

と考えられた。今後、菌濃度による EMA 効果の検討など基礎的検討を十分行った上で、臨床検体処理の指摘条件を検討し、臨床応用していく予定である。

E. 結論

昨年までに確立したハロゲンランプ照射による PMA-qPCR 法を用いた結核菌の生死菌鑑別法において、従来の薬剤感受性試験に応用可能であること、及びより迅速に結果を判別できる可能性があることを示した。しかしながら PMA を用いる方法では生菌の生菌率が低く換算される傾向があり、さらに基礎条件を検討した結果 LED 照射による EMA-qPCR 法がより正確に生死菌の判別ができることが示唆された。

これまでの PMA の核酸増幅抑制効果の検討では効果が試験毎に異なる可能性も示されたため、安定したデータが得られるよう次年度以降も EMA-qPCR 法の基礎条件検討を継続する必要がある。十分な基礎検討後臨床検体を用いて指摘処理条件を設定し、喀痰検体の生死菌鑑別の評価及び薬物投与後の生菌の割合の変化を検討する予定である。

F. 健康危機情報

本研究においては、結核菌の感染の危険があると考えられた。全ての結核菌（生菌）の取扱は感染症法及びバイオハザード指針に従って、BSL3 レベルの実験室内で安全キャビネットを使用して行った。

G. 研究発表

1. 高木明子, 加藤朋子. 生菌死菌を迅速に鑑別できるか? 日本結核病学会雑誌 2015; 90(2): 203. 第 90 回日本結核病学会総会 長崎 2015 年 3 月 28 日

H. 知的財産権の出願・登録情報
特になし。

厚生労働省科学研究補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

分担研究報告書

M株の全ゲノム比較で同定された非同義置換SNPを持つ結核菌蛋白質の過剰発現による抗酸菌の機能変化

研究分担者 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

日本全国に広まっていることが判明している結核菌 M 株は、IS6110 制限酵素断片長多型 (RFLP) や反復配列多型 (VNTR) 分析で同一パターンであることから、ヒトからヒトへの感染性が高い可能性、多型性が低く安定したゲノム構造を持つ株と推定されている。このような性質を持つ M 株の特徴を明らかにするために次世代シーケンサーで全ゲノム解析を行った。M 株は北京型新興タイプの結核菌なのでこの遺伝系統が共通でもつ一塩基多型 (SNP) 部位を除き、M 株が特異的に持つ 100 箇所以上の SNP を抽出した。本研究では、これらの SNP の内、アミノ酸変化が伴う非同義置換 SNP を持つ 6 種類の遺伝子 (*fadD25*、*fadB3*、*fadE17*、*ftsQ*、*kdtB*、*hsaD*) に注目して抗酸菌内での過剰発現実験を行った。その結果、実験した 6 種類の遺伝子の内、3 種類の遺伝子 (*fadD25*、*fadB3*、*kdtB*) は、SNP によりアミノ酸が変化した遺伝子を過剰発現させると形質転換効率や菌の増殖に影響があることが判明した。今後、この再現性とメカニズムを解明する必要がある。また、全 41 種類の非同義置換 SNP の内、まだ検討していない 35 遺伝子については同様に研究を行う必要がある。

A. 研究目的

分離された結核菌の遺伝型を IS6110 制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析や反復配列多型 (VNTR) 法で調べると、疫学的リンクが明らかでないにも関わらず、多くの地域で特定の遺伝型の菌が見られる。そのような遺伝型の結核菌のひとつの例として、M 株が報告されている。M 株は、ストレプトマイシン耐性の北京型 (新興タイプ) 菌で関東南部に広がっていることが報告され

ている。また、神戸地区では最大クラスターを形成する結核菌と報告されている。このように、同じ遺伝型の結核菌が、全国的に広がっていることからヒトからヒトへの感染性が高いという性質を M 株は持っているとして推定される。そこで、全国から集めた M 株について次世代シーケンサー (NGS) で全ゲノム解析を行い M 株が独自に持つ一塩基多型 (SNP) を確認した。また、その中でも非同義置換 SNP を持つ遺伝

子をリストアップした。このような変異を持った遺伝子が M 株の病原性に關与している可能性が高いと推定される。そこで、これらの遺伝子を *Mycobacterium bovis* BCG と *Mycobacterium smegmatis* で過剰発現させて野生型菌の表現型が変化するかどうか確認した。

本研究では、このような非同義置換を伴う SNP を持った遺伝子に注目して、ヒトからヒトへの感染性上昇に關与すると推定される遺伝子の同定を目指して研究を進めた。

B. 研究方法

・M 株の収集と次世代シーケンサーによる分析

M 株は、大阪府 5 株、東京都 2 株、山形、沖縄県及び神戸市各 1 株の合計 10 株を選択し、次世代シーケンサー (NGS) で全ゲノム解析を行った。NGS 分析は、ペアーエンドで 100-150bp の塩基配列を分析した。M 株結核菌の遺伝系統で共通に存在する SNP 部位を除き、H37Rv との塩基配列と異なる SNP 部位を Qiagen 社 CLC Genomics Workbench プログラムで抽出した。

・遺伝子発現プラスミドの構築

絞り込んだ 6 遺伝子 (*fadD25*、*fadB3*、*fadE17*、*ftsQ*、*kdtB*、*hsaD*) を *M. bovis* BCG ゲノムを鋳型として PCR 法で遺伝子を増幅して pVV16 プラスミド (大腸菌-抗酸菌シャトルベクター) に導入した。また、それぞれの遺伝子プラスミドは、サイトダイレクトミュータージェネシス法で M 株が持つ SNP 変異を導入したプラスミドを人工的に作成した。

・抗酸菌への作製プラスミドの導入

作製したプラスミドで *M. smegmatis* mc² 155 及び *M. bovis* BCG Tokyo をエレクトロポレーション (2,500V、25uF、1,000Ω) 法で形質転換し、各遺伝子の過剰発現株を分離した。培養は、カナマイシン (25ug/ml) 及び 10% オレイン酸-ブドウ糖-カタラーゼ (OADC) 含有 Middlebrook 7H10 寒天培地で培養を行った。また、菌に導入する各プラスミドは、予め 260nm の吸光度で DNA 濃度がほぼ同じになるように調整しておいた。*M. smegmatis* は 4 日後、*M. bovis* BCG は 3 週間後にコロニーの大きさやコロニー数を比較した。

