

結核菌株の遺伝背景と臨床・疫学・細菌学的特徴との関連性の解明

岩本 朋忠 神戸市環境保健研究所・微生物部・副部長

研究要旨

薬剤耐性化の代償である生物的負荷(生存能力の低下)を軽減する遺伝子変異(*rpoC* 遺伝子での二次変異)に着目し、我が国で分離される多剤耐性結核菌の潜在的な感染拡大リスクを評価した。本研究により、本邦の多剤耐性結核菌は諸外国に比して高率に *rpoC* 遺伝子変異を有し、感染拡大能力の高い株が多く存在することが示唆された。また、*rpoC* 変異を有する特定の株が大阪湾岸で感染拡大していることを明らかにした。リファンピシン耐性関連遺伝子である *rpoB* 遺伝子の変異箇所と *rpoC* 遺伝子変異の関連性を調べたところ、*rpoC* 変異は *rpoB* コドン 531 変異株ではほぼ独占的に検出された。両遺伝子間の強い相互作用を示唆するものといえる。一方、*rpoB* コドン 516 に変異を持つ感染拡大株は、*rpoC* 遺伝子に変異が認められなかった。*RpoB* コドン 531 変異株以外の株で有利に働く未知の二次変異の可能性を示すものと思われる。再排菌事例株で、*rpoC* 遺伝子変異を新規に獲得した株が検出された。多剤耐性結核菌では、再発時の菌株と初発時の菌株の異同性を判断するのに、遺伝子型別の一致のみでは不十分であり、新たな薬剤耐性変異や二次変異の獲得についても今後注視する必要があるだろう。

研究協力者

吉田 志緒美 (近畿中央胸部疾患センター)

A. 研究目的

結核の多彩な疫学像・臨床像の根源となる結核菌株個性の多様性をゲノム情報と関連付けて解明することで、公衆衛生上の対策に資することを大目的としている。本年度は多剤耐性結核菌の全ゲノム情報データの蓄積から見出された二次変異、すなわち、薬剤耐性関連遺伝子の変異により低下した生存能力を回復させる補填的変異の保有状況の解明を目指した。多剤耐性結核菌のもつ潜在的な感染拡大能力を菌株レベルで評価しうるものであり、今後の診断・治療・感染対策への活用が期待される。

B. 研究方法

1. 供試菌株

神戸市結核菌バンク事業により収集した多剤耐性結核菌 36 株と大阪府で分離された多剤耐性結核菌 16 株の計 52 株を使用し、*rpoB* ならびに *rpoC* 遺伝子の変異を検出した。50 名の患者からの分離株であり、同一患者 2 名の再排菌株を含めた。また、感染拡大株検出の目的で、近畿中央胸部疾患センターにて 2001-2008 年に分離された多剤耐性結核菌 98 株の遺伝型別解析を行った。

2. 遺伝子変異解析

リファンピシン耐性関連遺伝子である *rpoB* のホットスポット領域 81bp (RRDR) の塩基配列を解析し、リファンピシン耐性関連変異を検出した。生存能力の補填的変異として、*rpoC*

遺伝子の変異に着目し、RpoA-RpoC interaction area を含むアミノ酸ポジション 240-822 の塩基配列 (1749nt) を解読した。

3. 感染拡大株の検出

多剤耐性結核菌 98 株の 15-MIRU-VNTR 解析を行った。クラスター形成株については IS6110-RFLP による二次解析を行い、最終的に 10 株からなるクラスターを形成する感染拡大株を 2 株特定した。

4. 比較ゲノム解析

既知の補填的変異が検出されなかった感染拡大株 1 株について全ゲノム解析を行った。イルミナ HiSeq を用いて、全ゲノム領域の数百倍に相当する配列情報を取得し、結核菌 H37Rv 株の既知ゲノム塩基配列を参照配列とした全ゲノムマッピング解析によって点置換変異を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた菌株は全て番号化することで、個人情報の特定が不可能となるように配慮した。

C. 研究結果

RpoC 遺伝子変異の検出

コドン 591 のグルタミン酸からグルタミンへの変異(E591Q)が、北京型株の亜系統群である STK に特有の変異であることを新たに確認した。E591Q を含む遺伝系統群固有の *rpoC* 変異は、薬剤感受性株・耐性株いずれにおいても検出される変異であるため、薬剤耐性化に伴う補填的変異として出現する二次変異とは区別する必要がある。以降の我々の解析からは、遺伝系統群固有の変異は対象外とした。

52 株の多剤耐性結核菌のうち、22 株 (42.3%) で *rpoC* 遺伝子のアミノ酸置換を伴う非同義置

換が検出された(表 1)。この値は、諸外国の状況(20-30%) に比べて高く、わが国の多剤耐性結核菌は潜在的な感染拡大リスクが高いものと思われる。北京型株と非北京型株間には *rpoC* 遺伝子変異保有株の割合に違いは認められなかった (42% vs 44%)。一方、北京型株内の亜型間で比較すると、初期祖先型株(ST26)と新興型株でそれぞれ 77.8% (7/9), 44% (4/9)と他の亜型(後期祖先型株, STK, ST3, ST19)の 26%に比べて高い値を示した(表 1)。

今回検出された *rpoC* 遺伝子の非同義置換の内訳は、遺伝系統固有の *rpoC* 変異を除いて、12 か所のコドンで合計 15 種類であった(表 1)。これらの変異は、全ての遺伝系統群を網羅した薬剤感受性菌株セットでは検出されなかったことから、薬剤耐性化に伴い出現した変異であると判断できる。これら 15 種類の変異の内、5 種類の変異は、今回の解析により初めて特定されたものである。同一コドンでの複数の変異がコドン 332, 416, 483 で認められた。また、コドン 332 のグリシンからセリンへの変異(G332S)とコドン 483 のバリンからグリシンへの変異(V483G)は、異なる複数の遺伝系統で検出された(表 1)。これらの結果は、*rpoC* 遺伝子の変異が、遺伝系統分岐とは独立した、何らかの選択圧により引き起こされた変異であることを強く支持するものである。

リファンピシン耐性関連遺伝子である *rpoB* 遺伝子の変異と補填的変異である *rpoC* 遺伝子の関連性を調べたところ、*rpoB* コドン 531 変異株 27 株の内 21 株(77.8%)で *rpoC* の非同義置換が検出された。*RpoC* 変異株 22 株中 21 株が *rpoB* コドン 531 の変異を有するという結果であり、両遺伝子変異での相互作用が強く示唆される。

再排菌事例株として、同一患者から 7 年の間隔を隔てて分離された株(2 事例)について *rpoB*,

rpoC の変異を調べた。*RpoB* コドン 526 に変異を持つ株では、初発と 7 年後いずれの株にも *rpoC* 変異は認められなかった。一方、*rpoB* コドン 531 に変異を持つ株では、初発株には *rpoC* 変異は存在しなかったが、7 年後の株で *rpoC* 変異の存在が認められた。*RpoB* 変異に引き続いて出現する二次変異を臨床分離株で直接的に捉えた興味深い事例である。なお、いずれの事例株も、初発と 7 年後の株で、VNTR 遺伝子型は完全に一致しており、外来性の再感染は否定された。

