

千葉県における結核菌の分子疫学的解析

蜂巢友嗣,橋本ルイコ,横山栄二,岸田一則

Yushi HACHISU, Ruiko HASHIMOTO, Eiji YOKOYAMA, Kazunori KISHIDA

Molecular epidemiological study of *Mycobacterium tuberculosis* in Chiba Prefecture

要旨

千葉県内在住の結核患者から分離された結核菌株 804 株の Large Sequence Polymorphisms (LSPs) 解析及び Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) 解析を実施した。LSPs 解析の結果 74.9%が East-Asian lineage, 19.9%が Euro-American lineage, 5.1%が Indo-Oceanic lineage, 0.1%がその他の lineage であった。また、VNTR 解析において 34.2%の結核菌がクラスターを形成した。lineage 別では East-Asian は 41.2%、Euro-American は 12.5%、Indo-Oceanic は 17.0%がクラスターを形成し、我が国で最も多い East-Asian は他の lineage と比較し有意に高いクラスター形成率であった。また就業世代の結核は、East-Asian のある特定の subgroup が大きく関わっていることが明らかとなった。この subgroup の結核菌は世界中で感染の広がりが危惧されており、千葉県においても同様にその広がりが危惧される。

はじめに

現在、日本における結核の罹患率の低下には鈍化が見られる¹⁾。高齢者における結核に限らず、30代、40代といった働き盛りの世代の結核も問題となっている。千葉県には患者の 75%が 60 歳以上の地域があり、高齢者の結核が中心となっている地域がある一方、患者の 60%が 60 歳未満で就業世代の結核の拡大が懸念される地域がある。また、県全体の新規登録患者の 3.7%を外国籍患者が占める。このように千葉県の結核感染には様々な背景があり、我々は県内の結核発生の予防、または結核の発生の状況・動向を把握するために県内在住結核患者から分離された結核菌の分子疫学的解析を実施している。

その解析法の 1 つは Large Sequence Polymorphisms (LSPs) といわれる結核菌の遺伝子欠損領域の違い (Region of Difference: RD) により結核菌を分類する手法で、これによって結核菌を 6 つの lineage に大別できる⁶⁾。国や地域によって分離される結核菌の lineage には偏りがあることが知られているが、日本におけるそれぞれの lineage の分布状況の詳細な報告はない。

もう 1 つの解析法は Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) 解析といわれる、結核菌ゲノム内に存在する数十～百数十塩基の繰り返し配列数を測定し菌株を識別する手法で、この解析法は菌株の一致、不一致といった識別に優れており、どの患者間で感染が生じたかの推察が可能でありその有用性が明らかとなっている⁷⁾。

今回我々は上記の解析によって千葉県における結核感染にどのような遺伝系統の結核菌が関わっているかを明らかにした。

材料および方法

1. 供試菌株

2008 年 1 月以降に千葉県衛生研究所に搬入された、県内在住結核患者 804 名から分離された結核菌 804

株を供した。

2. LSPs 解析

RD を既報^{2,4,6)}に従い検査し、East-Asian、Indo-Oceanic、East-African-Indian、West-African1、West-African2 もしくは polyketide synthase(pks15/1) 遺伝子に 7bp の欠損が認められる Euro-American の 6 つの lineage に分類した²⁾。

3. VNTR 解析

解析領域、方法は既報のとおりである⁸⁾。Tandem Repeat を持つ 23 の領域を PCR により増幅し、シーケンサー (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems) によりフラグメントの長さを測定した。VNTR プロファイルは BioNumericsVer.5 (Applied Maths) に入力し、Pearson の相関係数で類似度算出を行い UPGMA によってクラスター解析し、類似度 95% 以上を同一クラスターとした。そして Supply らが提唱する 15 の領域⁹⁾で Categorical 係数による Minimum Spanning Tree (MST) を作成した。Warren らの PCR 法¹¹⁾によって供試菌を Beijing 型、non-Beijing 型結核菌に分類し、Beijing 型結核菌を MST での complex に従い 5 つの subgroup (B1~B5)^{3,10)}に分類した。

結果

1. LSPs 解析

供試した 804 株は East-Asian が 602 株 (74.9%)、Euro-American 160 株 (19.9%)、Indo-Oceanic 41 株 (5.1%)、その他 East-African-Indian が 1 株確認された。West-African1 及び West-African2 は確認されなかった。外国籍患者由来株は 32 株あり、内訳は East-Asian 14 株、Euro-American 6 株、Indo-Oceanic 11 株、East-African-Indian 1 株であった。これら外国籍患者から分離された結核菌は、患者の出身地域で分離頻度の高い lineage⁶⁾であった (表 1)。

