
東京都微生物検査情報

MONTHLY MICROBIOLOGICAL TESTS REPORT、 TOKYO

第41巻 第2号
2020年 2月号
月 報

 東京都健康安全研究センター

<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/>

ISSN 1883-2636

結核菌の遺伝子型別法の現状

1. はじめに

2018年の東京都における結核罹患率（人口10万対）は14.2で、1999年以降減少傾向にあるが（図1）、全国の12.3と比較すると依然として高い状況にある。結核は薬剤耐性菌の蔓延や外国人患者の増加等の新たな課題もあり、感染の予防や発生状況の把握が必要とされる公衆衛生上重要な感染症である。

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、他の菌に比べ血清型やフェージ型分類に乏しく、菌株間の比較をするには、遺伝子解析による型別が有効とされる。遺伝子型別法は、菌をDNA塩基配列によって区別する試験で、集団感染例か否かの鑑別や再燃・再感染の鑑別、流行株のモニタリングや疫学調査ではわからなかった感染経路の発見などの目的で用いられる。これまでにさまざまな型別法が報告され、迅速性やコスト、分解能、簡便性などを勘案しながら発展してきた。実際に広く普及している型別法として、IS6110制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) やスポリゴタイピング、反復配列多型 (Variable Numbers of Tandem Repeats; VNTR) などが挙げられる。

本稿では、日本で広く用いられているVNTRと世界的に様々な分野で活用されている次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer; NGS) を用いた全ゲノム配列による一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 解析について紹介する。

2. VNTR型別法

結核菌の遺伝子では、ある配列を繰り返している領域 (VNTR領域) が80か所以上報告されている。これらの領域は変化しやすく、配列の繰返しの数が結核菌株によって異なる (図2A)。VNTR型別法は、菌株の領域ごとの繰返しの数を分析し、菌株間で比較することで同じ由来なのか、異なる由来なのかを判別する手法である。方法は、目的の領域のDNAをPCR法で増幅し、アガロースゲルやキャピラリーシーケンサーを用いて電気泳動し、PCR

産物の分子量から繰返しの数を判定する (図2B)。VNTRに必要なDNA量はRFLPに比べ少量でよく、培養初期の菌量の少ない時期でも検査が実施でき、迅速に結果が得られるという利点がある。また、VNTRの結果は各領域の繰返しの数の羅列として得られるため、比較が容易であり、多数の菌株を網羅的に解析することが可能である。

繰返しの数の変化頻度は、VNTR領域や結核菌の系統によって異なり、複数のVNTR領域を組み合わせで解析する。24領域を分析する24Beijing-VNTRは日本で70～80%を占める北京型結核菌において十分な分解能を持つ方法とされ、24領域全てで結果が一致あるいは1領域違いであれば共通の感染源が疑われる。

現在、東京都では、結核菌の積極的疫学調査事業として、24Beijing-VNTRによる型別法を実施している。一方、VNTRの結果が一致するにもかかわらず、疫学調査では患者間の関連が確認できない株も存在している。このような株については、24Beijing-VNTRでも分解能が不十分であると考えられている。近年、このような株における高い分解能をもつSNP解析の活用が注目されている。

3. SNP解析

結核菌のゲノムは約4,400,000塩基対であり、NGSを用いて全ゲノム配列を得ることができる。全ゲノム配列を結核菌標準菌株 (H37Rv) と比較することで、一塩基レベルでの変異 (SNP) の有無が判定可能である (図3A)。SNPはゲノム上の様々な部位に生じるが、特にコアゲノムという全ての株に共通して存在する領域中のSNPから、比較対象株同士が近縁であるかを知ることができる (図3B)。配列の繰返しの数を比較するVNTRと違い、SNP解析は一塩基レベルでの比較であるため、高い分解能を持つ。疫学的リンクを示唆するクラスターの閾値は明確には定められていないが、5 SNPsや12 SNPsが用いられることが多い。

また、全ゲノム配列からは型別以外の情報も得ることができる。例えば、薬剤耐性に関連した遺伝子変異の検出は、培養による薬剤感受性試験よりも迅速に薬剤耐性の有無を知ることができ、治療における効率化が期待される。現在、薬剤耐性関連変異の情報蓄積と臨床での活用のための技術

