

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月19日現在

機関番号：84406

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790585

研究課題名（和文） 広域的な拡散が懸念される結核菌臨床分離株の疫学情報・ゲノム情報に関する統合的研究

研究課題名（英文） Comprehension of epidemiologic information and genomics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains causing putative nationwide proliferation

研究代表者

和田 崇之 (WADA TAKAYUKI)

大阪市立環境科学研究所・研究主任

研究者番号：70332450

研究成果の概要（和文）：結核患者から分離培養された結核菌株の遺伝多型解析は、患者間の伝搬経路推定に役立てられている。本課題では広域的に分離される2種類の遺伝型（pECT04, 07）に着目し、計12株についてゲノム比較を実施した。結果、pECT07では菌株間の近似性は必ずしも由来地域に相関せず、多地域間での複雑な伝搬様式の存在が示唆された。一方、pECT04では、pECT07と比較して固有変異が多数見いだされ、菌株間に隔たりがあると考えられた。本結果は、現行の遺伝型で同一と考えられる菌株においても、ゲノム比較によってより詳細な感染源調査が可能であることを示している。

研究成果の概要（英文）：Genotyping of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* has been used to estimate their putative transmission routes. In this study, we focused on two genotypes of *M. tuberculosis*, pECT04 and pECT07, detected occasionally from broad areas in Japan. Totally twelve clinical isolates of the genotypes were genomically sequenced for comparative analysis. Results show that phylogenetic relation among pECT07 isolates was not associated with their geographic origins, which suggests their complicated transmission routes around Japan. Contrary to pECT04, many SNPs characteristic to two isolates of pECT04 were identified. These results mean that comparative genomics of clinical isolates can provide deep traceability of transmission of *M. tuberculosis* that has never achieved with present genotyping methods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	500,000	150,000	650,000
平成23年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：分子疫学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：感染症，ゲノム，衛生，社会医学，分子疫学，公衆衛生，結核，細菌

1. 研究開始当初の背景

近年における本邦の結核罹患率（年間）は人口10万人に対して約20人となっており、先進諸国では最悪の水準、世界全体としては

中程度蔓延国と位置づけられている。結核を引き起こす病原体である結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) はヒト-ヒト間の伝播によって拡散するが、長期間の

顕性感染を経て発症したり、極めて軽微な接触でさえ伝染するケースも多く、詳細な伝播経路を疫学的に推定することは困難である。

結核菌では、1990年代から遺伝多型に関する調査研究が進展し、その技術応用が結核公衆衛生に寄与するものとして期待されている。現在、結核患者から分離培養された菌株を遺伝多型に基づいて分類／定義することにより、個々の菌株伝播を追跡することが可能となりつつある(結核菌の分子疫学)。本邦では、結核菌ゲノム内に多数存在する縦列反復配列数多型 (Variable Number of Tandem Repeat, VNTR) 分析が遺伝型別法としてスタンダード化されている。集団事例における感染源追求や未知の伝播経路推定などを目的とした VNTR 分析が結核対策の一環として徐々に浸透しつつある段階である。

日本各地で分離された結核菌株の VNTR 型別データが集積されるにつれて、特定の VNTR 型を示す菌株が、地域的由来や解析年度に関係なく一定の割合で分離されることが明らかとなってきた。本研究代表者らの先行研究では、関西地域において「広域的・断続的に分離され、疫学的リンクが定かでないにも関わらず同一菌株であることを示唆する VNTR 型」を抽出し、「拡散性クラスター型 (putative Expanding Cluster Types, pECTs)」として定義した (Wada, et al. Kekkaku. 2010)。現時点では 9 タイプ (pECT01 ~ pECT09) が報告されているが、他地域における分布状況や異なるタイプが存在する可能性などについてはなお明らかでない。このような菌株が広範・高頻度に見出される理由は現段階では不明であり、結核対策、公衆衛生上の重大な問題として認識されつつある。

これらの株において遺伝型別が一致する理由については、いくつかの可能性が考えられる。具体的には、(1) 現代において実際に広域的な伝播が発生している可能性、(2) 過去における大規模集団事例を背景とする再発事例の可能性、(3) VNTR 型別の分解能に起因する誤判定の可能性などが挙げられるが、いずれについても決定的な根拠、理由は現時点では不明である。

2. 研究の目的

我が国における結核菌伝播を俯瞰的に理解するにあたり、pECTs 株の異同性を詳細に検証し、その広域的な出現について要因を究明することが必要であると考えられた。そこで、本課題では以下の2点を主要な目的として設定し、その分離状況や株個性の把握を試みた。

