

第84回総会ミニシンポジウム

II. 結核菌分子疫学の展望

座長 ¹松本 智成 ²岩本 朋忠

キーワード：結核菌，分子疫学，遺伝子型別，VNTR，RFLP，データベース

シンポジスト：

1. 結核菌の反復配列多型（VNTR）標準分析法の確立と型別情報データベースの構築
°前田伸司，村瀬良朗（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部結核菌情報科）
2. 他の細菌分子疫学解析からみた結核菌分子疫学解析
横山栄二（千葉県衛生研究所細菌研究部）
3. 結核菌分子疫学研究の将来展望（From local surveys to global surveillance）
岩本朋忠（神戸市環境保健研究所微生物部）
4. 分子疫学解析の臨床応用
松本智成（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部）

結核菌の分子疫学は，21世紀に入って大きな変革の時期を迎えた。その背景には，1998年にH37Rv株の全ゲノムが解読されたのを皮切りに，その後数年間で複数の結核菌株の全ゲノム情報が解明されたという科学的進歩がある。全ゲノム情報の解読が結核菌分子疫学にもたらした最大の恩恵の一つは，多型縦列反復領域，すなわち Variable numbers of tandem repeats (VNTR) の発見であろう。

1990年代の結核菌分子疫学は，Restriction fragment length polymorphism of insertion sequence 6110 (IS6110 RFLP) にはほぼ完全に依存していた。この方法は菌株識別能に優れた手法ではあるが，手技が煩雑で解析に時間と熟練を要する，施設内・施設間での再現性の低さという問題を抱えている。21世紀に入り，Polymerase chain reaction (PCR) を利用した VNTR 法が開発されると，その迅速性と再現性の高さから IS6110 RFLP に取って代わって急

速に普及し，今日の結核菌分子疫学解析の第一選択手法となっている。

VNTR 法の導入により結核菌遺伝子型別データベースの構築が加速化され，その動きは一地域内でのデータベース構築にとどまらず，近隣地域あるいは全国規模さらには世界規模でのデータベースの構築へと向かっている。世界中に蔓延している結核菌に対して全人類的包囲網を形成することで，より効率的・効果的な結核対策への手がかりを得ようとするものである。コンピュータネットワークを活用した新たな疫学，すなわち，in silico epidemiology と呼べるアプローチが技術的に可能となった。

また，最近の研究から VNTR はその解析対象を選別することで，結核菌の進化・系統発生的情報をも提供しうることが分かってきた。このことは，結核菌分子疫学が，結核感染のルートとその感染源を特定するだけではなく，菌側の遺伝系統的背景をも提示しうるものであり，そのデータ蓄積は，個々の遺伝系統がもつ病原体としての個性・性質の洞察を可能にするものと期待される。

大きな可能性を秘めた結核菌分子疫学ではあるが，VNTR 法によるデータが蓄積されるに伴い，いくつかの課題が浮き彫りとなってきた。各 VNTR 領域は独立に変化し，その可変の幅にも領域間で違いがある。したがって，利用者は，自らの目的に合致した VNTR 領域の組み合わせをカスタマイズする必要がある。一方で，データの互換性やデータベースの活用のためには，一定のルールに従った VNTR 領域の組み合わせの標準化が必要になる。カスタマイズ化と標準化の整合性は早急に解決すべき課題であるが，この点についても，すでに多くのデータが蓄積されつつあり，近近，解決されるもの

¹大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部，²神戸市環境保健研究所微生物部

連絡先：岩本朋忠，神戸市環境保健研究所微生物部，〒650-0046 兵庫県神戸市中央区港島中町4-6
(E-mail: tomotada_iwamoto@office.city.kobe.lg.jp)
(Received 30 Sep. 2009)

と期待している。

結核菌分子疫学を取り巻くこのような現状を踏まえて、本シンポジウムでは、今後の結核菌分子疫学の方向性を示すことを目的として4人のシンポジストにそれぞれの立場からの提言を頂いた。

前田伸司氏（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部結核菌情報科）からは、国内結核菌のVNTR分析標準法の確立とデータベース構築を目指した研究成果が報告された。JATA (12)-VNTR法の改良版として、JATA (15)-VNTRおよびJATA (15)+VNTR 4120分析システムが紹介され、精度の高いデータベース構築のためのアプローチとその意義についての話題が提供された。横山

栄二氏（千葉県衛生研究所細菌研究部）には、分子疫学的解析において先駆的な取り組みがなされてきた腸管出血性大腸菌 O157の現状を紹介していただき、結核菌分子疫学の今後について検討していただいた。岩本朋忠氏（神戸市環境保健研究所微生物部）は、解析手法の発展・多様化を背景にして、多方面に展開している結核菌分子疫学研究の将来展望を、結核菌北京型株の研究成果を例に提言された。松本智成氏（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部）からは、VNTR法の登場により、結核菌分子疫学解析の診断などへの臨床応用が可能になったことを、実際の症例に基づき解説いただいた。

1. 結核菌の反復配列多型 (VNTR) 標準分析法の確立と型別情報データベースの構築

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部結核菌情報科 前田 伸司, 村瀬 良朗

はじめに

全国から集めた325株の結核菌について、35カ所の反復配列多型 (VNTR) 分析を行い、4カ所のハイパーバリアブル (HV) のローサイ¹⁾を除き、*h*値を使って型別能の高い上位12カ所を分析するというJATA (12)-VNTR分析システムを構築し既に報告した²⁾³⁾。このVNTRシステムは、国内結核菌株分析標準法として地域内で発生した全数型別分析調査に利用できるものと考えていた。しかし、樹立したJATA (12)-VNTRを用いて地域内で分離された菌株の型別を行い、クラスター形成率でIS6110制限断片長多型 (RFLP) 分析結果と比較すると、型別能力はJATA (12)-VNTRのほうが劣っていることが判明した。そこで、RFLP分析に代わる型別方法として利用できるVNTRシステムの構築を目指し、JATA (12)-VNTRの改良を行った。また、病原性の高い結核菌や多剤耐性結核菌の存在を事前に察知するために、型別情報の共有化に関する研究も進めている。