感染拡大株の特定と詳細解析

大阪府下で分離された多剤耐性結核菌 97 株を 15-MIRU-VNTR ならびに IS6110 RFLP 解析したところ、10 株からなるクラスターを形成する株が 2 株検出された (Fig. 1: Large cluster A, B)。これらのクラスター形成株は、神戸市内分離株からも検出されており、大阪湾岸地域で感染拡大した多剤耐性結核菌と考えられる。Large cluster A 株は北京型株の初期祖先型 (ST26) であり、*rpoB* コドン 531 の変異と *rpoC* コドン 332 の変異を有することが確認された。一方、large cluster B 株は北京型株の後期祖先型 (ST3) であり、*rpoB* コドン 516 に変異を持つが、*rpoC* に変異は認められなかった。*RpoC* 以外の未知の補填的変異の存在の可能性を示唆するものである。この株については、全ゲノム解析を行い、未知遺伝子変異の詳細解析を行っている。これまでの解析で、何らかの関与が疑われる変異として、*rpoB* の RRDR 領域外にサイレントミューテーションが検出されている。

D. 考察

次世代シーケンサーの活用により、過去数年間で、結核菌の全ゲノム情報の蓄積が爆発的に

進んだ。その結果、結核菌が薬剤耐性獲得の代償として受ける生物的負荷(生存能力の低下)を軽減する遺伝子変異として、*rpoC* 遺伝子の非同義置換変異が特定された(Comas et. al. Nature Genetics vol. 44, 106-112)。薬剤耐性結核菌の感染拡大リスク評価の指標として今後、臨床・公衆衛生の場で活用されるものと思われる。

本研究では、まず、わが国の多剤耐性結核菌での *rpoC* 遺伝子変異の分布状況を解析し、さらに、その遺伝系統別出現頻度、*rpoB* 遺伝子変異との関連性、再発事例株での変異の有無、そして、実際の感染拡大株での変異の検出を行い、次の点を明らかにした。1) 我が国の多剤耐性菌は潜在的に感染拡大能力の高い株の比率が高い (*rpoC* 変異保有率 42.3%)、2) 北京型株と非北京型株との間に *rpoC* 遺伝子変異保有株の割合に違いは認められなかった (42% vs 44%)。一方、北京型株の亜系統群別の比較からは、初期祖先型株 (ST26) と新興型株で変異保有率が高いことが示された、3) *RpoC* 遺伝子の変異は、*rpoB* のコドン 531 変異株にほぼ独占的に出現しており (95.5%, 21/22)、両遺伝子間の相互作用が強く示唆された、4) 再発事例株の結果から、*rpoC* 遺伝子変異は *rpoB* 遺伝子変異出現後の二次変異として出現することが臨床分離株で確認された、5) *rpoB* コドン 531 に変異を持つ、感染拡大株 (large cluster A) で *rpoC* 変異が確認された。一方、*rpoB* コドン 516 に変異を持つ感染拡大株 (large cluster B) では *rpoC* 変異は検出されず、未知の補填的変異の存在が示唆される。

本研究により、本邦の多剤耐性結核菌が、高率に *rpoC* 遺伝子変異を有し、また、その変異のバリエーションも高いことが示された。感染拡大能力の高い株が多く存在することを示すものといえる。実際に、大阪湾岸地域において

は、遺伝型別解析により巨大クラスター (large cluster A, B) が検出されており (Fig. 1)、その原因の解明と対策は、公衆衛生上の緊急課題といえる。Large cluster A 株については、*rpoC* 遺伝子の変異が認められており、補填的変異獲得の有利性を反映しているものと考えられる。一方、large cluster B 株については、*rpoC* 変異は認められなかった。その一つの理由として、*rpoB* 変異と *rpoC* 変異の相互作用が考えられる。我々のデータは、*rpoC* 変異は *rpoB* コドン 531 の変異と非常に強い関連性を示した。実際、large cluster A 株は *rpoB* コドン 531 変異株であるのに対して、large cluster B 株はコドン 516 変異株であった。すなわち、補填的変異として検出された *rpoC* 変異は、*rpoB* コドン 531 変異株に特徴的に出現する変異であり、*rpoB* 531 以外の変異による耐性菌については、未知の補填的変異が存在する可能性が高い。現在、我々は、large cluster B 株について、全ゲノム解析を行い、その可能性について検討を進めている。

再排菌事例で、初回時には認められなかった *rpoC* 変異が再排菌時分離株で認められたのは興味深い。慢性持続排菌や再排菌に対して、特に多剤耐性結核菌の場合は、遺伝型別解析のみで菌株の同一性を判断するのではなく、薬剤耐性関連遺伝子変異の変化、ならびに補填的変異の出現についても注意する必要があることを示す事例と言える。

現在、補填的変異保有株の疫学的特徴をさらに詳細に調べるために、対象を 200 株に増やし、解析を進めている。サンプル数を拡張した研究においては、*rpoC* 以外の補填的変異候補として報告されている *rpoA* 遺伝子の変異や *rpoB* 遺伝子の多重変異出現についてもデータ蓄積する予定である。また、クラスター形成株などについては、積極的に全ゲノム解析を行い、新規

の二次変異を検出したい。

E. 結論

本研究により、本邦の多剤耐性結核菌が、高率に *rpoC* 遺伝子変異を有し、また、その変異のバリエーションも高いことが示された。感染拡大能力の高い株が多く存在することを示すものといえる。実際に、*rpoC* 変異を有する特定の株が大阪湾岸で感染拡大していることを明らかにした。リファンピシン耐性関連遺伝子である *rpoB* 遺伝子の変異箇所と *rpoC* 遺伝子変異の関連性を調べたところ、*rpoC* 変異は *rpoB* コドン 531 変異株でほぼ独占的に検出された。両遺伝子間の強い相互作用を示唆するものといえる。一方で、*rpoB* コドン 516 に変異を持つ感染拡大株は、*rpoC* 遺伝子に変異が認められなかった。*RpoB* コドン 531 変異株以外で有利に働く未知の補填的変異の可能性を示すものである。再排菌事例株で、*rpoC* 遺伝子変異を新規に獲得した株が検出された。多剤耐性結核菌では、再発時の菌株と初発時の菌株の異同性を判断するのに、遺伝子型別の一致のみでは不十分であり、補填的変異などの新たな変異の獲得についても注視する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjian B, Aye KS, Ling H, Hattori T, **Iwamoto T**, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y and Matsuba T. Simple multiplex PCR assay for identification of Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* isolates with a lineage-specific mutation in Rv0679c. J. Clin. Microbiol. 51:2025-2032, 2013
- 2) **Iwamoto T**, Arikawa K, Nakajima C,

Nakanishi N, Nichiuchi Y, Yoshida S, Tamaru A, Tamura Y, Hoshino H, Yoo H, Park YK, Saito H and Suzuki Y. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Infect. Genet. Evol.* 21:479-83, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表

- 1) 岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子, 藤山理世, 松林恵介, 山下真理子, 水尻節子, 白井千香, 伊地智昭浩. 結核分子疫学への新技術「次世代シーケンサー」活用の基礎的検討. 第111回日本結核病学会 近畿地方会, 2013年7月13日、大阪
- 2) 有川健太郎, 中西典子, 岩本朋忠, 藤山理世, 松林恵介, 山下真理子, 水尻節子, 白井千香, 伊地智昭浩. 神戸市における外国人結核の分子疫学
第111回日本結核病学会 近畿地方会, 2013年7月13日、大阪
- 3) 岩本朋忠, 有川健太郎, 吉田志緒美, 露口一成, 鈴木克洋. BCG ワクチン接種副反応事例から得た BCG Tokyo 172-1 株に生じた遺伝子変異の検出
第44回 結核・非定型抗酸菌症治療研究会, 2013年12月8日、東京
- 4) 岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子, 瀧井猛将. ワクチン接種副反応患者の生体内で起こった BCG Tokyo 172 株の微小進化
第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日、東京
- 5) 有川健太郎, 中西典子, 岩本朋忠. 結核菌分子疫学による地域内蔓延株の網羅的解析ならびに外国人結核との比較
第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日、東京

