

Ⅲ 調查研究報告

高齢者結核対策支援と薬剤耐性迅速診断法の導入に関する調査研究（平成 26～27 年度）

秋田県で分離された結核菌の

イソニアジド及びピラジナミド耐性関連遺伝子と遺伝系統の解析

今野貴之 高橋志保 熊谷優子

秋田県における薬剤耐性結核菌の検出状況を把握するため、2012 年から 2015 年に県内の一医療機関で分離された結核菌 162 株を対象にイソニアジド、ピラジナミドに対する耐性化の状況を調査した。耐性と判定された菌株については、両薬剤の耐性化に関わる遺伝子の DNA シークエンス解析を行い、その耐性化機構を調査した。その結果、イソニアジドにおいては、医療機関の感受性試験で耐性と判定された 13 株の内 8 株で何らかの遺伝子変異が確認された。一方、ピラジナミドでは、3 株が耐性と判定されたものの、遺伝子変異は確認されなかった。さらに、分離株の遺伝系統を調査したところ、県内では北京祖先型 STK が多く、北京新興型が少ない傾向がみられ、本県における高齢者結核の多さが一因と考えられた。また、イソニアジド耐性株の中には多剤耐性結核菌に多いとされる北京祖先型 ST11/26 が確認された。

1. はじめに

結核は未だ国内最大の感染症であり、患者数は全国で年間約 2 万人、死亡者は 2 千人に及ぶ。現在は、数種類の薬剤を服用することで完治するようになったが、服薬期間は標準治療で 6 ヶ月もしくは 9 ヶ月必要である。治療の途中で服薬をやめてしまったり、不適切な薬剤を用いたりすると薬剤耐性となり、治療困難になる場合がある。結核菌に有効な抗菌薬は限られており、薬剤耐性結核菌の蔓延防止は、本感染症の対策上非常に重要となっている。特に、イソニアジドは結核の治療や予防の第一選択薬であり、治療の柱となる薬剤の一つとなっている。また、ピラジナミドも重要な第一選択薬の一つであり、ピラジナミドの服薬が可能な場合は、治療期間を 6 ヶ月にすることが可能である。

本研究では、秋田県における結核患者の治療・入院の中核施設である市立秋田総合病院の協力のもと、県内におけるイソニアジド及びピラジナミド耐性結核菌の分離状況やその耐性機構を解明するため、両薬剤の耐性に関わる遺伝子変異の検出状況を調査した。さらに、分子疫学的な解析により秋田県における結核菌の遺伝系統を解明した。

2. 方法

2.1 供試菌株

市立秋田総合病院から 2012 年から 2015 年までに受領した結核菌 162 株を対象に調査した。

2.2 薬剤耐性関連遺伝子の解析

医療機関による薬剤感受性試験でイソニアジド耐性と判定された結核菌について、*katG*、*fabG1/inhA*、*ahpC*、*furA* の DNA シークエンス解析を行い¹⁻³⁾、遺伝子変異の有無を調査した。また、ピラジナミドについては医療機関による薬剤感受性試験で耐性と判定された 3 株を含む計 75 株について *pncA* の DNA シークエンス解析を行い¹⁾、遺伝子変異の有無を調査した。

2.3 JATA12-VNTR による遺伝系統の解析

結核菌のゲノム中の反復配列（VNTR）12 カ所を PCR 法により増幅し、増幅断片の大きさから反復数を計測した。得られた 12 カ所の反復数のプロファイルから、Seto, et al.⁴⁾ の方法に従い遺伝系統を推定した。

3. 結果と考察

3.1 薬剤耐性遺伝子変異の検出状況

供試した結核菌 162 株の内、医療機関における感受性試験によりイソニアジド耐性と判定さ

表 イソニアジド耐性遺伝子変異の保有状況

No.	受領日	年齢	性別	治療歴	<i>katG</i>	<i>fabG1/inhA</i>	<i>ahpC</i>	<i>furA</i>
1	2012/6/21	54	M	無	S315T	—	—	ND
2	2012/6/21	65	F	無	(L148V)	-8 T→A	—	ND
3	2012/7/2	82	M	有	—	(E59K)	-48 G→A	ND
4	2012/7/17	85	M	有	—	—	—	—
5	2013/2/19	65	M	有	L141S	—	—	—
6	2013/6/4	85	M	無	S315T	—	—	ND
7	2013/7/13	74	M	無	—	-15 C→T	—	ND
8	2012/7/26	80	F	有	—	NG	—	A14V
9	2012/8/6	68	F	有	—	—	—	—
10	2013/9/20	85	F	有	S315T	—	—	ND
11	2013/9/20	51	M	無	—	—	—	—
12	2013/10/30	84	M	無	—	—	—	—
13	2014/9/26	91	M	有	—	—	—	—