C. 研究結果

1. M 株の遺伝子型

M 株は、共通の IS6110 制限酵素断片長多型 (RFLP)、反復配列多型パターンを持つ北京型株で、最近世界的に広まっている新興タイプの結核菌だった。また、共通の性質としてストレプトマイシン耐性を持っていることが確認できた。

2. 次世代シーケンサーを用いた SNP 解析

結核菌の場合、H37Rv 株の塩基配列を NGS の比較標準株に使用している。そのため、北京型結核菌を分析すると、1,500 箇所以上の北京型共通 SNP が存在する。北京型新興型の結核菌が、共通に持つ SNP 部位を除き解析を行った。また、多型性の高い PE/PPE 遺伝子や *Mycobacterium cell entry protein (mce)* 遺伝子ファミリーのオープンリーディングフレーム (ORF) 中の変異 (SNP) も除いた。その結果、M 株が独自に持つ SNP が 100 箇所存在することが判明

した。これら SNP の内、59 箇所がサイレントで、残り 41 箇所がアミノ酸変異を伴う非同義置換 SNP だった。

3. 非同義置換 SNP を持つ蛋白質（酵素）の抗酸菌での過剰発現

41 種類の非同義置換 SNP を持つ蛋白質の内、16 種類についてはデータベースを用いた相同性解析から機能を推定できた。今年度はこれらのうち、6 種類の遺伝子に絞り抗酸菌で過剰発現実験を行った。候補遺伝子は、*fadD25* (1752-bp)、*fadB3* (915-bp)、*fadE17* (1230-bp)、*ftsQ* (945-bp)、*kdtB* (486-bp)、*hsaD* (876-bp) とし、pVV16 ベクター (5.8k-bp) の *NdeI/HindIII* サイトに各遺伝子を導入した。野生型 (BCG 株由来の遺伝子) と変異型 (M 株の SNP を持つ遺伝子) を *M. smegmatis* 及び *M. bovis* BCG に導入して表現型の変化を調べた (図 1)。

M. smegmatis を宿主にした場合はエレクトロポレーションの 4 日後に、コロニー数を観察した。*fadE17* と *hsaD* は野生型、変異型共にほぼ同数の多くのコロニーが観察された。*fadD25* と *fadB3* は変異型プラスミドが大量のコロニーが観察されたが、野生型プラスミドではコロニーは観察できなかった。一方、*kdtB* では、逆に変異型プラスミド導入菌でコロニーが見られず、野生型で大量のコロニーが観察された。また、菌の分裂に関連する *ftsQ* では、野生型と変異型のプラスミド共に、この時点ではコロニーの形成は見られなかった (図 2)。更に 4 日後 (エレクトロポレーション後 8 日目) の観察では、4 日目で観察できなかったプレートすべてで少量のコロニーが観察できた。つまり、遺伝子発現プラスミドでの導入で形質転換の効率が低下しているこ

とがわかった。また、*ftsQ* では野生型と変異型共に、この時点で大量のコロニーが観察されたことから、この遺伝子の過剰発現で菌の増殖が非常に遅くなることがわかった。

M. bovis BCG での形質転換についても、同様にエレクトロポレーションから 3 週間後、さらに 3 週間培養 (形質転換から 6 週間後) して観察を行った。BCG では、コロニー形成までに時間がかかったが、各プラスミドの野生型と変異型における形質転換効率やコロニー数などは、*M. smegmatis* の場合と同じであった。

D. 考察

日本全国に広まっている M 株が持つ非同義置換 SNP の存在する 41 種類の遺伝子が、M 株の特徴的な表現型であるヒトからヒトへの感染性に関与している可能性があると考えられるので、各遺伝子の過剰発現で菌の表現型が変化するかどうかが調べた。その結果、以下のように対象遺伝子は、3 つのグループに分けることができた。1) BCG 由来遺伝子 (野生型) プラスミド導入株に比べて M 株の非同義置換 SNP を持つ遺伝子 (変異型) プラスミド導入株のコロニー数が多かった遺伝子:*fadD25* と *fadB3*、2) 変異型遺伝子導入株に比べて野生型遺伝子導入株の方が、コロニー数が多かった遺伝子:*kdtB*、3) コロニー形成に SNP が関与しなかった遺伝子:*fadE17*、*ftsQ*、*hsaD* であった。細胞壁に存在する脂肪酸の合成に関与する *fadD25* と *fadB3* や内部代謝に関与する *kdtB* が SNP 有り無しの遺伝子を過剰発現させることで、形質転換の効率や菌の増殖に影響が出たことから菌の表現型に

関わっている可能性が示唆された。この点は、再現性等検討する必要があると考えられる。

E. 結論

日本全国に広まっていることが判明している結核菌 M 株は、ヒトからヒトへの感染性が高く、またゲノム構造変化もほとんどなく安定であると推定される。このような M 株の持つ SNP の内、アミノ酸変化が伴う非同義置換 SNP を持つ遺伝子に注目して 6 種類の遺伝子の過剰発現実験を行った。実際に 3 種類の遺伝子は、SNP が存在しアミノ酸が変化すると形質転換効率や菌の増殖に影響があることが判明した。今後、この再現性とメカニズムを解明する必要がある。また、残りの 35 遺伝子についても同様に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Matsumoto T, Suzuki M, Iinuma Y, Maeda S, Ano H, Koshii Y, Murakawa T, Suzuki K, Hoshino Y: A molecular typing methodology of *Mycobacterium tuberculosis* using small genomic islet patterns (TB-SGIP): A novel genotyping methodology to discriminate clinical strains between Beijing family and T3-OSAKA, J Infect Dis Ther. 2014, 2: 35-45.
2. Wada T, Iwamoto T, Tamaru A, Seto J, Ahiko T, Yamamoto K, Hase A, Maeda S, Yamamoto T: Clonality and Micro-Diversity of a Nationwide Spreading Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. PLoS

One. 2015, 10: e0118495.

3. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, Blum MG, Rüschi-Gerdes S, Mokrousov I, Aleksic E, Allix-Béguec C, Antierens A, Augustynowicz-Kopeć E, Ballif M, Barletta F, Beck HP, Barry CE 3rd, Bonnet M, Borroni E, Campos-Herrero I, Cirillo D, Cox H, Crowe S, Crudu V, Diel R, Drobniewski F, Fauville-Dufaux M, Gagneux S, Ghebremichael S, Hanekom M, Hoffner S, Jiao WW, Kalon S, Kohl TA, Kontsevaya I, Lillebæk T, Maeda S, Nikolayevskyy V, Rasmussen M, Rastogi N, Samper S, Sanchez-Padilla E, Savic B, Shamputa IC, Shen A, Sng LH, Stakenas P, Toit K, Varaine F, Vukovic D, Wahl C, Warren R, Supply P, Niemann S, Wirth T: Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. Nat Genet. 2015, 47: 242-9.