East-Asian と Euro-American は日本人患者由来がほとんどを占め、患者居住地域、患者年齢、患者の性の偏りは認められなかった。

表 1 : lineage 別割合および各 lineage における外国籍患者の割合

lineage	全体 (%)	外国籍患者 (%)	外国籍患者の出身地
East-Asian	602 (74.9)	14 (2.3)	韓国 5、中国 3、ネパール 2、 モンゴル 1、ミャンマー 1、 タイ 1、ベトナム 1
Euro-American	160 (19.9)	6 (3.7)	韓国 2、フィリピン 2、 中国 1、ウガンダ 1
Indo-Oceanic	41 (5.1)	11 (26.8)	フィリピン 10、インド 1
East-African-Indian	1 (0.1)	1 (100)	インド 1
West-African1	0	0	
West-African2	0	0	
合計	804 (100)	32 (4.0)	

2. VNTR 解析

275/804 株 (34.2%) の株がクラスターを形成した。lineage 別では East-Asian 248/602 株 (41.2%)、Euro-American 20/160 株 (12.5%)、Indo-Oceanic 7/41 株 (17.0%) がクラスターを形成し、East-Asian は他の lineage と比較し有意にクラスター形成率が高かった(表 2)。患者の年齢が明らかな 797 株について、患者年齢別にクラスター形成率を比較すると 30 歳未満の患者由来株は 43.9% (36/82)、30~59 歳の患者由来

株は 44.8% (147/328) と 40%を超えるのに対し、60 歳以上の患者由来株は 23.0% (89/387) と有意に低かった。

MST による Beijing 型結核菌の 5 つの subgroup において、B4 以外の subgroup は 60 歳以上の患者の占める割合が高かったが、B4 は患者年齢 60 歳未満の就業世代の分離比率が他の subgroup と比較し有意に高かった(表 3)。

表 2 : lineage 別クラスター形成率

lineage	全体	クラスターした株 (%)	East-Asian との比較*
East-Asian	602	248 (41.2)	
Euro-American	160	20 (12.5)	P=1.06×10 ⁻¹¹
Indo-Oceanic	41	7 (17.0)	P=0.0022
East-African-Indian	1	0	
West-African1	0	0	
West-African2	0	0	
合計	804	275 (34.2)	

*Fisher の正確確率検定による

表 3 : subgroup 別患者年齢層別の分離株数

Subgroup	~29	30~59	60~	B4 との比較*
B1	10	37	60	P=0.0003
B2	8	35	49	P=0.002
B3	3	43	51	P=0.0001
B4	26	86	52	
B5	4	13	21	P=0.03

*Fisher の正確確率検定による

考察

今回、我々の解析では分離菌の75%が East-Asian であった。これまで国内で分離された結核菌の7~8割が Beijing 型と報告¹⁰⁾されている。East-Asian はその大部分を Beijing 型結核菌が占めており、我々の解析では East-Asian の中で Beijing 型は602株中593株であった(データ非表示)。また Euro-American が全体の20%を占め、East-Asian 以外の結核菌では80%であった。Euro-American も日本人患者が大多数であることから East-Asian 同様千葉県に定着していると考えられた。

East-Asian と Euro-American には患者の居住地域、性差、年齢差がない(データ非表示)にもかかわらずクラスター形成率に有意差が認められた。Beijing 型結核菌は高い感染力を有するという報告¹³⁾もあり、East-Asian が主体の国では Euro-American が主体の欧米諸国よりも強力な結核対策を行わなければ結核罹患率の低下も、低罹患率の維持も困難である可能性が示唆された。

East-Asian の中でも特に subgroup B4 に属する Beijing 型結核菌の患者年齢60歳未満の就業世代での分離比率が有意に高かった。B4 は Beijing 型結核菌の中でも modern type といわれ、世界中で大規模な集団発生を引き起こしている Beijing 型結核菌¹²⁾はこの modern type である。また、modern type の Beijing 型結核菌は感染伝播力・発病率が高いと報告されている⁵⁾。この subgroup の Beijing 型結核菌が千葉県において30代、40代といった世代の結核蔓延に大きく関わっていることが明らかとなり、結核罹患率の低下の鈍化にも関与していると示唆された。

