

結核菌の遺伝子型別について —VNTR からみる札幌市の結核—

石黒真琴 菊地正幸 東田恭明 三觜 雄

1. 結 言

結核は、新規登録患者数が 2016 年に全国で 17,625 人、札幌市内で 160 人発生しており、未だ重大な感染症の一つである。札幌市では、結核菌の分子疫学調査の方法として 2009 年から VNTR 法を実施している。2011 年からは札幌市の結核菌分子疫学事業事務取扱要領の改訂を受け、市内で発生した肺結核患者の分離菌株全株の VNTR 法による検査が可能となった。

今回、2017 年度に分離された菌株及び過去に分離された菌株の VNTR データについて、患者の年齢階級や居住区等の疫学情報と合わせて解析を行い、札幌市における結核の流行状況についてまとめたので報告する。

2. 方 法

2-1 供試菌株

1999 年～2018 年 2 月に札幌市の医療機関において分離された結核菌株（1999 年～2011 年までは分子遺伝子調査を行うことに同意が得られた菌株、それ以降は分離された結核菌全株）1,012 株を用いた。

2-2 鋳型 DNA の調製

固形培地の場合はプラスチックループを用いてコロニーを 1 白金耳程度掻き取り、液体培地の場合は菌塊を滅菌スポイトで採取し、滅菌精製水 300 μ L を入れた 1.5mL チューブに懸濁した。菌懸濁液の入った 1.5mL チューブを 100 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 10 分間加熱後 13,000rpm で 10 分間遠心し、その上清を鋳型 DNA とした。

2-3 VNTR 型別解析

PCR 反応は結核菌 VNTR ハンドブックの方法に準じ、国内標準法とされる JATA(12)-VNTR 分析法の 12 領域を基本とし、JATA(15)-VNTR 分析法の 3 領域、超可変領域の 3 領域を加えた計 18 領域について実施した。電気泳動にはキャピラリー電気泳動装置 QIAxcel (QIAGEN) を用いた。

2-4 系統分類解析

系統解析には、VNTR 型から最大事後確率(maximum a posteriori: MAP) 推定法により北京型株・非北京型株の区別と北京型株の細分類化を実行するプログラム¹⁾を用いた。

3. 結果と考察

3-1 年齢階級

2017 年度(2017 年 4 月～2018 年 2 月、72 株)と 1999 年～2018 年 2 月(蓄積データ、1,012 株)の VNTR 検査を実施した結核菌株について、年齢階級の割合を図 1 に示す。2017 年度と蓄積データともに 80 歳代が割合として最も多く、70 歳代以上で 6 割以上を占めていた。高齢者が多いのは全国と同様の傾向であった²⁾。

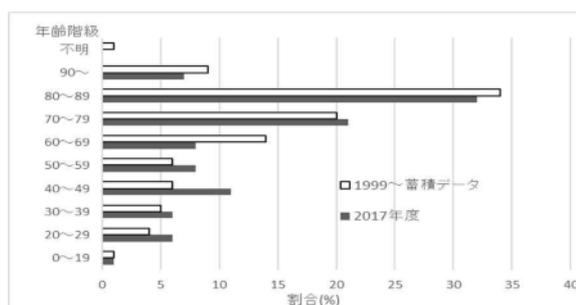


図 1 年齢階級別 VNTR 検査数割合

3-2 北京型別・系統推定結果

北京型は東アジアで分離される結核菌の多くが属する遺伝子型で、日本の臨床分離株の7～8割がこの遺伝子系統に属しており、高病原性が示唆されている。北京型のうち新興型は、感染伝播・発病において祖先型よりも優れ、集団感染を起こしやすい系統と考えられている^{3,4)}。結核菌培養陽性全株について VNTR 検査が可能となった 2011 年度以降と 2010 年度以前で区別し、各年度での北京型及び、北京型のうち新興型の割合を表 1 に示した。蓄積データでは北京型が 71.7%、北京型のうち新興型の割合が 14.8%となり、全国の平均(北京型 73.8%、新興型 18.3%)⁵⁾と比べるとやや低めという結果であった。また、2017 年度は北京型が 72.2%、新興型が 23.1%となった。2017 年度は蓄積データと比べ新興型の割合が高かったが、各年度で北京型・新興型の割合にばらつきがあり、経時的な増加傾向はみられなかった。2017 年度の新興型の増加傾向が一過性のものかどうか次年度以降も確認していく必要がある。

