

今村賞受賞記念講演

結核菌北京型ファミリーの集団遺伝学的解析から推察される日本国内定着型遺伝系統群の存在と遺伝系統別薬剤耐性化傾向の違い

岩本 朋忠

キーワード：結核菌北京型ファミリー，結核菌集団構造，VNTR，分子疫学，遺伝系統，遺伝子型，多剤耐性結核

はじめに

1990年代に入って急速に発展した結核菌遺伝子型別解析手法により，結核菌の遺伝的多様性が明らかになった。病原体（結核菌）の遺伝的多様性が形成される背景には，時間経過に伴う進化，環境（ホスト）への適応力・定着性，選択淘汰圧に対する反応性などがある。したがって，その遺伝的多様性を論理的に解析することで，これらの背景についての洞察が可能となる。病原体群集を一群の分子集団としてとらえ，その集団の形成を科学するのが分子集団遺伝学的解析である。

結核菌を遺伝的・表現型的に均質な集団ととらえてきたこれまでのドグマは，いまや存在しない。結核菌集団の遺伝的多様性を解析し，結核菌の進化・適応，系統地理学的分布，宿主定着要因などを解明することで，結核対策，治療法，ワクチン開発にブレークスルーがもたらされるものと期待される。本研究では，わが国で分離される結核菌全体の約8割を占める結核菌北京型ファミリー（結核菌北京型株）を研究対象として，その遺伝学的特徴（集団構造）と集団構造のダイナミクス，ならびに遺伝系統別の薬剤耐性化傾向の違いについて集団遺伝学的に解析した。

結核菌北京型ファミリー

Soelingenらは東アジアで分離される結核菌の多くが特徴的な遺伝子型を示すことを見出し，この遺伝子型に属する株を結核菌北京型株（Beijing genotype strain）と

名付けた¹⁾。北京型株は，他の遺伝系統と比べて，①感染伝播力が優れている，②薬剤耐性と関連性が高い，③発病・再発を引き起こしやすい，④BCG接種による免疫の影響を受けにくい等の研究報告がなされており²⁾，その高病原性が示唆されている。現在，世界的に感染拡大傾向にあり，結核流行の原動力の一つとして危惧されている。日本を含む東アジア地域の高蔓延株であり，世界で分離される結核菌の約3割がこの遺伝系統に属するといわれている。近年，南アフリカ，旧ソ連諸国，ベトナムなど東アジア地域以外における北京型株の急激な感染拡大ならびに多剤耐性結核の蔓延との関連性が報告されている³⁾。ヨーロッパでは多剤耐性結核菌の伝播の85%が北京型株によるものであり，大きな問題となっている。1990年代に，ニューヨーク州の病院や刑務所において頻発した集団感染事例の原因菌として有名なW株は，北京型株である。わが国の臨床分離株の実に7～8割がこの遺伝系統に属している（Table）。

結核菌北京型ファミリーの集団構造と遺伝系統分岐の解明

国内分離株355株を用いて，縦列反復配列数多型解析（VNTR）による遺伝子型別，一塩基多型（SNPs, single nucleotide polymorphisms），大規模ゲノム欠失（RD, Region of difference），およびゲノムの特定領域（NTF領域）への挿入配列（IS6110）の有無を網羅的に解析した結果⁴⁾，わが国の北京型株は複数の遺伝系統に分岐しており（Fig. 1A），各遺伝系統は遺伝的多様性に富んでいるこ

とが明らかとなった (Fig. 1B)。また、それらの出現機序は、変異を蓄積しながら段階的に派生・定着してきたことが推察された。中国、ロシア、南アフリカでの報告から、世界的に蔓延している北京型株は modern type (新興型) が主流を占めると認識されてきたのに対して、わが国では諸外国の状況とは全く異なり、ancient type (祖先型) がその約 8 割を占めることが分かったのは特に興味深い (Table)。複数の多様性に富んだ遺伝系統群が共存し分子進化系統の足跡が保存された結核菌集団構造は、これまでに報告例のないものである。わが国の北京型株が特有の集団構造を示すことは、海外からの結核菌伝播の影響が少なく、独自に結核菌伝播が起こった結果であると推察される。海外における蔓延状況とは非依存的に形成された集団構造は、単一民族性の高いわが国における宿主と結核菌の相互関係を見出し、新たな結核対策への手がかりを得るうえでも興味深い知見と思われる。