JATA (12)-VNTR分析の地域分子疫学調査への応用

JATA (12)-VNTR分析で東京都内から分離された146株の結核菌の型別を行った。クラスター形成率を比較すると、IS6110 RFLP分析では34.7%だったのに対して、JATA (12)-VNTRでは45.9%となり、10%以上もクラスター形成率が高かった。しかし、JATA (12)は、ヨーロッパを中心に採用されている15カ所調べるSupply (15)-VNTR⁴⁾の48.3%よりクラスター形成率が低く、型別能力は高いことが確認できた。

地域内で発生した結核菌の分子疫学調査に現在のJATA (12)-VNTR分析システムを導入した場合、クラスター形成率がIS6110 RFLP法より高いことから、本来無関係な株同士が同じプロファイル、つまり同一株と判定される可能性が高くなり、混乱する可能性がある。そのため、ローサイを追加するなどして、識別能を高める必要がある。

JATA (12)-VNTRシステムの改良

JATA (12)-VNTR分析の識別能を上げるためには、13番目以降の選択されなかったローサイを追加するのがよいと考えられる。例えば、4カ所 (VNTR-2401, ETR-A, MIRU 40およびMIRU 39) 加えて16カ所として、クラスター形成率を算出すると42.5%となった。このクラスター形成率は、RFLP分析での34.7%より高く型別能は低かった。そのため、VNTR分析の識別能をRFLPのものに近づけるためには、JATA (12) システム構築の際に除いたHVのローサイを追加する必要がある。

種々の組み合わせについて検討し、最終的にETR-A, QUB-18 (VNTR-1982)⁵⁾, QUB-11a (VNTR-2163a) の3カ所を加えるとよいことがわかった。東京都内で分離した結核菌を使ってローカスの追加によるクラスター形成率の変化を調べると、3カ所の追加、つまりJATA (15)-VNTRではクラスター形成率は36.3%となり、RFLP分析のクラスター形成率34.7%よりは若干高めではあるがほぼ同程度となった。さらに、このJATA (15)にHVのローサイからもう1カ所追加することにより、RFLP分析よりも型別能を高くすることも可能だった。

次に、東京都以外で分離された株について、すなわち

神戸市環境保健研究所の岩本先生、大阪市立環境科学研究所の和田先生にご協力いただき、それぞれの都市および沖縄県から分離された株を使って同様な検討を行った。図は、RFLP分析でのクラスター率を1とした割合で、それぞれのVNTR分析でのクラスター形成率を表した。神戸市の分析例では、IS6110 RFLP分析でのクラスター率を基準としてJATA (12)-VNTRでは1.5倍のクラスター形成率、JATA (15)では1.1倍、JATA (15) + VNTR-4120で0.9となった。この傾向は、東京都、沖縄県、大阪市でもほぼ同様だった (Fig.)。いくつかの異なる地域で分離された結核菌 (合計751株) を分析して得られた結果なので、この傾向は他の都市でも同様と考えられる。

VNTR分析システムの選択の基準

いくつかのVNTR分析システムの選択の基準をまとめた (Table)。JATA (12)-VNTRは、サーマルサイクラーと電気泳動装置があればどの施設でも分析可能という基準で開発したシステムで、集団感染か否かの判定に利用できる。一方、クラスター形成率の関係で地域分子疫学調査には最適ではない。このJATA (12)を国内結核菌株分析のコアのローカスの組み合わせとして利用し、必要に応じてローカスの追加を行い、型別能を確保するのが、精度の高いデータベース構築のために必要なことだと考えられる。3カ所のローサイを追加して型別能の向上をはかったJATA (15)-VNTRは、特別な装置なしでもIS6110 RFLP分析の型別能に近い識別能をもった本研究で新規に構築した分析システムである。JATA (15) + VNTR-4120の分析システムは、RFLP分析より型別能が高いが、HVを2カ所含むため、得られるPCR産物の分子量が大きくアガロースゲルでの分析はできない。そのため、シーケンサーを用いたフラグメント解析かキャピラリー電気泳動装置が分析には必要となる。また、型別能が高すぎるため異なる施設間でのデータ共有は困難であると考えられる。

ま と め

国内結核菌のVNTR分析標準法とデータベース構築に関してまとめると、①日本国内の結核菌型別に有用な

JATA (15)-VNTRおよびJATA (15) + VNTR-4120分析システムを新たに構築した、②分析法により型別能力が異なることから、それぞれの施設における設備や目的に応じて分析方法を選択する必要がある、③他施設とのデータ共有のためにはJATA (12)-VNTR (VNTR分析システムのコアのローサイとして) が適切だと考えられる。

今後、これらの分析システムを利用した結核菌の型別法が全国に普及し、型別結果の共有化ができれば、感染性の高い結核菌や治療が困難な結核菌を初期に把握することが可能となる。また、このような精度の高いデータベースが完成すれば、病原性の高い結核菌の感染拡大を防ぐための対策に貢献することができる。

文 献

- 1) 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.
- 2) 前田伸司, 村瀬良朗: 反復配列多型を利用した結核菌

