

5. 栃木県内で分離された結核菌の全ゲノムを用いた 薬剤耐性遺伝子の解析

○水越 文徳 (栃木県保健環境センター)

船渡川 圭次 (栃木県保健環境センター)

桐谷 礼子 (栃木県保健環境センター)

【研究目的】

結核は発展途上国を中心に蔓延しているが、日本においても結核罹患率が高く、依然として中蔓延国とされている。治療には長期の抗結核薬投与が必要であるが、薬剤耐性の結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*; MTB) の出現が問題となっている。そこで、本研究では、栃木県で分離された MTB の全ゲノム情報を基に薬剤耐性遺伝子を分析し、その種類と性状、分子疫学的特徴を明らかにする。この研究成果は、薬剤耐性 MTB の対策や制圧の基盤となるものである。

【研究の必要性】

結核は世界中で猛威を振るい、WHO によると、2017 年では約 1,000 万人が新たに結核を発症し、130 万人が結核で死亡した¹⁾。このように、単独の病原体による死因としては最も多い感染症である。日本においても、2017 年の結核罹患率（人口 10 万人対の新登録結核患者数）は 13.3 人で、欧米諸国と比較すると高い値であり、我国では結核対策は依然として重要な課題である²⁾。栃木県においても結核罹患率は 11.1 人であり、地域としての公衆衛生対策を講じる必要性がある。

結核は、長期間、抗結核薬を適切に投与すれば効果的に治療できる。しかしながら、薬剤耐性獲得のリスクもあり、治療効率の低下、患者の予後不良につながる。特に、主要な抗結核薬であるイソニアジド (isoniazid; INH)、リファンピシン (rifampicin; RIF) が効かない多剤耐性 (multidrug-resistant; MDR) MTB は治療成績が悪く、その拡大を防ぐための早期診断、適切な治療法の開発が必要である。日本でも、新規登録結核患者から分離された MTB のうち、INH 耐性が 4.9%、RFP 耐性が 1.1%、このうち 0.7%が MDR である²⁾。

さらに加えてフルオロキノロン系または注射可能な抗結核薬にも耐性がある超多剤耐性 (extensively drug-resistant; XDR) MTB は、公衆衛生、臨床で重要な問題となっている。

本研究では、栃木県内で分離された MTB の全ゲノムを解読し、薬剤耐性遺伝子の変異や薬剤感受性を基に詳細な分子疫学的解析を行った。

【研究計画】

(1) 結核菌の全ゲノム解読

・2007 年から 2015 年に栃木県内で分離された MTB 317 株の全ゲノムを次世代型シーケンサーで解読した (2006/9/29~2008/12/5 ; 114 株、2012/12/26~2015/10/9 ; 203 株)。

(2) 分子疫学的解析および薬剤耐性遺伝子のスクリーニング

- ・全ゲノムデータが十分に得られた 279 株を対象に、感染症サーベイランスシステム (NESID) から情報を取得して、臨床や疫学情報 (患者の年齢、性別、国籍、など) を解析した。
- ・MTB のゲノムを包括的に解析するシステム CASTB を用いて、MTB の各種タイピング (Lineage 解析、北京型)、薬剤耐性遺伝子のスクリーニング (INH、RIF、amikacin; AIM、ofloxacin; OFX、streptomycin; SM、ethambutol; EMB、pyrazinamide; PZA) を実施した。
- ・SNP コンカテマーによる菌株間の系統的関係を解析するため、近隣結合法 (neighbor-joining methods; NJ 法) による系統樹を構築した。

(3) 薬剤耐性遺伝子の詳細な解析および薬剤感受性 (最小発育阻止濃度 ; MIC) の検討

- ・CLC Genomics Workbench を用いて、全ゲノムデータから INH 耐性に関連する遺伝子 (*katG*、*inhA*、*kasA*、*ahpC*、*ndh*、*mabA*[*fabG*]) を抽出し、遺伝子、アミノ酸の変異を解析した。
- ・薬剤耐性遺伝子が検出された株のうち培養が可能だった 25 株と control として感受性 MTB の 5 株について、表現型を確認するためにブロスミック MTB-I (極東製薬) を用いて、培養試験による薬剤感受性 (MIC) を検討した。

【実施内容・結果】

(1) 疫学的解析および薬剤耐性遺伝子のスクリーニング

279 株が分離された患者の平均年齢は 65.1 (±22.2) 歳で、日本人 247 人は 69.0 (±19.7) 歳に対して外国籍 32 人は 35.3 (±17.2) 歳と有意に若かった (Unpaired t test; $P < 0.0001$)。