結核菌北京型ファミリーの集団構造のダイナミクス

わが国の結核疫学は、戦前の結核高蔓延時代と戦後導

Table Ratio of Beijing strains to all clinical isolates and their distribution based on the ancient/modern classification

Countries/Region	Beijing (%)	Ancient (%)	Modern (%)
Japan All	73.8	81.7	18.3
Chiba Pref.	80.4	—	—
Osaka City	80.4	—	—
Kobe City	78.5	—	—
Okayama Pref.	72.5	—	—
Okinawa Pref.	71.3	—	—
China (Beijing)	93	5	95
Hong Kong	70	14	86
Taiwan	52	4	96
Vietnam	54	25	75

入された本格的な結核対策 (集団検診, BCG 接種, 化学療法など) による急激な罹患率・死亡率の低下ならびに人口構成の超高齢化を背景として、高齢者患者の割合が圧倒的に高いという特徴をもつ。高齢者結核の大部分は、結核高蔓延期の青年時代に感染した結核の内因性再燃である。そのため、わが国の結核患者の分布は、高齢者層で認められるピークと、20~40歳代でのピークの二峰性を示す⁵⁾。それぞれのピークを形成する患者は、内因性再燃を主要因とする患者群 (高齢者グループ) と現在感染拡大を認める患者群 (中・若年者グループ) と考えられる。そこで、わが国における結核菌集団構造を誕生年コホート別に比較することで、結核高蔓延時代の集団構造の推察、現在活発に感染伝播を認める遺伝系統群の特定、ならびに結核菌集団構造の将来像予測を試みた。

2002年から2007年の間に神戸市内で分離された新規登録結核患者由来の結核菌909株に対して、VNTR, SNPs, RD, NTF領域へのIS6110の挿入を解析し、結核菌集団構造を調べた。誕生年コホート別に集団構造を比較したところ、新興型の北京型結核菌の出現頻度が若年者層で有意に上昇したのに対して、祖先型の北京型結核菌である B3は逆に若年者層で出現頻度が有意に減少することが分かった⁶⁾。新興型は感染伝播・発病において祖先型よりも優れているとの研究報告がある⁷⁾。つまり、集団感染などをより引き起こしやすい遺伝系統とも言うことができる。集団感染誘発のリスクファクターとしての新興型が、わが国の若年者層に多いという事実は、従来の若者のライフスタイルに加えて菌側の要因からも、若年層に対して感染・発病の危険性に関する警鐘を鳴らす必要性を感じる。また、高頻度変異領域を含む19 lociを用いたVNTR解析⁸⁾から、新興型は他の遺伝系統と比

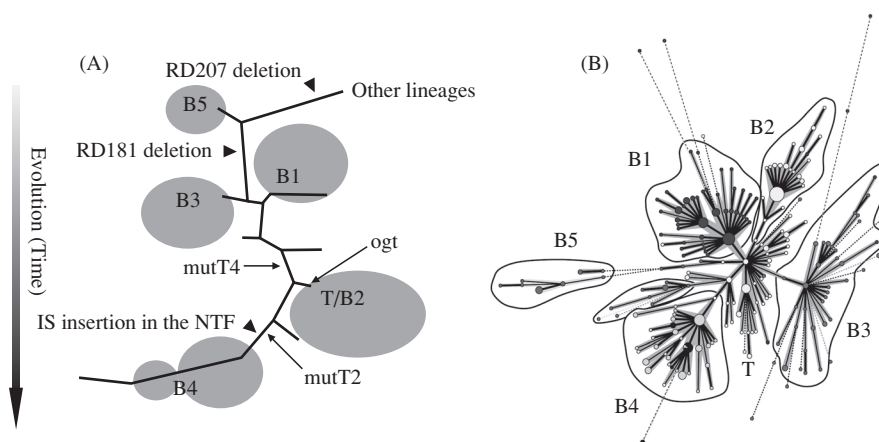


Fig. 1 (A) Phylogenetic tree of *M. tuberculosis* family strains based on SNPs specific to the lineage. (B) Minimum spanning tree representation of 15-VNTR clustering. Each circle represents a genotype, and the size is proportion to the number of isolates.