(2) 学会発表

1. 大原直也、趙娜、和田崇之、藤原永年、前田伸司、山本三郎、瀧井猛将、前山順一：BCG Tokyo172-1に存在するサブポピュレーションの比率変化に関する検討：第89回日本結核病学会、2014. 岐阜
2. 前田伸司、櫻田紳策、小林信之、慶長直人：ベトナムハノイ地区で分離された結核菌の反復配列多型 (VNTR) 分析法を利用した分子疫学：第89回 日本結核病学会、2014. 岐阜
3. 村瀬良朗、大角晃弘、内村和広、前田伸司、石川信克：都市部における外国人結核の感染動態に関する分子疫学研究：第89回

日本結核病学会、2014. 岐阜

4. 藤原永年、和田崇之、前田伸司：超高分解能MALDI Spiral-TOFMSによるミコール酸の簡易迅速分析法の開発：第89回 日本結核病学会、2014. 岐阜

5. 土方美奈子、松下育美、前田伸司、櫻田紳策、慶長直人：ベトナムにおけるマンノース結合レクチン（MBL）遺伝子多型と結核の関連：第89回 日本結核病学会、2014. 岐阜

6. 和田崇之、岩本朋忠、瀬戸順次、田丸亜紀、長谷篤、前田伸司、阿彦忠之、山本太郎：M株の広域的分離の原因究明—比較ゲノム解析に基づく「結核ゲノム疫学」の導入：第89回 日本結核病学会、2014. 岐阜

7. S. Maeda, N. Nakata, T. Naka, N. Fujiwara: Isolation of mycobacterial mutants that disrupted the phospholipid synthetase gene, and their properties. FEBS EMBO 2014 Conference (Palais des Congrès), 2014, Paris, France.

8. 慶長直人、前田伸司、櫻田紳策、土方美奈子：ベトナムハノイ市で検出される結核菌の臨床疫学的特徴について：第90回 日本結核病学会、2015. 長崎

9. 松本智成、前田伸司、星野仁彦：Small genomic islandの有無による新規結核菌遺伝子型別解析 TB-SGIPの開発：第90回 日本結核病学会、2015. 長崎

10. 村瀬良朗、大角晃弘、渡部裕之、内村和広、神楽岡澄、窪田ゆか、榊原麻里絵、前田伸司、石川信克：感染経路の推定に難渋した集団発生事例における結核菌全ゲノム解析の活用：第90回 日本結核病学会、2015. 長崎

11. 柴田満、前田伸司、藤原永年：結核菌

由来脂質抗原の家兎免疫による抗脂質IgG抗体の産生とその性質：第90回 日本結核病学会、2015. 長崎

12. 前田伸司、和田崇之、櫻田紳策、小林信之、慶長直人：ベトナムハノイ地区で分離された結核菌の分子疫学解析：第90回 日本結核病学会、2015. 長崎

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

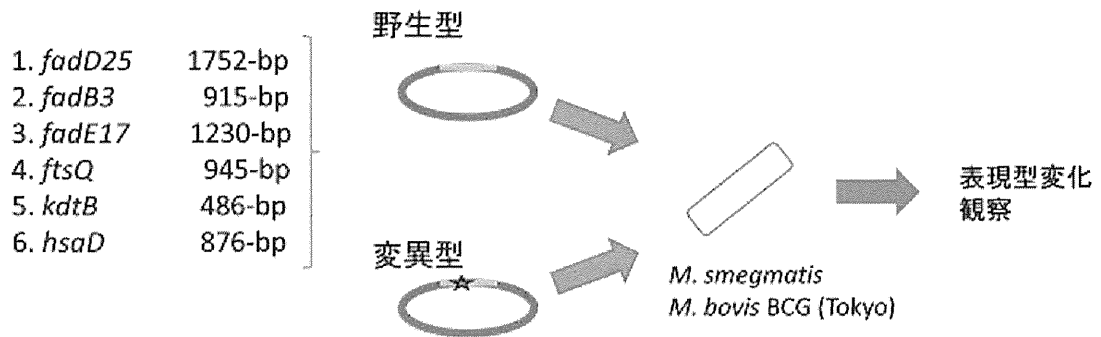


図 1. 6 種類の遺伝子に関してそれぞれ野生型と変異型を抗酸菌に導入して菌の表現型変化を観察

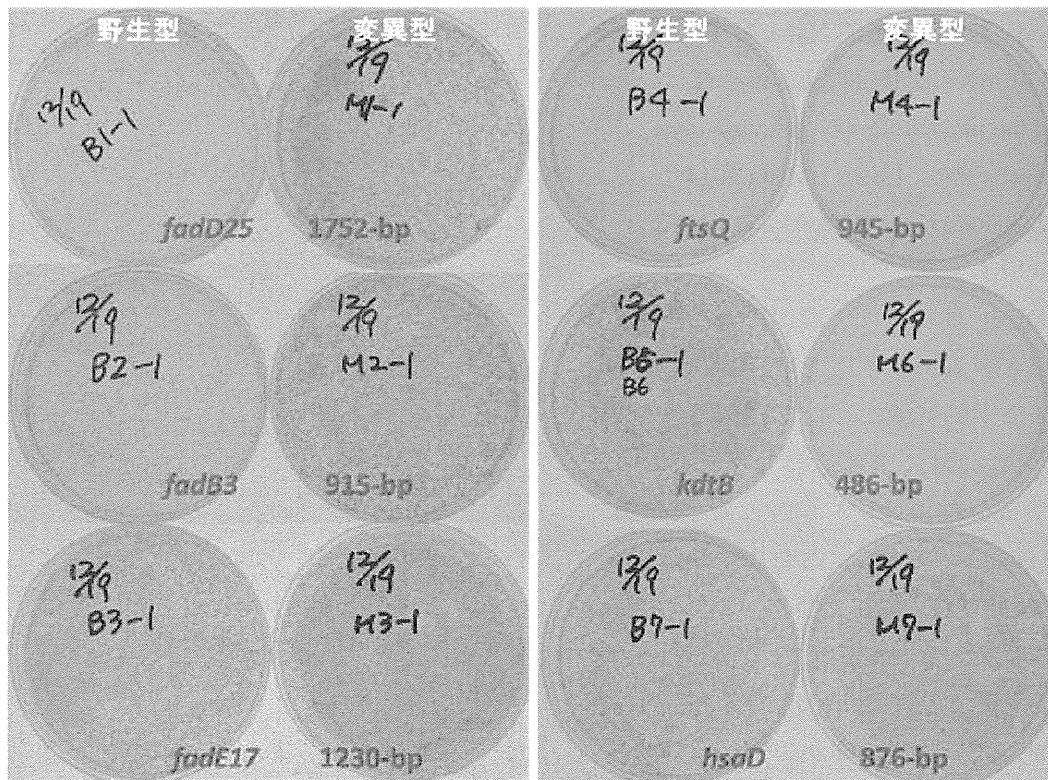


図 2. プラスミド（野生型と変異型）を用いた *M. smegmatis* の形質転換

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

分担研究報告書

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

研究分担者 岩本 朋忠 (神戸市環境保健研究所・感染症部・副部長)