表 1 年度別系統分類割合

年度	北京型 (%)	新興型 (%)
1999～2017 蓄積データ	71.7	14.8
2017	72.2	23.1
2016	76.1	10.4
2015	76.5	17.3
2014	73.4	17.0
2013	68.5	16.1
2012	66.4	9.3
2011	73.1	17.7
<=2010	70.5	12.4

また、年齢階級ごとの北京型と新興型の割合を図 2 に示す。北京型は 70 歳代以上では 75%程度、70 歳代未満ではばらつきはあるが平均すると 65%程度と

なり、70 歳代以上のほうがやや高い傾向を示した。北京型のうち新興型の割合については、高齢層で低く若年層で高い傾向がみられた。集団感染を引き起こしやすいとされる新興型が行動範囲の広い若年層で多いということについては結核対策の観点から考えると重要な問題であり、今後も注意が必要である。

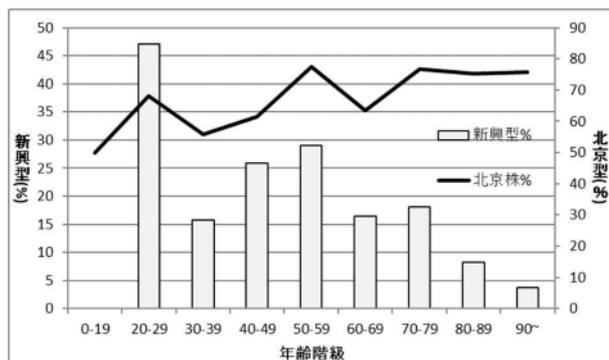


図 2 年齢階級別 北京型と新興型の割合

3-3 居住区別概要

居住区別の人口(平成 28 年 10 月統計)及び VNTR 検査数(2011 年以降)の割合を図 3 に示す。それぞれの割合が類似していたことから、本市では人口に対し一定程度の割合で結核患者が発生しているという状況が考えられた。

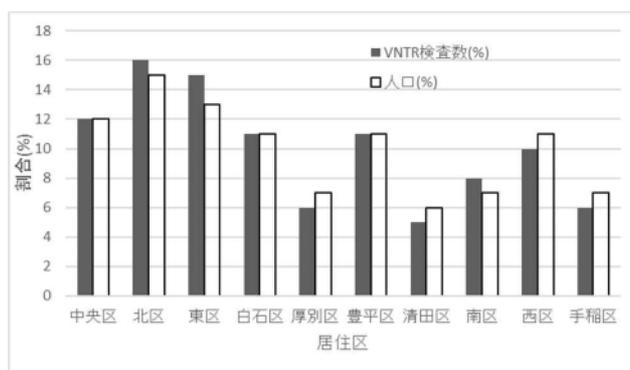


図 3 居住区別 人口と VNTR 検査数の割合比較

また、居住区別の患者の年齢階級の割合を図 4 に示す。各区とも 70 歳代以上が半数以上を占めており、これは 3-1 で示した全体の年齢割合と同様の結果であった。

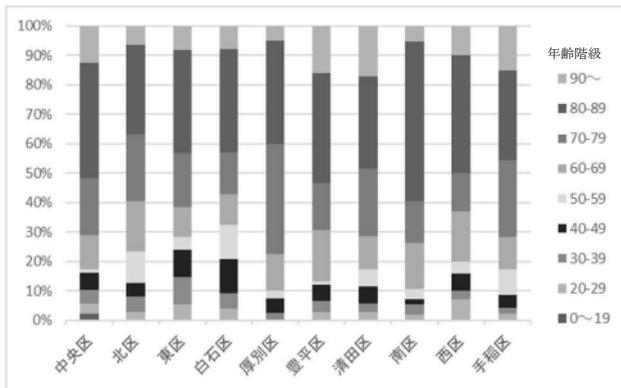


図4 居住区別 年齢階級割合

居住区別の北京型及び新興型の割合について図5に示す。区により多少のばらつきはみられるが大きな差はみられなかった。検体数が少ない区もあるため現時点で特定の傾向があるとは言えないと思われる。

