

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2015

課題番号：24406021

研究課題名(和文) アジア地域での多剤および超多剤耐性結核の伝播動態調査

研究課題名(英文) Investigation of the transmission dynamics of MDR- and XDR-tuberculosis in Asian countries

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：多剤、並びに超多剤耐性結核の調査が不十分と考えられるネパール、バングラデシュ、ミャンマー、タイおよびフィリピンにおいて結核あるいは結核様症状を呈したヒトより総計2,208株の抗酸菌を分離して当該国において菌株バンクとして保存した。さらに、これらの菌株からDNAを抽出して、当該国、並びに日本においてDNAバンクとして保存した。

日本に輸入したDNAを対象として遺伝子型を決定するとともに薬剤耐性関連遺伝子変異の解析を実施した結果、ネパールおよびタイにおいては、多剤、並びに超多剤耐性結核の多くがBeijing型結核菌により引き起こされ、急速な伝播動態を示している事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We selected Nepal, Bangladesh, Myanmar, Thailand and the Philippines as the countries without sufficient investigation of multidrug-resistant (MDR)- and extensively drug resistant (XDR)-tuberculosis (TB). We isolated 2208 Mycobacterium tuberculosis strains from those who were showing tuberculosis or tuberculosis-like symptoms and stored as strain banks in each country. In addition, we extracted DNA from these strains and stored as DNA bank in both Japan and those countries.

By genotyping and the analysis of drug resistance associating gene mutations, we found that many of the MDR- and XDR-TB were caused by M. tuberculosis strains with Beijing genotype and the strains were showing rapid transmission dynamics.

研究分野：細菌学

キーワード：多剤耐性結核 超多剤耐性結核 遺伝子型別

1. 研究開始当初の背景

結核は全世界で年間約 960 万人の新規登録患者と 150 万人の死者を出している疾病であり、マラリア、エイズと並んで三大感染症の一つと考えられている。特に多くの結核患者が見られるのはアジア諸国で、全世界の結核患者の 3 分の 2 が集中していると言われていた。従って、アジアにおいて効率的な結核対策を講じ、結核を減少させる事は最優先課題の一つであると言っても過言ではない。

結核治療には、4 種類の一次選択薬の同時服用が標準であるが、その内の特定の 2 剤（リファンピシン、並びにイソニアジド）以上が効かない（耐性）ものを多剤耐性結核、さらに、これに加えて 7 剤ある二次選択結核治療薬の特定の 2 剤（キノロン系抗菌薬、並びに注射用抗菌薬）以上、合計 4 剤以上に耐性のものを超多剤耐性結核と呼んで区別している。現在のところ超多剤耐性結核の治療には効果的な薬はなく、患者は社会から完全に隔離され、多くは早期に死亡する。近年多剤耐性結核が世界的に蔓延しつつあり、東ヨーロッパや西アジア地域では解決すべき社会問題の一つとなっている。一方で、中央アジア、東南アジア、アフリカ、中東地域では多剤耐性結核は増加しているものの、超多剤耐性結核の蔓延は起こっていない。従って、現段階でアジア地域において多剤耐性結核および超多剤耐性結核の蔓延を防止する事は社会的に大きな意味がある。

昨今の交通機関の発達により、国々間の物理的距離が接近している。この事は、感染症の伝播頻度の上昇にもつながっている。実際、我が国からアジア諸国への渡航者が滞在国内において結核に罹患した例やアジア諸国から日本への旅行者、就労者、留学生が日本において結核を発症して、日本人伝播したという例も見られている。結核高蔓延地域であるアジア諸国において多剤耐性結核および超多剤耐性結核の蔓延を未然に防ぐ事は世界の他の地域の人々の健康を守る上でも重要である。更に、これまで結核のワクチンとして接種されてきた BCG は成人結核の予防効果が疑問視されており、このことも、多剤耐性結核および超多剤耐性結核の蔓延を防止する必要性を増加させている。

多剤耐性、並びに超多剤耐性結核の蔓延を防止するためには、疫学調査を実施して世界的な伝播動態を把握する必要がある。現在、世界的な流行調査が WHO 主導で行われ報告されているが、国毎に調査の規模お

よび精度が異なり、包括的な調査がなされているとは言い難い。

2. 研究の目的

本研究では、調査が不十分と考えられるアジアの国々のうち、特にバングラデシュ、ミャンマーおよびネパールに焦点を絞り、1) 対象国において臨床分離菌株を収集し、当該国において臨床分離菌株バンクおよび DNA バンクを構築する、2) 薬剤含有培地を用いて薬剤感受性試験を実施し、耐性結核の流行状況を調査する、3) 臨床分離菌株における薬剤耐性に関する遺伝子の塩基配列を分析し、対象各国における耐性と遺伝子変異の関係を明らかにする、4) 遺伝子型別を実施して伝播動態を明らかにする。また、本研究を通じて薬剤耐性結核サーベイランスネットワークを強化して本研究プロジェクトの対象国のみならずその近隣諸国の結核対策にも貢献することも考えた。

