

結核菌反復多型 (VNTR) 分析法を用いた福岡県における結核菌の遺伝子型別

^{1,2}大石 明 ¹前田詠里子 ^{1,3}村上 光一 ¹西田 雅博
¹世良 暢之

要旨:〔目的〕福岡県における結核菌反復多型 (VNTR) 分析法を用いた結核菌の遺伝子型の分布状況を把握する。〔対象〕福岡県在住者306名から分離され、2012年11月13日~2014年6月11日の期間に搬入された結核菌306株。〔方法〕VNTR分析法およびPCR法による北京型・非北京型の型別を行った。〔結果〕24領域のVNTR分析法では306株中、296株が全領域で型別され、この296株は264の型に分類された。24領域すべて同一か、あるいは超多変領域内での1領域のみ違う型を示す株同士を同一クラスターと定義すると、クラスターは25認められた (計65株が含まれる)。うち2クラスターは (構成株数: 4および2)、近畿地区の多発性大規模感染株候補型 (文献) と一致した。24領域の多様性については、超多変領域はSimpson's Index 平均0.894を示し比較的高い多様性が認められた。全体に占める北京型の割合は78.1%であり、神戸市 (78.5%, 2009年) のデータと同程度であった。〔考察〕福岡県内における結核菌のVNTR分析法による遺伝子型の分布は近畿地区の多発性大規模感染株候補型に属する菌株が確認された一方で、同地区で多発性大規模感染株候補型に属さない菌株が福岡県にてクラスターを形成するなど、福岡県の特徴と考えられる菌株型の分布も明らかとなった。〔結論〕今後、福岡県内のVNTR分析データを蓄積し、行政等にフィードバックすることにより、VNTR分析を根拠とした保健所による追加疫学調査の実施など新たな結核対策を展開することが可能になると思われる。

キーワード: 結核菌, Variable-number tandem-repeat (VNTR), 結核菌反復多型分析, 分子疫学, 北京型

緒 言

近年、分子疫学調査が結核対策に応用されるようになり、感染ルートの解明および地域の流行菌株の把握などに広く用いられている (横山栄二ら, (<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/27/320/dj3206.html> 2014年3月25日アクセス)。

結核菌の遺伝子型別法として、IS6110を用いた制限酵素断片長多型による型別法が国際標準法であったが、この方法は高分子のDNAが必要であること、培養が長期間であること、またバンドの差異には電気泳動の状態や条件による変動が多くなることなどの欠点がある¹⁾。これらの欠点を補う型別法として、近年、Variable number of tandem repeats (VNTR) 分析法という手法が地方衛生

研究所等で汎用され、集団感染事例において適用されている²⁾。近畿地区においては以前から汎用され、和田らは、近畿地区の既報データに基づいて9つの多発性大規模感染株候補型 (putative expanding cluster types: pECTs) を規定し監視体制を構築している³⁾。しかし、このようなデータの蓄積は福岡県ではなされていない。福岡県内の結核菌の遺伝子型別状況を把握し、流行株を予測することができるならば、今後、結核対策の施策に役立てることができる。そこで、福岡県在住の新規登録患者から分離された結核菌の遺伝子型の分布状況を把握することを目的として、VNTR分析法を実施した。

¹福岡県保健環境研究所, ²現: 福岡県保健医療介護部健康増進課, ³現: 国立感染症研究所感染症疫学センター

連絡先: 大石 明, 福岡県保健医療介護部健康増進課, 〒812-8577 福岡県福岡市博多区東公園7-7
(E-mail: oishi-a9130@pref.fukuoka.lg.jp)
(Received 2 Feb. 2016/ Accepted 18 May 2016)

方 法

1. 材料等

1.1 本研究と行政事業との関連

本研究は、福岡県が実施した「福岡県結核菌病原体サーベイランス事業（2012年9月-2014年3月）」から得られたデータの一部を解析したものである。当該事業は福岡県内関係自治体の衛生主管部（局）、保健所、医療機関および当研究所の連携により実施され、事業目的は分子疫学的観点からその発生の態様と動態を把握することであった。

1.2 対象

2012年11月13日～2014年6月11日の期間に、福岡県（政令指定都市、中核市および保健所政令市を含む）に新規登録された結核患者（肺外結核、再治療を含む）から分離され、かつ収集可能であった結核菌306株を使用した。菌株収集率は、本研究期間に新登録された菌陽性結核患者数944名に対して、32.4%であった（「厚生労働省感染症サーベイランスシステム」による、2015年7月11日確認）。

