

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590651

研究課題名(和文)大阪府に蔓延する多剤耐性結核菌を用いた結核菌感染性マーカーの開発

研究課題名(英文) Research for genetic specificity of the Multi Drug-resistant Mycobacterium tuberculosis Spreading in Osaka Prefecture.

研究代表者

田丸 亜貴 (Tamaru, Aki)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・主任研究員

研究者番号：70270767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大阪府内の多剤耐性結核菌の地域分子疫学の結果発見した多剤耐性結核菌株のみで構成される大きな同一遺伝子型群(以下、V02群)について、その感染性の強さの原因を調べるべく、次世代シーケンサーによるゲノム解析を実施した。V02群の15株と結核菌標準菌株H37Rvを比較するとV02群株に共通するSNPsは1445か所あったが、V02群株間では51/4Mbpしか相違点のない菌株群であることが分かった。15株は2か所の変異(7582のA→C、3157508のG→A)の有無により大きく2つに分かれ、1つの感染源による集団感染ではないが共通の祖先を有すると強く示唆される結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：V02 strain: the spreading multi drug-resistant Mycobacterium tuberculosis stain in Osaka Prefecture, were subjected to genome-wide analysis by next-generation sequencing. Compared with H37Rv, 1,445 SNPs were common to all 15 isolates belonging to V02 strain. Although 51 SNPs were found among 15 isolates of V02 strain, and V02 strains were divided into two groups by two SNPs (A to C at 7582 and G to A at 3157508). These results shows the existence of V02 strains was not from one outbreak causing by one infectious source but the isolates of V02 may have common ancestor.

研究分野：細菌学

キーワード：多剤耐性結核菌 遺伝子型別 ゲノム解析 SNP解析

## 1. 研究開始当初の背景

大阪府内の多剤耐性結核の地域分子疫学の結果、多剤耐性結核菌株のみで構成され、多剤耐性結核菌の 12.4%、感受性株も含めた対象株全体の 1.1%を占める大きな同一遺伝子型群(以下、V02 群)を発見した。V02 群株は初回結核患者からも分離されており、さらに、各分離株の薬剤耐性遺伝子変異が一致していることから、V02 群株は多剤耐性化した後に感染拡大していることが示された。また、結核は再感染が起こりにくい疾患であるが、感受性結核菌で発症していた患者が V02 群株に再感染した事例がみられた。これらのことから、V02 群株は多剤耐性結核菌のなかでも感染性が高い菌株であり、本菌株の遺伝子変異を解析することで菌株間の感染性差の原因となる遺伝子変異を特定し、結核菌臨床分離株の感染性を診断するツールとして用いることができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

結核菌にも感染性の高い株と低い株がある。結核菌臨床分離株の感染性の高低を診断することができれば、結核、特に致死率の高い多剤耐性結核の感染拡大に非常に有用なツールとなる。本研究では、申請者が発見した感染性の高い多剤耐性結核菌 V02 群株を変異解析して同菌株群に共通する遺伝子変異を検出し、他の臨床分離株と比較することにより、「感染性マーカー」になりうる遺伝子変異を特定することをめざし、V02 群株の遺伝的特性の解明を試みる。

## 2. 研究の方法

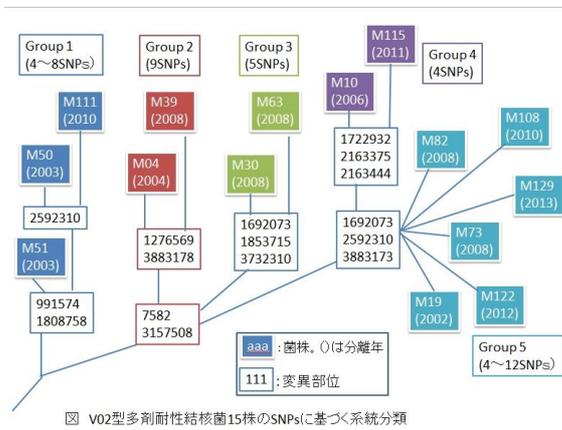
2002~2013 年に大阪府および近隣自治体から搬入された多剤耐性結核菌のうち、26 loci VNTR 型別にて V02 群株と同定された 15 株を対象とした。

