視されることから、著者らは行政検査としてJapan Anti-Tuberculosis Association(12)-VNTR（以下「JATA(12)-VNTR」という。）結核菌型別解析法を導入するためのプロトコルを検討してきた。前報¹⁾ではゲルトレイ長が15cmのバイオラッド製Sub-Cell[®]GT電気泳動槽を用いて360分間の泳動を行うことにより、アドバンスト製Mupid-2plus電気泳動槽では解析できなかった高分子量域の解析が可能となり、行政検査としての導入が期待される実用的なプロトコルを完成したことを報告した。

このプロトコルを用いて、2014年4月から2014年12月に新

規登録された結核患者の検体から、当所で分離・保存した24菌株（山城北保健所管内18菌株、丹後保健所管内6菌株）について解析を行った。得られた結果を前報¹⁻³⁾で報告した103株を併せて比較・検討し、JATA(12)-VNTR結核菌型別分析において、12の領域すべて、もしくは11の領域で一致するグループ（以下「クラスター」という）を同一クラスターとして分類し、それぞれの型（クラスター型）を構成する菌株について個別の実地疫学調査を行った。

さらに、前報^{1,2)}および本報で報告したすべてのクラスター型について和田ら⁴⁾の報告した阪神地区において出現頻度の高いJATA(12)-VNTR型別（以下「和田らの分類」という）とを比較・検討することにより、京都府内でも同様の流行があると予測される。

材料と方法

1. 供試菌株

2014年4月から2014年12月に新規登録された結核患者から得られた24菌株を用いた。

（平成27年7月31日受理）

*1 京都府山城北保健所

*2 京都府丹後保健所

*3 長崎大学熱帯医学研究所

*4 大阪市立環境科学研究所

2. 実験方法

前報^{1~3)}に示したプロトコルで「JATA(12)-VNTR」の型別を調べた。

3. 実地疫学調査

実地疫学調査は前報^{1~3)}と同様にして行った。既に報告した103菌株との関連についても比較・調査した。

結果

1. JATA(12)-VNTR型別と事例解析

供試菌株24菌株についてJATA(12)-VNTR型別を調べた。菌株番号、発生地域、JATA(12)-VNTR型別およびクラスター型を表1に示す。菌株番号は前報¹⁾で報告した菌株番号に続きNo104からNo127とした。発生地域は菌株の患者所在地を管轄する4つの保健所名で示した。JATA(12)-VNTR型別はJATA1からJATA12の各領域の反復数を「,」で区切り列挙した。前報^{1,2)}で報告した103菌株と併せて検討し、前報で分類したクラスター型と同一型の場合はそのクラスター型に、異なる型の場合は、報告したアルファベットに続いて新しくqからuで分類した。前報^{1,2)}で定義したとおり、11領域で反復数が一致した場合はアルファベットの右肩にダッシュ、ダブルダッシュあるいはトリプルダッシュをふり、同じアルファベットのクラスター型に準ずる菌株とした。

今回解析した24菌株のうち5菌株が関連するクラスターは1つ、2菌株が関連するクラスターは3つ、1菌株が関連するクラスターは5つ、合計9クラスターに分類され、16菌株がいくつかのクラスターに包含された。qからuに分類されたNo91、No103、No47、No90、No61、No81およびNo16については

今回解析した24菌株が加わるにより新しいクラスターを形成した。なお、今回解析した24菌株のみで新たなクラスターは構成されなかった。

クラスター型a、d、h、k、q、r、s、t、uについて実地疫学調査を行った。菌株番号、発生地域、患者間の関連性と、そしてJATA(12)-VNTR型別の12領域もしくは11領域が和田らの調べたJATA(12)-VNTR型別に一致する場合には和田らの分類型別名を、表2に示した。

クラスター型a、d、h、k、q、sおよびuはいずれも山城北管内、中丹西管内あるいは丹後管内の二つ以上の管内の菌株が含まれており、このうちd、h、kについては和田らの分類のJ12-0001、J12-0003、J12-0007に一致した。