1.3 菌株の収集方法

福岡県登録結核患者の主な勧告入院先である8医療機関（結核病床を有する第2種感染症指定医療機関）から概ね月に1回の頻度で菌株を収集した。

2. 方法

2.1 DNA抽出

2%小川培地（S）（極東製薬工業）に培養された結核菌株をFast Prep用破碎用チューブ（MP Biomedicals）に分散し、Fast Prep（MP Biomedicals）で破碎した。その後、5% Chelex（Bio-Rad）加Tris-EDTA bufferを800 μ L加え、適宜攪拌しながら56℃、30分間、さらに100℃、10分間、加熱した。12,000 rpmで5分間遠心し、上清をDNA抽出液として用いた。

2.2 結核菌反復多型（VNTR）領域（24領域）のPCR

PCR反応に用いたプライマーをTable 1に示す。解析に用いたVNTR領域はJapan Anti-Tuberculosis Association (JATA)-(12)-VNTR分析法⁴⁾に用いられている12領域、さらにJATA(15)-VNTR分析法⁵⁾で追加されている3領域、加えて超多変（hypervariable, HV）領域⁶⁾に属する3領域、並びにその他の領域としてClassical MIRU³⁾に属する4領域、およびSupply's MIRU(15)³⁾に属する2領域の計24領域を用いた（Table 2）。Classical MIRUに属する4領域、およびSupply's MIRU(15)に属する2領域の計6領域を合わせて以下「Supply's MIRU(15)の6領域」と表記する。なお、シーケンサーを用いたフラグメント解析には片側に蛍光標識したプライマーを用いてPCRを行った。PCRの条件は前田ら⁴⁾の方法を一部改変（ア

ニール温度を60℃に変更）して行い、DNA量が少ない場合はサイクル数を40サイクルまで延長した。

2.3 縦列反復配列数の算出

2.3.1 シークエンサーを用いたフラグメント解析

得られたPCR産物は適宜希釈し、4領域ごと混合したものを、Hi-Diホルムアミド（Applied Biosystems）およびLIZ1200マーカー（Applied Biosystems）の入った96ウェルプレートへ混和した。95℃5分間、氷上5分間以上処理を行った後、シーケンサー（AB 3500, Applied Biosystems）にて電気泳動を行った。PCR産物の大きさはGeneMapperソフトウェア（Applied Biosystems）を用いて算出した。また、Iwamotoらの方法⁶⁾を参考に、VNTR領域を増幅した際に出現するスタッターピークの数を実測することにより、縦列反復配列数を算出した。各領域の遺伝子の塩基配列を別途決定した6株⁷⁾を用いて3回以上解析を繰り返し、シーケンサーによる電気泳動にrepeatabilityがあることを確認した。

2.3.2 パルスフィールド・ゲル電気泳動

シーケンサーの分子量サイズマーカーであるLIZ1200の範囲（40-1200 bp）を超えるPCR産物については、パルスフィールド・ゲル電気泳動装置（DR-III, Bio-Rad）を用いて縦列反復配列数を算出した。1% Seakem GTGゲル（0.5%, TBEバッファー）を用い、3.5V/cm, 5s, 120°, 14℃, 24時間の条件で泳動した。サイズマーカーとして、100 bp DNA Step Ladder（プロメガ）を用いた。泳動後、エチジウムブロミドにてゲルを染色し、紫外線下でゲルの撮影を行った。パルスフィールド・ゲル電気泳動による縦列反復配列数の算出は、得られたバンドの大きさをサイズマーカーとの移動度の差異を目視で計測し、前田らの方法⁷⁾によりオフセット値および繰り返し単位塩基数を算出した。

2.3.3 領域の多様性およびクラスター形成率の算出

24領域全てが一致、もしくはHV領域（QUB3232, VNTR3820およびVNTR4120）が1領域のみ異なり他の領域は一致する菌株を同一クラスターと判定した。これは今回、HV領域はクローン性がきわめて高い菌株間でさえ変異していることがある³⁾ことを考慮した試みである。クラスターを形成した菌株の母集団（全体、北京型および非北京型の3集団）での割合をクラスター形成率とした。

2.3.4 Minimum spanning tree

以上2種類の電気泳動で得られた各領域の繰り返し単位塩基数からPrim's algorithmを用いてminimum spanning treeを作成した。ソフトウェアはBioNumerics 6.6 Applied Maths（Sint-Martens-Latem, Belgium）を用いた。