解析した 279 株は 5 つの Lineage に属していた (表 1)。本邦の主流である Lineage 2 Ancestral 型 (L2A) が 126 株 (126/279 ; 45.2%) と最も多く、そのうち 122 株が日本人患者由来の MTB だった。次いで、Lineage 4 (L4、81/279 ; 29.0%)、Lineage 2 Modern 型 (L2M、51/279 ; 18.3%) の順で多かった。東南アジア土着株の Lineage 1 (L1) は、19 株中 12 株が外国籍由来の MTB だった。Lineage 3 (L3) はインド、東アジアで流行しているが、調査期間中に栃木県内からは 2 株 (2/279 ; 0.7%) のみ分離された。

CASTB 解析で薬剤耐性遺伝子が検出された MTB は 37 株 (37/279 ; 13.3%) で、日本人患者由来が 27 株、外国籍患者由来が 10 株だった (表 1、表 2)。そのうち、INH に対する耐性遺伝子を検出した株が最も多く (25/279 ; 9.0%)、次いで SM 耐性遺伝子を有する株が多かった (10/279 ; 3.6%)。CASTB の結果から INH と RIF の両方で耐性遺伝子が認められた MTB は 1 株であった。

表 1 栃木県内から分離された結核菌の Lineage 分類、性別、国籍、薬剤耐性遺伝子の有無

	ALL	L1	L2A	L2M	L3	L4	2006-2008	2012-2015
Total	279	19	126	51	2	81	86	193
男性	178	11	81	33	1	52	59	119
女性	101	8	45	18	1	29	21	74
日本人	247	7	122	48	0	70	75	172
外国籍	32	12	4	3	2	11	11	21
感受性	242	15	116	44	2	65	73	170
耐性※	37	4	10	7	0	16	13	23

※ CASTB 解析で薬剤耐性遺伝子が検出された株数

表 2 薬剤耐性遺伝子が検出された MTB の株数 (CASTB 解析)

	Total	INH	RIF	AIM	OFX	SM	EMB	PZA
Total	37	25	1	5	4	10	4	2
日本人	27	17	0	5	3	8	2	1
外国籍	10	8	1	0	1	2	2	1