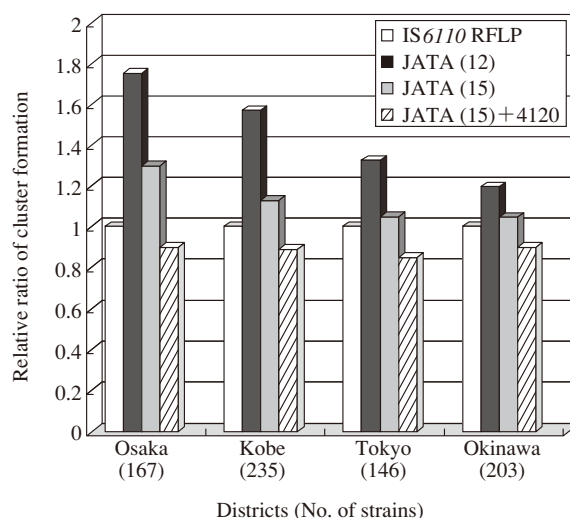


Fig. Comparison of the relative ratio of cluster formation rate by the JATA-VNTR systems in each district. The relative ratio was expressed as a standard at cluster formation rate of the IS6110 RFLP analysis.

Table The criteria for selection of the VNTR analysis systems

	Analytical instrument		Purposes of VNTR analysis		
	Agarose gel electrophoresis	DNA sequencer or Capillary electrophoresis	Confirmation of epidemiological link	Population based-analyses of TB genotyping	Databases of TB genotyping
JATA (12)	○	○	○	△	○
JATA (15) [JATA (12)+3 loci]	△	○	○	△	△
JATA (15) + VNTR-4120	×	○	○	○	×

の迅速遺伝子型別法の標準化, 第82回総会シンポジウム「抗酸菌研究の最前線」. 結核. 2007; 82: 784-786.

- 3) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他: 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム—JATA (12)-VNTR分析法の実際—. 結核. 2008; 83: 673-678.
- 4) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for standard-

ization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006; 44: 4498-4510.

- 5) Zhang L, Chen J, Shen X, et al.: Highly polymorphic variable-number tandem repeats loci for differentiating Beijing genotype strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai, China. FEMS Microbiol Lett. 2008; 282: 22-31.

2. 他の細菌分子疫学解析からみた結核菌分子疫学解析

千葉県衛生研究所細菌研究部 横山 栄二

はじめに

Levinら¹⁾は分子疫学のゴールを, 感染症の病原体を同定し, その感染源および感染ルートを明らかにすることであるとしている。これまでわが国における病原細菌の分子疫学解析は, まさに Levinらの言うところのゴールを目指して行われてきている。特に汚染食品の広域流通による diffuse outbreakが発生する腸管病原系細菌では, outbreakの発生を早期に把握することでその拡大を防止することを目的として, 広域で連携した分子疫学解析がすでに10年以上にわたって行われている²⁾³⁾。

一方, 結核菌の分子疫学的解析は腸管病原系細菌に比べて立ち遅れており, variable-number tandem repeat typing (VNTR) の登場によってようやく広域連携が模索されるようになってきた。今後, 腸管病原系細菌と同様の方向性で分子疫学的解析が進展すると思われるが, 結核と腸管病原系細菌では感染様式が異なることから, 分子疫学的解析の必要性も異なってくることが想定される。そこで, わが国で分子疫学解析の頻度が高い腸管病原系細菌である腸管出血性大腸菌 O157 (O157) の分子疫学的解析の現状を検証することで, 結核菌の分子疫学的解析の今後の方向性を検討した。

腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析の現状

O157の分子疫学的解析法として, 現在では全国の地方衛生研究所でパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) を行うことが可能となっている³⁾。しかし PFGEによる解析では, 疫学的に全く無関係な感染者から分離された O157 菌株が同一のパターンを示すことがあり, より型別能力が高い方法が検討されていた。そこで用いられたのが, 病原細菌の分子疫学的解析で近年多用されている VNTRである。千葉県でも, PFGEに加えて VNTRを行うことで, より早い時期に diffuse outbreakを把握できる監視体制を採っている⁴⁾。しかし, outbreakの発生監視をいくら分子疫学で行っても, 被害拡大の防止は行える

が outbreakの発生そのものを防止することはできない。そのため, 毎年一定数以上の O157感染者が全国的に発生している⁵⁾。

根本的な感染防止対策を講じるためには病原体の特質を解明する必要があるが, そのためには現在分布している病原体がどのような分化状態にあるかを把握する必要がある。病原体の分化状況の把握は, outbreakの特定と同様に分子疫学的解析によって可能であるが, ある程度保存性の高い領域を対象とした解析が必要である。

近年, O157のゲノム中に存在する IS629の挿入状況を調べることで分子疫学的解析を行う IS-printingが開発された。IS-printingの型別能力は PFGEより低く, outbreak特定を目的とした場合には他の分子疫学的解析法との併用が必要である⁶⁾。一方で IS629の挿入状況は O157の分化状況を示しており⁷⁾, 系統学的解析を行うことでわが国に分布する O157の分化状況が把握できる可能性がある。

そこで, 千葉県内でヒトから分離された O157を IS-printingで解析し, そのデータを基に minimum spanning tree (MST) を作成した。MST上で VT1&2 産生株は一つの大きな complexを形成した (Fig. 1) のに対し, VT2 産生株は複数の complexを形成した (Fig. 2)。この結果は VT1&2 産生株と VT2 産生株の分化状況に差があることを示している。このような O157の分化状況の違いは, VNTRデータに基づく系統解析でも確認された。

O157は ancestorである EPEC O55から分化したと推定されている⁸⁾が, 現在分布している菌株の分化状況に差があることはこれまでに明らかとなっていなかった。今後, 分化状況に違いのあった菌株を whole genomeレベルで解析することで, 現在分布している O157の特質を把握することが可能になると思われる。