2.4 北京型および非北京型

Warrenらの方法⁸⁾に従い、北京型結核菌同定プライマ

Table 1 PCR primers for detection and sequencing

Typing subsets	Regions	Primer name	Fluorescent dye	Sequence (5'-3')	Direction	References
Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)-(12)	Mtub4	Mtub4F	FAM TM	GTCCAGGTTGCAAGAGATGG	Forward	14
		Mtub4R	—	GGCATCTCAACAACGGTAG	Reverse	
	MIRU10	miru10F	VIC TM	ACCGTCTTATCGGACTGCACTATCAA	Forward	15
		miru10R	—	CACCTTGGTGATCAGCTACCTCGAT	Reverse	
	Mtub21	Mtub21F	VIC TM	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC	Forward	14
		Mtub21R	—	CAACATCGCCTGGTCTGTGA	Reverse	
	Mtub24	Mtub24F	PET TM	CACTAGCTGCGTCACTGG	Forward	16
		Mtub24R	—	GCTGATCCCGACGAAAG	Reverse	
	QUB11b	QUB11bF	FAM TM	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG	Forward	14
		QUB11bR	—	CGAAGTGAATGGTGGCAT	Reverse	
		IW-QUB11bF*	—	CCGATGTAGCCCGTGAAGA	Forward	6
		IW-QUB11bR*	—	AGGGTCTGATTGGCTACTCA	Reverse	
	VNTR2372	VNTR2372F	PET TM	ACCTCCGTTCCGATAATC	Forward	16
		VNTR2372R	—	CAGCTTTCAGCCTCCACA	Reverse	
	MIRU26	miru26F	PET TM	GCGGATAGGTCTACCGTCGAAATC	Forward	15
miru26R		—	TCCGGGTCATACAGCATGATCA	Reverse		
QUB15	QUB15F	VIC TM	TACATTCGCGGCCAAAGG	Forward	17	
	QUB15R	—	AGGGGTTCTCGGTCACCC	Reverse		
MIRU31	miru31F	FAM TM	CGTCGAAGAGAGCCTCATCAATCAT	Forward	15	
	miru31R	—	AACCTGCTGACCGATGGCAATATC	Reverse		
QUB3336	QUB3336F	FAM TM	ATCCCCGCGGTACCCATC	Forward	17	
	QUB3336R	—	GCCAGCGGTGTCGACTATCC	Reverse		
QUB26	QUB26F	VIC TM	GAGCCAAATCAGGTCCGG	Forward	16	
	QUB26R	—	GAGGTATCAACGGGCTTGT	Reverse		
QUB4156	QUB4156F	NED TM	TGGTCGCTACGCATCGTGTGCGCCCGT	Forward	14	
	QUB4156R	—	TACCACCCGGGCGAGTTTAC	Reverse		
JATA (15)	QUB11a	QUB11aF	FAM TM	CCCATCCCGCTTAGCACATTCGTA	Forward	14
		QUB11aR	—	TTCAGGGGGGATCCGGGA	Reverse	
		IW-QUB11aF*	—	CGTGATGTTGATCGGGATGT	Forward	6
		IW-QUB11aR*	—	ACCCTGGAGTCTGGCATC	Reverse	
	ETR-A	ETR-AF	NED TM	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	Forward	18
	ETR-AR	—	CGAAGCCTGGGGTGCCCCGCGATT	Reverse		
QUB18	QUB18F	NED TM	ATCGTCAGCTGCGGAATAGT	Forward	14	
	QUB18R	—	AATACCGGGGATATCGGTTT	Reverse		
Hypervariable region	QUB3232	QUB3232F	PET TM	CAGACCCGGGCGTCATCAAC	Forward	14
		QUB3232R	—	CCAAGGGGCGGCATTGTGTT	Reverse	
	VNTR3820	VNTR3820F	VIC TM	TGCGCGGTGAATGAGACG	Forward	16
VNTR3820R		—	ACCTTCATCCTTGGCGAC	Reverse		
VNTR4120	VNTR4120F	NED TM	GTTACCGGAGCCAACC	Forward	16	
	VNTR4120R	—	GAGGTGGTTTTCTGTTGTCG	Reverse		
Others (Classical MIRU [†])	MIRU4	miru4F	FAM TM	GTCAAACAGGTCACAACGAGAGGAA	Forward	15
		miru4R	—	CCTCCACAATCAACACACTGGTCAT	Reverse	
	MIRU16	miru16F	NED TM	CGGGTCCAGTCCAAGTACCTCAAT	Forward	15
		miru16R	—	GATCCTCCTGATTGCCCTGACCTA	Reverse	
MIRU40	miru40F	VIC TM	GATTCCAACAAGACGCAGATCAAGA	Forward	15	
	miru40R	—	TCAGGTCTTCTCTCACGCTCTCG	Reverse		
ETR-C	ETR-CF	PET TM	GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG	Forward	18	
	ETR-CR	—	GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG	Reverse		
Others (Supply's MIRU (15))	Mtub30	Mtub30F	NED TM	AGTCACCTTCTTACCCTCGTAAC	Forward	14
		Mtub30R	—	ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAAG	Reverse	
	Mtub39	Mtub39F	PET TM	AATCACGGTAACTTGGGTTGTTT	Forward	14
		Mtub39R	—	GATGCATGTTTCGACCCGTAG	Reverse	

*Those primers were only used in the method with Pulsed-field gel electrophoresis.

