

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08724

研究課題名(和文) 結核菌が多剤耐性、超多剤耐性化するメカニズムの解明とそのマーカーの探索

研究課題名(英文) Elucidation of the drug-resistance acquisition mechanism in Mycobacterium tuberculosis to be multidrug and extremely-multidrug resistant and identification of those possible genetic markers.

研究代表者

中島 千絵 (Nakajima, Chie)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授

研究者番号：60435964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌の多剤耐性化は、薬剤の作用分子をコードする遺伝子上に順次変異が蓄積されて行くことによって生じるが、特定の菌株でより耐性化や耐性菌による二次感染が起こりやすいことが知られている。結核高蔓延国であるミャンマー、ネパール、タイにおいて得られた多剤耐性結核菌株の遺伝子解析を行ったところ、北京型のモダンタイプと呼ばれる系統の割合が薬剤耐性の度合いと共に上昇し、また、イソニアジド耐性に係るKatG315の変異等、特定の遺伝子変異を持つ株が蔓延している傾向にあった。これらの特徴は感染性の高い多剤耐性結核菌を早期に特定するためのマーカーとして使用可能であると考えられ、簡易検出用のPCR法の開発に至った。

研究成果の概要(英文)：Sequential acquisition of mutations in drug-resistance associating genes causes an emergence of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis (MDR-MTB). The Beijing genotype of MTB is known to be associating with MDR, and its prevalence among MDR-MTB population was significantly higher than that in non-MDR MTB in three TB high-burden countries; Myanmar, Nepal and Thailand. The majority of the Beijing type isolates belonged to the “modern” subtype and most of them had putative KatG S315T and RpsL K43R mutations suggesting those were isoniazid and streptomycin resistant. Those genetic characteristics can be used as a marker of transmissible MDR-MTB; thus, we have developed simple detection methods including a multiplex PCR to identify the “modern” type of the Beijing lineage and a line probe assay to diagnose isoniazid resistance.

研究分野：細菌学、感染症学

キーワード：結核 多剤耐性 遺伝子解析 型別 疫学

1. 研究開始当初の背景

結核は現在でも世界中で年間約1千万人の新規患者を出し、140万人を死に至らしめている重要な感染症である。更には近年、標準的な結核治療に反応しない多剤耐性菌が出現し、大きな問題となっている。結核の一次選択薬のうち、最も有用な2剤であるイソニアジド (INH) 及びリファンピシン (RFP) に対する耐性を獲得したものを多剤耐性結核と呼び、通常その治療には1年以上の長い期間を要する。日本における多剤耐性結核の割合は1%未満であるが、結核の高蔓延国ではその割合は高くなる傾向にあり、初感染時に既に30%以上が多剤耐性菌となっている国もある。多剤耐性結核の治療には複数の薬の併用投与が行われるが、これらの二次選択薬にも耐性を獲得する株が現れており、とりわけ有効なフルオロキノロン (FQ) とアミノグリコシド系の注射剤 (カナマイシン (KM) 等) にも耐性をも獲得したものは超多剤耐性菌と呼ばれ、その治療は困難を極め、若くして亡くなる患者も珍しく無い。ところが、高蔓延国の多くでは、初感染例から既にこれらの耐性菌に感染している可能性があるにも係わらず、迅速・簡便で安価な識別法が無いため通常の治療が施され、更なる耐性菌の伝播を生む結果となっている。

結核菌では他の多くの菌と異なり、薬剤耐性獲得メカニズムはもっぱらゲノム上の塩基置換、とりわけ薬剤の標的分子をコードする遺伝子上の変異に頼っている。通常、薬剤の標的分子は菌の生存や増殖に必須の分子であるため、形が変わって薬剤が結合しにくくなった標的分子は活性を失い、菌は死に至る。薬剤から逃れつつ、分子の活性を保つことができる変異は非常に限られており、臨床分離株で観察される変異は薬剤ごとに特定の数種類の変異に収束する。取り分け多剤耐性化した株の蔓延が示唆されるようなケースでは、ごく限られた特定の変異がポピュレーションの大半を占めていることが多い。これらの観察結果は、許容可能な変異の中でもある特定の変異が菌の生存にとってより有利であり、これらの変異を獲得した菌は薬剤に対する耐性を維持したまま次の患者へ感染・伝播できることを示唆している。また、上記のような薬剤耐性変異株の一部においては、耐性獲得に伴って損なわれた酵素活性を補完するような追加の変異 (微小進化) が起きていることが報告されている。

