

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(第2報)

微生物部

水越 文徳 船渡川 圭次 桐谷 礼子

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、菌株間の関係を解析することは、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、及び2013年から2015年に分離された結核菌282株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、さらに若い年齢層では、Lineage の多様化が認められた。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流行型がグローバル化している現象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、Lineage、外国人由来株、多様化

1 はじめに

世界保健機関 (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。このように、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¹⁾。日本においても厚生労働省によると、平成26年の日本の結核罹患率(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倍であり、欧米諸国と比較すると日本は極めて高い値である。さらに、日本における外国出生者の新登録結核患者数は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、世界の各地においていくつかの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、そして菌株間の関係を解析することは、以前にも増して重要になっている。しかしながら、現在の結核菌の解析では、多数のタイピング法によって実施され、統一がなされていない。これらの解析は全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。このような全ゲノム解読は、次世代型シーケンサーによる網羅的遺伝子解析が可能となったが、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の全ゲノムを解析し、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。本稿では、栃木県保健環境センター年報(平成28年度版)で報告⁴⁾した2007年、2013年に分離された結核菌の情報に、さらに2014年、2015年に分離された結核菌の情報を合わせて、282株の膨大な菌株数のデータによる分子疫学解析を実施したので報告する。

2 材料と方法

栃木県内で2007年、2013年、2014年及び2015年に分離された結核菌について、次世代型シーケンサーを用いて全ゲノムを解読した。検体の年毎の内訳は、表1に示す。結核菌のタイピングと薬剤耐性の判定などを自動で解析するオンライン解析システムでCASTB (Comprehensive Analysis Server for the Mycobacterium tuberculosis complex) を用いて、全ゲノム情報の解析を実施した^{5), 6)}。具体的には、CASTBによって、①一般的な結核菌疫学解析用のタイピング(スポリゴタイピング、VNTR、LSPによるLineage解析、北京型判定)、②SNPコンカテマーによる菌株間の系統的關係、③既知の薬剤耐性変異の有無の判定(Isoniazid; INH、Rifampicin; RIF、Ofloxacin; OFX、Streptomycin; SM、Ethambutol; EMB、Pyrazinamide; PZA)について、詳細な解析を行った。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、症状(合併症を含む)や治療の情報、薬剤感受性試験結果などを取得して、詳細な分子疫学的解析を実施した。最終的に、282株の結核菌(外国人患者由来の32株も含む)を解析対象とした。

2013年、2014年及び2015年の分離株のSNPコンカテマー配列について、MAFFT version 7⁷⁾でアライメントを行い、Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7⁸⁾を用いて最尤法(Maximum likelihood method; ML法)の系統樹を作成した。また、患者年齢の比較については、結核菌の採取時の年齢を基に、一元配置分散分析(One-way ANOVA)を用いて統計的に解析した。

3 結果

3.1 Lineage 分布について

解析した282株は、LSPによるLineage解析、北京型判定及び系統樹解析により5つのグループに分類された(表1、図1)。全ての年代の合計として、分離された菌

表1 Lineageの内訳

	Lineage 1	Lineage 2 Ancestral	Lineage 2 Modern	Lineage 3	Lineage 4	Subtotal
2007	8(5)	44(3)	13(0)	0(0)	22(3)	87(11)
2013	5(4)	31(0)	19(1)	2(2)	21(3)	78(10)
2014	4(2)	28(0)	11(0)	0(0)	22(1)	65(3)
2015	2(1)	25(1)	7(2)	0(0)	18(4)	52(8)
Total	19(12) [6.7%]	128(4) [45.4%]	50(3) [17.7%]	2(2) [0.7%]	83(11) [29.4%]	282(32) [100.0%]