[†]mycobacterial interspersed repetitive units

Table 2 (1) Putative clusters in 24 loci in variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains collected from November 2012–June 2014 in Fukuoka Prefecture, Japan

Cluster	Strain	Host age	Host sex	Beijing type or not	Variable-number tandem-repeat typing subsets																										
					Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)-(12)												JATA15						Hypervariable region						Part of Supply's MIRU (15)		
					Mtub 4	MIRU 10	Mtub 21	MIRU 24	Mtub 24	VNTR 11b	QUB 11b	QUB 2372	MIRU 26	MIRU 15	QUB 31	QUB 3336	QUB 26	QUB 4156	QUB 11a	ETR- A	QUB 18	ETR- B	QUB 3232	VNTR 3820	VNTR 4120	MIRU 4	MIRU 16	MIRU 40	ETR- C	Mtub 30	Mtub 39
Cluster 1	F198	43	M	Non-Beijing	1	4	6	3	8	3	2	4	4	7	6	2	11	4	7	1	11	4	5	3	2	4	2	2			
	F234	39	F	Non-Beijing	1	4	6	3	8	3	2	4	4	7	6	2	11	4	7	1	11	4	5	3	2	4	2	2			
Cluster 2	F065	28	M	Non-Beijing	1	4	7	3	9	1	2	4	4	7	7	2	9	4	4	1	8	3	5	3	2	4	2	2			
	F074	97	M	Non-Beijing	1	4	7	3	9	1	2	4	4	7	7	2	9	4	4	1	8	3	5	3	2	4	2	2			
Cluster 3	F112	39	F	Non-Beijing	1	4	8	3	9	1	2	4	4	7	7	2	11	4	8	1	11	4	5	3	2	4	2	2			
	F117	69	M	Non-Beijing	1	4	8	3	9	1	2	4	4	7	7	2	11	4	8	1	11	4	5	3	2	4	2	2			
Cluster 4	F240	102	F	Non-Beijing	2	3	1	3	3	2	5	3	3	12	5	3	2	2	4	5	5	2	2	3	1	4	2	8			
	F260	61	F	Non-Beijing	2	3	1	3	3	2	5	3	3	12	5	3	2	2	4	5	5	2	2	3	1	4	2	8			
Cluster 5	F026	79	F	Beijing	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	4	10	9	12	9	2	4	3	4	4	3			
	F176	38	F	Beijing	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	4	10	9	12	11	2	4	3	4	4	3			
	F053	35	F	Beijing	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	4	10	9	12	11	2	4	3	4	4	3			
	F138	81	M	Beijing	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	4	10	9	12	11	2	4	3	4	4	3			
Cluster 6	F190	41	F	Beijing	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4	8	4	10	13	9	8	2	2	2	4	4	3			
	F221	85	F	Beijing	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	9	4	8	4	10	13	9	8	2	2	2	4	4	3			
Cluster 7	F029	82	M	Beijing	3	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	14	14	10	2	3	3	4	4	3			
	F143	79	M	Beijing	3	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	14	14	10	2	3	3	4	4	3			
Cluster 8	F089	85	M	Beijing	3	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	14	14	11	2	3	3	4	4	3			
	F163	83	F	Beijing	3	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	14	14	11	2	3	3	4	4	3			
Cluster 9	F040	59	M	Beijing	4	1	2	2	7	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	17	12	12	2	3	3	4	4	3			
	F113	65	M	Beijing	4	1	2	2	7	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	17	12	12	2	3	3	4	4	3			
Cluster 10	F137	30	M	Beijing	4	1	3	2	6	2	7	4	5	7	8	5	9+IS	4	10	16	15	10	2	3	3	4	4	3			
	F181	29	M	Beijing	4	1	3	2	6	2	7	4	5	7	8	5	9+IS	4	10	16	15	10	2	3	3	4	4	3			
Cluster 11	F271	59	M	Beijing	4	1	3	2	6	4	9	4	5	7	8	5	9	4	10	10	14	12	2	3	3	4	4	3			
	F036	67	M	Beijing	4	1	3	2	6	4	9	4	5	7	8	5	9	4	10	10	14	12	2	3	3	4	4	3			
Cluster 12	F168	84	M	Beijing	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5	9	4	10	16	14	9	2	3	3	4	4	3			
	F100	41	F	Beijing	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5	9	4	10	16	14	12	2	3	3	4	4	3			
Cluster 13	F106	77	M	Beijing	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	10	2	3	3	4	4	3			
	F034	56	M	Beijing	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	14	2	3	3	4	4	3			
Cluster 14	F013	75	M	Beijing	4	1	3	2	9	5	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	11	2	2	3	4	4	3			
	F083	74	M	Beijing	4	1	3	2	9	5	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	11	2	2	3	4	4	3			
	F084	56	M	Beijing	4	1	3	2	9	5	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	11	2	2	3	4	4	3			
	F205	25	F	Beijing	4	1	3	2	9	5	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	11	2	2	3	4	4	3			
	F256	63	M	Beijing	4	1	3	2	9	5	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	11	2	2	3	4	4	3			
Cluster 15	F265	51	M	Non-Beijing	4	2	0	3	4	2	5	4	3	11	7	3	2	4	0	9	3	4	4	2	2	4	2	1			
	F269	33	F	Non-Beijing	4	2	0	3	4	2	5	4	3	11	7	3	2	4	0	9	3	4	4	2	2	4	2	1			
	F159	62	M	Non-Beijing	4	2	0	3	4	2	5	4	3	11	7	3	2	4	0	9	3	4	4	2	2	4	2	1			
	F175	60	M	Non-Beijing	4	2	0	3	4	2	5	4	3	11	7	3	2	4	0	9	3	4	4	2	2	4	2	1			

