

栃木県内で分離された結核菌の全ゲノム解読を用いた分子疫学的解析

微生物部

水越文徳、秋山徹¹、祝弘樹¹、切替照雄²、鈴木尚子、船渡川圭次、桐谷礼子

¹ 国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部

² 順天堂大学医学部 微生物学講座

要旨

結核は、世界で最も多い感染症で、開発途上国を中心に蔓延している。一方、日本の結核罹患率は欧米先進国に比べて高く、依然として中蔓延国とされている。結核菌の性状や薬剤耐性、菌株間の関係の理解は、その予防や治療の対策に重要である。そこで、栃木県内で2007年、2013年に分離された結核菌169株（このうち21株が外国人由来）の全ゲノムを次世代型シーケンサーで解読した。さらに、患者の年齢、国籍、薬剤感受性などの情報と併せて、詳細な分子疫学的解析を実施した。その結果、海外で流行している Lineage が栃木県内でも外国人患者から検出され、Lineage の多様化が認められた。特に65歳未満の患者由来の株の Lineage は、海外で流行している型を含めて一様に分布していた。このように、外国人の人口増加に伴い、栃木県内で結核菌のグローバル化が顕著に進行している可能性が示唆され、今後もその動向に注意をする必要がある。

キーワード: 結核菌、全ゲノム解析、外国人由来株、流行型、多様化

1 はじめに

結核は世界中で猛威を振るい、単独の病原体による死因としては最も多い感染症である。WHO によると、2014年では約960万人が新たに結核を発症し、150万人が結核で死亡した¹⁾。厚生労働省によると、日本においても平成26年の結核罹患率（人口10万人対の新登録結核患者数）は15.4人である²⁾。この結核罹患率は、米国（2.8人）の5.5倍、ドイツ（5.1人）の3.0倍と、欧米諸国と比較すると高い値であり、日本は「中蔓延国」とされている²⁾。また、日本における外国出生者の新登録結核患者数は、平成24年から3年連続で1千人を超え、増加傾向が続いている²⁾。

結核菌は人類の進化と共に変化を続けており、様々な地域において流行型が存在している³⁾。このため、結核菌の菌株毎の性状や薬剤耐性、菌株間の関係を理解することは以前にも増して重要になっている。しかしながら、結核菌のタイピング法は多数の方法によって実施され、統一がなされていない。これらの解析はすべて遺伝情報に基づいており、理論的には、各菌株の全ゲノム情報を解読すれば、一度の解析で迅速に結果を得ることが可能である。これを可能にしたのは、次世代型シーケンサーによる網羅的遺伝子解析である。しかしながら、膨大な株数の結核菌を対象とした全ゲノムの分子疫学解析は、これまで殆ど報告されていない。そこで、結核における将来的な地域医療対策や疫学研究的の基盤を構築することを

目的とし、栃木県内で分離された結核菌169株の全ゲノムを解析し、その性状について患者の臨床所見や薬剤耐性、国籍などの情報と併せて、詳細な分子疫学的解析を実施した。

2 材料と方法

栃木県内で2007年、2013年に分離された結核菌169株（外国人患者由来の21株も含む）について、次世代型シーケンサーを用いて全ゲノムを解読した。検体の内訳は、図1に示す。得られた全ゲノム情報は、オンライン解析システムCASTB (Comprehensive analysis server of Mycobacterium tuberculosis complex) を利用し^{4), 5)}、①SNP コンカテマーによる菌株間の系統的關係、②結核菌のタイピング(LSPによるlineage解析、北京型など)、③薬剤耐性変異を解析した。さらに、感染症サーベイランスシステム(NESID) から、患者の年齢、性別、国籍、薬剤感受性などの情報を取得し、多角的に詳細な分子疫学的解析を実施した。

