

日本、中国、韓国および台湾で分離される結核菌の一塩基多型 (SNP) を用いた型別

研究分担者 加藤誠也 結核予防会結核研究所 副所長
研究協力者 前田伸司 結核予防会結核研究所 抗酸菌部
結核菌情報科 科長

研究要旨

東アジアに位置する日本、中国、韓国、台湾では、多くの人が観光・ビジネスでそれぞれの国を訪れている。その際、人の移動に伴い結核をはじめとした感染症も輸入・輸出されている可能性がある。日本では結核患者の約 5%が外国出生であるが、結核菌の由来を明らかにすることは対策上重要であることから、それぞれの国内で広まっている結核菌の特徴を調べて比較することにした。東アジアでは結核罹患率が先進諸国に比べて高く、結核菌の型別では台湾を除き北京型結核菌の割合が高いなどの特徴を持っている。各国の分子疫学担当者との会議を持ち、各国で広まっている結核菌の遺伝的系統の違いを明確にするために、次世代シーケンサーを用いた解析から報告されている一塩基多型 (SNP) 分析法を利用した型別法で結核菌の解析を行った。本研究で樹立した SNP システムは、リアルタイム PCR を利用して 23箇所の SNP を検出するもので、結核菌を網羅的に解析することができる。今までの型別法では、北京型結核菌は NTF 領域への IS6110 の挿入の有無で、ancient型と modern型の 2グループにしか分けることができなかった。しかし、本 SNP 分析システムで日本と台湾からの結核菌を分析すると、少なくとも ancient型は 4グループ、modern型も 5グループに分けることができた。このような解析により、各国で広まっている結核菌の特徴を明らかにすることができるので、今後注目する結核菌が由来した国等の推定も可能となると考えられる。

研究協力者

韓国

Dr. Park, Young-K il 分子疫学部長 韓国結核研究所

中国

Dr. Zhao, Yan-L in 結核研究部長 中国疾病管理予防センター (CDC)

Dr. Mei, Jian 結核部門長 上海市疾病管理予防センター (CDC)

Dr. Gao, Q ian 微生物教室 教授 上海 Fudan 大学医学部

台湾

Dr. Jou, Ruwen 抗酸菌部部長 台湾疾病管理予防センター (CDC)

日本

岩本朋忠 神戸市環境保健研究所

和田崇之 長崎大学熱帯医学研究所 国際保健学

A. 研究目的

観光やビジネス等に伴う人の移動によって結核を含めた感染症がアジア地域内の国々に広まる可能性が考えられる。

欧米諸国では既に反復配列多型 (VNTR) 法を利用した標準型別システムが、フランス

パスツール研究所の Supply らによって報告されている。また、北京型結核菌が他の系統と比べて病原性が高いこと、多剤耐性菌へ変化しやすいことなどが報告されている。一方、東アジアの国々では、欧米で主流となっている遺伝型の結核菌とは異なる北京型結核菌の