表1. 多剤耐性結核菌で検出された*rpoC*遺伝子の非同義置換とその遺伝系統別分布

<i>rpoC</i> 変異	北京型株					非北京型株	
	ST26	STK	ST3	ST19	Modern	LAM	T
G332D					1		
G332S	3						2
N416S			1				
N416T			1				
V483A					1		
V483G	1			1			
I491V				1			
L507V			1				
V517L						1	
A521D					1		
H525Q					1		
L527V	3						
S561P				1			
D747G		1					
L774V							1
no mutation	2	4	8	8	5	1	4

STKの遺伝系統に固有の非同義置換 (E591Q) を除く。

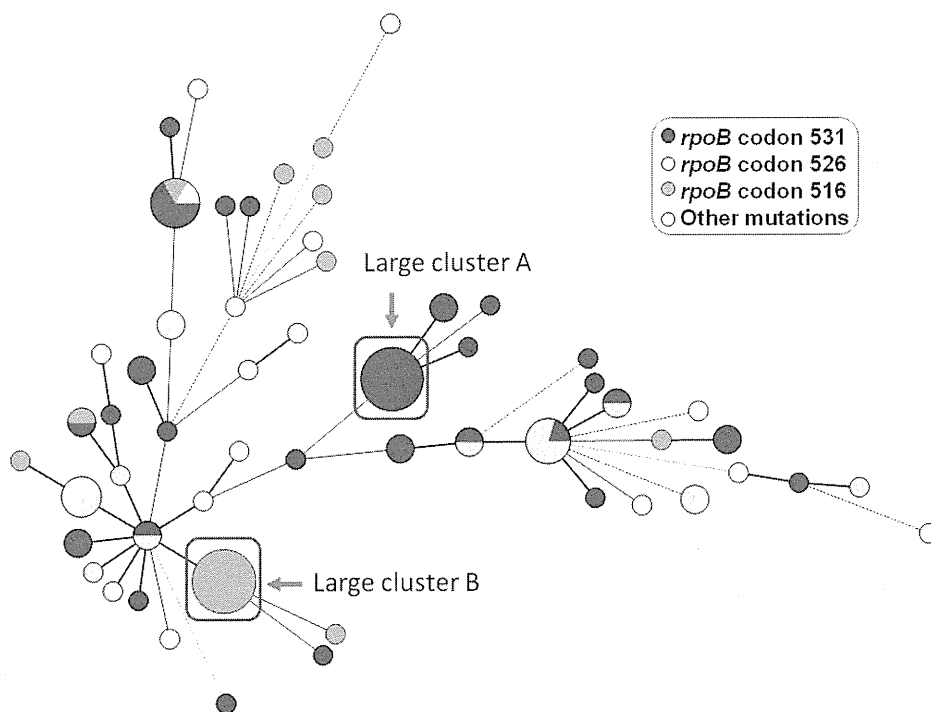


Fig. 1. 多剤耐性結核菌97株の15-MIRU-VNTRによるMinimum spanning tree

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症 研究事業）
研究分担報告書

多様な研究シーズを想定した結核菌臨床分離株のゲノム情報集積

和田 崇之 長崎大学熱帯医学研究所国際保健学 助教

研究要旨

結核菌の臨床分離株には遺伝的多様性があり、各菌株には点変異や遺伝子欠損など、様々な個性がゲノムレベルで存在している。こうした違いは病原性に関する遺伝学的理解や菌株間の異同判定に活用でき、新しい研究シーズとして活用しうる。本年度は、本邦において普及が進んでいる「VNTR 型別に基づく分子疫学」において注目される2つの事象、すなわち、①「全国広域的かつ持続的に分離される VNTR 型別一致株」、②サーベイランス調査内で見いだされる「疫学的リンクを持たない VNTR 型別一致株」に着目し、菌株の異同性、関連性を分析することを目的とした。「M株」は全国的に継続して分離されることから、大規模な集団感染といった疫学的要因に加えて、菌側の遺伝的要因による高病原性・高伝播性が懸念されている。そこで、ゲノム比較に基づいてM株（10株）の共通変異を調べ、同株の新しい定義とすることによって VNTR 型別の偶発的変異に左右されない検出方法とした。同手法によってサーベイランス株 2,410 株のうち 52 株がM株として同定され、株固有のゲノムバリエーションを活用した系統分類によって全国的な拡散と地域的な拡散を区別して調査しうる可能性が示唆された。

研究協力者

林 哲也（宮崎大フロンティア科学実験総合センター・微生物ゲノム科学分野・教授）
小椋 義俊（同・助教）
阿彦 忠之（山形県衛生研究所・所長）
瀬戸 順次（同・専門研究員）

究のみならず、公衆衛生上で患者間の伝搬経路を推定するための重要な根拠となりうる。

近年、次世代シーケンサー（NGS, Next Generation Sequencer）の発達に伴い、結核菌でもゲノム塩基配列全域を対象とした解析（比較ゲノム）が容易になってきた。比較ゲノムでは、菌株ごとの遺伝的個性を網羅的に抽出・検索できるだけでなく、その変異情報を他の菌株と比較して検証することにより、極めて高精度な異同判定、相同性解析が可能となる。

本研究課題の目的は、臨床分離株の比較

A. 研究目的

罹患者から分離される病原体、すなわち臨床分離株には、菌株ごとに様々な遺伝子レベルの多型性がある。こうした「菌株の違い」は、病原因子や薬剤耐性獲得能といったような、喫緊の感染症対策に関わる研

ゲノムデータを効率的に蓄積し、我が国における結核菌の遺伝的多様性を効率的に網羅することである。変異情報を共同研究者と共有、公開することにより、様々な結核研究シーズとして役立てると共に、変異検出技術に応用することによって現行の遺伝型別法（VNTR法）の問題点が解消され、結核公衆衛生に寄与できるだろう。疫学上、何らかの菌株個性が推定されるケース（多剤耐性菌の市中伝搬や特定の患者集団における蔓延など）においては、母集団の変異情報をあらかじめ蓄積しておくことができれば、危険度の高い菌株の拡散阻止や、原因遺伝子の究明に繋がる。

本年度は、とりわけ公衆衛生上の進展を目指した。具体的には、我が国の結核分子疫学において注目される2つの事象、すなわち、①「全国的に持続的に分離されるVNTR型別一致株」（＝広域拡散性クラスター株、和田ら、結核(2012)）、②サーベイランス調査内で見いだされる「疫学的リンクを持たないVNTR型別一致株」に着目した。それぞれの事象について菌株を選択してゲノム比較を行い、各菌株間の異同性を調べることにより、それぞれの「真の伝播経路」を把握することを目的とした。

B. 研究方法

広域拡散性クラスター株（M株）の比較ゲノム解析. 広域拡散性クラスター株のうち、最も顕著な分離傾向を示すM株（Ohkado et al., BMC Infect Dis, 2009）を対象とした。5地域（山形、東京、大阪、神戸、沖縄）における結核分子疫学サーベイランスでVNTR型別によって同定されたM株（7株）を対象とした。加えて、接触調

査によって家族内伝播が疑われた事例から2株、同一患者から分離された多剤耐性化1株を加え、計10株を比較ゲノム対象とした。各株の変異箇所は、H37Rvを参照配列としたマッピング解析によって決定した。

これら10株に加え、先行研究によって近縁株であることが判明していた株（T85）のNGS配列情報をデータベース（TBDB: <http://www.tbdb.org/>）よりダウンロードし、同等の解析によって変異箇所を決定した。T85株の変異箇所をM株の共通変異から差分することにより、M株共通の固有変異を決定した。

