

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3報)

微生物部

水越 文徳¹ 船渡川 圭次² 関川 麻実 齋藤 明日美
切替 富美子³ 切替 照雄³ 永木 英徳

(¹前保健環境センター)(²元保健環境センター)(³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、日本は中蔓延国と位置付けられてきたが、国内の患者数が減少して低蔓延国の基準を満たした。欧米などの先進国の水準に近づき、他のアジア諸国と比較しても低い罹患率となった。この罹患率をさらに低下・改善させるためには、結核菌の性状や薬剤耐性、菌株間の関係を解析して、それらの結果や情報を臨床や公衆衛生へ還元することが重要である。そこで、栃木県内で分離された結核菌 365 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 が外国人患者からだけでなく若い年齢層からも検出され、結核菌の多様化が認められた。このように、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、今後もその動向を監視する必要がある。

キーワード: 結核菌、全ゲノム解析、Lineage、外国人由来株、多様化、データベースの構築

1 はじめに

世界保健機関 (WHO) によると、2021 年では約 1060 万人が新たに結核を発症し、約 157 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^{1,2)}。日本においても厚生労働省によると、2021 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、前年の 10.1 から 9.2 に減少し、結核において低まん延国との定義が満たされた³⁾。この結果により、日本は、欧米などの先進国の結核罹患率に近づき、近隣アジアの国々と比べても低い罹患率となった。一方、この罹患率の減少は COVID-19 の影響とも考察されている³⁾。栃木県内の結核罹患率は、2017 年では 11.7 であったが、翌年の 2018 年に 8.8 に減少し、2021 年は 7.9 となって、全国の結核罹患率よりも低かった³⁾。さらに罹患率を下げするために、結核に関する分子疫学的解析の情報を公衆衛生に還元させることは重要な課題である。

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⁴⁾。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 (NGS; Next Generation Sequencer) 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。

当センターでは、これま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、2007 年、2008 年、2013 年、2014 年、2015 年に分離された結核菌の全ゲノム解析による調査研究について、順天堂大学との共同研究で報告した^{5~7)}。本稿では、さらに 2018 年、2019 年に分離された結核菌の情報について、患者の臨床所見や薬剤耐性、国籍などの情報と併せて、365 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

2.1 結核菌株と疫学解析

栃木県内で 2007 年、2008 年、2013 年、2014 年、2015 年、2018 年、2019 年に分離された結核菌について、MiSeq (Illumina 社) を用いて全ゲノムを解読した。検体のシーズン毎の内訳は、表 1 に示す。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

表 1 期間毎の Lineage の内訳

Lineage	ALL Lineage	Lineage 1	Lineage 2 Ancestral	Lineage 2 Modern	Lineage 3	Lineage 4
Total	365	25	160	69	4	107
Period 1 (2007~2008)	86	8	42	14	0	22
Period 2 (2013~2015)	194	11	84	37	2	60
Period 3 (2018~2019)	85	6	34	18	2	25

た。菌株を分離した年に基づき、2007年・2008年をPeriod 1、2013～2015年をPeriod 2、2018～2019年をPeriod 3として、3つの期間に分けて解析した。最終的に、菌株の疫学的情報が得られ、かつ、解読したゲノムデータのクオリティーが十分だった365株の結核菌を解析対象とした。また、患者年齢の比較については、結核菌を採取した時の年齢を基に、一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey's multiple comparisons test を用いて統計的に解析した。

2.2 CASTBによる全ゲノム解析

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^{8,9)}。CASTB では、結核菌疫学解析用のタイピング (LSP による Lineage 解析、北京型判定)、SNP コンカテマーによる菌株間の系統的關係について、詳細な解析を行った。2007年、2008年、2013年、2014年及び2015年に分離された279株及び参照株 H37Rv の SNP コンカテマー配列について、MAFFT version 7¹⁰⁾ でアライメントを行い、Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7¹¹⁾ を用いて最尤法 (Maximum likelihood method; ML 法) の系統樹を作成した。

