

[ノート]

## 兵庫県における結核菌分子疫学解析について（2012～2024年）

辻田 久美子<sup>1\*</sup> 齋藤 悦子<sup>1</sup> 池端 真帆<sup>1</sup> 荻田 堅一<sup>2</sup> 鷲 ゆい<sup>3</sup> 荻 美貴<sup>1</sup> 押部 智宏<sup>1</sup>

### Molecular Epidemiological Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Hyogo Prefecture, 2012-2024

Kumiko TSUJITA<sup>1\*</sup>, Etsuko SAITO<sup>1</sup>, Maho IKEBATA<sup>1</sup>, Kenichi OGITA<sup>2</sup>, Yui WASHI<sup>3</sup>, Miki OGI<sup>1</sup> and  
Tomohiro OSHIBE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health Science, 1819-14, Kanno, Kanno-cho, Kakogawa 675-0003, Japan, <sup>2</sup>Hyogo Prefectural Animal Well-Being Center and <sup>3</sup>Hyogo Prefectural Tajima Meat Inspection Center

A total of 1,598 *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected between April 2012 and March 2025 were analyzed using the VNTR method. As a result, 24.8% were classified as non-Beijing lineage and 75.2% as Beijing lineage. Among the Beijing lineage, the Ancient lineage accounted for 76.5%, these results showed a pattern similar to that observed nationwide.

By age group, among patients aged 20-29, the proportions of non-Beijing lineage(39.1%)and Modern lineage(33.3%) were relatively high, and foreign born patients accounted for 81.5% and 82.6% of these groups, respectively. Regarding cluster formation, the Modern lineage tended to form larger cluster sizes than the other lineages.

In the future, it will be necessary to introduce genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* to achieve higher resolution analyses that can elucidate epidemiological links and genetic relationships that cannot be resolved by conventional epidemiological investigations or VNTR typing alone.

## I はじめに

結核は、結核菌によって引き起こされる感染症で、「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」において二類感染症に分類される。2016年11月に「結核に関する特定感染症予防指針」（以下、予防指針）<sup>1)</sup>が改正され、日本は「結核低まん延国（人口10万人対結核罹患率10以下）」となることを目指し、包括的なDOTS（直接服薬確認療法）の推進、潜在性結核感染症（LTBI）の治療強化、高齢者やハイリスクグループの結核対策の

強化等が定められた。日本は2021年に人口10万人対結核罹患率が9.2となり、目標値の10.0以下に達し<sup>2)</sup>、2024年には8.1にまで減少した。しかし、兵庫県は全国ワースト8位の9.6であり<sup>2,3)</sup>、全国的に見ると結核罹患率が高い傾向にある。

予防指針では、都道府県等は、結核菌の全株を収集し、分子疫学的手法からなる病原体サーベイランスの構築に努めることが目標として掲げられている。兵庫県立健康科学研究所（以下、当所）でも、2015年より、「結核患者の積極的疫学調査にかかる菌株型別検査実施要領」<sup>4)</sup>（以下、要領）に基づき、分子疫学手法として国内で汎用されているVNTR法（Variable numbers of tandem repeats）による遺伝子型別解析を実施している。

今回、2012年4月～2025年3月までに県内（神戸市及び姫路市を除く）の健康福祉事務所等から当所に搬入

<sup>1</sup> 兵庫県立健康科学研究所 感染症部

\* 〒675-0003 兵庫県加古川市神野町神野 1819-14

<sup>2</sup> 兵庫県動物愛護センター

<sup>3</sup> 兵庫県食肉衛生検査センター但馬食肉衛生検査所

された菌株について、VNTR法により遺伝子型の解析を行った結果を報告する。

## II 材料と方法

### 1. 材料

2012年4月～2025年3月までに当所に搬入された県内（神戸市及び姫路市を除く）発生患者由来結核菌株1,633株のうち、解析不能であった22株、患者情報が確認できなかった5株、BCG株であった6株及び非結核性抗酸菌株であった2株を除く1,598株を対象とした。

### 2. テンプレートDNAの調製

結核菌培養用の液体培地培養液又は小川培地上の発育コロニーをTE緩衝液で懸濁し、ドライバスで95℃、10分加熱し、13,000 rpm、10分遠心分離を行い、上清をDNA抽出液とした。DNA抽出液は、精製水を用いて2倍程度に希釈しDNAテンプレートとした。