一方、クラスター型rおよびtは山城北管内のみの菌株で構成されており、このうちtは和田ら⁴⁾の分類のJ12-0005に一致した。

前報^{1,2)}および本報で報告した全てのクラスター型、構成する菌株数および和田ら⁴⁾の分類型別名を表3に示す。21のクラスターのうち、構成する菌株数が12のクラスター型h、10のクラスター型d、6のクラスター型kはいずれも和田らの分類に一致し、菌株数の多いクラスターは阪神地区で流行しているJATA(12)-VNTR型別に一致する可能性が高いことがわかった。

表1. 2014年度JATA(12)-VNTR型別とクラスター型分類

| 菌株番号(No.) | 発生地域 | JATA(12)-VNTR型別 | クラスター型* |
|-----------|------|-------------------------------------|---------|
| 104 | 山城北 | 4, 3, 3, 3, 3, 5, 4, 3, 7, 7, 4 | |
| 105 | 山城北 | 4, 1, 3, 2, 6, 4, 7, 4, 5, 7, 8, 6 | k'' |
| 106 | 山城北 | 3, 3, 3, 4, 7, 3, 7, 5, 5, 7, 2, 5 | d |
| 107 | 丹後 | 4, 3, 3, 2, 3, 4, 7, 4, 5, 8, 10, 5 | |
| 108 | 丹後 | 1, 4, 10, 3, 9, 2, 2, 4, 4, 7, 7, 2 | |
| 109 | 山城北 | 3, 3, 3, 3, 3, 2, 7, 4, 2, 4, 8, 4 | q |
| 110 | 山城北 | 3, 3, 3, 4, 7, 3, 7, 5, 5, 7, 2, 6 | d' |
| 111 | 山城北 | 4, 3, 2, 2, 7, 3, 7, 4, 4, 7, 10, 5 | t' |
| 112 | 山城北 | 2, 5, 2, 1, 2, 3, 1, 2, 3, 10, 5, 4 | |
| 113 | 山城北 | 4, 1, 3, 2, 7, 4, 7, 4, 5, 10, 2, 7 | |
| 114 | 山城北 | 2, 2, 2, 2, 4, 2, 5, 4, 3, 5, 8, 3 | |
| 115 | 山城北 | 4, 3, 4, 3, 6, 3, 8, 3, 5, 7, 8, 3 | r |
| 116 | 丹後 | 3, 3, 3, 4, 7, 3, 5, 5, 5, 7, 2, 5 | d''' |
| 117 | 山城北 | 3, 3, 3, 4, 6, 3, 7, 5, 5, 7, 2, 5 | d'''' |
| 118 | 山城北 | 4, 3, 3, 2, 7, 3, 7, 4, 5, 7, 10, 5 | t'' |
| 119 | 山城北 | 4, 1, 3, 2, 7, 4, 7, 4, 5, 7, 6, 5 | h'' |
| 120 | 山城北 | 3, 3, 3, 4, 7, 3, 7, 5, 5, 7, 2, 5 | d |
| 121 | 山城北 | 2, 1, 3, 2, 6, 4, 9, 4, 5, 7, 6, 5 | a'' |
| 122 | 丹後 | 1, 4, 9, 3, 8, 1, 2, 4, 4, 7, 7, 2 | |
| 123 | 山城北 | 4, 3, 3, 2, 3, 4, 7, 4, 5, 8, 10, 5 | |
| 124 | 山城北 | 4, 1, 3, 2, 6, 5, 9, 4, 5, 7, 8, 5 | k' |
| 125 | 山城北 | 2, 3, 3, 4, 7, 3, 8, 5, 5, 7, 2, 5 | u |
| 126 | 丹後 | 4, 1, 3, 2, 7, 4, 7, 4, 5, 7, 8, 5 | h |
| 127 | 丹後 | 4, 2, 3, 3, 3, 3, 7, 4, 4, 7, 7, 4 | s |

* JATA(12)-VNTR型別が一致した株を同じアルファベットで分類し、同一のクラスター型とした。また、11領域で一致したものはアルファベットの右肩にダッシュ、ダブルダッシュあるいはトリプルダッシュの記載をし、同じアルファベットのクラスター型に準ずる株とした。クラスター型は前報^{1,2)}で報告した103菌株と併せて検討し前報で分類したクラスター型と同一の場合は前報で定義したクラスター型を示した。

