

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670332

研究課題名(和文)古標本から紐解く結核史と結核分子疫学へのフィードバック

研究課題名(英文)Paleopathological genetic analysis to unveil national history of tuberculosis in Japan and its application to molecular epidemiology

研究代表者

和田 崇之(WADA, Takayuki)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：70332450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：1960～1970年代の肺結核患者の感染組織から結核菌DNAを抽出し、遺伝系統分析を行った。現代日本において遺伝多型解析による分離が困難なB2群は、ゲノム比較上において数100年以内の発生・流行を示しており、実際にそれらの古病理標本からB2特異的変異を持つ結核菌が高頻度に検出されたことで、同菌株群が当時既に国内に広く蔓延していたことが推察された。こうした標本由来DNAからの結核菌群検出技術を臨床現場に応用することで、飼育動物の抗酸菌症や肺外結核症において正確な診断根拠を提供することができるようになった。

研究成果の概要(英文)：Clinical samples such as paraffin blocks for histopathological diagnosis of tuberculosis about several decades ago (1960s to 1970s) were challenged to purify DNA of the etiological agent, *Mycobacterium tuberculosis*. Phylogenetic classification of these samples reveals that unique population genetic structure of *M. tuberculosis* in Japan has been already seen. A genetic group B2, which was considered to have spread for several hundred years from genomic comparative analysis, was also found frequently in the old samples. The DNA analysis techniques to target on mycobacterial DNA are applicable to clinical diagnosis for mycobacterial infection such as extra pulmonary tuberculosis and veterinary cases.

研究分野：分子疫学

キーワード：分子疫学 感染症 古病理学 歴史学

1. 研究開始当初の背景

結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の感染によって発症する感染症である。肺結核は感染者からの咳やくしゃみなどを介して飛沫核感染によって伝播するとされているが、感染後潜伏し、数十年に及ぶ無症状期を経て発症するケースが多い。また、発症後完治しても潜伏した結核菌を完全に排除することは難しく、長い時間が経過した後に再発することも珍しくない。一般的には保菌者の免疫力が低下した時に活性化・再発すると考えられており、HIV 感染による免疫不全や糖尿病などの慢性疾患、高齢化に伴って発症リスクが高まる。

現代における日本の結核罹患率は、人口 10 万人あたり約 15 で漸減している状況にある。これは、他の先進諸国では 5 前後であるのに対して突出して高く、今もなお結核中蔓延国として位置付けられている。日本の罹患率が高い理由には、20 世紀初頭から中盤にかけて、世界的にも例のない大流行を経験していることが挙げられる。流行期に感染し、やがて高齢化して再発する長期的サイクルにより、過去の流行株を現代で再発している高齢患者が多数存在すると考えられる。1960 年代の結核罹患率が現代の数十倍であったこと、当時学童期であった世代人口が現代の日本において突出していることは、現代の再発患者の増加傾向に合致する。たしかに、我が国の結核患者は高齢者が多く、65 歳以上の結核患者罹患率は 65 歳未満に比べて 5 倍以上になっている (H26 年結核登録者情報調査年報集計結果: 65 歳未満罹患率 7.2, 65 歳以上 38.9)。

研究開始当初、研究代表者は、現代株の遺伝多型解析から、「北京型」と呼ばれる系統に属する結核菌株が国内に定着していること、それらが 5 つの亜群に細分類されること、そのような多様性が地域に関わらず全国的に様に認められることを見出していた。さらに、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer, NGS) を用いて一部の菌株をゲノムレベルで比較し、いくつかの系統群で分岐年代が集中していることが推定されていた。これは、その系統株が過去の一時期において集中的に拡散 (流行) したことを意味しており、現代日本に見られるユニークな結核菌系統群構成が短期間に形成された可能性を示唆している。

現代の結核対策として重要なのは、菌株の遺伝子比較によって感染者間の経路を見出し、新たな結核伝播を断ち切ることである。過去の流行株の再発を集団事例として判定してしまうことは本来の目的を不鮮明にし、ひいてはその価値を過小評価することに繋がると考えられる。つまり、日本特有の結核史は、結核菌の伝播経路を患者由来菌株の遺伝子情報から推定する「結核分子疫学解析」の精度を大きく損ねている可能性がある。したがって、結核の伝播を正確に発見し、公衆

衛生に結びつけるためには、過去における結核菌の素性を遺伝子レベルで理解し、現代の状況と比較することが重要であると言える。

2. 研究の目的

本課題では、過去の流行と現代の再発という時間の隔たりをもつ感染現象について、これまで平面的であった病原体伝搬経路の追跡範囲を、過去の蔓延 / 拡散状況にまで広げて立体的に捉え、我が国の結核の履歴と経過を高精度に追跡することを目指す。以下、具体的な目的を挙げる。