しかし, O157の分子疫学的解析のために現在行っている PFGEではこのようなデータを得ることができない。VT1&2 産生株の MST上で最大の nodeに属する菌株を PFGEで解析した場合, 類似度が90%に満たない菌

株が出現し (Fig. 3), 同一遺伝子型とは判断できない。従って, O157の分子疫学的解析として汎用されている型別能力の高い方法は, outbreak 特定を目的とした分子疫学的解析には有効であるが, 病原体の分化状況という重要な情報を見落とす危険性があることを念頭に置く必要がある。

結核菌の分子疫学的解析の今後の展望

結核菌の分子疫学的解析においても, outbreak 特定は重要な目的である。なぜなら, outbreak の発生監視は, 住民に近い立場である自治体としては非常に重要な感染症対策であり, 今後も引き続き行う必要があるためである。しかし, 腸管病原系細菌では汚染食品の広域流通によって感染者が全国的に発生する可能性がある²⁾³⁾のに対し, 結核は患者との接触がなければ感染しない。従って, 結核菌の分子疫学的解析において, 腸管病原系細菌のように outbreak の特定を全国規模で行う必要があるかどうかについては考慮する余地がある。

千葉県で分離された結核菌を VNTR で解析した場合, 東京都市圏地域においては疫学的関連性が不明なクラスターの出現頻度が高かったことから, 東京都市圏に属する他の自治体との間で連携した outbreak の特定が必要と判断された。一方, それ以外の地域では高齢化が進展しており⁹⁾, 高齢者の再燃対策に重点を置く必要があると判断された。このように, 結核の発生状況は一つの自治体内でも地域差があり, 単純に VNTR を用いて全国規模で outbreak 特定のための分子疫学的解析を行っても, 結核対策にあまり寄与しないことが考えられる。

結核では, これまでに腸管病原系細菌のような特定ク

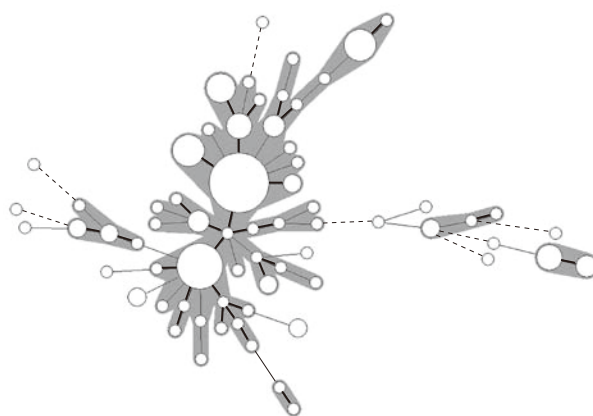


Fig. 1 Minimum spanning tree of EHEC O157 (VT1 & 2) based on the data of IS-printing

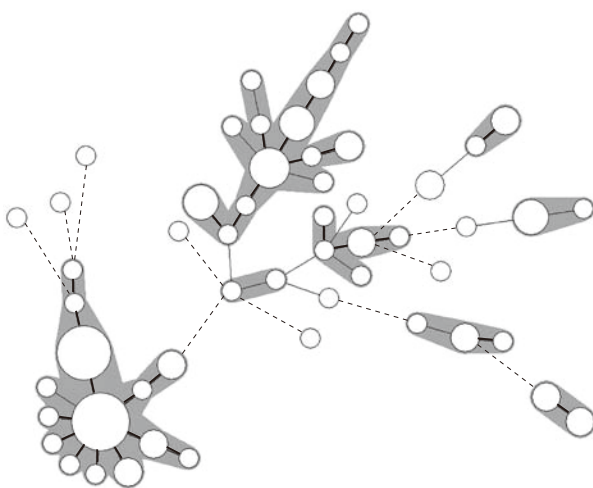


Fig. 2 Minimum spanning tree of EHEC O157 (VT2) based on the data of IS-printing

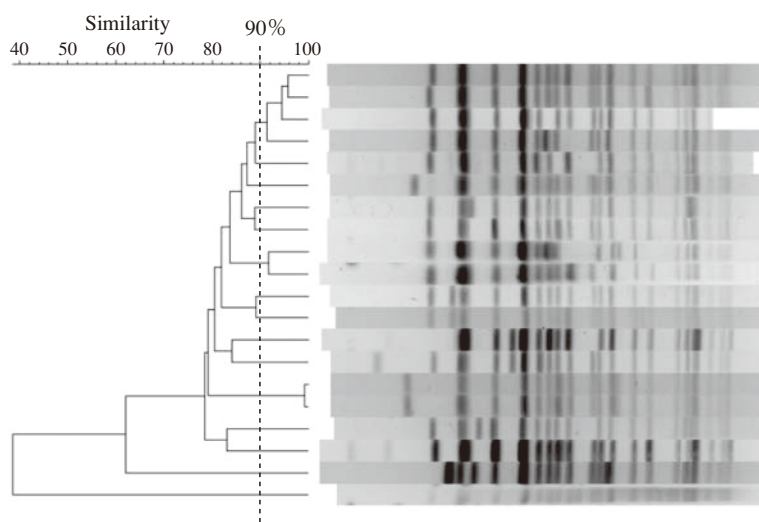


Fig. 3 PFGE patterns of EHEC O157 (VT1 & VT2) strains belonging to the largest node of minimum spanning tree showed in Fig. 1

ローンによる全国的な outbreak 発生はあまり確認されていない。結核菌の特定クローンの蔓延がこれまで確認されていない理由として、各地に分布している結核菌の全国的な比較が行われていないために把握されていないことも考えられるが、現状では近隣自治体間での outbreak 特定の優先順位が高いと思われる。