CASTB から得られた SNP コンカテマーの配列を MAFFT version 7⁶⁾、Molecular Evolutionary Genetics

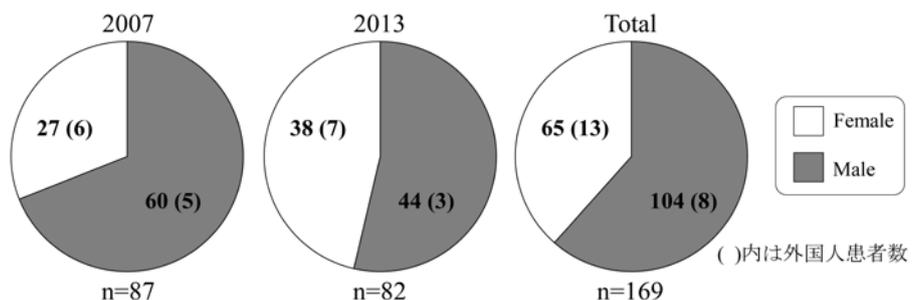


図1. 検体を分離した患者数の内訳

表 1. 栃木県内で分離された結核菌における lineage 解析、及び北京型の分布

Lineage (北京型)	Lineage 1	Lineage 2		Lineage 3	Lineage 4	Total
		(Ancestral)	(Modern)			
Total	13(9)	111(4)		2(2)	43(6)	169(21)
		79(3)	32(1)			
2007	8(5)	44(3)	13	0	22(3)	87(11)
2013	5(4)	35	19(1)	2(2)	21(3)	82(10)

()内は外国人患者由来の株数

Analysis 7⁷⁾を用いて最尤法 (Maximum likelihood method; ML 法) の系統樹を作成した。

3 結果

3.1 Lineage 分布について

解析した 169 株は、LSP による lineage 解析及び系統樹解析により 4 つの lineages に分類された (図 2、表 1)。表 1 には、各年に分離された結核菌の lineage 解析、及び北京型の株数を示す。検出数が多い順に、111 株 (65.7%) が Lineage 2 に、43 株 (25.4%) が Lineage 4 に、13 株 (7.7%) が Lineage 1 に、2 株 (1.2%) が Lineage 3 に分類された。さらに、最も多く検出された Lineage 2 の北京型については、本邦の主流である Ancestral 型が 79 株 (71.2%) と大半を占め、東アジアで流行している Modern 型は 32 株 (28.8%) であった。Ancestral 型は、さらに 3 つの sub-clades に分類され (それぞれ 26、22、31 株)、それぞれが独自に進化している可能性が示唆される (図 2)。年代別の Modern 型の割合を比較すると、2007 年 (13/87, 14.9%) よりも 2013 年 (19/82, 23.2%) の方が高く、増加の傾向が示された (表 1)。

3.2 外国人患者由来株について

Lineage 1 の大半が、外国人患者由来の菌株で (9/13; 69.2%)、その出身地はフィリピン (3 株)、台湾 (2 株)、タイ (2 株)、ネパール (1 株)、ベトナム (1 株) であった。Lineage 2 では、111 株中、わずか 4 株 (3.6%) が外国人患者由来の結核菌株であった。その内訳は、Ancestral 型がそれぞれ韓国、台湾、中国の出身の患者、Modern 型が中国の出身の患者から分離された結核菌株であった。Lineage 3 は、2007 年では検出されなかったが、2013 年では 2 名の外国人患者から検出された。それらの株は、ネパール、及びフィリピン出身の患者から分離された。Lineage 4 では、43 株中 6 株 (14.0%) が外国人患者由来の結核菌で、ペルー (2 株)、韓国 (2 株)、ブラジル (1 株)、タイ (1 株) の出身であった。

3.3 男女比と年齢分布について

患者の性別については 104:65 (男性:女性) で、男女比は 1.63 となり、男性患者由来の結核菌株が多かった (図 1)。年毎の男女比は、2007 年が 2.22、2013 年は 1.16 であった。菌株を分離した時の患者の年齢を比較すると、Lineage 1 (平均 37.9 歳) は、Lineage 2 Ancestral 型 (平均 69.4 歳)、Lineage 2 Modern 型 (平均 57.1 歳)、

Lineage 4 型 (平均 63.3 歳) に比べて、有意に低い年齢であった (図 3)。また、Lineage 2 の中でも、Modern 型よりも Ancestral 型の方が有意に高い年齢だった。Lineage 3 が分離された 2 名の外国人患者は 21.6 歳と 48.6 歳 (平均 35.1 歳) であった。

3.4 薬剤耐性遺伝子について

全ゲノム解析より、169 株中 11 株 (6.5%) で薬剤耐性遺伝子が検出された (data not shown)。これらは、イソニアジド、硫酸ストレプトマイシン、セフォキシチンに対する薬剤耐性遺伝子だった。また、NESID より薬剤耐性試験の結果が得られた 86 株について、全ゲノム解析のデータと一致した。

4 考察

本研究において、外国人患者由来の結核菌株が栃木県内の結核菌の遺伝的多様性に影響を与えていることが示唆された。Lineage 1 に分類された株の殆どは、その Lineage 1 が流行する地域出身の外国人患者から分離された株だった。また、Lineage 3 について、日本国内で検出された報告は非常に少ないが、本県では 2013 年に外国人患者から 2 株が分離された。近年、外国出生者の新登録結核患者数は 1000 人を上回り、増加の傾向が続いている²⁾。2007 年、2013 年の栃木県内の外国人登録者が県全体の人口に占める割合はそれぞれ 1.7%、1.5%であった⁸⁾。一方、本研究で対象とした結核患者数に占める外国人の割合はそれぞれ 12.6% (11/87)、12.2% (10/82) であり、全体的な人口比に比べて極めて高い割合である。この結果より、栃木県内に在住する外国人の結核菌罹患率が日本人よりも高い可能性も考えられる。