(Continued)

Table 2 (2) Putative clusters in 24 loci in variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains collected from November 2012–June 2014 in Fukuoka Prefecture, Japan

Cluster	Strain	Host age	Host sex	Beijing type or not	Variable-number tandem-repeat typing subsets																													
					Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)-(12)												JATA15						Hypervariable region						Part of Supply's MIRU (15)					
					Mtub	MIRU	Mtub	QUB	VNTR	MIRU	QUB	MIRU	QUB	QUB	QUB	QUB	QUB	ETR-	QUB	QUB	VNTR	VNTR	QUB	VNTR	VNTR	MIRU	MIRU	MIRU	ETR-	Mtub	Mtub			
Cluster 16	F174	62	M	Beijing	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	5	4	10	15	13	8	2	3	3	4	4	3						
	F035	62	M	Beijing	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	5	4	10	15	13	8	2	3	3	4	4	3						
	F183	19	F	Beijing	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	5	4	10	15	13	8	2	3	3	4	4	3						
	F048	83	M	Beijing	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	5	4	10	15	16	8	2	3	3	4	4	3						
	F085	34	F	Beijing	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	5	4	10	16	13	8	2	3	3	4	4	3						
Cluster 17	F030	59	M	Beijing	4	3	3	3	2	3	7	4	5	7	9	4	8	4	11	14	15	12	2	3	4	4	2	2						
	F238	84	F	Beijing	4	3	3	3	2	3	7	4	5	7	9	4	8	4	11	14	15	15	2	3	4	4	2	2						
Cluster 18	F052	23	M	Beijing	4	3	3	3	6	3	7	4	4	11	14	5	5	4	11	16	16	17	2	3	3	4	4	3						
	F054	51	M	Beijing	4	3	3	3	6	3	7	4	4	11	14	5	5	4	11	16	16	17	2	3	3	4	4	3						
	F232	43	F	Beijing	4	3	3	3	6	3	7	4	4	11	14	5	5	4	11	16	16	17	2	3	3	4	4	3						
Cluster 19	F127	40	F	Beijing	4	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5	8	4	10	16	19	20	2	3	3	4	4	3						
	F090	78	F	Beijing	4	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5	8	4	10	16	19	20	2	3	3	4	4	3						
	F018	77	F	Beijing	4	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5	8	4	10	16	20	20	2	3	3	4	4	3						
Cluster 20	F294	76	M	Beijing	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	8	4	10	13	12	5	2	3	3	4	4	3						
	F177	82	M	Beijing	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	8	4	10	13	12	5	2	3	3	4	4	3						
Cluster 21	F165	83	F	Beijing	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	4	8	15	12	10	2	3	3	4	4	3						
	F244	27	M	Beijing	4	3	4	3	5	3	6	4	5	10	8	3	8	4	8	15	14	10	2	3	3	4	4	3						
Cluster 22	F284	26	F	Beijing	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	15	14	10	2	3	3	4	4	3						
	F223	26	M	Beijing	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	15	14	10	2	3	3	4	4	3						
Cluster 23	F237	72	M	Beijing	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	4	8	13	14	6	2	3	3	4	4	2						
	F184	66	F	Beijing	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	4	8	13	14	6	2	3	3	4	4	2						
	F218	79	M	Beijing	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	4	8	13	14	6	2	3	3	4	4	2						
Cluster 24	F272	36	M	Beijing	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	4	8	14	14	6	2	3	3	4	4	2						
	F067	41	F	Beijing	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	4	8	14	14	6	2	3	3	4	4	2						
	F098	55	M	Beijing	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	4	8	14	14	6	2	3	3	4	4	2						
	F248	83	F	Beijing	4	3	4	3	6	3	7	4	4	7	8	3	8	4	8	14	14	6	2	3	3	4	4	2						
Cluster 25	F132	67	M	Beijing	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	6	4	8	10	14	10	2	3	3	4	4	3						
	F007	59	M	Beijing	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3	6	4	8	10	14	10	2	3	3	4	4	3						

F: female; M: male.