M株の再定義とサーベイランス調査. ゲノム比較した10株に共通の変異（92か所）は、M株を他の株と区別するための遺伝マーカーとして活用できると考えられた。そこで、サーベイランス株（2,410株）を対象とした変異株調査を行った。まず、全株からM株と同じ系統群（新興型北京ファミリー）に属する菌株を既知の遺伝マーカーによって490株（20.3%）抽出した。次に、これらの菌株について、共通変異（92か所）のうち1か所（1757565 G->A）を選び、リアルタイムPCRで検出できるよう設計されたMGBプローブを用いてアレル解析を行った。

ゲノム情報に基づくM株のクローン内系統分類. ゲノム比較した10株の中でバリエーションが認められる変異（58か所）は、M株を詳細に細分化するための遺伝マーカーとして活用できると考えられた。そこで、上述したM株共通の変異を持つ52株について各変異領域をPCR増幅し、ダイレクトシーケンシングによって変異の有無を確かめ、その結果に基づいて系統分類した。系

統解析には、変異箇所に基づいてmaximum pulmonary treeを構築した。

サーベイランス調査内のVNTR型別一致株におけるゲノム比較. 山形県において実施されている結核分子疫学サーベイランス（瀬戸ら、結核、2013）を対象とした。2009-2011年に新規登録された266人中184人から分離された結核菌株において、24領域VNTRのうち23領域が一致した菌株（49株）を対象としてショートリード取得および変異比較を行うため、ゲノムDNAを抽出した。

倫理面への配慮. 本研究に供試された結核菌株は、共同研究者の所属機関において継続的に集積されたものである。各菌株については、個人情報特定されないように番号をつけ匿名化し、プライバシーに配慮した。本課題における菌株とその遺伝型別利用は、未知の結核感染源推定に重要な情報を与えるものであり、感染症法15条および17条により規定される「積極的疫学調査」に適合する。

C. 研究結果

M株の比較ゲノムとクローン性. 比較ゲノムにより見いだされた各株の変異に基づいて、菌株間の系統関係を確認した（図1）。共通祖先（図1の矢印）から各ゲノム解析株までに蓄積された置換変異数は最大13か所（kk2647株、2005年）に留まり、これら10株のクローナルな関係が認められた。疫学的リンクがある2株（OPSHおよびOPKH）間の置換変異は1か所のみであった。同一患者の耐性化事例では耐性関連遺伝子（2か所）にだけ変異が検出され、過去の同一患者由来株または直近の伝播にお

ける菌株同士の変異数が5個程度であるとした過去の報告（Walker, et al., Lancet Infect Dis, 2013）と一致した。一方で、それ以外の株同士のペアワイズ比較では7個以上の置換変異が見いだされ、直近の伝播よりも遠い関係が支持された。最も遠い株間（KK2647とFY21N052）では23か所の変異が見いだされており、分解能が高い24領域VNTRで一致した菌株間でも、NGS解析によってゲノム上に蓄積された菌株多様性を検出できることを示している。

M株のサーベイランス調査. M株に共通する変異を遺伝マーカーとしてサーベイランス株（2,410株）を調査したところ、52株に同変異が認められた。これらはすべてストレプトマイシン耐性であり、VNTR24領域が完全一致した株は35株（67.3%）にとどまった。これらの菌株の系統関係を確かめるため、比較ゲノムによって見いだされたM株内部変異（58か所）の有無を全菌株で確かめたところ、関西圏でのみ見出される1系統（II群）と、地域に関わらず分離される2系統（I、III群）に系統分類された（図2）。

ゲノム抽出プロトコルの改良. 結核菌株からのゲノムDNAの抽出には、細胞壁の効率的な脱脂、破碎が不可欠である。今年度はより多数の菌株から高精度ゲノムDNAを抽出するため、菌株保管機関からのスムーズな試料検体輸送と収率の良いプロトコルを確立する必要がある。そこで、山形県におけるサーベイランス解析クラスター形成株（49株）を用いて、菌体を小川培地から集菌後、メタノール・クロロホルムによる不活化・脱脂処理時に凍結し、非感染化させてから輸送することにより、以

後の抽出操作（リゾチーム、プロテイナーゼ処理および核酸精製）を収率よく行えることを確認した。本工程により、バイオハザードを懸念することなく試料輸送することが可能となり、煩雑な操作を培養・検査機関で実施する必要がなくなった。

D. 考察

公衆衛生領域における病原体ゲノム解析の導入は、NGSの発達に伴って容易に実現可能な状況にまで到達した。結核ではイギリスでの大規模解析 (Walker et al., *Lancet Infect Dis*, 2013) の他、Roetzer ら (PLoS Med, 2013) のドイツにおける型別一致株解析など、欧州での検討がいち早く進んでいるところである。わが国は現在中蔓延国であり、患者数の多さや超高齢化社会における過去の流行株による再発事例など、他の先進諸国とは異なるユニークな「菌事情」があり、ゲノム比較による臨床分離株の比較検討は結核対策において重要な知見を与えうるものとして期待される。

M株は VNTR 型別による菌株分類が困難であり、全国各地での分離が長期間にわたって報告されていることから、大規模な集団感染や排菌患者の長距離移動といった疫学的要因に加えて、菌株側の遺伝的要因による高病原性・高伝播性が懸念されている。本解析では、比較ゲノムによって見いだされた固有の変異情報に基づいて同株の再定義を行い、VNTR 型別が変化した場合においても株追跡を可能とした。さらに、M株内の微小なバリエーションを利用することにより、VNTR 型別では追跡できない菌株相同性を調査することが可能となった。結果として、M株内の3系統のうち、2系

統 (I、III 群) が関東・関西・沖縄などで広範に検出される一方で、1系統 (II 群) は関西で限局的に見いだされ、全国的拡散と地域的拡散を区別して調査できる可能性が示された。今後、臨床株のゲノムデータを地域単位、サーベイランス単位で蓄積することにより、詳細な伝搬経路推定が可能になるだろう。

地域単位での菌株サーベイランスにゲノム解析を導入するため、低罹患率地域である山形県における結核菌サーベイランスをモデルとして検討を開始した。年度内に具体的な異同判定をもたらすゲノム情報を獲得することはできなかったが、詳細なクラスター株の一致／不一致に関する情報から、菌株伝播に関する基礎情報が蓄積できるだろう。疫学調査に基づいて菌株伝播を仮定してから遺伝子情報によって裏付けを取るという従来の方向とは逆に、ゲノム情報によって伝播を確定してから疫学調査によってその要因を探ることが可能になり、これまでの結核公衆衛生を一新する研究展開が期待できる。

E. 結論

結核分子疫学において同一株と判定される結核菌臨床分離株は、比較ゲノム解析によって詳細な菌株間の違い、相同性などが分析できる。微小な違いを菌株判定の遺伝マーカーとして活用することにより、これまで判定できなかった個々の事例においても詳細な伝搬経路が推定できるだろう。こうしたゲノム情報の蓄積により、これまで実地疫学のみが担っていた伝搬経路調査を菌株情報から迫ることで、新たな公衆衛生上の知見が得られることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wada, T., Maeda, S. 2013. Multiplex agarose gel electrophoresis system for variable number of tandem repeats genotyping: Analysis example using *Mycobacterium tuberculosis*. Electrophoresis. 34(8): 1171-1174.
- 2) Tateishi, Y., Tamaru, A., Ogura, Y., Niki, M., Wada, T., Yamamoto, T., Hirata, K., Hayashi, T., Matsumoto, S. 2013. Whole-Genome Sequence of the Potentially Hypertransmissible Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strain OM-V02_005. Genome Announcement. 1(4): e00608-00613.

