

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461173

研究課題名(和文) 組み換え抗酸菌を使用した新規薬剤感受性試験の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method for assessing drug resistances using recombinant mycobacteria

研究代表者

中田 登 (Nakata, Noboru)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・主任研究官

研究者番号：70237296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺MAC症の未治療患者から分離された50株のMycobacterium aviumについて薬剤耐性を調べた。リファンピシン、レボフロキサシン、クラリスロマイシン(CAM)に対する耐性率はそれぞれ52%、68%、6%であった。これらの株の薬剤耐性がそれぞれの薬剤の標的遺伝子(rpoB、gyrBA)の変異によるかどうかを調べる実験系を迅速発育性抗酸菌M. smegmatisを用いて構築し、耐性菌から得られたrpoB遺伝子、gyrA遺伝子について調べたが、耐性の性質は、それら遺伝子中の変異によるものではなかった。CAM耐性についても同様に調べたが、標的遺伝子のrrlに変異は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Drug susceptibilities of 50 Mycobacterium avium clinical isolates obtained from untreated patients were examined. Resistance rates of rifampicin, levofloxacin, clarithromycin were 52%, 68%, and 6%, respectively. No non-synonymous mutations were detected in RRDR of the rpoB gene and QRDR of the gyrA gene of the drug resistant isolates. Clarithromycin resistance of the isolates was also analyzed. No mutation were found in the rrl genes of the clarithromycin-resistant isolates. To test whether mutations in the rpoB other than RRDR and in the gyrA other than QRDR in the drug resistant isolates are responsible for their resistance, recombinant M. smegmatis strains, having the rpoB gene or gyrBA genes from the drug resistant M. avium isolates instead of M. smegmatis rpoB or gyrBA, were produced and their drug susceptibilities were examined. Results revealed that rifampicin resistance and quinolone resistance of the M. avium isolates were not caused by mutations in the rpoB and gyrA genes.

研究分野：細菌学

キーワード：薬剤耐性 抗酸菌 MAC

1. 研究開始当初の背景

抗酸菌によって生じる疾患は結核と非結核性抗酸菌症に分類される。非結核性抗酸菌 (NTM) は環境中に存在する菌がヒトに症状を起こす。結核とは対照的に NTM 症は世界的に患者数の増加を認め、特に本邦ではその増加は著しい。NTM 症として一番症例の多い *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症は肺結核症に次いで本邦で 2 番目に多い呼吸器抗酸菌感染症である。MAC においても近年薬剤耐性株が増えつつあり、この傾向が持続するとクラリスロマイシン (CAM) の併用薬であるリファンピシン (RFP) やエタンブトール (EB) にも耐性株が出現する可能性がある。又シタフロキサシン等のフルオロキノロン系抗菌薬も臨床で併用される傾向にあり耐性菌が増加する可能性がある。

2. 研究の目的

MAC 感染症の問題点の一つに非結核性抗酸菌症専用の治療薬が存在しない点がある、結核や一般細菌に使用される抗菌薬を代用して使用しているが効果は弱く、1-2 年間使用を続けなければならない。また症状の改善により使用を中止すると再発する症例や複数の抗菌薬を内服しているのに症状が悪化する症例が非常に多い。加えて非常に長い期間複数の抗菌薬を服用しなければならないので、患者の服薬に対するアドヒアランスはしばしば悪くなり、これが抗菌薬に対する薬剤耐性の原因となっている。日本において患者の増加と共に急速に NTM 症患者が増加しており、一定の割合で薬剤耐性患者が存在するとすれば、それぞれの抗菌薬の薬剤耐性機構の解明および簡便な薬剤感受性スクリーニング法を開発することが求められる。MAC 感染症は一般に治療が長くなることが多く、そのため薬剤耐性菌の出現の可能性が高く、化学療法剤を使用する際には感染菌の耐性獲得状況を正確に知っておくことが重要である。MAC 感染症の薬剤耐性に関しては、CAM について、23S リボソーム RNA 遺伝子 (*rrl*) の変異が報告されている。しかし、それ以外の薬剤に対する耐性についてはほとんど報告が無く、薬剤の標的分子において耐性を引き起こす変異の位置等についての情報に乏しいため、適切な治療薬を選択するための DNA 診断ができない。MAC は菌株間の DNA 塩基配列一致性が低く、例えば RFP の耐性に関わるとされる *rpoB* 遺伝子の DNA 塩基配列の一致度は、*M. avium* 104 株と *Mycobacterium intracellulare* ATCC13950 株では 95% 程度であり、薬剤感受性菌株同士でも薬剤標的分子をコードする遺伝子に薬剤耐性とは無関係な変異を多く含んでいる。一方、結核菌では RFP、EB に対する耐性はそれぞれ *rpoB* 遺伝子、*embB* 遺伝子の変異によるとされているが、それら遺伝子の変異で説明可能な耐性は、全耐性菌のそれぞれ 95%、70% 程度であり、他の因子の変異による耐性化のメカニズムも存