### 3. VNTR法による解析

「結核菌VNTRハンドブック」<sup>5)</sup>に準拠し、1,598株において、12領域の解析を実施した<sup>6)</sup>。1,592株においては、JATA (15) -VNTR 分析法で追加されている3領域、超可変領域 (QUB3232, V3820, V4120) 並びにその他の領域として国際的に広く用いられている6領域 (MIRU4, MIRU16, MIRU40, ETR-C, Mtub30, Mtub39) を12領域に追加し、24領域で解析を実施した<sup>7)</sup>。

DNAテンプレートをPCR法で増幅を行い、得られたPCR産物を適宜希釈し、Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて電気泳動を行った。その後、Gene Mapper ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて反復数を算出し、VNTR型を決定

した。

領域の増幅ピークを確認できなかった場合は、アガロースゲル電気泳動を用いて反復数を算出し、非増幅やサイズ超過のケースであること等も確認して菌株のVNTR型を決定した。

### 4. 型別及び系統推定

山形県衛生研究所より提供された最大事後確率 (maximum a posteriori:MAP) 推定法による解析プログラムを用いて<sup>8)</sup>、VNTR型から非北京型 (non-Beijing)、北京型 (Beijing) の5つの系統 (新興型 (Morden)、祖先型 (Ancient) のST11/26, STK, ST3, ST25/19) に分類した。

### 5. 患者の分布状況

患者の疫学調査を元に、型別及び系統推定毎の年次推移や年齢分布、外国出生患者の状況を比較した。

### 6. クラスターの解析

VNTR法において24領域すべての反復数が一致した2株以上の菌株群をクラスターと定義した。

## III 結果及び考察

### 1. 患者の年齢内訳

解析した1,598株の患者の年齢分布をFig.1に示した。患者の年齢分布は0歳～104歳で、80-89歳が最も多く575株 (36.0%)、次いで70-79歳が299株 (18.7%)、90-99歳が206株 (12.9%) で、70歳以上が全体の67.8%を占めていた。県内の年間結核患者 (2020年～2024年) の70歳以上の占める割合は59～67%であり<sup>9)</sup>、同様の傾向であった。

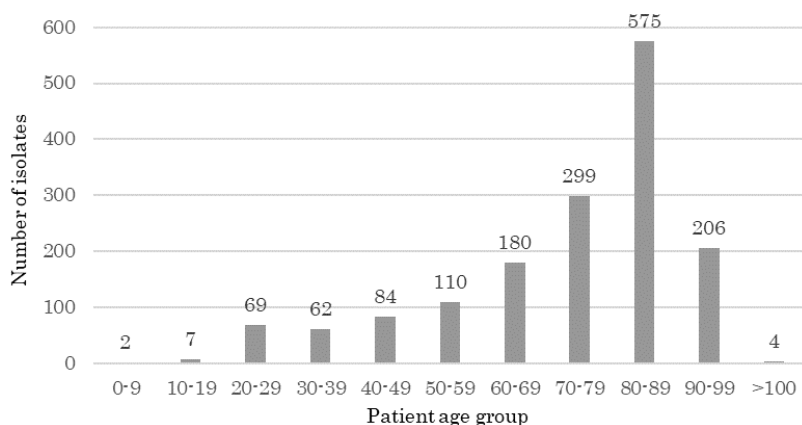


Fig.1 Age distribution of patients analyzed by VNTR typing

2. 非北京型と北京型及び系統推定

型別及び系統推定の結果をFig.2に示した. 非北京型は396株 (24.8%), 北京型は1,202株 (75.2%)であった. 北京型に属する新興型は283株 (17.7%), 祖先型は919株 (57.5%)であり, 祖先型はさらにST11/26が58株 (3.6%), STKが196株 (12.3%), ST3が313株 (19.6%), ST25/19が352株 (22.0%)に分類された.

北京型は, 感染伝播が強く, 発病や再発を起こしやすいとされており<sup>8)</sup>, 日本で分離される結核菌の7~8割ほどが北京型で, 北京型のうち祖先型が8割を占めている<sup>8,10,11)</sup>. 今回の型別では, 北京型が全体の75.2%であり, 北京型に占める祖先型の割合は76.5%となり, 全国及び他の自治体の報告<sup>12)</sup>と同様の傾向であった.

