

山梨県における結核菌VNTR検査の実施状況について

山上隆也 柳本恵太

Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in Yamanashi
by Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) Method

Takaya YAMAGAMI, Keita YANAGIMOTO,

キーワード：結核菌、分子疫学解析、VNTR法

近年、結核菌の分子疫学解析法として、縦列反復配列数多型解析 (Variable Numbers of Tandem Repeats, VNTR) 法が普及している。VNTR法は、結核菌のゲノム上に存在するミニサテライトDNA中の繰り返し配列の反復数を求めることで遺伝子型別を行う方法である。複数の領域の反復数を数字のら列 (プロファイル) とし、これを比較することで菌株の異同識別が可能である。解析する領域は、結核研究所の提唱する12領域 (JATA 2)¹⁾ もしくは15領域 (JATA15) が一般的であるが、地域性や疫学情報等を考慮して領域の追加解析が行われている。

本県では、2017年度から結核菌の分子疫学サーベイランスを開始し、VNTRプロファイルのデータベース化を行ってきた²⁾。そこで今回、当所における2022年までのVNTR検査の実施状況について報告する。

対象と方法

1 供試菌株

感染症法第15条により調査を実施した結核患者由来の結核分離菌株のうち、2017年から2022年に管轄保健所がVNTR検査による調査を必要とした22株を対象とした。また、BCGワクチン株 (Tokyo172株、日本BCG製造) の異なる2ロットを対照として使用した。

2 VNTR法

結核菌VNTRハンドブック³⁾に準じて実施した。

(1) 鋳型DNAの作成

小川培地で培養した菌塊を一白金耳かき取り、滅菌蒸留水200 μ lに懸濁して95 $^{\circ}$ C10分間加熱した。放冷後、13000回転10分間遠心した上清をDNA粗抽出液とした。

(2) VNTR法

解析領域はJATA15⁴⁾の15領域 (J01~J15) に、標準化超可変領域 (HV) 3領域⁵⁾、Supply15⁶⁾のうち6領域を追加した計24領域とした。

PCR試薬はTaKaRa EX Taq HotStart Version (custom) ver. 1 (タカラバイオ) を使用し、添付の2 \times GC Buffer I 10.0 μ l、2.5mM dNTPs mixture 1.6 μ l、ExTaq HS version 0.1 μ lに、10 μ Mプライマー各0.8 μ l、滅菌蒸留水5.7 μ l、DNA粗抽出液1.0 μ lを加えて合計20.0 μ lとした。

PCRサイクルは初めに95 $^{\circ}$ C3分、次に95 $^{\circ}$ C30秒、60 $^{\circ}$ C30秒、72 $^{\circ}$ C1分30秒を35サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ C7分を追加した。

(3) 電気泳動法

PCR増幅産物の確認は、Genetic Analyzer 3500 (サーモフィッシャー) によるキャピラリー電気泳動で行った。

PCR増幅産物は滅菌蒸留水で15~20倍に希釈し、その1 μ lにHi-Di Formamide (サーモフィッシャー) 12 μ l、GeneScan1200 LIZ (サーモフィッシャー) 0.5 μ lを加えて95 $^{\circ}$ C5分加熱したものを試料とした。

結果の解析にはGeneMapperソフトウェアを使用し、反復数の換算はIwamotoら⁵⁾の方法に準じ、スタッターピークの数を計測して求めた。

VNTR各領域の多様度をHunter Gaston Diversity Index (HGDI 値)⁷⁾で表記し、0.5を超える場合を多様度が高い、0.3を超え、0.5までを中程度、0.3以下を多様度が低いと判定した。

3 結核菌遺伝系統の推定

VNTRパターンから最大事後確率推定法により結核菌遺伝系統を推定し⁸⁾、北京株 (祖先型、新興型) と非北京株を判定した。

結果と考察

1. VNTR 検査結果

VNTR 検査を実施した 22 株のうち 24 領域のパターン全てが一致したのは 2 株であり、当該菌株が分離された患者間には疫学的関連性が認められた。他の菌株間では最小単位である JATA12 においてもパターンの一致は確認されなかった。

VNTR の結果から推定した結核菌遺伝系統と系統別の患者平均年齢を表 1 に示した。北京株 15 件(祖先型 9 件、新興型 6 件)、非北京株 7 件であり、国内の検出状況と同様、北京株が多かった。