研究要旨

結核菌ゲノム情報の蓄積は、複数遺伝子間の相互作用 (epistasis) に関する研究を推進した。その結果、多剤耐性結核菌の生存能力を高める補償的変異として、*rpoA*, *rpoC* の変異が報告された。我々は、平成 24、25 年度の研究により、本邦の多剤耐性結核菌は諸外国に比して高率に *rpoA/rpoC* 遺伝子の変異を有し、感染拡大能力の高い株が多く存在することを明らかにした。また、大阪湾岸地域において感染拡大を示す遺伝子型株 (L527V 型株と命名) を検知した。本年度は、この L527V 型株 (合計 11 株) を用いて全ゲノム解析を行い、菌の均質性ならびに感染様式の詳細について検討を行った。11 株のゲノム解析結果を比較したところ、L527V 型株は、非常に高い均質性を示した。L527V 型株による巨大クラスターの形成は、単クローンによる感染伝搬の結果であることを強く支持するものである。また、過去において、少なくとも 3 回の感染拡大イベントが発生したものと推察された。さらに、L527V 型株の発生動向を正確にモニタリングする上で利用価値の高い、本菌株に固有の変異を特定した。

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

本邦における多剤耐性結核菌の感染拡大に及ぼす潜在的リスクを菌側のゲノム情報から解明し、公衆衛生上の対策に資することを目的としている。本年度はこれまでの研究成果として我々が検知した、大阪湾岸地域で高頻度に検出される特定の遺伝子型の多剤耐性結核菌 (L527V 型株) について、全ゲノム解析を行い、その感染拡大の実態の解明を目指した。また、L527V 型株を正確かつ効率的に検出できる遺伝子変異の特定もあわせて行った。

B. 研究方法

1. 全ゲノム解析

イルミナ社の 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た。結核菌 H37Rv 株の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。

2. 感染拡大株 (L527V 型株) の比較ゲノム解析。

L527V 型株 11 株について全ゲノムマッピング解析を行い、各株の点置換変異を決定した。得られた点置換変異情報を菌株間で比較し、各菌株間の異同性を 1 塩基レベルの解像度で判定した。

3. 感染拡大株 (L527V 型株)に固有な変異の特定。

L527V 型株に固有な変異は、他の株と区別する場合の遺伝マーカーとして有用である。菌株固有の変異の特定には、出来る限り直近の共通祖先から分岐した株との比較ゲノム解析を行う必要がある。この目的に最適な株として、我々は、L527V 型株と RFLP パターンが一致し、VNTR で 1 ローカス違いをみとめ、さらに *rpoC* の変異ポジションが異なる株 (G332S 型株と命名)を特定し、比較ゲノム解析に用いた。

4. 超近接ゲノム比較。

L527V 型株(11 株)と G332S 型株(2 株)の全ゲノム解析データを用いて、超近接ゲノム比較を行い、各株固有の変異を特定した。各株固有の変異を連結し、PopART を用いて Median Joining Network tree を描写した。

(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、個人情報への特定が不可能となるように配慮した(連結不可能匿名化)。

C. 研究結果

図 1 に、大阪湾岸地域における分子疫学調査により検知した、超多剤耐性結核菌による巨大クラスターとその類似パターンによる minimum spanning tree を示した。結核菌北京型株に最適化した 24 領域を用いた VNTR 解析によるものであり、これらの菌株は、遺伝的関連が非常に高いグループであると判断できる。リファンピシン耐性化による負荷を補填する *rpoC* 変異により、これらの株は 2 つのグループ、すなわち、コドン 527 が Leu から Val に置換した L527V 型株とコドン 332 の Gly が Ser

に置換した G332S 型株に分けられた。

これら 13 株について、全ゲノムマッピング解析を行い、各型に属する菌株間での変異の有無を比較した (図 2)。L527V 型株に固有の変異が 13 か所、G332S 型株に固有の変異が 18 か所検出された。共通祖先からの分岐を示すものであり、両菌型の遺伝的関連性は極めて高いものの、それぞれに独立して、感染伝搬してきたことを支持する結果である。

一方、同一型に属する菌株間の変異は各グループ内での感染伝搬の実情を反映したものになっていると考えられる。G332S 型株の 2 株は家族内感染事例であり、Fa 株が新たに獲得した 2 か所の変異は、この伝播を反映したものといえる。L527V 型株の 11 株の近接ゲノム比較からは、図 2 に示した A, B, C の 3 つの感染拡大イベントの存在が示唆された。すなわち、変異の出現様式から、1) 全 11 株の共通祖先となり得る A の時点での株の拡散、2) 2 か所の変異を共有した 5 株 (k28, k66_2007, k23, k45, k19) が拡散した B、3) 1 箇所の変異を共有した 3 株 (k78, New35, kb193) が拡散した C の時点の合計 3 つのイベントが再構築できたと言える。また、B, C においては、さらに微小なレベルでの変異の共有が各 1 組の株間で (k45 と k23, k78 と New35)認められた。直近での感染伝搬を強く示唆するものである。また、これらの菌株固有の変異は、VNTR 型別が一致する遺伝子型別株をより詳細に細分類するための遺伝子マーカーともなる。

VNTR 型別には偶発的変異により、同一クローン由来にもかかわらず異なる株と判断される場合がある。L527V 型株に属する kb193 株がその例といえる。逆に、1 領域変異を許容して同一型別と判断した場合、本来異なるクローン由来株を同一株と判断する危険性がある。