3. 型別及び系統推定の年齢階級別分布

型別及び系統推定の年齢階級別分布の割合をFig.3に示した. 20-29歳~60-69歳の年齢階級では新興型の割合

が全体の約3割 (26.1%~33.9%)を占めていた. この系統は感染伝播力や発病リスクにおいて他の系統よりも高く, 社会的活動が盛んな若年層に多いことが報告されており<sup>11,13)</sup>, 今回の解析結果はそれを裏付けるものと考えられた.

20-29歳は, 非北京型の割合が39.1%で, 他の年齢階級 (21.0~29.1%)と比較すると高かった. また, 内因性再燃の影響があり祖先型の占める割合が高いとされる70歳以上の高齢者<sup>13)</sup>では, 今回の解析結果でもST25/19, ST3, STK等の祖先型が59.9%~66.3%と他の年齢階級と比較して高かった.

4. 型別及び系統推定の年次推移

型別及び系統推定の割合を年次別にFig.4に示した. 要領の制定により, 菌株の搬入数が安定した2015年度以降も型別及び系統推定の割合に大きな変化はなく, 特徴的に増減している系統はなかった.

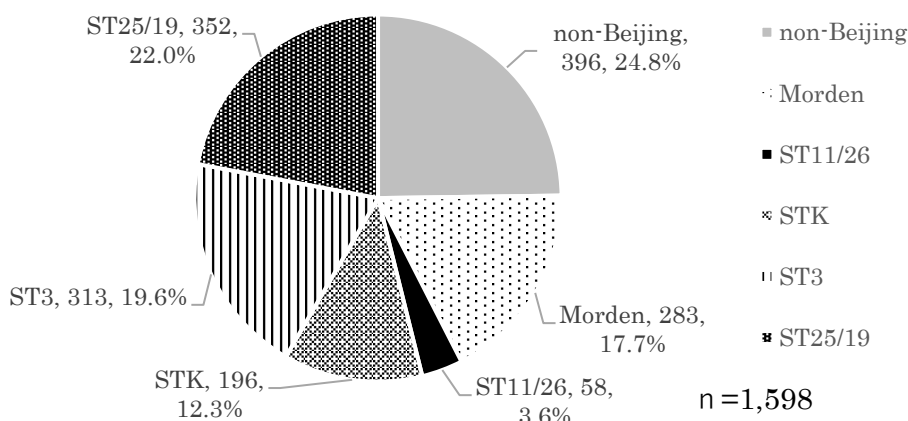


Fig.2 Proportions of *M. tuberculosis* isolates by VNTR-based lineage

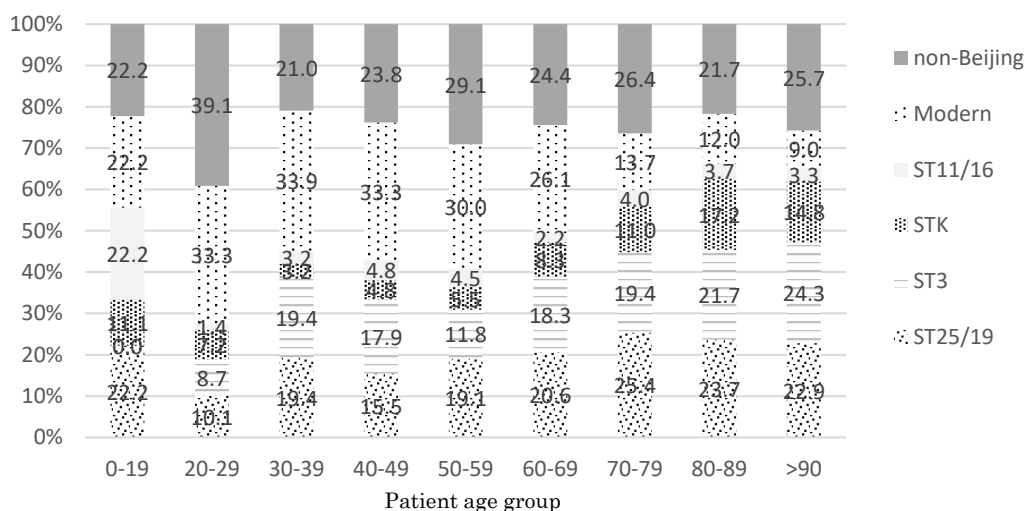


Fig.3 Lineages proportions of *M. tuberculosis* isolates by patient age group

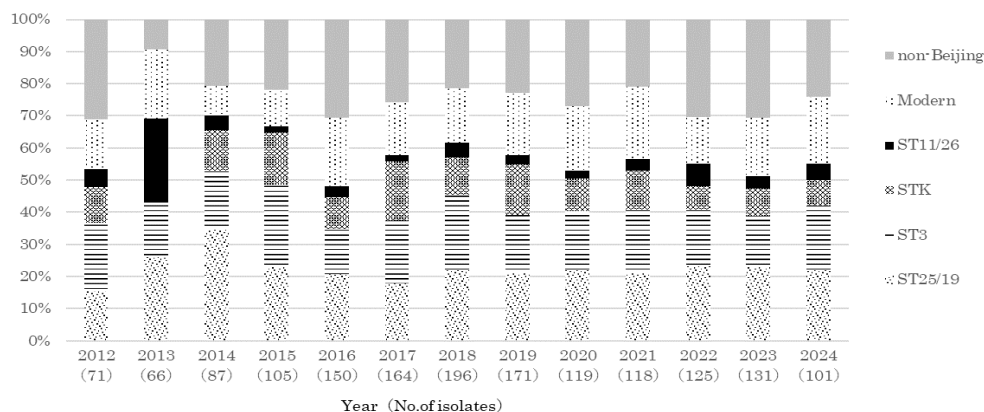


Fig.4 Lineages proportions of *M.tuberculosis* isolates by year

### 5. クラスターの解析

型別及び系統推定におけるクラスター数とクラスターサイズをTable 1に示した. 24領域を調べた1,592株のうち, 361株が132のクラスターを形成し, クラスター形成率は22.7%であった.

クラスターを形成した361株のうち, クラスター形成率は新興型が34.2%, 次いでST11/26が31.0%, ST25/19が27.3%, ST3が20.5%であった.

クラスターサイズでは, 2株からなるクラスターの割合は新興型が48.0%で, 他の系統は72.0~87.5%であり, 新興型は3株以上からなるクラスターが多く, 8株以上から構成されるクラスターが4つ認められた. 新興型は感染伝播が起こりやすくクラスターを形成しやすい遺伝子系統と報告されており<sup>13)</sup>, 今回の解析結果は同様の傾向が見られた.