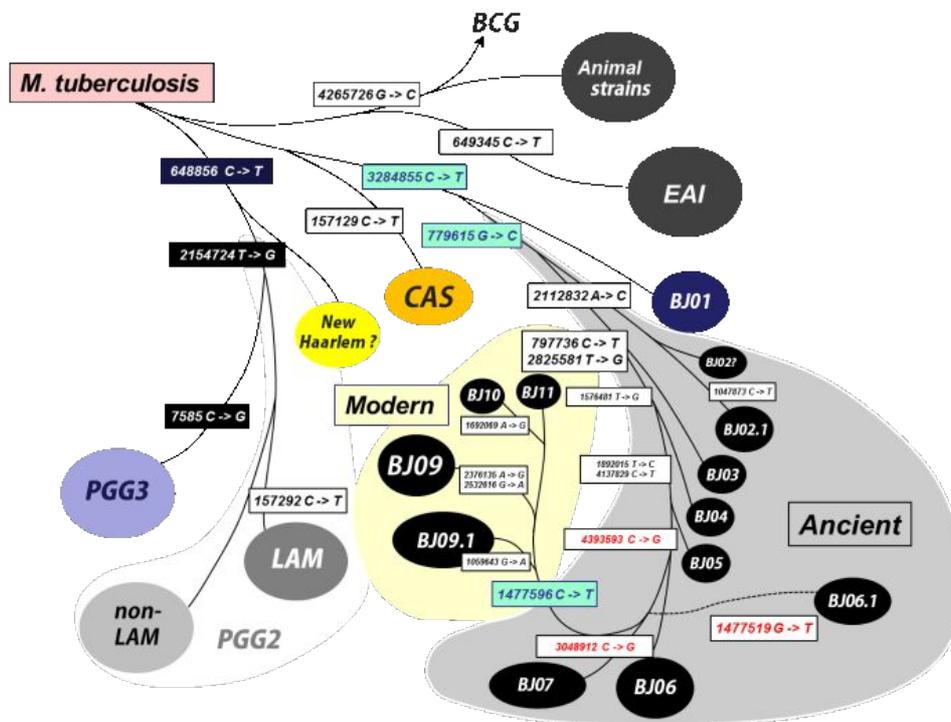


図1. SNPs を利用した結核菌の系統解析

23 箇所の SNP で分析することで結核菌は 21 のグループに分けることができる

割合が高く、この株に対する国際標準 VNTR システムでの型別能は低いことがわかっている。そのため、東アジア諸国で共通で利用できる結核菌型別システムの構築を目指して共同研究を開始した。

昨年までの研究で共通に利用できる反復配列多型 (VNTR) 分析システム (10-locus VNTR) を樹立した。また、各国で広まっている結核菌の遺伝型を網羅的に分析し、特徴を明らかにすることで、結核菌の由来や感染国の推定などに利用できると考えられる。このための型別法として、次世代シーケンサーによる結核菌の全ゲノム解析から得られた一塩基多型 (SNP) を用いた型別法を利用した分析システムの構築を進めた。SNP は結核菌の遺伝系統に応じて発生し、蓄積されていくことから VNTR のような亜種型別ではなく、もっと安定した遺伝系統 (型別情報) を提供するものと期待される。

各国、各地域から結核分子疫学を専門とする研究者を集めて会議を開き本研究について議論を行った。東アジア国々で共通の SNP 解析や VNTR 分析システムを構築し、型別情報の蓄積と情報交換ができれば、例えば、各国

で広がっている多剤耐性菌や病原性の高い株の型別情報を迅速に共有することができる体制をつくることのできる。

B. 研究方法

リアルタイム PCR を利用した SNP 分析システムの構築

次世代シーケンサーを使った結核菌株の分析から明らかになった SNP 部位を遺伝系統毎に選択して、結核菌を遺伝系統的に型別する SNP 分析システムを作成した (図 1)。SNP 部位の塩基は、リアルタイム PCR を利用した分析系で検出した。本システムを使って各国で分離された結核菌 (200 株以上) の解析を行った。

日中韓台分子疫学研究会議

平成 26 年 1 月 14-15 日、東京都清瀬市、結核研究所で分子疫学担当者会議を開催した。SNP 解析については、結核研究所で樹立した 23 か所の全系統の結核菌を網羅的に分析できるシステムを採用した。本研究所で各 SNP 部位の塩基検出のためのリアルタイム PCR 用のプライマーやプローブ及び変異の入った

表. 北京型結核菌と非北京型結核菌を分ける 3284855 部位と 779615 部位の SNP 解析

各部位における SNP 分析でスポリゴタイピング結果と一致した株数と一致率

Spoligotyping	SNP position	
	3284855	779615
Beijing	318 (100%)	318 (100%)
non-Beijing	313 (98.4%)	318 (100%)

陽性コントロールを準備して参加施設に送付した。

C. 研究結果

1. SNP タイピング用のプローブの型別能力の確認

リアルタイム PCR で SNP 分析する 23 箇所について、タカラバイオ (株) のサイクリングプローブあるいはライフテクノロジーズ (株) の TaqMan MGB プローブを合成した。サイクリングプローブを最初に選択し、プローブがデザインできない場合や確認実験で SNP を検出できないロークスは、MGB プローブに変更するなど再合成を試みた。そして 23 箇所すべての SNP サイトの変異を検出できる分析系を構築した。SNP 分析での野生型陽性コントロールとして H37Rv のゲノム DNA が使用できる。しかし、分析用の変異型陽性コントロールが無いので、各ロークスの変異型陽性コントロール DNA も作成した。

2. SNP 解析のローサイ

北京型結核菌と非北京型結核菌を区別する SNP として今まで 3284855 を使用していた。しかし、最近、中島らによって新しい 779615 部位の SNP が報告された。どちらの SNP 部位が型別に適切か検討を行った。スポリゴタイピングで北京型と判定された 318 株と非北京型と判定された 318 株について、3284855 と 779615 の SNP 分析を行い型別しスポリゴ

