

令和 3 年 10 月 26 日現在

機関番号：82801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09961

研究課題名(和文) 日本列島における結核感染伝播の科学的可視化に関する研究

研究課題名(英文) Prediction of tuberculosis transmission in Japan by use of genotypic data

研究代表者

村瀬 良朗 (Murase, Yoshiro)

公益財団法人結核予防会 結核研究所・抗酸菌部 結核菌情報科・科長

研究者番号：80535998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：日本全国から幅広く収集された結核菌株の遺伝子型別情報、ゲノム情報、分離地情報等を分析し、結核感染伝播に関わる以下の2つの知見を得た。

- (1) 結核菌遺伝子型別法として国内外で使用されているVNTR法では、52%-76%の株を誤って最近の感染伝播に係る株として識別する可能性がある。
- (2) 結核菌クローン株集団が分離された地点を分析したところ、結核感染の半数は40km以内、大部分は200km以内で発生していたことが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における結核分子疫学調査では、当該自治体内で発生した症例を主な調査対象としていることから、隣接自治体にまたがる結核感染伝播を検出できない可能性がある。また、結核菌遺伝子型別法として用いられているVNTR法に基づく菌の異同判定では、不十分な菌株識別能を背景に疫学的関連性の無い株を誤って同一の株と判定する可能性が指摘されている。これらの問題点を検証するため、日本全国から収集された結核菌とその付随情報を分析し、広域的にゲノム分子疫学調査を実施することの有用性を示した。これらの知見は将来の導入が期待される結核菌ゲノム分子疫学調査の基礎情報となり、結核対策の高精度化に活用される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the genotypic data on Mycobacterium tuberculosis strains collected throughout Japan and obtained the following two findings related to the tuberculosis transmission. (1) The VNTR methods used in Japan and other countries may falsely identify 52%-76% of strains as originate from recent transmission. (2) From the analysis of the location where genetically clonal tuberculosis strains isolated, half of the tuberculosis transmission occurred within 40 km and most within 200 km.

研究分野：分子疫学

キーワード：結核 分子疫学 ゲノム解析 VNTR法

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

かつて亡国病として恐れられた結核は未だ我が国における公衆衛生上の課題であり、毎年1.5万人以上の新規患者が発生し、約2千人が死亡している。2018年の結核罹患率（人口10万対）は12.3であるが、これは欧米先進国と比べて高く、世界的にも未だ中蔓延国として位置付けられている。医療施設や学校等における集団感染も継続して発生しており、社会的注目度も高い。結核は患者から排出された飛沫に含まれる結核菌を吸入することによって感染傳播するが、感染から発病までの期間が長く（主に5か月以上）、短時間の軽微な接触でも感染する場合があるため、聞き取り調査を主体とする従来の実地疫学調査から感染経路を究明することが難しい。

1990年代より遺伝子多型に基づいた結核菌株の異同判定が可能となり、実地疫学情報と組み合わせることにより、患者個々の菌株傳播を追跡することが可能となりつつある。本邦では結核菌ゲノム上の縦列反復配列多型に基づく分析法（Variable Number of Tandem Repeat、VNTR）が標準法として用いられている。結核菌ゲノム上には100以上の縦列反復配列領域が存在しているが、国際的には、Supplyらの提唱した15領域（loci）、24 loci、あるいは28 lociを組み合わせたVNTR法（15/24/28 loci - MIRU-VNTR法）が使用されている。本邦では、北京型結核菌と呼ばれる近縁菌株集団が約7割を占めることから、北京型結核菌の菌株識別に有用な12 lociから構成されるJATA 12-VNTR法を共通の分析領域とし、必要に応じて菌株識別能を向上させるために追加領域（JATA15、JATA18、24_{Beijing}-VNTR法）を分析することが提唱されている。また、最近では、4 HV loci（超可変領域：1982、3232、3820、4120）が北京型結核菌の菌株識別に有効であることが報告されている。

近年では、ある地域で発生した結核菌を網羅的に解析することによって、遺伝型の一致から結核感染経路を帰納的に究明し、結核菌の拡散を予防することを目的とした公衆衛生的取り組み（結核の分子疫学調査）が実施されるようになってきた。しかしながら、申請者らが新宿区と共同で実施した先行研究では、菌の遺伝型が一致したにもかかわらず、患者同士の接触状況が判明することは極めて稀であった（0～11.6%）。VNTR型の一致が感染経路の解明に結び付かないという課題は日本のみならず世界的にも報告されている。

