

JATA (12)-VNTR 型別による結核集団発生事例の 菌株異同調査

¹田丸 亜貴 ²和田 崇之 ³岩本 朋忠 ⁴長谷 篤

要旨：〔目的〕結核菌遺伝子型別法として日本国内で標準法となりつつある JATA (12)-VNTR 型別の、結核患者複数発生事例における菌株異同調査法としての有用性を検討した。〔方法〕1999年4月から2011年12月に菌株異同調査依頼のあった結核患者複数発生事例のうち270事例643株を対象とした。菌株の異同の基準には詳細な型別能を有する26 loci-VNTRを用いた。〔結果と考察〕非集団感染64事例で JATA (12)-VNTR 型が一致したものはみられなかった。集団感染206事例のうち185事例 (89.8%) で JATA (12)-VNTR 型が一致した。JATA (12)-VNTR 型別で菌株の異同の判別が不能だったのは、12領域中1領域だけの挿入数が異なった事例で、このような事例は集団感染事例の10.2%、集団感染ではなかった事例の1.6%みられた。全体として、結核患者複数発生270事例中248事例 (91.9%) の菌株異同は JATA (12)-VNTR 型別だけで正しく判定され、2領域以上の相違に起因する判定の齟齬は生じなかった。以上のことから、1領域違いの事例や地域的に多発する遺伝子型に注意して用いれば、JATA (12)-VNTR 型別は結核患者複数発生事例の異同調査に十分有用であると示された。

キーワード：結核菌、遺伝子型別、結核集団感染、公衆衛生

I. はじめに

結核の集団感染は「1人の感染源が2家族以上にまたがり、20人以上を感染させた場合をいう。ただし、発症者1人は感染者6人とみなして、感染者数を数える」と定義される。結核集団感染の発生時には厚生労働省および都道府県担当当局へ報告することとされており、毎年40~60事例報告されているが¹⁾、より小規模な結核感染事例はさらに多く、結核対策において重要な対象となっている。接触歴のある、または接触歴があると疑われる複数の結核患者が発生した事例 (以下、結核患者複数発生事例) では、同一感染源からの感染 (以下、集団感染) か否かを証明するために、結核菌遺伝子型別による菌株異同調査が必須であり、「結核の接触者健康診断の手引き 第4版」においても、「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」第15条に基づく調査の一環として、積極的に実施すべきと記載されている²⁾。

結核菌の遺伝子型別として現在、主として用いられて

いる方法は反復配列数多型 (variable number of tandem repeats, VNTR) 型別である³⁾。VNTR 型別は、結核菌ゲノム上の反復配列 (VNTR) が並んだ領域 (VNTR 領域) の複数箇所をターゲットとして、各 VNTR 領域の VNTR 挿入数の組合せを遺伝子型とする方法である。型別の対象とする VNTR 領域の数と種類に関しては種々の組合せが報告されているが⁴⁾⁵⁾、本邦では、結核菌臨床分離株の70%以上を占める「北京ファミリー」に対して高い型別分解能を有する Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)-VNTR 型別が国内標準法として提唱されている⁶⁾⁷⁾。JATA (12)-VNTR 型別は対象 VNTR 領域数が12カ所と少なく、各 VNTR 領域の PCR 産物はアガロース電気泳動で測定可能なため、これまで結核菌遺伝子型別の経験のない施設でも導入しやすい。

しかし、JATA (12)-VNTR 型別は不特定多数の結核菌株を対象とした分析においては分解能が低いとも指摘されており⁸⁾⁹⁾、結核患者複数発生事例等での菌株異同調査に対しての有用性も詳細には調べられていない。そこ

¹大阪府立公衆衛生研究所感染症部微生物課、²長崎大学熱帯医学研究所国際保健学、³神戸市環境保健研究所微生物部、⁴大阪市立環境科学研究所微生物部

連絡先：田丸亜貴、大阪府立公衆衛生研究所感染症部微生物課、〒537-0025 大阪府大阪市東成区中道1-3-69

(E-mail: tamaru@iph.pref.osaka.jp)

(Received 18 May 2012/Accepted 24 Nov. 2012)

で、本研究では近畿圏内で実際に発生した結核患者複数発生事例をJATA (12)-VNTR型別を用いて菌株異同調査し、その有用性を検討した。

II. 対象と方法

対象株：1999年4月から2011年12月に大阪府立公衆衛生研究所に菌株異同調査依頼のあった結核患者複数発生事例のうち家族内発生や、感染者数20人未満の事例も含む270事例（643株）を対象とした。これらの事例の初発患者発生から続発患者発生までの期間は3カ月～9年、事例ごとの菌株数は2～13株であった。