タイピングの型別結果と比較した (表)。

779615 位を使った型別では、北京型と非北京型ともすべての例でスポリゴタイピング結果と一致した。一方、3284855 部位の SNP 型別では、318 株の非北京型結核菌株の内、313 株はスポリゴタイピング結果と一致したが、5 株は本部位の SNP 分析で北京型と判定され、1.6% が不一致となった。

3. SNP 法による分析

日本 (東京都内: 191 株) と台湾 (210 株) で分離された結核菌について本 SNP システムで分析した。779615 位で北京型と非北京型、北京型はさらに 1477596 位の分析で ancient と modern 型のへ型別を行い、結核菌を 3 グループに分けた。各グループはさらに非北京型は 7 箇所、北京型 ancient は 10 箇所、北京型 modern は 4 箇所の SNP 部位の分析を行った。東京と台湾で分離された結核菌について、北京型 ancient と北京型 modern についてサブタイプの存在比を比較した (図 2)。

東京で分離された北京型 ancient 株は、大きく 4 グループに分けることが可能で最大グループは BJ06- I サブグループで 36.4% であった。台湾で分離された ancient 株も、4 グループに分けることが可能で最大グループは東京の場合と同じく BJ06- II で 30% であった。台湾で 20% を占めている BJ06- I と BJ07- III は日本では 2% しか存在していなか

