

平成30年6月25日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19181

研究課題名(和文)非結核性抗酸菌の特徴に着目した抗酸菌症治療方針策定の試み

研究課題名(英文)Creation of drug susceptibility prediction system based on VNTR genotyping of *Mycobacterium avium*

研究代表者

多田 納 豊 (Tatano, Yutaka)

国際医療福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：70432614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*Mycobacterium avium* complex (MAC)菌の多型縦列反復配列(VNTR)遺伝子型情報から薬剤感受性を迅速に予測できるシステムの確立を目指した。島根、栃木、大阪、福岡由来の*M. avium*臨床分離株のVNTR遺伝子型に基づき構築されたグループ間でキノロン感受性に有意な差が認められ、菌株のVNTR遺伝子型からそのキノロン感受性を予測できる可能性が示唆された。福岡株は他の3地域とは異なる遺伝子背景を持つ可能性が示唆された。また、多変量解析の結果15のVNTR領域(MATR1-9, 11-16)のうち、MATR-3がキノロン感受性と有意に連動性の強い領域であった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish a system that can predict drug susceptibility based on polymorphic tandem repeat sequence (VNTR) genotype of *Mycobacterium avium* complex (MAC). Significant differences in sensitivity to quinolone were observed among groups constructed based on the VNTR genotype of *M. avium* clinical isolates derived from Shimane, Tochigi, Osaka and Fukuoka. Hence, it was suggested that the quinolone sensitivity could be predicted from the VNTR genotype of the strain. However, it was shown that the *M. avium* strains derived from Fukuoka have a different genetic background compared to the strains derived from the other three areas. Multivariate analysis showed that, among the 15 VNTR regions (MATR-1 - 9, 11 - 16), MATR-3 region showed a significant association with quinolone susceptibility.

研究分野：微生物学

キーワード：Mycobacterium avium VNTR 薬剤感受性 キノロン 抗酸菌

1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌症の年間新規患者数は約1万人を超え、その内の8割を占める *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症は、最近20年間で、感染者数が約3倍、死亡者数が約7倍と大幅に増加している(森本ら, 結核, 2011)。MACの治療には、クラリスロマイシン (CAM)、リファンピシン (RFP)、エタンブトール (EMB) 等が使用されるが、MACの *in vitro* 増殖は非常に遅いため、薬剤感受性試験終了前に治療を開始している。さらに、薬剤耐性菌が存在する、菌株ごとに薬剤感受性が異なる、多クローン性の感染をしているなどの問題があり、MAC感染症はしばしば治療困難である。

近年、抗酸菌の中では結核菌を中心に、菌株の遺伝子型と薬剤感受性を関連付ける試みが行われている(Yuan Xら *BMC Infect Dis*, 2013)。遺伝子型判定には、制限酵素断片長多型 (RFLP) や縦列反復配列多型 (Variable Numbers of Tandem Repeats: VNTR) が用いられている (Supply Pら, *J Clin Microbiol*, 2001)。VNTRは微量サンプルから増幅でき、操作・解析が簡便なため遺伝子型判定の主流となりつつあるが、どの領域が安定で、どの領域が変化しやすいか議論が続いている (Supply Pら, *Infect Genet Evol*, 2011)。結核菌は、ヒトからヒトへ感染し、また菌の伝播過程で様々な抗菌薬が使用されているため、結核菌から遺伝子型と薬剤感受性との関連性を明らかにするのは困難である。一方、MACは環境からヒトへの一方行感染のため、感染菌はその地域に由来すると考えられる。

2. 研究の目的

非結核性抗酸菌症の多くは、治療が困難であり、菌株の薬剤感受性を迅速に判別して適切な治療を開始することが重要である。菌株の遺伝子型判定に使われている縦列反復配列多型 (VNTR) は、菌の感染中や地域毎にリピート数変動している可能性がある。そこで本研究は、*Mycobacterium avium* complex (MAC) の、VNTRの変動要因を明らかにし、薬剤感受性と連動するVNTR遺伝子型データベースを構築する。これをもとにMACの薬剤感受性予測システムの樹立を試みる。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株