L527V 型株と G332S 型株の場合が、この例に当てはまる。このような、VNTR 型別の不確かさを補填できるのが、菌株固有の変異情報の活用である。今回のゲノム解析により、L527V 型株に固有の変異が 13 カ所特定できた(表 1)。これらの変異の一つは、*intergenic* 領域にあり(ゲノム上の 3067988 番目の塩基の T から G への変異)、今後、L527V 型株の発生動向を簡便かつ迅速にモニタリングできる遺伝子マーカーとして活用できる。

D. 考察

我々は、これまでに、特定の VNTR パターンを示す超多剤耐性結核菌が、大阪湾岸地域において高頻度に検出されることを明らかにした。感染拡大が疑われる株であり、公衆衛生上の警戒が必要である。我々は、この株を L527V 型株と名付け、比較ゲノム解析を行うことで、より詳細な菌株間の違いを明らかにすることで、過去における複数の感染拡大イベントの発生と、現在への影響を推察した(図 2)。比較ゲノム解析により、L527V 型株の遺伝的均質性は極めて高く、巨大クラスターの形成は、単クローンによる感染伝搬の結果であることが強く示唆された。また、過去において、少なくとも 3 回の感染拡大イベントが発生したものと推察された。さらに、L527V 型株に共通の固有変異や細分類に有効となる菌株固有変異を特定した(表 1)。このような変異は、L527V 型株の高精度なモニタリングのための遺伝子マーカーとして、有効利用できるものであり、L527V 型株の広域感染の実態解明に大きく貢献するものと思われる。

地域内分離株を網羅的に遺伝子型別解析し、その結果見いだされた感染拡大株について、比較ゲノム解析を実施し、その感染伝搬様式を詳

細に解明するというアプローチは、今後の、結核対策の基盤になり得るものと思われる。本研究は、そのアプローチを、公衆衛生上最も警戒を要する超多剤耐性結核菌について実践しえたものである。さらに、ゲノム解析は、そのアウトプットとして、特定の菌株を高精度にモニタリングするための菌株固有変異を提供できる。すなわち、VNTR 解析による網羅的な遺伝子型別解析と、ゲノム解析による菌株の精密解析、そして、固有変異を指標として特定の菌株を重点的にモニタリングするターゲット分子疫学を環として繋げることで、より発展的な分子疫学調査が可能になるものと期待される。

E. 結論

大阪湾岸地域において感染拡大を示す超多剤耐性結核菌である L527V 型株 11 株を用いて全ゲノム解析を行い、菌の均質性ならびに感染様式の詳細について検討を行った。比較ゲノム解析により、L527V 型株による巨大クラスターの形成は、単クローンによる感染伝搬の結果であることが強く示唆された。また、過去において、少なくとも 3 回の感染拡大イベントが発生したものと推察された。さらに、L527V 型株の発生動向を正確にモニタリングする上で利用価値の高い、本菌株に固有の変異を特定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Barletta F, Otero L, de Jong B, Iwamoto T, Kentaro Arikawa K, Van der Stuyft P, Niemann S, Merker M, Uwizeye C, Seas C, Rigouts L. Predominant *Mycobacterium tuberculosis* families and high rate of transmission among new cases are not associated with primary multidrug resistance in Lima. J. Clin. Microbiol.

(in press)

- 2) Grandjean L, Iwamoto T, Lithgow A, Gilman R.H., Arikawa K, Nakanishi N, Martin L, Castillo E, Alarcon V, Coronel J, Solano W, Aminian M, Guezala C, Rastogi N, Couvin D, Sheen P, Zimic M, Moore D. The association between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and drug resistance in Peru. PLoS ONE (in press)
- 3) Wada T, Iwamoto T, Tamaru A, Seto J, Ahiko T, Yamamoto K, Hase A, Maeda S, Yamamoto T. Clonality and micro-diversity of a nationwide spreading genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. PLoS ONE 10:e0118495, 2015

2. 学会発表

- 1) 岩本朋忠、有川健太郎、藤山理世、松林恵介、水尻節子、白井千香、伊地智昭浩. BCG ワクチン接種副反応事例から得た BCG Tokyo 172 株の遺伝子変異. 第 89 回 日本結核病学会総会、2014 年 5 月 9-10 日、岐阜
- 2) 藤山理世、松林恵介、水尻節子、白井千香、伊地智昭浩、有川健太郎、岩本朋忠、鈴木克洋、岡田全司、坂谷光則、若林一郎. 神戸市において 60 代・70 代を含む集団に実施した QFT 検査の結果について. 第 89 回 日本結核病学会総会、2014 年 5 月 9-10 日、岐阜
- 3) 和田崇之、岩本朋忠、瀬戸順次、田丸亜貴、長谷篤、前田伸司、阿彦忠之、山本太郎. M 株の広域的分離の原因究明 - 比較ゲノム解析に基づく「結核ゲノム疫学」の導入. 第 89 回 日本結核病学会総会、2014 年 5 月 9-10 日、岐阜
- 4) 有川健太郎、中西典子、岩本朋忠、藤山理世、松林恵介、水尻節子、白井千香、伊地智昭

浩. 結核菌分子疫学による神戸市内蔓延株の網羅的解析ならびに外国人結核との比較. 第 89 回 日本結核病学会総会、2014 年 5 月 9-10 日、岐阜

5) 岩本朋忠. 都市型結核分子疫学へのゲノム解析の活用. 第 19 回 国際結核セミナー、2015 年 3 月 5 日、東京

6) 有川健太郎、吉田志緒美、岩本朋忠. 多剤耐性結核菌の二次変異保有状況の解析. 第 88 回 日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26-28 日、岐阜

7) 瀧井猛将、吉田志緒美、有川健太郎、藤山理世、岩本朋忠. BCG 副反応事例株における遺伝子変異と宿主細胞に対する作用の解析. 第 90 回 日本結核病学会総会、2015 年 3 月 27-28 日、長崎

知的財産権の出願・登録状況
なし

表1. L527V型株に固有な一塩基変異

ID	Position in H37Rv	野生型	変異	遺伝子	アミノ酸置換
1	125888	G	A	ctpI	
2	494462	C	T	ackA	
3	764948	T	G	rpoC	Leu527Val
4	1439214	C	T	cysN	Ala103Val
5	1472359	A	C	rrs	
6	1473246	A	G	rrs	
7	1481337	G	A	Rv1319c	Arg389Trp
8	2258133	A	T	vapB15	Asp35Val
9	3067988	T	G		
10	3337303	G	A	ddlA	
11	4016556	A	G	kstR	Thr25Ala
12	4247431	G	C	embB	Met306Ile
13	4296123	T	G	pks2	Lys1161Asn