(1) 広域由来の pECTs 株検出および同定

これまで解析してきた結核菌株に加えて、日本各地にターゲットを拡張して pECTs 株の検出・同定を行う。現在、全国の地方衛生研究所 (地衛研) において VNTR 型別分析の普及事業が進められており、この中からその出現状況を調査する。これにより、pECTs 株の全国的な分布や検出状況を把握することを目指す。

(2) pECTs 株のゲノム比較

近年の次世代シーケンサー (Next Generation Sequencers, NGS) の発展は目覚しく、多検体の菌株ゲノムを分析対象とした塩基配列データの獲得はコスト的にも実用に耐えうるものとなってきた。そこで、結核対策上においてより重要と思われる pECT 株を地域由来の異なる菌株群から選択し、ゲノム比較を実施する。同結果から pECTs 株のクローン性について具体的な検証を行うとともに、菌株の系統分析に基づいた疫学的リンクの推定・再構築の糸口を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 広域由来の pECTs 株検出および同定

現在、わが国において結核菌株 VNTR 解析を精力的に行っている研究施設・検査機関は、主に JATA(12)-VNTR と名づけられた簡易的な VNTR データを利用・集積している。研究協力者ら (神戸市環境保健研究所、大阪府公衆衛生研究所、山形県衛生研究所および結核予防会結核研究所) との連携により、そこから候補株の絞込みを行い、それらについて pECTs 株 (9 タイプ) の定義となる 24 領域の VNTR アレルを分析することにより、当該タイプの有無について判定を行った。詳細な VNTR データをすでに保有している機関については当該タイプの有無を照会し、その検出状況を確認した。

(2) pECTs 株のゲノム比較

本課題では、特に広域伝播が疑われた pECT04 および pECT07 (M 株) について注力し、pECT04 から 2 株、pECT07 からは濃厚接触例 (2 株) および同一患者再発例 (2 株) を含めた 10 株をゲノム比較対象として選択した。

Genome Analyzer II (Illumina, Inc.) を用いてゲノム全域の配列情報を獲得し、マッピング分析に基づくゲノム比較を実施した。計 12 株からゲノム DNA を精製してそれぞれ断片化し、DNA バーコードタグを付加して混和後、バイアスフリー配列解析を実施した。解析配列長は各リード 75 bp×2 (ペアエンド) とし、得られた配列データは DNA バーコード配列によって再分配した後、各株由来の配列情報として扱った。既に完全ゲノム配列が明らかとなっているリファレンス株 H37Rv

の配列情報 (AL123456.2) をリファレンスとし, Burrows-Wheeler Aligner (BWA) によるアライメントマッピングならびに Genome Traveler (In Silico Biology, Inc.) による変異箇所の抽出を行った。

4. 研究成果

(1) 広域由来の pECTs 株検出および同定

先行研究での pECTs 定義は近畿圏 (大阪, 神戸) での分離状況に基づいたものであったので, VNTR 型別に基づいた菌探索を山形県衛生研究所 (山形県内由来株), 結核研究所 (東京都内, 神奈川県内, 沖縄県内由来株) に依頼し, 当該型と合致する株を探索した。その結果, pECT04, 07, 09 が地域的分散を伴って検出されていることが明らかとなった。このうち, pECT04 は山形県, 首都圏, 近畿圏で分離され, pECT09 は首都圏, 近畿圏, 沖縄県内での分離が確認された。一方, pECT07 はすべての母集団から分離された。pECT07 は首都圏における大規模な集団事例の原因菌株として報告されていた「M株」(Ohkado, et al., BMC Infect Dis. 2009) と VNTR 全 24 領域が一致することが既に判明している。本課題により, 都市圏での拡散が認められるだけでなく, 国内の地方都市でも見出されることが明らかとなった。VNTR 全 24 領域が一致して分離された pECT07, pECT09 とは対照的に, pECT04 では VNTR 追加領域のみが異なる菌株が多数分離される傾向にあり, 同一性の高い株が全国的に拡散している可能性が示唆された。

本結果から, 後述のゲノム比較分析対象としては pECT07, pECT04 を優先的に選択した。

(2) pECTs 株のゲノム比較: pECT07

ゲノム比較に供試した菌株 (10 株) は, より多くの事例パターン, 由来地域から選ばれよう配慮された (表 1)。

表 1 本課題でゲノム比較に供された pECT07 株 (10 株)