DNA抽出：結核菌培養試験用培地（小川培地, Middlebrook 7H9, その他）において増殖が確認された結核菌株を用いて、ビーズビーターにより菌体を破碎し、フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿法によりゲノムDNAを抽出精製した。

VNTR型別：JATA (12)-VNTR型別は、以前の報告に準じて行った⁹⁾。26 loci-VNTR型別はMycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) 4, 10, 16, 23, 26, 27, 31, 39, 40, Exact tandem repeat (ETR) A, C, F, Queen's university of Belfast (QUB) 11a, 11b, 26, VNTR 0424, 1955, 2401, 3690, 4156, 1895, 2074, 2372, 3155, 3336, 4120の26カ所のVNTR領域を対象にした。各PCR産物はコスモアイSV1210（日立ハイテクノロジーズ）によるキャピラリー電気泳動を用いて分析し、PCR産物の長ささと各VNTR領域のVNTR長（bp）から、各領域でのVNTR挿入数を計算した。

集団感染事例の判定：われわれは、26 loci-VNTR型別が大阪府内結核菌株の分子疫学調査においてIS6110-restriction fragment length polymorphism (IS6110-RFLP) 分

析の同等以上の解析能を示したこと¹⁰⁾、IS6110-RFLP分析により集団感染と確認された120事例301株について26 loci-VNTR型別を実施し、同一菌株でも1領域の挿入数違いが起こりうることをすでに示している¹¹⁾。そこで、本研究では、結核患者複数発生事例のうち分離結核菌株の26 loci-VNTR型が26領域とも完全に一致、あるいは挿入数が1領域だけは違うが他の25領域では一致した事例を「同一感染源由来の集団感染」と判定した。

III. 結果

被験270事例中、26 loci-VNTR型によって集団感染と定義されたのは206事例であった。初発患者発生から続発患者発生までの期間は集団感染事例で3カ月～9年、集団感染でなかった結核患者複数発生事例（以下、非集団感染事例）では数カ月～3年であった。

Fig.に、非集団感染64事例において挿入数に相違のみられたJATA (12)-VNTR型別のVNTR領域数をまとめた。非集団感染事例でJATA (12)-VNTR型別が一致したものはみられなかった。JATA (12)-VNTR型別の挿入数の相違が1領域しかなかったのはTable 1に示した1事例（1.6%）だけであった。この1事例については、26 loci-VNTR型別では3カ所のVNTR領域で挿入数の相違がみられた（Table 1）。他の非集団感染63事例では、JATA (12)-VNTR型別の2～12領域（平均7.4領域）で挿入数の相違がみられ、半分以上の事例では8領域以上で挿入数の相違がみられた。

集団感染206事例と非集団感染64事例のJATA (12)-VNTR型別の結果をTable 2にまとめた。集団感染206事例のうち183事例（88.8%）でJATA (12)-VNTR型が一致した。残りの23事例のうち、1事例では1カ所のVNTR領域で2種類の挿入数が検出され、もう1事例では2カ所のVNTR領域で2種類の挿入数が検出された。これらの事例では、Table 3に示すように、2種類の挿入数のうち片方が比較対象菌株の挿入数と一致していたので、対象株と同一遺伝子型と判定することができた。集団感染事例においてJATA (12)-VNTR型別で1領域違いだったのは21事例（10.2%）で、挿入数の違いがみられたVNTR領域は12カ所中10カ所であった（Table 4）。

IV. 考察

本研究における検討では、JATA (12)-VNTR型別により集団感染事例185事例、非集団感染63事例の合計248事例（91.9%）の感染源を判別することができた。

JATA (12)-VNTR型別で菌株異同の判別が26 loci-VNTR型別と一致しなかったのは、12のVNTR領域のいずれか1領域で挿入数の違いが認められた事例（以下、「1領域違い」）で、このような事例は集団感染事例の10.2