13年間に及ぶ解析データの蓄積によって, 分離の時期が数年離れていても, 疫学的に関連が認められなかった菌株間においてクラスターを形成することがある. クラスターサイズに関わらず疫学情報から感染経路が判明している事例もあるが, 疫学的な関連が認められないクラスターも多かった.

最も規模の大きい新興型の15株のクラスターは多発

性大規模感染株のpECT07 (M株)であったが<sup>7,14)</sup>, 患者の発症年次や地域, 年代にバラつきがあり, 疫学的な関係は認められず, 県内(神戸市及び姫路市は除く)では2022年以降は出現していなかった.

近年, 結核菌においてもゲノム解析が行われており, より高精度に菌株の近縁性が識別されている<sup>15)</sup>. 疫学調査で関連が認められなかったクラスターについても, 偏りなく菌株収集を行い, VNTR法に加え, 結核菌ゲノム解析を併用し, 分子疫学解析の精度を上げていく必要がある.

### 6. 外国出生患者の状況

患者の疫学情報から外国出生患者は74名であった. 出生国別ではベトナム(18人), フィリピン(14人), 中国(9人)及びインドネシア(9人), ミャンマー(7人)の順に多かった.

外国出生患者由来株の型別及び系統推定の割合をFig.5に示した. 非北京型は47.3%と最も多く, 次いで北京型の新興型が39.2%であり, 日本に多い祖先型の割合は低かった. 世界では7割が非北京型で, 3割の北京型のうち新興型の割合が高く祖先型が低いことから<sup>13)</sup>, 今回の外国出生患者の結果は世界的な傾向を表している

Table 1 Number (%) of clustered isolates and cluster sizes by lineage

Lineage	Total no. of isolates	Cluster size (No. of isolates)									No. (%) of clustered isolates
		15	11	8	7	5	4	3	2	Total	
non-Beijing	394					2	1	4	24	31	74 (18.8)
Beijing Morden	281	1	1	2			3	6	12	25	96 (34.2)
Ancient ST11/26	58						1		7	8	18 (31.0)
STK	195							1	5	6	13 (6.7)
ST3	312				1		3	3	18	25	64 (20.5)
ST25/19	352				2	1	3	3	28	37	96 (27.3)
Total	1,592	1	1	2	3	3	11	17	94	132	361 (22.7)

