

平成 28 年度（第 11 回）秋田県健康環境センター研究発表会抄録

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

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治療できるようになったが、服薬期間は少なくとも 6 ヶ月に及ぶ。しかしながら、治療の途中で服薬をやめてしまったり、不適切な服薬の仕方をし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である。

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であるが、これまで秋田県におけるイソニアジド耐性結核菌に関する調査はなく、その耐性機構等については不明であった。そこで、本研究では秋田県の結核患者の治療・入院の中核的医療機関である市立秋田総合病院と共同で、イソニアジド耐性結核菌の検出状況とそのイソニアジド耐性に関わる遺伝子変異の保有状況を調査した。さらに、分子疫学的な解析をもとに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 イソニアジド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、イソニアジド耐性に関わる遺伝子 *katG*, *fabG1/inhA*, *ahpC*, *furA* の DNA シークエンス解析を行い、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. (*Infect Genet Evol.*, 35, 82-88, 2015) の方法に従い、最大事後確率法により遺伝系

統を推定した。

3. 結果と考察

3.1 結核菌のイソニアジド耐性遺伝子変異の検出状況

供試した結核菌 162 株のうち、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が 162 株中 22 株あり、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。これは、過去の結核治療の際、途中で治療を中断したり、治療が不十分であったりすると、イソニアジドに強い結核菌が体内に残存し、耐性化したためと考えられる。

イソニアジド耐性株 13 株のイソニアジド耐性に関わる遺伝子 *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（そのままでは不活性な、もしくは活性の低い状態で投与される医薬品）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。*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た。*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、イソニアジド耐性になったと考えられる。*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。*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。

イソニアジドの耐性機構は多岐にわたり、完全に解明されてはいない。実際、不明な場合も多く、解明率はこれまでの報告でも 60～90%程度である。県内のイソニアジド耐性株からも様々な遺伝子変異が検出されており、その耐性機構は多様であった。

表 イソニアジド耐性遺伝子変異の保有状況

遺伝子解析							
イソニアジド耐性株	変異あり				なし	変異保有株の割合	
	<i>katG</i>	<i>fabG1/inhA</i>	<i>ahpC</i>	<i>furA</i>			
感受性試験	治療歴あり (7株／22株)	2		1	1	3	18%
	初回、不明 (6株／140株)	2	2			2	2.9%
	計:13株／162株	4	2	1	1	5	
		8					4.9%

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。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.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うち、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.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おり、本県における高齢者の結核の多さを反映している結果と考えられた。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、イソニアジド耐性の結核菌では全体に比べ割合がやや高かった。感染力が強いとされる北京新興型の割合は、秋田県では全国に比べるとやや低い傾向にあった。

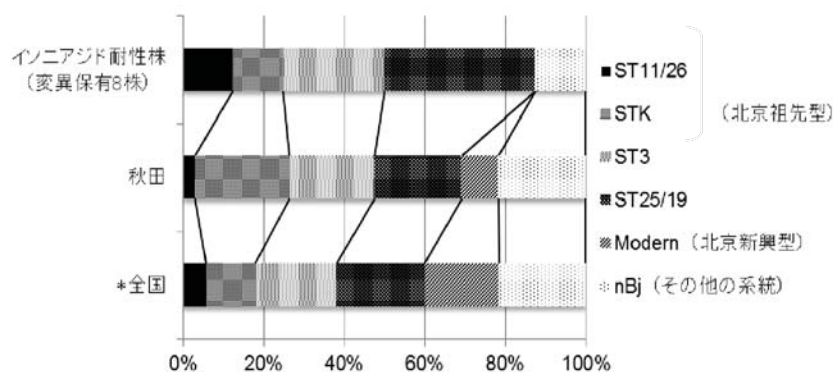
このような薬剤耐性や感染力が強いなどの特徴的な遺伝系統の結核菌が今後増加するかどうかについては注視していく必要があり、遺伝系統の解析は今後の結核菌サーベイランスに有用な情報を提供するものと考えられた。

【研究協力者】

市立秋田総合病院

呼吸器内科 本間光信先生

臨床検査科 金田深樹先生



*Iwamoto, et al. (J Clin Microbiol., 47, 3340-3343, 2009) を参照

図 結核菌の遺伝系統の割合