

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：84406

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893338

研究課題名(和文) 結核菌の遺伝系統分類および疫学情報に基づく若年者結核のリスク要因究明

研究課題名(英文) The genotypic classification of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factor investigation on the basis of the epidemiology information in young tuberculosis patient

研究代表者

山本 香織 (Yamamoto, Kaori)

大阪市立環境科学研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：70649011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：北京型株新興型は、結核菌の中でより病原性の高い遺伝系統であると考えられている。本課題では40歳未満の若年結核患者由来および、あいりん地域患者由来の結核菌株を対象として、結核菌の感染伝播状況を調査した。結果、若年結核患者由来およびあいりん地域患者由来の結核菌株において、北京型株新興型の検出率が増加していることが明らかとなった。あいりん地域の患者年齢階級は、50代から70代で80%以上を占めており、若年者層だけでなく中高年者層にも新興型の検出割合が高まってきていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The modern subfamily of Beijing lineage, one of the genetic groups of *Mycobacterium tuberculosis*, is considered more virulent than other genetic groups. In this study, I investigated genetic situation to elucidate situation of spread of the tubercle bacilli isolated from two patients groups: younger than 40 years and resident in the Airin area. As a result, it was revealed that the proportion of strains belonging to the modern Beijing subfamilies has increased from both patients populations. In Airin area, TB patients aged 50 to 80 accounted for more than 80% of the total population. The situation suggests that the modern Beijing subfamily strains has increased in not only young fellows but also old and middle aged people.

研究分野：分子疫学

キーワード：結核 遺伝系統 若年者 北京型株新興型 あいりん

1. 研究開始当初の背景

結核は主に結核菌により引き起こされる感染症で、日本の新登録結核患者は毎年2万人を超える。厚生労働省の平成24年結核登録者情報調査年報集計結果によると、罹患率(人口10万対の新登録結核患者数)は16.7で、欧米諸国の平均罹患率4.4と比較すると依然として高い状況にあり、低蔓延国の水準となる結核罹患率10以下にはまだ至っていない。年齢別の新登録結核患者割合では70歳以上の高齢者が55.6%を占め、多くは過去の結核高蔓延期に結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)に感染し、現代において再発したと考えられている。一方で、40歳までの若年者層においては、最近の感染により発病したケースが多いと考えられている。若年者は結核に対する認知度の低さから受診が遅れ、重症化することで結核菌を飛散させ、新たな感染者を増加させる恐れが大きい。さらに行動範囲の広さ、繁華街などの不特定多数の人が集まる場所への出入りの多さから、把握が難しい集団感染を招くことが危惧される。また、若年者結核患者では結核菌の中でも病原性が高いとされる遺伝系統群が拡がりつつあることが報告されている。したがって、若年結核患者が登録された際には接触者調査によって無症状病原体保有者を発見し、予防投薬を早期に行うことで発症を抑えることが特に重要な対策となる。

結核菌は地域によって検出される遺伝系統の割合が異なる傾向にある。日本が属する東アジア地域では、北京型と呼ばれる遺伝系統が優勢であり、わが国でも臨床分離株の約8割は北京型である。北京型はさらに祖先型と新興型に分類され、東アジア諸国では検出される北京型の約9割が新興型であるのに対し、わが国では祖先型が約8割を占めるといふ特徴がある。しかしながら、近年40歳未満の若年結核患者からは、新興型の検出率が上昇しているとの報告がある。

北京型は、他の遺伝系統と比べ感染伝播力が強い、薬剤耐性化傾向がある、BCGによる獲得免疫に対して抵抗性がある、発病・再発を起こしやすいと言われている。オランダ・ベトナム・香港・中国では、BCG接種歴のある若い世代で分離された結核菌は新興型が多いとの報告(Kremer K, et al. *Emerg Infect Dis.* 2009 15:335-339)があり、新興型はBCG接種のワクチン効果から免れる遺伝系統であることが推察されている。さらに、新興型は感染伝播力、発病率が祖先型より高く、集団感染に関与する遺伝系統であると示唆されているが、理由は明らかではない。病原性や感染伝播力の高さが指摘され、今後の流行が危惧されている新興型であるが、国内において疫学情報に基づいた検証はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では全国で最も結核患者が多い大