2. 学会発表

- 1) Maeda, S., Wada, T., Naka, T., Shibata, M., Fujiwara, N. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), especially Beijing genotype MTB, in Japan by using the variable-number of tandem repeats (VNTR) and a next generation sequencer (NGS). (NGS). The 5th EMBO meeting 2013, September 21 – September 24, Amsterdam, Netherlands.
- 2) 飛永祥平, 松本充生, 吉田志緒美 北市正則, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 林清二, 山本太郎, 和田崇之. 昭和初期における結核菌の薬剤耐性を探る-抗結核薬の変遷とその影響に関する考察. 第 54 回日本熱帯医学会大会 2013 年 10 月 長崎

- 3) 和田崇之, 山本太郎. わが国における結核分子疫学と伝搬経路推定:結核中蔓延国としての役割について. 第 54 回日本熱帯医学会大会 2013 年 10 月 長崎
- 4) 和田崇之. 反復配列多型(VNTR) 分析法による結核菌型別—精度管理と考え方, 使い方—. 第 72 回日本公衆衛生学会総会 2013 年 10 月 三重
- 5) Wada, T., Yoshida, S., Takata, M., Tomita, M., Tsuyuguchi, K., Yanai, T., Yamamoto, T. *Mycobacterium kansasii*: its epidemiological background in humans and a case of infection in black bearded Sakis in a zoo. Combined Conference 2013, One Health in Asia Pacific, October 26 – October 27, Singapore, Singapore.
- 6) Haridy, M., Tachikawa, Y., Wada, T., Yoshida, S., Maeda, S., Inoue, S., Sakai, H., Yanai, T. Pathological findings of Mycobacteriosis in Japanese forest green tree frogs, *Rhacophorus arboreus*. Combined Conference 2013, One Health in Asia Pacific, October 26 – October 27, Singapore, Singapore.
- 7) 和田崇之, 岩本朋忠, 瀬戸順二, 田丸亜貴, 前田伸司, 長谷篤, 山本太郎. 結核菌における遺伝型別一致株の比較ゲノム解析. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし.

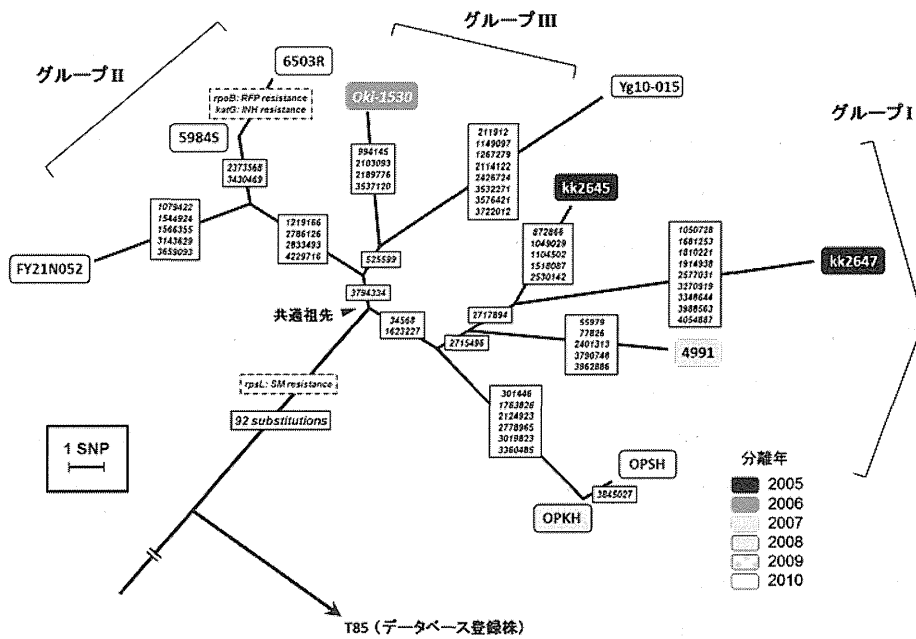


図 1. 比較ゲノムによって見いだされた M 株 (10 株) 固有の変異に基づく系統解析。枝長は変異数に対応し、それぞれに見いだされた変異のゲノムポジションを記述している。

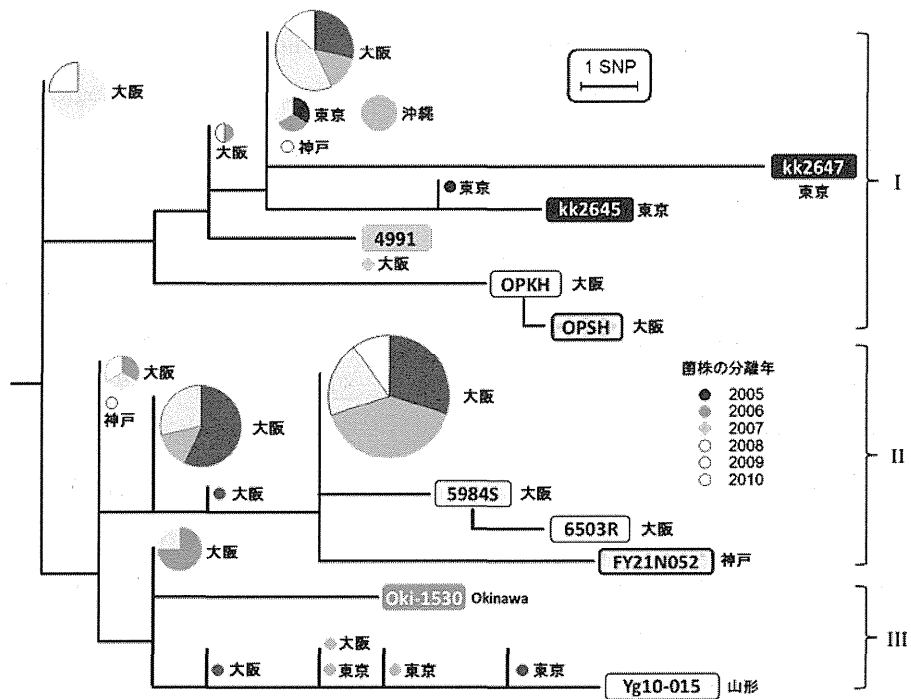


図 2. サーベイランスから見いだされた M 株 (52 株) について、比較ゲノムによって見いだされた株内バリエーション変異を分析して各系統関係を図示した。円は菌株数に対応しており、各分離年によって色分けした。

結核菌の病原性と微細形態学的特徴との関連に関する研究

山田博之 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部 主任研究員

研究要旨

あらゆる生物は環境に適応して生息するためのプログラムを固有の遺伝情報としてDNA上にコードしている。完全に同一な遺伝情報を有するクローン以外の個体は、同種内でも生存に影響を与えない範囲で僅かに異なる遺伝情報を有し、種としての固有性を保ちつつ多様性も実現している。特に細菌などの分裂周期が短い生物では種の存続をはかるため固有性と多様性が巧みに制御されていると考えられる。

一方、近年、同一ゲノムを有する細菌の1細胞観察の研究から、遺伝学的に同一な背景を持つ菌体集団でも遺伝子産物発現（量）に多様性が見られることが明らかにされている。これは、ヒトの一卵性双生児において指紋が異なることにより支持される現象である。

本研究では、透過型電子顕微鏡(TEM)による急速凍結法で調製した結核菌標準菌株の超薄連続切片観察(serial ultra-thin section, SUS)により、1菌体ごとの全体像を高分解能で可視化し、菌体構成成分の実測による定量を行い、菌体ごとの類似性、共通性とともにごのような多様性が見られるかを検討する。将来的には菌体の高分解能3次元構築を目指す。

また、走査型電子顕微鏡を用いて固形培地に生育した非結核性抗酸菌コロニーの形態観察を行ったが、単個菌の形態および病原性とコロニー性状との関連を検討するために、より生きた状態に近い形態が観察出来る氷包埋サンプルをCryo-TEMで観察し、菌種ごとの標準形態を計測する。