結核菌は、蔓延している地域や宿主となる人のポピュレーションの違いによって、幾つかの系統に分類されている。その中で、アジアを発祥の地として世界中に広がりつつある北京型と呼ばれる系統の株が、多剤耐性結核の蔓延に大きく関与している可能性が示唆されている。北京型は、他の系統よりも遺伝子変異を起こしやすく耐性菌を生じやすいと言われており、上述の様な微小進化や適応が起こりやすい株であると考えられる。即

ち、多剤耐性化した状態で蔓延している菌株には、特定の系統や遺伝子上の変異といった特徴があり、その特徴を検出することによって、次の患者に伝播し得る危険な薬剤耐性菌を見分けられる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

多くの多剤耐性蔓延株に共通に見られる変異は、結核菌の薬剤耐性化のメカニズムを解明する鍵であると同時に、次の患者へ伝播可能な危険な耐性菌のマーカーとなる。もし、特定の変異を持った多剤耐性菌の適応度や感染性が他の株に比べて高いことがあらかじめ分かれば、それらの変異を持った株の患者に対する治療方針を変更したり、場合によっては一時的な隔離によって多剤耐性菌の伝播を断ち切る等の対策を立てることができる。こうした遺伝学的な特徴についてはまだ解析が始まったばかりであり、治療困難な超多剤耐性菌の発生やその伝播を未然に防ぐためには、材料となるデータを可能な限り集めることが重要である。そこで、アジア各国の共同研究者と共に、結核菌の臨床分離株を収集し、その詳細な遺伝子解析を行うことによって、多剤耐性菌株、取り分け耐性化した後の伝播や蔓延が示唆された株につき、共通して見られる遺伝子上の特徴の解析を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 検体の収集及び薬剤感受性試験

ミャンマー (保健省医学研究局)、ネパール (ドイツ-ネパール結核プロジェクト)、タイ (保健省衛生研究所)、スリランカ (ペラデア大学医学部) において、各共同研究者が近年収集、保存していた臨床分離結核菌株を使用した。薬剤感受性試験は、WHO 推奨プロトコールにより各研究所が通常行っている方法 (固形培地もしくは MGIT 法による液体培地) にて実施した。また、患者の背景情報も入手可能な範囲で収集した。

(2) 薬剤感受性に係る遺伝子変異の検出

固形培地上にて培養された菌を TE バッファー中に懸濁し、ポイルすることによって菌体からゲノム DNA を抽出した。この抽出液を用い、各ターゲット遺伝子の相当部位を PCR にて増幅、その産物の配列を解読した。これを標準株と比較して変異を特定し、既知の変異か否かを文献等データより判断した。また、型別によって同一遺伝子型であることが判明し、耐性菌の伝播が疑われた株については補完変異の検出も行った。薬剤とその耐性変異に係わる解析遺伝子は以下のとおり。INH: *katG*, *inhA*, RFP: *rpoB*, *rpoC*, FQ: *gyrA*, KM: *rrs*, プラジナミド: *pncA*, ストレプトマイシン: *rpsL*, *rrs*, *gidB*。

(3) 型別及び系統樹解析

各菌株はまずスポリゴタイピングによって

系統を特定した。データベース上に記載が無かった型については、他の系統識別法（欠損部検出法 LSP 及び北京型検出 PCR）により系統同定を行った。北京型についてはモダン型か否かを特異的点多変異（基準株における位置：1477596）の検出により判定した。また、スポリゴタイピングにてクラスター（同じ遺伝子型を持った株の集団）を形成した株については、反復配列数解析 MLVA によって異なる型別を行い、BioNumerics 描図ソフトを用いて系統樹を作成した。