3. 研究の方法

1) 調査研究実施国・地域及び旅行経路

提案代表者・鈴木がこれまでに構築してきた研究ネットワークのうち多剤耐性および超多剤耐性結核の調査が不十分と考えられるアジア地域の 5 カ国（ネパール、バングラデシュ、ミャンマー、タイおよびフィリピン）を対象にして研究を遂行した。研究代表者はドイツ-ネパール結核プロジェクト（ネパール）結核研究室長 Bhagwan Maharjan 氏、バングラデシュ下痢症研究国際共同センター結核研究室長 Muhammad Zeaur Rahim 博士、ミャンマー医学研究局副長 Khin Saw Aye 博士、タイ保健省予防衛生研究所結核研究室長 Benjawan Phetsukusiri 博士およびフィリピン保健省 STD/AIDS Cooperative Central Laboratory 所長 Elizabeth Telan 博士を連携研究者として疫学情報の収集、DNA 抽出、目的遺伝子断片の増幅を行ない、得られた結核菌臨床分離株 DNA ないしは目的遺伝子断片を日本に輸入した。

2) 研究計画を遂行するための研究体制

菌株収集、薬剤感受性試験、遺伝子診断、分子疫学的解析が有機的に関連する必要がある。また、役割分担として、菌株収集および薬剤感受性試験を海外の共同研究者が担当し、遺伝子診断および分子疫学的解析を日本国内の研究者が担当した。

3) 薬剤耐性結核の伝播動態調査のための海外研究ネットワークの構築

代表研究者ならびに分担研究者は対象国を訪問し、各国の連携研究者を通じて薬剤耐性

結核の伝播動態情報と疫学情報を収集するためのネットワークを強化した。

4) バイオリソースの収集とデータベースの構築

対象を結核あるいは結核様症状を呈した人の喀痰としてバイオリソース(病原体バンク、病原体DNAバンク)の収集に関して標準手順書を作成した。代表研究者ならびに分担研究者は学術調査対象国を訪問し、バイオリソースの収集に関して情報を交換した。更に、対象国毎にその国の事情にあった形でバイオリソース収集の標準手順書を修正し、それ従ったバイオリソース収集を依頼した。海外連携研究者は標準手順書に従ってバイオリソースを収集した。

5) 抗酸菌症原因菌の鑑別

通常結核様感染症は多種・多様な抗酸菌により引き起こされるが、本研究では、その重要性から結核菌のみを調査対象とした。抗酸菌の分類には代表研究者らが開発した Loop Mediated Isothermal DNA amplification (LAMP) 法による低コスト・簡便・迅速抗酸菌鑑別法を用いた。また、結核菌群の人型結核菌、牛型結核菌、アフリカ結核菌への分類には代表研究者らが開発したマルチプレックスPCR法による結核菌群鑑別法を用いた。また、必要に応じて海外連携研究者を日本に招聘して技術移転を図った。

6) 薬剤性関連遺伝子変異の解析

国際標準法にのっとり培養法により薬剤感受性試験を実施した。対象薬剤は結核標準化学療法に用いられているリファンピシン(RFP)、イソニコチン酸ヒドラジド(INH)、エタンブトール(EB)およびピラジナミド(PZA)と超多剤耐性の判断基準となっているカナマイシン(KM)およびキノロン(FQ)とした。薬剤含有培地上に生育した菌株からDNAを抽出し、日本に輸入し、DNAを対象にして、薬剤耐性に関与することが報告されている遺伝子の塩基配列を決定し、塩基置換を特定した。RFP耐性に対しては*rpoB*遺伝子、INH耐性に対しては*katG*ならびに*inhA*遺伝子、カナマイシン耐性に対しては*rrs*遺伝子、キノロン耐性に対しては*gyrA*ならびに*gyrB*遺伝子を対象とした。

7) 遺伝子型別

Spoligotype 分析法、Multi Locus Variable number tandem repeat 分析法、並

びに Long Sequence Polymorphism 分析法を用いた。

4. 研究成果

1) 病原体バンク、病原体DNAバンクの構築

ドイツ-ネパール結核プロジェクト、Bangladesh下痢症研究国際共同センター、ミャンマー医学研究局、タイ保健省予防衛生研究所、並びにフィリピン保健省 STD/AIDS Cooperative Central Laborator の連携研究者と共同して多剤耐性結核臨床分離株を収集して総計 2208 株を結核菌株バンクに収蔵した。また、これらの結核菌株より DNA を抽出してDNAバンクに収蔵した。