阪市(平成24年結核罹患率42.7)をモデルとし、(1)40歳未満の若年結核患者から分離された結核菌株について新興型の蔓延状況を把握すると共に、疫学情報との関連を統計的に解析し、新興型の病原性や感染伝播力、再発への関与を明らかにすることを目的とした。また、比較として(2)結核高蔓延地域である大阪市あいりん地域における結核感染伝播状況を調査した。あいりん地域は大阪市の中心からやや南に位置する西成区の北東部一帯の汎称地名であり、人口密度の高い地域である。ホームレス、日雇い労働者、生活保護受給者が多く、結核罹患率が極めて高い(平成24年結核罹患率368)地域である。

3. 研究の方法

研究対象およびサンプル調整

大阪市において、2012年から2014年に新登録となった40歳未満結核患者から分離された結核菌188株(外国出生患者由来29株を含む)および、大阪市あいりん地域において2006年から2014年に新登録となった結核患者から分離された結核菌490株を対象とし、加熱処理によりDNAを抽出した。

VNTR型別

VNTR(Variable Number of Tandem Repeat)型別は、結核菌ゲノム内に多数存在する反復配列領域が示す多様性を利用した遺伝型別法であり、現在国内で結核菌の標準的な型別法として提唱されている。本研究では12領域を対象としたJATA(12)-VNTRを基本とし、必要に応じて12領域を加えた24領域の解析を行った。得られたVNTR型について、24領域が一致した菌株群をクラスタとしたクラスタリング解析を行った。

遺伝系統分類

対象結核菌株について、VNTR型別結果から、各領域における反復数の頻出傾向を利用した亜系統推定(MAP推定)(Seto J, Wada T, et al. *Infect Gene Evol.* 2015 35:82-88)により、非北京型株、北京型株(祖先型・新興型)の3系統に分類した。若年結核患者由来の188株については、推定結果の確認のためRv0679c遺伝子の1塩基置換をターゲットとしたマルチプレックスPCR法による北京型、非北京型の分類(Nakajima C, et al. *J Clin Microbiol.* 2013 51:2025-2032)を併せて実施した。

4. 研究成果

(1)若年結核患者における結核菌伝播状況

検出された北京型株のうち約半数(47.9%)は新興型を示し、188株のうち41株(21.8%)が14クラスタを形成した(表1)。遺伝系統毎のクラスタ形成率を比較すると、非北京型株は5%(2株/42株)、祖先型は23.7%(18株/76株)、新興型は30.0%(21株/70株)であった。若年者層の結核発病は多くが最近の感染に

よるものであるが、若年者間での感染伝播は北京型株、特に新興型に多く、非北京型株を示した患者の多くは中高年齢層からの感染であると推定された。

表 1. 若年結核患者由来菌株の遺伝系統およびクラスタ形成状況

	計	非北京型	祖先型	新興型
菌株数 (%)	188(100.0)	42(22.3)	76(40.5)	70(37.2)
クラスタ形成菌株数	41	2	18	21
クラスタ数	14	1	7	6
クラスタ形成率 (%)	21.8	4.8	23.7	30.0
最大クラスタ形成菌株数	7	2	3	7

外国出生患者由来 29 株のうち 2 株は国内出生患者と 2 つのクラスタを形成した。外国出生患者由来 1 株と国内出生患者由来 3 株から成るクラスタは、接触状況の調査から国内出生患者から外国出生患者へ感染したと推定された。もう一方のクラスタの詳細は調査中であるが、登録時期から国内出生患者からの感染である可能性が高いと考えられた。外国出生者関連株の多くは国内出生患者とクラスタを形成していないこと、2 つのクラスタはいずれも国内出生患者からの感染が推定されたことから、海外からの流入株による流行は現在ないと考えられた。結核高蔓延国である中国・韓国・フィリピン等のアジア諸国から就学および就労目的で日本へ入国する若年者は増加傾向にあり、それに伴う結核菌の流入を監視するためにも継続した VNTR データのモニタリングが重要である。アジア諸国で分離される結核菌は日本と同じく北京型株が多く、新興型の検出割合が増加してきた状況から、国内患者との接触に起因する直近の伝播と海外からの新規菌株の流入を厳密に区別するために、今後は次世代シーケンサーなどを活用した比較ゲノム解析も必要となると考える。