近年のゲノム解析技術の普及により、結核菌においても全ゲノム配列情報を用いた菌株識別がなされるようになってきた。結核菌のゲノム配列比較では、イルミナ社等の次世代シーケンサーから得られる数百bpのリード配列を結核菌H37Rv株に対してアライメントマッピングすることで全ゲノム配列を決定し、個々の菌株を相互比較することでゲノム差異を同定する。全ゲノム解析では多くの情報が得られるため、VNTR法よりも感染経路を詳細に推定できることが示されている。しかしながら、ゲノム解析に用いられる機器や試薬が高価であり、また、標準プロトコルが定められていないこと、ゲノム情報解析に習熟を要すること等から、結核菌遺伝子型別検査を実施する地方衛生研究所等では導入が進んでおらず、本邦の分子疫学調査ではVNTR法が主に用いられている。

近い将来にVNTR法から全ゲノム配列比較法へ移行することが見込まれているが、北京型結核菌が高度に蔓延している地域において、両手法を詳細に検討した知見は限られており、両手法を比較検討する必要があると考えた。また、本邦では、結核の分子疫学調査が地方自治体の責任において自治体単位で実施されているが、その調査対象範囲は当該自治体内に限られている。

そのため、結核感染が生じる地理的範囲を推計し、調査対象範囲の妥当性を検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本邦では、「結核に関する特定感染症予防指針」に従って VNTR 法を用いた結核菌分子疫学調査が各自治体で実施されている。しかしながら、現在の分子疫学調査実施体制では、当該自治体内で発生した症例を主な調査対象としていることから、隣接自治体にまたがる結核感染伝播を検出できないという課題がある。また、VNTR 法に基づく菌の異同判定では、不十分な菌株識別能を背景に疫学的関連性の無い株を誤って同一の株と判定する可能性が指摘されている。これらの問題点を検証するため、日本全国から収集された結核菌 981 株を用いて広域的に分子疫学調査を実施することの有用性を評価した。また、ゲノム配列比較法を基準として VNTR 法による菌株識別の詳細を評価した。

3. 研究の方法

(1) 研究対象とゲノム DNA の調製

2010 年 10 月から 2011 年 11 月の期間に 36 都道府県から集められた結核菌 981 株を研究対象とした。これらの結核菌株を結核研究所にて小川培地で培養し、菌体をクロロホルム存在下でガラスビーズと激しく混和することで破碎し、ゲノム DNA を抽出した。さらに RNase A 処理、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1)処理を実施して DNA を精製し、エタノール沈殿で DNA を回収した。DNA 濃度の定量には Qubit アッセイ (ThermoFisher Scientific) を用いた。菌株の付随情報として、性別、年齢、株が分離された都道府県、の情報をを用いた。地理情報解析における株の分離地点として、株が分離された都道府県の県庁所在地をデータポイントとして用いた。

(2) VNTR 型別解析

15/24/28 loci MIRU-VNTR 法および JATA12-/15-/18-VNTR 法、24_{Beijing}-VNTR 法を網羅する合計 33 loci のコピー数を分析に用いた。各 locus のコピー数は、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動、あるいは、キャピラリー電気泳動から推定される分子量から算出した。各 VNTR 法で得られるコピー数のプロファイルを VNTR 型として登録し、VNTR 型が完全一致した菌株をクラスター形成株として定義した。全株に占めるクラスター形成株の占める割合(クラスター形成率)を指標として各 VNTR 法の菌株識別能を比較した。

(3) ゲノム解読とゲノム解析

(1)の方法で精製された DNA を出発材料として全ゲノム解読を実施した。QIAseq FX (QIAGEN) を用いてライブラリーを調製し、MiSeq による 350bp、250bp ペアエンドシーケンシス、あるいは、NextSeq 550 による 150bp ペアエンドシーケンシスを実施して各菌株のゲノムを解読した。解析対象とした 981 株のうち、シーケンシスクオリティに問題の無い 954 株を対象として全ゲノム配列比較解析を実施した。解析対象株間においてペアワイズで全ゲノム配列を比較し、遺伝学的差異を SNVs 数として算出した。先行研究の定義に従って株間の SNVs 数が 5 以内を疫学的接触が強く疑われる事例、13 以上を疫学的接触には否定的な事例、と定義した。患者疫学情報(性別、年齢)、菌株分離地情報と菌ゲノム情報を総合的に解析し、本邦における結核感染伝

播動態に関わる分析を実施した。

4. 研究成果

(1) VNTR 法による結核感染伝播の推定精度

国内外で使用されている7つのVNTR法の菌株識別能を比較した。菌株識別能の指標としてクラスター形成率を用いた。菌株識別能は、JATA12、MIRU15、MIRU24、JATA15、JATA18、MIRU28、24_{Beijing}-VNTR法の順に高くなっていた(クラスター形成率[%]: 52、50、41、39、24、23、22)。北京型結核菌の菌株識別に有用な4HVが含まれるJATA18、MIRU28、24_{Beijing}-VNTR法において最も高いレベルで菌株識別がなされていた。