2) 薬剤性関連遺伝子変異

DNAを対象にして、薬剤耐性に関与することが報告されている遺伝子の塩基配列を決定し、塩基置換を特定した。ミャンマーより分離された多剤耐性結核菌においては、*rpoB* 遺伝子変異保有株ならびに *katG* 又は *inhA* 遺伝子変異保有株の割合が他国に比べて極端に低かった。これとは対照的に、ネパール、Bangladesh、タイで分離された多剤耐性結核菌においては *rpoB* 遺伝子変異保有株ならびに *katG* 又は *inhA* 遺伝子変異保有株は 90%を大幅に越えていた。*rpoB* 遺伝子上に見出される変異で最も頻繁な変異は 4 カ国とも共通で、531番目のアミノ酸のセリンをロイシンに置換するものであり、また、INH耐性に関連して見出された遺伝子でも 3 カ国とも共通で、*katG* 遺伝子上で 315番目のセリンをスレオニンに置換する変異が最も頻繁に検出された。

3) 超多剤耐性結核

ネパール、Bangladesh、タイで分離された超多剤耐性結核菌全てにおいてカナマイシン耐性 *rrs* ならびに *gyrA* または *gyrB* 遺伝子上に変異が見られた。

4) 遺伝子型別法による伝播動態把握

日本に輸入したDNAを対象として遺伝子型を決定するとともに薬剤耐性関連遺伝子変異の解析を実施した結果、ネパールおよびタイにおいては、多剤、並びに超多剤耐性結核の多くが Beijing 型結核菌により引き起こされ、急速な伝播動態を示している事が明らかとなった。一方、フィリピンでは Manila 型結核菌が蔓延している事が判明した。

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 20 件)

Matsuba T, Siddiqi U, Hattori T, Nakajima C, Fujii J, Suzuki Y (2016) Antigenic characterisation of dimorphic surface

protein in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*, 363(10):fnw082. (査読あり)

Thapa J, Paudel S, Sadaula A, Shah Y, Maharjan B, Kaufman GE, McCauley D, Gairhe KP, Tsubota T, Suzuki Y, Nakajima C (2016) Tuberculosis caused by *Mycobacterium orygis* in a free-ranging rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) in Nepal. *Emerg Infect Dis*, 22(3): 570–2. (査読あり)

Khin Saw Aye, Nakajima C, Yamaguchi T, Min Min Win, Mu Mu Shwe, Aye Aye Win, Thandar Lwin, Wint Wint Nyunt, Ti Ti, Suzuki Y (2016) Genotypic Characterization of Multi-drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar. *J Infect Chemother*, 22(3):174-9. (査読あり)

Diab HM, Nakajima C, Kotb SA, Mokhtar A, Khder NFM, Abdelaal ASA, Hegazy A, Poudel A, Shah Y, Suzuki Y (2016) First insight into the genetic population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from pulmonary tuberculosis patients in Egypt. *Tuberculosis*, 96:13-20. (査読あり)

Senoputra M, Shiratori B, Hasibuan F, Koesoemadinata R, Apriani L, Ashino Y, Ono K, Oda T, Matsumoto M, Suzuki Y, Alisjahban B, Hattori T (2015) Diagnostic value of antibody responses to multiple antigens from *Mycobacterium tuberculosis* in active and latent tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 83:278-85. (査読あり)

Thapa J, Nakajima C, Maharjan B, Poudel A, Suzuki Y (2015) Molecular characterization of *Mycobacterium orygis* isolates from wild animals of Nepal. *Jpn J Vet Res*, 63:151-8. (査読あり)

Zhao J, Zhu Z, Zhang X, Suzuki Y, Chagan-Yasutan H, Chen H, Wan Y, Xu J, Ashino Y, Hattori T (2015) Evaluation of anti-TBGL antibody in TB patients in China: anti-TBGL antibody titers elevated in pulmonary TB patients presenting with cavitation or bronchiectasis. *J Immunol Res*, 2015:834749. (査読あり)

Usami O, Nakajima C, Endo S, Inomata S, Kanamori H, Hirakata Y, Uchiyama B, Kaku M, Suzuki Y, Hattori T (2015) A case of

Manila type *Mycobacterium tuberculosis* infection in Japan. *Clin Case Rep*. 3:622-5. (査読あり)

Mwikuma G, Kwenda, Hang'ombe M B, Simulundu E, Kaile T, Nzala S, Siziya S, Suzuki Y (2015) Molecular identification of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens in Zambia. *Ann Clin Microb Anti*, 14:1. (査読あり)