抗結核薬の耐性株の出現は、国内外で重要な問題となっている¹⁾。従来の薬剤耐性試験は、培養などに時間や労力を要する。しかしながら、全ゲノム解読を解読し、薬剤耐性遺伝子を解析すれば、迅速に薬剤感受性の結果を得ることが可能である。したがって、本研究の解析方法を用いれば情報を臨床の現場へ早急に還元することが可能であり、治療の効率が高まることが期待される。

このように、日本国内に入国する外国人の増加から、栃木県内でも結核菌のグローバル化・多様化が進行していると考えられる。したがって、今後も外国人由来の結核株の動向を注意深く監視していく必要がある。このようなデータベース構築は、栃木県内の結核菌の疫学研究

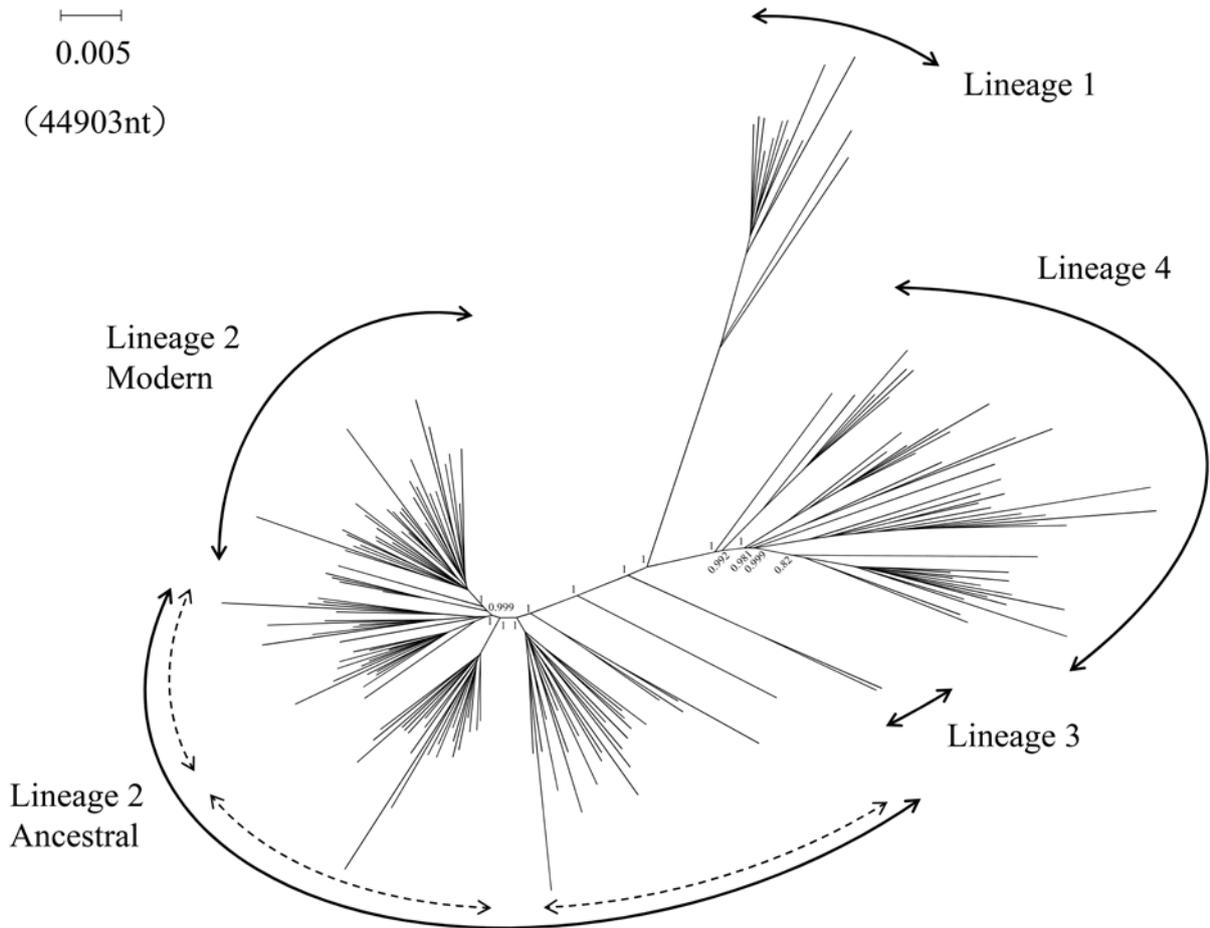


図2. 最尤法による系統樹解析 (169株)

