

## [ ] 日本、中国、韓国および台湾で分離される結核菌の型別解析

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、台湾では近年、ビジネスや観光で多くの人々がそれぞれの国を訪れている。そのため、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。これらの地域では、台湾を除き北京型結核菌の割合が高いという共通の特徴を持っている。また、結核罹患率は先進諸国に比べて高く、罹患率を低下させるためには今後も精力的な対策が必要である。このような対策のひとつとして、各国の分子疫学担当者との会議を持ち、型別データを共有できる 10-bcusの反復配列多型 (VNTR) システムを構築した。また、次世代シーケンサー (NGS) を用いた結核菌の全ゲノム解析から報告されている一塩基多型 (SNP) を利用して、結核菌を遺伝系統的にグループ分けできる新しいシステムの構築を行った。共通な型別システムを用いて各国で分離された結核菌を分析することでデータを直接比較することが可能となる。その結果、各地域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。本研究で樹立した SNP 分析システムは、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、分離された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 I 6110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の由来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 i 分子疫学部長 韓国結核研究所

#### 中国

Dr. Zhao, Yan-L i n 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

近年、日本から中国、韓国、台湾への渡航及びこれらの国からの来日者が増加している。これら人の移動に伴い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も考えられる。また、台湾を除きこれらの国々では、北京型結核菌がそれぞれの国内で広まっているという共通の地域性があり、他の地域とは異なる特徴を持っている。そこで、東アジア諸国内で共通で利用できる結核菌型別システムの構築を目的として共同研究を開始した。結核菌の型別法として、比較が難しい I 6110制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析ではなく、迅速で容易に型別結果を比較できる反復配列多型 (VNTR) 分析法を採用した。VNTR分析では、分析ローカスの選択が分解能を決定する上で最も重要である。将来のデータベース化および型別データの比較には共通のローカスで結核菌の型別を行う必要があり、それぞれの研究者間でコンセンサスを得る必要がある。また、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。各国で既に広まっている結核菌の系統情報を調べることで、それぞれの地域の結核菌の特徴が判明すると期待される。

東アジア諸国で共通の 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共有することができる。

### B. 研究方法

#### 日中韓台分子疫学研究会議

平成 23年 9月 1日、平成 24年 12月 10-11日、平成 26年 1月 14-15日と全体で 3回、結核菌の分子疫学担当者会議を開催した。VNTR分析は株ごとに複数ローサイを PCR にかけて、得られた PCR 産物の分子量を測定し、コピー数に換算する必要がある。しかし、SNP 解析なら最初にプローブとプライマーの設計さえ行えば、リアルタイム PCR の系で簡単に分析・型別することができる。本研究所でまとめ



**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%)

これら 2箇所の分析で結核菌は、非北京型、北京型 (ancient)、北京型 (modern) の 3つのグループに区別することができた。3つのグループは、非北京型結核菌はさらに 7箇所の SNP 分析、北京型 (ancient) はさらに 10箇所、北京型 (modern) はさらに 4箇所の SNP 分析を行うことで遺伝的背景に基づき、全体を 21 のサブグループに分類することができた。

#### 4. 各国で分析する株について

各国で 200 株程度の結核菌を分析することとした。各国結核菌のサブグループの存在比等の比較を行うためには、一定期間内に分離された population-base の株を用いる必要があるが、本システムが国際比較に活用可能であるか等、有用性を早く検証することを優先して各国の事情に応じて出来るだけバイアスがかからないように株を選択することとした。

#### 5. 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別の SNP 部位の分析を行った。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。

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-II サブグループで 36.4% であった。一方、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都同じく 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-N 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、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。