(1) 過去の結核患者由来の標本から結核菌の遺伝子を抽出し、当時の菌株 DNA を取得する。その遺伝情報から、現代の主要系統群が形成された時期をさかのぼって調査する。また、日本各地から集めた現代由来株のゲノムデータを用いて、それらの来歴を分子系統樹に照らし合わせて検証する。

(2) 次に、その年代に菌株が拡散した理由とその規模を推定し、現代への影響度を分析する。結核の「潜伏の再発」と「直近の伝播」を区別する手がかりを突き止め、感染源調査に組み込むべき新たな概念を提唱する。

(3) 古い病理標本からの DNA 抽出・検出には、痕跡量であっても試料として利用する必要がある。また、化学的損傷が激しくなるため、既存の方法よりも短い遺伝子領域を検出できる手法の開発が望ましい。本課題の付加的な要素として、高感度な検出技術の確立が不可欠であり、そうした需要に合わせた結核菌群検出技術の確立とその応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 病理標本の選択。本課題では、先行的に進めていた関西地域での調査に加え、関東での調査を実施した。1960~1970 年代に肺切除術が行われ、組織標本 (パラフィンブロック) として残存していた検体を確保した。同じく資料として保管されていた病理カルテにおいて結核感染症と診断されていた症例を抽出し、分析対象とした。

(2) DNA の抽出および結核菌遺伝系統解析。(1)において選択されたパラフィンブロック (111 検体) を対象として、市販の DNA 精製キットを用いて DNA 抽出を行った。北京型の判定および系統群推定には、各系統の共通変異となる SNP (一塩基多型) を選択し、TaqMan プローブをデザイン後、リアルタイム PCR に基づく変異検出を行った。

(3) 現代株ゲノム比較。国内に定着している北京型系統群の時系列変動を推定するために、先行研究により集積していた現代の患者由来の菌株ゲノムデータ (Illumina ショートリード) を利用した。マッピング解析によっ

て抽出された変異を繋いだ配列を作成し、分子系統樹を構築した。

(4) 微量 DNA からの結核菌配列検出。微量の結核菌群 DNA を検出するため、トランスポゾン IS6110 領域の約 100 bp を増幅する PCR 用プライマーを設計し、増幅産物の有無によって結核菌の混在を確かめた。

4. 研究成果

(1) 1960～1970 年代の肺結核患者由来組織からの結核菌検出。新規調査先（関東）における標本から DNA を精製し（111 検体）、先行研究によって集積・分析していたデータ（関西地域、同年代の組織標本：101 検体）と合わせることで、当時の結核状況を知る上で信頼度の高い標本群を構築した。これらを用いて IS6110 の検出を試みたところ、49 検体（44.1%）が陽性となった。このうちリアルタイム PCR によって遺伝系統群鑑別が可能であったのは 27 検体であり、20 検体（74.1%）が北京型結核菌であることがわかった。本状況は関西での先行データおよび現代の傾向とほぼ一致していた。

(2) 現代株ゲノム比較からの樹形分析。日本に定着している 5 群の北京型亜系統群は、時系列的には段階的に派生して国内で定着してきたと考えられる。そのうち STK, ST3 の 2 群は日本固有性が特に高く、その分岐年代と定着時期は非常に古い（1000～2000 年前）と示唆された。一方で、ST25/19 の内部系統である B2 群は、現在遺伝多型解析として用いられている VNTR 型別法においても多型性が低く、比較的近年の分岐（数 100 年以内）であると考えられた。このことから、B2 群に特異的な点変異検出を標的としたリアルタイム PCR 解析法を樹立し、(1)で示した標本について分析したところ、ST25/19 に属した 10 標本由来の結核菌 DNA のうち 7 標本で変異が認められ、約 50 年前には既に定着が進んでいたことが確かめられた。

B2 群株は現代日本において国内各地で数多く分離されることから、20 世紀初頭の結核大流行と関連していた可能性がある。しかし、現代分離株のうち、固有性の高い結核系統は上述の STK, ST3 が主流であり、B2 群株が全国的に定着したことは菌株構成上の影響として限局的であったと考える。歴史的に想定されている結核患者の都市部から農村部への流れが、結核患者全体の中でどの程度の規模であったのかについては、今後考察を展開する余地がある。

(3) 微量 DNA 検出系の薬剤耐性鑑別、臨床診断への応用。組織標本から抽出された DNA が抗酸菌症の診断根拠として利用される事例は少ないが、BCG 接種後の皮膚炎症（コッホ現象）や肺外結核、飼育動物における臨死解剖などの病理診断で抗酸菌陽性であったと

きに有用である。こうした医療、獣医領域での臨床診断の需要を満たすために、古標本からの DNA 抽出や抗酸菌 DNA の検出手法を実際に応用し、歯肉結核炎、小児 BCG 症例における菌種鑑別に寄与し、症例報告および論文での公開に至っている。