将来、遺伝子変異株の表現型観察を行うにあたり、可視化を伴った標準形態計測データとして利用可能なアーカイブ構築を最終的な目的とする。

A. 研究目的

生物は生息する環境に適応するためのプログラムである遺伝情報をコードしたDNAを細胞内に有している。完全に同一な遺伝情報を有するクローン以外の個体は、同種内でも生存に影響を与えない範囲で僅かに異なる遺伝情報を有し、種としての固有性を保ちつつ多様性も実現し、環境の変化により適応した新しい種の分化に向かう準備をしていると考えられる。特に細菌などの分裂周期が短い生物では種の存続をはかるため固有性と多様性が巧みに制御されていると考えられる。

細胞内には多種多様な分子がそれぞれの持ち場で緻密に制御されて機能している。

原核生物である結核菌といえども多くの構成要素の有機的な統合により各個体としての生命現象を維持していると考えられる。単一の遺伝子の発現、変異、単一の分子の発現、構造解析で表現型の全てを説明することは困難である。本研究では、TEMによる結核菌のSUS観察により、菌体の全体像を細胞壁外膜、菌体内部構造を含めて高分解能で可視化し、菌体構成要素の局在、表面積、体積、リボソーム数の計数を行い、分子生物学的データとの連携により結核菌

の病原性発現の解明を目指す。

また、結核菌コロニーの特徴であるコード形成を走査型電子顕微鏡で観察し、非結核性抗酸菌コロニーと比較して、病原性との関連を検討するために、各菌種の単個菌の形態の基本情報をCryo-TEMによる観察で蓄積し、データベースを構築する。

B. 研究方法

【SUSのTEM観察】

結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*) H37 Rv株(ATCC 27294)をMiddlebrook 7H9液体培地(OADC, 0.05 % Tween 80添加)で約2週間培養し、遠心にて濃縮した沈渣約1 μ lを親水化处理した銅製単孔グリッドに滴下し、もう1枚の単孔グリッドで挟み、液体窒素で冷却した液体プロパンに投入して急速凍結置換標本(サンドイッチ法)を作製した。-85°Cで2%オスミウム・アセトンにより置換固定し、徐々に室温に戻して、純アセトンで洗浄後、Spurr樹脂に包埋、重合した。Reichert Ultracut Eで厚さ55 nmのSUSを作製し、Maxtaform HF49単孔グリッドに載せ、フォルムバル支持膜で裏打ちした。酢酸ウランと鉛で電子染色し、JEOL JEM1230 TEMで観察した(図1)。

グリッド12枚、総計500枚以上のSUSを作製し(図2)、そのうち、観察に適した約250枚のSUS内に存在する菌体を2,000~2,500倍の低倍率で観察し、その中からSUS間で末端から末端まで菌体が保存された5菌を選択した(図3)。各菌体を30,000倍と60,000または80,000倍で観察、写真撮影した。

当初SUS作製において菌体の縦断面を連続して観察できれば少ない枚数の切片観察で結果を出せると考えたが、図4に示すよ

うに縦断面では横断面と比較して、SUSから菌体が抜落ちる頻度が高いため、横断面を観察した。

【抗酸菌の氷包埋サンプルの観察】

H37Rv株及び非結核性抗酸菌ATCC標準株を7H9液体培地で培養し、十分に発育した菌液のペレットに、2.5 % glutaraldehyde (GA, in 100 mM, リン酸緩衝液 (PB)、pH 7.4)を1 ml加え、4°Cで一晩固定した。PBで洗浄後、Quantifoilグリッド上に上記沈渣を付着させ自然科学研究機構生理学研究所岡崎統合バイオサイエンスセンター内のFEI Vitrobotにて急速凍結、氷包埋し、Cryo-TEM (JEM-2200FS)で観察した。形態計測は撮影した写真ファイルをFiji (ImageJ)ソフトウェアにて行った。(図12)

C. 研究結果

【結核菌SUSのTEM観察】5菌体の菌体中央部付近の横断面を図5に示す。また、個々の菌体のSUS像、計測値及び菌体模式図を図6から図10に示した。形態計測結果のまとめと菌体ごとの類似性と多様性はそれぞれ表1と図11に示した。

なお、菌体2と菌体3は連続した複数のグリッドにSUSが分かれて積載されており、グリッドが替わる際に数枚のSUSがグリッド銅版上に積載されたため、いくつかの断面が観察できていない可能性がある。したがって、これらの2菌体の長さ、表面積、断面積、リボソーム数は表1に示す値より多くなる可能性がある。

【抗酸菌の氷包埋サンプルの観察】

結核菌H37Rv株及び*M. aurum* (ATCC 233

66), *M. austroafricanum* (ATCC 33464), *M. celatum* type I (ATCC 51130), *M. celatum* type II (ATCC 51131), *M. chitae* (ATCC 19627), *M. farcinogenes* (ATCC 35753)をCryo-TEMにて観察した(図13)。このうち結核菌H37Rv株について14菌体の形態計測を終了し、平均菌体長: 2.67 ± 0.83 (SD) μm 、平均菌体幅: 0.55 ± 0.06 (SD) μm を得た。(図14)

D. 考察

【結核菌SUSのTEM観察】急速凍結法で調製した結核菌SUS作製、TEM観察を行った。急速凍結法により調製された樹脂包埋結核菌の観察は既にいくつか報告があるが、SUSの観察はこれまで例がない。また、広く微生物を対象としても、真核生物である酵母でSUSによるTEM観察の報告はあるが細菌を対象とした報告はこれまで例がない。

今回の研究は、SUSの観察だけではなく、これまで想定や計算で算出されてきた菌体構造について、一連の観察により実測値を計測し、結核菌の様々な研究領域に有用な基礎データを提供しようと考えられる。

5菌体の計測データは、表1に示すごとく平均菌体直径、細胞質直径はそれぞれ0.345 μm 、0.293 μm で菌体ごとの差はほとんど見られなかったが、その他の計測値は菌体ごとに差が見られた。

菌体長に関しては、菌体1と菌体2が2 μm 以下であるのに対して、他の3菌体は3 μm を超えていた。同じ連続切片内で縦断面を観察できた菌体で細胞分裂像を示すものがいくつか見られたが、3 μm 以上の菌体長を示した3菌体の横断面で細胞分裂を示す像は認められなかった。また、後述のCryo-TE

M観察では6 μm を超える菌体長を持つ菌が観察されており、SUS観察では長い菌ほどSUSの作製、観察が難しく、今回観察した菌体より長い菌が存在していることが示唆された。

また、菌体内リボソームに関しては、4菌体ではリボソーム数が850から約2,000計数されたが、1菌体(菌体2)ではわずかに49であった(図6~11, 表1)。この菌は菌体3の極く近傍に存在した菌であり(図5)、リボソーム数の大きな違いがサンプル調製の過程で生じたアーティファクトであるとは考えにくい。また、菌体2の細胞質は全体的に電子密度が高く、この菌体像はしばしば死菌に見られる像であり、菌体2は急速凍結時に既に死菌であったことが示唆される。

さらに、単位体積あたりのリボソーム密度は菌体3を除いて約600/ 0.1 flであった(図6~11, 表1)。菌体3は約1,000/ 0.1 flであり、他の3つの菌とは代謝状態が異なる可能性もある。即ち、同一の遺伝的背景を持つ菌集団内にリボソーム数を含むパラメーターに多様性を持つ菌が存在することを示唆している。このことは、実際に宿主に感染した遺伝学的に同一な単クローン由来の菌が、宿主細胞内外で分裂、増殖、生存する際、ゲノム情報の変異の有無に関わらず個々の菌における様々な菌体構成成分の発現に多様性を示すことを示唆している。