2.3 薬剤耐性に関与する遺伝子変異

CLC Genomics Workbench (QIAGEN) を用いて、FASTQ データから薬剤耐性に関与する遺伝子を構築した。それらの遺伝子について、MEGA 7 で塩基とアミノ酸の配列を解析した。対象とした薬剤耐性遺伝子は、2021年にWHOが発表した Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance^{12,13)} において、FINAL CONFIDENCE GRADING の項目が【associated with resistance】と定義された遺伝子変異を解析した。イソニアジド (isoniazid: INH) に関しては、*katG* gene (S315T, S315N, W328L)、*inhA/fabG1* gene (c-777t[c-15t], g-154a[L203L]) を確認した。一方、リファンピシン (rifampicin: Rif) に関しては、*rpoB* gene (V170F, L430P, Q432K, Q432L, Q432P, D435F, D435Y, D435V, S441L, S441Q, H445C, H445D, H445L, H445N, H445R, H445S, H445Y, S450F, S450L, S450W, L452P, I491F, 1296ins.3[ttc], 1328ins.3[gac]) を確認した。

3 結果

3.1 Lineage 分布について

解析した365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、分離された菌株は、Lineage 1が25株(6.8%)、Lineage 2 Ancestral型が160株(43.8%)、がLineage 2 Modern型が69株(18.9%)、Lineage 3が4株(1.1%)、Lineage 4が107株(29.3%)であった。各期間とも、割合の傾向は同様であった。

3.2 男女比と年齢分布について

患者の性別は230:135(男性:女性)で男女比は1.70(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)。期間毎の男女比においても、同様に男性の比率が高かった(2007～2008年; 2.19、2013～2015年; 1.59、2018～2019年; 1.58)。また、Lineage毎に比較しても、株数の少ないLineage 3以外において、同様に男性の比率が高かった(Lineage 1; 2.13、Lineage 2 Ancestral型; 1.81、Lineage 2 Modern型; 1.65、Lineage 3; 1.00、Lineage 4; 1.55)。

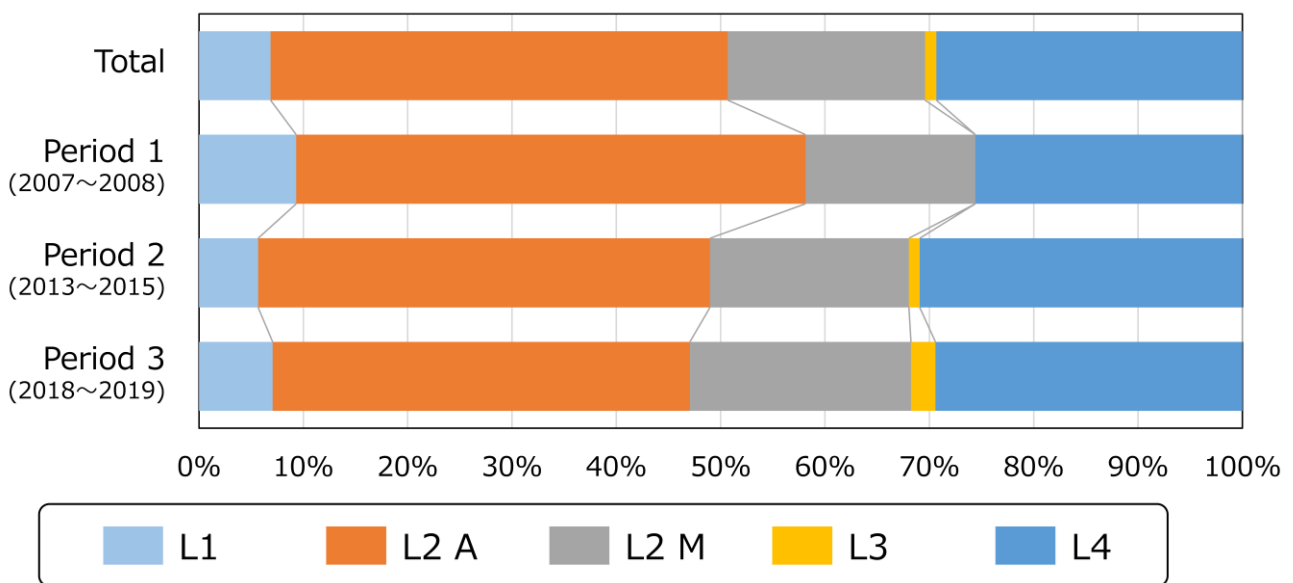


図1 シーズン毎のLineage 分布

表2 期間毎のLineage と性別の内訳

	Lineage	ALL Lineage	Lineage 1	Lineage 2 Ancestral	Lineage 2 Modern	Lineage 3	Lineage 4
	Total	365	25	160	69	4	107
All Periods	男性	230	17	103	43	2	65
	女性	135	8	57	26	2	42
Period 1 (2007~2008)	男性	59	6	27	10	0	16
	女性	27	2	15	4	0	6
Period 2 (2013~2015)	男性	119	5	55	22	1	36
	女性	75	6	29	15	1	24
Period 3 (2018~2019)	男性	52	6	21	11	1	13
	女性	33	0	13	7	1	12