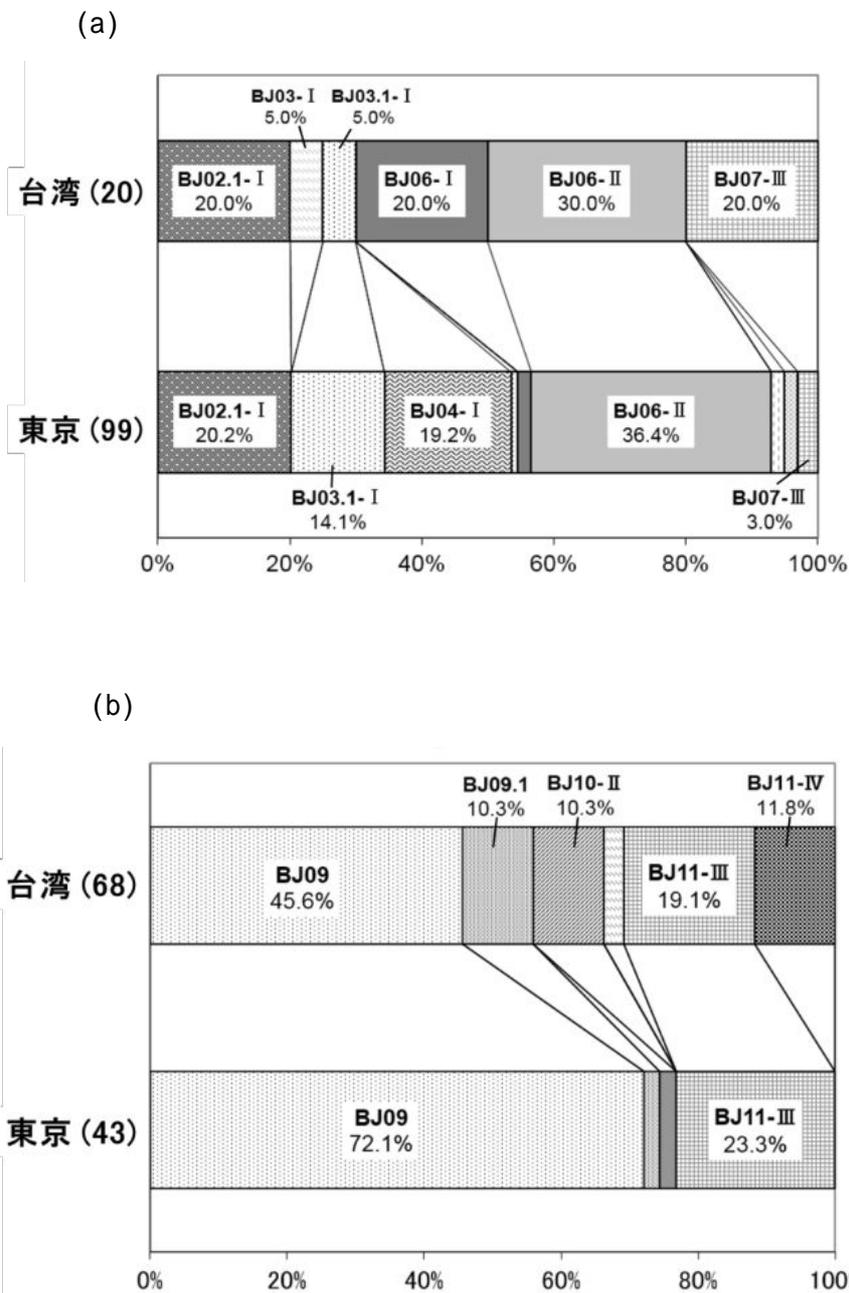


図 2. 樹立した SNP 分析システムを用いた結核菌の分析

779615 部位と 1477596 部位の SNP を調べることで結核菌を非北京型、北京型 ancient (a)、北京型 modern (b)に分けて、それぞれのグループ毎に SNP 解析を行った。各グループ内で SNP 分析により型別できたサブグループの割合を示した。

った。また、BJ04-Iグループは台湾では存在せず、日本だけで存在（全体の 19.2%）する型の結核菌であることがわかった（図 2-a）。

日本の modern 株の分析では、BJ09（72.1%）と BJ11-III（23.3%）の 2グループで大部分を占めていた。台湾の modern は BJ09型が 45.6%で最も多く、他に 4つのサ

ブタイプが存在した。また、BJ11-IV型は、台湾で 11.8%占める型であるが、日本では検出されなかった（図 2-b）。同じ北京型 ancientあるいは北京型 modernのグループの結核菌でも、分離された地域によってサブタイプの種類やその割合が異なることが明らかになった。

今までの型別法では NTF領域への IS6110

の挿入の有無で、北京型結核菌は ancient型と modern型の 2グループにしか分けることができなかった。しかし、本 SNP分析システムで日本と台湾からの結核菌を分析すると少なくとも ancient型は 4グループ、modern型も 5グループに分けることができた。

4. 会議での合意事項

本研究所で樹立した SNP分析システムで、それぞれの地域で分離された最低 200株の結核菌を分析しデータを 5月までに送るということで合意が得られた。その分析のために必要なデザインしたプローブや試薬を本研究所が準備して供給することにした。

D. 考察

北京型結核菌と非北京型結核菌を区別する SNP 部位に関して検討した結果、3284855位の分析では一部の非北京型結核菌が北京型と判定され、本部位の SNP は結核菌の Lineage-2 の分岐と関連していることが明らかになった。一方、最近報告された 779615位の変異は、北京型結核菌の定義であるスポリゴタイピングの結果と一致していることが本研究から確認できた。そのため、今までは、3284855 位を北京型と非北京型を区別する SNPとして使用していたが、今後は 779615位を用いて分析することにした。また、3284855 位は、引き続き非北京型結核菌の SNP型別に利用することにした。

完成した 23箇所の SNP分析システム（各ローカスは、野性型と変異型の 2種類のプローブ、PCRプライマー、変異型用コントロールからなる）及び分析用試薬を既に各国の施設に送付した。各施設では、地域内で分離された結核菌（200株以上）を分析し、得られた型別データを平成 26年 5月までに提供してもらうことで合意を得ている。このように、共同研究によって共通な手法を利用してそれぞれの地域の結核菌を解析することで、各国で広まっている結核菌を直接比較することができる。その結果、それぞれの地域での特徴を明らかにすることができる。今後、本システムの有用性が確認され、本会議参加国だけでなく他のアジアの国々で広く活用できるよ

うになれば、各地域における結核菌の伝搬状況や由来地域等の推定に関する研究も飛躍的に進展すると期待される。

E. 結論

人の移動が活発になり、感染症が流入する可能性が高まっている。アジアの国や地域で共通で利用できる型別法（VNTR や SNP など）が開発され、それぞれの国で広まっている結核菌の特徴を明らかになれば、結核菌が由来した国（将来的には感染した国や地域など）を推定することができると考えられる。また、近隣諸国で問題となっている病原性の高い結核菌や多剤耐性結核菌などを特定して遺伝子型情報を共有することができれば、注意すべき高病原性結核菌の流入を早期に把握するための国際的な監視システムの確立が可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし