

3 4 . 疫学的関連がなく従来法で同一遺伝子型を示す

結核菌の一塩基多型解析法による識別

○片宗 千春、重村 洋明、江藤 良樹、濱崎 光宏（福岡県保健環境研究所）

【研究目的】

結核菌の分子疫学調査に用いる反復配列多型（VNTR）解析法は、ゲノムの特定領域のみ解析に用いるため、時間的・地理的等の疫学的関連性がない場合でも同一遺伝子型を示す場合がある。本研究の目的は、疫学的関連性が認められていないが VNTR 法で同一遺伝子型を示す菌株について、全ゲノムを用いた一塩基多型解析法により識別するとともに、その成果を保健所等に提供することで、結核菌感染対策の一助とすることである。

【研究の必要性】

結核は、国際連合において 2030 年までに流行終結が目標とされている公衆疫学上注視すべき疾患である。福岡県は全国に比べ結核罹患率が高いため、特に結核菌による感染拡大防止に努める必要がある。我々は、結核菌感染症の集団発生や感染経路の追跡等の感染症対策の一助とするため、2012 年より福岡県内で発生した結核患者由来株について反復配列多型（VNTR）解析法による分子疫学的調査を実施してきた。しかし、この方法では、対象ゲノムが一部の領域に限られているため、時間的・地理的等の疫学的関連性が認められないが同一の遺伝子型（VNTR 型）を示す菌株が出てくることがある。このような場合、「偶発的な VNTR 型の一致」あるいは「同一菌株による集団感染」の判別がつかず、我々はその解釈に苦慮してきた。そのため、より精度の高い分析法を用いてこれらを正確に判別する必要がある。精度の高い分析法の一つとして、全ゲノム領域を対象とした一塩基多型（SNV）解析^①があり、疫学的関連性が認められない菌株を判別することができる。従って、本研究により福岡県における結核菌の分子疫学調査に SNV 解析を応用できれば、より正確な情報を保健所等に提供し疫学調査等に役立てることができるようになる。また、得られた情報に基づいた結核菌の感染防止対策や啓発に大きく寄与できる。そのため、公衆衛生の観点から本研究は有用である。

【研究計画】

福岡県内の患者由来結核菌のうち、疫学的関連性が認められていないが VNTR 法で同一遺伝子型を示す結核菌について SNV 解析を行い、菌株をより詳細に識別する。菌株が集団感染事例に該当するか検討し、疫学的関連性がある可能性の有無について再評価する。

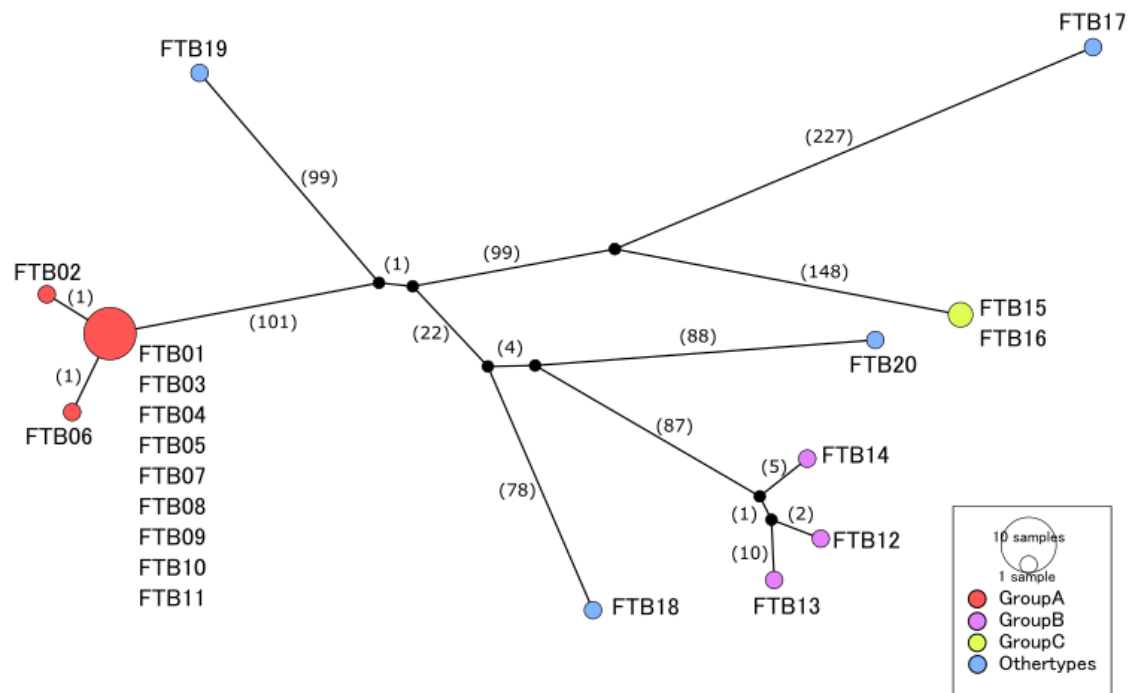


図1 ハプロタイプネットワーク図 (括弧内は SNVs の数)