島根県、栃木県、大阪府、福岡県内の病院施設を受診した患者の喀痰から分離された *M. avium* 菌株を用いた。

(2) 抗菌薬

薬剤感受性試験には、クラリスロマイシン

(CAM; wako)、リファンピシン (RFP; wako)、エタンブトール (Sigma)、ストレプトマイシン (wako)、カナマイシン (wako)、アミカシン (wako)、アジスロマイシン (東京化成工業)、レボフロキサシン (LVFX; wako)、シタフロキサシン (STFX; 第一三共)、モキシフロキサシン (MFLX; フナコシ)を用いた。

(3) 微量液体希釈法による薬剤感受性試験

M. avium に対する薬剤感受性試験は、微量液体希釈法にて実施した。96 well plateにて、各菌株を1well当り 5×10^5 CFU/mlとなるように、また、各種抗菌薬の最高終濃度は、それぞれ2倍希釈系列にて、0.0625 - 128 μ g/mlの範囲で調製した。最終容量は200 μ l/wellとした。抗菌薬処理用の菌液を調製後、37、5% CO₂条件下にて培養し、2週間後に、目視により菌の増殖を観察した。菌の増殖が認められなかった最も低い抗菌薬の濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) として測定した。

(4) Real Time PCR法による薬剤感受性試験

Hellyer TJらの報告 (*J Clin Microbiol*, 1999)を参考にして定量的PCR法によりMAC菌株の薬剤感受性を実施した。

MAC菌はMAC症患者臨床分離株を用いて、 2×10^5 CFU/well (1×10^6 CFU/ml)となるように調製し、2または4倍希釈系列の各濃度のリファンピシン (RFP) 存在下または非存在下にて7HSF培地中で1~4日間培養した。培養終了の24時間前に終濃度10 μ Mとなるようにpropidium monoazide (PMA; Biotium)を添加した。菌体からのDNAの抽出は、菌体を遠心にて回収した後、InstaGene™ Matrix (BioRad)を用いて、標準のプロトコールに従って調製した。MAC菌株のrDNAを指標としてSYBR Premix Ex Taq GCを用いてStepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)にてReal Time PCRにより培養0日のCt値を基準として、一定期間培養後のrDNAの増減を解析し、測定数値の差から薬剤感受性を判定した。

(5) VNTR 遺伝子型解析

菌株からDNAの抽出は、Instagen (BioRad)を用いて、プロトコールに従って行った。

VNTR遺伝子型別解析のための基本的なPCR反応は、Go Tag Flexi Polymerase (Promega)を用いて、DMSO存在下(終濃度4%)で行った。PCRの反応条件は94 5min(1 cycle)、94 30sec、45 30sec、72 1.5min(35 cycle)、72 7min(1 cycle)にて行った。PCR増幅産物は、1.5%アガロース電気泳動後、CS Analyzer 3ソフトウェアを用いて移動度から塩基対数を算出した。塩基対数から各VNTR

領域の反復回数を求め、アリルプロファイルを作成した。アリルプロファイルからマンハッタン距離を算出し、phylip Ver. 3.695にてFitch Margoliash法により系統樹を構築した。また、系統樹編集ソフトのTree viewを用いて系統樹を編集した。この系統樹をもとにグループ分けを行い、グループ間の各薬剤のMICを比較検討した。さらに、MAC菌株のVNTRについて、単変量解析および多項ロジスティック解析を行い、薬剤感受性と強く連動するVNTR領域を選定した。

(6) 全ゲノムデータを用いた薬剤感受性に相関する遺伝子領域の探索

キノロンに対する高感受性、および低感受性を示した菌株8株を用いて、PacBioによる全ゲノムシーケンスを行った(マクロジェン・ジャパン)。M. aviumからのgenome DNAの精製は、ISOPlant (ニッポンジーン) およびDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いて行った。

(7) MAC菌株の遺伝的地域差についての検討

複数の地域(島根、栃木、大阪、福岡)のM. avium菌株について、VNTR型別解析および薬剤感受性試験を行った。各地域毎のVNTR遺伝子型に基づいた系統樹形成によるグループ分けと、上記4地域を混合した際のVNTR遺伝子型に基づいた系統樹形成によるグループ分けの後、薬剤感受性との相関性について評価を行った。

4. 研究成果

(1) 地域毎の菌株のVNTR型別解析と薬剤感受性試験

島根、栃木、大阪、福岡の4府県から分離された菌株について、それぞれの地域毎のVNTR型別解析を行った。

島根県由来株24株においては、3グループに分かれた(Fig. 1A)。3グループそれぞれをクラスターA, B, Cとし、形成したグループと薬剤感受性との関係性について検討したところ、クラスターBは、他のグループと比べ、キノロンに対して有意に高感受性であることが示された(Fig. 1B)。