平均年齢は、北京株 64.2 歳(祖先型 75.1 歳、新興型 47.8 歳)、非北京株 55.3 歳であり、北京株祖先型で高く、新興型で低い傾向がみられた。

世界的に蔓延している北京株は新興型が主流を占めるのに対し、国内では祖先型が約 8 割を占めるといわれている。しかし、近年では若年層を中心に新興型が増加してきており、結核患者の分布は、高齢者層で認められる祖先型によるピークと、比較的若年齢層の進行型によるピークの二峰性を示すといわれている⁹⁾。山梨県でも同様の傾向がみられたことから、新興型の動向について今後も注視していくことが重要と思われる。

2. VNTR 各領域の多様度の比較

解析した 24 領域における多様度を表 2 に示した。

北京株では、JATA15 のうち 3 領域の多様度が低く、1 領域が中程度であった。HV 領域では多様度の低い領域はみられなかったが、Supply の追加 6 領域のうち 5 領域は多様度が低かった。

非北京株では JATA15 で多様度の低い領域はなく、HV のうち 1 領域が中程度、Supply の追加領域のうち 1 領域が低かった。非北京株では、JATA15 の型別分解能が比較的高いことが示唆された。

多様度の低い領域は、異なる株間でも反復数に差異が生じにくいいため、多様度の高い領域への変更や、解析領域の追加といった対応が必要である。本県では北京株が多かったことから、JATA15 だけでは型別分解能が十分ではない可能性があり、HV 領域を追加解析することの必要性が示唆された。

3. 結核菌と BCG との比較

結核菌と BCG とを鑑別することは、結核の届け出や患者の治療決定において重要であり、RD1 領域の有無を検

表 1 結核菌遺伝系統と患者平均年齢

	n	(%)	平均年齢(歳)
北京型	15	(68.2)	64.2
祖先型	9	(40.9)	75.1
新興型	6	(27.3)	47.8
非北京型	7	(31.8)	55.3

表 2 VNTR 領域別の多様度の比較

			北京株		非北京株	
			多様度	HGDI	多様度	HGDI
JATA12	J01	v0424	低	0.154	高	0.762
	J02	MIRU10	高	0.590	高	0.857
	J03	v1955	高	0.641	高	0.762
	J04	v2074	高	0.615	高	0.714
	J05	v2163b	高	0.859	高	0.857
	J06	v2372	中	0.410	高	0.810
	J07	MIRU26	高	0.795	高	0.905
	J08	v3155	低	0.282	高	0.524
	J09	MIRU31	高	0.692	高	0.571
	J10	v3336	高	0.904	高	0.810
	J11	v4052	高	0.603	高	0.810
	J12	v4156	高	0.705	高	0.762
JATA15	J13	v1982	高	0.846	高	0.952
	J14	v2163a	高	0.692	高	0.905
	J15	ETR-A	低	0.295	高	0.857
超可変領域 (HV)		v3232	高	0.769	高	0.952
		v3820	高	0.833	高	1.000
		v4120	高	0.885	中	0.476
Supply		v3690	低	0.000	高	0.810
		MIRU40	低	0.295	高	0.762
		MIRU4	低	0.154	高	0.667
		v2401	中	0.385	高	0.667
		MIRU16	低	0.154	高	0.762
		ETR-C	低	0.000	低	0.000

出する PCR 法が開発されている¹⁰⁾。しかし、VNTR を目的とした検査依頼の場合、別系統で PCR を実施することとなり、操作が煩雑となる。そこで、VNTR プロファイルから BCG が推定できるかどうかを検討した。

その結果、結核菌 22 株のうち、BCG ワクチン株と同一プロファイルのものはなく、特に 6 領域 (J1, J3, J12, J13, J18, J24) では BCG 株と同じ反復数を示す結核菌は確認されなかった (表 3)。

前田ら¹¹⁾は J1, J3, J6, J12, J15 領域では BCG 株と同一の反復数を示す結核菌は少なく、この 5 領域を比較することで BCG が推定できると報告している。今回の結果と併せ、J1, J3, J12 領域の反復数は BCG 株に特徴的であり、BCG 株の推定に利用できると考えられた。