今後、更に観察菌数を増やし、結核菌の基本的な形態データを得るとともに、菌体の構成成分の定量とともに3次元構築を試みたい。

【抗酸菌の氷包埋サンプルのCryo-TEM観察】

SUS観察から得られた計測データと同様に結核菌H37Rv株では菌体ごとに菌体長に多様性が見られ、最も長い菌体長の菌は最も短い菌体長の3倍以上の長さを示したが、菌体直径は0.47 μm から0.68 μm まで、平均0.55 μm と極めて類似していた。また、観察した菌体の中に細胞分裂像は観察されなかった。

また、氷包埋サンプルのCryo-TEM観察での菌体直径と先述のSUSで計測された菌体直径を比較すると、SUSでの測定値は約60%であり、樹脂包埋、重合及びそれ以前の脱水で菌体が収縮している可能性が示唆された。

E. 結論

急速凍結法で調製した結核菌の樹脂包埋SUSをTEMで観察し、菌体内部微細構造を含む形態計測を行い、Cryo-TEMでより生きた状態に近い氷包埋した結核菌の形態計測を行った。

いずれの計測でも菌体直径はほぼ近似していたが菌体長には多様性があった。また、いずれの観察においても細胞分裂像は観察されず、細胞分裂と菌体長の関連についての知見は得られなかった。

また、SUS観察でリボソーム数を計数し、3菌体で約600/0.1 flにあったのに対し、1菌体では1,000/0.1 flを超え、代謝の状況によりリボソーム数に変化が見られる可能性が示唆された。また、1菌体当たり2,000を超えるリボソームを有する例はなく、結核菌単個菌のリボソーム数は最大でも約2,000程度であることが示唆された。

Cryo-TEM観察では菌体幅がSUSのTEM観

察で得られた計測値の1.6倍ほどあり、樹脂包埋標本で収縮が起こっている可能性が示唆された。

今回の観察は、同一の遺伝学的背景を持つクローンを同一条件で培養した場合でも、集団内に多様性が生じうることを示唆するものである。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 山田博之. 電子顕微鏡観察で可視化される結核菌の素顔。顕微鏡、48 (1) 51-56, 2013.

2. Yamada H, Chikamatsu K, Aono A, Mitarai S. Pre-fixation of virulent *Mycobacterium tuberculosis* with glutaraldehyde preserves exquisite ultrastructure on transmission electron microscopy through cryofixation and freeze-substitution with osmium-acetone at ultralow temperature. *Journal of Microbiological Methods*. 96 (1);50-55, 2014.

3. Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Sugamoto T, Kato T, Kazumi Y, Tamai K, Yanagisawa H, Mitarai S. Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *BMC Infect Dis*. 14 (2); 54, 2014.

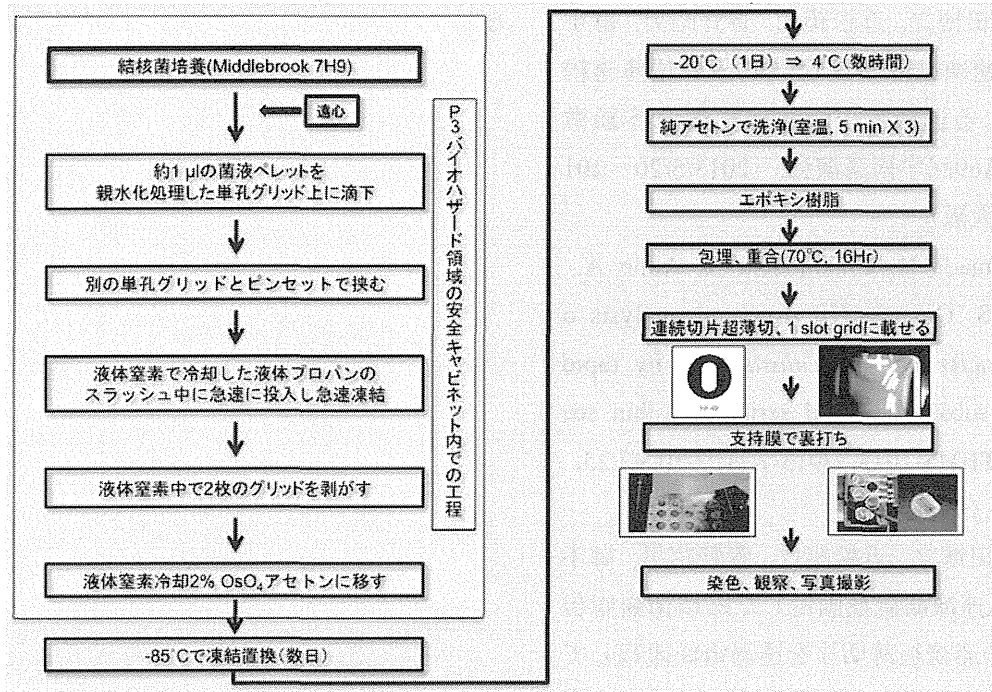
4. Hoshino A, Hanada S, Yamada H, Mii S, Takahashi M, Mitarai S, Yamamoto K, Manome Y. *Mycobacterium tuberculosis* escapes from the phagosomes of infected human osteoclasts reprograms osteoclast development via dysregulation of cytokines and chemokines. *Pathogens and disease*. 70 (1); 28-39, 2014.

2. 学会発表

1. 山田博之, 近松絹代, 青野昭男, 御手洗聡. 急速凍結置換固定結核菌の超薄連続切片による透過電子顕微鏡観察. 日本顕微鏡学会第69回学術講演会. 2013/5/20~2013/5/22 (大阪)
2. Yamada H, Chikamatsu K, Aono A, Mitarai, S. Quantitative structural analysis of *Mycobacterium tuberculosis* cells by rapid freeze- substitution and serial ultra-thin sectioning. FEMS-2013, 2013/7/21~2013/7/25, (Leipzig, Germany)
3. 山田博之, 近松絹代, 青野昭男, 御手洗聡. 急速凍結置換固定した結核菌樹脂包埋標本の連続超薄切片を透過電顕観察して得られた形態計測データ. 第45回日本臨床分子形態学会. 2013/9/13~2013/9/14 (福岡)
4. 山田博之, 近松絹代, 青野昭男, 御手洗聡. Analog vs. Digital. ~超薄(連続)切片、FIB-SEM, SBF-SEM像の比較~ 平成25年度 生理学研究所研究会. 2013/11/13~2013/11/14 (愛知)
5. 山田博之, 近松絹代, 青野昭男, 御手洗聡. 結核菌急速凍結置換固定標本の連続超薄連続切片による定量構造解析. 日本顕微鏡学会第57回シンポジウム. 2013/11/15~2013/11/16 (愛知)
6. 山田博之, 加藤朋子, 御手洗聡. 急速凍結置換固定した結核菌超薄連続切片の透過型電子顕微鏡観察による定量構造解析. 日本細菌学会総会. 2014/3/26~2014/3/28 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