栃木県由来株15株についてのVNTR型別解析では、2グループに分かれた(Fig. 2A)。また、形成された2グループ間の抗菌薬のMIC値について比較検討を行ったところ、クラスターBに属する菌株はキノロンに対して有意に高感受性であることが示された(Fig. 2B)。

大阪府由来株50株についてのVNTR型別解析では、3グループに分かれた(Fig. 3A)。

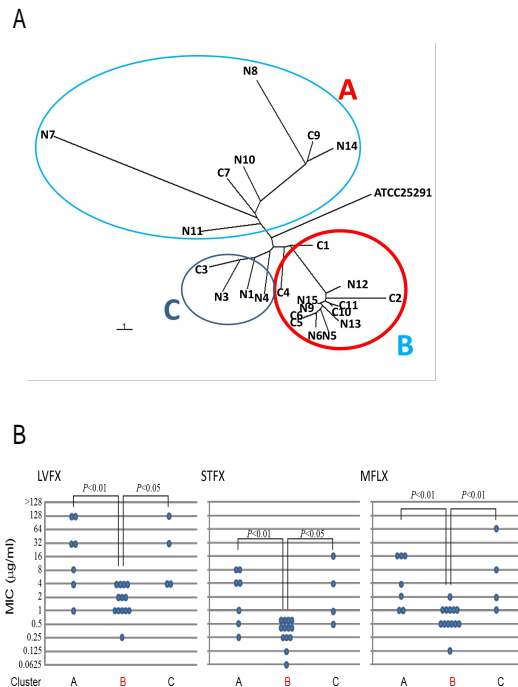


Fig. 1 島根県由来株のVNTR型別解析
A) VNTR型別解析により形成された系統樹.
B) キノロンのMIC値についてのグループ間の比較.

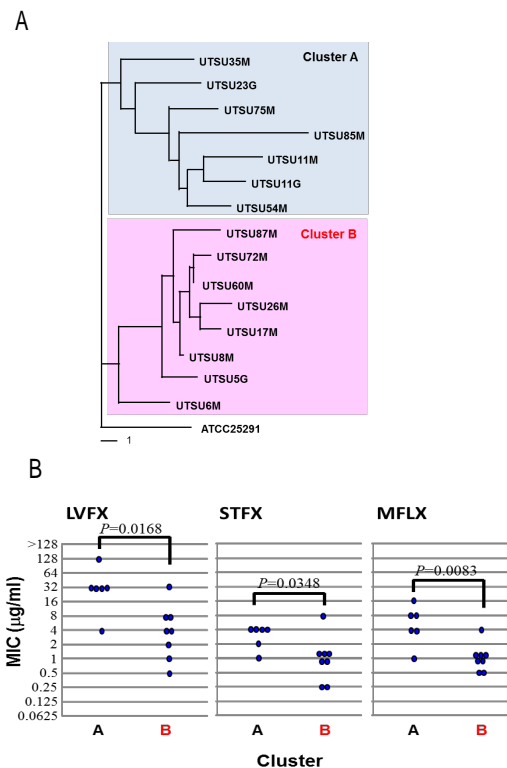
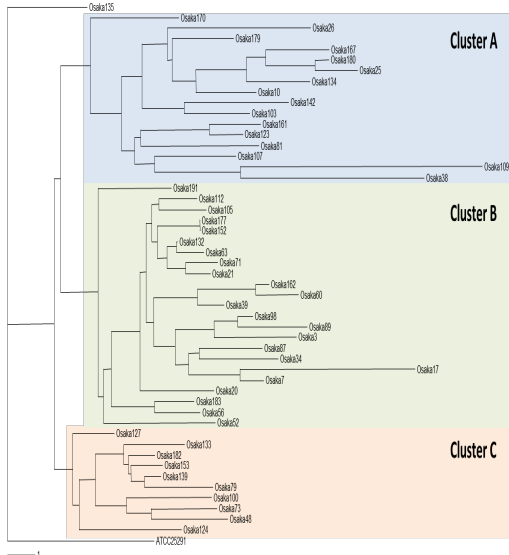


Fig. 2 栃木県由来株のVNTR型別解析
A) VNTR型別解析により形成された系統樹.
B) キノロンのMIC値についてのグループ間の比較.