()内は、外国人患者由来の菌株数

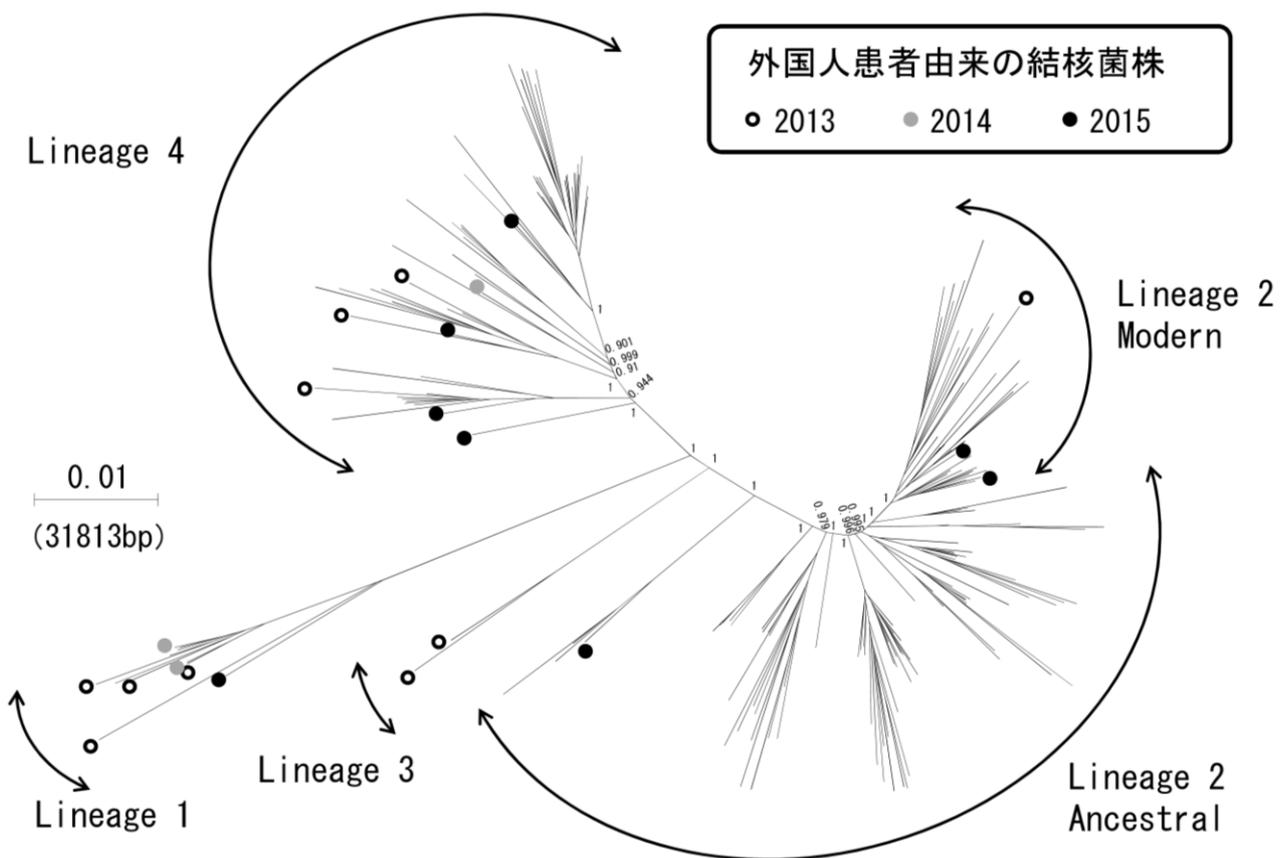


図1 SNP コンカテマーを用いた最尤法による系統樹解析 (2013~2015 年分離株)

株は、Lineage 1が19株 (6.7%)、Lineage 2 Ancestral型が128株 (45.4%)、が Lineage 2 Modern型が50株 (17.7%)、Lineage 3が2株 (0.7%)、Lineage 4が83株 (29.4%)であった。さらに、ML法の系統樹解析により、Ancestral型は3つのsub-cladesに分類されて、それぞれが独自に進化している可能性が示唆された(図1)。

3.2 外国人患者由来株について

282株中32株 (11.3%)が外国人患者から分離された(表1)。Lineage 1の大半が外国人患者由来の菌株で(12/19; 78.1%)、その出身地はフィリピン、台湾、タイ、ネパール、ベトナムなどであった。Lineage 2は殆どが

日本人患者由来の菌株であった。Lineage 3の菌株は、2013年に2名の外国人患者から分離されたが、その出身地はネパール、フィリピンであった。Lineage 4では、83株中11株 (13.3%)が外国人患者由来の結核菌であった。また、系統樹解析では、外国人由来の菌株が集中するクラスターは確認されなかった(図1)。