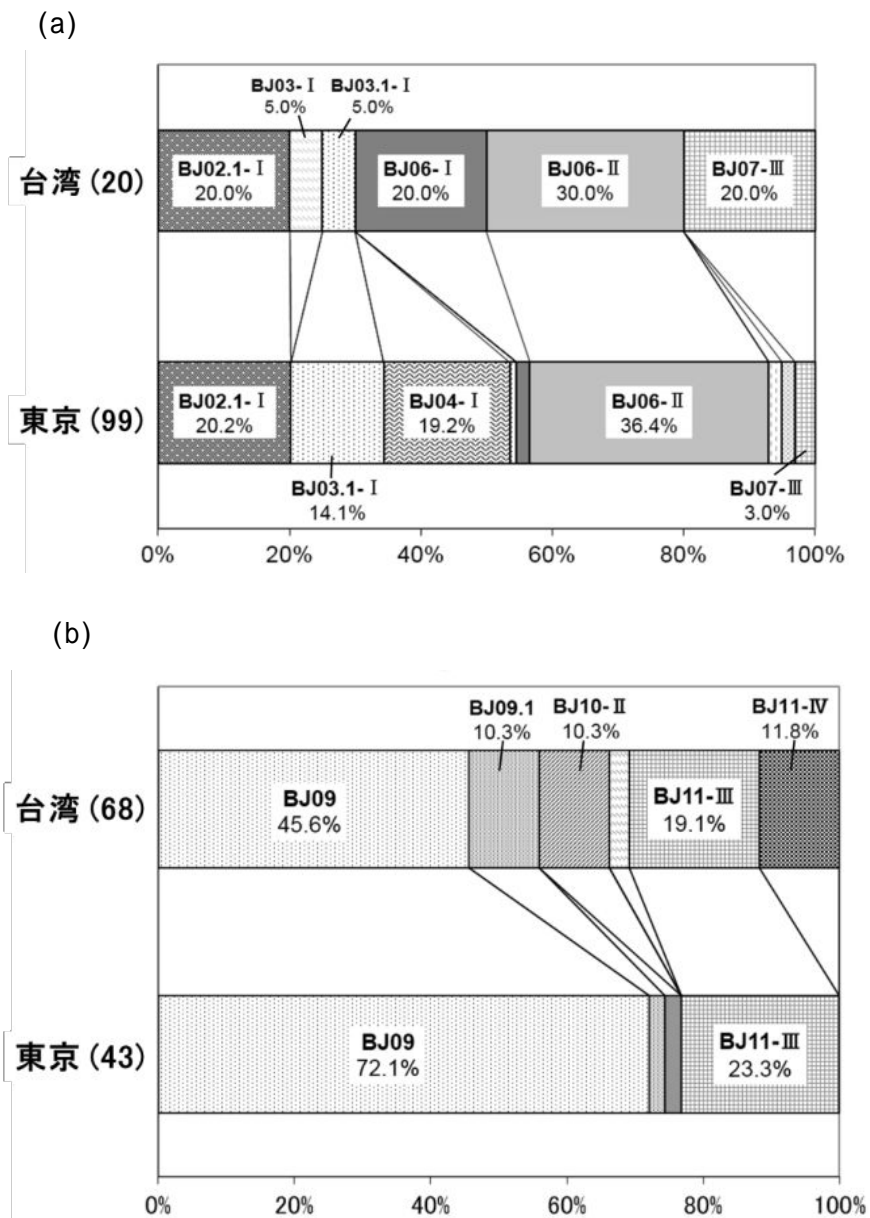
#### 6. 会議での合意

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平成 26 年 5 月まで本研究所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。試薬類は平成 26 年 2 月に送付済である。

#### 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 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、今まで使用していた 3284855 位ではなく、今後は北京型と非北京型を区別する SNP として 779615 位の SNP を利用して分析を進めることとした。また、3284855 位は、今後も非北京型結核菌の型別のための SNP 部位として利用することにした。

完成した 23 箇所の SNP 分析システム (各ロークラスは、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



**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。

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、各地域で広まっている結核菌の遺伝的な特徴を明らかにできる。実際に、東京と台湾で分離された結核菌を SNP 分析すると同じ北京型 ancient や北京型 modern でも分離された場所によってサブタイプの

種類やその組成が異なることが明らかになった。特定の地域で特異的にみられる遺伝型が判明すれば、感染した地域の推定も可能となると考えられる。

本システムが確立され、広く活用できるようになれば、より簡便に系統解析が可能になり、それぞれの国や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。今後、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すれば、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監視可能な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共通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