(2) あいりん地域における結核菌伝播状況

2002 年から 2004 年にかけてあいりん地域内のホームレス由来結核菌株 273 株を対象とした研究結果 (Wada T, et al. Tuberculosis, 2009 89:252-255) と比較すると、新興型の検出率は 27.7% から 39.3% と増加し、本研究期間の 2006 年以降も、新興型の検出率は増加傾向にあった。2014 年には新興型が 40.4% と祖先型の 31.9% を上回ったことは、従来祖先型の検出割合が高いとされてきたわが国において、高罹患地域では他の地域に先駆けて結核菌遺伝的集団構造に変化が生じていることが示された(図 1)。あいりん地域患者由来の結核菌株の 80% 以上は 50 代から 70 代の結核患者から分離されており、若年結核患者でその検出割合が増えつつあると指摘されている新興型は、中高年齢層においても検出割合が高まってきていることが明らかとなった。また、本地域内におけるクラスタ数は新興型によるものが最

も多く、地域内での感染伝播の主流は新興型になりつつあることが判明した。

一方で、本地域内では 2006 年以降同一の VNTR 型を示す非北京型株の菌株が毎年検出され、最も大きなクラスタを形成していた。本クラスタの菌株について患者間の関連は見出されていないが、なんらかの集団感染が継続していることが示唆された。

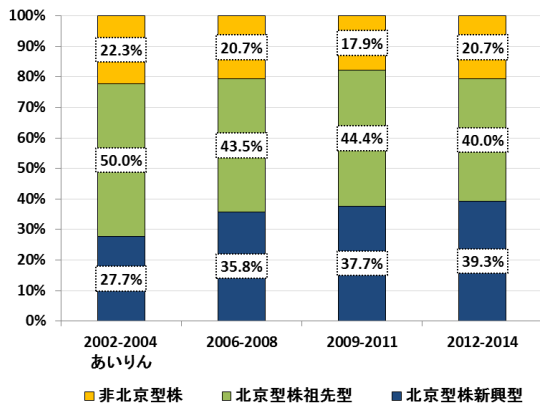


図 1. あいりん地域内の結核菌遺伝系統検出状況

本地域内の感染伝播は新興型が主流となりつつあるが、地域全体においてクラスタ形成率および、クラスタ数が減少していることから、地域内で検出される結核菌の遺伝子型が多様化していることが明らかとなった。また、結核罹患率も低下してきていることから、本地域内における感染伝播は減少していることが示唆された。

(3) まとめ

若年結核患者由来ならびに、あいりん地域内患者由来の結核菌株はいずれも新興型の検出率が増加傾向にあり、クラスタ形成状況からも本遺伝系統群が最近の感染の主流となっていることが示された。

現在疫学情報の収集を継続しており、結核菌の遺伝系統による感染伝播力・病原性について今後検討を行う予定である。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

山本香織, 中村寛海, 小向潤, 和田崇之, 梅田薫, 小笠原準, 平井有紀, 平山照雄, 長谷篤, 松本健二, 西尾孝之.
大阪市における結核菌の分子疫学解析状況 (2012-2014).
平成 26 年度大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報, 和文, 発行年月 2015.12, 第 77 集, 21-26 (査読無)

[学会発表](計 3 件)

山本香織, 和田崇之, 小向潤, 松本健二, 下内昭, 山本太郎

大阪市あいりん地域における結核菌分子疫学調査 第74回日本公衆衛生学会総会，長崎県（2015.11.4-6）

山本香織，小向 潤，下内 昭，中村寛海，和田崇之，長谷 篤，平井有紀，平山照雄，松本健二，西尾孝之

大阪市あいりん地域における結核菌分子疫学調査．第14回大都市結核対策研究会，大阪市（2016.2.20）

山本香織，和田崇之，小向 潤，長谷 篤，松本健二，下内 昭，山本太郎

大阪市あいりん地域における結核菌伝播状況解析（2006～2014）

第91回日本結核病学会総会，石川県（2016.5.26-27）

6．研究組織

研究代表者

山本 香織（YAMAMOTO, Kaori）

大阪市立環境科学研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：70649011