べて有意に高いクラスター形成率を示しており、近年わが国で感染伝播が盛んに起こっていることが示された。現在は、祖先型が優占するわが国の北京型結核集団構造であるが、今後、新興型がその勢力を拡大するものと思われる。

高齢者層と若年者層での集団構造の違いを引き起こした原因の一つとして、BCG接種の可能性も示唆される。すなわち、新興型はBCG接種によるワクチン効果からの回避能力が優れているのに対して祖先型のB3はBCG接種の導入により大きな選択圧を受けた遺伝系統であると推察できる。結核菌の遺伝系統の違いとBCGによるワクチン効果の関連性は、今後の研究課題といえる。

多剤耐性・超多剤耐性結核患者群で高頻度に出現する遺伝系統株

北京型結核菌による多剤耐性化が世界各地から報告されており、多剤耐性化のハイリスク系統である可能性が示唆されている³⁾。一方、北京型結核菌と多剤耐性化との相関については地域差があり、その原因の一つに、地域に蔓延している北京型株の遺伝系統の違いが疑われているが、そのことを実証した報告はない。

同一地域で得た全薬剤感受性株188株と多剤耐性結核菌97株（うち47株は超多剤耐性結核菌）の結核菌集団構造を比較したところ、北京型株の祖先型に分類される2遺伝系統（B1, B5）が多剤（超多剤）耐性結核菌群で有意に出現頻度が高いことが示された⁹⁾。多剤耐性・超多剤耐性結核患者集団で高頻度に出現するB1, B5の両遺伝系統は、遺伝子変異の蓄積に対して寛容である、あるいは、遺伝子変異を起こしやすいなど多剤耐性化傾向を強める何らかの特性を有するものと思われる。本結果が、集団感染や特定の流行株の存在によるバイアスが影響したものではないことは複数の遺伝子変異解析により確認された。

進化系統発生的情報を提示するVNTRローカスの特定

遺伝子型別解析方法の中には、unique event polymorphisms (UEP) すなわち、進化・系統分化の流れの中で、1度限りのイベントである分子マーカーを用いることで進化系統発生別に分類する方法と、遺伝的同一性を検証するために遺伝的多様性に富んだ分子マーカーを用いる方法がある。前者の例としては、large sequence polymorphisms (Region of difference, RDとも呼ばれる) や SNPsが、後者の例としては IS6110 RFLPや VNTRがある。現在、結核菌分子疫学領域で汎用されている VNTR法であるが、その多様化の発生機序はいまだ解明されていない。一般に、VNTR領域は変異頻度がきわめて高いことから、

homoplasyすなわち、同一の変異が異なる複数の遺伝系統において重複して認められ、進化・系統分化の追跡に適用できない分子マーカーと考えられてきた。しかしながら、われわれの研究により、VNTRの特定の loci は結核菌北京型ファミリーの内部系統分岐を反映した情報を提示しうるということが明らかになった¹⁰⁾。これは、北京型株が比較的新しく分化した遺伝系統であることを反映しているのかもしれない。

おわりに

これまでの研究成果として、わが国の結核菌北京型株の遺伝系統群を解明し、さらに、各遺伝系統の疫学的特徴を把握することができた (Fig. 2)。今後、これらの疫学的特徴をもたらし機構を解明することで、現在の結核対策へのブレークスルー、すなわち、菌株の個性に応じた結核対策が実現できるものと信じている。そのためには、個々の遺伝系統に関して、ゲノムワイドな解析が必要になってくるであろう。ゲノム上の部分的な領域を遺伝子マーカーとする geno-typing based molecular epidemiology から全ゲノムを対象とした genome-typing based molecular epidemiology への発展は、結核菌研究にさらなる飛躍をもたらすものと期待している。全ゲノム情報に基づく菌株比較を分子疫学レベルで実行するというのは、数年前までは夢物語にすぎなかった。しかしながら、今日の次世代シーケンサーに見られる技術革新のスピードは、その幕開けがすぐそこまで来ていることを予感させる。