そのうちクラスターBは、他のグループと比べ、キノロンに対して高感受性である傾向を示した (Fig. 3B)。しかしながら、有意差が認められたのは、LVFX におけるクラスターBとクラスターCとの間にのみ認められた。

福岡県由来株 18 株についての VNTR 型別解析では、2 グループに分かれた (Fig. 4)。クラスターAは、クラスターBと比べ、キノロンに対して高感受性の傾向を示し、特に STFX においては、両クラスター間で有意な差が認められた。

A



B

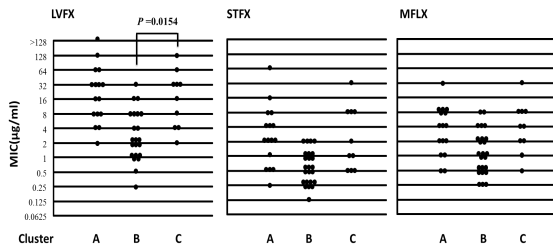


Fig. 3 大阪府由来株の VNTR 型別解析

A) VNTR 型別解析により形成された系統樹。
B) キノロンの MIC 値についてのグループ間の比較。

(2) 複数地域を混合した場合の菌株の VNTR 型別解析と寒剤感受性との関連性

島根、栃木、大阪、福岡の4地域の全ての菌株を混合して VNTR 型別から系統樹を作成した。また、その系統樹に基づきグループ分けをし、そのグループ間の薬剤感受性について比較検討を行った。その結果、大きく2つのクラスターに分かれることが示された (Fig. 5)。また、LVFX, STFX, MFLX はクラスターA よりもクラスターB の菌株で有意に高

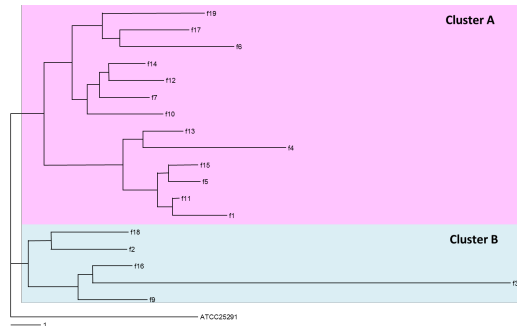


Fig. 4 福岡県由来株の VNTR 型別解析

A) VNTR 型別解析により形成された系統樹。
B) キノロンの MIC 値についてのグループ間の比較。

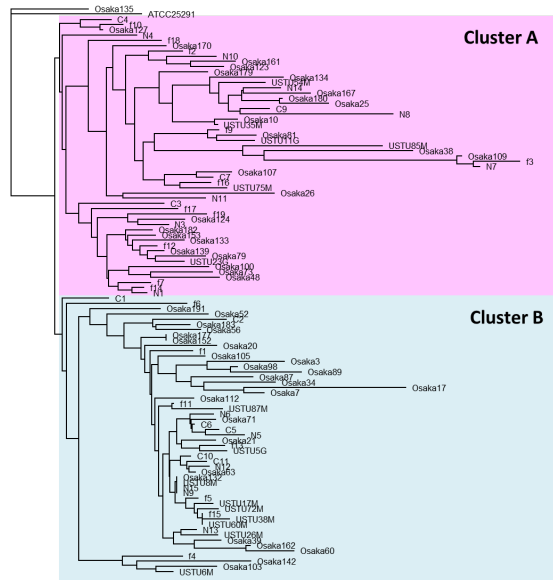


Fig. 5 島根・栃木・大阪・島根由来株の4地域合同での VNTR 型別解析

感受性であった (それぞれ、 $P = 2.44 \times 10^{-09}$ 、 4.29×10^{-07} 、 3.12×10^{-08})。

栃木株は、栃木単独地域で認められた高感受性グループ株と低感受性グループ株が (Fig. 2) 4 地域合同における VNTR 型別によるグループ分けにおいても、それぞれ同様に高感受性グループと低感受性グループに分かれた。他方、3つのクラスターに分かれた大阪府由来株と島根県由来株については (Fig. 1, 3) 3つのグループのうち、各地域におけるキノロン高感受性グループが4地域合同の場合においても高感受性グループに属し、各地域において低感受性グループであった2グループは、4地域合同の場合においては1つの低感受性グループに纏められる形となった。他方、福岡県由来株においては、福岡単独の中では高感受性グループに属した菌株が (Fig. 4)、4 地域合同の場合においては低感受性グループに属することになった株が多く存在した (Fig. 5)。

