

第83回総会招請講演

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

Dick van SOOLINGEN and Kristin KREMER

キーワード：分子疫学，北京遺伝子型，多剤耐性結核，サーベイランス

オランダおよびヨーロッパの結核

世界的に見て結核の罹患率はプラトーに達したように見えるが、患者の絶対数は急激に上昇しており、主としてこの10年間人口が未だに非常な速さで増大しているからである(図1)。オランダの状況はどうか。他の西側の欧州の諸国と同じように、結核はこの数年間は低下しており、その低下はかなり早く、年間10~15%程度になる。そしてオランダでは結核の根絶のための計画を目下策定中である。同時に非結核性抗酸菌の分離件数が急激に上昇しているが、この非結核性抗酸菌の分離にかかる臨床的な意義は一般的に過小評価されていると思う(図2)。

オランダの結核の罹患率は移民の流入に依存しており、これは1975年から2007年にかけての亡命希望者数

の変化に見るとおりである。この数は1980年代に急上昇するが、2000年にはオランダの国の政治的な方針が変わってその後亡命希望者の数はかなり少なくなった。オランダでは結核患者の60%が外国生まれであり、その結核罹患率は移民流入に強く依存している。欧州連合(EU)は最近東側にまでその版図を拡大したが、これによって西欧に比して結核罹患率ははるかに高い東欧諸国から来る人々が地域の労働力となっており、これが今後への脅威となっている。かくして今の結核の減少が持続するか否かは移民問題にかかっているということになる。

結核菌北京株の発見

結核菌集団の構造は全世界的にかなりばらついている。一般的に結核蔓延率の低いところでは結核分離株は遺伝的多様性が高い。これはIS6110-RFLPパターンに見

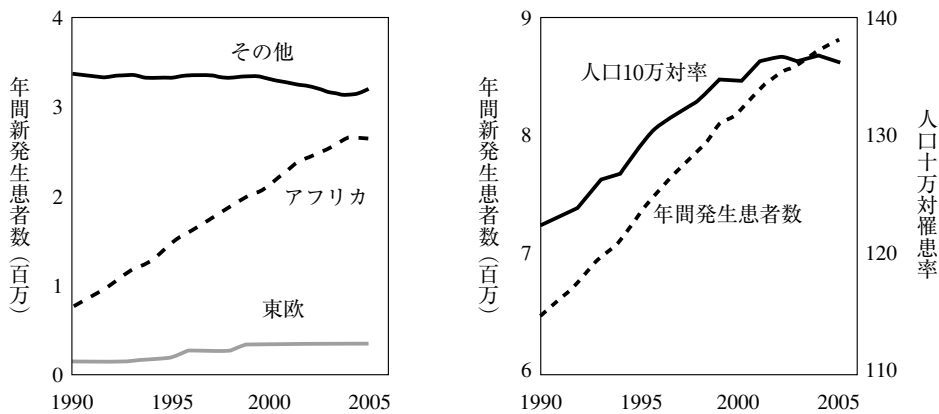


図1 世界の結核罹患率 人口対率は低下しているが、新発生患者の絶対数は増加中。

ることができる(図3)。ラテンアメリカ、アジア、アフリカのように結核蔓延率の高いところでは、菌株は非常にクローナルである。その最も著しい例が中国やモンゴルといった東南アジアに見られ、そこではスポリゴタイピングのような特定の遺伝子マーカーで菌株を区別できないほどである。さらに、IS6110-RFLPに基づいて見た多くのバンドが菌株の間で共通である、つまり菌の集団のクローナリティは高い。われわれは1995年に北京遺伝子型を発見して「北京」と命名したが¹⁾、この菌株は近年の世界の結核流行の駆動力の一つとなっている。