開発が進められている。

全ゲノム配列を用いた解析の具体的な流れとしては、NGSより得られたリードデータ（DNA配列の断片）をソフトで解析し、アライメント（リードを繋げて一つの長い配列にする）した後、SNPの抽出や系統判定、薬剤耐性関連の変異検出などの結果を得る方法が一般的である。解析ソフトは多数開発されているが、各ソフトの解析結果の比較に関する評価がなされていないことが現状の課題である。SNP解析はVNTRに比べ、コストがかかり、結果が複雑で比較が容易でないため、未だ普及が進んでいないが、菌株の詳しい情報を得ることができるという利点がある。

今後は、VNTRに加えてSNP解析を適宜取り入れていくことで、感染経路の推定や結核対策に役立てていくことが期待される。

<参考文献>

- 1) 東京都における結核の概況（2018年<平成30年>），東京都感染症情報センター
http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/diseases/tb/year_tb/y_2018/
- 2) 結核菌VNTRハンドブック，地研協議会 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
- 3) Meehan CJ, et al. Whole Genome Sequencing of Mycobacterium Tuberculosis: Current Standards and Open Issues. Nat Rev Microbiol 17 (9), 533-545 (2019).

（病原細菌研究科 長谷川 乃映瑠）

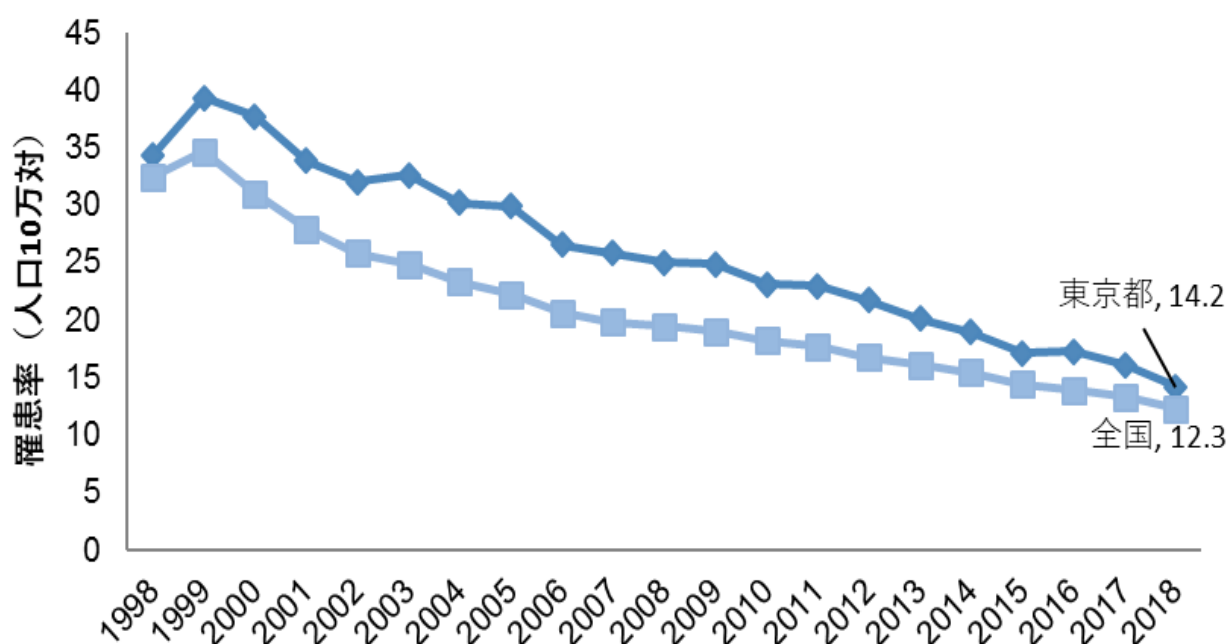


図 1. 東京都および全国における結核罹患率（人口 10 万対）の推移

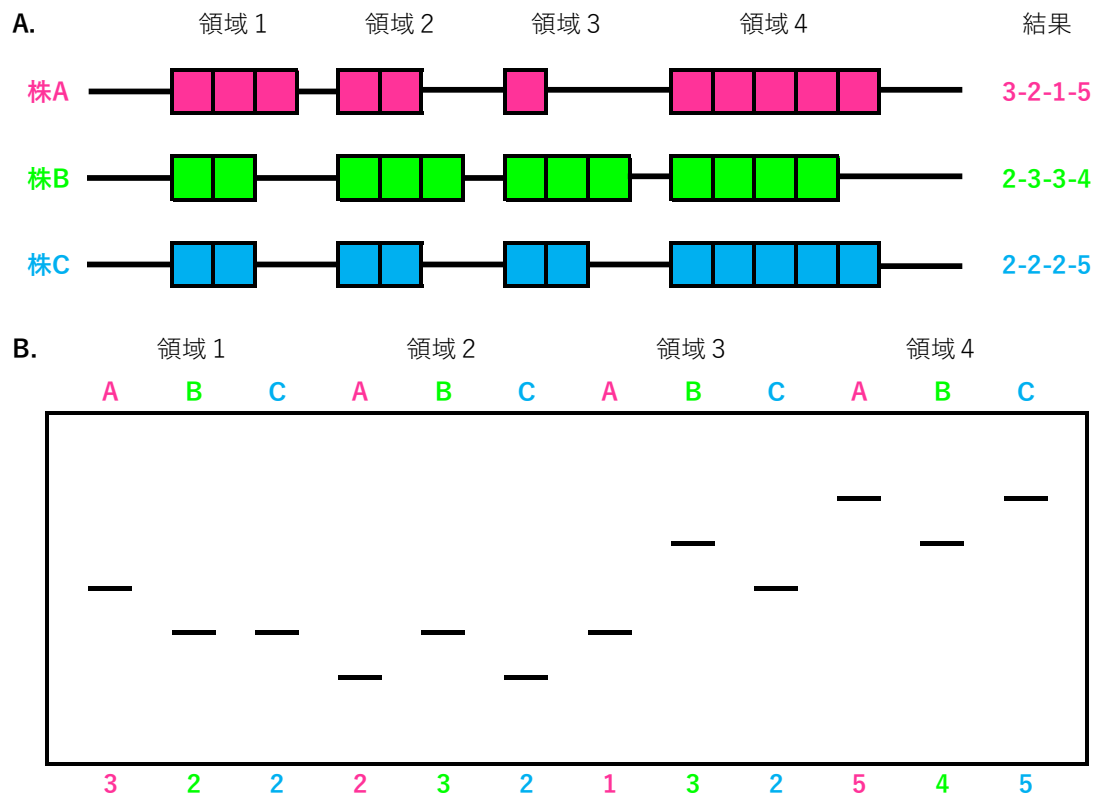


図 2. VNTR 型別法の例

A: 菌株による配列の繰り返し数の違い、B: PCR 産物の分子量からの繰り返し数の判定

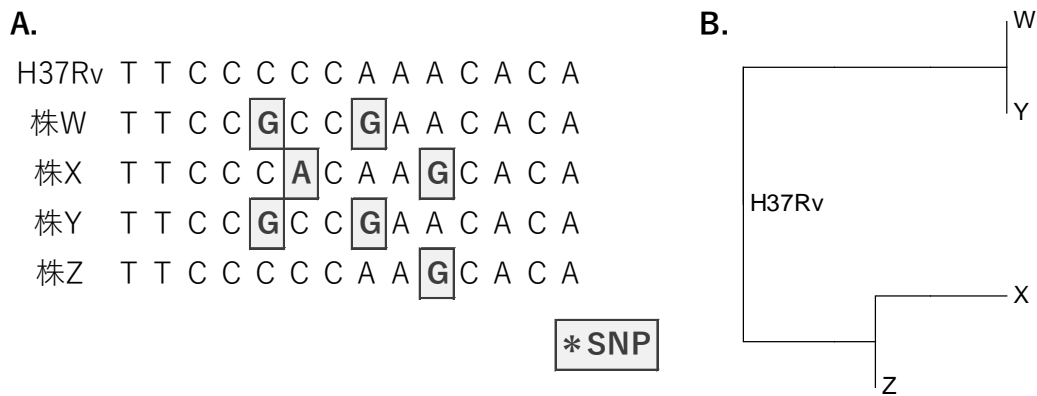


図 3. コアゲノムにおける一塩基レベルでの変異 (SNP) (A) と解析結果 (B) の例

表1 病原体搬入・検出状況(4種等)※

2020年2月分