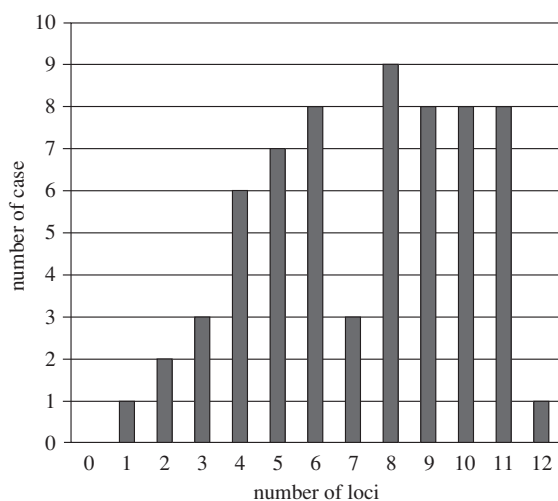


Fig. The number of loci in which difference was shown among comparison isolates isolated from 64 non-group tuberculosis-infections

Table 1 VNTR profile of the non-group infection case which discriminated by difference of number of alleles in one locus by JATA (12)-VNTR

Isolates	Contact history	26 loci-VNTR																											
		JATA (12)-VNTR																											
		VNTR 0424	MIRU 10	VNTR 1955	VNTR 2074	QUB 11b	VNTR 2372	MIRU 26	VNTR 3155	MIRU 31	VNTR 3336	QUB 26	VNTR 4156	MIRU 4	MIRU 16	MIRU 23	MIRU 27	MIRU 39	MIRU 40	ETR -A	ETR -C	ETR -F	VNTR 2401	VNTR 3690	VNTR 1895	QUB 11a	VNTR 4120		
06-84	Homeless living in the same park	4	1	3	2	4	5	7	4	5	7	8	5	2	3	5	3	3	3	4	4	3	4	3	4	3	4	7	12
07-31		4	1	3	2	7	5	7	4	5	7	8	5	2	3	8	3	3	3	4	4	3	4	3	4	3	4	9	12

Table 2 The results of JATA (12)-VNTR genotyping of the 270 tuberculosis outbreaks

Cases	Number of cases	Result of JATA (12)-VNTR	Number of cases (%)
Group infection	206	Concordant in 12 loci	183 (88.8)
		Double alleles in one locus*	1 (0.5)
		Double alleles in two loci*	1 (0.5)
		One-locus variant	21 (10.2)
Non-group infection	64	One-locus variant	1 (1.6)
		Discordant in more than two loci	63 (98.4)

*One among double alleles was the same as the allele detected in comparison isolates.

Table 3 JATA (12)-VNTR profiles of the case which had double alleles were detected

Isolates	Contact history	JATA (12)-VNTR												
		VNTR 0424	MIRU 10	VNTR 1955	VNTR 2074	QUB 11b	VNTR 2372	MIRU 26	VNTR 3155	MIRU 31	VNTR 3336	QUB 26	VNTR 4156	
19-sa-39 080710iz	Users in the same nursing facility	4	3	3	3	2,3	4	7,8	4	5	7	6	4	
		4	3	3	3	3	4	7	4	5	7	6	4	
101216su-1 101216su-2	Family	4	1	3	2	6	5	9	4	5	7	8	5	
		4	1	3	2	5,6	5	9	4	5	7	8	5	

Table 4 The loci of JATA (12)-VNTR in which single locus variants were observed among the 206 group infections

Locus	VNTR 0424	MIRU 10	VNTR 1955	VNTR 2074	QUB 11b	VNTR 2372	MIRU 26	VNTR 3155	MIRU 31	VNTR 3336	QUB 26	VNTR 4156	Total
Number of cases	2	2	2	2	2	6	1	1	0	1	2	0	21

%, 非集団感染の1.6%でみられた。JATA (12)-VNTR 型別における「1 領域違い」は集団感染事例、非集団感染事例のどちらにも認められたうえ、12領域のうち10領域で起こっており、「1 領域違い」の起こったVNTR挿入部位から集団感染か非集団感染かを判別することはできなかった。すなわち、JATA (12)-VNTR 型別における「1 領域違い」はいずれのVNTR領域に起こっていても判定保留とすべきである。しかし、「1 領域違い」の結果にさえ留意して用いれば、JATA (12)-VNTR 型別は結核患者複数発生時の菌株異同に十分実用可能と言える。

JATA (12)-VNTR 型別による菌株異同結果で特筆すべきは、非集団感染事例の98.4%を正確に判別できた点である。VNTR 型別はPCRを基本とした方法なので塗抹陽性喀痰からも数日で型別完了することができる。JATA (12)-VNTR 型別により結核患者発見から短期間で結核

患者複数発生事例が集団感染か非集団感染かを鑑別できれば、その結果を接触者健診実施の是非や範囲決定の判断材料として用いることができ、より効率的な結核対策が可能となる。

