

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04136

研究課題名(和文)患者地理情報と病原体遺伝子情報を駆使した結核伝播経路追跡

研究課題名(英文) Tracing of transmission routes of tuberculosis using geographical information of patients and genetic analysis of clinical isolates

研究代表者

和田 崇之(WADA, Takayuki)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：70332450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：結核の感染伝播を調べるために、患者から分離された臨床分離株の遺伝子を比較して関連を求める手法(分子疫学)が広く利用されている。本研究では、菌株の遺伝子解析から伝播関係が推定された患者間の空間的な関係性(居住地間の距離)に基づき、遺伝子変異から推定された伝播プロセスと空間的な拡散の相関を可視化した。また、交通流動調査に基づく人流データから、地域ごとの居住者がどの地域の人と接触しているのかを計算、可視化、比較し、感染流行の背景となりうる人同士の接触量が空間的に強い異方性(全方向に一律でなく、特徴のある広がり方をしていること)を伴っていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人から人へと伝播拡散していく病原体がどのような経緯で広がっているのかを調べるには、実際にその現象を追いかけて実証していく必要がある。その手法の一つが病原体の遺伝子比較、患者情報に基づく疫学解析となる。これらは病原体を網羅的に集めること、患者情報を適切に扱うことが不可欠であり、国内の調査研究としては結核が唯一可能性のある研究対象となっている。ここに患者地理情報や社会活動に伴う人の流れ情報をこうした研究に取り入れることにより、病原体の伝播経路把握という公衆衛生の発展だけでなく、将来的な感染症の脅威に向けた社会実装を下支えする研究基盤を提供できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the transmission of tuberculosis infection, molecular epidemiology, in which genes of clinical strains isolated from patients are compared, is widely used. In this study, we visualized the correlation between spread of pathogens estimated from genetic analysis of the strain and spatial diffusion estimated from the spatial relationship (distance between residences) of the patients. Moreover, from people-flow data based on person-trip survey, we estimated, visualized, and compared how people are in contact with other people resident in surrounding areas. As a result, strong geographic anisotropy was monitored in the amount of contact of people that can be the background of epidemic of infection in a society.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：分子疫学 感染症 結核 ゲノミクス 地理学

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本における結核の罹患率は人口 10 万人当たり 10 を超える状況が長く続いており、世界的には中蔓延国に分類される状況が続いている。その理由の一つには、我が国が 20 世紀初頭から中盤にかけて世界的にも例のない大蔓延期を経験していることが挙げられる。結核菌は数十年に及ぶ潜伏を経て発症することがあり、結核蔓延期に感染した菌が現代で再燃したと考えられる高齢患者が多数認められている。事実、我が国の結核患者は大半が高齢者であり、70 歳以上の患者が全体の 58.9% を占めている（H27 年速報値）。こうした状況は、その後 4 年が経過した R1 年においても大きな変化は認められておらず、我が国における結核の様相は、依然として高い罹患率と高齢者の再燃という構図が持続的である。

一方で、発症者が結核であることに気づかず日常生活の中で排菌を続け、結果的に不特定多数に拡散してしまった事例も少なからず存在し、感染源究明や接触者検診といった結核対策は保健所の役割として今なお重要である。結核によって命を落とすことは少なくなったものの、入院を余儀なくされ、社会的・経済的に深刻な影響を被るケースはもちろんのこと、長期にわたる治療や再発への恐怖は、特に若い感染者にとって耐え難い重荷となる。こうした状況は数値として表に出てこないものの、日本社会に特有の健康被害の一つとして捉えることができる。