また、キノロン感受性について未知の M 。

avium 株 4 株 (IUHW 1~4) について、Fig. 5 の系統樹構築に用いた菌株とともに、VNTR 遺伝子型解析・系統樹構築を行い、キノロン感受性について予測した。その結果、Table 1 に示すように、クラスター A に分類された IUHW 3 および 4 は、キノロン低感受性、クラスター B に分類された IUHW 1 および 2 は、キノロン高感受性の傾向を示した。特に、STFX については、顕著にその傾向を示した。

Table 1. IUHW 株のキノロン感受性

Cluster	IUHW	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		LVFX	STFX	MFLX
Cluster A	IUHW3	128	32	16
	IUHW4	8	2	1
Cluster B	IUHW1	16	0.5	4
	IUHW2	1	0.125	0.25

(3) キノロン感受性と連動性の高い VNTR 領域についての検討

上記(1)(2)の結果から、VNTR 遺伝子型とキノロンの感受性については相関性が認められた。そこで、現在標的としている 15 の VNTR 領域のうち、どの領域の反復回数の違いがキノロン感受性と強く相関するのか明らかにするため、STFX の MIC 値に基づき、MIC が $1 \mu\text{g/ml}$ 以下の株を高感受性、MIC が $2 \mu\text{g/ml}$ 以上の株を低感受性として、各 VNTR 領域について高感受性株と低感受性株の反復回数の差について、統計解析により、検討を行った。その結果、Table 2 に示すように、MATR1, 3, 6-9, 11, 13 の 8 領域について、関連性があることが示唆された。さらに、キノロン感受性との関連性が認められたこれらの VNTR 領域について、多変量解析(重回帰分析)を行ったところ、MATR3 領域において有意な相関性が認められた。

以上の結果より、*M. avium* のキノロン薬感受性については、VNTR 型別解析に基づいた薬剤感受性予測が可能であると考えられた。ただし、上記の如く、福岡由来株においては、地域単独でのグループ形成と 4 地域合同の際のグループ形成とで株の組み合わせが大きく異なっていたため、福岡株については、他の府県と遺伝子背景の異なる *M. avium* の集団である(地域差がある)可能性が示唆された。

また、CAM や RFP などの他の抗菌薬については、地域毎で調べた場合に VNTR 遺伝子型に基づき形成されたグループ間で感受性に有意な差が認められる場合も僅かにあったが、キノロンとの関連性の様に、常にどの地域においても相関性が認められる、というものではなかった。このことから、現時点では、

キノロン薬以外においては VNTR 型別解析から薬剤感受性予測への応用は難しいと考えられた。

Table 2. 各 MATR 領域における反復数の違いと STFX 感受性の違い^{a)}との相関性についての検討

Locus	Mann-Whitney U test (P 値)
MATR1	0.0002 **
MATR2	0.5340
MATR3	0.0000063 **
MATR4	0.2443
MATR6	0.0263 *
MATR7	0.0003 **
MATR8	0.0140 *
MATR9	0.0205 *
MATR11	0.000012 **
MATR12	0.9576
MATR13	0.0027 **
MATR14	0.3242
MATR15	0.3024
MATR16	0.0735

a) STFX 高感受性: MIC $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, STFX 低感受性: MIC $2 \mu\text{g/ml} \leq$
b) 多変量解析(重回帰分析)において、MATR3 の領域が STFX の感受性との相関性が最も高かった。

(4) リアルタイム PCR 法を利用した MAC の迅速な薬剤感受性試験法の開発

MAC における薬剤感受性試験の一般的な方法として微量液体培地希釈法による最小発育阻止濃度(MIC)の測定があるが、培養に 2 週間を要す。この培養の期間を短縮するために結核菌を対象とした Suporn Pholwat ら報告を参考にして、リアルタイム PCR 法を利用した薬剤感受性試験法について検討した。