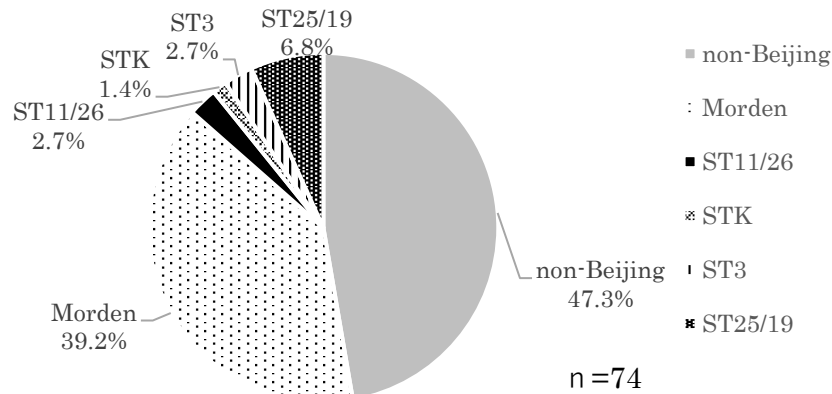


Fig.5 Proportions of *M. tuberculosis* isolates from foreign-born patients by lineage

と思われた。近年、外国出生の新登録結核患者数は増加傾向にあり<sup>16)</sup>、罹患率の高い国の出生者が日本滞在中に結核を発病する例が報告されている<sup>17)</sup>。今回の結果においても、外国出生患者の出生国での流行状況の影響を受けていることが考えられた。

年齢階級別の外国出生患者由来株のVNTR法による解析状況をTable 2に示した。全株と外国出生患者の株を年齢階級別に見ると、20-29歳は69株のうち46株(66.7%)で、他の年代と比較すると外国出生患者の割合が高かった。近年、外国出生患者が増加し、特に20-29歳の外国出生患者の割合が高いことが報告されており<sup>16)</sup>、今回の解析結果も同様の傾向が見られた。疫学調査における患者の職業欄を見ると、20-29歳の技能実習生が多いために、このような傾向が見られるものと考えられた。また、非北京型の20-29歳の患者は全株27株のうち外国出生患者の株が22株(81.5%)を占めており、新興型においても同様に全株23株のうち外国出生患者の株が19株(82.6%)と高い割合を占めていた。これらの結果から、20-29歳の患者で、非北京型と新興型の割合が他の年齢階級より高いのは外国出生患者由来株の占める割合が高いことが影響していると考えられた。

外国出生患者のクラスターについては、9株がそれぞれ

9つのクラスター形成に関わっていたが、疫学情報から集団発生したものと見られる事例は認められなかった。今後も海外の流行状況が県内の患者発生動向に与える影響は大きくなっていくものと思われる。入国前スクリーニングの実施<sup>18)</sup>による結核対策上の効果が期待されるとともに、導入が開始されていない国に対しても早期の導入が求められる。

#### IV 結論

2012年4月～2025年3月までに搬入された結核菌1,598株について、VNTR法による遺伝子型別の分類を行った結果、非北京型は24.8%、北京型は75.2%で、北京型のうち新興型は23.5%、祖先型は76.5%となり、全国的に報告されている割合と同様の傾向であった。

年齢階級別では、20-29歳の患者で非北京型(39.1%)と新興型(33.3%)の割合が他の世代より高く、外国出生患者がそれぞれ81.5%と82.6%を占めていた。クラスターの形成状況をみると、新興型が他の系統より大きなクラスターを形成する傾向にあった。