ND: 検査実施せず, NG: 検査不可, (): 耐性への関与不明な変異.

れたのは13株であった。また、過去に結核治療歴があった人から分離された結核菌は162株のうち22株であった。イソニアジド耐性13株のうちの7株が治療歴のある人から分離された菌株であり、治療歴の有無がイソニアジド耐性化のリスクファクターとなっていた。

イソニアジド耐性株13株の*katG*, *fabG1/inhA*, *ahpC*, *furA*の変異保有状況を表に示す。13株のうち、いずれかの遺伝子に何らかの変異が検出されたのは8株で、耐性機構の解明率は62%であった。治療歴があった場合は、変異が検出された結核菌の割合も18%と高率であった。

最も頻繁に変異が検出された遺伝子は、*katG*であった。イソニアジドはプロドラッグであり、結核菌のKatG（カタラーゼ-ペルオキシダーゼ）の作用により活性化され効力を発揮する。そのため、*katG*に変異が生じ、その酵素活性が低下した結核菌ではイソニアジドが活性化されず耐性となる⁵⁾。*fabG1/inhA*においては、2株で遺伝子上流の転写活性に関わる領域に変異が検出され、その内の1株では*katG*にも変異が検出された。ただし、この変異箇所は酵素の活性部位や活性を発揮するために必要な補助因子の結合部位とは近接していないことから、耐性への関与は不明である⁶⁾。*FabG1/InhA*は、結核菌の細胞壁を構成するミコール酸の合成に関与し、イソニアジドの標的となっている。転写調節領域への変異により発現量が増加したために、イソニアジド耐性となったと考えられる⁵⁾。*ahpC*においても、1株で遺伝子上流に変異が検出された。*ahpC*のコードする酵素は、KatGによるイソニアジドの活性化に抑制的に働くため、変異によりその抑制効果が高まったと考えられる⁵⁾。

*furA*においては、1株で変異が検出された。FurAはKatGの転写因子であり、*furA*の変異は*katG*の発現に影響する可能性がある。

ピラジナミドに関しては、抗菌活性がpH5.5付近にあり、通常の感受性試験では検査が困難なことが知られている。本研究においても、耐性株3株を含む75株を検査したが、*pncA*の変異は検出されなかった。このことから、県内では実際に*pncA*に遺伝子変異を有するようなピラジナミド耐性結核菌は非常に稀と考えられた。

3.2 秋田県における結核菌の遺伝系統の特徴

結核菌は進化と伝播の歴史の中で、地理的分布と関連した遺伝系統を持っていることが報告されている^{7, 8)}。遺伝系統はインド・オセアニア、東アジア、東アフリカ・インド、ユーロ・アメリカ、西アフリカⅠ、西アフリカⅡの6つの系統に大別される。国内で多い東アジア系統は北京型とも呼ばれ、北京型はさらに祖先型と新興型の遺伝子型に分けることができる。本研究では、Seto, et al.⁴⁾の方法に従いVNTRによる分子疫学的解析から遺伝系統を推定した(図)。

結核菌の遺伝系統の内、北京型の結核菌はこれまでの約1,000年の間で東アジア等における人口増加に伴って変異してきた系統で、一部の系統は薬剤耐性や感染力が強いなどの特徴を持っている。県内で特に分離頻度の高かった北京祖先型STKは、Iwamoto, et al.⁹⁾の研究で若年層には少ない系統であることが示唆されている。一方、感染力が強く若年層を中心に感染が広がっているとされる北京新興型の秋田県での割合は、全国に比べるとやや低い傾向にあった。これらの結果は、本県における高齢者の結核の多