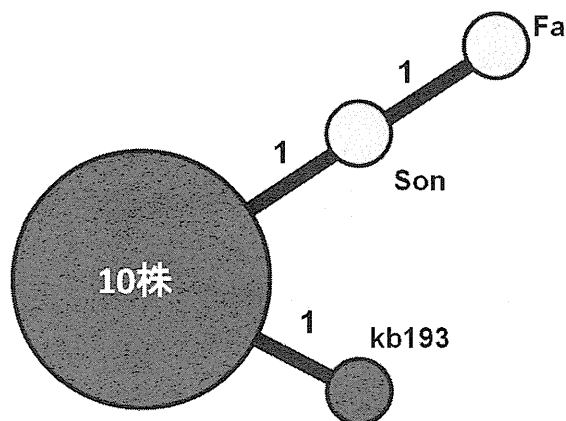


図1. 拡張型クラスターを形成する超多剤耐性結核菌 (L527V 型株、赤色表示)とその類似パターン株 (G332S 型株、黄色表示)のminimum spanning tree。各ノード間の数字は、VNTRの異なるローカス数を表す。VNTR解析は、北京型株の異同性判定に最適化した24領域を対象として行った。

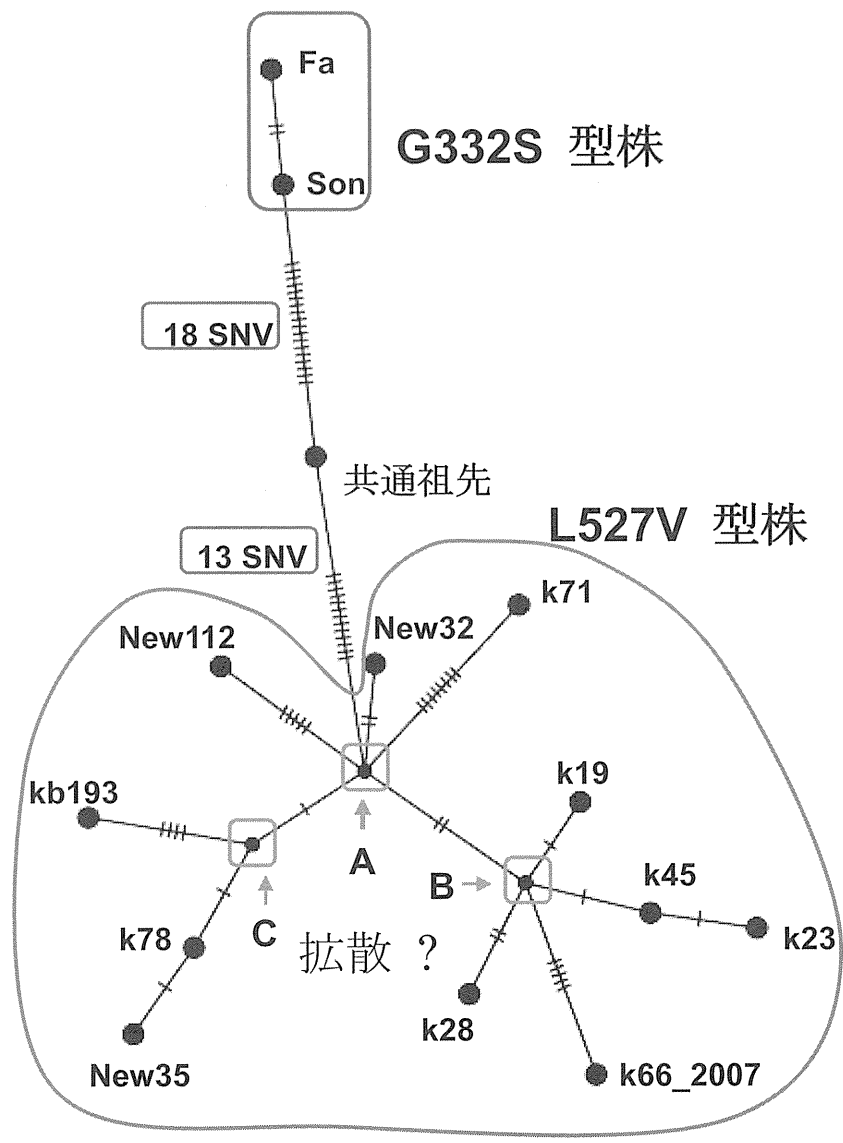


図 2. L527V 型株 (11 株)と G332S 型株 (2 株)の超近接ゲノム比較。

各ノード間のバーの数は菌株間の変異数を表す。

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担研究報告書

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

研究分担者 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、低罹患率地域をモデルとして結核菌サーベイランスにゲノム比較解析を導入することによって、どのように結核伝搬経路が見出されるのかについて検討を行った。具体的には、3年間の菌株サーベイランスにおいて検出された17クラスター（49株）についてIllumina MiSeqによるショートリードを獲得し、マッピング解析によって得られた変異データを比較することにより、クラスター内での菌株一致度を確かめた。その結果、7クラスターのみが同一株による感染事例であることが判明し、残り10クラスターは直近の伝播による感染ではないことが示唆された。また、変異の蓄積機序から、クラスター内の詳細な伝搬経路が推定できた。本結果はゲノム比較解析の異同判定が極めて精密であることを示すと共に、現行における実地疫学の再評価および今後のゲノムデータ蓄積と運用における指針になりうるものである。

研究協力者

阿彦 忠之（山形県衛生研究所・顧問）
瀬戸 順次（同・専門研究員）
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）

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手がかりとしても重要な役割を果たす。

近年、次世代シーケンサー (NGS, Next Generation Sequencer) によるゲノム解析技術の躍進に伴い、結核菌でもゲノム全域を対象とした解析（比較ゲノム解析）が容易になってきた。比較ゲノム解析では、菌株ごとの遺伝的個性を詳細に検索できるだけでなく、変異情報を他の菌株と比較することにより、理論上もっとも高精度な異同判定、相同性解析が可能となる。

ゲノム解析技術の劇的な発達に伴って、

A. 研究目的

臨床分離株には、菌株ごとに様々な遺伝子レベルの違いがある。遺伝子解析によって見出される菌株多様性は、病原性の解明や薬剤耐性の検出といったような、細菌学的な結核の理解と臨床応用に向けた研究の