15 株から、Parish らの方法 (Parish T, and Stoker, NG(1998) *Mycobacteria*

protocols: Humana Press. 31-44p) により染色体 DNA を精製し、IlluminaHiSeq により Pair-end でゲノム配列を得た(タカラバイオ)。各株のゲノム配列は DDBJ Read Annotation Pipeline (<https://p.ddbj.nig.ac.jp/pipeline/Login.do>) を用いて結核菌標準菌株 H37Rv (GenBank:AL123456) に Burrows-Wheeler Aligner によりマッピングし、得られた変異リストを比較することにより各株の一塩基変異 (SNP) を調べた。

## 4. 研究成果

V02 群株は、26 loci-VNTR 遺伝子型のみならず、RFP, INH, SM 等抗結核薬の耐性に関与する遺伝子変異部位も一致しており、研究開始時にはクローナルな菌株であると予想した。しかし、2002 年大阪南部分離株、2010 年大阪北部分離株、V02 株のうち唯一患者接触歴が確認できていたペアの 2 株、の計 4 株について SNPs 解析したところ、各株間に 4~8 か所の SNPs がみつかった。この SNPs 数は各株の出現間隔の長さから予想される範囲内であるが、V02 群株がさらにサブグループに分かれる可能性も示唆された。そこで、すべての V02 群株について SNPs 解析を実施した(図)。V02 群の 15 株と結核菌標準菌株 H37Rv を比較すると V02 群株に共通する SNPs は 1445 か所あった。V02 株間での比較では SNP のない株はなく、1~12 か所の SNPs があった。12 株に共通、9 株に共通、5 株に共通する SNP がそれぞれ 1 か所、11 株共通と 8 株共通がそれぞれ 2 か所、10 株共通が 5 か所、3 株共通と 2 株共通がそれぞれ 4 か所、各株に特異的な SNP が 39 か所あった。15 株は 2 か所の変異(7582 の A C、3157508 の G A)の有無により大きく 2 つに分かれた(図、Group 1 と Group2~5)。V02 群株のうち 3 株はキノロン感受性株であったが、これらは Grpup 1 に分類され、キノロン耐性関与



遺伝子変異だけでなく他の SNPs もキノロン耐性 V02 群とは異なることが分かった。Group1 以外の 12 株はさらに 4 グループに分かれた。各グループ内での SNPs 数は、直接感染ではないものの共通の感染源からの伝搬を示唆する値であった。

以上まとめると、本研究から V02 群株間はゲノム解析結果でも 51/4Mbp しか相違点のない菌株群であること、V02 群株が 1 つの感染源による集団感染ではないが共通の祖先を有すると強く示唆される結果が得られた。V02 群株に共通する約 1400 の SNPs に本群菌の感染性の高さの原因があるものと考え、今後、感染源マーカーになりうる変異を検索していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### 【論文】

1. Clonality and Micro-Diversity of a Nationwide Spreading Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. Wada T, Iwamoto T, Tamaru A, Seto J, Ahiko T, Yamamoto K, Hase A, Maeda S, and Yamamoto T. PLOS One 10(3), e0118495, 2015. (査読あり)
2. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and

scale samples by loop-mediated isothermal amplification. Nishiuchi Y, Tamaru A, Suzuki Y, Kitada S, Maekura R, Tateishi Y, Niki M, Ogura H, Matsumoto S. J Water Health. 12(2): 211-219, 2014. (査読あり)

3. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in *Mycobacterium avium* subsp. hominissuis. Iwamoto T, Arikawa K, Nakajima C, Nakanishi N, Nishiuchi Y, Yoshida S, Tamaru A, Tamura Y, Hoshino Y, Yoo H, Park YK, Saito H, Suzuki Y.: Infect Genet Evol. 21: 479-483, 2014. (査読あり)
4. Whole-Genome Sequence of the Potentially Hypertransmissible Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strain OM-V02 005. Tateishi Y, Tamaru A, Ogura Y, Niki M, Yamamoto T, Hirata K, Hayashi T, Matsumoto S. Genome Announc. 1: e00608-12, 2013. (査読あり)
5. 「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 - 」 和田崇之、田丸亜貴、岩本朋忠、有川健太郎、中西典子、小向 潤、松本健二、長谷 篤. 結核 88 巻 4 号、393-398、2013 年 (査読あり)
6. 「JATA (12)-VNTR 型別による結核集団発生事例の菌株異同調査」 田丸亜貴、和田崇之、岩本朋忠、長谷篤. 結核 88 巻 4 号、399-403、2013 年 (査読あり)

7. Simple multiplex PCR assay for the identification of Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* isolates with a lineage-specific mutation in Rv0679c. Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye KS, Ling H, Hattori T, Iwamoto T, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y, Matsuba T. J Clin Microbiol 51: 2025-2032, 2013. (査読あり)
8. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. hominissuis strains isolated from humans, pigs, and human living environment. Iwamoto T, Nakajima C, Nishiushi Y, Kato T, Yoshida S, Nakanishi M, Tamaru A, Tamura Y, Suzuki Y, Nasu M. Infection, Genetics and Evolution 12: 846-852, 2012. (査読あり)
9. Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific *Mycobacterium tuberculosis* clones in Osaka prefecture, Japan. Tamaru A, Nakajima C, Wada T, Wang Y, Inoue M, Kawahara R, Maekura R, Ozeki Y, Ogura H, Kobayashi K, Suzuki Y, Matsumoto S. PlosOne. 7(8) :e42505, 2012 (査読あり)

【学会発表】

1. 田丸亜貴、大阪府における多剤耐性結核の分子疫学、第 53 回日本社会医学学会総会、2012 年 7 月、大阪
2. 田丸亜貴、鈴木定彦、中島千恵、郡山孝則、坪田敏雄、Outbreak of *Mycobacterium bovis* Infections of Japanese Shika Deer (*Capreolus nippon centralis*) in Zoological garden in

Osaka. Asian society for zoo and wildlife medicine society. 2012 Oct, Bangkok.

3. 田丸亜貴、耐性結核菌の分子疫学、大阪公衆衛生協会保健計画部会・感染症予防部会合同シンポジウム、2013 年 3 月、大阪
4. 「高まん延地域の結核対策における分子疫学的解析」、田丸亜貴、第 72 回日本公衆衛生学会総会、2013 年 10 月 23 日、津市
5. 「病院内検体コンタミネーション事例への保健所としての対応」、北井俊大、岡本美喜恵、梅田美緒、岸田裕香、中田栄子、佐藤善子、山本祐子、田丸亜貴、永井信彦、第 51 回日本公衆衛生学会近畿地方会、2014 年 05 月 22 日、和歌山市、
6. 「コンタミネーションが原因の結核菌検査誤判定例とその対策に関する考察」、田丸亜貴、第 73 回日本公衆衛生学会総会、2014 年 11 月 6 日、宇都宮市
7. 「当所における多剤耐性結核菌の発生状況と分子疫学：2007 年以降とそれ以前の比較」、田丸亜貴、第 90 回日本結核学会総会、2015 年 3 月 27 日～28 日、長崎

〔雑誌論文〕(計 9 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課  
主任研究員  
田丸亜貴 ( TAMARU Aki )

研究者番号：70270767

##### (2) 研究分担者

新潟大学 医学部細菌学教室  
教授  
松本壮吉 ( MATSUMOTO Soukichi )

研究者番号：30244073

長崎大学 熱帯医学研究所  
助教  
和田崇之 ( WADA Takayuki )

研究者番号：70332450