4. 研究成果

(1) 多剤耐性結核と系統

ミャンマー（265 株）およびネパール（498 株）の多剤耐性結核菌株の型別解析を行ったところ、いずれも特定の系統「北京型」の割合がミャンマーで 79%、ネパールで 48%と、通常の結核ポピュレーションにおける割合（各々 39%と 35%）よりも有意に高くなっていた。これらの北京型株の大半はゲノム上の点多変異により、モダン型と呼ばれるサブグループに属することが示された。また、ネパールの検体は 2009 年から 2013 年の 5 年間に亘って採取されていたが、多剤耐性菌の中で北京型が占める割合が年々増える傾向にあったことが判明し、他の系統と比較して 30 歳以下の若年層における感染率が有意に高かった。

(2) 超多剤耐性結核及びピラジナミド耐性、ストレプトマイシン耐性結核

結核高蔓延国にて分離された多剤耐性結核菌株では、リファンピシンとイソニアジドの 2 剤のみならず、他の一次選択薬や二次選択薬に対する耐性を獲得している株も多い。中でも治療期間の短縮に重要な役割を果たしているピラジナミドに対する耐性は、培地の pH 調整等が困難であるため、ほとんど調べられていない。そこで、ミャンマーで分離された多剤耐性結核菌株を用いてピラジナミド耐性に大きく関与しているピラジナミダーゼ遺伝子（*pncA*）上の変異を調べたところ、半数近くの株（46%）からアミノ酸置換やフレームシフトを伴う様々な変異が検出され、既にピラジナミド耐性を獲得している可能性が強く示唆された。また、ミャンマーおよびネパールの多剤耐性菌株の大半が既にストレプトマイシン耐性で、最も多く観察された変異はリボゾーム蛋白質 RpsL 上の K43R であったが、そのほとんど全てが特定の系統、北京型に集約しており、ストレプトマイシン耐性北京型株のアジアにおける蔓延が示唆された。超多剤耐性に関しても、結核高蔓延国では薬剤感受性試験によって確認されている例は多くないが、*gyrA* 及び *rrs* の特定の領域の変異が耐性に関与していることが知られているため、変異が確認された場合は超多剤耐性と判断できる。この方法にてミャンマーでは多剤耐性菌の 4%が超多剤

耐性化していることが判明し、その前段階である FQ への耐性のみを獲得している株を含めると 15%に上った。ネパールでは 109 株の多剤耐性菌について配列解析を行ったが、そのうち 12%が既に超多剤耐性化しており、FQ 耐性を含めると 39%に上っていた。

(3) 結核菌の型別及び薬剤耐性との関連

ミャンマーの多剤耐性北京型株を用いた MLVA 解析により、モダン型のクラスター（同じ遺伝子型を持った株の集団）形成率が高く、また、超多剤耐性の前段階であることを示唆する FQ 耐性変異や、薬剤耐性変異によって損なわれた酵素活性を補完していると考えられる二次変異（リファンピシン耐性株に見られる *rpoC* 上の変異）の検出率も、クラスターを形成している群において有意に高いことが判明した。ミャンマーの北京型モダン型株の個々のクラスターサイズは最大で 8 株程度であったが、タイのアウトブレイクが示唆された事例の北京型モダン株では数年前に採取、解析されていた株も含めた巨大なクラスターが形成され、数年間に亘って同じ型の菌株が蔓延していることが示された。また、ネパールの超多剤耐性菌株でもやはり北京型モダン株が大半を占めており、これらの VNTR 型や点多変異の特徴により、同一の菌株が伝播している可能性が示唆された。

これらの国の北京型モダン株 MLVA 解析結果より、系統樹の中心に位置する型、即ちその国に最初に侵入した蔓延株の原型は、この 3 国間で近似しているのみならず、現在、ロシアや東ヨーロッパ、中央アジアにて蔓延している多剤耐性結核菌株とも非常に近縁であることが示された。更には、これらの株は一樣にイソニアジド耐性に係る特定の変異（KatG-S315T）を持ち、また、ストレプトマイシン耐性に係る特定の変異（RpsL-K43R）を保持していた。これらの変異の圧倒的な存在比は、日本の北京型株（非モダン型）や、他の系統の多剤耐性結核菌においては観察されなかったため、特定の生存に有利な変異を獲得した株が、これらの薬剤耐性という性質を保った状態で蔓延していることが示唆された。即ち、これらの菌は、薬剤耐性を獲得しやすく、かつ、耐性化した菌が次の患者へ伝播しやすいことを示唆しており、上述したスポリゴタイプやモダン型を示す点多変異、*katG* や *rpsL* の特異的な変異等は、危険な蔓延株を示唆するマーカーと成り得ると考えられた。