— (5'-TTC AAC CAT CGC CGC CTC TAC-3', 5'-CAC CCT CTA CTC TGC GCT TTG-3'), 非北京型結核菌同定プライマー (5'-GGT GCG AGA TTG AGG TTC CC-3', 5'-TCT ACC TGC AGT CGC TTG TGC-3') を用いて PCR により北京型および非北京型の分類を行った。

2.5 研究倫理

なお本研究は、患者情報を連結不可能匿名化の状態にしたうえで福岡県保健環境研究所に提供され、さらに福岡県保健環境研究所倫理審査委員会承認の下 (No. 26-9), 「疫学研究に関する倫理指針」(平成14年6月17日, 文部科学省, 厚生労働省) を遵守しつつ実施した。

結 果

(1) 結核菌反復多型 (VNTR) 分析法結果

306株をVNTR分析法で解析した結果, 10株が1領域以上にて縦列反復配列数を確認できなかった。縦列反復配列数を確認できなかった領域は, QUB11b (4株), QUB26 (1株), QUB11a (4株), ETR-A (2株), QUB18 (1株), QUB3232 (2株) およびVNTR3820 (2株) であった。その結果, 296株が全領域で型別された。

これら296株は264型に分類され (Fig.), Simpson's Index⁹⁾ (SI) は0.999であった。クラスターは25認められ, その内訳は5株で構成されたものが2つ (Cluster 14および16), 4株で構成されたものが3つ (Cluster 5, Cluster 15, Cluster 24) などであった (Table 2)。全体のクラスター形成率は22.0% (65/296) であった。また, Cluster 5 (Fig.) に属する菌株は和田らのpECTsのpECT04³⁾と, Cluster 6はECT01³⁾と一致していた。

24領域の縦列反復配列数の多様性についてSIを用い, その結果をTable 3に示す。VNTR-JATA (12) のSIの平均値は0.592であり, VNTR-JATA (15) の平均値は0.660, HVの3領域の平均値は0.894, Supply's MIRU (15) の6領域の平均値は0.331であった。大きな多様性を示した領域 (0.8以上とする) は, QUB11b (0.840), QUB11a (0.800), QUB3232 (0.908), VNTR3820 (0.857), およびVNTR4120 (0.915) であった。また, 多様性が最も小さかった領域はETR-C (0.089) であった。

(2) 北京型および非北京型の割合

対象株306株のうち北京型の占める割合は, 78.1% (239/306) であった。患者年齢については全体 (306名) の年齢の平均が67.9歳 (中央値77歳, 最低17歳, 最高102歳), 北京型罹患者のそれが69.4歳 (中央値79歳), 非北京型罹患者で64.7歳 (中央値72歳) を示し, 北京型罹患者の年齢が非北京型罹患者のそれより高い傾向にあった。男女比は北京型1.6:1, 非北京型1.1:1であった。北京型のクラスター形成率は22.2% (53/239) であり, 非北京型のクラスター形成率は17.9% (12/67) であった。

考 察

今回, 2012年11月13日~2014年6月11日の期間に福岡県保健環境研究所に搬入された株を用いてVNTR分析法を行った。

短期間の調査であり, 供試菌株数は少なく, かつ菌株収集時期における全対象患者に対する菌株収集率は32.4%と小さい, ゆえに福岡県在住者の感染結核菌全体

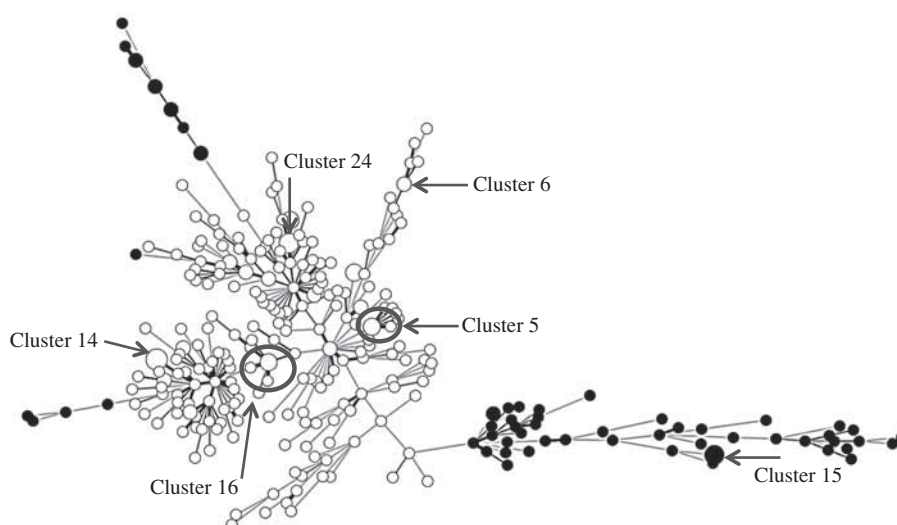


Fig. Minimum spanning tree from 24-loci variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains (n=296) collected from November 2012–June 2014 in Fukuoka Prefecture, Japan. The Clusters 14 and 16 (n=5 each) are dominant followed by the Clusters 5, 15, and 24 (n=4 each) and Cluster 6 (n=2). Isolates exhibited with white points are Beijing lineage and black ones are non-Beijing lineages.