3.3 男女比と年齢分布について

患者の性別は179:103(男性:女性)で男女比は1.74(女性を1としたときの男性の割合)となり、結核菌を分離した患者において男性の占める割合が高かった(表2)。年毎の男女比においても、同様に男性の比率が高か

表2 結核菌が分離された患者の男女比 (女性を1としたときの男性の割合)

	Lineage 1	Lineage 2 Ancestral	Lineage 2 Modern	Lineage 3	Lineage 4	Subtotal
2007	3.00	1.93	2.25	-	2.67	2.22
2013	0.25	1.38	1.38	1.00	1.10	1.17
2014	1.00	2.50	2.67	-	1.75	2.10
2015	-	2.13	0.75	-	1.57	1.74
Total	1.38	1.91	1.63	1.00	1.68	1.74

表3 Lineage 毎の平均年齢

	Lineage 1	Lineage 2 Ancestral	Lineage 2 Modern	Lineage 3	Lineage 4	Subtotal
2007	37.4 (12.6)	69.3 (20.6)	56.6 (22.9)	-	56.4 (22.2)	61.2 (22.7)
2013	38.7 (19.1)	69.4 (22.5)	57.5 (21.7)	35.1 (19.1)	70.0 (19.9)	63.8 (23.0)
2014	46.6 (23.1)	74.1 (18.8)	60.7 (16.7)	-	72.7 (16.8)	69.7 (19.0)
2015	62.1 (39.7)	71.7 (20.6)	45.2 (21.6)	-	71.3 (21.5)	67.6 (22.9)
Total	42.3 (19.5)	70.8 (20.5)	56.3 (21.0)	35.1 (19.1)	67.7 (20.8)	65.1 (22.1)

