

第86回総会特別講演

結核菌分子疫学の成果と挑戦

岩本 朋忠

要旨：結核菌の分子疫学は、遺伝子情報に基づく高精度な菌株識別という技術革新が従来からの実地疫学や臨床医学と融合することで派生した新たな学問領域である。その研究対象は、結核感染様式の科学的検証、感染連鎖の追跡（集団感染検出）およびその背景の特定、結核菌とヒトとの共生の歴史をひもとく進化・系統解析、個々の遺伝系統の個性・性質の洞察など多岐にわたっている。多領域横断型の研究であるがゆえに、そのデータ解析と活用には様々な視点が要求される。特に結核は二類感染症であり、その感染対策において国・地方自治体の果たす役割がきわめて大きい。そのため、結核菌分子疫学に携わる研究者にとって、自らの研究は、知的好奇心を追求するものであると同時に、結核対策に資する科学的データと見識の提供という社会的使命が課されていることを認識しておく必要がある。言い換えれば、純粋科学の側面を維持することで科学的レベルの向上を常に目指すと同時に結核対策に科学的側面から直接貢献できるという醍醐味をもった研究領域であると言える。本稿では、結核菌分子疫学による成果を集団遺伝学的研究の面と結核疫学状況の包括的理解への貢献の両面から概説した。

キーワード：分子疫学, VNTR, 遺伝系統, ゲノム解析, 次世代シーケンサー

はじめに

従来の疫学では、量的なデータ変化、すなわち、罹患率、高齢者結核患者数、多剤耐性結核患者数、外国人結核患者数などの増減に基づく解析が主であり、“何が・どのように”といった質的な変化への解釈には限界があった。分子疫学では、“何が”に対して“遺伝子型別を特定した菌株 (genotype)”が、そして、“どのようにして”に対しては、“同一 genotype 株のトレーサビリティ (クラスター形成)”という視点を与えることで、上述した量的な疫学データの質的解釈を可能とする。具体的には、罹患率の変化に対してクラスター形成状況を加味することで、罹患率の変化をもたらした要因を、最近の感染拡大の寄与と過去の感染の再燃による影響の両面から解釈することが可能となる。再発事例では、再感染によるのか再燃によるのかが明らかになるし、多剤耐性結核菌を医源的につくられたものと感染伝播によるものに区別することも可能となる。また、外国人や高齢者由来の

菌株の伝播状況を知ることができる。このように、分子疫学の成果は、集団発生事例の科学的検証にとどまらず、外来性再感染の証明、多剤耐性菌や海外からの流入株などの特定の株の感染拡大への監視、結核発生の地域・年齢別特性、さらには広域的発生事例の検出などにわたり、従来からの疫学的疑問に少しずつではあるが、着実に回答を与えている。結核をめぐる社会的リスクは社会状況にともない刻々と変化し、多彩である。この変化を迅速にキャッチし、対策に生かすためには、実地疫学と分子疫学のさらなる連携と新たなシステム作りが不可欠であろう。

一方、分子疫学のための基本技術である遺伝子型別解析を応用して、結核菌を遺伝学的に亜分類し、分子進化学的に解釈しようという研究が盛んに行われている^{1)~5)}。全世界レベルでの菌株を母集団とした解析結果から、結核菌には、遺伝子変異の蓄積を経て現在繁栄している複数の遺伝系統群 (単系統群) が存在し、それらが地域性の高い分布を示すことが明らかとなった^{6)~8)}。国内分離

株を対象に行ったわれわれの解析から⁹⁾¹⁰⁾, わが国では、北京型株という遺伝系統が優占しており、全分離株の約7～8割を占めることが分かった。さらに、わが国の北京型株は5つの亜系統群に細分類され、その分布状況は、世界的にも稀有なものであることを明らかにした¹⁰⁾¹¹⁾。また、各亜系統群間の疫学的・臨床的データの比較から、感染拡大傾向にある系統、老人性結核に頻発する系統、薬剤耐性化に対する優位性が疑われる系統の存在を示した¹²⁾¹³⁾。各遺伝系統群は、それぞれに特徴的な遺伝子変異を蓄積していることから、各々が疫学的・臨床的に異なる特色を生み出すことは想像に難くない。単系統群や株の病原性・伝播性などの個性とその根本原因を明確化することで、新たなワクチン・治療法・感染対策の確立のための基礎データとなり、結核撲滅のための根本的対策につながるものと期待される。感染症のテーラーメード医療化への方向性を含むものとも言える。さらに、次世代の分子疫学的解析を牽引する可能性を秘めたものとして、高速シーケンサーが登場しており、その活用が今後のホットトピックスとなるものと期待される。

1. 結核菌臨床分離株は遺伝的に多様な集団である

ヒト型結核菌は単一遺伝系統の菌種であり、ゲノム情報の変化が連続性をもって蓄積されている。進化的戦略として遺伝子の水平伝播を利用していない（遺伝子の水平伝播がない）ことから、ホモプラシー、つまり異なる遺伝系統群間に同じ遺伝子変異が平行に出現する割合はきわめて低い⁷⁾。つまり、ゲノム情報を血統書として共通祖先をきわめて正確に遡ることができるという遺伝学的特徴を有する。

Gagneux らは⁶⁾, ゲノム上の特定の領域が欠落するという変異事象（Region of differences, RD）を目印にして、

世界80カ国から収集した875株のヒト型結核菌群株の系統地理学的解析を行った。これら875株の結果からヒト型結核菌群は6つの主要な遺伝系統群に分類されることを明らかにした。また、その分布に地域特性が認められることも見出した。その後、Hershberg ら⁷⁾による89遺伝子を用いた一塩基多型解析（Single nucleotide polymorphism, SNP）、さらには、Comas ら¹⁴⁾による全ゲノムシーケンス解析により、これら6つの遺伝系統群への分類の信頼性が確認された。Hershberg らは⁷⁾, 異なる系統群に蓄積されたSNPのうち、アミノ酸置換を伴う変異が全体の約半数と非常に高い割合であることを明らかにした。これは遺伝系統別の個性を強く示唆するものであり、結核菌研究においてその遺伝的背景の違いを考慮することの重要性を支持するものである。また、全ゲノム解析を行ったComas らは¹⁴⁾, これら6遺伝系統すべての結核菌で、human T-cell epitopeが高度に保存されているという興味深い知見を報告した。さらに、Schürch らは²⁾北京型株の亜系統群の全ゲノム比較解析を行い、世界中に蔓延しているmodern typeが他の亜系統群と比べてregulatory network 関連の遺伝子群に多くの変異を有することを見出した。

結核菌遺伝子型別解析手法の進歩により、遺伝的に多様な臨床分離株を進化的に異なる遺伝系統群に分類することが可能となった。その結果、上述の研究報告のように、臨床分離株が示す多様な菌株の特徴を遺伝系統横断的に検証することで、菌種普遍的な特性、系統（亜系統）群の特性、さらには菌株に特異的な特性を解明しようという研究が活発化してきた。図1は、このような結核菌研究における新たな潮流の概念と各進化レベルへの系統分岐の流れを模式的に表したものである。菌株の識別に際しては、系統分岐のどの段階を基準に用いるかにより、

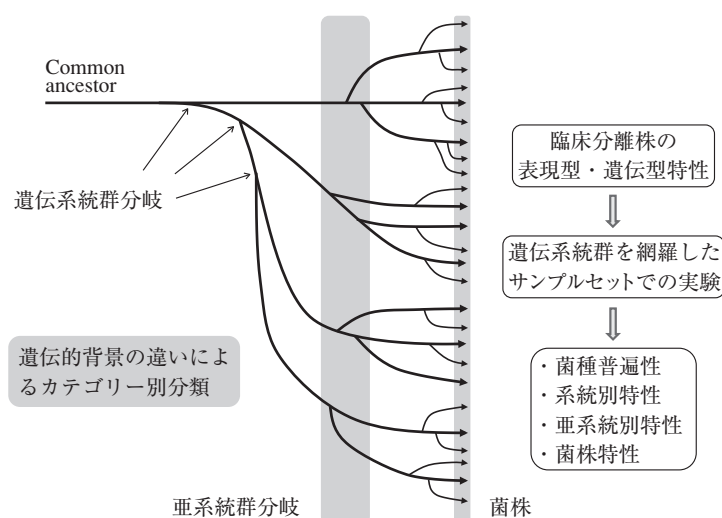


図1 実験室標準株を用いた研究から臨床分離株へのシフト

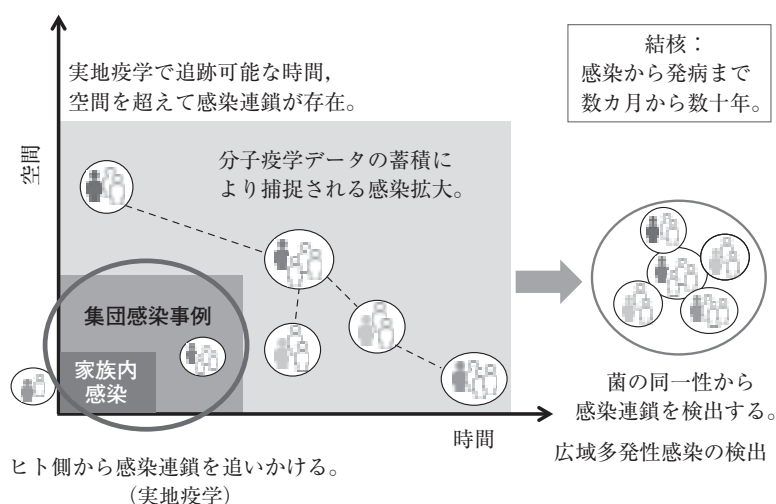


図2 分子疫学による結核感染様式の実態解明

そのカテゴリーの分岐レベルが異なることを認識しておく必要がある。結核菌分子疫学は菌株の同一性の特定や感染伝播の追跡に大きく貢献してきた。今後、従来の分子疫学的データに系統分類データを加味することで、結核菌分子疫学は個々の事例検証にとどまらず、菌の進化・系統分岐、個性、ヒトとの関連性を包含した解釈へと発展し、より示唆に富むデータが提示されるものと期待される。

2. 結核低蔓延化時代に向けた結核菌分子疫学への期待

わが国の結核罹患率は10万対19.0（2010年）であり、未だ、中蔓延状態にあると言わざるをえないが、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。結核罹患率の減少により、特定の感染リスクが牽引する特徴的な感染事例の存在が浮き彫りになるものと考えられる。分子疫学により、菌の遺伝子型を科学的根拠として地域内の結核蔓延状況を精査することで、感染リスクが牽引する特異な事例の検出・抽出が可能となるであろう。つまり、分子疫学は、低蔓延化時代においては従来からの感染連鎖の特定のみならず、感染リスクの解明のための強力なツールとして効果的な結核対策の推進に大きく寄与するものと考えられる。

結核は、ヒトからヒトに伝播し、感染から発病にいたる時間経過が数カ月から時には数十年と多岐にわたっている。そのため、一般の感染症とは異なり、感染様式の実態を把握するためには、時間的・空間的に巨視的な観点が必要となる（図2）。つまり、一地域あるいは短期間

の調査では一過性の集団感染もしくは単なる散発例として処理されないが、巨視的にみると単一の株が大規模な感染伝播を広域的・長時間的に引き起こしている事例が存在しているものと推察される。このような株は感染拡大におけるハイリスク株となる可能性がありその精査が必要だが、広域をカバーする分子疫学の導入により、初めてその検出は可能となる。従来の集団感染事例とは異なる概念として扱われるべき事例であり、ここでは、「広域多発性感染」と呼称することにする。関東地方で大規模な感染拡大が確認され、同一株が全国各地でも検出されているM4株¹⁵⁾はこの広域多発性感染事例の一例と言える。この株は、神戸市においても2002～2010年の間に18株が検出されている。また、集団感染を引き起こした株が時期と場所を変えて再び集団感染を引き起こした事例を神戸市では経験している。この事例も、広域多発性感染事例としてとらえることができるであろう。今後、結核罹患率の低下を背景にして、分子疫学調査の充実により、上述のM4株や集団感染再発事例株のような広域多発性感染を引き起こした株の報告例が増えてくるものと思われる。それらの事例は、現在のわが国における結核感染伝播の実態を反映するものであり、その理解を深めることで、今後の結核対策に新たな方向性が提示できるものと期待される。