結核研究も飛躍的に進展する可能性が高い。そこで本研究課題の目的は、そうしたゲノム解析の手技手法を結核対策に取り入れるために、我が国における結核菌臨床分離株のゲノムデータを効率的に蓄積し、その遺伝的多様性を網羅することとした。本課題を通して、変異情報を共同研究者のみならず、不特定多数の結核研究者と共有、公開することができる。そうした基礎情報を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。また、何らかの菌株個性が推定されるケース（多剤耐性株の市中伝搬や、特定患者集団における蔓延など）においては、一般患者由来株の変異情報をあらかじめ蓄積しておくことによって、危険度の高い菌株をいち早く発見することができる。

上述したように、結核菌の遺伝多型解析は菌株の異同判定に基づく伝播経路の推定に役立てられている（結核分子疫学）。なかでも、VNTR型別は簡便かつ容易であり、各自治体の保健所、衛生研究所において導入が進んでいる。しかし、型別データの蓄積に伴って、偶発的な型別一致（誤判定）が散見されるようになり、VNTR型別によってどの程度直近の伝搬を検出できているのか、検証の必要が生じている。

そこで本年度は、不特定多数の菌株を収集・分析する結核菌サーベイランスに着目し、VNTR型別が一致したケース（クラスター）についてゲノムデータを獲得、比較することにより、精密な異同判定を試みた。その際、解析フィールドを低罹患率地域（山形県）に設定することにより、今後のわが

国で想定される低罹患率化において、ゲノム研究が伝播経路推定にどのような知見を与えうるかについて評価できるように配慮した。

B. 研究方法

低罹患率地域における結核菌株サーベイランス. 山形県において実施された結核分子疫学サーベイランス（瀬戸ら、結核、2013）を解析対象とした。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、17クラスター）をゲノム解析対象株とした。

ゲノムデータの獲得. ゲノムデータ獲得にはMiSeq（Illumina社）を用いた。ライブラリの作成にはNextera DNA Sample Prep Kit（同）、シーケンシングにはMiSeq Reagent Kit v3（同）を用い、300 bp×2（ペアエンド）の配列長を獲得した。

クラスター内の菌株におけるゲノム比較解析. リードデータはCLC genomics workbench（QIAGEN社）によってマッピング解析を行った。H37Rv

（GenBank:AL123456.2）を参照配列とし、冗長度5以上のミスマッチ変異を株間変異として検出した。誤検出を避けるため、重複遺伝子、反復領域を除いた遺伝子コーディング領域のみを抽出し、異同判定に利用した。各株間の変異蓄積マップは微小進化における系統解析に汎用される

Median-Joining treeを採用した。本解析にはNetwork version. 4.613

（<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>）を利用した。

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の利用は、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

各クラスター内の変異数比較。マッピング解析によって検出された変異をクラスター内で差分解析し、菌株間の遺伝的相同性を比較した（表 1）。7 クラスター（クラスター ID2, 4, 5, 7, 8, 9, および 11. 表内で灰色に着色した。）ではクラスター内の変異数は非常に小さいことが観測され、これらが同一菌株による直近の伝播例であることが強く示唆された。一方、それ以外の 10 クラスターでは各株間の変異数が大きく、直接的な関係は薄いことが示された。高い一致性を示した 7 クラスターのうち 6 クラスターは、保健師らによる患者情報の集積によって集団事例の可能性がうまく把握されており、低罹患地域における伝播経路調査では、実地疫学解析がなお重要な役割を担い、ゲノム解析による裏付けによってそれを強固に補完できると考えられた。

ゲノム一致クラスター内の系統解析。ゲノム上に蓄積される点変異は基本的に不可逆であり、系統関係から結核菌の伝搬機序が推定可能である。そこで、マッピング解析によって同一株による伝搬事例と推定された 7 クラスターについて Median-joining tree を構築し、株間の詳細比較を試みた（図

1）。結果、特に大きな集団事例（クラスター 4）において詳細な伝搬機序が浮かび上がり、どのように結核菌が伝播・拡散していったのか、ゲノムデータから再構築可能であることが示唆された。

D. 考察

わが国における結核は、比較的最近（1960 年代）まで罹患率がきわめて高かったため、その時代に感染した潜在性結核患者が高齢化して再燃するケースが増えていると考えられる。このような場合、当時の流行株を遺伝多型解析から区別することは困難であり、伝搬経路を推定する際の信頼性を損ねる結果となってしまっている。ゲノム比較による厳密な異同判定はこうした国内の特異的状況を克服できる可能性があり、結核分子疫学におけるブレイクスルーを生み出しうると言える。

本課題では、VNTR 型別解析によって見いだされていた 17 クラスターのうち、7 クラスターのみが真の同一株、すなわち直近の伝播によって感染した患者由来株であることが示唆された。同一感染源の存在が示唆されたこれらの 7 クラスターでは、そのうち 6 クラスターで濃厚な患者間接触が確認されていた。一方で、異なる感染源が示唆された 10 クラスターでは、そのうち 7 クラスターでは患者間に疫学情報が得られていなかった。本結果は、直近の伝播は実地疫学情報によってある程度正確に絞り込めており、遺伝子解析はその結果を補佐することでより正確な伝搬経路推定が導けることを意味する。今後の低罹患率社会においても、現在の実地疫学情報の集積は結核対策に重要な知見を与えうるだろう。

わが国における結核菌株の集積および遺伝多型解析の状況は、主に各自治体の枠組みにおいてボトムアップ的に進められている。こうした状況において、効率的にゲノムデータの集積、活用を目指すことは大きな困難を含んでいると言ってよい。生菌の収集、P3 安全設備における DNA 精製に加え、次世代シーケンサーの手技、大規模データのバイオインフォマティクス解析などのような専門性の高いプロセスが随所に含まれているため、自治体ベースにおける展開は当面限局的になることが予想される。こうした中、結核公衆衛生におけるゲノム解析の導入は、より緊急性が高い事例、具体的には多剤耐性結核の流行や外国人結核の流入などにおけるリスク管理などにおいて集中的に実施していくべき課題なのかもしれない。

E. 結論

結核菌の遺伝型別解析において同一株と判定された臨床分離株は、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事例においても詳細な伝搬経路を個々に推定できる。今後、低罹患率化を迎える我が国において、実地疫学の充実とゲノム科学情報の蓄積により、正確な伝搬経路推定が可能になることが期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wada T, Iwamoto T, Tamaru A, Seto J, Ahiko T, Yamamoto K, Hase A, Maeda S,

Yamamoto T. Clonality and micro-diversity of a nationwide spreading genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. 2015. PLoS ONE. 2015;10(3):e0118495.