まとめ

- 2017 から 2022 年に結核菌 22 株の VNTR 検査を実施した結果、24 領域の VNTR プロファイルが一致したのは、

表 3 VNTR 領域別の反復数分布

VNTR 領域別に結核菌株の各反復数の割合 (%) を示した (グレーの塗りつぶしは BCG 株の反復数)

n=22	JATA 12											JATA 15			超可変領域 (HV)			Supply						
	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	J13	J14	J15	v3232	v3820	v4120	v3690	MIRU40	MIRU4	v2401	MIRU16	ETR-C
反復数	v0424	MIRU10	v1955	v2074	v2163b	v2372	MIRU26	v3155	MIRU31	v3336	v4052	v4156	v1982	v2163a	ETR-A	v3232	v3820	v4120	v3690	MIRU40	MIRU4	v2401	MIRU16	ETR-C
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	13.6	13.6	0.0	9.1	9.1	9.1	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	9.1	0.0	4.5	4.5	13.6	4.5	4.5	9.1	0.0
2	13.6	18.2	22.7	18.2	0.0	9.1	9.1	4.5	9.1	0.0	0.0	13.6	4.5	0.0	13.6	4.5	0.0	0.0	13.6	9.1	81.8	36.4	18.2	0.0
3	0.0	45.5	50.0	59.1	18.2	63.6	0.0	9.1	27.3	0.0	0.0	31.8	0.0	0.0	9.1	0.0	0.0	9.1	77.3	72.7	4.5	0.0	72.7	0.0
4	72.7	13.6	18.2	13.6	9.1	18.2	9.1	81.8	22.7	9.1	0.0	27.3	0.0	0.0	63.6	0.0	4.5	22.7	4.5	4.5	0.0	59.1	0.0	100.0
5	0.0	4.5	0.0	0.0	13.6	0.0	13.6	4.5	40.9	9.1	9.1	27.3	9.1	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.1	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0	0.0	22.7	0.0	18.2	0.0	0.0	13.6	9.1	0.0	0.0	9.1	0.0	4.5	13.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	27.3	0.0	0.0	36.4	27.3	0.0	18.2	13.6	0.0	4.5	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8	0.0	4.5	0.0	0.0	9.1	0.0	13.6	0.0	0.0	0.0	54.5	0.0	18.2	31.8	0.0	0.0	4.5	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.0	0.0	9.1	0.0	4.5	0.0	4.5	0.0	0.0	13.6	0.0	0.0	22.7	18.2	0.0	0.0	4.5	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.6	0.0	0.0	22.7	0.0	0.0	4.5	13.6	18.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	9.1	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	0.0	31.8	27.3	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.6	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.1	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
算定不能	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
不検出	0.0	0.0	0.0	0.0	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.1	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

患者間で疫学的関連性が明らかな 2 株のみであった。

2. VNTR 解析領域として、北京株では JATA15 に HV を加えた 18 領域以上の解析が必要と考えられた。
3. J01、J03、J12 領域の反復数は BCG 株に特徴的であり、VNTR プロファイルから BCG 株が推定できると考えられた。

参考文献

- 1) 前田伸司ら：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，**83**，673-678(2008)
- 2) 山上隆也ら：VNTR 法による結核菌の遺伝子型別について，山梨衛環研年報，**60**，50-52(2016)
- 3) 地方衛生研究所全国協議会保健情報疫学部会：結核菌 VNTR ハンドブック第一版，2012
- 4) 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，**65**，201(2010)
- 5) Iwamoto, T. 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., **270**, 67-74(2007)
- 6) Supply P, et al. : Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol., **44**, 4498-4510(2006)
- 7) Hunter, P. R., Gaston, M. A. : Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity, J. Clin. Microbiol., **26**, 2465-2466(1988)
- 8) S. Junji et. al. : Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation. Infection, Genetics and Evolution, **35** , 82-88(2015)
- 9) 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**，755-759(2009)
- 10) Taibot EA, Williams DL, Frothingham R : PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG, J. Clin. Microbiol., **35**, 566-569, 1997
- 11) 前田伸司ら：反復配列多型 (VNTR) 分析を利用した結核菌と BCG 推定の可能性，感染症誌，**92**，705-709(2018)