これまで、JATA (12)-VNTR 型別は地域分子疫学においては分解能が低い⁸⁾⁹⁾との見解があったが、本研究では非集団感染事例の菌株間でのJATA (12)-VNTR 型の違いが非常に大きく、結核患者複数発生時の異同判定においては信頼性が高いことが示された。結核菌遺伝子型別の分解能は、対象菌株群のうち同一遺伝子型クラスターを形成する菌株の割合（以下、クラスター形成率）から推測される。和田らが大阪市、大阪府、および神戸市の新規登録患者由来株1,778株をJATA (12)-VNTR 型別しクラスター解析を行ったところ全体でのクラスター形成率は61.1%で¹²⁾、大阪府での新規登録患者由来結核菌株

の26 loci-VNTR 型別やIS6110-RFLP分析でのクラスター形成率の約35% (未公開データ) と比べて非常に高かった。しかし、和田らの解析でJATA (12)-VNTR 型別で形成された個々のクラスターの菌株数は最も大きいクラスターでも全体の5.5% (97株/1778株) で、この割合であれば、対象株のうち任意の複数株が偶然に同一クラスターに属する確率はきわめて低くなる。このように、全体でのクラスター形成率が高くて個々のクラスターの菌株数が小さい地域においては、結核患者複数発生事例のそれぞれの患者由来結核菌株が偶然に同一遺伝子型になる可能性は低いと、本研究に示したようにJATA (12)-VNTR 型が結核患者複数発生時の菌株異同調査に十分実用可能という結果となる。もちろん、地域によってクラスター形成率や個々のクラスターの存在率は異なると考えられるので、JATA (12)-VNTR 型別を結核患者複数発生時の菌株異同調査に用いる場合は、対象地域の結核菌地域分子疫学の情報が必要かもしれない。

JATA (12)-VNTR 型が一致した事例で、26 loci-VNTR 型別によって非集団感染事例として判断された事例は認められなかった。このことは、結核患者複数発生時の菌株異同調査において、JATA (12)-VNTR 型の一致をもって集団感染とみなしてよいということの意味している。しかしながら、結核菌の広域分子疫学では広い範囲で共通して多数発見されるJATA (12)-VNTR 型が存在し、それらの一部は追加領域解析によりさらに細分化されることがわかっている⁸⁾¹²⁾。地域的に頻出し、追加領域解析で細分化されるJATA (12)-VNTR 型については、菌株異同で一致した場合でも追加領域解析が望ましい。

JATA (12)-VNTR 型別の追加解析に用いるVNTR 領域については、現在推奨されている組合せはない。本稿では26 loci-VNTR 型別を基準として用いたので、JATA (12)-VNTR 型別以外の14領域が追加領域となっているが、対象領域数の多さやPCR産物長のレンジの広さから、どの施設でも導入できる方法とは言えない。少ない対象領域数でできるだけ簡易に追加解析が可能となる組合せの開発が望まれる。VNTR 領域には挿入数の変化が激しすぎる部位もあり、そのような領域を菌株の異同判定に用いると集団感染を過少に見積もってしまうことになる。たとえば、同一菌株間で各VNTR 領域の挿入数が異なる割合を調べたところ、26 loci-VNTR 型別に用いている領域では0.3~1.3%であったのに対し、QUB3232という領域では4.2%と高かった (未公開データ)。このように、追加領域の選定には解析能の高さだけを基準にすることはできず、適切な追加領域選定には今後さらなる検討が必要である。

結核菌遺伝子型別に関しては、「結核の接触者健康診断の手引き」や2011年に改正された「結核に関する特

定感染症予防指針」で推奨されているため、行政からのニーズも高まっており、各地方衛生研究所等への導入が望まれている。一方で、一部の地方衛生研究所を含むいくつかの研究所では、それぞれの追加領域を用いた結核菌分子疫学調査が実施されており、各研究所でそのデータが蓄積されている。本邦での結核対策への結核菌遺伝子型別導入を早期に実施するには、まず結核患者複数発生時の菌株異同調査にJATA (12)-VNTR 型別を導入し、追加領域解析が必要なケースについては、結核菌分子疫学研究を先行している機関に相談するのが現実的な方法と思われる。

V. 結 語

結核患者複数発生270事例をJATA (12)-VNTR 型別により菌株異同調査したところ、248事例 (91.9%) での感染源を正しく判別することができた。JATA (12)-VNTR 型別で感染源の判別が不能だったのは、12カ所のVNTR 領域のいずれか1領域で挿入数の違いが起こる事例で、このような事例は集団感染事例の10.2%、非集団感染の1.6%にみられたが、2カ所以上の相違に起因する判定の齟齬は生じなかった。これらの結果から、「1カ所違い」の結果にさえ留意して用いれば、JATA (12)-VNTR 型別は結核患者複数発生時の菌株異同に十分実用可能と考えられた。