その一方で、系統学的解析でわが国に分布する結核菌の特質を把握することは、結核の根本的対策につながる可能性がある。そのためには、先の O157 の分子疫学的解析の検証で明らかになったように、結核菌の分化状況を把握する必要がある。近年、結核菌の VNTR データに基づいて系統学的解析を行うことによって、結核菌の分化状況が把握できることが報告されている。このような場合には、ある程度保存性の高い VNTR 領域を用いて解析する必要がある。しかし、これまで行われてきた結核の outbreak 特定を目的とした分子疫学的解析では、非常に高い型別能力が求められる。千葉県では、RFLP 解析との比較により、23 領域を解析対象とした VNTR を行っている¹⁰⁾。そのため、outbreak の特定と系統学的解析を両立させることを目的とすると、VNTR に用いる領域の選択に苦慮することになる。

ここで考慮すべきなのは、分子疫学的解析で必要とされる実施規模である。先のとおり、outbreak 特定は近隣自治体間での必要性が高いのに対し、系統学的解析には全国規模でのデータ集積が必要となる。そこで、VNTR が解析対象として用いる領域の組み合わせで型別能力が変わることを上手く利用して、分子疫学的解析の目的によって解析対象とする領域を決定すればよい。すなわち、ある程度保存性の高い共通領域を用いて全国規模で系統学的解析のためのデータ集積を行うとともに、その領域に多様性の高い領域を加えて近隣の自治体間で outbreak 特定を行う、といったことである。

結核菌の分子疫学的解析で outbreak の特定と系統学的解析を両立させるためには、自治体は分子疫学解析の両面への対応を求められることになる。しかし現時点では、系統学的解析のデータ集積を目的としている JATA12 に対応可能な自治体すら少ない状況であり、ましてや outbreak 特定を目的とした分子疫学的解析を行える自治体は全国でも数えるほどである。自治体のレベルアップが結核菌の分子疫学的解析の今後の重要な課題と思われる。

ま と め

結核菌の分子疫学的解析は、outbreak 特定と系統学的解析の両面で進展する必要がある。そのためには VNTR の解析対象とする領域を上手く組み合わせることが重要である。結核菌の分子疫学的解析の進展には自治体のレベルアップが必須であり、そのための技術的支援をいかに行うかを検討しなければならない。

文 献

- 1) Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S: Population biology, evolution, and infectious disease: Convergence and synthesis. Science. 1999; 283: 806–809.
- 2) Greener-Smith P, Hise K, Hunter S, et al.: PulseNet USA: A five year update. Foodborne Path Dis. 2006; 3: 9–19.
- 3) 渡辺治雄, 寺嶋 淳, 泉谷秀昌, 他: 分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制; パルスネットの構築. 感染症誌. 2002; 76: 842–848.
- 4) Yokoyama E, Uchimura M: Variable number of tandem repeats and pulsed-field gel electrophoresis cluster analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serovar O157 strains. J Food Prot. 2007; 2583–2588
- 5) 国立感染症研究所: 腸管出血性大腸菌感染症 2009 年 4 月現在. 病原微生物検出情報. 2009; 30: 119–121.
- 6) 堀川和美, 尾崎延芳, 村瀬浩太郎, 他: IS-printing system の分子疫学的解析法としての有用性について. 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究. 新興・再興感染症研究事業平成 20 年度総括・分担報告書. 167–177.
- 7) 大岡唯祐, 小椋義俊, 林 哲也: 大腸菌 O157 のゲノム研究とその応用. JARMAM. 2005; 16: 179–181.
- 8) Monday SR, Whittam TS, Feng PC: Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of β -glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157: H7. J Infect Dis. 2110; 184: 918–921.
- 9) 横山栄二: 低まん延地域の結核対策における分子疫学的解析. 第 83 回総会シンポジウム「分子疫学研究の進歩と対策への応用」. 結核. 2009; 84: 57–59.
- 10) Yokoyama E, Kishida K, Uchimura M, et al.: Improved differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains, including many Beijing genotype strains, using a new combination of variable number of tandem repeats loci. Infect Genet Evo. 2007; 7: 499–508.

3. 結核菌分子疫学研究の将来展望 (From local surveys to global surveillance)

神戸市環境保健研究所微生物部 岩本 朋忠

はじめに

結核菌分子疫学研究は大別すると、①遺伝子型別解析手法の開発・評価、②遺伝系統別の地理的分布・地域に蔓延する結核菌の遺伝的多様性の解明、そして、③特定の菌株による感染連鎖の特定（集団感染の特定など）に分類できる。これまでの研究から、地球規模でみると結核菌には複数の遺伝系統群が存在しており、その分布に地域特性や人種別特性が認められること¹⁾、東アジア地域では北京型株という遺伝系統が高蔓延しており、近年、この遺伝系統が世界的に感染拡大傾向にあること、W株と呼ばれる菌株での大規模な集団感染事例がニューヨーク州を中心に1990年代に起こったこと²⁾、また、最近ではわが国においてもM株と呼ばれるstreptomycin (SM) 耐性の結核菌株が広範囲に伝播していることなどが明らかになった。

解析手法の発展・多様化に伴い、分子疫学研究は多面的なアプローチ、すなわち、特定の菌株の感染連鎖を追跡するミクロなアプローチ（micro-epidemiological study）から各地域あるいはグローバルレベルで分布している結核菌の分化状態・遺伝系統を特定し、病原体としての個性・性質を宿主への定着という観点から解明するというマクロなアプローチ（macro-epidemiological study）までをカバーする多角的な視野に立った研究へと展開している。ここでは、結核菌遺伝子型別手法を概説し、結核菌北京型株に関する最新の知見を紹介するとともに、今後の結核菌分子疫学研究の方向性について述べる。