(2) 結核に限らず、病原体の伝播経路を把握して予防策を打ち出し、より大きな拡散を事前に阻止することは感染症対策として極めて重要である。結核では、患者への聞き取り調査のほか、患者から分離培養された臨床分離株から菌株 DNA を抽出し、遺伝子レベルでの個性（遺伝型別）を感染源究明に役立てる「結核分子疫学」が利用されている。本研究代表者らが中心となって普及に努めてきた「反復配列長多型解析（Variable Number of Tandem Repeats, VNTR）法」は、現在わが国で標準的に用いられる手法として確立したものであり、国内の分離株傾向や実際に積極的疫学調査を行う各自治体の状況に応じて様々な場面で活用されている。どこで感染の広がりが発生したのかを調査する「さかのぼり調査」は結核対策として主流であるが、結核分子疫学はこの裏付けとして利用されるだけでなく、今後どのような流行が起こり得るのか、また、何が結核伝播のリスク要因となっているのかを事前に探索する糸口としても期待されている。

より問題となるのは、先に挙げた長期再発例や、遺伝型別による判別精度の限界によって過去の再発に起因する「直近の伝播ではない感染」によって発症した患者間で同一と誤判定される菌株が分離されることである。研究代表者らの先行研究では、低罹患率化、超高齢化がいち早く進展した地域でそうしたケースが多く見られ、今後のわが国に想定される結核事情に即した場合、より正しく結核菌伝播を推定する科学的根拠、人社会の中で病原体が広がるダイナミクスの理解、そしてそれらを解明する手法の開発が強く望まれる。

(3) 遺伝子解析技術の爆発的な進展に伴い、病原体の全ゲノム配列を読み、菌株間のわずかな違いを逃すことなく比較検証できる手法が確立してきた。こうした手法では、上述した遺伝多型解析では判断が難しい直近の伝播についても正確な検証ができる。つまり、遺伝多型解析の結果も含め、どのような患者間（菌株間）において直近の伝播をより強く（正確に）推定できるのか、といったことが検証可能となる。患者情報と菌株情報をゲノム解析によって繋ぎ、疫学的に患者伝播を評価・分析できる素地が整ってきた状況であると言える。

(4) 感染伝播を考える上で重要な患者情報として、患者間の地理的関係性、つまり居住地域や勤務地に関する情報がある。結核菌は患者の咳、くしゃみなどに含まれる菌が空気中を漂い、周囲の人へと伝播する。この時、新規感染の成立には距離的にある程度接近している必要があることから、家族間、学校内といった日常生活での接触の他に、互いの地理的関係性が有用なパラメータとして応用できるはずである。しかし、こうした空間情報が患者間伝播の要因として検証されたことは少なく、単純に発症リスクといったような使われ方が主流となっている。これは、患者間の伝播を評価する方法として原因菌の遺伝子関係を調べるには、公衆衛生学・微生物学・ゲノム科学（バイオインフォマティクス）といった多様な研究領域を統括的に扱うことが必要であり、さらに地理学・情報学による研究融合が想定される学際性の難しさによるところが大きいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、結核菌の伝播を説明できる患者情報として、上述したような患者地理情報、そして社会活動を俯瞰的に把握できる「人の移動」に関するデータに着目した。研究開始時点までの先行研究において、菌株のゲノム解析導入によって、それまで接触者間に限局されていた病原体伝播の調査研究は、未知の伝播経路推定と、それに資する情報の探索というステージに到達していると考えられた。そこで、こうした研究基盤を前提とし、以下に掲げる 2 つの地理情報について利用価値を精査することにより、遺伝型別解析との共有的活用を試みることにした。

(1) 結核患者の静的な位置情報

地理情報の感染症対策への活用は、地域別患者数といった統計量に基づく相関解析が主流で

あった。しかし、臨床分離株の遺伝子解析を用いることによって共通感染源を持つ患者群の絞り込みが可能となった現在、そこに地理情報を付加することによってさらに高精度な絞り込みができる可能性が高い。本研究では、結核登録患者の個人データから居住地をはじめとした位置情報を得て、地点間距離を結核伝播経路推定に応用することを模索する。具体的には、菌株遺伝型別から共通感染源が疑われた事例の信ぴょう性に対して位置情報による重み付けを行い、菌株ゲノム比較解析による判定結果との整合性評価を目的とした。