現在のところわれわれは集団BCG接種、もちろん抗結核薬治療のように結核に対する特異的な方策を導入す

ることにより、ある特定の結核菌遺伝子型を選択しているということができる。われわれは、新たに出現し流行する菌株というものは他の遺伝子型のものよりも選択上の強みをもっている、という仮説をもっている。われわれは2006年、結核菌北京株の世界的分布に関する調査の論文を刊行した²⁾。これはさまざまな国35カ国からの、3万近い結核菌株に基づくもので、われわれは東南アジアでは北京株の濃度が非常に高く、これがバルト海諸国や旧ソ連諸国の蔓延にも強く影響していることを見出した。さらに南アフリカの分離株の20%が北京遺伝子型である(図4)。他の地域で北京遺伝子型が蔓延しているところでは、多剤耐性と北京遺伝子型の頻度の間には明らかな相関が認められている。その後われわれは他の旧ソ連諸国においても北京株がかなり蔓延しており、薬剤耐性に強く関連していることを見出した。

北京遺伝子型の拡大と進化

さて、ここでいくつか新しいデータを紹介したい。まず、インドネシアの西ジャワとチモールで行った研究³⁾で、北京遺伝子型は西ジャワでは分離株の33%だが、これに対してチモールではF株(East African-Indian)が33%、D株(Latin American and Mediterranean)が20%で、北京遺伝子型は14%であった。つまりインドネシアのこれら2つの島では異なる2つの遺伝子型の結核菌が流行していることになる。その主な違いは、西ジャワは人口密度が高く、チモールは低いということである。既に他の地域でも見たように、人口密度と北京型の株の拡大の間には相関がある。同様に、ベトナムのホーチミン市