機関名		コレラ菌	赤痢菌	チフス菌	パラチフスA菌	腸管出血性大腸菌	結核菌
区	千代田区						
	中央区		1				
	港区					2	1
	新宿区		1		1	2	7
	文京区						2
	台東区						
	墨田区						
	江東区						
	品川区						
	目黒区						
	大田区						3
	世田谷区					1	1
	渋谷区						
	中野区						
	杉並区					1	
	豊島区						
	北区						
	荒川区						
	板橋区					2	2
	練馬区					2	1
足立区						1	
葛飾区							
江戸川区						1	
市	町田市						
	八王子市						
小計			2		1	10	19
都	西多摩						
	多摩立川						
	南多摩						
	多摩府中					1	
	多摩小平						1
	島しょ						
小計						1	1
合計			2		1	11	20
健康安全研究センター 検出分							

※2016年4月より、各保健所から搬入された検体を集計することとした。

表2 検体搬入状況(全数把握対象疾患-五類)*

2020年2月分

	検体数	2020年累計
侵襲性インフルエンザ菌感染症(菌)	2	12
侵襲性髄膜炎菌感染症(菌)		1
侵襲性肺炎球菌感染症(菌)	2	19
カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症(菌)	3	6
播種性クリプトコックス症(菌)		
合計	7	38

※2016年4月(第37巻・第4号)から追加

表3 病原微生物検出状況(食中毒関連)

2020年2月分

	菌種名	検体数	2020年累計
細菌	大腸菌		
	毒素原性		
	組織侵入性		
	腸管出血性		
	その他・不明		
	サルモネラ		
	O4	3	3
	O7		
	O8		
	O9		
	その他		
	腸炎ビブリオ		
	プレジオモナス・シグロイデス		
	カンピロバクター	8	13
	黄色ブドウ球菌		
A型ウェルシュ菌	11	15	
エシェリキア・アルベルティイ			
プロビデンシア・アルカリファシエンス			
ウイルス	ノロウイルス(G I)	18	18
	ノロウイルス(G II)	120	253
	ノロウイルス(G I, G II)	4	4
	ロタウイルス		