国内での結核患者の数が減少してくると、相対的に外国人結核患者の数の増加が顕著となる。外国人結核の実態を正確に理解するには地域内分子疫学解析データが必須と言えよう。2002年からの菌株データを蓄積している神戸市内分離株の分子疫学データは、神戸市での外国人結核の多くは母国での感染、日本での発病を示唆している。現在までのところ外国人結核由来株の地域内感染拡大は認められていないものの、一部では、外国人コミュ

ニティー内での感染伝播を強く示唆するデータも得られている。さらに、多剤耐性結核菌の海外からの流入を強く示唆する事例も過去に3件経験している。また、外国人結核患者からは、国内に分布している株とは遺伝系統的に異なる株が多く検出されている。つまり、われわれがあまり曝露経験のない株が海外から持ち込まれている状況であり、これらの株の影響についても今後注意が必要である。現在、第二の開国時代を迎えたといわれるように、今後ますます外国人結核は増加するであろう。地域内分子疫学は、外国人結核由来株の動向をモニタリングするための強力なツールであることに疑問の余地はない。

3. 分子疫学からゲノム疫学そしてシステム疫学へ

分子疫学データの蓄積により、結核菌の遺伝系統別分類と疫学的特徴の関連性が見えてきた。例えば、若年層で現在活発に感染拡大傾向にある遺伝系統や、高齢者から高頻度に検出される遺伝系統の存在¹³⁾、さらには多剤耐性結核患者から高頻度に検出される遺伝系統の存在が報告されている¹²⁾。このような genotype 別の疫学的特徴付けは今後一層その速度を加速するものと思われる。分子疫学解析から見出されたこれらの知見を、診断・治療・対策に結び付けるためには、基礎科学研究による細菌学的特徴付けや責任遺伝子の特定が不可欠である。つまり、分子疫学的知見→基礎科学的検証→細菌学的・遺伝学的特徴付け→分子疫学的検証の循環からなる分子疫学の循環システム（図3）を構築することが現在結核菌分子疫学に課された近々の課題と言えよう。

分子疫学の次の展望として全ゲノム情報を活用したゲノム疫学が、高速シーケンサー（次世代シーケンサーとも呼ばれる）技術の急速な進歩により、現実的なものとなってきた¹⁶⁾¹⁷⁾。現在の分子疫学は、variable numbers of tandem repeats (VNTR) などの特定の遺伝子マーカーを活用することで菌株の分子レベルでの識別（遺伝型別）