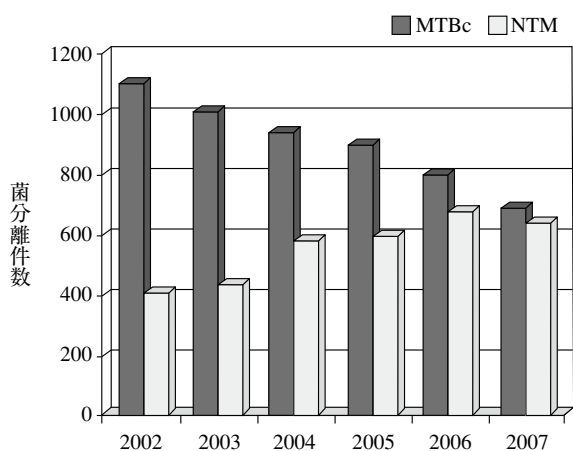


図2 オランダの現状

結核(MTBc)は減っているが、非結核性抗酸菌症(NTM)は増加。

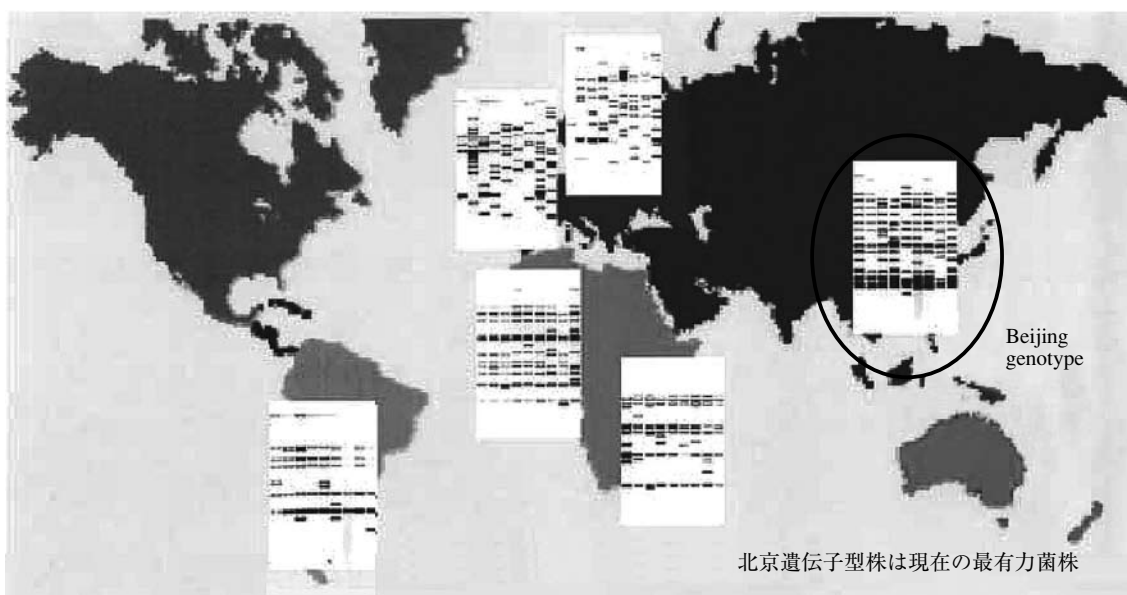


図3 世界の地域ごとに見た結核菌集団の構造

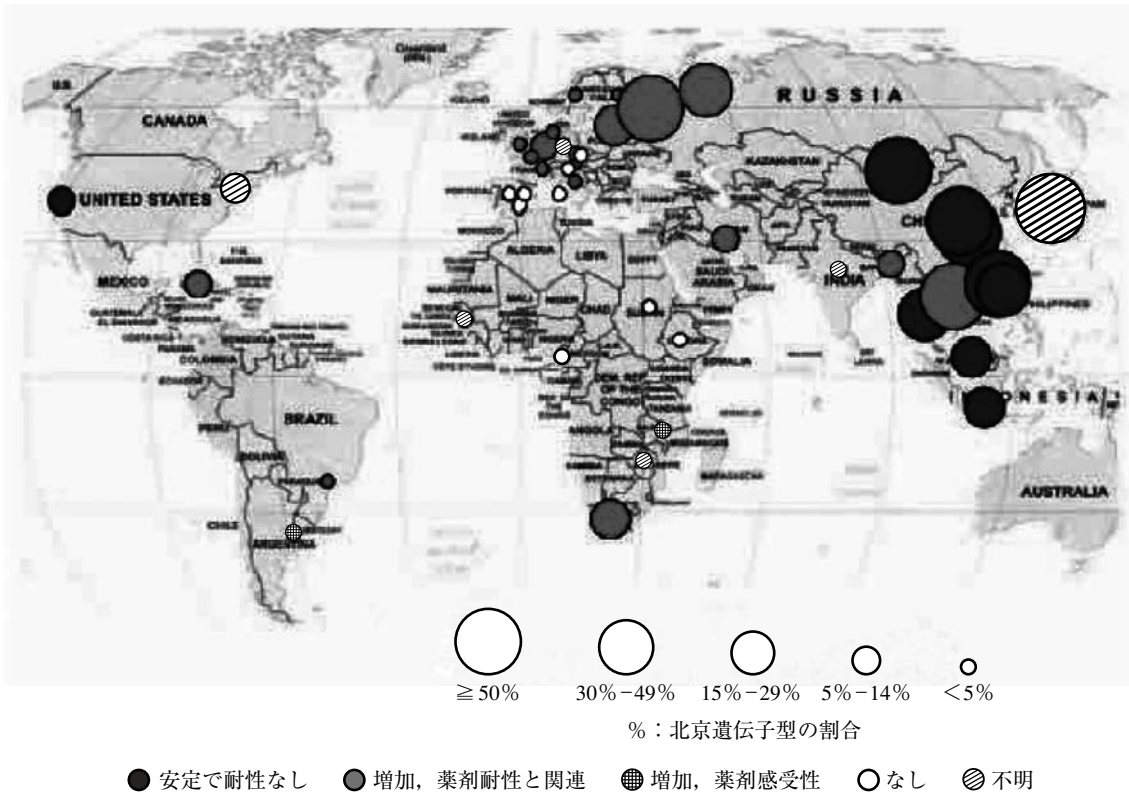


図4 北京遺伝子型結核菌の分布 (35カ国, 29,000人以上)

