

【短報】 感染症発生動向調査事業への

結核菌 VNTR 解析導入に向けた研究

河合優子 中野剛志 後藤考市 塩野雅孝 松井孝男* 櫻井昇幸**

A study toward introduction of VNTR analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to infectious disease surveillance project in Gunma

Yuko KAWAI, Tsuyoshi NAKANO, Koichi GOTO, Masataka SHIONO,
Takao MATSUI, Nobuyuki SAKURAI

群馬県内で分離された結核菌株を収集し、VNTR 解析を実施したところ、株間の関連性が示唆される事案が複数検出された。また、実地疫学調査から結核集団感染を疑った事例において、得られた菌株の VNTR 解析を実施したところ、解析パターン一致により株間の関連性について科学的な根拠を与えることができた。このような具体的な活用例を広く情報提供することにより、結核菌サーベイランスの必要性について理解が得られ、平成 28 年 1 月より群馬県感染症発生動向調査の一環として「群馬県結核菌サーベイランス」事業が施行となった。

Key words : VNTR 解析、結核菌サーベイランス、遺伝系統推定

1. はじめに

我が国における結核患者数は、緩やかではあるが減少傾向にある。しかしながら依然として結核が我が国における最大の慢性感染症であることに変わりはなく、今後も結核対策の手を緩めることは出来ない状況である。

国は低蔓延に向けた結核対策の再構築として、平成 23 年 5 月に「結核に関する特定感染症予防指針」を改正し、国及び都道府県等が取り組むべき結核対策の課題のひとつとして、分子疫学的手法からなる病原体サーベイランス体制の構築について明記した。これを受け当所でも平

成 23 年度から一般研究として、結核菌の分子疫学的解析手法の一つである VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 解析に関する研究を開始した。しかし研究では収集できる菌株に限りがあり、また個々の菌株について詳細な疫学情報を入手することは困難であることから「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (以下、感染症法)」第 15 条に基づく積極的疫学調査の一環として事業化し、疫学情報を加味した解析を行っていくことが望ましい。

そこで、これまで一般研究として行ってきた VNTR 解析について規模を拡大して実施し、データを蓄積していくとともに、事業化を見据えたサーベイランス体制の構築を目的として本研究を行った。

* 独立行政法人国立病院機構 渋川医療センター (旧称 西群馬病院)

** 群馬県健康福祉部保健予防課

2. 方法

2.1. VNTR 解析の有用性及び利用方法の検討

2.1.1. 材料

平成 23 年 10 月から平成 28 年 1 月までに県内医療機関等から収集した結核菌株を供試菌株とした。

表 1 に示したとおり、計 150 件の結核菌株を収集し、小川培地上で発育不良が認められた 8 件を除いた 142 件について、VNTR 解析を実施した。

表 1 供試菌株

菌株収集年度	供試菌 件数			計	VNTR 実施件数
	西群馬病院	他			
		行政	医療機関		
平成23年度	10	1	1	12	11
平成24年度	20	0	0	20	20
平成25年度	20	0	0	20	18
平成26年度	30	3	0	33	31
平成27年度	62	1	2	65	62
計	142	5	3	150	142

2.1.2. 菌株同定・VNTR 解析

供試菌株を 2% 小川培地に滴下し 35°C で培養し、発育したコロニーから熱抽出法により DNA を抽出し、結核菌群であることを確認 (Nakajima et al., 2010) した後、「結核菌 VNTR ハンドブック (第一版および追補版)」 (地方衛生研究所全国協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループ編) に従い、キャピラリーシークエンサーを利用した VNTR 解析を実施した。

2.1.3. 完全一致・類似パターンの検出

VNTR 解析により得られた個々のデータを「VNTR24 簡易解析ソフト」を用いて比較し、完全一致、1 領域違い、2 領域違いの菌株の存在を検出した。

2.1.4. 遺伝系統推定

VNTR 解析結果の傾向からは、その菌株の遺伝系統群推定 (北京型か否かの推定、北京型 MLST 型別の系統群推定) が可能とされている

(Wada et al., 2009)。「TB MAP estimation (遺伝系統推定マクロ)」(Seto et al., 2015) を用いてそれぞれの遺伝系統を推定した。

