

論文の内容の要旨

論文題目 日本における結核菌の分子疫学と迅速タイピング法の確立

指導教員 北 潔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名 村瀬 良朗

1. 背景と目的

科学的根拠に基づいた効果的な結核対策を実施するためには、社会の中で結核菌がどのような感染経路を経て人々へ感染しているのかを明らかにする必要がある。そのためには臨床分離された結核菌を遺伝子タイピングする必要がある。現在、この目的のために世界で標準的に用いられているのが **IS6110-RFLP** 分析法である。**IS6110-RFLP** 法は、ゲノム中に存在する挿入配列 **IS6110** のコピー数と挿入位置の多様性に基づいたタイピング法であるが、以下のような欠点がある。すなわち、①高分子 DNA を数 μg 要するため、約 1 ヶ月の結核菌培養期間が必須である、②実験操作が複雑であり、また感染予防のための特別な施設が必要なため、全国の検査室で実施するのが困難である、③研究施設間において **RFLP** バンドパターンの比較や情報の共有をおこなうことが難しい、などである。

こうした **RFLP** 法の欠点を解決するためのタイピング法として、近年、**PCR** を用いた 2 つの迅速タイピング法が報告されている。1 つは、ゲノム上に存在する 43 箇所の **spacer** 配列の有無を調べる **Spoligotyping** 法である。**Spoligotyping** 法は **RFLP** 法とともに欧米で広く用いられているが、日本では **Spoligotyping** パターンの多様性が限られる **Beijing family** (北京遺伝子型) が蔓延していると考えられており、一般的には用いられていなかった。もう 1 つの迅速タイピング法が本研究で着目した **VNTR** (**Variant Numbers of Tandem Repeats**) 法である。**VNTR** 法は、ゲノム中に存在するヒトミニサテライト様反復配列多型に基づいたタイピング法であるが、**PCR** を用いた分析法のため、喀痰などの臨床材料から迅速に実施可能であり、また、解析結果が数値で表されるため全国規模での結果の共有と比較が容易であるという特徴を持つ。**VNTR** 法の識別力は、組み合わせる反復配列多型領域の場所 (**locus**) と数により決定されるが、これ

まで日本の結核菌に対して、どの locus を何領域分析する必要があるのか分かっていなかった。

本研究では、結核菌感染経路の解明を日本全国で実施可能とすることを目的として、各医療施設や研究施設において導入可能な迅速タイピング法の確立を目指した。

2. 従来のタイピング法を用いた日本における結核菌の分子疫学

日本国内における標準的な迅速タイピング法を確立するためには、まず、日本で分離される結核菌が既存の遺伝子タイピング法でどのようにタイピングされるかを明らかにする必要がある。本論文の前半部では、現在用いられている代表的な結核菌タイピング法(Spoligotyping 法、IS6110-RFLP 法、MIRU-VNTR 法)を用いて、全国の都道府県で分離された結核菌 325 株を分析した結果について報告する。

(1) 日本で分離される結核菌遺伝子型分布の特徴

日本で分離される結核菌の遺伝的多様性を明らかにする目的で、Spoligotyping 法を用いた結核菌の遺伝子型分類をおこなった。その結果、全体の 73.8%という極めて高い割合で Beijing family が存在していることが明らかとなった。これまでに韓国や中国などの極東アジア地域で Beijing family が蔓延しているとの報告がなされていたが、本研究結果は日本においても結核症の大部分が Beijing family によって引き起こされていることを示している。Beijing family は病原性や多剤耐性結核との関連が指摘されており、また、その分布域を急速に世界各地へ拡大させていることから国際的にも注目されている。そのため、Beijing family の迅速タイピング法の確立は日本国内だけでなく、その他の地域の結核対策においても重要な役割を果たすと考えられる。

(2) 日本分離株を用いた IS6110-RFLP の識別力の検討

Beijing family が高度に蔓延している日本において、現在の標準的な結核菌タイピング法である IS6110-RFLP の識別力を調べた。IS6110-RFLP による十分な識別力が期待される菌株（IS6110、6 コピー以上）の割合は全体の 94.2%であった。これらの菌株のうち 85.3%がユニークな RFLP パターンを持つ菌株としてタイピングされた。IS6110 を 6 コピー以上もつ菌株では、Beijing family 及びその他の菌株間において識別力に大きな違いは存在せず、IS6110-RFLP 法は日本の結核菌に対しても有効なタイピング法であることが改めて確認された。

本研究で用いた菌株は全国の医療機関から無作為に収集されているが、同一 RFLP

パターンを示す菌株群が隣県以上の比較的広域にわたり分布していた。このことは、患者同士の接触状況を反映しない RFLP クラスター形成株が全国的に存在することを示していると考えられ、感染源追跡調査等で RFLP 分析を実施する際にはこうした株の影響を考慮する必要があると考えられた。

(3) 従来の迅速タイピング法と RFLP 法の識別力の比較

米国疾病予防管理センター(CDC)の提案している 12 MIRU-VNTR と Spoligotyping による迅速タイピング法を日本に導入することが可能であるかを検討した。分析の結果、12 MIRU-VNTR + Spoligotyping の識別力は RFLP 法と比較して大きく劣っていた(クラスター形成率: 66.8% vs. 18.5%)。その識別力は、特に Beijing family において低く、また、56 株、38 株といったサイズの大きな同一 VNTR クラスターが形成されるという問題点も存在していた。

3. 新しい迅速タイピング法の確立

本論文の前半部において、IS6110-RFLP 法は日本国内においても有効なタイピング方法であることが確認された。しかしながら、米国等で用いられている 12 MIRU-VNTR + Spoligotyping は、その識別力が低く、RFLP 法の代替法として日本に導入することが困難であることが示された。本論文の後半部では、Beijing family が多数を占める日本の結核菌に対して有効な VNTR locus を評価し、組み合わせることにより、日本全国で用いることが可能な標準的 VNTR 法の確立を目指した。

(1) Beijing family のタイピングに有効と考えられる VNTR locus の評価

Beijing family に対してコピー数の多様性を示すことが報告されていた locus を評価対象に加え、合計 35 locus について、その識別力を全国から収集された結核菌 325 株を用いて調べた。識別力を示す HGDI 値を用いて 35 locus を分類すると、16 locus は高い識別力(HGDI > 0.5)を示し、9 locus は中程度(0.5 > HGDI > 0.3)であり、残りの 10 locus は比較的安定(0.3 > HGDI)な locus と評価された。これらのうち、識別力の高い 4 locus (VNTR 3232、4120、3820、QUB-11a)については、コピー数の測定が困難な株が多く(全体の 5%以上)存在したため、選択対象から除外した。

(2) VNTR locus の組み合わせの最適化

RFLP 法を代替するタイピング法を確立するためには、その識別力(クラスター形成率、クラスターサイズ)が RFLP 法を超えている必要がある。そこで、これらの合計 31 locus の中から識別力の高い順に locus を組み合わせ、必要な locus 数を決定した。その結果、12 locus (12 VNTR (JATA))を用いることにより、その識別力が RFLP 法を超えることが明らかになった。

(3) 12 VNTR (JATA)を用いた結核の同一感染源が疑われた事例の解析

12 VNTR (JATA)を用いて実際の同一感染源が疑われた菌株群(9例 23株)の解析を実施したところ、すべての例において RFLP 法の結果と同様に、異なる株としてタイピングされた。このことから、12 VNTR (JATA)は実際の感染源追跡調査でも有用な方法として用いることが可能であると考えられた。

(4) 12 VNTR (JATA)とその他の主要なタイピング法の比較

12 VNTR (JATA)をこれまでに報告されている他のタイピング法と比較した。まず、従来の標準的な迅速タイピング法である 12 MIRU-VNTR + Spoligotyping と比較すると、その識別力は大幅に向上していた(クラスター形成率: 12.6% vs. 66.8%)。また、最近 Supply らにより提案された 15 VNTR (Supply)、24 VNTR (Supply)と比較すると、より少ない locus 数にもかかわらず、12 VNTR (JATA)は 15 VNTR (Supply)の識別力を上回り、24 VNTR (Supply)とほぼ同等の能力を示していた。

4. 今後の展望

本研究で得られた成果は、全国の地方衛生研究所等の関係施設へ還元され、今後、タイピング法と結果の共有がなされる予定である。結核対策は地域を越えて迅速に実施される必要があるが、12 VNTR (JATA)を活用することにより、これまで未解明であった広域における結核菌伝播の状況が明らかにされ、科学的根拠に基づいたより効果的な結核対策の実施が可能になると期待される。