表3 期間・Lineage 毎の患者年齢

	Lineage	ALL Lineage	Lineage 1	Lineage 2 Ancestral	Lineage 2 Modern	Lineage 3	Lineage 4
Total	Mean	65.4	47.2	71.5	55.5	30.8	68.2
	SD	22.7	20.7	21.0	22.3	12.1	20.8
Period 1 (2007~2008)	Mean	67.3	37.4	67.8	58.3		55.4
	SD	23.4	12.6	22.6	22.8		22.2
Period 2 (2013~2015)	Mean	66.9	45.9	71.7	56.2	35.1	71.8
	SD	21.8	23.3	20.5	20.5	19.1	19.0
Period 3 (2018~2019)	Mean	60.3	62.7	75.8	51.9	26.5	71.1
	SD	23.3	17.2	20.0	26.0	2.0	19.8

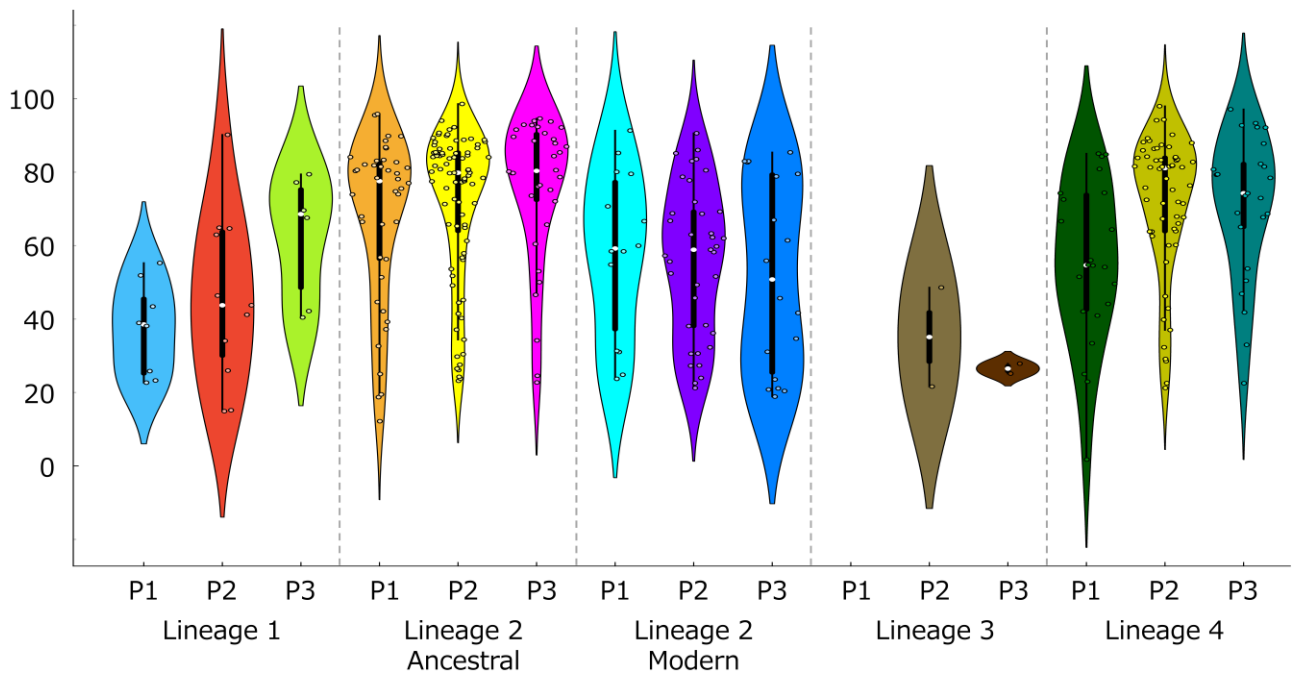


図2 各期間・各Lineage における年齢分布

年齢の分布をViolin Plot と Box and Whisker Plot で示し、dots は各患者の年齢を示す。P1~P3 は、Period 1~3 を略す。