()内は、SD

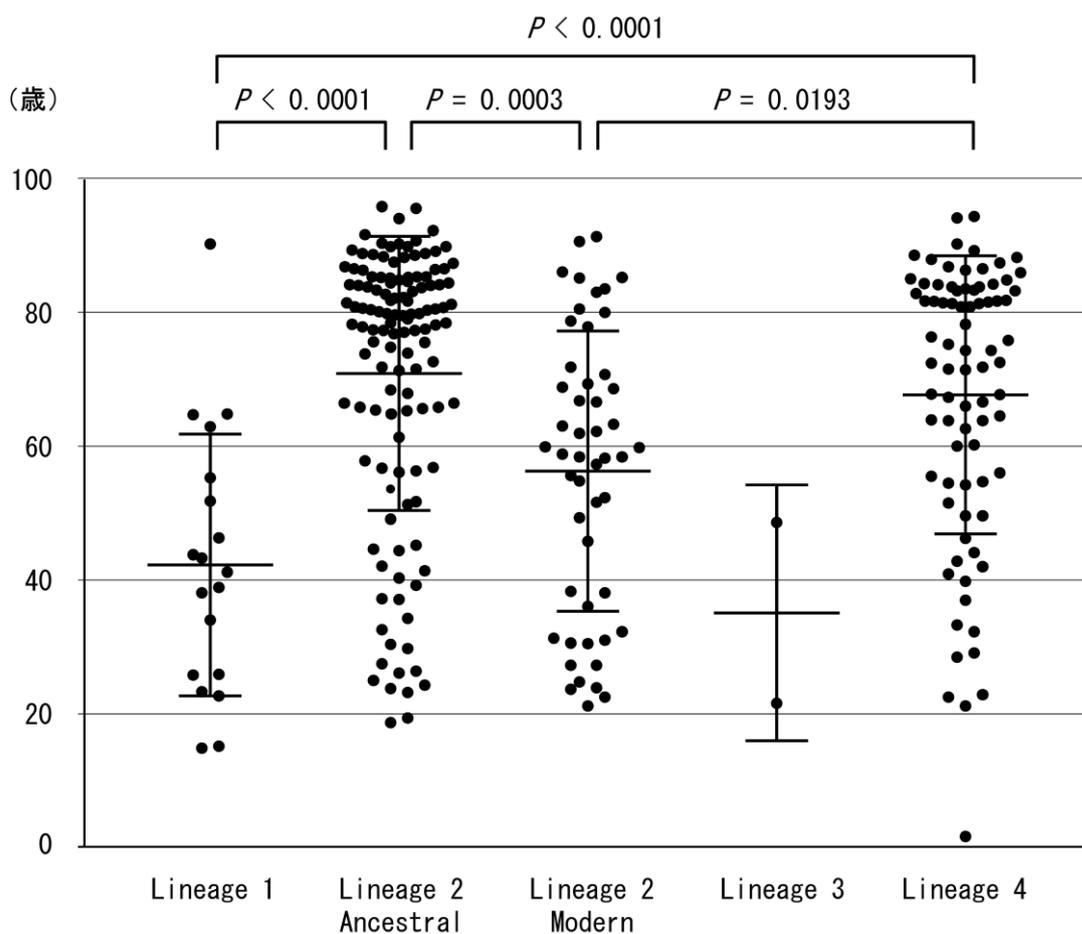


図2 Lineage 毎の年齢比較

った (2007年 ; 2.22、2013年 ; 1.17、2014年 ; 2.10、2015年 ; 2.10)。

年毎の患者年齢について統計的に有意差はなかったことから、全ての年を合計してLineage 毎に解析をした(表

3、図2)。菌株を分離した時の患者の年齢を比較すると、Lineage 2 Ancestral 型 (平均70.8歳)、Lineage 4 型 (平均67.7歳) に比べて、Lineage 1 (平均42.3歳) が分離された患者は有意に低かった。また、Lineage 2 Modern 型 (平均56.3歳) よりも、Ancestral 型が分離された患者の年齢は有意に高かった。さらには、Lineage 4 が分離された患者の年齢は、Modern 型よりも有意に高かった。Lineage 3 が分離された2名の外国人患者の平均は、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、282株中、21株(7.4%)で既知の薬剤耐性遺伝子が検出された。その21株中、7株(33.3%)が外国人由来株である。薬剤耐性遺伝子の内訳として、INHが12株、RIFが0株、OFXが3株、SMが8株、EMBが1株、PZAが1株から検出された。さらに、複数の耐性遺伝子を持つ結核菌は、INH/SMが2株、INH/OFX/SMが1株だった。

4 考察

近年、外国出生者の新登録結核患者数は1千人を上回り、増加の傾向が続いている²⁾。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 は日本国内で検出された報告は非常に少ないが、今回の調査で本県から2013年に2株のLineage 3の結核菌が外国人患者から分離された。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⁹⁾。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11.3%(32/282)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。

Lineage 2 Ancestral 型やLineage 4 が分離された患者は、高い年齢層に分布が集中し、以前の流行株だったことが示唆される。一方、若年齢層では、海外で流行しているLineageを含めて一様に分布している。このように、栃木県内の外国人の増加から、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、海外の流行株の日本人の間での伝播、栃木県内での定着などの動向を注意深く監視していく必要がある。

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、全ゲノムを解読して、薬剤耐性遺伝子を解析すれば、迅速に結果を得ることが可能である。本研究の解析方法を用いれば臨床へ情報を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。

このようなデータベース構築は、栃木県内の結核菌の

疫学研究(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。全ゲノム解析によって蓄積された菌株の性状や分子疫学情報は、将来的な結核対策の基盤となりうるものである。

5 謝辞

本研究の共同研究者である切替照雄先生(順天堂大学)、秋山徹先生、及び切替富美子先生(国立国際医療研究センター)には、心から感謝を申し上げます。

本研究の一部は、公益財団法人大同生命厚生事業団の平成28年度「地域保健福祉研究助成」の補助を受けて行った。

6 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-kan-senshou03/14.html>)
- 3) Iwai K, Maeda S, Murase Y, Archaeology of tubercle bacilli and tuberculosis, *Kekkaku*, 85, 465-475, 2010.
- 4) 水越文徳、秋山徹、祝弘樹、切替照雄、鈴木尚子、船渡川圭次、桐谷礼子、栃木県保健環境センター年報 平成28年度版、22、37-40、2017
- 5) The comprehensive analysis server for the Mycobacterium tuberculosis complex (CASTB) (<http://castb.ri.ncgm.go.jp/CASTB/>)
- 6) 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.
- 7) Katoh K, Standley DM, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability, *Mol Biol Evol*, 30, 772-780, 2013
- 8) Kumar S, Stecher G, Tamura K, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Mol Biol Evol*, 33, 1870-1874, 2016.
- 9) 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>)