

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590688

研究課題名(和文) 新種非定型抗酸菌の同定と抗菌薬耐性化のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of novel non-tuberculous mycobacterium and analysis of the mechanism underlying its resistance to antibiotics

研究代表者

松島 早月 (Matsushima, Satsuki)

杏林大学・医学部・実験助手

研究者番号：80231596

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)：本研究では、新菌種である*M. kyorinense*の菌株14株について抗菌薬耐性遺伝子を主とした遺伝子解析を行ったところ、16S rRNA遺伝子の一部の塩基に多型が認められ、種内でのheterogeneityの存在が明らかとなった。一方、近縁種とされる*M. celatum*の2型が複数の遺伝子配列で*M. kyorinense*と完全に一致することが判明し、*M. celatum*の2型は*M. kyorinense*に再分類されるべきであることを提唱した。また、*M. kyorinense*基準株の全ゲノム解析により、抗菌薬耐性機構が結核菌と異なる部分が多いことが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：The genetic analysis of 14 collected strains of *Mycobacterium kyorinense* clarified that they harbored polymorphism in 16S rRNA, suggesting the genetic diversity among the strains of this organism. In addition, analysis of *Mycobacterium celatum*, a species closely related to *M. kyorinense*, revealed that the sequences of several housekeeping genes of *M. celatum* type 2 are identical to those of *M. kyorinense*; therefore, we propose reclassification of *M. celatum* type 2 as *M. kyorinense*. Furthermore, the whole genome analysis of the type strain of *M. kyorinense* suggested that the mechanism underlying the resistance to antibiotics of this organism is significantly different from those of *M. tuberculosis*.

研究分野：医歯薬学

キーワード：微生物 抗酸菌 遺伝子 感受性 新菌種 *mycobacterium kyorinense*

1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌感染症は一般にヒトヒト間の伝染性がなく、免疫不全患者以外では致死的になることも少ないとされ、結核菌と比較してあまり注目されてこなかった。また、非結核性抗酸菌の培養法が十分に確立されておらず、培養で同定される頻度が低かったことも、非結核性抗酸菌感染症が過少評価されたことの一因であったと思われる。しかしながら、近年の分子生物学的手法の進歩により、培養が不可能な例においても病因菌種が同定可能となったことで、非結核性抗酸菌感染症の頻度は予想以上に高いことが明らかとなった。また、最近新たな培地の導入により、非結核性抗酸菌の培養に成功する例も増加し、日常診療においても非結核性抗酸菌感染症がクローズアップされている。さらに、従来の化学的性状によらない分子生物学的手法による細菌の分類同定法が進歩し、新たな菌種が毎年のように報告されているのが現状である。

このような背景のもとで、2007年我々は、肺炎患者の痰検体から菌種同定不能であった非結核性抗酸菌を分離した。詳細な遺伝子解析を行ったところ、本菌はこれまでに報告のない菌種であることが判明した。さらに別の2施設の患者から検出された非結核性抗酸菌が、遺伝子解析の結果本菌と全く同一の菌種であることがわかった。これらの遺伝子配列は、新菌種の条件を満たしたことから、我々はヒトに感染性を持つ新種の非結核性抗酸菌として、*Mycobacterium kyorinense* と命名し2009年新菌種登録の専門誌に報告した。¹⁾ その後、本菌種の報告例は国内外で増加し、本菌の感染性や抗菌薬感受性についての情報が蓄積されつつある。

一方、我々は本菌の抗菌薬に対する感受性についても検討を行った。その結果、結核菌と同様非結核性抗酸菌でも広く用いられるリファンピシンやイソニアジドに対して低

感受性であることが明らかにされた。本菌が検出された検体は、いずれも抗菌薬使用前のものであることから、抗菌薬で誘導された耐性ではなく、自然耐性である可能性が考えられた。また、本菌種と最も近縁である非結核性抗酸菌の *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium branderi* はいずれもこれらの抗菌薬に低感受性であることから、これらの菌種の抗菌薬耐性化機構には共通の遺伝学的背景が存在する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

以上のような背景のもとで、本研究は *Mycobacterium kyorinense* およびその近縁菌種において薬剤耐性の原因として知られる遺伝子について解析し、本菌における薬剤耐性のメカニズムを解明することを目的とした。また、3菌種の遺伝子解析により、これらの菌種間の遺伝学的差異についても解明を目指した。

一方、新たな非結核性抗酸菌の同定を目指し、抗酸菌の培養を、呼吸器感染の患者の上・下気道検体すべてについて行い、スクリーニング検査で菌種が同定できなかった検体について、遺伝子配列を決定し、新規菌種の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) *Mycobacterium kyorinense* および近縁菌種の抗菌薬感受性および臨床的特徴の検討

