

30. より確かな伝播経路の推定を目指した 結核菌ゲノム疫学の試み

○岩本朋忠（神戸市環境保健研究所）

【背景と目的ならびに研究の必要性】

我が国の結核罹患率は、徐々に低蔓延すなわち 10 万対 10 以下の状況に近づきつつあり、現在はその移行期といえる。結核低蔓延化に伴い、集団社会防衛としての結核対策は、高蔓延時代の集団への対処（集団検診）から個への対処（菌検査・接触者検診）、そして、リスクへの対応へとその重心を移してゆく。そのような背景のもと、結核菌分子疫学が、結核の感染連鎖の特定、ならびに、感染リスクの解明のための強力なツールとして広く活用されている。本邦では、分子疫学のための遺伝子型別解析法として、縦列反復数多型配列を検出する Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) 法が広く用いられている¹⁾。同じ菌株で感染した患者グループを特定するのに極めて優れた方法である。しかしながら、その菌株の異同性の判定は全ゲノム上の一部の領域（VNTR 領域）をマーカーとした遺伝子型別解析であるため、直接的な疫学的関連性が無い株間の偶発的な型別一致の余地を残している。実際に、特定の遺伝子型株が複数年にわたり継続的に検出されるものの、その疫学的関連性が解明出来ない事例を、我々は経験している。このような遺伝子型株は、拡張型クラスター形成株として着目されおり、地域内に潜む未知の感染伝搬経路の特定の糸口になりうるものの、現行の遺伝子型別解析法では、それらの菌株間の関連性を追跡することが出来ない。そこで、本研究では、全ゲノム上の数塩基の違いで菌株を識別できる「全ゲノムマッピング解析」を適用することで、同一遺伝子型別を示す菌株間の遺伝的関連性を詳細に解析し、より確かな感染伝搬経路の推定を試みた。結核菌分子疫学を 10 年以上にわたり継続してきた神戸市が直面している課題は、他の自治体においても早晚直面するものと思われ、その解決に向けた提言を行う上でも、本研究は、時事を得た重要なものといえる。

【対象と方法】

供試菌株

2002 年から継続している神戸市結核菌分子疫学解析により、最も大きなクラスター（クラスターサイズ 30 株）を形成する遺伝子型株 (KCT018) に着目した。KCT018 の遺伝子型を示す 30 株は、VNTR パターンが完全に一致であり、単一クローン株から派生した遺伝的関連性の極めて高い株であることが示されたが、従来の遺伝子型別解析では、これ以上の細分類が不可能である。

全ゲノムマッピング解析

各結核菌株を小川培地にて培養後、集菌し、ゲノム DNA を Parish らの方法²⁾に従って抽出、精製した。得られたゲノム DNA を Illumina 社製の GAIIX/HiSeq/Miseq での解析に使用し、ゲノム全域の配列（リードデータ）を取得した。リードデータを、既に完全ゲノム配列が明らかになっている結核菌 H37Rv 株の配列情報（AL123456.2）を参照配列としてアラインメントマッピングし、一塩基バリエーション（Single Nucleotide Variant; SNV）を検出した。冗長度 5 以上のミスマッチ変異を株間変異として検出した。ショートリード解析による SNV の誤検出を避けるため、重複遺伝子や反復領域を解析対象から除外した。

ゲノム型別分類

ゲノム型別分類の方法を図 1 に示した。KCT018 に属する 30 株から 6 株を選択し、全ゲノムマッピング解析により、菌株毎の点変異を検出する（図 1-A）。次に全ての株に共通する変異を削除し、菌株固有の点変異を特定する（図 1-B）。さらに、菌株固有の点変異の有無を指標として、残りの 24 株をゲノム型別グループに細分類する（図 1-C）。



【結果と考察】

神戸市結核菌分子疫学解析により見出された拡張型クラスター形成株、すなわち、VNTR法により菌株間の同一性が示唆されるものの、その疫学的関連性が不明である菌株グループについて、全ゲノム解析をベースとしたゲノム疫学的アプローチを試みた。まず、対象とする拡張型クラスター形成株（遺伝子型 KCT018）30 株から、6 株を抽出し、各菌株の全ゲノムマッピング解析結果から、菌株固有の SNV を検出した。その結果、合計、35 か所の SNV が特定され、6 株は、少なくとも 4 つの亜系統群に分岐していることが分かった（図 2）。これら 4 つの亜系統群の分岐点は約 10 か所の SNV で特徴付けられている。結核菌ゲノムの進化速度は、1 年間に全ゲノム（4.4 Mb）あたり、0.5 SNV と推定されている³⁾ことから、これら 4 つの亜系統群は、個々に独立して派生したものであり、その分離由来患者間では感染伝搬に関して直接的関連性はないと判断できる。本解析により特定された 35 か所の SNV の機能的な内訳は、アミノ酸置換を伴う非同義置換が 11 か所、アミノ酸置換を伴わない同義置換が 12 か所、非翻訳領域である遺伝子間領域での変異が 12 か所であった。遺伝的浮動による中立的な変異出現傾向を示しており、4 つの亜系統群間で、生存能力に大きな違いはないものと推察される。一方、全ゲノムレベルでの比較において、完全に一致した 2 株、25KIH073 と 25KIH074 は、祖父と孫の間での感染事例であり、初発である祖父の病状診断から 2 か月後に孫が発病した事例である。初発患者（祖父）の発見から 2 か月後の発病（孫）であり、孫の発病は、感染直後の発病、すなわち初感染発病と判断できる。その