研究開始当初は必要相当数の薬剤耐性、感受性株の全ゲノムを比較することによってその違いを抽出し、薬剤耐性化のメカニズムと耐性獲得後に蔓延する菌の特徴の特定を実施する予定であった。ところが、結核高蔓延国では通常、初回の診断時に菌培養が行われることは無く、治療困難で耐性が疑われた例のみが薬剤感受性試験用に菌培養される

ため、自ずと耐性菌のみが集まり、感受性株の絶対量が不足していた。そこで共同研究者へ初診患者の検体の培養と、ナショナルサーベイ等にて集められていた株の無作為抽出と提供を依頼していたが、添付されている薬剤感受性試験結果と遺伝子上の変異との相関が有意に低いという問題が発生し、現時点における菌株の表現型と遺伝子型の比較は無意味であると判断した。現行の培地を用いた薬剤感受性試験ではしばしばこの様な問題が報告されており、この意味でも遺伝子変異の検出による薬剤感受性試験が推奨されているところである。検査現場における試験方法やデータの管理法等への介入調査をしつつ、信頼性におけるデータに基づいた解析を継続して行きたいと考えている。

(4) 北京型-モダン型株簡易検出法の開発

スポリゴタイピングは結核菌株の系統判別に有用であるが、ハイブリダイゼーション等の手間の掛かる手順を要する方法である。我々は既に北京型特異的な点変異を特定し、特異的に検出するためのマルチプレックスPCR法を開発、報告済みである(Nakajima *et al*, *J Clin Microbiol*. 2013) が、今回は北京型-モダン株特異的な点変異をターゲットとしたマルチプレックスPCRを開発し、臨床分離株を用いた検討を行い、その有用性を確認した(報告準備中)。これらの簡便なPCR法は、多剤耐性北京型-モダン株が蔓延の兆しを見せている地域におけるモニタリングに有用であると考えられる。また、現在、世界的に広く普及している多剤耐性結核検出システムは、リファンピシン耐性を検出するものであるが、上述の様にベースとして蔓延している耐性株は KatG S315T 変異を持ったイソニアジド耐性菌であり、また、この変異を持った株は病原性を損なわないため持続し、次の変異を獲得しやすいという報告もある。従って、危険な蔓延菌のスクリーニングの意味では *rpoB* 変異よりも KatG S315T 変異を検出した方が理にかなっており、その簡易検出キットも現在、開発、性能検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Bwalya P, Yamaguchi T, Mulundu G, Nakajima C, Mbulo G, Solo ES, Fukushima Y, Kasakwa K, Suzuki Y. Genotypic characterization of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Lusaka, Zambia. *Tuberculosis* (Edinb). 2018, 109: 117-122.(査読有)DOI: 10.1016/j.tube.2017.12.007

Shah Y, Maharjan B, Thapa J, Poudel A, Diab HM, Pandey BD, Solo ES, Isoda N, Suzuki Y, Nakajima C. High diversity of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* Central Asian Strain isolates

in Nepal. *Int J Infect Dis*. 2017, 63: 13-20. (査読有) DOI:

10.1016/j.ijid.2017.06.010

Tun T, Aye KS, Nyunt WW, Crump JA, Nakajima C, Suzuki Y, Thinn KK, Cook GM, Aung HL. Genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Myanmar. *Infectious Diseases*. 2017, 49: 237-239. (査読有) DOI: 10.1080/23744235.2016.1231419

Aye KS, Nakajima C, Yamaguchi T, Win MM, Shwe MM, Win AA, Lwin T, Nyunt WW, Ti T, Suzuki Y. Genotypic Characterization of Multi-drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar. *J Infect Chemother*. 2016, 22: 174-179. (査読有) DOI: 10.1016/j.jiac.2015.12.009

[学会発表](計34件)

Mendis C, Ratnatunga C, Thevanesam V, Kumara A, Wickramasinghe S, Madegedara D, Gamage C, Nakajima C, Suzuki Y. Diverse molecular genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates circulating in Kandy, Sri Lanka. U.S.-Japan Cooperation Medical Science Program, 54nd Mycobacteria Panel Meeting. 2018.