(2) 人の動的な流動情報

アンケートによる移動調査やスマートフォンなどの携帯通信端末の発達により、人がどのように往来し、日々の生活を営んでいるのかが巨大なデータとして蓄積されている。一つ一つのデータは個人の行動に過ぎないが、巨視的な観点から解析すると、各都市・地域において様々な傾向と特徴を持った「人の流動」を観察できる。こうした解析結果は、人から人へと伝染していく病原体の伝播経路を解明する上で、有用な情報源となるかもしれない。これらのことより、人の流動が多い地域間では結核菌の伝播が起こりやすい可能性を鑑み、上述した地理情報と同様に遺伝子解析による感染源推定の重み付けに利用する方法を検討することとした。

最終的には、双方の地理情報と多岐にわたる患者データ(実地疫学情報)を統合的に利用し、より有用な結核伝播経路の推定方法の確立を目指す。こうして、現時点で利用できる情報を可能な限り集約することにより、これまで展開してきた結核分子疫学の集大成として昇華させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分析対象

わが国において結核罹患率が高く、結核伝播が比較的高頻度である地域として、大阪市を対象とした。当該地域における結核患者から分離された結核菌株を収集するとともに、患者情報を個人特定できないように匿名化して集計することとした。具体的には、長期間の潜伏と再発感染事例をできるだけ避け、直接の伝播発症をより多く検出するために、若年者(40歳以下)を対象として菌株・患者情報を収集した。3年間(2012~2014年)を調査期間としたところ、対象患者は404名、うち菌株培養陽性234件となり、このうち後述するゲノム解析のために再培養が可能であった177株を分析対象とした。また、将来的にゲノム比較による伝播経路推定に活用することを目的とし、同市内でも特に結核患者が多いあいりん地域由来株に関しても菌株DNAを収集し、遺伝型別をモニタリングした。これらは2006年から継続的に行っている調査研究でもあり、2016年までの11年間に596株が収集されている。

(2) 遺伝型別解析

収集された結核菌株すべてにおいて、VNTR型別解析を行った。日本標準12領域(JATA12-VNTR)を含む24領域について、蛍光プライマーを用いてDNA断片をPCR増幅し、キャピラリー電気泳動の波形分析から断片長を計測した。電気泳動にはGenetic Analyzer(Thermo Scientific)を利用し、断片長測定にはソフトウェアGene Mapper(Thermo Scientific)を用いた。反復数に換算して遺伝型別とした。

(3) 菌株ゲノム解析

若年者由来株(177株)を培養し、ゲノムDNAを抽出してMiSeq(Illumina)を用いてショートリード配列を取得した。CLC Genomics Workbench(QIAGEN)を用いて参照株ゲノム配列(AL123456.3)にマッピングし、全アライメントデータをbam形式で抽出した後、NGS解析システムGGM(GeneBay)を利用してコア領域の点変異領域をすべて抽出した。

全177株から少なくとも1株で変異抽出された領域(11,591bp)をアライメントし、分子系統樹解析およびペアワイズ変異数(ハミング数)を算出した。分子系統樹解析はGTR塩基置換モデルの下、MEGA6.06を用いて行った。

(4) 地理データを含めた可視化ツールの検討および患者情報解析

ゲノム系統上において直近の伝播が推定された感染者群(22クラスター、66株)を分析対象とし、クラスター別に患者間の点突然変異数を反映する分子系統樹(Median Joining tree)を作成し、患者居住地の位置と変異数の関係を、地理情報システム(GIS)を用いて視覚化した。この際、クラスター外の株データを1株加えて外群とすることにより、共通祖先配列(根)を決定した。

また、距離行列回帰(Multiple Regression on distance Matrices(MRM))のロジスティック回帰版を利用し、どのような患者間の組み合わせがゲノム配列一致(変異数5以下を一致と定義する)と関連するのかを統計解析した。