次に、7つのVNTR法による結核感染伝播の推定精度を調べた。本研究では5SNVs以内の関係性を持つ菌株群を真の結核感染伝播由来株と定義し、各VNTRクラスター形成株に含まれる真の感染伝播由来株の割合を算出することでVNTR法による結核感染伝播の推定精度を求めた。7つのVNTR法において菌株識別能が高くなるにつれて結核感染伝播の推定精度は高くなっていた(感染伝播の推定精度[%]: 25、25、27、31、46、43、48)。菌株識別能が最も低いレベルのJATA12、MIRU15ではクラスター形成株の約25%のみが真の感染伝播由来株と推定された。一方で、4HV lociが含まれるJATA18、MIRU28、24_{Beijing}-VNTRではクラスター形成株の43-48%が真の感染伝播由来株であった。VNTR法でクラスターを形成した52%から76%の株は6SNVs以上の関係性を示しており、VNTRクラスターの半数以上が感染伝播を反映していない可能性が示唆された。

(2) 結核感染が生じた地理的範囲の推計

広域的にゲノム分子疫学調査を実施することの有用性を明らかにするため、本邦で結核感染が生じる地理的範囲を推計した。疫学的接触が強く疑われる群(0-5 SNVs)は、そうではない群と比べて、有意に近距離で発生しており(ペアワイズで比較した株間の分離距離における中央値、40 km [0-5 SNVs] vs 293 km [13- SNVs])、 $p < 0.01$ 、右図)、半数が40 km以内、大半が200 km以内で分離されていた。また、疫学的接触が強く疑われる群(0-5 SNVs)は、そうではない群と比べて、有意に若かった(年齢の中央値、49歳 [0-5 SNVs] vs 76歳 [13- SNVs])、 $p < 0.01$ 、data not shown)。高齢者層と比べて若年層は最近の感染による発病をより反映していると考えられていることから、この結果は0-5 SNVsのゲノムクラスターが最近の感染伝播を反映していることの傍証と考えられた。

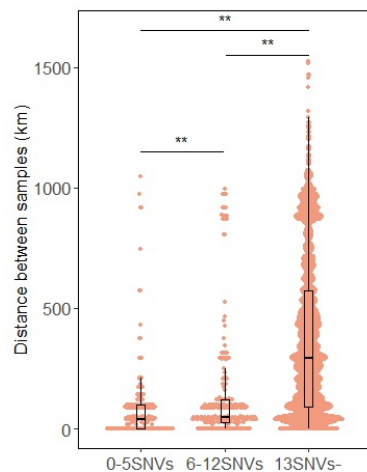


図 異なるゲノム差異を持つ菌株群における株間の分布距離

(3) ゲノムクラスターの地理的分布状況

複数自治体で分子疫学調査を実施することの有用性を明らかにするため、結核感染伝播が強く疑われるゲノムクラスター(0-5 SNVs)の地理的分布状況を調べた。ゲノムクラスターのうち、26(26/44、49%)は複数都道府県由来の菌株で構成されており、18(41%)は同一都道府県内の株で構成されていた。このことから、結核感染伝播の全体像を究明するためには、近隣都道府県と情報共有して分子疫学調査をすることが必須であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takeda Keita, Murase Yoshiro, Kawashima Masahiro, Suzukawa Maho, Suzuki Junko, Yamane Akira, Igarashi Yuriko, Chikamatsu Kinuyo, Morishige Yuta, Aono Akio, Yamada Hiroyuki, Takaki Akiko, Tamura Atsuhisa, Nagai Hideaki, Matsui Hirotohi, Tohma Shigeto, Mitarai Satoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 A case of Mycobacterium tuberculosis laboratory cross-contamination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 610 ~ 614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.03.012	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 -