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 3 件）

Yokoyama K, Kubo K, Yoshida Shiomi, Wada Takayuki, Kawai T, Nishikomori R, Yoshida A. Tumor in chest wall caused by *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Pediatrics International*. 2016; 58(4): 317-318. doi: 10.1111/ped.12984. 査読有。

Okano Y, Yoshida Shiomi, Shinohara T, Takahashi N, Naito N, Kagawa K, Machida H, Hatakeyama N, Ohno A, Wada Takayuki, Ogushi F. Primary gingival tuberculosis diagnosed by genetic identification. *Internal Medicine*. 2015; 54(21): 2765-2768. doi: 10.2169/internalmedicine.54.4353. 査読有。

Teramoto K, Suga M, Sato T, Wada Takayuki, Yamamoto A, Fujiwara A. Characterization of mycolic acids in total fatty acid methyl ester fractions from *Mycobacterium* species by high resolution MALDI-TOFMS. *Mass Spectrometry*. 2015; 4: A0035. doi: 10.5702/massspectrometry.A0035. 査読有。

〔学会発表〕（計 10 件）

Takayuki Wada. Uniqueness of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: a clue to elucidate the history of transmission and diffusion of tuberculosis. The Third Conference of East Asian Environmental History (EAEH 2015). 2015.10.24-25. Kagawa University. Kagawa (Japan)

Tomoo Ichikawa. Tuberculosis History from the Relationship between Cattle and Human: *Mycobacterium bovis* and Modern Japan. The Third Conference of East Asian Environmental History (EAEH 2015). 2015.10.24-25. Kagawa University. Kagawa (Japan)

和田崇之。ゲノム解析が解き明かす結核の拡散経緯とこれから。第 20 回国際結核セミナー。2015.3.5. ヤクルトホール（東京）

吉田志緒美，露口一成，鈴木克洋。1960～70 年代における結核菌の薬剤耐性状況

の推察と系統進化. 第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 57 回日本感染症学会西日本地方会学術集会合同集会. 2014.10.25.岡山コンベンションセンター (岡山,岡山市).

Takayuki Wada, Shiomi Yoshida, Taro Yamamoto, Tokuma Yanai. Opportunistic and pathogenic Mycobacteria: importance of systematic surveillance of mycobacteriosis based on pathological diagnosis. The 7th Asian Society of Zoo and Wildlife Medicine meeting in Vietnam. 2014.10.14. Tam Dao (Vietnam)

吉田志緒美, 露口一成, 鈴木克洋, 岡田全司, 山本太郎, 和田崇之, 林清二. 1960 ~ 70 年代における結核菌の薬剤耐性状況の推察 - 抗結核薬の変遷とその影響について. 第 89 回日本結核病学会総会. 2014.5.9-10. 長良川国際会議場 (岐阜, 岐阜市).

藤原永年, 前田伸司, 和田崇之. 超高分解能 MALDI Spiral TOFMS によるミコール酸の簡易迅速分析. 第 89 回日本結核病学会総会. 2014.5.9-10. 長良川国際会議場 (岐阜, 岐阜市).

和田崇之. 結核菌国内臨床株の比較ゲノム解析:大規模拡散株と国内定着系統群を追跡する. 第 84 回実験結核研究会. 2014.5.8. 長良川国際会議場 (岐阜, 岐阜市).

和田崇之, 岩本朋忠, 瀬戸順次, 田丸亜貴, 前田伸司, 長谷篤, 山本太郎. 結核菌における遺伝型別一致株の比較ゲノム解析. 第 87 回日本細菌学会総会. 2014.3.26-28. タワーホール船橋 (東京)

和田崇之. 結核分子疫学研究の現在と未来. 第 19 回国際結核セミナー. 2014.3.6. ヤクルトホール (東京)

〔その他〕

特記事項無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 崇之 (WADA, Takayuki)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 70332450

(2)研究分担者

吉田 志緒美 (YOSHIDA, Shiomi)
独立行政法人国立病院機構 (近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター)・感染症研究部・流動研究員
研究者番号: 40260806

(3)連携研究者

北市 正則 (KITAICHI, Masanori)
独立行政法人国立病院機構 (近畿中央胸部

疾患センター臨床研究センター)・臨床検査部・臨床検査部長

研究者番号: 00161464

永井 英明 (NAGAI, Hideaki)

独立行政法人国立病院機構 (東京病院)・臨床研究部・外来診療部長

研究者番号: 30510391

蛇澤 晶 (HEBISAWA, Akira)

独立行政法人国立病院機構 (東京病院)・臨床研究部・臨床研究部長

研究者番号: 70549146

市川 智生 (ICHIKAWA, Tomoo)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号: 30508875

前田 伸司 (MAEDA, Shinji)

公益財団法人結核予防会結核研究所・抗酸菌情報科・科長

研究者番号: 50250212

(4)研究協力者

花島 誠人 (HANASHIMA, Makoto)

国立研究開発法人防災科学技術研究所・主幹研究員