(5) 人流データと居住地間接触量に基づくメッシュ間距離の定義

2010年に実施された第5回近畿圏パーソントリップ(PT)調査から、大阪市内在住者のトリップデータを抽出した。地域を500m区画(メッシュ)に細分し、各区画居住者のトリップ情報に基づき、移動先で同一メッシュに同時に滞在した被調査者の居住地を計測して「区画間の

居住者接触量」を測定した。

4. 研究成果

(1) あいりん地域における VNTR 型別解析により、同地域でのクラスター率（2 株以上で型別が一致する株数の割合。伝播事例の頻度に相当する）が漸減していることが観察された（図 1）。同地域において結核の伝播事例が減少しつつあり、対策が奏功していることが示唆された。一方で、他地域とのクラスター形成株が一定頻度で検出されることから、結核菌株の流出入について今後ゲノム解析も含めた詳細な検証が必要であると考えられた。

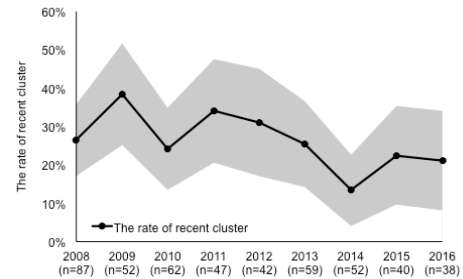


図 1 あいりん地域由来結核菌株のクラスター率の減衰。

(2) 大阪市全域若年者株（2012～2014 年、177 株）について、比較ゲノム解析に基づく分子系統樹を構築した（図 2）。わが国では北京型結核菌が分離株の約 7 割を占め、そのうちの 6～8 割程度が祖先型系統に属することが知られており、本解析対象群においても同等であることが確かめられた。

一般的に結核菌の変異頻度は 0.5 塩基/年と推計されているが、本解析での変異塩基数の分布から、21 個以下のハミング数の関係にある株をクラスターとして定義した場合、66 株（37.3%）からなる 22 クラスターが形成されることとなった。系統群ごとのクラスター形成率は、北京型新興系統で 64 株中 34 株（53.1%）、祖先系統のうち ST25/19 群において 38 株中 18 株（47.4%）、ST3 群において 16 株中 7 株（43.8%）となり、クラスター形成株の約 9 割がこれらに属していることが判明した。