M. kyorinense の菌株およびその近縁種である *M. celatum*, *M. branderi* の基準株を固形培地 CTC 加小川培地で培養後、液体培地で増殖させ、菌株の保存を行った。

各菌株の抗菌薬感受性試験をキット(プロスミック NTM 極東)を用いて行った。

M. kyorinense 感染症患者の臨床像について調査し、感染部位や抗菌薬使用後の予後について検討した。

(2) *Mycobacterium kyorinense* および近縁菌種における薬剤耐性遺伝子の解析

上記の菌株からキット (コバス Taqman MTB SOL-M) を用いて DNA を抽出した。

結核菌その他の抗酸菌で耐性化に關与することが報告されている遺伝子について、PCR 機器およびシークエンサーを用いて上記菌株の塩基配列の決定を行った。

菌株間の遺伝子配列の比較を行い、感受性試験の結果と照合することにより、これらの菌における抗菌薬耐性化に關与する遺伝子変異を決定した。

(3) *Mycobacterium kyorinense* の菌株間および近縁種との遺伝学的差異の検討

M. kyorinense の複数の菌株および近縁種である *M. celatum*, *M. branderi* の基準株について 16S rRNA, rpoB, hsp65 などのハウスキープング遺伝子の塩基配列をダイレクトシークエンスにより決定し、菌株間の heterogeneity について検討した。

(4) *Mycobacterium kyorinense* の全ゲノム解析

M. kyorinense の基準株について、ION PGM システム (Life Technology) を用いて全塩基配列を決定し、CLC Genomics Workbench 7.0 を用い解析した。このなかから、inhA, embB, katG などの薬剤耐性関連遺伝子について、*M. tuberculosis* との配列の比較検討を行った。

(5) 呼吸器感染症患者気道検体の非結核性抗酸菌スクリーニング培養

当院微生物検査室に通常の細菌培養目的で提出された、呼吸器感染症患者の上・下気道検体 (喀痰、気管洗浄液など) について、全例抗酸菌培養キット (マイコアシッド極東) を用いて培養を行った。

培養陽性検体のうち、実際に抗酸菌が分離された場合は、抗酸菌スクリーニングキット (DDH マイコバクテリア極東) により遺伝子の抽出と同定を行った。

4 . 研究成果

(1) *Mycobacterium kyorinense* および近縁菌種の抗菌薬感受性および臨床像の検討

M. kyorinense 感染症の報告が国内で相次ぎ、13 菌株を入手できた。また、初めて国外でもブラジルから *M. kyorinense* 感染症の報告があり、遺伝子解析において協力し、共著論文として **Journal of Clinical Microbiology** 誌に公表された。一方、これらの *M. kyorinense* 株の臨床像・抗菌薬感受性について解析したところ、1) 呼吸器感染症が多くみられるが、関節炎やリンパ節炎も生じること、2) 全例が抗結核薬、特にリファンピシンに耐性であることなどを明らかにした。この結果は **Emerging Infectious Diseases** 誌に公表された。

(2) *Mycobacterium kyorinense* および近縁菌種における薬剤耐性遺伝子の解析

上記の検討により、*M. kyorinense* はリファンピシンに高度耐性であることが判明したことから、リファンピシン耐性に關与する遺伝子について rpoB 遺伝子の塩基配列を決定した。全株で配列が一致し、結核においてリファンピシン耐性に關与する部位に塩基置換 Ser531Asp がみられることが判明した。また、近縁種で同様にリファンピシン耐性である *M. celatum*, *M. branderi* についても同じ塩基置換が認められ、Ser531Asp がこれらの菌種におけるリファンピシン自然耐性に關与している可能性が強く示唆された。

(3) *Mycobacterium kyorinense* の菌株間および近縁種との遺伝学的差異の検討

M. kyorinense の 14 菌株について 16S rRNA, rpoB, hsp65 などのハウスキープング遺伝子の解析を行ったところ、rpoB, hsp65 については解析した範囲で全例が一致していたが、16S rRNA 遺伝子では一部の塩基に多型が認められた。一方、近縁種である *M. celatum* および *M. branderi* についても同様の遺伝子解析を行った結果、*M. celatum* の 2

型がこれらの遺伝子配列で *M. kyorinense* と完全に一致することが判明した。*M. celatum* の1・3型では *M. kyorinense* とかなりの差異が認められることから、*M. celatum* の2型は *M. kyorinense* に再分類されるべきであることを提唱し、**Annals of Microbiology** 誌にその結果を公表した。本事例のように、従来細菌学的性質から行われていた分類は不完全であり、時に遺伝子解析によって再分類が行われるため、*Mycobacterium* 属の分類においても今後遺伝子解析に基づいた見直しを行う必要があると考えられた。