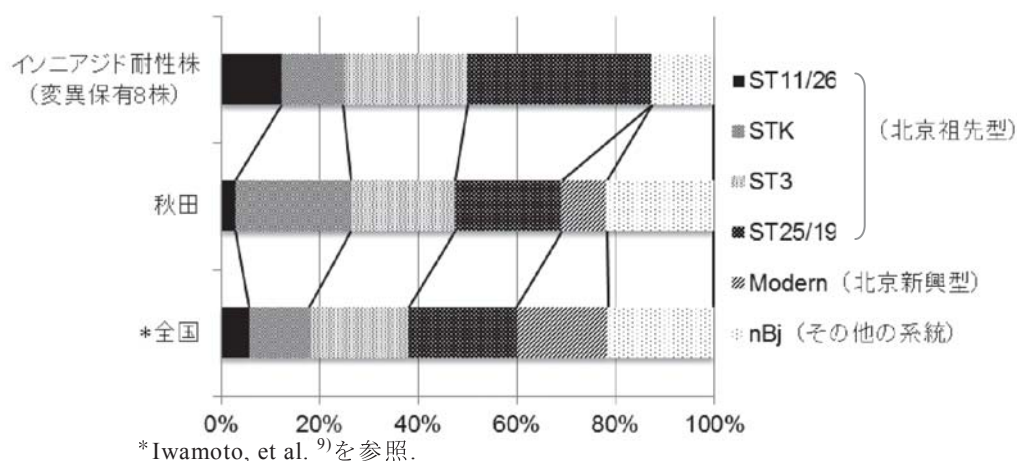


図 結核菌の遺伝系統の割合

さを反映しているものと考えられた。また、多剤耐性結核菌に多い系統とされる ST11/26 は分離数こそ少ないが、イソニアジド耐性結核菌が確認された。

薬剤耐性や感染力が強いなどの特徴的な遺伝系統の結核菌が今後増加するかどうかについては注視していく必要があり、遺伝系統の解析は今後の結核菌サーベイランスに有用な情報を提供するものと考えられた。

謝辞

本研究に多大な御協力を頂いた市立秋田総合病院呼吸器内科の本間光信先生、臨床検査科の金田深樹先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Sekiguchi J., Miyoshi-Akiyama T., Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z., Kirikae F., Toyota E., Kobayashi I., Morita K., Kudo K., Kato S., Kuratsuji T., Mori T., Kirikae T.: Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol*, **45**, 2007, 179-192.
- 2) Fang Z., Doig C., Rayner A., Kenna D.T., Watt B., Forbes K.J. : Molecular Evidence for Heterogeneity of the Multiple Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Population in Scotland (1990 to 1997) , *J Clin Microbiol*, **37**, 1999, 998-1003.
- 3) Ramaswamy S.V., Reich R., Dou S.J., Jasperse L., Pan X., Wanger A., Quitugua T., Graviss E.A.: Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 2003 1241-1250.
- 4) Seto J., Wada T., Iwamoto T., Tamaru A., Maeda S., Yamamoto K., Hase A., Murakami K., Maeda E., Oishi A., Migita Y., Yamamoto T., Ahiko T.: Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation, *Infect Genet Evol*, **35**, 2015, 82-88.
- 5) 谷口初美：多剤耐性結核菌－その耐性機構を中心に－，産業医科大学雑誌，**22**，2000，269-282.
- 6) Cardoso R.F., Cooksey R.C., Morlock G.P., Barco P., Cecon L., Forestiero F., Leite C.Q., Sato D.N., Shikama M.de L., Mamizuka E.M., Hirata R.D., Hirata M.H.: Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil, *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 2004, 3373-3381.
- 7) 岩井和郎，前田伸司，村瀬良朗：結核菌と結核症の考古学－その発生から世界流行まで－，結核，**85**，2010，465-475.
- 8) 岩本朋忠：世界的感染拡大傾向が危惧される結核菌北京型株，複十字，**9**，2009，20-21.
- 9) Iwamoto T., Fujiyama R., Yoshida S., Wada T., Shirai C., Kawakami Y.: Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan, *J Clin Microbiol*, **47**, 2009, 3340-3343.