- 1) De Beer JL, Ködmön C, Van Ingen J, Supply P, Van Soolingen D, Jamieson FB, Bidovec-Stojkovic U, Brown T, Cirillo, DM, Cruz L, Miranda A, Dou HY, Fauville-Dufaux M, Fitzgibbon MM, García De Viedma D, Groenheit R, Haanperä-Heikkinen M, Indra A, Kam KM, Kramer R, Jiang GL, Niemann S, Obrovac M, Rasmussen EM, Refrégier G, Realpe T, Samper S, Sharma MK, Sougakoff W, Stakenas P, Stavrum R, Trenkler J, Wada T, Siame KK, Tafaj S, Cowan L, Sng LH, Seagar AL, Basu I, Rastogi N, Ferro BE, De Matos, F, Kipnis A, Van Soolingen D, Supply P. 2014. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis.* 18(5):594-600.

2. 学会発表

- 1) 和田崇之, 岩本朋忠, 瀬戸順次, 阿彦忠之, 田丸亜貴, 長谷篤, 前田伸司, 山本太郎. M 株の広域的分離の原因究明—比較ゲノム解析に基づく「結核ゲノム疫学」の導入. 第 89 回日本結核病学会総会 2014 年 5 月 岐阜
- 2) 和田崇之, 瀬戸順次, 阿彦忠之, 山本太郎. 低罹患率地域における結核菌臨床分離株の伝播経路追跡. 第 90 回日

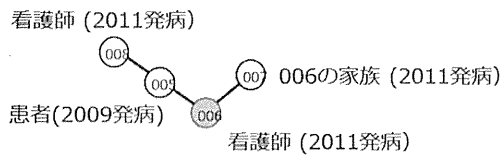
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

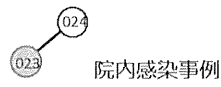
表1. 各VNTRクラスター株のゲノム比較によって見出された変異数

Cluster ID	No. of isolates	No. of total SNVs in a cluster	The largest No. of SNVs between two isolates with the highest similarity in a cluster	Phylogeny	Epidemiological relationship
1	4	35	15	Beijing, Modern	Middle
2	4	3	1	Beijing, Modern	High
3	2	36	36	Beijing, ST25/19	Middle
4	12	19	4	Beijing, ST11/26	High
5	2	1	1	Beijing, ST25/19	High
6	3	77	26	non-Beijing	Middle
7	2	1	1	Beijing, STK	High
8	2	2	2	Beijing, STK	High
9	2	4	4	Beijing, ST3	High
10	2	79	79	non-Beijing	Low
11	2	0	0	Beijing, ST25/19	Low
12	2	29	29	Beijing, ST25/19	Low
13	2	91	91	Beijing, ST25/19	Low
14	2	81	81	Beijing, ST25/19	Low
15	2	26	26	Beijing, ST3	Low
16	3	111	46	Beijing, ST3	Low
17	2	87	87	Beijing, ST25/19	Low

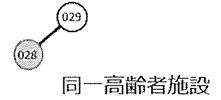
Cluster 02



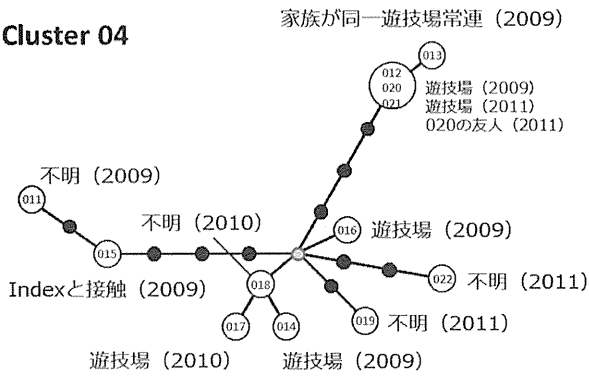
Cluster 05



Cluster 07



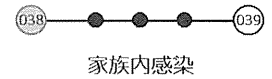
Cluster 04



Cluster 08



Cluster 09



Cluster 11

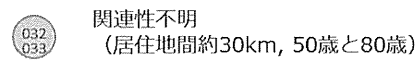


図 1. ゲノム比較によって同一株による感染と推定された7クラスターの変異関係を Median-joining tree によって示した。白丸はゲノム比較した菌株を示し、数字は菌株 ID 番号、円サイズは菌株数を示す。灰色は各クラスターの中で最も変異集積が少ない株、すなわち初発感染源により近い株を示している。黒点は変異塩基の数を示す。

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
分担研究報告書

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

研究分担者 山田博之
公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌部 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)に遺伝子そのものによる制御とは別にゆらぎ、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。

結核菌基礎研究の多くは、他の細菌を含む広範な生物学分野の研究と同様に分子生物学的、生化学的手法に頼ることなく行うことは不可能である。しかし、分子生物学的、生化学的手法による分析は、多くの場合、菌体の集団を材料として解析し、様々な遺伝子発現状況や病原関連因子、免疫原性分子の産生量を多様な菌体から構成される集団の平均値として示すことになる。この分析手法にはいくつかの未確認の前提が存在している。すなわち、(1) 集団内の個々の菌体はあらゆる点において全て同一であること、(2) 集団内の菌体は全て生菌であること、(3) 集団を構成する菌体数は明確であること、である。そして、最終的にはこれらの前提に基づいて集団を構成する単個菌当りの遺伝子発現量、病原関連因子や免疫原性分子の合成量を計算によって推測することになる。これらの前提が全て想定に基づくものであるため、最終的な結果も推定の域を出ない。

この科学的な不明確性を解消するため、本研究では、結核菌単一菌体の超薄連続切片を透過電子顕微鏡で観察することにより、単一菌体の基礎形態情報を獲得し、菌体のサイズ、表面積、体積と細胞質内に存在するリボソームを透過電子顕微鏡像で直接計測するアプローチを選択した。このアプローチは上述の分子生物学的、生化学的手法とまったく逆のアプローチで、多様な単一菌体の表現型を基本情報として菌の集団を推測するもので、単一菌体の情報が正確であれば集団の表現型も正確に推測可能である。すなわち前者は微分的に高次元の集団が示す特徴から全ての菌体が同一であるという前提で単一菌体の特徴を推測するアプローチであるのに対し、後者は多様な単一菌体の特徴から積分的により高次元の集団の特徴をより正確に推測するアプローチであると考えられる。

本研究では、急速凍結置換固定法で調製した結核菌標準菌株の超薄連続切片観察により、

一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、共通性とともにとど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三次