表2. 2004年度から2014年度の菌株についてJATA(12)-VNTR型別から分類したクラスター型ごとの疫学調査結果

| クラスター型 | 菌株番号 | 発生地域 | 患者間の関連性 | 和田らの分類型別名 ^{*1} |
|--------|--------------------|------|---|-------------------------|
| a | No1 | 中丹西 | No1とNo7は同一人物、No121との接触確認できず。 | 該当なし |
| | No7 | 中丹西 | | |
| | No121 | 山城北 | | |
| d | No11 | 中丹西 | No110とNo120は生活圏を同一にするも、接触確認できず。 | J ₁₂ -0001 |
| | No13 | 丹後 | | |
| | No37 | 丹後 | | |
| | No44 | 山城北 | | |
| | No50 | 山城北 | | |
| | No106 | 山城北 | | |
| | No110 | 山城北 | | |
| | No116 | 丹後 | | |
| h | No5 ^{*2} | 山城北 | No40とNo56が同級生の関係以外12人の間で接触確認できず。また、No60とNo88は生活圏を同一にするも接触確認できず。 | J ₁₂ -0003 |
| | No31 | 山城北 | | |
| | No40 | 丹後 | | |
| | No42 | 丹後 | | |
| | No56 | 丹後 | | |
| | No60 | 山城北 | | |
| | No69 ^{*2} | 山城北 | | |
| | No71 | 丹後 | | |
| | No80 ^{*2} | 山城北 | | |
| | No88 | 山城北 | | |
| k | No119 | 山城北 | No83とNo124は過去に生活圏を同一にするも、6人の間で接触確認できず。 | J ₁₂ -0007 |
| | No126 | 丹後 | | |
| | No5 ^{*2} | 山城北 | | |
| | No69 ^{*2} | 山城北 | | |
| | No80 ^{*2} | 山城北 | | |
| q | No83 | 丹後 | No91とNo109は生活圏を同一にするも、3人の間で接触確認できず。 | 該当なし |
| | No105 | 山城北 | | |
| | No124 | 山城北 | | |
| r | No91 | 山城北 | 2人の接触確認できず。 | 該当なし |
| | No103 | 丹後 | | |
| s | No109 | 山城北 | 2人の接触確認できず。 | 該当なし |
| | No47 | 山城北 | | |
| t | No115 | 山城北 | N61とNo111は同居の親子関係。4人の間で接触確認できず。 | J ₁₂ -0005 |
| | No90 | 山城北 | | |
| | No127 | 丹後 | | |
| u | No61 | 山城北 | 2人の接触確認できず。 | 該当なし |
| | No81 | 山城北 | | |
| | No111 | 山城北 | | |
| | No118 | 山城北 | | |
| | No16 | 中丹西 | | |
| | No125 | 山城北 | | |

*1：和田⁴⁾らの分類した阪神地区における出現頻度の高いJATA(12)-VNTR型別名
 *2：No5、No69およびNo80についてはkであるとともに、h¹⁾であるのでクラスターhにも分類される。

表3. 2004年度から2014年度菌株のクラスター型と構成する菌株数および和田らの分類型別名

| クラスター型 | 構成する菌株数 | 和田らの分類型別名 [*] |
|--------|---------|------------------------|
| a | 3 | 該当なし |
| b | 5 | 該当なし |
| c | 4 | 該当なし |
| d | 10 | J ₁₂ -0001 |
| e | 3 | J ₁₂ -0006 |
| f | 2 | 該当なし |
| g | 2 | 該当なし |
| h | 12 | J ₁₂ -0003 |
| i | 2 | 該当なし |
| j | 2 | 該当なし |
| k | 6 | J ₁₂ -0007 |
| l | 2 | 該当なし |
| m | 2 | 該当なし |
| n | 3 | J ₁₂ -0004 |
| o | 2 | J ₁₂ -0016 |
| p | 2 | 該当なし |
| q | 3 | 該当なし |
| r | 2 | 該当なし |
| s | 2 | 該当なし |
| t | 4 | J ₁₂ -0005 |
| u | 2 | 該当なし |