Nan Aye Thida Oo, Lai Lai San, Khin Saw Aye, Wah Wah Aung, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki. Detection of drug-resistant associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates of Myanmar. 第91回日本細菌学会総会. 2018.

Lai Lai San, Nan Aye Thida Oo, Wah Wah Aung, Khin Saw Aye, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki. Insight into the Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* in Myanmar. 第91回日本細菌学会総会. 2018.

Suzuki Y, Nakajima C. Molecular Epidemiological Analysis of Tuberculosis in Asia. 2nd International Conference on Tropical Medicine. 2017

Shrestha D, Maharjan B, Oo NAT, Nakajima C, Suzuki Y. Molecular analysis of streptomycin-resistance associating genes on *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Nepal. The 48th Union World Conference on Lung Health. 2017.

Poudel A, Maharjan B, Suzuki Y, Nakajima C. Predominance of modern sublineage of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype among clinical isolates in Nepal. The 48th Union World Conference on Lung Health. 2017.

Yogendra Shah, Bhagwan Maharjan, Jeewan Thapa, Ajay Poudel, Hassan Mahmoud Diab, Yasuhiko Suzuki, Chie Nakajima. Characterization of genetic diversity of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* Central Asian Strain isolates from Nepal and comparison with neighboring countries. 第16回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2017.

Charitha Mendis, Champa Ratnatunga, Vasanthi Thevanesam, Athula Kumara, Susiji Wickramasinghe, Dushantha Madegedara, Chandika Gamage, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Kandy, Sri Lanka: Insight to Beijing genotype. 第90回日本細菌学会総会. 2017.

Yogendra Shah, Bhagwan Maharjan, Ajay Poudel, Hassan Mahmoud Diab, Jeewan Thapa, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki. High diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Central Asian Strain family isolates in Nepalese patients. Colorado Mycobacteria Conference 2016.

Lai Lai San, Nan Aye Thida Oo, Wah Wah Aung, Khin Saw Aye, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki. MIRU-VNTR typing of Beijing family multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Myanmar. Colorado Mycobacteria Conference 2016.

Nan Aye Thida Oo, Lai Lai San, Khin Saw Aye, Wah Wah Aung, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki. Detection of mutations in streptomycin resistance *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar. 第89回日本細菌学会総会. 2016.

Chie Nakajima, Bhagwan Maharjan, Khin Saw Aye, Zeaur Rahim, Benjawan Phetsuksiri, Aki Tamaru, Nan Aye Thida Oo, Lai Lai San, Yogendra Shah, Janisara Rudeeaneksin, Jeewan Thapa, Ajay Poudel and Yasuhiko Suzuki. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Asian Countries. US-Japan Cooperation Medical Science Program 50th Anniversary TB, Leprosy Panel Meeting. 2016.

Bhagwan Maharjan, Yasuhiko Suzuki, Chie Nakajima, Ajay Poudel, Harald Hoffmann, Korkut Avsar, Bhabana Shrestha, Jeewan Thapa, Yogendra Shah, Rajendra Pant. Genetic Diversity and Transmission Dynamics of Multidrug Resistant Tuberculosis in Nepal. US-Japan Cooperation Medical Science Program 50th Anniversary TB, Leprosy

Panel Meeting. 2016.

Janisara Rudeeaneksin, Benjawan Phetsuksiri, Supranee Bunchoo, Sopa Srisungngam, Wiphat Klayut, Somchai Sangkitporn, Anupong Sujariyakul, Krairerk Suthum, Nattakan Tipkruai, Yukari Fukushima, Haruka Suzuki, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki. Molecular characteristics and genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from an outbreak of Thailand-Myanmar border. US-Japan Cooperation Medical Science Program 50th Anniversary TB, Leprosy Panel Meeting. 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 千絵 (NAKAJIMA, Chie)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授

研究者番号：60435964

(2) 連携研究者

鈴木 定彦 (SUZUKI, Yasuhiko)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：90206540