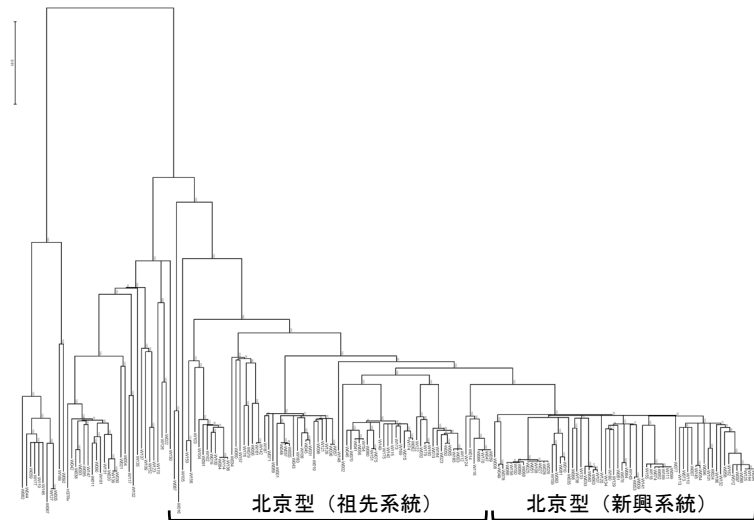


図 2 本研究対象とした結核菌臨床分離株（177 株）のゲノム系統樹。

(3) 個々のクラスターをそれぞれ個別に分析して得られた変異蓄積の経過を各患者の居住地情報と合わせ、平面次元に患者居住地、垂直方向に各クラスター系統樹の外群から推定された根（共通祖先）からの変異数を GIS 環境で視覚化した。結果、伝播を重ねるとともに患者の分布が空間的に拡大すること、それには性別等の患者属性による違いがみられることが観察された（図 3）。MRM の結果、居住地間距離が 2km 未満の患者間では、10 km 以上の患者間と比べて、直近の感染と推定されるオッズ比が 32.7（モンテカルロ p 値=0.015）等、地理的近接性との関連が認められた。さらに、男性同士の患者間のオッズ比が 3.1（<0.01：参照カテゴリは異性間）、互いに 30 代未満の患者間のオッズ比が 4.3（<0.01：参照カテゴリは異なる年齢層間）等、患者属性との関連も確認された。

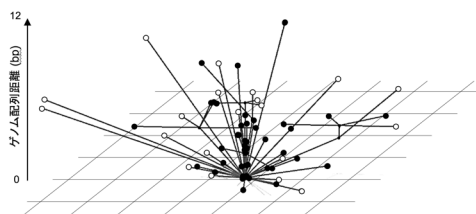


図 3 クラスター 22 組（66 人）の患者居住地を線で繋ぎ、推定初発源を原点に合わせた立体時空間ゲノム系統樹の描画。原点からゲノム配列距離方向（時間軸に相当）に沿って空間的拡大が認められる。また、女性（○）に対して男性（●）にゲノム・空間距離双方に近接性が認められる。

(4) 大阪市全域を 500 m 区画に区切り、居住者ごとの PT データを使って被調査者が別のどの区画の住人と接触しているのかを計測した。PT データは人口の約 3.5%（約 100,000 人）に相当し、区画ごとに平均 100 人程度の居住者の人流が観測されていることになる。

大阪市内の代表的な地点を選び、それらの居住者と接触量が多い地域がどのように分布しているかを可視化した（図 4）。どの地域においても、居住地点周辺だけにとどまらず強い異方向性が認められ、2 点間の単純距離とは異なる空間分布となることが確かめられた。本研究において計算された接触量は、異なる地点間で比較・差分可能であり、複数の流行地点からの病原体伝播リスクを評価する手法として応用できる可能性があると考えられた。



図4 区画ごとの居住者のPTデータに基づく接触量の地域分布. 大阪市内5つの主要駅(弁天町、東三国、京橋、あびこ、平野)周辺500m区画の居住者がどの地域の住人と接する傾向にあるかが図示されている.

(5) 本研究において対象とした若年者の結核伝播は、国内では罹患率が高い地域であっても大きな流行が観測されず、クラスターが断片化される状況にあった。今後調査を拡張し、遺伝系統的に近接性が高い菌株を集中的に分析対象とすることや、長期間にわたるモニタリングを実現することが望ましいと考えられる。

本研究では、空間疫学的な可視化に加えて、人流データに基づく地点間接触量を応用した距離定義を実現できた。今後はこうした仮想的距離を実距離と比較し、疫学的に検証することになる。これについては現在も進行中であり、展望としては早い段階で結果が得られると期待される。