1. 著者名 Phelan Jody E., Lim Dodge R., Mitarai Satoshi, de Sessions Paola Florez, Tujan Ma. Angelica A., Reyes Lorenzo T., Medado Inez Andrea P., Palparan Alma G., Naim Ahmad Nazri Mohamed, Jie Song, Segubre-Mercado Edelwisa, Simoes Beatriz, Campino Susana, Hafalla Julius C., Murase Yoshiro, et.al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Mycobacterium tuberculosis whole genome sequencing provides insights into the Manila strain and drug-resistance mutations in the Philippines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45566-5	査読の有無 有
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 Kadota Naoki, Shinohara Tsutomu, Hino Hiroyuki, Goda Yuichiro, Murase Yoshiro, Mitarai Satoshi, Ogushi Fumitaka	4. 巻 19
2. 論文標題 Mycobacterium abscessus ssp. abscessus infection progressing to empyema from vertebral osteomyelitis in an immunocompetent patient without pulmonary disease: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12890-019-0860-4	査読の有無 有
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 Izumi Kiyohiko, Murase Yoshiro, Uchimura Kazuhiro, Kaebeta Aya, Ishihara Keiko, Kaguraoka Sumi, Takii Takemasa, Ohkado Akihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Transmission of tuberculosis and predictors of large clusters within three years in an urban setting in Tokyo, Japan: a population-based molecular epidemiological study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e029295 ~ e029295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2019-029295	査読の有無 有
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 村瀬 良朗、御手洗 聡	4. 巻 84
2. 論文標題 特集 ゲノム革命-予防・医療のイノベーション ゲノム革命がもたらす結核対策の将来展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 公衆衛生	6. 最初と最後の頁 256 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1401209367	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Iwamoto Tomotada, Murase Yoshiro, Yoshida Shiomi, Aono Akio, Kuroda Makoto, Sekizuka Tsuyoshi, Yamashita Akifumi, Kato Kengo, Takii Takemasa, Arikawa Kentaro, Kato Seiya, Mitarai Satoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Overcoming the pitfalls of automatic interpretation of whole genome sequencing data by online tools for the prediction of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0212798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0212798	査読の有無 有
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 Kimura Muneyoshi, Araoka Hideki, Baba Hiromi, Okada Chikako, Murase Yoshiro, Takaki Akiko, Mitarai Satoshi, Yoneyama Akiko	4. 巻 73
2. 論文標題 First case of sexually transmitted asymptomatic female genital tuberculosis from spousal epididymal tuberculosis diagnosed by active screening	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 60 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijid.2018.05.021	査読の有無 有
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 大江 紗希, 岡村 直美, 阿久澤 義徳, 近松 絹代, 山田 博之, 村瀬 良朗, 御手洗 聡	4. 巻 71
2. 論文標題 輸入カニクイザルにおける結核症の集団発生事例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本獣医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 369 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12935/jvma.71.369	査読の有無 有
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 Aono Akio, Chikamatsu Kinuyo, Yamada Hiroyuki, Igarashi Yuriko, Murase Yoshiro, Takaki Akiko, Mitarai Satoshi	4. 巻 154
2. 論文標題 A simplified pyrazinamidase test for pyrazinamide drug susceptibility in Mycobacterium tuberculosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 52 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2018.09.018	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 -

1. 著者名 桑原 直太, 大西 司, 楠本 壮二郎, 岸野 康成, 鈴木 慎太郎, 村瀬 良朗, 御手洗 聡, 相良 博典	4. 巻 93
2. 論文標題 家族内再感染により肺結核を発病したと考えられる姉妹例の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 結核	6. 最初と最後の頁 463-467
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 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7件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 村瀬 良朗, 森重 雄太, 青野 昭男, 近松 絹代, 山田 博之, 五十嵐 ゆり子, 高木 明子, 御手洗 聡
2. 発表標題 広域的な結核菌ゲノム分子疫学調査の有用性評価に関する研究
3. 学会等名 日本結核病学会総会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 下村 佳子, 村瀬 良朗, 森重 雄太, 近松 絹代, 青野 昭男, 五十嵐 ゆり子, 山田 博之, 高木 明子, 御手洗 聡
2. 発表標題 一般検査室での全ゲノム解析を見据えた抗酸菌ゲノムDNA精製法の評価
3. 学会等名 日本臨床微生物学会総会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 村瀬 良朗
2. 発表標題 結核感染伝播の数理的可視化とゲノム分子疫学調査の有用性評価
3. 学会等名 衛生微生物技術協議会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 村瀬良朗, 泉清彦, 大角晃弘, 青野昭男, 近松絹代, 山田博之, 五十嵐ゆり子, 高木明子, 御手洗聡
2. 発表標題 結核菌VNTR情報を用いた広域比較の必要性について
3. 学会等名 第93回日本結核病学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Y. Murase, K. Izumi, A. Ohkado, A. Aono, K. Chikamatsu, H. Yamada, Y. Igarashi, A. Takaki, S. Mitarai
2. 発表標題 Prediction of active local transmission of Mycobacterium tuberculosis by VNTR genotyping methods in Japan with high prevalence of Beijing lineage.
3. 学会等名 European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 泉 清彦, 河津 里沙, 村瀬 良朗, 内村 和広, 大角 晃弘
2. 発表標題 社会ネットワーク分析を用いた結核菌伝播状況の検討
3. 学会等名 第92回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 泉 清彦, 大角 晃弘, 内村 和広, 村瀬 良朗, 瀧井 猛将, 森重 雄太, カエベタ 亜矢, 神楽岡 澄, 石原 恵子
2. 発表標題 結核菌遺伝子型別クラスタにおける初期患者の特徴に基づく大規模感染の危険因子
3. 学会等名 第93回日本結核病学会総会
4. 発表年 2018年～2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関