4. 結果

ハプロタイプネットワーク図は、細菌ゲノムの SNVs の構成の違い (ハプロタイプ) の関係性を示した図である。それぞれの丸 (ノード) は、一つのハプロタイプを示しており、丸の大きさが菌株数を示している。本研究において、異なる VNTR 型を示す菌株は、SNV 解析においても、異なるノードに分類された (図1)。また、VNTR 型グループ A (11 検体) は 3 ノードに分類され、FTB02 と FTB06 は他株と 1 個の SNV の違いであった。VNTR 型グループ B (3 検体) はすべて違うノードに分類され、最大 16 個の SNVs の違いがあった。VNTR 型グループ C (2 検体) は同じノードに分類された。

【考察と今後の課題】

過去の研究より、患者に疫学的関連のある場合、SNVs がほとんどない (通常は 6 個未満) ことが指摘されている^③。また、結核菌ゲノムの推定変化率は、1 年あたり 0~5 個の SNVs であり^④、同一患者から分離された検体を解析した場合、変異の少ない再発症例 (SNVs 0~6 個) と再感染症例 (SNVs 1,306~1,419 個) を区別できる可能性が指摘されている^③。

今回、VNTR 型グループ A の FTB05 の患者は高齢であり、同グループの他患者とは居住区も離れていたため、過去に感染した結核を発病する高齢者結核を疑っていた。この場合、SNVs は 6 個以上離れていることが想定されていたが、VNTR 型グループ A はいずれも 1 個以内の SNVs であった。したがって、FTB05 を含めてグループ A は直接的もしくは間接的な疫学的関連が存在していた可能性あり、2018 年から 2019 年にかけて福岡県内の広範囲に感染が広がっていた可能性が示唆された。VNTR 型グループ B は、分離年も患者の地域も違う疫学的関連が不明な菌株であるが、2018 年、2020 年及び 2021 年と度々確認された VNTR 型であり、特定できていない感染源の存在が懸念されていた。しかしながら、SNV 解析によると、これらの株は最小 8 個、最大 16 個の SNVs であったため、同じ株に

よる感染の可能性は低いことが示唆された。VNTR 型グループ C は、短期間に同一施設で感染した患者から分離された菌株であり、SNV 解析においても同じノードを示すことが示された。

本研究により、これまでの VNTR 解析では疫学的関連が不明なまま調査していた事例に対し、グループ A の場合は疫学情報の再調査の有用性があり、グループ B は不要である可能性が示唆された。このことから、SNV 解析にて詳細に菌を識別することは、分子疫学調査で度々生じる「菌株の偶発的な VNTR 型の一致」あるいは「同一菌株による集団感染」の判別に対し、有用であることが示された。一方で、SNV 解析は VNTR 解析に比べ費用が高いため、疫学的関連性がなく VNTR 型が一致する検体のすべてに活用するのは、費用対効果が悪い可能性がある。今後、どのような時に SNV 解析を活用するかについて検討していく必要がある。

【参考文献】

- (1) Sekizuka, T. et al. (2015). TGS-TB: Total Genotyping Solution for Mycobacterium tuberculosis Using Short-Read Whole-Genome Sequencing. *PLoS One* 10(11): e0142951, doi: 10.1371/journal.pone.0142951.
- (2) 結核分子疫学調査の手引き 第一版 (平成 29 年 7 月)、公益財団法人 結核予防会 結核研究所、http://www.jata.or.jp/dl/pdf/law/2017/09_1.pdf (アクセス 2022 年 8 月 31 日)
- (3) Bryant, JM. et al. (2013). Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with Mycobacterium tuberculosis: a retrospective observational study. *Lancet Respir. Med.* 1(10):786-792, doi: 10.1016/S2213-2600(13)70231-5.
- (4) Walker, TM. et al. (2013). Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect. Dis.* 13(2):137-146, doi: 10.1016/S1473-3099(12)70277-3.

【経費使途明細】

使 途	金 額
物品費 (DNA 抽出試薬、プライマー、書籍 他)	249,400 円
情報収集費 (バイオインフォマティクス実践 受講料)	50,600 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円