在する。そのため、薬剤耐性臨床分離株の当該遺伝子の変異を検出しただけでは、耐性を実際に引き起こしている変異を同定することは困難である。

3. 研究の方法

(1) *M. avium* 臨床分離株の薬剤感受性試験
臨床分離株は米国の CLSI (clinical and laboratory standards institute) の方法に準拠して、Mueller-Hinton 培地に 5% OADC を付加した液体培地を使用して各種抗菌薬に対する最小発育阻害濃度 (MIC) を測定した。対照とする薬剤感受性標準株 (*MAC* 104 株、ATCC700898) との比較から薬剤耐性・感受性を決定した。

(2) 組み換え *Mycobacterium smegmatis* の作製

M. avium の *rpoB* 遺伝子、*gyrBA* 遺伝子はプラスミド pMV261 にクローニングした。*M. smegmatis* の *rpoB* 遺伝子、*gyrBA* 遺伝子の上流、下流それぞれの部分約 1kb の断片をベクターにクローニングし、温度感受性ファージに組み込んで相同組み換えによる *M. smegmatis* の *rpoB* 遺伝子、*gyrBA* 遺伝子破壊に用いた (図 1)。*M. avium* の *rrl* 遺伝子を含む *rrn* オペロンは染色体組込み型ベクター pNN301RKR にクローニングした。*M. smegmatis* は *rrl* 遺伝子を含む *rrn* オペロンをゲノム中に 2 コピー (*rrn1*、*rrn2*) 有するため、*rrn1*、*rrn2* それぞれの上流・下流域 1kb をクローニングし相同組み換えに用いた。*M. smegmatis* の *rrn2* オペロンを破壊後、*M. avium* の *rrn* プラスミドを導入し、その後 *rrn1* オペロンを破壊して *rrn* オペロン交換株を作製した。

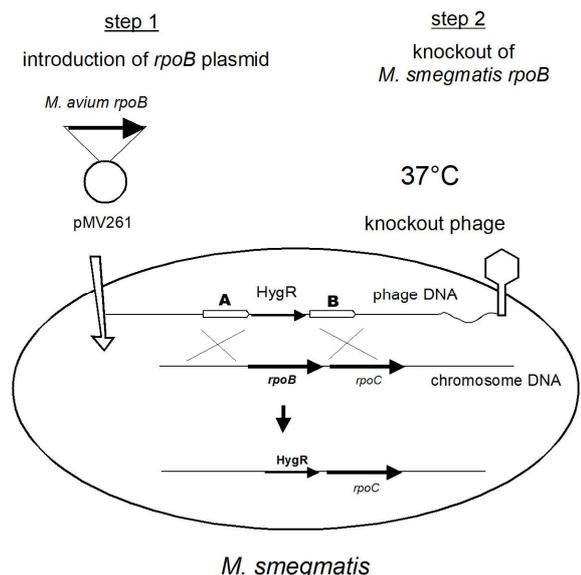


図 1 組み換え *M. smegmatis* 作製の概略

4. 研究成果

(1) 肺 MAC 症臨床分離株の薬剤感受性
肺 MAC 症患者の未治療経過観察群から分離された *M. avium* 臨床分離株 50 株について、RFP、

レボフロキサシン(LVFX)、CAM に対する最小発育阻害濃度(MIC)を測定を行った。対照とする薬剤感受性標準株 (MAC104 株、ATCC700898) との比較から薬剤耐性・感受性を決定した。現在の肺 MAC 症の標準的治療は CAM、エタンブロール、RFP の 3 剤であり、それに加えてフルオロキノロンを併用することもある。CAM の感受性については、調べた株の約 6%にあたる 3 株が、対照と比較して 4 倍以上の MIC をしめした。また、RFP では、約 52%の株が対照と比較して 4 倍以上の MIC を示した。フルオロキノロン系薬剤の LVFX では、68%の菌株が耐性を示した (表 1)。