ため、菌株の微小な変化を引き起こすだけの時間的猶予がなく発病に至ったものと思われる。その結果、両者の菌株間では、全ゲノムレベルで完全一致という結果になったものと考えられる。

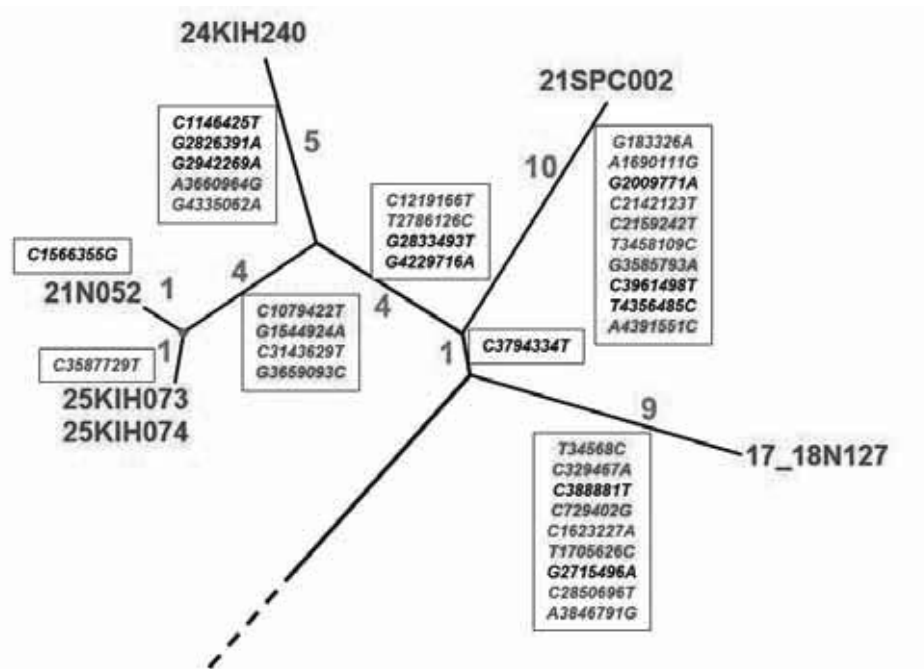


図2. 6菌株間のゲノム比較による菌株固有の変異。四角ないの数字は塩基変異の位置、アルファベットは塩基変異を示す。アミノ酸置換を伴う非同義変異を赤字で示した。各ノード間の数字は、変異の数を表す。

次に、ゲノム解析を行った6株と同一の遺伝子型に属する残りの24株について、上記の解析で見出された35か所のSNVの有無をサンガーシーケンス法により調べ、どのゲノム型に分類されるのかを調べた。その結果、拡張型クラスター形成株30株は、11株からなるグループ(G1)、10株からなるグループ(G2)、そして、その他散発的なものに大別された(図3)。G1の11株について、それぞれの疫学的関連性を精査したところ、これら11株は特定の職種・職場に勤める者とその家族で構成されることが分かり、これまで感染経路が不明としていた感染拡大株の感染様式の一つが解明された。今後、G1グループに属する11株すべての全ゲノム解析を行うことで、グループ内での関連性の流れを解明できるものと期待される。G1グループの疫学的関連性が見出されたのに対して、G2グループは患者間に共通する疫学的背景を見出すことが出来なかった。そこで、G2グループのゲノム情報を、和田ら⁴⁾が報告したゲノム解析データと比較したところ、神戸市以外の近隣地域で高頻度に分離される株が同じグループに属するゲノム型に分類されることが分かった。すなわち、G2に属する10名は、神戸市外で感染した可能性が高いと思われる。地域を超えた広域での感染伝搬の発生を支持する結果であり、このような広域での感染伝搬株については、その感染経路を特定するためには、自治体の枠を超えたデータの共有、すなわち、広域データベースによるアプローチが必要であると結論付けられた。