2.2. サーベイランス体制の検討

2.2.1. データ管理方法の検討

近県の自治体等の状況を確認し、当県でのデータ管理方法を検討した。

2.2.2 流行状況把握への利用

解析結果と疫学情報を一元管理することにより、株間の関連性を見出し、結核菌の伝搬経路解明を試みた。

3. 結果

3.1. VNTR 解析の有用性及び利用方法の検討

3.1.1. 集団感染の科学的証明

集団感染の科学的証明として解析を実施した 3 事例、9 件については、事前に得た疫学情報を加味した解析を行い、菌株間の関連性について明確な判断を行うことができた。

【事例 1：施設内集団感染疑い】

ある施設において、一定期間内に複数名の結核患者が発生し、うち 3 名から菌が分離されたため VNTR 解析を実施した。2 名は 24 領域完全一致、1 名は 1 領域違いであり、疫学情報から同一感染源であると判断した。2 年後にもう 1 名、初発患者と同室歴のある結核患者が発生し、VNTR 解析の結果、完全一致であった。

【事例 2：地域での感染伝搬疑い】

同一保健所管内で一年間に 5 名の結核患者が発生し、疫学情報から関連性が疑われたため VNTR 解析の依頼があった。しかし収集できた菌株は 5 名中 3 名分のみ (結核菌は BSL3 であるため 2 名分は既に廃棄されていた) であり、解析結果は 2 名が完全一致、1 名は全く異なっていた。

【事例 3：医療機関からの依頼】

免疫抑制剤を使用している患者が結核を発症した。患者の義理の父は結核で別の医療機関に入院中だが、患者とはほとんど接触はないとのこと。ただ念のため関連性について調べて欲しい、との依頼を受けた。VNTR 解析の結果は完

全一致であった。

3.1.2. 完全一致・類似パターンの検出

結核菌サーベイランスとして、142 件全ての VNTR 解析結果を比較したところ、24 領域完全一致もしくは類似により、関連性を疑う事例が 17 例発見された。

3.1.3. 遺伝系統推定

マクロを利用した遺伝系統推定により、当研究に用いた結核菌株は、非北京型 48 件（34%）、北京型 94 件（66%）であることがわかった（表 2）（図 1）。

北京型結核菌は日本を含む東アジア地域の高蔓延株であり、世界で分離される結核菌の約 3 割、また我が国で分離される結核菌の約 8 割がこの遺伝系統に属するといわれている。今回の研究で解析を実施した菌株については、全国平均と比較してやや北京型の割合が低かった。

表 2 遺伝系統推定結果（株数）

非北京		48
北京	ST11/26	2
	STK	26
	ST3	26
	ST25/19	21
	Modern	19

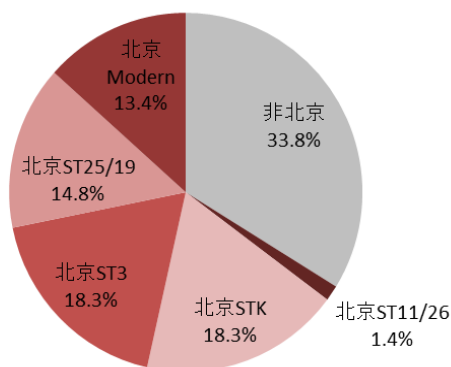


図 1 遺伝系統群別割合

3.2. サーベイランス体制の検討

3.2.1. データ管理方法の検討

近県 4 県への聞き取り調査では、4 県全てが Excel によるデータ管理を行っていることがわかった。また、平成 26 年に厚労省から公表された、先駆的に VNTR 解析を行っている 32 の