今後は疫学調査やVNTR法では解明できない菌株間の関連性について、より高精度な解析を行うために結核菌ゲノム解析を導入する必要がある。

Table 2 Number of VNTR-typed foreign-born patients by age group

Age group	non-Beijing		Modern		Ancient <sup>a)</sup>		Total	
	Foreign-Born Patients (%)	Total	Foreign-Born Patients (%)	Total	Foreign-Born Patients (%)	Total	Foreign-Born Patients	Total
0-19	0(0.0)	2	2(100)	2	0(0.0)	5	2(22.2)	9
20-29	22(81.5)	27	19(82.6)	23	5(26.3)	19	46(66.7)	69
30-39	6(46.0)	13	6(29.0)	21	2(7.1)	28	14(22.6)	62
40-49	4(20.0)	20	1(3.6)	28	0(0.0)	36	5(6.0)	84
50-59	3(9.4)	32	0(0.0)	33	0(0.0)	45	3(2.7)	110
>60	0(0.0)	302	1(0.6)	176	3(0.4)	786	4(0)	1,264
Total	35(8.8)	396	29(10.0)	283	10(1.1)	919	74(4.6)	1,598

<sup>a)</sup> Ancient lineage includes ST11/26, STK, ST3, ST25/19 lineage.

## V 謝 辞

疫学情報の提供及び検体採取にご協力いただきました  
県保健医療部疾病対策課，県健康福祉事務所並びに各中  
核市保健所，医療機関の皆様方に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 厚生労働省：結核に関する特定感染症予防指針について.平成 19 年 3 月 30 日（最終改正平成 25 年 11 月 25 日），厚生労働省告示 72 号（2007）
- 2) 公益財団法人 結核予防会結核研究所 疫学情報センター：年報 都道府県別罹患率推移
- 3) 兵庫県保健医療部疾病対策課：兵庫の結核統計 令和 6 年版（2024）
- 4) 兵庫県保健医療部疾病対策課：結核患者の積極的疫学調査にかかる菌株型別検査実施要領. 令和 7 年 12 月 8 日最終改定（2024）
- 5) 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：結核菌 VNTR ハンドブック（2012）
- 6) 前田伸司，村瀬良朗，御手洗聡，菅原 勇，加藤 誠也：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）
- 7) 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，**85**，845-852（2010）
- 8) 加藤誠也，瀧井猛将，大角晃弘，藤山理世，玉井清子，岩本朋忠，村瀬良朗，山本香織，瀬戸順次，阿彦忠之：結核分子疫学調査の手引き第一版（2017）
- 9) 兵庫県立健康科学研究所（兵庫県感染症情報センター）：兵庫県感染症発生動向調査事業年報，10（2024）
- 10) 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：結核菌 VNTR ハンドブック追補（2014）
- 11) Iwamoto,T, Fujiyama,R, Yoshida,S, Wada,T, Shirai,C, Kawakami,Y : Population structure dynamics of Mycobacterium tuberculosis Beijing strains during previous decades in Japan. J Clin Microbiol, **47**, 3340-3343（2009）
- 12) 山田和弘，松田達也，青木美耶子，中根衣久美，白鳥浩美，齋藤典子，安井善宏：2016 年から 2020 年に愛知県内で分離された結核菌の VNTR（Variable Numbers of Tandem Repeats）法における遺伝子型. 愛知県衛研究所報，**74**，9-16（2024）
- 13) 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）
- 14) Ohkado,A, Murase,Y, Mori,M, Hasegawa,N, Otsuka,G, Nagamine,M, Maeda,H, Uchimura,K, Ohmori,M, Yamada,N, Maeda,S, Kato,S, Mori,T, Ishikawa,N : Transmission of specific genotype streptomycin resistant strains of Mycobacterium tuberculosis in the Tokyo Metropolitan Area in Japan. BMC Infect Dis., **9**, 138（2009）.
- 15) 瀬戸順次，和田崇之，村瀬良朗，三瓶美香，下村佳子，細谷真紀子，水田克巳，御手洗聡，阿彦忠之：山形県における結核菌ゲノム解析を用いた結核分子疫学調査. 感染症学雑誌 **97**，6-17（2023）
- 16) 国立感染症研究所：結核 2023 年現在.病原微生物検出情報（IASR），**46**，47-50（2025）
- 17) 高柳喜代子：第 94 回総会教育講演 外国出生結核患者の現状と対策—外来診療での取り組みを中心に—. 結核，**94**，541-546（2019）
- 18) 出入国在留管理庁在留管理支援部在留管理課長，外務省領事局外国人課長厚生労働省健康・生活衛生局感染症対策部感染症対策課長：入国前結核スクリーニングの実施について. 令和 6 年月 26 日（令和 7 年 3 月 31 日最終改正），入管庁管第 4384 号，外領外合第 1335 号，感感発 1226 第 1 号（2024）

（令和 8 年 3 月 18 日受理）