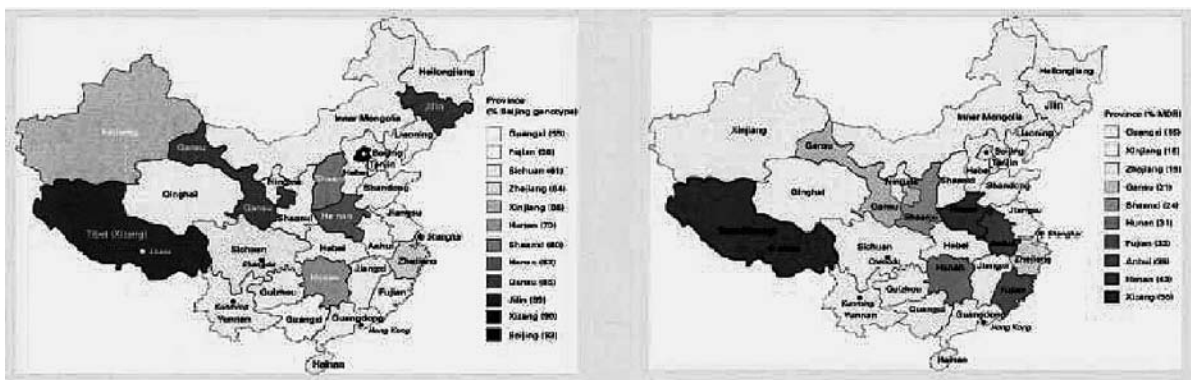


図5 北京株の分布(左)と多剤耐性結核の頻度(右)の関連⁵⁾

でも北京遺伝子型が高度蔓延しており、分離株の50%に達するが、ベトナムの農村部に行くと30~35%程度しかない⁴⁾。

中国CDCおよびフランスの研究班との共同研究でも、われわれは中国の10の省からの分離株2000について分析した。全体で北京株の頻度は76%であるが、省によって55%から93%までのばらつきが見られた。北京株の密度が一番高かったのは北京地域(93%)であった。

われわれはさらに祖先北京株と、より進化した近代北京株という、株の進化について分析を進めている。そして様々な省で古代北京型はおよそ3~6%の割合で存在

することを見出した。この研究では分離した株のMDRの頻度も調べたが、中国のこれら10省の北京株の分布とMDR結核の有病率の間には明確な相関があることも知られた(図5)⁵⁾。

北京遺伝子型のフィットネス

2007年に発表されたシンガポールのSunらの研究⁶⁾は患者関連のいくつかの要因の薬剤耐性のオッズ比を明らかにしている。これによると、もしシンガポールでリファンピシン耐性の患者をみたらその菌株が北京遺伝子型である確率は2.9倍であるという。ストレプトマイシン

耐性であれば2.7倍である。いいかえれば、シンガポールでは薬剤耐性やMDR株の拡がり北京遺伝子型であることの間には明白な相関があるということである。

上述のようにわれわれはこれまで北京遺伝子型は拡大中であるのかについて調べてきた。そして世界的に多くの地域で事実であることを見てきた。2000年、われわれのベトナムのチームのAnhらの論文が刊行された⁷⁾。この研究ではホーチミン市の500人以上の患者を調べ、年齢の低さと北京型の明確な相関があること、つまり年齢が低いと北京株に感染しており、それが最近の結核感染に関連していることを確認した(図6)。北京株は非常に急速に拡大しつつあるというのがわれわれの印象である。

われわれは最近ベトナムのメコンデルタの3地域で2003年から2005年にかけて行っていた研究を完了した。この研究では初回治療の90%、再治療患者の75%を含む2000人の患者について分析した。遺伝子型分析を行うと菌株の49%がEAI(East-African Indian)遺伝子型、35%が北京遺伝子型(ホーチミン市では以前50%であった)、そして16%が他の遺伝子型であった。ベトナムの農村地域ではやはり低年齢(25歳未満)ほど北京遺伝子型が多かった⁸⁾。25歳未満の結核患者ではその菌が北京遺伝子型の結核菌である確率はそれ以上の年齢と比して2.6倍にもなる。ベトナム農村部における再発や治療失敗もやはり北京遺伝子型と関連している。この農村地帯でMDR結核をみたらそれは北京遺伝子型である確率が7.5倍も高い。

BCG接種と北京遺伝子型

長年にわたる古典的な疑問であり、未解決の問題として、BCG接種が特定の菌株を選択しているのではないかという問題がある。2000年の論文⁹⁾でわれわれはベトナムにおけるBCG既接種の結核患者の菌は北京遺伝子