自治体を対象としたアンケート調査では、72% の自治体が Excel 等の表形式でデータ管理をしている、との結果であった。このことを踏まえ、本県でも Excel を用いて「結核患者届出情報」「菌株属性情報」「VNTR 解析結果」それぞれのデータ管理を行った。また、それらのデータを一元的に管理すべく、データベース構築に取り組んでいくこととした。

3.2.2. 流行状況把握への利用

VNTR 解析結果から関連性が疑われた患者間の疫学情報を詳細に検討した結果、いくつかの事例について患者間の関連性（伝搬経路）を確認することができた。

4. 考察

事業化に向けての取り組みということで、これまで以上に菌株提供を受けられるよう、協力医療機関等に働きかけることができた。

集団感染の科学的証明として実施した解析では、疫学情報を加味した VNTR 解析の有用性と、現体制における課題が浮き彫りとなった。

事例 1 では、数年後に届出となった 1 名についても他の 3 名と同一感染源であると判断することができた。事例 2 では、完全一致であった 2 名は同一感染源と判断されたが、菌株を収集することが出来なかった 2 名については関連性を確認することができなかった。行政による菌株確保の重要性を再認識した事例であった。また、事例 3 では、VNTR 解析一致という科学的証拠と患者疫学情報との双方を総合的に判断する重要性を感じた。

これらの事例について、当所の業績発表会や日本結核病学会関東支部学会、結核行政担当者会議等の場で情報提供することにより、本研究での経験・実績と、事業化の必要性が認められ、平成 28 年 1 月 12 日より、感染症法に基づく感染症発生動向調査事業の一環として「群馬県結核菌サーベイランス」が施行されたことが、当研究の最大の成果であると考えられる。

研究を進めるにあたって発生した①迅速な行政による菌株確保、②患者疫学情報の収集、③具体的な実施手順に関する取り決め（要領やマ

ニユアル等の策定)、④結核対策に有用な情報還元方法、等の課題について、研究段階で関係機関との連絡調整等を図り対処していったことにより、円滑に事業への移行がなされた。

また、事業として結核菌サーベイランスが施行されたことにより、当研究で収集・解析した供試菌株に氏名が提供され、また感染症発生動向調査システムに入力された患者届出情報とのリンクが認められた。そのことにより、VNTR解析結果から関連性を疑ったいくつかの単発事例に関しては伝搬経路を解明することができた。ただ、複数名の関連性が疑われる事例については、届出情報だけでは同一感染源の証明には不十分で、より詳細な実地疫学情報が必要であったため、患者を管轄する保健所に追加調査を依頼し、判断したい。

当研究で得たデータをベースに、今後は事業として結核菌 VNTR 解析に取り組み、本県の結核対策に貢献していきたい。

謝辞

菌株提供にご協力いただきました西群馬病院の皆様、VNTR24 簡易解析ソフトをご提供いただきました宮城県保健環境センター微生物部 畠山敬様、TB MAP estimation (遺伝系統推定マクロ) をご提供いただきました山形県衛生研究所微生物部 瀬戸順次様、サーベイランス体制構築に関するご意見をいただきました自治研究グループ「結核を考える会」の皆様、「群馬県病原微生物情報研究会」の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

- Nakajima, C., Rahim, Z., Fukushima, Y., Sugawara, I., van der Zanden, A.G., Tamaru, A., Suzuki, Y., 2010: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Bangladesh by a species distinguishable multi-plex PCR, *BMC infectious diseases*, **10**(1), 1.
- Seto, J., Wada, T., Iwamoto, T., Tamaru, A., Maeda, S., Yamamoto, K., Hase, A., Murakami, K., Maeda, E., Oishi, A., Migita, Y., Yamamoto, T.,

Ahiko, T., 2015: Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation, *Infection, Genetics and Evolution*, **35**,82-88

Wada, T., Iwamoto, T., 2009: Allelic diversity of variable number of tandem repeats provides phylogenetic clues regarding the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family, *Infection, Genetics and Evolution*, **9**(5), 921-926