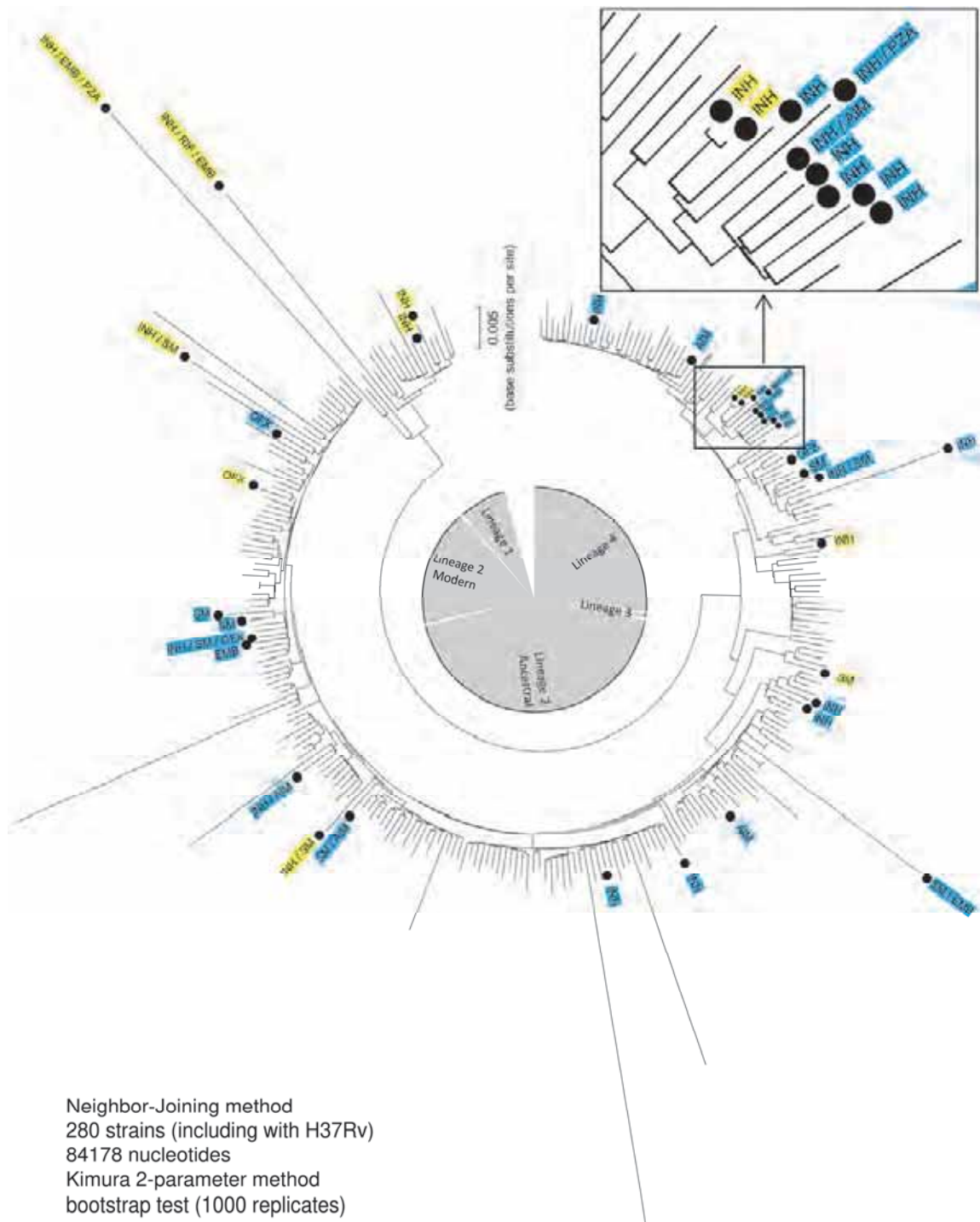


図 1 SNP コンカテマーを用いた系統樹解析 (NJ 法)

●は薬剤耐性遺伝子が検出された株を示し、それぞれの薬剤を記載。
青は日本人由来、黄は外国籍由来の薬剤耐性 MTB を示す。

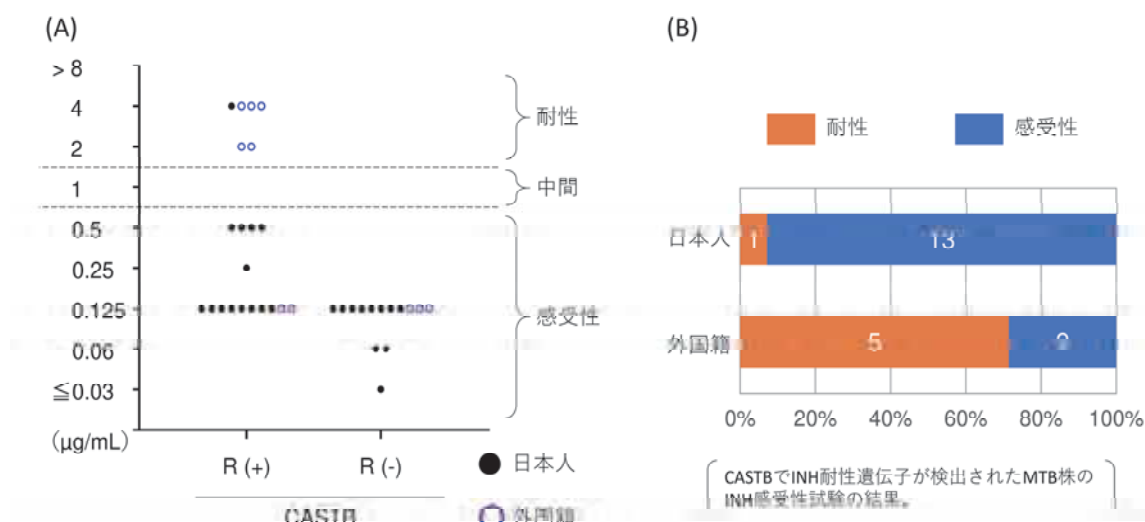


図 2 INH 耐性遺伝子変異の有無と MIC の比較(A)、および国籍別の比較(B)

表 2 遺伝子解析と薬剤感受性試験 (MIC) の比較検討

ID	08-016	15-037	13-048	07-008	13-021	08-010	07-010	14-010	14-024	14-064	14-059	07-066	13-031	13-061	13-066	13-073	14-077	15-025	07-020	13-020	07-021
Country	外国	外国	日本	外国	外国	外国	日本	日本	日本	日本	日本	日本	日本	日本	日本	日本	日本	日本	外国	外国	日本
Lineage	L1	L4	L2M	L2A	L1	L1	L4	L2A	L2A	L2A	L2A	L4	L4	L4	L4	L4	L4	L4	L4	L4	L2M
Broth MIC (MIC; μg/mL)	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CASTB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
katG Ser315Thr																					
Ser315Asn																					
Arg463Leu																					
kasA Gly269Ser																					
Gly312Ser																					
mabA C[-15]T																					
C[-8]T																					
inhA Ser94Ala																					