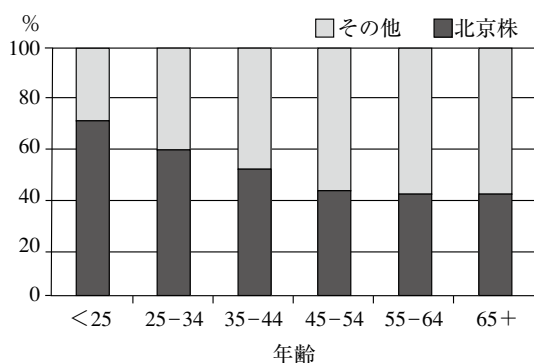


図6 北京株は最近の結核感染に関連するベトナム・ホーチミン市⁷⁾

型株が多いことを見た。ただしこの相関は統計学的には非有意であった。

その後われわれは北京遺伝子型を2種に分けてこの点を調べている。つまり1つは近代型でよりクローナルな株、もう1つは非定型的な遺伝子型でより古典的な系統である⁹⁾。われわれが見出したのは、BCG接種の既往がベトナムの北京株の25%を占めるこの非定型的な株への負のリスク要因となっていることであった。逆に典型的な北京株はBCG接種に対して正のリスク要因となる。つまりベトナムではBCG接種は近代型北京株の拡大に対して選択的に働いていることが明確に示されていることになる。それゆえこの方面の研究も今後進めていきたい。

欧州領域のMDR結核と北京株

ヨーロッパの国々をまたいだ多剤耐性(MDR)結核の拡がりについてもわれわれは広範な研究を行っている。ヨーロッパでは2つの方向の展開を見ることができ。西側では結核罹患率は1990年から2005年にかけてかなり低下した。ただ英国だけはまだ上昇中で、1990年にヨーロッパの罹患率は人口10万対38、2005年には50と上がった。西ヨーロッパでは人口10万対12、中央ヨーロッパでは66、と格差は明らかである。

MDRの拡大に関してわれわれは欧州連合結核プロジェクトをもっているが、これが近い将来ヨーロッパECDC(European Centre for Disease Prevention and Control 欧州疾病予防管理センター)¹⁰⁾の中にいい位置づけが得られるようになってもらいたいと思っている。そのためにDNA指紋法を用いたMDR結核伝播に関するサーベイランスを組織している。ここには2003~2007年のプロジェクトの成果を示している。この時期ヨーロッパのMDR株を約2500株収集した。それらの27%についてはDNA指紋をオランダの衛生環境研究所(RIVM)のデータベースに登録した。全部で全欧州のMDRの47%がヨーロッパクラスターに属しており、これは16カ国で18クラスター確認されている。1つのクラスターに174人もMDR患者が含まれているものがある。そのうち149人がエストニア、8人がイスラエル、6人がリトアニア、1人がオランダはじめ多くの国となっている。他に33人、21人の患者がいる大きなクラスターがあり、その他が多くの小さなクラスターとなっている。意外なことにヨーロッパのMDR株の3大クラスターの伝播は北京遺伝子型株によるものであり、一方ヨーロッパの薬剤感受性株ではそのわずか6~7%だけが北京遺伝子型であることが知られた。いいかえればヨーロッパのMDRの伝播と北京遺伝子型の間には明確な関連があるということである。これらのクラスター、とくに最大の

ものについては追跡を行っているが、その結果東欧諸国からの移民による西ヨーロッパ諸国への MDR の侵入が始まっていることが確認された。この問題は今のところはそれほど深刻ではないが、西側への侵入という点で重要だと思われる¹¹⁾。

ヨーロッパの MDR 感染伝播のサーベイランスに関して要約すると、13 のヨーロッパクラスターは北京遺伝子型によって起こっており、最大の 3 クラスターが旧ソ連諸国の最大の部分を占めている。全体で見ると、ヨーロッパの MDR 結核伝播の 85% は北京遺伝子型の感染にあり、前に述べたように感受性株についてはこの割合はわずか 7% にすぎない。ある 1 つのクラスターは主としてアフリカからきた患者によっているが、これらの患者は結核の既往歴はなく、MDR 菌で感染を受けたと考えられている。