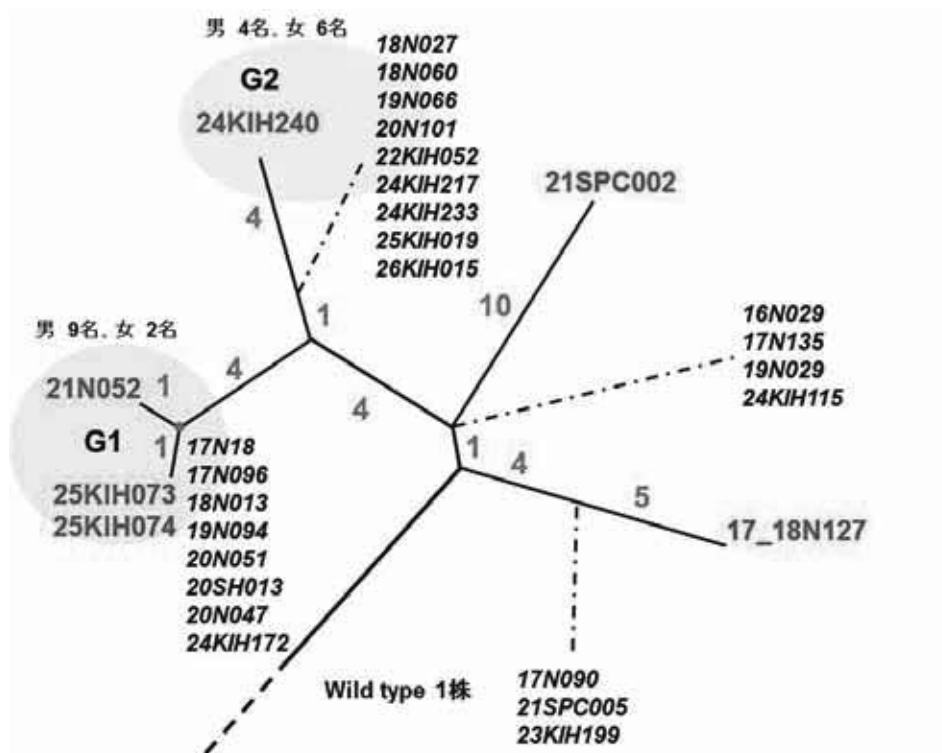


図3. 全30株のゲノム型別分類。全ゲノム解析を行った6株間の比較で特定された菌株固有の変異を指標として、その他の24株についてゲノム型別分類を行った。

【まとめ】

結核菌のゲノム解析は、従来の遺伝子型別解析を凌駕する信頼性の高い菌株異同判定を可能にすることが確認された。従来の結核分子疫学調査結果を基礎として、ゲノム疫学を組み合わせることで、より詳細な感染伝搬経路の解明を目指すことが出来ることが確認された。NGSによるゲノム解析は、今後の結核対策における抜本的な分析法となりうるものと期待される。

【今後の課題】

本研究により、結核分子疫学で見出される拡張型クラスター形成株は、必ずしも単一の感染伝搬経路によるのではなく、複数の感染伝搬が組み合わさることで、形成されるものであることが分かった。従来考えられていた以上に、複雑な感染伝搬様式が存在しており、そのために、これまでの実地疫学と分子疫学の食い違いが生じていたものと推察される。全ゲノム解析の限界の一つとして、感染後すぐに発病する初感染発病の場合には、感染源の菌株との違いを識別できない可能性のあることが分かった(全ゲノムレベルでの一致)。短期間に感染伝搬が引き起こされた集団感染事例などにゲノム解析を適用する場合には、この菌株異同性判定の限界を認識しておく必要があるだろう。また、感染伝搬の流れを詳細に把握するためには、自治体の枠を超えたデータ比較が不可欠になることが、本研究に

より明らかとなった。結核対策をより効率的、効果的に実践するためには、自治体間の枠を超えた情報のやり取りが必要不可欠であり、今後の課題として認識されなければならない。

【引用文献】

- 1) Iwamoto T. et al.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 2007:67-74.
- 2) Perish, T. et al. Mycobacteria protocols. 1st ed. Humana Press. 1998. pp.31-44
- 3) Walker T.M. et al.: Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. Lancet Infect Dis. 2013:137-46.
- 4) Wada, T. et al. Clonality and micro-diversity of a nationwide spreading genotype *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. PLoS ONE 10:e0118495 (2015)

【経費使途明細】

遺伝子解析試薬：

| | |
|-------------------------------|----------|
| ・キアゲン DNA Screening Kit | 78,300 円 |
| ・TaqMan MGB 検出キット | 73,000 円 |
| ・PowerWater DNA Isolation Kit | 67,150 円 |

プラスチック・ガラス製品：

| | |
|---------------------|----------|
| ・PYREX 濾過フラスコ (2 個) | 11,340 円 |
| ・ミリポア 1.2um, 47mm | 14,370 円 |
| ・ミリポア 0.8um, 47mm | 14,370 円 |

その他：

| | |
|-------------|----------|
| ・フナコシ アダプター | 17,100 円 |
| ・アズワン タイマー | 2,148 円 |

| | |
|----------|-----------|
| 消費税 (合計) | 22,222 円 |
| 合計 | 300,000 円 |