過去10年余りにわたる結核菌分子疫学研究は、結核感染様式の解明と感染連鎖の特定を目指した狭義の分子疫学研究のみならず、病原体（結核菌）の進化・系統発生、集団遺伝学的研究、遺伝的多様性の解明など多方面にスピノフしてきた。これら様々な研究領域がさらな

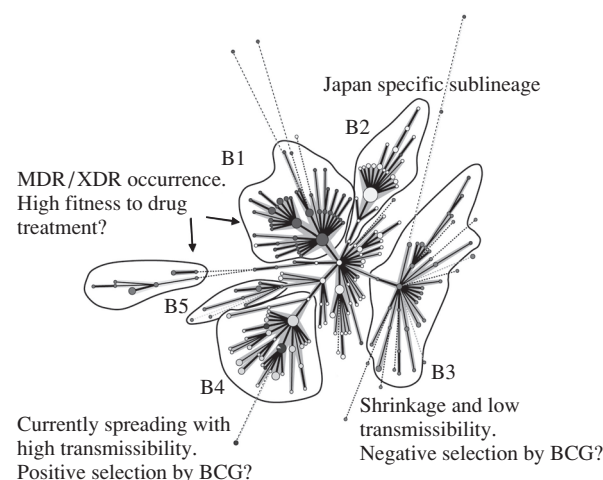


Fig. 2 Summary of the epidemiological characteristics of each monophyletic sublineage within Beijing family.

る発展を遂げ、その成果が有機的に結びつくことで、結核菌という病原体に対する理解が深まり、革新的な結核対策、診断、治療へとつながることを願っている。

謝 辞

発表の機会をお与えいただいた第84回日本結核病学会会長 岸不盡彌先生、座長の労をお取りいただきました齋藤肇先生、今村賞にご推薦いただきました結核研究所名誉所長 森亨先生はじめ多くの共同研究者の諸先生方に深謝申し上げます。

文 献

- 1) van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al.: Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.* 1995 ; 33 : 3234–3238.
- 2) Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, et al.: Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.* 2002 ; 10 : 45–52.
- 3) van Soolingen D, Kremer K: Findings and ongoing research in the molecular epidemiology of tuberculosis. 結核分子疫学の成果と研究の現状. 結核. 2009 ; 84 : 83–89.
- 4) Wada T, Iwamoto T, Maeda S: Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 2009 ; 291 : 35–43.
- 5) 大森正子: 結核の統計2009を読む—わが国の結核の現状と課題—. 複十字. 2009 ; 329 : 4–7.
- 6) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, et al.: Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during previous decades in Japan. *J Clin Microbiol.* 2009 ; 47 : 3340–3343.
- 7) Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, et al.: A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol.* 2007 ; 45 : 1483–1490.
- 8) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, 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 ; 270 : 67–74.
- 9) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al.: Population structure analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 ; 52 : 3805–3809.
- 10) Wada T, Iwamoto T: Allelic diversity of variable number of tandem repeats provides phylogenetic clues regarding the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family. *Infection, Genetics and Evolution.* 2009 ; 9 : 921–926.

Memorial Lecture by the Imamura Award Winner

POPULATION STRUCTURE ANALYSIS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BEIJING FAMILY IN JAPAN

Tomotada IWAMOTO

Abstract The Beijing family is a genotypic lineage of *M. tuberculosis* that reportedly predominates throughout eastern Asia and in parts of Russia yet dispersed worldwide. About 80% of clinical isolates in Japan are belonging to this family. The predominance of a narrow range of genotypes, in this case predominance by Beijing family strains, hypothesized that these strains may have a selective advantage either with virulence or transmissibility that led to clonal expansion.