ヨーロッパの 593 人の患者の MDR 株のクラスター関連要因について調べた。MDR 株ではバルト海諸国の患者であることが大きな危険要因でオッズ比が 10.4 にもなる。北京遺伝子型は XDR 結核の伝播とも明らかに関連しており、欧州にとっても今後重要な問題になるであろう。

MDR 結核と XDR 結核に関して結論をいうと、ヨーロッパでは MDR 株の半数がクラスター化しており、つまり最近伝播した菌株によるものであり、その多くが北京遺伝子型株であり、欧州においてもそれが MDR や XDR の主要な原因となっている。それらは特にバルト海諸国および新興国に由来している。

北京株の系統発生

北京遺伝子型株の拡大については多くの研究を行ってきたが、拡大とともに重要なことはその進化である。われわれが系統発生について新しく研究を始めたのは、日本や中国、南アフリカ等々に広がっていった北京株をわれわれの系統樹の上に位置づけたかったからである。どの株が感染拡大の可能性の大きい危険な株であるか、どの株が選択上の優位性の古い株といえるのか、なども明らかにしたい。それゆえ、北京遺伝子型株が蔓延しているベトナム、南ア、エストニアなどバルト海諸国、米国といった多くの地域から代表的な北京株を集めることとした。この分析には日本も含めたいと思っている。日本でも今日のシンポジウム（シンポジウムⅣ：分子疫学研究の進歩と対策への応用）にあるように北京遺伝子型の系統発生に関して興味深い研究が行われていることを知った。一緒にこの大規模な系統発生研究に合同してもらいたいと思う。そして、いろいろな地域で典型的でクロールな近代北京株がどのようにして世界中への拡散を始めたのかを知りたい。

北京遺伝子型が拡大に成功した訳をさらに明らかにするため、われわれは結核菌のゲノム分析に手を広げた。目下 15 株の結核菌をわれわれの研究所で全ゲノム分析中である。われわれがいま仮説として考えているのは、結核菌遺伝子型の系統樹のなかで、ある時点で仮想的突然変異遺伝子に変異が起こり、それがもつて他の株よりも有意に選択されるようになった、その後北京株は非常に急速に広まり、それで現在非常に多数のクロールな典型的な近代北京株ができたのではないかと、ということである。

現在われわれは非定型的な古代北京株と近代的な、いま流行している北京株とのゲノムを比較している。北京株の共通の祖先のゲノムにあるとき変異がいくつか（例えば Region of difference 181 など）起こった¹²⁾。これによっていくつかの株が選択され、枝分かれが起こる。このような結核菌の進化を調べることで世界各地の北京株のクロールナリティを解明したいと思う。

世界で初めて全ゲノム分析が行われた菌株は H37Rv だが、われわれはこれと北京株を比較している。これを 454 DNA 塩基配列決定法を用いて行っているが、きわめて順調に進行している。ただし、データの解析は大変複雑で、塩基配列の決定は数週間でもできて、その全部のデータの分析には何カ月もかかる。これまでのところ北京株の両系統の 97% の配列情報を入手している。しかし反復配列の部分の配列決定が厄介な問題で、じつはここに面白い情報がある。われわれはこういった問題に目下取り組んでいる。

北京遺伝子型の異なる系統の比較で興味深いのは近代北京株で明らかにされた突然変異遺伝子の変異が DNA 修復に関与しているのではないかとということである。近代北京株はまた他の DNA 修復遺伝子 (*mut* 遺伝子) にも変異をもっていることをわれわれは見出し、2003 年に報告した¹³⁾ (図 7)。そのとき遺伝子型菌株はより高次の突然変異株なのではないかと考えたが、そのために、結核菌がワクチンからエスケープしたり、薬剤耐性を獲得したりする進化の過程を解明すべく 2007 年から 2010 年にわたるヨーロッパ・プロジェクトに着手することに