結核菌分子疫学解析で利用される 遺伝子型別解析法

（1）結核菌の分化状態（divergence）と遺伝系統（phylogeny）の解析

① Large sequence polymorphisms (LSPs)：ゲノム領域の大規模な欠失をPCRにより検出する。Region of difference (RD) として、系統発生的情報を提示しうる領域が結核菌において多数報告されている³⁾。RDの出現は、unique event polymorphisms (UEP)、すなわち進化の途上で1度限り認められるイベントであることから、各遺伝系統別への分岐を示す遺伝子マーカーとして有用である。

②一塩基多型 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs)：スニップ (ス) と呼ぶ。一塩基の置換 (点突然変異) によ

って生じた多型である。各遺伝系統への分岐時（あるいは分化後）にランダムに発生した複数の一塩基変異を検出することで、遺伝系統を特定する。結核菌ではこれまでに多くのSNPsが特定されており系統解析に活用されている⁴⁾。一塩基多型を検出する手法は、リアルタイムPCRやシーケンサーを用いた方法など数多く報告されている。

③特定領域への挿入配列 (Insertion sequence, IS) の存在：結核菌北京型株ではNTF領域へのIS6110の挿入により、祖先型 (IS6110をもたない) と新興型 (IS6110を有する) に分類される⁵⁾。

④スパーサーオリゴタイピング (Spoligotyping)：ダイレクトリピート (DR) に挟まれた1～43のスパーサー配列の有無により菌株をタイピングする方法である。世界規模での結核菌分離株のデータが蓄積されており、spoligotypingのパターンにより、主要な分岐群 (clade) を特定できる。元々、感染連鎖検出のための遺伝子型別法として開発されたが、わが国のような北京型株が高蔓延している地域ではその遺伝子型別能力は低く、菌株レベルでの遺伝子型別解析には利用できない。

（2）感染連鎖検出のための手法

① RFLP (IS6110 Restriction fragment length polymorphism)：ゲノム上にランダムに挿入された挿入配列 (IS) 6110をサザンハイブリダイゼーション法で検出する。検出されたバンドの本数はゲノム上に存在したIS6110の数を、バンドの分子量はゲノム上でのIS6110の存在位置を反映したもので、IS6110の数と位置という情報に基づいて菌株の遺伝子型別を鑑別する。菌株のタイピング能力に優れた手法であるが、分析には、多量のDNA (約1 μg以上) が必要であり、また、操作が煩雑で時間がかかるという欠点がある。

②反復配列多型解析 (Variable numbers of tandem repeats, VNTR)：ゲノム上に存在する数十bpの塩基配列をユニットとした繰り返し配列のコピー数を調べることでによりタイピングする。PCRを利用した解析法のため、少量の粗抽出DNAで解析できる。これまでに、多数のVNTR領域が報告されており、その選択・組み合わせにより菌株タイピング能力が異なる⁶⁾。解析結果がデジタル表示できるため広域データベースの構築に有利な手法である。

結核菌北京型株の内部系統分岐

Soolingen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⁷⁾。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。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おり、中でも、近年、バルト海諸国や旧ソ連諸国での結核蔓延、特に多剤耐性結核の蔓延に大きく影響している。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)。

北京型株内での遺伝系統分岐に関する研究には、LSP (RD105, RD207, RD181, RD150, RD142) を用いた Tsolakiら³⁾の報告をはじめ、SNPs, DNA修復関連遺伝子の変異, IS6110の挿入など、多くの報告がある。これらの遺伝子マーカーを包括的に用いて、国内で分離された北京型結核菌の内部系統分岐について調べたところ⁸⁾、わが国の北京型結核菌は複数の遺伝系統群に派生しており、それぞれが変異を蓄積しながら定着したものであることが分かった (Fig.)。興味深いことに、諸外国ではNTF領域にIS6110の挿入を認める新興型 (modern type) の分離比率が高いのに対して、わが国では、逆に、祖先型の分離比率が高く、その特異性が際立っていることが解明された (Table)。このような分子進化系統が残存した結核菌集団構造は、これまでに報告例のないものであり、海外の状況とは非依存的に形成されたものであると推察される。今後、なぜ、わが国特有の遺伝系統が定着しているのかを解明してゆくことで、新たな結核対策への手がかりが得られるものと考えられる。

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

遺伝系統別にみた北京型結核菌の疫学的特徴

母集団中に存在する北京型結核菌遺伝系統群の種類と、それぞれの出現頻度により対象とする母集団での結核菌集団構造を表現し、各母集団間の集団構造を比較し各遺伝系統の疫学的特性を推察した。

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) の北京型結核菌集団構造を比較したところ、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。

誕生年コホート別の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した¹⁰⁾。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¹¹⁾。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いうことができる。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、高齢者層と若年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。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。

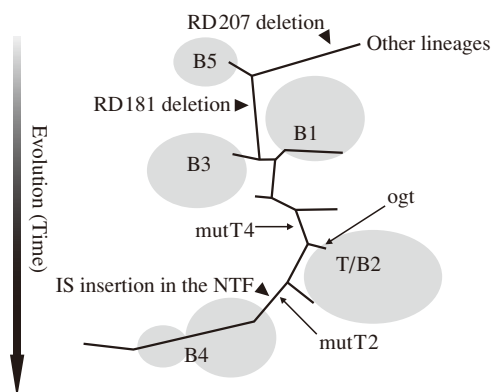


Fig. Phylogenetic tree of Beijing genotype *M. tuberculosis* strains based on SNPs specific to the lineage. Arrowheads show putative times at which the corresponding genetic events occurred.