(4) *Mycobacterium kyorinense* の全ゲノム解析

M. kyorinense の基準株について、ION PGM システムを用いて全ゲノム解析を行った。全長約530万塩基対、G/C比は66.9%で、他の抗酸菌同様に高いG/C比が認められた。RAST サーバーによる機能解析予測では、5351個の蛋白質をコードする遺伝子と46個のrRNA、および8個のtRNAをコードする遺伝子が同定された。薬剤耐性遺伝子について解析したところ、*rpoB* 遺伝子配列はこれまでの解析結果と完全に一致した。一方、エタンプトール耐性に関与するとされる *embB* 遺伝子や、イソニアジド耐性に関与するとされる *katG*, *ahpC*, および *inhA* 遺伝子では、結核菌で高頻度に認められる変異は見られず、別の耐性機構が関与している可能性が高いと考えられた。この結果は、**Genome Announcements** 誌に掲載された。

(5) 呼吸器感染症患者気道検体の非結核性抗酸菌スクリーニング培養

初年度から継続的に呼吸器感染症患者検体の全例において抗酸菌培養を行ってきたが、分類不明菌は検出されなかった。そのため、本項目については研究を中断し、代わりに上記の抗酸菌の全ゲノム解析を進めることとした。

< 引用文献 >

1. Okazaki M, Ohkusu K, Hata H, Ohnishi H*, Watanabe T, et al: *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel slowly growing *Mycobacterium* sp. related to *Mycobacterium celatum* isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 59:1336-1341, 2009

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 4件)

1. Ohnishi H, Tortoli E, Ramos JP, Kazumi Y, Yonetani S, Matsushima S, Ohtsuka K, Watanabe T: Proposal of reclassification of *Mycobacterium celatum* type 2 as *Mycobacterium kyorinense*. **Annals of Microbiology** 64:1879-1882, 2014. 査読あり。
2. Ohtsuka K, Ohnishi H, Nozaki E, Pais Ramos J, Tortoli E, Yonetani S, Matsushima S, Tateishi Y, Matsumoto S, Watanabe T: Whole-genome sequence of *Mycobacterium kyorinense*. **Genome Announcements** 2: e01062, 2014. 査読あり。
3. Ohnishi H, Yonetani S, Matsushima S, Wada H, Takeshita K, Kuramochi D, Caldas PC, Campos CE, da Costa BP, Ramos JP, Mikura S, Narisawa E, Fujita A, Funayama Y, Kobashi Y, Sakakibara Y, Ishiyama Y, Takakura S, Goto H, Watanabe T: *Mycobacterium kyorinense* infection: clinical features and antimicrobial susceptibility. **Emerging Infectious Diseases** 19:508-510, 2013. 査読あり。
4. Campos CE, Caldas PC, Ohnishi H, Watanabe T, Ohtsuka K, Matsushima S, Ferreira NV, da Silva MV, Redner P, de Carvalho LD, Medeiros RF, Abbud Filho JA,

Montes FC, Galvão TC, Ramos JP: First isolation of *Mycobacterium kyorinense* from clinical specimens in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology** 50:2477-2478, 2012.
査読あり。

〔学会発表〕(計 4件)

1. 大西 宏明, 松島 早月, 米谷 正太, 大塚 弘毅, 荒木 光二, 岸野 智則, 渡邊 卓. *Mycobacterium kyorinense* とその近縁種の遺伝子解析による比較. 第 60 回日本臨床検査医学会総会、平成 25 年 11 月 1 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
2. 大西 宏明, 松島 早月, 石山 由佳子, 大塚 弘毅, 米谷 正太, 荒木 光二, 岸野 智則, 和田 裕雄, 後藤 元, 渡邊 卓. *Mycobacterium kyorinense* の抗菌薬感受性についての検討. 第 59 回日本臨床検査医学会総会、平成 24 年 11 月 30 日、京都国際会議場(京都府京都市)
3. 大西 宏明, 米谷 正太, 荒木 光二, 福川 陽子, 牧野 博, 奥山 貴洋, 大塚 弘毅, 渡邊 卓. *Mycobacterium kyorinense* 感染症の臨床像の解析. 第 23 回日本臨床微生物学会、平成 24 年 1 月 22 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
4. 大西 宏明, 松島 早月, 石山 由佳子, 大塚 弘毅, 米谷 正太, 荒木 光二, 竹下 啓, 川村 千鶴子, 倉持 大輔, 岸野 智則, 和田 裕雄, 後藤 元, 渡邊 卓. *Mycobacterium kyorinense* 感染症の臨床像のスペクトラム. 第 58 回日本臨床検査医学会総会、平成 23 年 11 月 19 日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島早月(MATSUSHIMA, Satsuki)

杏林大学医学部・実験助手

研究者番号: 80231596

(2) 研究分担者

大塚弘毅(OHTSUKA, Kouki)

杏林大学医学部・助手

研究者番号: 70439165

大西宏明(OHNISHI, Hiroaki)

杏林大学医学部・准教授

研究者番号: 80291326

渡邊 卓(WATANABE, Takashi)

杏林大学医学部・教授

研究者番号: 00191768

(3) 連携研究者

なし