→ 北京遺伝子型株は突然変異誘発遺伝子株らしい

図 7 北京遺伝子型株は仮想 DNA 修復 (変異) 遺伝子 Rv3908, *ogt*, *mutT* の中に突然変異をもっている¹³⁾。

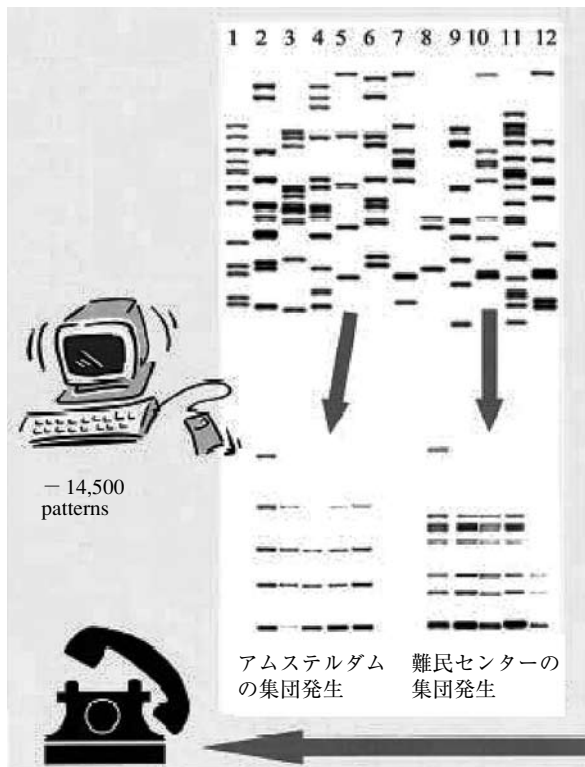


図8 オランダの結核感染の確認に利用される DNA 指紋法 (目下 VNTR に変換中)

なったのである¹⁴⁾。このプロジェクトは11の国際的な研究機関が参加しており、われわれはとくに結核菌の進化の部分を担当している。このプロジェクトの枠の中で結核菌の進化について更なる知見を得ることができるであろう。

結 論

北京遺伝子型株に関する研究を総括すると、喜ばしいことに、北京地域における菌の93%までが北京株であるということからすれば、北京遺伝子型というものもあながち悪い命名ではなかったということである。北京遺伝子型は人口密度の高さと関連しているようであり、旧ソ連諸国だけでなく、ベトナムのようにアジアでもいくつかの地域ではいろいろな遺伝子型の地理的分布が地域によって多彩であり、同じ国の中でもインドネシアや中国のように種々の遺伝子型のファミリーの拡がりに大きなばらつきが見られる。北京遺伝子型はシンガポールやベトナムのMDR結核の増加に有意に寄与している。それはヨーロッパや旧ソ連諸国のMDR結核とも関連しており、ベトナムの農村でも拡がりつつある。

いまや近代北京遺伝子型はBCG接種によって選択されたと言える。そして近代北京株はDNA修復機構のな

かに変異をもっていることも知られている。オランダでは1993年以来ルチーンに行い、多くのことを学んできたIS6110-RFLPタイピングを更新している。RFLPではこれまでに約15000のパターンをデータベース化した。それにしてもこれは非常に時間がかかる、技術的にも厄介な仕事であり、結核の診断がついてからDNA指紋を得るまでに3~4週間もかかった。これをPCRベースのVNTRタイピングに切り替えようとしている(図8)。

(文責：編集委員会)

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) European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis: Beijing/W Genotype *Mycobacterium tuberculosis* and Drug Resistance. *Emerg Inf Dis.* 2006; 12: 736-743.
- 3) Parwati I, van Crevel R, Sudiro M, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* population structures differ significantly on two Indonesian Islands. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 3639-3645.
- 4) Buu TN, unpublished data.
- 5) Kang-Lin Wan: Thesis. 2007.
- 6) Sun YJ, Lee AS, Wong SY, et al.: Genotype and phenotype relationships and transmission analysis of drug-resistant tuberculosis in Singapore. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11: 436-442.
- 7) Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6: 302-305.
- 8) Buu TN, et al. unpublished.
- 9) Brosch R, Gordon SV, Marniesse M, et al.: A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 3684-3689.
- 10) European Centre for Disease Prevention and Control: A Framework Action Plan to Fight Tuberculosis in the EU. Stockholm; 2008. Available from http://ecdc.europa.eu/pdf/080317_TB_Action_plan.pdf
- 11) van Soolingen et al. submitted.
- 12) 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.
- 13) Rad ME, Bifani P, Martin C, et al.: Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 838-845.
- 14) www.tuberculosis.rivm.nl