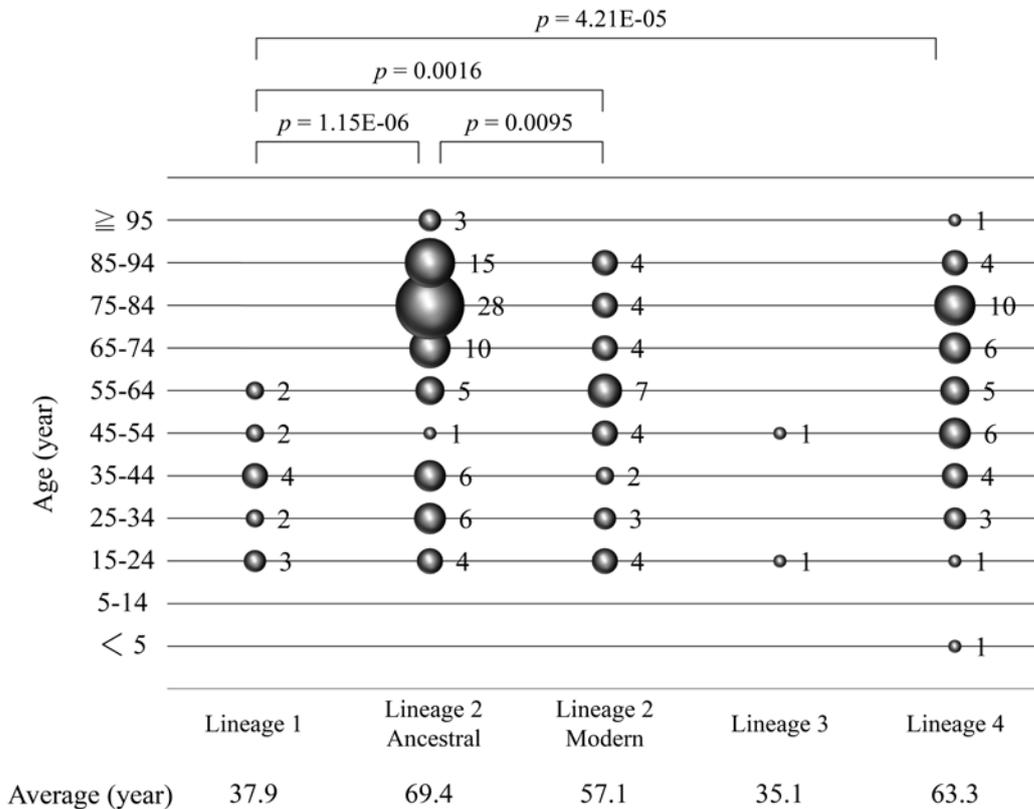


図3. Lineage 毎の年齢の比較

(地域性、集団感染など) や臨床治療 (薬剤耐性など) に有用性が高い。今後も、全ゲノム解析でそれらの菌株の性状や疫学情報を蓄積することは、将来的な結核対策の基盤となりうるものである。

5 参考文献

- 1) World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2015. Global tuberculosis report 2015.
- 2) 厚生労働省ホームページ. 平成26年結核登録者情報調査年報集計結果(概況). (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kanenshou03/14.html>)
- 3) Iwai K, Maeda S, Murase Y, Archaeology of tubercle bacilli and tuberculosis, *Kekkaku*, 85, 465-475, 2010.
- 4) The comprehensive analysis server for the Mycobacterium tuberculosis complex (CASTB) (<http://castb.ri.ncgm.go.jp/CASTB/>)
- 5) Iwai H, Kato-Miyazawa M, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T, CASTB (the comprehensive analysis server for the Mycobacterium tuberculosis complex): A publicly accessible web server for epidemiological analyses, drug-resistance prediction and phylogenetic comparison of clinical isolates, *Tuberculosis*, 95, 843-844, 2015.
- 6) Katoh K, Standley DM, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability, *Mol Biol Evol*, 30, 772-780, 2013
- 7) Kumar S, Stecher G, Tamura K, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Mol Biol Evol*, 33, 1870-1874, 2016.
- 8) 外国人登録者数、及び外国人住民数の推移 (<http://www.pref.tochigi.lg.jp/f04/documents/h27jumin-sityoubetu.pdf>)