Table 3 Simpson's Index of 24 loci in variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains collected from November 2012–June 2014 in Fukuoka Prefecture, Japan

Typing subsets	Regions	Simpson's Index
Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)-(12)	Mtub4	0.518
	MIRU10	0.561
	Mtub21	0.667
	Mtub24	0.525
	QUB11b	0.840
	VNTR2372	0.597
	MIRU26	0.581
	QUB15	0.284
	MIRU31	0.547
	QUB3336	0.609
	QUB26	0.681
	QUB4156	0.687
JATA (15)	QUB11a	0.800
	ETR-A	0.397
	QUB18	0.782
Hypervariable region	QUB3232	0.908
	VNTR3820	0.857
	VNTR4120	0.915
Others (Classical MIRU*)	MIRU4	0.241
	MIRU16	0.330
	MIRU40	0.435
	ETR-C	0.089
Others (Supply's MIRU (15))	Mtub30	0.443
	Mtub39	0.449
Total		0.999

*Mycobacterial interspersed repetitive units

を把握しているとは言いがたい。結核菌の潜伏期間が長いことを考慮すると、特にクラスター形成率に関しては、得られた数値は実態を正確に反映していないことも考えられる。VNTR分析法においてクラスターを定義する場合、24領域全てが一致する場合をクラスターとするか、あるいは数領域の不一致を許容してクラスターとするかは、その後の実地疫学へのフィードバックを考えるうえで重要である。今回、HV領域が1領域のみ異なり他の領域は一致する菌株を同一クラスターと判定したが、この妥当性に関しても更なる検討が必要である。そのような前提を基に考察すると、今検討で遺伝子型別は296株が264型に分かれ、SIが0.999と比較的高く、菌株は、高い遺伝子型の多様性を示した。この結果より、福岡県において大規模な患者発生を起こしている菌株は、現時点では比較的少ないと推測される。

このうち、クラスター構成株数が最も多かったCluster 14および16は福岡県内で比較的多くの患者を発生させている結核菌株である可能性が示唆された。Cluster 5の4株、Cluster 6の2株については、和田らにより報告³⁾

されているpECTsと一致しており、福岡県内においても近畿地区で分離される型の菌株が患者に感染していることが推測される。現在これら菌株による大規模な患者発生は認められないが今後、流行を起こす可能性があり注視する必要があると思われる。

北京型は、他の遺伝子系統と比べ、感染伝播力が優れ、薬剤耐性との関連が高く、発病や再発を起こしやすいとされている¹⁰⁾。岩本らの報告¹¹⁾では、北京型の割合は全国が73.8%、千葉県が80.4%、大阪市が80.4%、神戸市が78.5%、岡山県が72.5%、沖縄県が71.3%であり、今回の福岡県の結果(78.1%)は沖縄県や岡山県より比較的高率であり、神戸市¹³⁾と同程度の北京型の蔓延があると示唆される。廣地らは、結核罹患率の低い地域は北京型株の割合も若干低いことを報告している¹²⁾。福岡県は結核罹患率が高い地域であるため(厚生労働省, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou03/dl/12sankou.pdf#page=3> 2014年3月25日アクセス), 北京型の割合が高い傾向にあると思われる。また、北京型はmodern type(新興型)とancient type(祖先型)に分かれ、感染伝播・発病に違いがあると報告され¹⁰⁾、この細分類結果を把握することは、今後の課題である。

検体数が十分ではないが今回の調査で、福岡県において結核菌の複数のクラスターが存在していることが明らかになり、pECTsと一致する株も把握することができた。今後もVNTR分析法のデータを蓄積し、異なる自治体間のデータを比較し広域的な結核の感染動向を把握することは今後の結核対策に必要であると思われる。さらに、クラスター形成した菌株の宿主(患者)間の疫学的な関係・関連に関して保健所等関係当局と連携調査し、実際の感染拡大防止に役立てたい。