今後の結核菌分子疫学研究

結核菌北京型株に対する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。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。これまでの分子疫学研究に活用されてきた遺伝子型別解析手法は、いずれも、ゲノム上の部分的な領域を遺伝子マーカーとする、gene-based typing (geno-typing) であり、ゲノムワイドな情報を提供できるものではない。Geno-typing based molecular epidemiology から全ゲノムを対象とした Genome-typing based molecular epidemiology に発展することで、結核菌研究はさらなる飛躍を遂げるものと思われる。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み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。

ま と め

過去10年余りにわたる結核菌分子疫学研究の成果は、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いる。これらスピノフした様々な研究領域がさらなる発展を遂げ、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。

文 献

- 1) Gagneux S, DeRiemer K, Van T, et al.: Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2006 ; 103 : 2869–2873.
- 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) Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, et al.: Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2005 ; 43 : 3185–3191.
- 4) 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 : 759–772.
- 5) Mokrousov I, Jiao WW, Valcheva V, et al.: Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. J Clin Microbiol. 2006 ; 44 : 2851–2856.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 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) 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 : 3340–3343.
- 11) 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.

4. 分子疫学解析の臨床応用

大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部 松本 智成

結核診療において結核菌の増殖速度が遅いことがその妨げとなっているのは周知の事実である。何かしら人為的に増殖速度を増加させることは、今後改善すべき問題であるがその解決には今後さらなる検討と時間を要すると予想される。分子疫学解析の臨床応用においても結核菌の増殖の遅さが問題となっており、1990年代には Insertion sequence 6110 restriction fragment length polymorphism (IS6110 RFLP) が結核菌分子疫学解析に応用されたが、IS6110 RFLPが中心であった時代は、結核菌の増殖の遅さゆえに臨床応用を行うことが難しかった。その増殖の遅さを克服するために Polymerase chain reaction (PCR) が結核診断に応用されている。同様に結核菌分子疫学解析の分野においても PCR が利用され、特に2000年に入り PCR を用いた Variable numbers of tandem repeats (VNTR) の登場により、その迅速さならびに再現性の高さにより分子疫学解析に広く使用されるようになった。

VNTRを中心とした PCR を利用した結核菌分子疫学解析を利用することにより今まで疫学解析が中心であった結核菌分子疫学解析も診断等へ臨床応用することが可能になってきた。その実例を示す。

〔症例1〕喀痰からの直接 VNTR タイピングの実例を示す。患者は16歳の男児。父、母、叔母が当院にて結核加療歴があった。父、母が液体感受性試験にて streptomycin 耐性、isoniazid (INH) 判定保留域の結核に感染したということが判明していた。男児は保健所にて定期的に検診を受けていたが、2003年両肺尖に浸潤影が出現したので、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターに紹介になった。問題となったのは、少年の結核が両親と同じ菌によって発症し INH 耐性であるのかどうかであった。当初、喀痰塗抹陰性が続く、喀痰結核菌 PCR も陰性であったが、胃液検体の抗酸菌塗抹 (1+)、結核菌 PCR が陽性となった。翌日胃液検体から直接 VNTR 解析の結果が判明した。その結果、VNTR パターンは父親、母親由来の結核菌株と一致し家族内感染が明らかとなった。約1月後、少年からの結核菌の液体感受性試験の結果が判明、父親、母親と同様の感受性パターンであること、ならびに IS6110 RFLP パターンにて両親と同じパターンであることが確認できた。

〔症例2〕患者は68歳男性。基礎疾患に肺気腫あり。全剤感受性の結核にて大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターにて isoniazid, rifampin, ethambutol, pyrazinamide の4剤標準化学療法を開始。6カ月にて加療は終了した。しかしながら結核加療終了3カ月後の外来時に発熱出現。左下葉に浸潤影の増強が認められ、しかも喀痰抗酸菌塗抹が陽性であった。この患者は初回標準加療時多剤耐性結核患者と瀕回に接触していたので、内因性再燃よりも多剤耐性結核の外來性再感染が疑われた。初回加療開始前の結核菌株の VNTR 結果と今回採取の直接喀痰 VNTR 結果を比較すると全く同一であったことが翌日には判明したので全剤感受性結核菌株の内因性再燃と考え、通常の結核病棟にて再度標準化学療法を開始した。約1カ月後培養検査にて全剤感受性結核菌株であることが確認できた。

上述のように、結核菌排菌患者と接触歴のある患者が、発病し排菌した時に喀痰から直接 VNTR 解析を行うことにより接触歴と関連性があるか否かが数日で判断でき、特に multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) 排菌患者や extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB) 排菌患者と接触歴のある場合に、もともと感染していた結核菌が発病したのか、問題となる接触歴のある MDR-/XDR-TB が感染発病したか否かの判断に有用である。MDR-/XDR-TB 感染による発病が判明し迅速に対応することにより、さらなる感染拡大を防ぐことができる。

同様に、順調に治療が行われ、いったん結核菌排菌陰性化した患者が再排菌した時に治療開始時の結核菌が再排菌した場合、治療が失敗したのか、MDR-/XDR-TB の外來性再感染発病が起こったのか、はたまた検査室のコンタミネーションにより擬陽性であったのかの判断が迅速にでき、不必要な入院延長が回避でき、医療費削減にも役立てることができる。

VNTRの結果は数値データなので、容易に VNTR データベースを構築することができ、直接結核菌 PCR もしくは培養陽性検体を解析することにより多剤耐性結核 VNTR パターンの出現をリアルタイムで監視することができるので、迅速な公衆衛生学的な対応がとれる。