菌株を分離した時の患者の年齢について、期間毎・Lineage 毎に表3、図2に示した。各Lineageにおいて年別で比較した結果、それぞれ有意差はなかった。全ての期間を合計してLineage 毎に解析すると、Lineage 2 Ancestral型(平均71.5歳)を分離した患者の年齢が最も高く、Lineage 1(平均47.2歳)、Lineage 2 Modern型(平均55.5歳)、Lineage 4型(平均68.2歳)に比べて有意に高かった(P<0.001)。また、Lineage 4を分離した患者の年齢は、Lineage 1やLineage 2 Modern型よりも有意に高かった(P<0.001)。高齢者ではLineage 2 Ancestral型とLineage 4に集中しているが、若年齢層ではいずれのLineageにおいても一様に分布していた。

3.3 患者の国籍について

365株中47株(12.9%)が外国人患者から分離された(表4)。Lineage 1の半数以上(25人中14人;56.0%)が外国人患者由来の菌株で、国籍の内訳はMyanmar(1名)、Nepal(1名)、Philippines(4名)、Taiwan(2名)、Thailand(3名)、Viet Nam(2名)、不明(1名)であった。160株のLineage 2 Ancestral型のうち、殆どの154株(96.25%)が日本人由来で、6株(3.75%)がChina(1名)、Korea(2名)、Taiwan(1名) Viet Nam(2名)の国籍の外国人由来だった。Lineage 2 Modern型は9株が外国人由来(69人中9人;13.0%)で、国籍はChina(2名)、Myanmar(1名)、Nepal(1名)、Viet Nam(4名)、不明(1名)だった。Lineage 3の4株は全て外国人由来で、国籍はNepal(3名)、Philippines(1名)だった。Lineage 4は107株中14名(13.1%)が外国人由来で、その出身地はBrazil(1名)、India(1名)、Indonesia(1名)、Korea(2名)、Nepal(1名)、Peru(2名)、Philippines(1名)、Taiwan(1名)、Thailand(1名)、Viet Nam(2名)、不明(1名)であった。

各期間の外国人由来の割合について、2007~2008年が86株中11株(12.8%)、2013~2015年では194株中21株(10.8%)、2018~2019年では85株中15株(17.6%)であった。

3.4 分子系統樹解析について

系統樹解析では、2007~2008年および2013~2015年に分離された結核菌(279株)参照株:H37Rvの280株について、近隣結合法の系統樹で解析した(図3)。特に、同地域の患者由来の菌株や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。

3.5 薬剤耐性遺伝子について

解析対象とした365株中、培養による薬剤感受性試験(Wet系)結果をNESIDから得られたのは、260株だった(105株は情報がなかった)。情報があつた260株中、8株(3.1%)がINH耐性、1株(0.4%)がRif耐性だった(表5)。8株のINH耐性結核菌株のうち、katG geneのS315T/N変異が3株、inhA/fabG geneのc-777t[c-15t]変異が3株、およびg-154a[L203L]変異が1株だった(表6)。一方、INHに感受性を示す結核菌252株においても、inhA/fabG geneにおいて4株(1.6%)でc-777t[c-15t]変異、1株(0.4%)でg-154a[L203L]変異が認められた。1株のRif耐性結核菌はrpoB geneにおいてS450L変異が認められ、259株のRif感受性結核菌には該当の耐性変異は認められなかった。

表4 期間・Lineage 毎の患者国籍の内訳

	Lineage	ALL Lineage	Lineage 1	Lineage 2 Ancestral	Lineage 2 Modern	Lineage 3	Lineage 4
	Total	365	25	160	69	4	107
国籍	日本	318	11	154	60	0	93
	外国籍	47	14	6	9	4	14
Period 1 (2007~2008)	日本	75	3	39	14		19
	外国籍	11	5	3			3
Period 2 (2013~2015)	日本	173	4	83	34		52
	外国籍	21	7	1	3	2	8
Period 3 (2018~2019)	日本	70	4	32	12		22
	外国籍	15	2	2	6	2	3

表5 薬剤感受性試験(Wet系)の結果

INH	感受性	耐性	情報なし	RFP	感受性	耐性	情報なし
Total	252	8	105	Total	259	1	105
Period 1	7	1	78	Period 1	8	0	78
Period 2	166	3	25	Period 2	169	0	25
Period 3	79	4	2	Period 3	82	1	2