*：和田⁴⁾らの分類した阪神地区における出現頻度の高いJATA(12)-VNTR型別名

考察

2014年度にJATA(12)-VNTR型別を調べた菌株が含まれる9つのクラスターの実地疫学調査を行ったが、感染経路について解明することができた事例はなかった。前報¹⁾では2つのクラスターについて感染経路解明に成功し、結核対策上有用な科学的根拠を与えることができた。これらの2つのクラスターはいずれも和田ら⁴⁾の分類に一致せず、構成する菌株も単一管内の菌株のみで構成されており、極めて地域特性の強いクラスターと推測した。今回、新たに分類されたクラスター型rは上記条件に合致していたが、構成する菌株は2菌株で十分な疫学調査ができず事例解明には結びつかなかった。前報¹⁾にて報告したクラスターでは和田ら⁴⁾の分類に一致しないクラスターは、全て山城北管内あるいは丹後管内のどちらかの菌株のみで構成されており、地域特性の強い傾向があったが、今回の報告では、和田らの分類に一致しない5つのクラスターのうち4つのクラスターは2つ以上の保健所管内の菌株で構成されており、和田ら⁴⁾の分類と地域特性との関連について疑問が残った。また、これら4つのクラスターの構成する菌株は全て11領域での一致であった。田丸ら⁵⁾はJATA(12)-VNTR型別において11領域の一致する場合が、集団感染事例の10.2%、非集団感染事例の1.6%でみられたことから、この場合にも感染関係が成立するケースが多いと推論している。しかし、11領域の一致に関する報告は他になく、再燃などによる遺伝子変異を除いて、慎重に調査を行う必要があると推測される。

多くの菌株で構成されるクラスターのJATA(12)-VNTR型別は、和田らが阪神地区で流行していたとしたJATA(12)-VNTR型別と一致し、京都府内でも同様の型別の流行があると予測される。しかし、当所の報告は127菌株のみであり、調査した地域も限られたものである。和田ら⁴⁾の分類も2007年から2008年に大阪市、大阪府および神戸市において新規登録された結核患者に限定された報告である。そのため、近畿全域での流行および京都府の流行を議論するためにはさらに

データの蓄積が必要と考えられる。平成27年度からは地方衛生研究所全国協議会近畿支部が中心となり、滋賀県、大阪府、兵庫県、奈良県、京都市、大阪市、堺市、東大阪市、神戸市、尼崎市、姫路市の過去からのJATA(12)-VNTR型別検査結果のデータベース化を開始している。情報が集積すれば、得られた結果を比較・検討することによりさらに詳細な状況が解明され、結核対策上重要な知見が得られると期待される。

謝辞

本研究にあたり実地疫学調査に協力いただいた京都府保健所の職員の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 浅井紀夫, 平田佐知, 真田正稔, 鷺見舞, 堀忍, 中村清康, 和田崇之, 長谷篤. 2014. 京 JATA (12)-VNTR結核菌型別解析法の検討と京都府分離菌株の解析結果. 京都府保健環境研究所年報, 59, 8-12.
- 2) 浅井紀夫, 杉浦伸明, 真田正稔, 堀忍, 中村清康, 和田崇之, 長谷篤. 2013. 京都府分離結核菌株のJATA(12)-VNTR型別解析. 京都府保健環境研究所年報, 58, 6-11.
- 3) 浅井紀夫, 杉浦伸明, 真田正稔, 和田崇之, 長谷篤. 2012. 結核菌の分子疫学解析における Variable Numbers of Tandem Repeats(VNTR)法の検討. 京都府保健環境研究所年報, 57, 18-21.
- 4) 和田崇之, 田丸亜貴, 岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子, 小向潤, 松本健二, 長谷篤. 2013. 複数自治体をまたぐ広域的結核分子疫学の基礎構築. 結核, 88, 393-398.
- 5) 田丸亜貴, 和田崇之, 岩本朋忠, 長谷篤. 2013. JATA(12)-VNTR型別による結核集団発生事例の菌株異同調査. 結核, 84, 783-794.