謝 辞

本研究で検査材料の採取等にご協力いただきました福岡県保健医療介護部保健衛生課、医療機関の皆様、また当所でVNTR分析を開始するにあたって、多大なるご助言をいただきました大分県衛生環境研究センター 緒方喜久代博士、千葉県衛生研究所 横山栄二博士、東京都健康安全研究センター 向川純博士ならびに長崎大学熱帯医学研究所 和田崇之博士に深謝します。加えて、指導いただきました福岡県保健環境研究所 平田輝昭前所長、香月進所長、千々和勝己副所長、堀川保健科学部長心得、江藤良樹研究員、岡元冬樹博士に深謝致します。本研究は福岡県の事業予算により遂行しました。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示: 本論文発表内容に関して特になし。

文 献

- 1) Moström P, Gordon M, Sola C, et al.: Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect.* 2002 ; 8 : 694-704.
- 2) 田丸亜貴, 和田崇之, 岩本朋忠, 他: 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.* 2013 ; 88 : 399-403.
- 3) 和田崇之, 長谷 篤: 結核菌の縦列反復多型 (VNTR) 解析に基づく分子疫学とその展望. *結核.* 2010 ; 85 : 845-852.
- 4) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他: 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム. *結核.* 2008 ; 83 : 673-678.
- 5) 前田伸司, 村瀬良朗: 結核菌の反復配列多型 (VNTR) 標準分析法の確立と型別情報データベースの構築. 第84回総会ミニシンポジウム「結核菌分子疫学の展望」. *結核.* 2009 ; 84 : 784-786.
- 6) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 ; 270 : 67-74.
- 7) 前田詠里子, 大石 明, 江藤良樹, 他: Variable number of tandem repeats (VNTR) 法を用いた結核菌の遺伝子型別—繰り返し回数算出における基礎的検討. 福岡県保健環境研究所年報. 2013 ; 40 : 63-68.
- 8) Warren RM, Victor TC, Streicher EM, et al.: Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 ; 169 : 610-614.
- 9) Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an Application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988 ; 26 : 2465-2466.
- 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.* 2009 ; 84 : 755-759.
- 11) 岩本朋忠: 結核菌分子疫学研究的の将来展望. 第84回総会ミニシンポジウム「結核菌分子疫学の展望」. *結核.* 2009 ; 84 : 789-791.
- 12) 廣地 敬, 坂本裕美子, 大西麻実, 他: 札幌市における結核菌北京型株について. *札幌市衛研年報.* 2011 ; 38 : 61-63.
- 13) 辻 英高, 西海弘城, 谷岡絵理, 他: 兵庫県内の患者から分離された結核菌の分子疫学解析におけるVNTR法の検討. 兵庫県立健康環境科学研究センター紀要. 2008 ; 5 : 30-39.
- 14) Le Flèche P, Fabre M, Denoëud F, et al.: High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol.* 2002 ; 2 : 37.
- 15) Cowan LS, Mosher L, Diem L, et al.: Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 : 1592-1602.
- 16) Smittipat N, Billamas P, Palittapongarnpim M, et al.: Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43 : 5034-5043.
- 17) Kam KM, Yip CW, Tse LW, et al.: Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett.* 2006 ; 256 : 258-265.
- 18) Frothingham R, O'Connell WAM: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 1998 ; 144 : 1189-1196.

Original Article

TYPING OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS
IN FUKUOKA PREFECTURE, JAPAN,
USING 24-LOCUS VARIABLE-NUMBER TANDEM-REPEAT TYPINGAkira OISHI, Eriko MAEDA, Koichi MURAKAMI, Masahiro NISHIDA,
and Nobuyuki SERA

Abstract [Aim] To determine genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Fukuoka Prefecture, Japan.

[Methods] A total of 296 isolates from 296 tuberculosis patients is tested using 24-locus variable-number tandem-repeat (VNTR) typing. We also determined whether these isolates and a further 10 were Beijing lineage.

[Results] The 296 isolates were classified into 264 VNTR types, and re-classified into 25 clusters when each cluster was defined as isolates being identical to VNTR types in 24 regions, or in 23 regions with the exception of one hypervariable region. Two clusters were shown to be identical to that of the Kansai regional epidemic. Regarding regional diversity, hypervariable regions showed relatively higher variation of isolate types. The Beijing lineage accounted for 78.1% of all isolates, which was similar to the value obtained from Kobe (78.5% in 2009) in the Kansai region.

[Discussion] Six isolates from Fukuoka Prefecture overlapped with those from Kansai region with respect to domi-

nant VNTR type, while clusters from Fukuoka Prefectural isolates were unique, which may be a feature of Fukuoka prefectural isolates.

[Conclusion] These data are likely to be useful for public health measures in the area.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Variable-number tandem-repeat (VNTR), Molecular epidemiology, Beijing lineage

Department of Health Science, Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

Correspondence to: Akira Oishi, Health Promotion Division, Fukuoka Prefectural Government, 7-7 Higashi-Koen, Hakata-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 812-8577 Japan.
(E-mail: ooishi-a9130@pref.fukuoka.lg.jp)