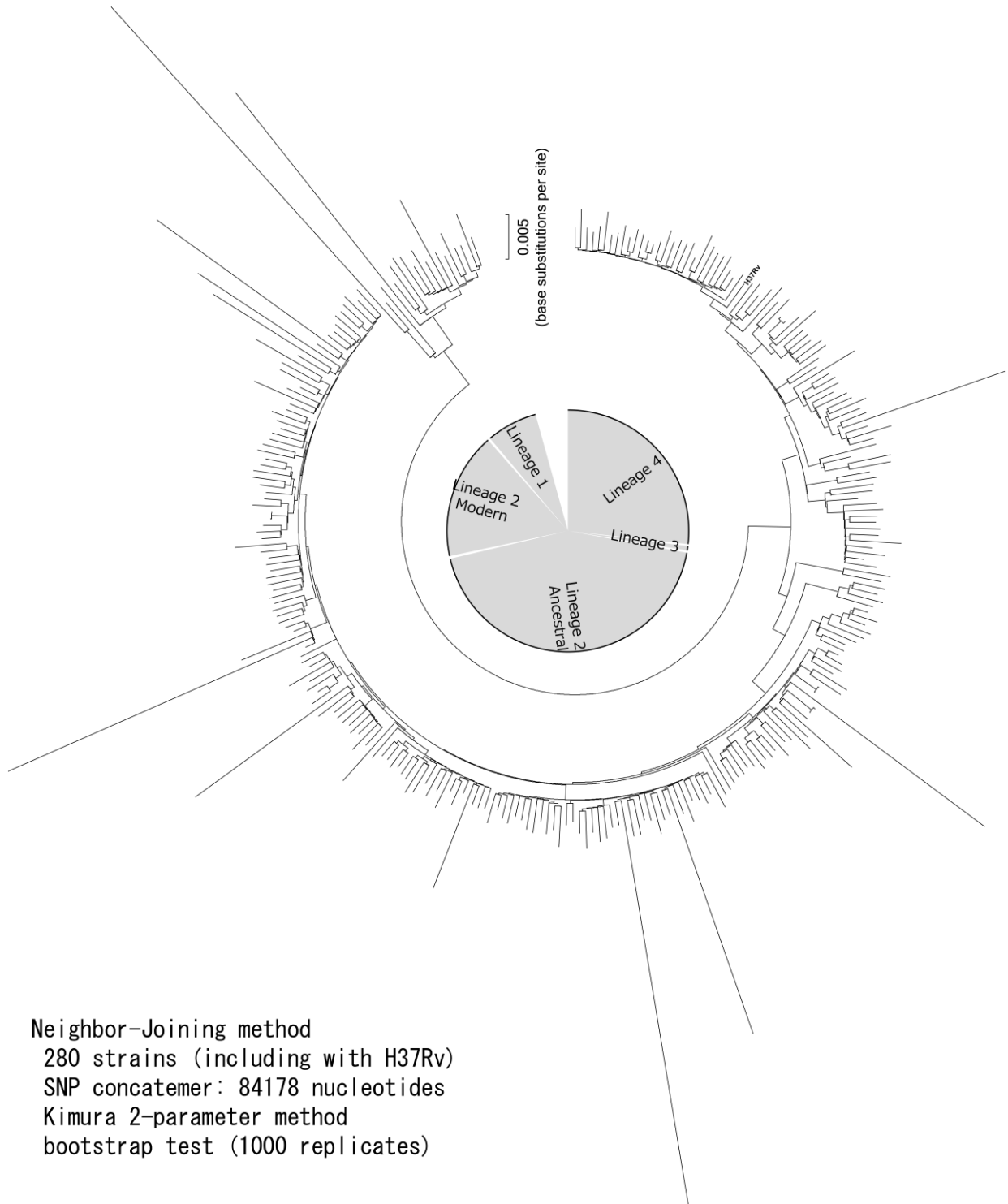


図3 2007～2008年および2013～2015年に栃木県内で分離された結核菌の近隣結合法による系統樹解析

表6 INH 耐性遺伝子変異 (Dry 系) について

	感受性株		耐性株	
	変異なし	耐性変異	変異なし	耐性変異
katG_S315T/N	252	0	5	3
katG_W328L	252	0	8	0
inhA_c-777t (fabG1_c-15t)	248	4	5	3
inhA_g-154a (fabG1_L203L)	251	1	7	1