感染症を取り巻く世界状況として、COVID-19の流行が大きな社会変容を巻き起こしている。こうした状況において結核伝播がどのように変化していくのかについて、慎重に検証していく必要があるものと思われる。本研究で集積したデータは、社会変容前後を比較するために有用なものになると考えられ、展望の一つとしても今後そうした応用研究を視野に入れていくことが想定される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 藤原直哉、翁長朝功、和田崇之、合原一幸 | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 感染抑制政策の最終規模への影響 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 生産研究 | 6. 最初と最後の頁 141-143 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11188/seisankenkyu.72.141 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 和田崇之 | 4. 巻 388 |
| 2. 論文標題 ゲノム科学の奔流と結核分子疫学 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 複十字 | 6. 最初と最後の頁 20-21 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto K, Takeuchi S, Seto J, Shimouchi A, Komukai J, Hase A, Nakamura H, Umeda K, Hirai Y, Matsumoto K, Ogasawara J, Wada T, Yamamoto T. | 4. 巻 S1567-1348(18) |
| 2. 論文標題 Longitudinal genotyping surveillance of Mycobacterium tuberculosis in an area with high tuberculosis incidence shows high transmission rate of the modern Beijing subfamily in Japan | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution | 6. 最初と最後の頁 30714-30717 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.meegid.2018.09.014 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中谷友樹、山本香織、竹内昌平、瀬戸順次、翁長朝功、藤原直哉、和田崇之 |
| 2. 発表標題 結核患者のゲノム変異上の近さと地理的近接性の関連 - 大阪市病原体情報を用いた解析 - |
| 3. 学会等名 日本疫学会第30回学術総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本香織, 下内昭, 笠井幸, 小向潤, 松本健二, 吉田英樹, 和田崇之 |
| 2. 発表標題 結核分子疫学を用いたあいりん地域における結核の感染・伝播に関する検討 |
| 3. 学会等名 第78回日本公衆衛生学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹内昌平 |
| 2. 発表標題 ヒトの接触行動と人口構成から求めた基本再生産数と人口密度の関連について |
| 3. 学会等名 第84回日本健康学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 中谷友樹, 和田崇之 |
| 2. 発表標題 病原体遺伝子情報を用いた結核の空間疫学 |
| 3. 学会等名 2019年度日本数理生物学会年会(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 和田崇之 |
| 2. 発表標題 抗酸菌の遺伝子解析と分子疫学 |
| 3. 学会等名 第94回日本結核病学会総会(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 和田崇之 |
| 2. 発表標題 ゲノム科学の進展がもたらす結核対策への恩恵とわが国の状況 |
| 3. 学会等名 第94回日本結核病学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本香織, 和田崇之, 小向潤, 清水直子, 青木理恵, 長谷篤, 松本健二, 吉田英樹, 山本太郎 |
| 2. 発表標題 大阪市における結核発生状況の地域差 |
| 3. 学会等名 第93回日本結核病学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 藤原直哉 |
| 2. 発表標題 ネットワーク科学・情報科学による人流解析の可能性 |
| 3. 学会等名 人文地理学会大会・第64回都市圏研究部会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本香織, 中谷友樹, 竹内昌平, 小向潤, 青木理恵, 松本健二, 吉田英樹, 山本太郎, 和田崇之 |
| 2. 発表標題 大阪市における社会経済的指標を用いた結核状況の地域差 |
| 3. 学会等名 第77回日本公衆衛生学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本香織, 和田崇之, 小向潤, 宇田瑛子, 清水直子, 松本健二, 下内昭, 山本太郎 |
| 2. 発表標題 大阪市あいりん地域における結核の感染伝播状況 (2006-2015) |
| 3. 学会等名 第76回日本公衆衛生学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 藤原 直哉 (FUJIWARA Naoya) (00637449) | 東北大学・情報科学研究科・准教授 (11301) | |
| 研究分担者 | 中谷 友樹 (NAKAYA Tomoki) (20298722) | 東北大学・環境科学研究科・教授 (11301) | |
| 研究分担者 | 山本 香織 (YAMAMOTO Kaori) (70649011) | 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員 (84407) | |
| 研究分担者 | 竹内 昌平 (TAKEUCHI Shohei) (80432988) | 長崎県立大学・看護栄養学部・講師 (27301) | |
| 研究協力者 | 瀬戸 順次 (SETO Junji) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究協力者 | 翁長 朝功 (ONAGA Tomokatsu) | | |
| 連携研究者 | 田丸 亜貴 (TAMARU Aki) (70270767) | 大阪府立公衆衛生研究所・微生物部・主任研究員 (84407) | |