菌株名	分離地	分離年	備考
yg10_015	山形県	2010	
FY21N052	神戸市	2009	
O_1530	沖縄県	2006	
K11-2645	東京都	2011	
K11-2647	東京都	2011	
080715T-5	大阪府	2008	家族内接触例
090824T	大阪府	2009	
4991	大阪市	2007	
5984S	大阪市	2009	同一患者由来 (6503R は多剤耐性株)
6503R	大阪市	2009	

これらの菌株による近接ゲノム比較から, 各株の固有点変異 (SNPs) を抽出し, 互いの系統関係を分析したところ, 濃厚接触関係にある事例 (2 株) では 1 塩基のみ置換変異が

見いだされたのに対し, 他の菌株間では 6 塩基ないし 23 塩基の置換変異が認められた (図 1)。

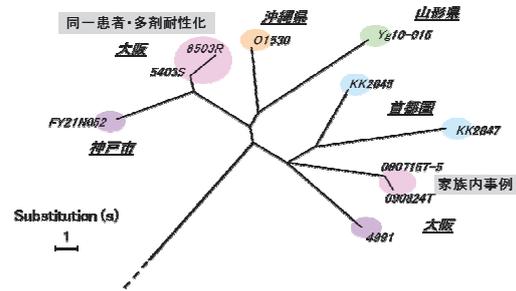


図 1 pECT07 (M株) の固有変異に基づく分岐推定

本結果について, 以下に纏める。

① 分離地域との関連

pECT07 における菌株間の同一性は必ずしも分離地域の位置関係と相関せず, 患者の長距離移動や長期にわたる不顕性感染などに起因する複雑な伝搬が推定された。しかし, 本結果は, 現行の VNTR 型別分析では同一と判定される場合においても, ゲノム比較によって菌の同一性を詳細に分析することで分子疫学的追跡ができることを示唆している。現在, 本分析によって見出された固有変異を遺伝マーカーとして用いることにより, 他の pECT07 株同士の同一性を追跡し, 都市間の分離傾向を比較検討している。

② 同一患者由来株 (多剤耐性化)

同一患者からの分離例では薬剤感受性試験によって多剤耐性化が確認されていたが, 本結果でのゲノムレベルでの相違は 2 塩基置換変異, すなわちリファンピシン・イソニアジド耐性化に関わる遺伝子の変異が認められた。本結果は, 結核菌の薬剤耐性獲得は患者体内において著しい選択圧の下で生じていることを示唆している。現在地衛研・医療機関などに照会依頼を進めており, 同様の経過を辿った臨床株の有無を調査中であり, 可能であれば比較ゲノムによって同等の結果が見出されるかどうか検証を行う予定である。

(3) pECTs 株のゲノム比較: pECT04

神戸市および山形県から分離された pECT04 株のゲノム情報からは, 互いに固有の変異箇所が少なくとも 72 塩基同定され, pECT07 における同一性と比較すると菌株間に遺伝的隔たりがあると考えられた。pECT07 と同様, これらの変異情報は現行の VNTR 型別解析では見いだされないものであり, ゲノム比較に基づく分子疫学解析, すなわち「結核ゲノム疫学」による新しい結核研究・公衆

衛生の可能性が開かれたと言える。

(4) まとめ

NGS によって見出される結核菌株の固有変異は、従来の遺伝型別法では見出すことのできない情報であり、実地疫学との整合性や、本来結核分子疫学が目指すべき伝搬経路の推定、公衆衛生・結核対策への還元という観点から、抜本的な分析法となりうることが確認された。

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)

[学会発表] (計4件)

- ① 和田崇之，岩本朋忠，わが国における北京型結核菌の集団構造に即した VNTR 型別データの考え方，第 85 回日本感染症学会総会，2011，東京
- ② 和田崇之，小向潤，有馬和代，團野桂，松本健二，吉田英樹，加藤仁一，岩本朋忠，田丸亜貴，吉田志緒美，下内昭，長谷篤，ホームレス結核患者由来株の VNTR 型別解析：多発性大規模伝播と未知の伝播経路推定，第 86 回日本結核病学会総会，2011，東京
- ③ Takayuki Wada，Tomotada Iwamoto，Atsushi Hase，and Shinji Maeda，Characterization of genomic specificity and diversity observed in *Mycobacterium tuberculosis* in far-eastern Asia，FEMS Microbiology Congress 2011，2011，Geneva
- ④ 和田崇之，岩本朋忠，長谷篤，前田伸司，ゲノム比較に基づく結核菌臨床分離株の遺伝的多様性包囲網の構築，第 85 回日本細菌学会総会，2012，長崎

[その他]

特筆事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 崇之 (WADA TAKAYUKI)

大阪市立環境科学研究所・研究主任

研究者番号：70332450