4 考察

本研究では栃木県内の結核菌の分子疫学解析を実施したところ、Lineage の分布、年齢層などに著しい変動は確認できなかった。しかしながら、外国人由来の結核菌の割合は各期間ともに 1 割以上で、全体として 365 株中 47 株 (12.9%) と多い傾向だった。栃木県内に在住する外国人の人口比について、2007 年の 1.70 から増加し続け、2019 年では 2.18 となった¹⁴⁾。外国人の人口比と比較しても、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。さらに、日本国内で検出された報告は非常に少ない Lineage 3 は 4 株検出されたが、すべて外国人由来の結核菌株であった。まだ中～高まん延国であるアジア諸国から国内に流入する可能性を注意しなければならない。

Lineage 2 Ancestral 型や Lineage 4 に属する結核菌が分離された患者は比較的に年齢が高い傾向があり、過去の流行株だった可能性が考えられる。一方、若年齢層から分離された結核菌株は、海外で流行している Lineage を含めて一様に分布している。したがって、栃木県内で分離される Lineage が海外の流行株を含めて多様化していることから、様々な型の結核菌が新興していると考えられる。故に、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。

本研究の分子系統樹解析からは全ての株が一様に分布していることから、アウトブレイクや地域流行を疑う所見は認められなかった。集団感染の場合、感染患者から分離・検出された病原体の近縁性が重要になる。県内で検出される結核菌の状況を把握しておくことは、アウトブレイクなどが生じたときに必要不可欠である。本研究のように、可能な限りの菌株数の全ゲノム解析を実施し、データベースとして構築することは、将来的な結核対策の基盤となりうるものである。

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。日本国内でも薬剤耐性結核菌は、日本人だけでなく外国人からも多く検出されている¹⁵⁾。従来の薬剤感受性試験は、培養などに時間を要する。一方、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。しかしながら、本研究において、8 株の INH 耐性結核菌のうち 1 株は、WHO が定義した薬剤耐性変異は認められなかった。さらに、252 株の INH 感受性結核菌のうち 5 株で薬剤耐性変異が認められた。このように、現状では、Dry 系の薬剤耐性遺伝子の変異の結果は、Wet 系の培養による薬剤感受性検査と合わせて評価・判断すべきであると考えられる。

このように、国内に在住する外国人の増加によって、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。また、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。本研究のように、全ゲノム解析で結核菌株の性状や疫学情報を蓄積することは、地方衛生研究所の重要な役割である。

5 謝辞

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 年度および平成 30 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, Global tuberculosis report 2022, 2022.
- 2) World Health Organization, Geneva, Switzerland, Tuberculosis profile (https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&lan=%22EN%22) [cited 2nd August 2023].
- 3) 厚生労働省ホームページ、2021 年結核登録者情報調査年報集計結果について (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00007.html) [cited 2nd August 2023].
- 4) Iwai K et al., Archaeology of tubercle bacilli and tuberculosis, *Kekkaku*, 85, 465-475, 2010.
- 5) Mizukoshi F et al., Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Tochigi prefecture, a local region of Japan, *BMC Infect Dis*, 17:365, doi: 10.1186/s12879-017-2457-y, 2017.
- 6) 水越文徳 他、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、栃木県保健環境センター年報平成 28 年度版、22、37-40、2017.
- 7) 水越文徳 他、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）、栃木県保健環境センター年報平成 29 年度版、23、42-45、2018.
- 8) 秋山徹他、結核菌のゲノムを包括的に解析するオンライン解析システムを構築 (<https://www.ri.ncgm.go.jp/research/pickup/20150109/index.html>) [cited 2nd August 2023].
- 9) Iwai H et al., 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.
- 10) Katoh K et al., MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability, *Mol Biol Evol*, 30, 772-780, 2013.

- 11) Kumar S et al., MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Mol Biol Evol*, 33, 1870–1874, 2016.
- 12) World Health Organization, Switzerland. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. 2021 (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>) [cited 2nd August 2023].
- 13) Walker TM et al., The 2021 WHO catalogue of *Mycobacterium tuberculosis* complex mutations associated with drug resistance: A genotypic analysis. *Lancet Microbe*, 3, e265–e273, 2022.
- 14) 栃木県ホームページ、栃木県外国人住民数現況調査結果(令和4(2022)年12月31日現在)について(<https://www.pref.tochigi.lg.jp/f04/kouhou/juaminsuu2022.html>) [cited 2nd August 2023].
- 15) Mizukoshi F et al., Molecular Epidemiology of Drug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* in Japan. *mSphere*, 6:e0097820, doi: 10.1128/mSphere.00978-20, 2021.