	RFP	LVFX	CAM
感受性	24	16	47
耐性	26	34	3

表 1 臨床分離株の薬剤感受性

(2) *rpoB* 遺伝子変異と組み換え抗酸菌による RFP 感受性試験法の開発

CAM、RFP、LVFX の標的分子をコードする遺伝子はそれぞれ、*rrl*、*rpoB*、*gyrBA* であるので、これら標的遺伝子の変異が耐性の原因となっているかどうかを調べるために、臨床分離株から DNA を抽出し、まず、高率で耐性が見られた *rpoB* 遺伝子の耐性決定領域 (rifampicin resistance determining region, RRDR) といわれる領域約 500bp を増幅するように primer pair を設定して PCR 増幅を行った。得られた増幅断片の塩基配列を決定し、リファンピシン感受性菌である *M. avium* 104 株の *rpoB* 塩基配列と比較した。その結果、多くの株で 4 か所から 5 か所の DNA 置換を検出したが、これらは全て同義置換と言われるアミノ酸の置換を伴わないものであった。そこで、これら菌株が示すリファンピシン耐性の性質が *rpoB* 遺伝子上の RRDR 以外の領域の変異が原因かどうかを調べるための実験系の開発を行った (図 1)。リファンピシン耐性株 2 株、及び対照としてリファンピシン感受性株 1 株から *rpoB* 遺伝子全域約 3.5kb を PCR 増幅後、発現ベクターにクローニングし、*M. smegmatis* にそれぞれ導入した。得られた株に対して、温度感受性ファージを用いた遺伝子破壊システムを用い、*M. smegmatis* が染色体上に持つ *rpoB* 遺伝子を破壊して、*M. avium* の *rpoB* 遺伝子との置換株の作製をおこなった。この実験系を用いることにより、らい菌、及び結核菌の *rpoB* 遺伝子を用いた場合に、変異がリファンピシン感受性に与える影響を試験できることを既に報告している (文献)。作製された *rpoB* 置換株について、リファンピシン感受性を調べたところ、耐性株、感受性株それぞれ由来の *rpoB* 遺伝子を持つ組み換え *M. smegmatis* でリファンピシンに対する感受性の差はなく、リファンピシン耐性の性質は *rpoB* の変異に起因するものではないことがわかった。これらの結果から、RFP 治療を行っていない肺 MAC

症患者から分離された菌であっても、高い比率で RFP 耐性を示すが、これらの菌は *rpoB* 遺伝子には変異がなく、他の遺伝子の作用によって RFP 耐性を示すことが示され、*M. avium* での RFP 耐性に関しては、結核菌で行われているような *rpoB* 遺伝子変異の検出だけでは判定できないことが示唆された。

(3) *gyrA* 遺伝子変異と組み換え抗酸菌によるフルオロキノロン感受性試験法の開発
次に LVFX に対して高い最小発育阻害濃度を示した 2 株について、LVFX などのフルオロキノロン耐性を引き起こすとされる *gyrA* 遺伝子の耐性決定領域 (Quinolone resistance determining region, QRDR) と言われる約 100bp の領域を PCR 増幅し、塩基配列を決定したが、感受性を示す配列と比較して変異が見られなかった。そこでリファンピシンと *rpoB* 遺伝子変異の関係と同様の実験系を構築し、*M. avium* の *gyrBA* 遺伝子全域約 4.5kb で自身の *gyrBA* 遺伝子を置換した *M. smegmatis* の作製を行い、LVFX 感受性を調べたが、やはり感受性株由来の *gyrBA* 遺伝子と同様の最小発育阻害濃度を示したことから、臨床分離株における LVFX 耐性が *gyrBA* 遺伝子の変異によるものではないことが示唆された。

(3) 組み換え抗酸菌による CAM 感受性試験法
CAM は肺 MAC 症治療において最も重要な薬剤の一つであるが、試験した臨床分離株では CAM 耐性を示した株は 6 株であったが、*rrl* 遺伝子に変異は見られなかった。*rrl* 遺伝子に変異した *M. avium* 株で CAM の高度耐性が報告されていることから、*rrl* 遺伝子の変異が CAM 耐性を引き起こすかどうかを直接証明する実験系の開発を行った。*rrl* の 2058、2059 番目の塩基はともに A であるが、これらにそれぞれ点変異を加え C としたものを作製した。これらの変異 *rrl* 遺伝子を使って組み換え *M. smegmatis* を作製し、CAM 感受性試験を行って調べたところ、元の配列と比較してそれぞれ 8 倍、4 倍の MIC を示し、これらの変異が CAM 耐性を引き起こすことが実験的に証明された (表 2)。

	CAM MIC (µg/ml)	野生型との比 (変異/野生型)
野生型	1.0	
2058A C	8.0	8
2059A C	4.0	4

表 2 組換え株に導入した変異と CAM 感受性

< 引用文献 >

Nakata N, Kai M, and Makino M. Mutation Analysis of Mycobacterial *rpoB* Genes and Rifampicin Resistance Using Recombinant Mycobacterium *smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 2008-2013, 2012

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Noboru Nakata, Masanori Kai, Masahiko Makino. Analysis of Mycobacterial rrl Genes and Macrolide Resistance using Recombinant M. smegmatis. 第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月

吉田光範、星野仁彦、中田 登：結核菌 gyrBA 遺伝子変異とフルオロキノロン耐性の新たな解析法、第 91 回日本結核病学会総会、2016 年 5 月

Noboru Nakata, Mitsunori Yoshida, Yoshihiko Hoshino. Analysis of fluoroquinolone susceptibility and temperature sensitivity of the Mycobacterium lerpae DNA gyrase. 第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月

Mitsunori Yoshida, Yoshihiko Hoshino, Noboru Nakata. A novel method for assessing Mycobacterium tuberculosis gyrBA mutations and fluoroquinolone resistance. 第 90 回日本細菌学会総会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 登 (NAKATA, Noboru)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センタ

ー・感染制御部・主任研究官

研究者番号：70237296

(2) 研究分担者

星野 仁彦 (HOSHINO, Yoshihiko)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センタ

ー・感染制御部・室長

研究者番号：20569694