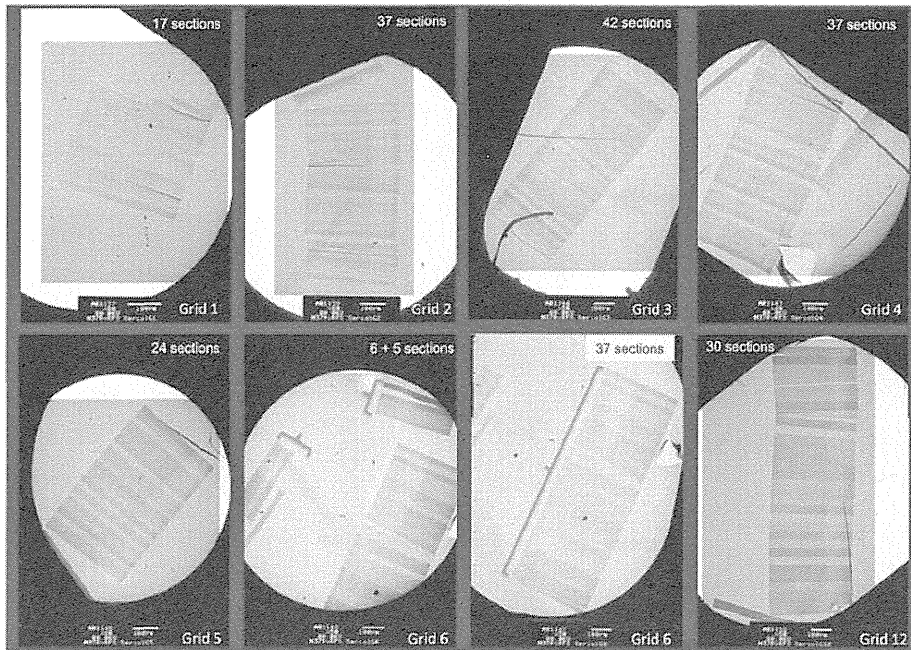
材 料 と 方 法



厚生科学研究事業(13年度) 研究報告書

図1. 急速凍結法による結核菌超薄連続切片作製方法

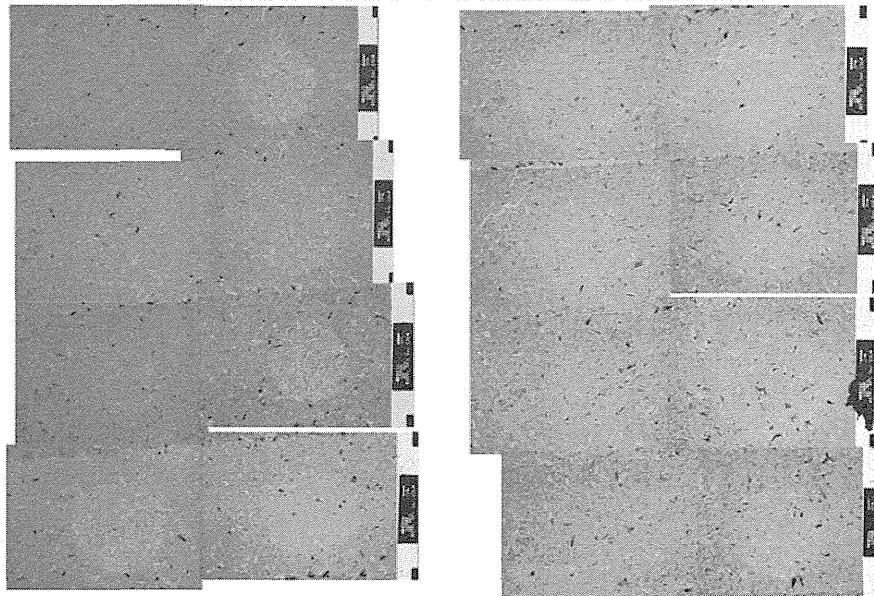
連続超薄切片



厚生科学研究事業135年度 研究報告書

図2. SUS (グリッド低倍像)

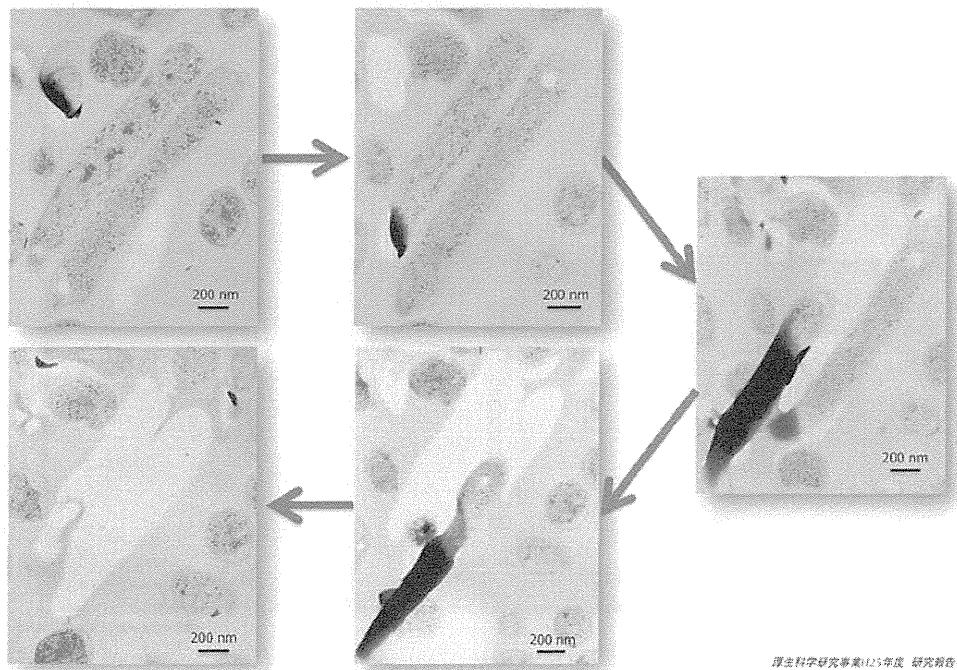
高倍率観察に適した菌体選定のための低倍率観察



厚生科学研究事業125年度 研究報告書

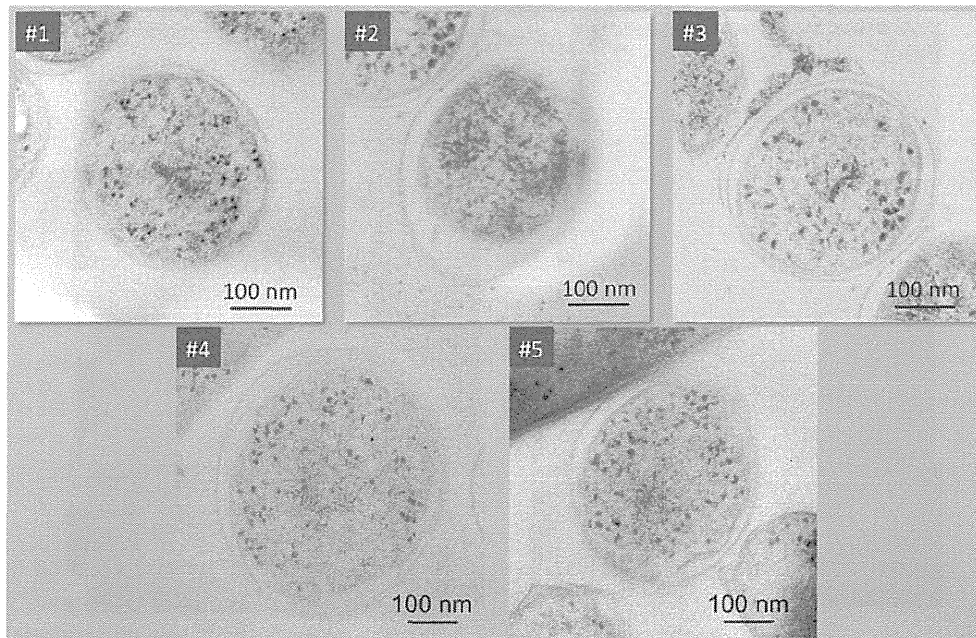
図3. 高倍率観察に適した菌体選定のための低倍率観察

菌体の抜け落ち



厚生科学研究事業125年度 研究報告書

図4. SUSにおける菌体縦断面の抜け落ち



厚生科学研究事業125年度 研究報告書

図5. SUSを観察した5菌体の菌体中央部付近の横断面像