外国籍患者から分離された結核菌は、患者の出身地で分離頻度の高い lineage⁶⁾の結核菌であり、クラスターも形成しないことから感染は来日前に起きていたと考えられ、East-African-Indian、West-African1、West-African2 といった lineage は千葉県には定着していないと考えられた。患者間の関連性、つまり菌株間の一致、不一致といった識別には VNTR 解析が有効であるが、LSPs 解析という結核菌の6つの lineage 大別であっても患者の感染源の推測に有用となった。

高齢者の結核はこれまで、再燃によるものが多いと考えられてきた。今回の VNTR 解析において、患者年齢でクラスター形成率を比較すると有意に高齢患者由来株ではクラスター形成率が低下した。患者の結核発症が再燃である場合、感染は何年、何十年も過去であるためクラスター形成率は当然低くなり、今回の解析によって高齢者の結核が再燃によるものが多いことを裏付けた。一方、初発感染による発症と考えられる若齢者の結核でクラスターが形成されない場合、すなわちそれは若齢患者の感染源となっ

た患者株の未解析を意味し、その要因を今後検討する必要がある。

日本における罹患率の低下の鈍化は結核対策の変化を要求しているサインと考えられる。分子疫学的解析は感染源、結核菌の遺伝的系統による感染力の違いによる危険度、初発と再燃の鑑別等についての考察を可能とし、新たな結核対策の構築を可能とする。

参考文献

- 1) 財団法人結核予防会:結核の統計 2009.
- 2) Thwaites, G.E., M. Caws, T. T. H. Chau, A. D'Sa, N. T. N. Lan, M. N. T. Huyen, S. Gagneux, P. T. H. Anh, D. Q. Tho, E. Torok, N. T. Q. Nhu, N. T. H. Duyen, P. M. Duy, J. Richenberg, C. Simmons, T. T. Hien, and J. Farrar: Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* Genotype and the Clinical Phenotype of Pulmonary and Meningeal Tuberculosis., *J. Clin. Microbiol.*, 46, 4, 363-368, 2008.
- 3) Wada, T., T. Iwamoto, and S. Maeda: Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis., *FEMS Microbiol. Lett.*, 291, 35-43, 2009.
- 4) Tsolaki, A. G., A. E. Hirsh, K. DeRiemer, J. A. Enciso, M. Z. Wong, M. Hannan, Y. O. Goguet de la Salmoniere, K. Aman, M. Kato-Maeda, and P. M. Small: Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from genomic deletion in 100 strains., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101, 865-870, 2004.
- 5) Hanekom, M., G. D. van der Spuy, E. Streicher, S. L. Ndambambi, C. R. McEvoy, M. Kidd, N. Beyers, T. C. Victor, P. D. van Helden, and R. M. Warren: A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease., *J. Clin. Microbiol.*, 45: 1483-1490, 2007.
- 6) Gagneux, S., K. DeRiemer, T. Van, M. Kato-Maeda, B. C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, M. C. Gutierrez, M. Hilty, P. C. Hopewell, and P. M. Small: Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 2869-2873, 2006.
- 7) Mazars, E., S. Lesjean, A.-L. Banuls, M. Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Locht, and P. Supply: High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 1901-1906, 2001.
- 8) Yokoyama, E., K. Kishida, M. Uchimura, and S. Ichinohe: Improved differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains, including many Beijing genotype strains, using a new combination of variable number of tandem repeats loci., *Infect. Genet. Evol.*, 7, 499-508, 2007.
- 9) Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van

Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N.Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M.Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Loch, and D. van Soolingen: Proposal for standardization of optimized mycobacterium interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol., 44,4498-4510,2006.

- 10) 岩本 朋忠: 結核菌北京型ファミリーの集団遺伝学的解析から推察される日本国内定着型遺伝系統群の存在と遺伝系統別薬剤耐性化傾向の違い., 結核,84,12,755-759,2009.
- 11) Warren,R.M., T.C.Victor, E.M.Streicher, M.Richardson, N.Beyers, N.C.Gey Van Pittus, and P.D.Van Helden: Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. Am.J.pespir.Crit.Care.Med., 169,610-614,2004.
- 12) Glynn,J.R., J.whiteley, P.J.Bifani, K.Kremer, and D van Soolingen: Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg.Infect.Dis.,8,843-849,2002.
- 13) Weis,S.E., J.M.Pogoda, Z.yang, M.D.Cave, C.Wallace, M.kelley, and P.F.Barnes: Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant county,Texas., Am.J.Respir.Crit.Care.Med., 166,36-42,2002.