The 83rd Annual Meeting Invited Lecture

FINDINGS AND ONGOING RESEARCH IN THE MOLECULAR
EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS

Dick van SOOLINGEN and Kristin KREMER

Abstract [Settings] While in The Netherlands the organization of tuberculosis (TB) control in the era of elimination is being discussed, worldwide TB is still a major problem.

[Objectives] To highlight findings and ongoing research in the molecular epidemiology of tuberculosis.

[Findings] In the past decade, many studies have pointed out the significance of the Beijing strains in the worldwide tuberculosis epidemic. In South-East Asia, as well as the former USSR Republics, the Baltic States and South Africa, Beijing strains are emerging and associated with (multi-drug) resistance. Recent research in China has pointed out that the average proportion of Beijing genotype strains in 10 provinces amounts 73%, but varies significantly by region. The highest density was observed in the Beijing region; 93%. Currently, research is focused on the evolutionary development of Beijing strains. Two evolutionary lineages were distinguished and the "modern" lineage seems associated with spread, despite BCG vaccination in Vietnam. A project of the European Union with 11 international partners is trying to disclose the evolutionary adaptation of *M. tuberculosis* in response to vaccination and exposure to anti-tuberculosis drugs. Also in Europe the interest in the Beijing genotype has recently been strongly awakened. While 6–7% of the susceptible isolates are of this genotype, 85% of the MDR-TB transmission in Europe can be attributed to the spread of Beijing strains. Moreover, one cluster of 174 MDR-TB cases has been detected and this re-emphasizes that particular genotypes are capable of gaining poly-resistance without losing fitness. It seems, therefore, important to have more studies on the dynamics in the population structure of *M. tuberculosis* worldwide. In the presentation examples of such studies will be discussed.

Since 1993, IS6110 restriction fragment length polymorphism typing has gained recognition as the gold standard in the molecular epidemiology of tuberculosis. However, although the application of this method has brought significant new insights into the transmission of tuberculosis, it remains

technically demanding and time-consuming. Therefore, recently a new standard typing method, the variable numbers of tandem repeat (VNTR) typing, has been proposed in a publication in the *J. Clin. Microbiol.* In the Netherlands, a large part of the collection of nearly 15,000 *M. tuberculosis* isolates are currently being retyped with VNTR typing. This is not only meant to evaluate the utility of the new 24 loci VNTR typing, but also to conserve the epidemiological trace of tuberculosis transmission in the past. The first results will be discussed.

The role of non-tuberculous mycobacteria (NTM) in the diagnosis and treatment of tuberculosis-like diseases becomes increasingly important in the era of the HIV/AIDS pandemic. In Zambia it was recently shown that only in 50% of the cases diagnosed by Ziehl-Neelsen microscopy and X-ray, *M. tuberculosis* was isolated in a liquid culture system. In the other cases often only NTM can be cultured. In The Netherlands, particular NTM like *M. avium*, frequently cause lymphadenitis in children. This infection is normally indicated as "bird tuberculosis". However, with IS1245 RFLP typing it was pointed out that the *M. avium* isolates from lymphadenitis cases do not represent the bird type *M. avium* strains, but the *M. avium* strains typically found in humans and slaughtered pigs: *Mycobacterium avium hominissuis*.

Key words: Molecular epidemiology, Beijing genotype, Multidrug-resistant tuberculosis, Surveillance

National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)

Correspondence to: Dick van Soolingen, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), PO BOX 1, 3720 BA Bilthoven, The Netherlands.
(E-mail: d.van.soolingen@rivm.nl.)