VI. 謝 辞

本研究は、各自治体において積極的疫学調査を目的として収集され、遺伝子型別が実施された菌株を用いました。菌株収集等にご協力くださった保健所、病院の諸先生方に心より感謝致します。本研究は、厚生労働省新興・再興感染症研究事業 (主任研究者 石川信克: 地域における効果的な結核対策の強化に関する研究) の一部として補助を受けました。

文 献

- 1) 結核予防会結核研究所疫学情報センター: 結核の統計, 年報 <http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/toukei/nenpou/>
- 2) 結核接触者検診の手引き (改訂第4版) 2010年6月. <http://www.jata.or.jp/rit/rj/2010sessyokusya4.pdf>
- 3) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human mini-satellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000; 36: 762-771.
- 4) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4498-4510.
- 5) Millet J, Miyagi-Shiohira C, Yamane N, et al.: Assessment of mycobacterial interspersed repetitive unit-QUB markers

- to further discriminate the Beijing genotype in a population-based study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Okinawa, Ryukyu Islands, Japan. *J Clin Microbiol.* 2007 ; 45 : 3606–3615.
- 6) 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—JATA(12)-VNTR分析法の実際. *結核.* 2008 ; 83 : 673–678.
- 7) Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, et al.: Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol.* 2008 ; 57 : 873–880.
- 8) 和田崇之, 長谷 篤: 結核菌の縦列反復配列多型 (VNTR) 解析に基づく分子疫学とその展望—大阪市の例. *結核.* 2010 ; 85 : 845–852.
- 9) 前田伸司, 和田崇之, 岩本朋忠: 国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型 (VNTR) 分析法. *日本細菌学雑誌.* 2010 ; 65 : 201.
- 10) 田丸亜貴: 大阪府の結核対策における結核菌分子疫学の有用性. 第83回総会シンポジウム「分子疫学研究の進歩と対策への応用」. *結核.* 2009 ; 84 : 55–57.
- 11) 田丸亜貴, 松本壮吉: 集団感染事例におけるVNTR型とIS6110-RFLPパターンの比較. *結核.* 2009 ; 84 : 386. (第84回総会抄録)
- 12) 和田崇之, 田丸亜貴, 岩本朋忠, 他: 複数自治体をまたぐ広域的結核分子疫学の基盤構築—JATA(12)-VNTR型別に基づくクラスター形成とその傾向. *結核.* 2013 ; 88 : 393–398.

————— Original Article —————

EVALUATION OF JATA(12)-VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS
AS A MARKER OF THE SOURCE
OF TUBERCULOSIS OUTBREAKS IN OSAKA

¹Aki TAMARU, ²Takayuki WADA, ³Tomotada IWAMOTO, and ⁴Atsushi HASE

Abstract [Objectives] To evaluate the usefulness of the JATA (12)-variable number of tandem repeats (VNTR) system for identifying the source of *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks.

[Design] JATA(12)-VNTR genotyping was performed on *M.tuberculosis* isolates from a total of 206 patients in whom group infection was confirmed by epidemiological studies (“group infection”), as well as from 64 patient clusters in whom group infection was suspected but not confirmed (“non-group infection”). The patients were diagnosed in Osaka Prefecture from April 1999 to December 2011.

[Results] All isolates from the “non-group infection” patients showed a unique VNTR pattern, whereas isolates from 185 (89.9%) “group infection” patients showed a common and group-specific JATA (12)-VNTR pattern. However, single-locus variants were observed in 1 (1.6%) “non-group infection” case and in 21 (10.2%) “group infection” cases.

[Conclusion] Tuberculosis in 248 (91.9%) of the 270 study patients could be correctly identified based on the genotyping

of the isolates by using the JATA (12)-VNTR. If proper attention is paid to the single-locus variant, the JATA (12)-VNTR system would be a useful tool for identification of sources of tuberculosis outbreaks.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Variable number of tandem repeats, Tuberculosis outbreak, Group infection

¹Department of Microbiology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, ²Department of International Health, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, ³Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, ⁴Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

Correspondence to: Aki Tamaru, Department of Microbiology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1–3–69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka-shi, Osaka 537–0025 Japan. (E-mail: tamaru@iph.pref.osaka.jp)