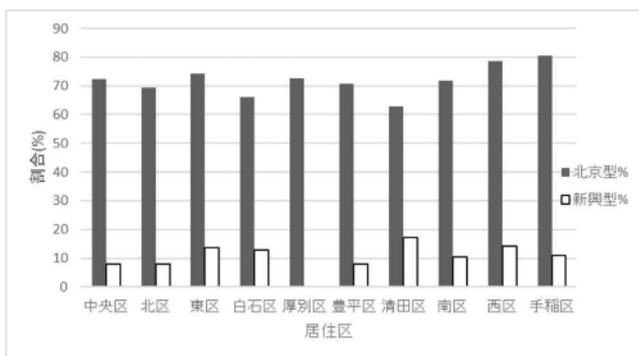


図5 居住区別 北京型株及びそのうち新興型株の割合

以上から、札幌市では特定の地域における結核の流行はみられないと考えられた。

3-4 外国籍患者概要

外国籍の患者から分離された結核菌株について、概要を表2に示す。1999年以降の札幌市における外国籍の結核患者から分離された結核菌株は7か国11株確認されており、全体の約1%であった。これらの外国籍患者由来株で他の株とVNTR型が一致しているものはなく、外国籍患者の結核の流行への影響はみられなかった。しかし外国籍患者の出身国

は、いずれも結核の高負担国または推定罹患率が高い国であり、その中でもA国株についてはすべて集団感染を引き起こしやすいとされる、北京型のうちの新興型であった。また、外国籍患者の職業、年齢をみると、学生や常用勤労者が多く、年齢も39歳までの若年層のみであった。今後、外国からの留学生や技能実習生などの労働者はますます増加すると予想される。一般的に結核は低蔓延状態になってからそのまま順調に罹患率が減少することは少なく、結核罹患率の高い国からの外国人の流入が結核罹患率の減少を鈍化させる一因となっている⁶⁾。結核登録者情報調査年報集計結果²⁾によると、全国的にも外国生まれ結核患者の登録数は年々増加しており、特に若年層での新登録結核患者における外国生まれの割合は多い。そのため、引き続き結核患者の発生動向を注視する必要がある。

表2 外国籍患者から分離された結核菌株の概要

出身地域	株数	北京型別	系統推定
東アジア A国	5	北京型 (5/5)	新興型 (5/5)
南アジア B国	1	北京型	祖先型
東南アジア C国	1	非北京型	—
東アフリカ D国	1	非北京型	—
東アフリカ E国	1	非北京型	—
中部アフリカ F国	1	非北京型	—
南部アフリカ G国	1	非北京型	—

職業	株数	年齢	株数
高校以上の生徒学生等	5	0~19	1
その他の常用勤労者	4	20~29	4
無職	2	30~39	6

4. 結 語

札幌市において届出のあった結核患者のうち2018年2月までにVNTR検査を行った菌株について、年齢階級や居住区、外国籍の疫学情報とVNTR型をあわせてデータをまとめた。年齢階級は70歳代

以上で 6 割以上を占めており全国と同様に高齢者が多い傾向であった。VNTR 型から系統分類した結果、全体では北京型の割合が 71.7%、新興型の割合が 14.8%となり、全国の平均と比べると北京型、新興型ともにやや低めという結果となった。居住区別では、特異的な傾向はなく、特定の区における結核の流行はみられなかった。また外国籍患者については、現時点では結核の流行に対する影響はみられなかった。

今後も検査精度を高めるとともにデータを蓄積し、札幌市における結核の発生状況・分布状況の把握や集団発生時の感染源の特定など、結核対策に役立てていきたい。

謝辞：ご協力いただきました保健所感染症総合対策課結核対策係の皆様へ深謝致します。

5. 文 献

- 1) Seto, J, Wada, T, Iwamoto, T. et. al: Infect. Genet. Evol. **35**, 82-88, 2015
- 2) 厚生労働省：結核登録者情報調査年報集計結果
- 3) Hanekom, M. et. al: J. Clin. Microbiol. **45**, 1483-1490, 2007
- 4) Wada, T. et. al: Tuberculosis. **89**, 252-255, 2009
- 5) Iwamoto, T, Fujiyama, R, Yoshida, S. et. al: J. Clin. Microbiol. **47**, 3340-3343, 2009
- 6) 石川信克：日本公衛誌. **55**(11), 791-794, 2008