MAC 臨床分離株(SHIOYA-d)を各濃度の RFP 存在下で 4 日間培養した後に rDNA を標的としてリアルタイム PCR 解析を行った。培養 4 日目において培養開始時(0 日目)との比較で Ct 値が 0 以下、すなわち培養開始時と比べて DNA 量が減少したサンプルの RFP の最小の濃度は $32 \mu\text{g/mL}$ であった。この結果から、リアルタイム PCR 法による SHIOYA-d の MIC を $32 \mu\text{g/mL}$ と決定した。同様の方法により、他の MAC 臨床分離株(SHIOYA-a, -b, -g)についても MIC 値を決定した。次に、リアルタイム PCR 法により求めた MIC 値と微量液体培地希釈法により求めた MIC 値との比較を行った。SHIOYA-d は両方法での MIC 値が一致した。しかし、同様の試験を行った他の 3 株は一致せず、リアルタイム PCR 法と現行の微量液体培地希釈法による MIC 値の間に相関性を認めることができなかつたため、この方法を応用するには至らなかつた。

(5) PacBio による *M. avium* 株の全ゲノムシーケンス解析

薬剤感受性を予測するための、より有効な遺伝子領域(VNTR 領域または SNPs など)を探索するため、キノロン高感受性と低感受性の *M. avium* 株について PacBio による全ゲノ

ムシーケンス解析を行った。

抗酸菌は、一般細菌と比べ細胞壁が堅牢なため、一般的に行われているゲノム DNA 調製法では精製度が低く、また収量も少ない。そこで、菌体からの DNA 精製方法について検討を行った。その結果、菌は 25ml ~ 50ml の 7HSF 中で混濁が認められるまで培養する必要があることや、DNA の抽出の際には ISOPlant (ニッポンジーン) および DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を組み合わせることで、損傷が少なく、精製度が高く、必要な量の DNA を得られる可能性が高くなることがわかった。

本実験においては、培養開始段階では 10 菌株を供試したが、解析に耐えうる精製度および量の DNA を調製できたのは 5 株であったため、この 5 株について PacBio によるシーケンス解析を実施することができた。本検討により、完全長ではないものの、5 菌株についての広範な遺伝子情報を得ることができたため、この得られら情報を基に、さらに全ゲノム解析を行うことにより、今後、薬剤感受性を予測するためのより有効な遺伝子領域を決定することが可能であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

(1) Tatano Y, Yamabe S, Sano C, Tomioka H. Anti-*Mycobacterium avium* complex activity of clarithromycin, rifampin, rifabutin, and ethambutol in combination with adenosine 5'-triphosphate. *Diagn Microbiol Infect Dis*, Vol. 88, No. 3, 2017, pp. 241-246
doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.04.012

(2) Shimizu T, Tatano Y, Tomioka H. Aldose reductase participates in the downregulation of T cell functions due to suppressor macrophages. *Sci Rep*, Vol. 6, 2016, No. 21093
doi: 10.1038/srep21093

(3) Tatano Y, Kanehiro Y, Sano C, Shimizu T, Tomioka H. ATP exhibits antimicrobial action by inhibiting bacterial utilization of ferric ions. *Sci Rep*, Vol. 5, 2015, No. 8610
doi: 10.1038/srep08610

[学会発表](計 27 件)

(1) 多田納豊、戸村雪花、佐野千晶、梅田啓、御手洗聡、吉田志緒美、露口一成、藤原純子、

竹下治男、八木秀樹、富岡治明：複数地域由来 *Mycobacterium avium* 株における VNTR 遺伝子型と薬剤感受性の関係性についての検討 . 第 91 回日本細菌学会総会 , 2018 年 3 月 27・28 日 , 福岡

(2) 多田納豊、戸村雪花、佐野千晶、梅田啓、御手洗聡、吉田志緒美、露口一成、藤原純子、竹下治男、八木秀樹、富岡治明：
Mycobacterium avium の VNTR 遺伝子型に基づく薬剤感受性予測システムの構築 . 日本薬学会第 138 年会 , 2018 年 3 月 26 日 , 金沢

(3) Tatano Y, Kanehiro Y, Yamabe S, Sano C, Shimizu T, Yagi H, Tomioka H: ATP has antimicrobial activity based on the chelating action of the ferric ions and shows its combined effect with anti-*Mycobacterium avium* complex drugs. International Congress of Chemotherapy and Infection 2017, 2017 年 11 月 26 日 , 台北

[その他]
ホームページ等

<https://sites.google.com/site/immunobiologyuhw/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

多田納 豊 (TATANO YUTAKA)
国際医療福祉大学・薬学部・講師
研究者番号 : 70432614