(2) 薬剤耐性 MTB 株の系統樹による分子疫学的解析

SNP コンカテマーの情報を基に NJ 法の系統樹を構築した (図 1)。279 株の解析株は、Lineage 毎にクラスターを形成した。さらに、9 株の INH 耐性 MTB が形成するサブクラスターが存在した (図 1 ; 右上の BOX に拡大)。

(3) 遺伝子解析と薬剤感受性試験 (MIC) の比較検討

INH 耐性における MIC と CASTB の結果を図 2(A) で比較した。CASTB で INH 耐性遺伝子が検出された 21 株について、培養による薬剤感受性試験では 6 株のみが耐性となった。日本人由来の 14 株中 13 株が、培養試験では感受性を示した。一方、外国人由来の 7 株のうち、CASTB と培養試験の結果が異なった株は 2 株のみだった。CASTB と培養試験の結果の乖離を国籍別で比較すると有意差があった (図 2(B)、Fisher's exact test ; $P=0.0055$)。

遺伝子解析の結果から INH と RIF の両方で耐性遺伝子が認められた 1 株の MTB は、培養による薬剤感受性試験の結果、RIF は感受性を示した (INH は耐性)。

(4) INH 耐性の遺伝子変異について詳細な解析

全ゲノムデータから INH 耐性に関連する遺伝子 (*katG*, *inhA*, *kasA*, *ahpC*, *ndh*, *mabA*[*fabG1*])

の変異を解析した(表 2)。培養試験で耐性となった株では、共通した変異は katG (Ser315Thr、Ser315Asn)、kasA (Gly312Ser)、mabA (C[-8]T)、inhA (Ser94Ala) であった。特に、katG (Ser315X) の変異株は、高い MIC で耐性を示した。一方、katG (Arg463Leu)、mabA (C[-8]T) の変異が認められた株は、培養による薬剤感受性試験において耐性と感受性のどちらかを示した。kasA (Gly269Ser) の変異のあった 9 株は、系統樹の L4 中で形成されたサブクラスターに位置し(図 1; 右上の BOX に拡大)、MIC が 0.125µg/mL と低く INH に感受性を示した。

【考察と今後の課題】

世界的に INH 耐性 MTB は 7.1%の新規感染者、7.9%の再発患者から分離され¹⁾、日本で分離される MTB の 4.9%が INH 耐性である²⁾。本研究では、INH 耐性遺伝子を検出した株は 9.0% (25/279) であったが、培養による感受性試験が実施できた 21 株のうち耐性を示したのは 6 株に過ぎなかった。今回、すべての MTB で培養による感受性試験が実施できなかったが、第一選択薬である INH 耐性の検出は、今後とも注意深く監視していく必要がある。

本研究で、遺伝子解析と培養による薬剤感受性試験の結果に乖離が認められた。典型的な katG (Ser315X) のような高い MIC で耐性を示す変異は診断に有用であるが、その他の報告数の少ない変異は十分な検討が必要である。今回の結果でも、薬剤耐性遺伝子が検出されても、耐性を示す MIC に達しない株が多かった。特に、国内の INH 耐性 MTB 分離株において、その傾向が強かった(図 2(B))。従来の薬剤感受性試験は時間を要するが、薬剤耐性遺伝子解析は臨床へ迅速に情報を提供でき、治療効率が高まると考えられる。迅速な遺伝子検査で正確な薬剤耐性の結果が得られるようにするために、情報を蓄積していくことが世界共通の課題と考える。

このような薬剤耐性遺伝子のデータベースを構築は、臨床治療(薬剤耐性など)だけでなく、疫学研究(地域性、集団感染等)に有用性が高い。将来、結核治療や公衆衛生対策の基盤とするために、既報の情報と併せて詳細な解析を実施することが今後の課題である。

【参考文献】

- 1) World Health Organization. Global tuberculosis report 2018
- 2) 厚生労働省. 平成 29 年結核登録者情報調査年報集計結果

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費(試薬;ブロスミック)	122,472 円
消耗品費(スクラブ)	20,100 円
消耗品費(チューブ、チップ、等)	25,812 円
消耗品費(電子媒体)	51,947 円
情報収集(書籍 4 冊、文献整理ソフト)	73,548 円
交通費(セミナー)	6,260 円
合 計	300,139 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円