The strains are monophyletic within the *M. tuberculosis* species and also reveal further sublineages within this family. It is believed that the genetic and evolutionary background of *M. tuberculosis* strains influence on the propensity to gain drug resistance as well as the pathogen's transmissibility. Thus, understanding the population genetic structure and its dynamics of Beijing family strains will undoubtedly help to unravel the basis for the considerable success and spread of this genotype in Japan.

During the past few years, we intensively studied this notorious clade, *M. tuberculosis* Beijing family, to reconstruct their evolutionary events and phylogeny and to elucidate their epidemiological characteristics at the sublineage levels through the population structure analysis. Here, I summarized the findings of our research in the past few years.

Singularity of the genetic diversity of Beijing family strains in Japan

We reconstructed the phylogenetic trees of Beijing family strains by the 15-MIRU-VNTR genotyping method and validated them through profiling of the NTF region, large sequence polymorphisms (LSP), and single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Interestingly, we could demonstrate that the ancient Beijing sublineage has remained endemic to Japan, in contrast to the worldwide spread of the modern Beijing sublineage. Moreover, we found that the ancient sublineage strains corre-

sponding to four monophyletic subgroups. The singularity of the genetic diversity of Beijing family strains in Japan, i.e., its high diversity and dominance of the ancient sublineage in contrast to the modern sublineage found worldwide, suggested that they became endemic independently from the evolutionary stream that led to the dominant modern Beijing sublineage in outside Japan.

Population structure dynamics of Beijing family strains in Japan

We inferred the population structure dynamics of Beijing family strains during the past decades in Japan by comparing the isolates from elderly TB patients (these strains represent the population structure that existed decades ago) and young TB patients (these strains reflect the population structure of currently prevalent strains). The comparison between the cohorts born in different years suggested that the population structure of the *M. tuberculosis* Beijing family strains in Japan before World War II—when TB was highly prevalent—was significantly different from that of the currently prevalent strains. The results revealed that the spread of a modern sublineage that has high transmissibility is currently increasing, while the spread of an ancient sublineage, STK, has significantly decreased in younger generations. It is interesting to assume that the observed trends in the case of the modern and STK strains may be associated with the *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination.

Association between sublineages of Beijing family and multi-drug resistance

Mycobacterium tuberculosis Beijing family strains are suspected to be an evolving lineage of *M. tuberculosis* that has acquired the advantage of drug resistance. However, the association between this genotype and drug resistance varies in different countries. This may be due to heterogeneity in the fitness of the sublineages of the Beijing family and different proportions of these sublineages in the local population. To

determine whether certain sublineages are associated with multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis, the population structure of the Beijing strains based on 10 synonymous single nucleotide polymorphisms (sSNPs) was analyzed in pan drug-sensitive (DS), MDR, and XDR strains.

The results revealed that two evolutionary subgroups (ST 26 and ST3), which are belonging to an ancient sublineage, occurred with a significantly higher frequency in the MDR/XDR population than in the DS population. This suggests that different sublineages of the Beijing family may differ in their mechanism of adaptation to drug-selective pressure. The greater vigilance in monitoring the occurrence of these strains is indispensable for achieving better TB control in this region.

In the combination of molecular epidemiological data with recent advances in mycobacterial genomics and population genetics, we could provide novel insights into genetic diversity and phylogeny of *M. tuberculosis* Beijing family strains circulating in Japan. This would be a good start to approaching the genetic determinants causing variations in virulence and transmissibility of *M. tuberculosis*. We are currently applying the next-generation sequencing technology to get the whole genome sequencing of the representative strains from each monophyletic subgroup within *M. tuberculosis* Beijing family.

Key words : *M. tuberculosis* Beijing family, Population structure, VNTR, Molecular epidemiology, Phylogeny, Genotype, Multidrug-resistant tuberculosis

Department of Microbiology, Kobe Institute of Health

Correspondence to : Tomotada Iwamoto, Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, 4–6, Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 650–0046 Japan.
(E-mail: tomotada_iwamoto@office.city.kobe.lg.jp)