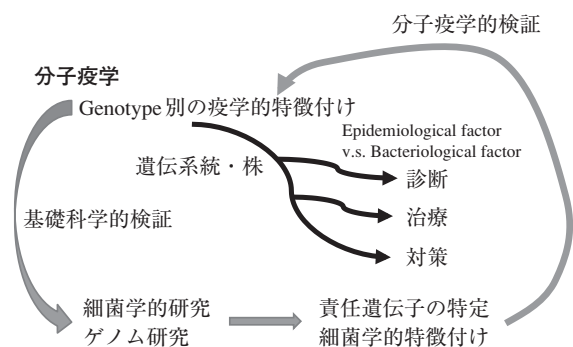


図3 結核菌分子疫学の循環システム

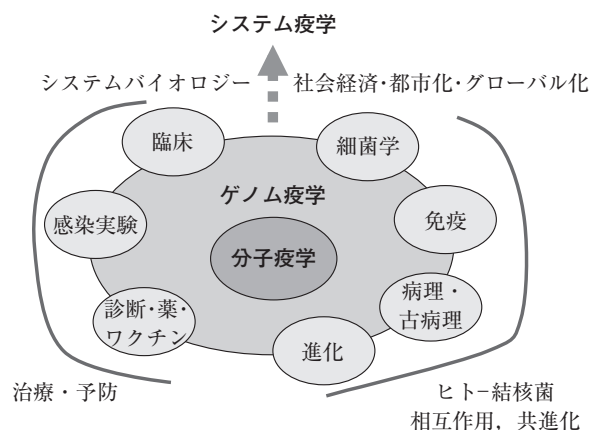


図4 分子疫学、ゲノム疫学、システム疫学

を行っている。VNTRパターン情報はあくまでも菌株へのタグ付け（名札付け）であり、細菌学的特徴を直接的に表現するものではない。一方、全ゲノム情報は、文字どおりすべての情報を提示するものであり、単なる菌株のタグ付けにとどまるものではない。得られる情報量の多さ・網羅性から他の様々な学問領域との融合が誘引されるものと思われる（図4）。ゲノム疫学の実現により、上述の分子疫学の循環システムに示した流れが一気に構築できるかもしれない。さらに、これらの情報に、社会学的情報を加味した結核菌システム疫学の概念が、分子疫学先進地域であるヨーロッパの研究者たちにより提唱されている¹⁸⁾¹⁹⁾。結核菌分子疫学が徐々に成熟してきたわが国においても、これらの概念から学ぶべき点は多く、今後のますますの分子疫学研究の発展に胸の高まりを抑えがたい時代を迎えていると言える。

おわりに

結核菌分子疫学はシステムとしての成熟度を高めつつ、次の展開、すなわち、ゲノム疫学さらにはシステム疫学へと昇華しつつある。生物学と情報科学（コンピュータサイエンス）の融合は、今後ますます盛んとなり、結核感染様式の実態が明らかにされるものと期待される。結核対策遂行にあたっては、やがてはコンピュータシミュレーションを駆使する時代が到来するかもしれない。

文 献

- 1) Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, et al.: Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol.* 2006; 188: 759-72.
- 2) Schürch AC, Kremer K, Warren RM, et al.: Mutations in the

- regulatory network underlie the recent clonal expansion of a dominant subclone of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Infect Genet Evol.* 2011 ; 11 : 587–97.
- 3) Abadia E, Zhang J, dos Vultos T, et al.: Resolving lineage assignation on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method. *Infect Genet Evol.* 2010 ; 10 : 1066–74.
 - 4) Mestre O, Luo T, Dos Vultos T, et al.: Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair. *PLoS One.* 2011 ; 6 : e16020.
 - 5) Gagneux S, Small PM : Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis.* 2007 ; 7 : 328–37.
 - 6) Gagneux S, DeRiemer K, Van T, et al.: Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 ; 103 : 2869–73.
 - 7) Hershberg R, Lipatov M, Small PM, et al.: High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol.* 2008 ; 6 : e311.
 - 8) Comas I, Chakravarti J, Small PM, et al.: Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nat Genet.* 2010 ; 42 : 498–503.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) Wada T, Iwamoto T : Allelic diversity of variable number of tandem repeats provides phylogenetic clues regarding the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family. *Infect Genet Evol.* 2009 ; 9 : 921–6.
 - 12) 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 : 3805–9.
 - 13) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, et al.: Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. *J Clin Microbiol.* 2009 ; 47 : 3340–3.
 - 14) Comas I, Homolka S, Niemann S, et al.: Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One.* 2009 ; 4 : e7815.
 - 15) Ohkado A, Murase Y, Mori M, et al.: Transmission of specific genotype streptomycin resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in the Tokyo Metropolitan Area in Japan. *BMC Infect Dis.* 2009 ; 9 : 138.
 - 16) Niemann S, Koser CU, Gagneux S, et al.: Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints. *PLoS One.* 2009 ; 4 : e7407.
 - 17) MacLean D, Jones JD, Studholme DJ : Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Microbiol.* 2009 ; 7 : 287–96.
 - 18) Young D, Stark J, Kirschner D : Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. *Nat Rev Microbiol.* 2008 ; 6 : 520–8.
 - 19) Comas I, Gagneux S: The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathog.* 2009 ; 5 : e1000600.