	サポウイルス		
寄生虫	アニサキス	8	12
	クドア		
合計		172	318

表4 HIV 検査数及び陽性数

2020年2月分

	男性		女性		性別不明		合計	
	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数
東京都南新宿検査・相談室	661	9	222	0	0	0	883	9
保健所等	166	1	112	0	1	0	279	1
合計	827	10	334	0	1	0	1,162	10
2020年累計	1,733	20	696	0	1	0	2,430	20

表5 性感染症検査数及び陽性数

2020年2月分

	梅毒検査		クラミジア遺伝子検査		淋菌遺伝子検査	
	検査数	陽性	検査数	陽性	検査数	陽性
東京都南新宿検査・相談室	850	55	0	0	0	0
保健所等	221	7	190	15	102	0
合計	1,071	62	190	15	102	0
2020年累計	2,264	134	409	30	236	1

表6 定点把握疾患別病原体分離状況（ウイルス）

過去3ヶ月

定点種別	対象疾患名	検出病原体	12月	1月	2月	合計
小児科	咽頭結膜熱	アデノウイルス	3	3	1	7
	手足口病	エンテロウイルス	3	3		6
	不明発疹症	RSウイルス	1	1		2
インフルエンザ	インフルエンザ及びインフルエンザ様疾患 (ILI)	インフルエンザウイルスAH1pdm09	121	89	31	241
		インフルエンザウイルスAH3	1	1	2	4
		インフルエンザウイルスB型Victoria系統	1	16	27	44
		インフルエンザウイルスB型Yamagata系統				
基幹	無菌性髄膜炎	エンテロウイルス	1	1		2
基幹	インフルエンザ入院	インフルエンザウイルスAH1pdm09	8	6	1	15

◆東京都微生物検査情報◆

2020年 5月 8日

編集・発行

東京都健康安全研究センター

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-24-1

TEL:03-3363-3231

FAX:03-5332-7365

S0000786@section.metro.tokyo.jp

<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/>