The 84th Annual Meeting Mini-Symposium

ADVANCES IN MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS OPEN THE DOOR TO THE NEXT STAGE

Chairpersons: ¹Tomoshige MATSUMOTO and ²Tomotada IWAMOTO

Abstract Before the availability of high-resolution genotyping tools in 1990s, there was a prevailing dogma of little genomic sequence diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. Due to the low levels of genetic variation, it was assumed that *M. tuberculosis* exhibit very little phenotypic variation in immunologic and virulence factors. The fingerprinting method based on restriction fragment length polymorphisms (RFLP) of IS6110 insertion sequences had unveiled the underestimation of the sequence variation in *M. tuberculosis* and the importance of strain-to-strain variation for understanding pathogenesis, immune mechanisms, bacterial evolution, and host adaptation. This method became a gold standard for strain differentiation in the molecular epidemiological study. It had lead to a profusion of studies in molecular epidemiology such as the detection of unsuspected transmission, the estimation of the extent of recent transmission, the identification of laboratory cross-contamination, the identification of outbreaks, and distinction between reinfection and relapse. This, in 1990s, is the opening of the molecular epidemiology of tuberculosis.

After the completion of genome project of the *M. tuberculosis* laboratory strain H37Rv, some of the clinical isolates were completely sequenced. This prompted the in silico genome comparison and identified various genomic markers which can give a unifying framework for both epidemiology and evolutionary analysis of *M. tuberculosis* population. Of them, variable numbers of tandem repeats (VNTR) was found as the most promising PCR-based method which can provide adequate discrimination of *M. tuberculosis* strains in many cases, including the estimation of *M. tuberculosis* transmission and the identification of genetic lineages. PCR-based VNTR analysis is easy, rapid, and highly specific and can generate portable digit-based data, unlike the analog information obtained from IS6110 RFLP which is labor intensive. In this regards, investigators can easily compare the genotypic data of independent studies between different laboratories. With the advantages, VNTR surpassed IS6110 RFLP and became the first line genotyping method in molecular epidemiology. One of the most attractive potentials on this method is its applicability for establishment of the database of *M. tuberculosis* genotype which covers not only local area but also world wide scale. This would open the door to "in silico epidemiology" which brings a breakthrough on the current TB control program. The optimization and standardization of the combination of VNTR loci for strain genotyping is the only but hard issue for the development of global database system. Road to the global Mtb genotype database is hard, but we believe, "Yes, We Can!". Another attractive potential of

VNTR is its use for phylogenetic analysis, although more intensive research on this with using comprehensive marker sets, such as large sequence polymorphisms and single-nucleotide polymorphisms are required.

Again, with the advantages of VNTR analysis, i.e., easy, rapid, specific, and digit-based data, VNTR became the first line method in molecular epidemiology. Molecular epidemiology of tuberculosis is expanding its research field from the investigation of TB transmission to more basic science such as evolution and phylogeographic distribution.

In this symposium, we have invited four opinion leaders in molecular epidemiology of TB in Japan who are talking about each title as followed.

1. Establishment of the standard VNTR analysis systems for Tuberculosis (TB) and preparation of databases for TB genotyping: Shinji MAEDA and Yoshiro MURASE (Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, JATA)

We have already reported the JATA (12)-VNTR system for TB genotyping in Japan. However, by comparison of cluster formation rate, the discrimination power of JATA (12)-VNTR was lower than that of IS6110 RFLP analysis. Therefore, we improved the JATA (12)-VNTR system for developing discrimination power. By addition of 3 loci (ETR-A, VNTR-1982 and VNTR-2163 a) to JATA (12)-VNTR, we established new JATA (15)-VNTR. We found that the discrimination power of JATA (15)-VNTR was almost the same as that of RFLP analysis.

2. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* reviewed by molecular epidemiology of other pathogenic bacteria: Eiji YOKOYAMA (Division of Bacteriology, Chiba Prefectural Institute of Public Health)

Molecular epidemiology of *M. tuberculosis* should be progressed to two goals. First is the short-term goal that intends to elucidate the unapparent route of transmission of the organism. Second is the long-term goal that intends to ascertain the phylogeny of the organism. The combination of VNTR loci should be changed according to the goals of molecular epidemiology of the organism.

3. Progress of the research in molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*: Tomotada IWAMOTO (Department of Microbiology, Kobe Institute of Health)

In the past decade, molecular epidemiology of tuberculosis brought significant insights into the transmission of tuberculo-

sis, genetic diversity of *M. tuberculosis*, population structure and geographical distribution of *M. tuberculosis*, etc. In the advanced stage of the molecular epidemiological study, we expect to change the current geno-typing based molecular epidemiology to whole genome-typing based molecular epidemiology on the basis of the rapid innovation of next-generation sequencing technology.

4. Clinical application of molecular epidemiology of tuberculosis: Tomoshige MATSUMOTO (Department of Clinical Research and Development, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases)

The molecular epidemiology can be applied in clinical practice. We showed some examples about usefulness of the clinical application of molecular epidemiology, especially using variable number of tandem repeats (VNTR) analysis. One example we showed: using VNTR, we can know whether two tuberculosis bacilli which developed from the patients, who have close contact, are the same or not in a few days; Especially, when one patient suffers from multidrug-resistant (MDR) strain of or extensively drug resistant (XDR) of

tuberculosis, we can easily know whether the other suffers from MDR/XDR tuberculosis or not. The other example we showed: we can know relapse, reinfection, or laboratory contamination by using VNTR in a few days when a patient shows bacteriological relapse during the treatment. By introducing VNTR to clinical practice, we can diminish days of inappropriate hospitalization. Because VNTR data are numerical, we can easily construct VNTR database, compare data, and survey emergence of MDR/XDR-tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Molecular epidemiology, Genotyping, VNTR, RFLP, Database

¹Osaka Prefectural Hospital Organization Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, ²Kobe 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)