Shiratori B, Leano PSA, Nakajima C, Chagan-Yasutan H, Niki T, Ashino Y, Suzuki Y, Telan EFO, Hattori T (2014) Elevated OPN, IP-10 and neutrophilia in loop-mediated isothermal amplification confirmed tuberculosis patients. *Mediat Inflamm*, 2014:513263. (査読あり)

Li D, Dong CB, Cui JY, Nakajima C, Zhang CL, Pan XL, Sun GX, Dai EY, Suzuki Y, Zhuang M, Ling H (2014) Dominant modern sublineages and a new modern sublineage of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family clinical isolates in Heilongjiang Province, China. *Infect Genet Evol*, 27:294-9. (査読あり)

Nishiuchi Y, Tamaru A, Suzuki Y, Kitada S, Maekura R, Tateishi Y, Niki M, Ogura H, Matsumoto S (2014) Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. *J Water Health*, 12:211-9. (査読あり)

Paudel S, Mikota SK, Nakajima C, Gairhe KP, Maharjan B, Thapa J, Poudel A, Shimozuru M, Suzuki Y, Tsubota T (2014) Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from elephants of Nepal. *Tuberculosis*, 94:287-92. (査読あり)

Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye KS, Ling H, Hattori T, Iwamoto T, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y, Matsuba T (2013) A simple multiplex PCR for the identification of Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* with a lineage-specific mutation in *Rv0679c*. *J Clin Microbiol*, 51:2025-32. (査読あり)

Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Bunchoo S, Roienthong D, Mukai T, Nakajima C, Hamada S, Suzuki Y (2013) Applicability of in-house loop-mediated isothermal amplification for rapid

identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on solid media. *Jpn J Infect Dis*, 66:249-51. (査読あり)

Poudel A, Maharjan B, Nakajima C, Fukushima Y, Pandey BD, Beneke A, Suzuki Y (2013) Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Nepal. *Tuberculosis*, 93:84-8. (査読あり)

Hang'ombe BM, Munyeme M, Nakajima C, Fukushima Y, Suzuki H, Matandiko M, Ishii A, Mweene AS, Suzuki Y (2012) *Mycobacterium bovis* infection at the interface between domestic and wild animals in Zambia. *BMC Vet Res*, 14:221. (査読あり)

Rahim Z, Nakajima C, Raqib R, Zaman K, Endtz HP, van der Zanden AGM, Suzuki Y (2012) Molecular Mechanism of Rifampicin and Isoniazid Resistance in *M. tuberculosis* from Bangladesh. *Tuberculosis*, 92:529-34. (査読あり)

Tamaru A, Nakajima C, Wada T, Kawahara R, Maekura R, Ozeki Y, Ogura H, Kobayashi K, Suzuki Y, Matsumoto S (2012) The Dominant Incidence of One Strain of Peculiar Genotype to Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Osaka Prefecture, Japan. *PLoS One*, 7: e42505. (査読あり)

Rahim Z, Momi SB, Saha SK, Zaman K, Uddin KN, Ashraf Jamil SNA, Nahar N, Azad Khan AK, Cooreman EAWD, Ahmed M, van der Zanden AGM, Nakajima C, Suzuki Y, Endtz HP (2012) Pulmonary tuberculosis in patients with diabetes mellitus in Bangladesh. *Int J Tuberc Lung Dis*. 16:1132-3. (査読あり)

〔学会発表〕(計3件)

Rudeeaneksiri R, Phetsuksiri B, Bunchoo S, Srisunggam S, Klayut W, Sangkitporn S, Sujariyakul A, Suthum K, Tipkruai N, Fukushima Y, Suzuki H, Nakajima C, Suzuki Y. Molecular characteristics and genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from an outbreak of Thailand-Myanmar border. US-Japan Cooperative Medical Science Program, TB, Leprosy Panel Meeting, January 13, 2016, Bethesda, USA. (口頭)

Rahim Z, Parvez M, Zaman K, Nakajima C, Suzuki Y. Phylogenetic clades of

Mycobacterium tuberculosis circulating among HIV patients of Bangladesh. US-Japan Cooperative Medical Science Program, TB, Leprosy Panel Meeting, January 13, 2016, Bethesda, USA. (ポスター)

Shah Y, Poudel A, Diab HM, Thapa J, Conscilliah M, Maharjan B, Nakajima C, Suzuki Y. Diversity of MIRU-VNTR among *Mycobacterium tuberculosis* Central Asian family isolates from Nepalese patients. 46th Union World Conference on Lung Health, December 2, 2015, Cape Town, South Africa. (口頭)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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・特任助教

研究者番号：60435964