

氏 名	稲垣 孝行
国籍・本籍	愛知県
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	乙第197号
学位授与の日付	平成25年12月 6 日
学位授与の要件	名城大学学位規程第 3 条第 5 項該当
学位論文題目	抗酸菌における分子疫学的解析法と薬剤耐性に関する遺伝学的研究
論文審査委員	主 査 二 改 俊 章
	副 査 小 嶋 伸 夫
	副 査 湯 川 和 典

論文内容の要旨

【序章】

ヒトに対して病原性を示す抗酸菌は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) を中心とした結核菌群、らい菌 (*Mycobacterium leprae*)、非結核性抗酸菌 (non-tuberculous mycobacteria : NTM)である。

NTM は、自然界に広く存在する環境常在菌で、ヒトへの感染経路は特定されておらず、ヒトからヒトへの感染は否定的であり、有効な薬剤が少ない難治性疾患である。2001 年の全国調査で NTM 症は、全抗酸菌症中の約 29 %を占め、このうち *Mycobacterium avium* 症が 57.8 %、*Mycobacterium intracellulare* 症が 25.0 %と 8 割以上が *M. avium-intracellulare* complex (MAC) 症である。MAC 症は HIV 感染者に対して全身播種型 MAC 症として発症することが知られている。一方、わが国で近年特に、中年以降の基礎疾患のない女性において肺 MAC 症の罹患率が急増している。肺 MAC 症の治療に関しては、Clarithromycin (CAM) を中心とした多剤併用療法が行われているが、耐性化への懸念があることから適切な管理の上、迅速かつ簡便に CAM に対する薬剤耐性の有無を検出する方法が求められている。

結核は、結核菌のヒトからヒトへの連続的な感染が起こることにより発病が見られる伝染性疾患である。結核化学療法の標準的治療法は、Isoniazid (INH) と Rifampicin (RFP) を柱とする治療が進められている。しかし、この INH と RFP の両剤に耐性を示す多剤耐性結核 (multidrug-resistant tuberculosis : MDRTB) が近年問題となっており、その蔓延防止・発

現抑制は、臨床上重要な課題である。

【第1章】 *Mycobacterium avium* における分子疫学的解析法の有用性の検討

分子疫学的解析は、菌株間の遺伝子構造の差異を比較する手法であり、結核の集団感染事例における感染源の特定などに広く用いられている。*M. avium* において分子疫学的解析法は、標準法である Insertion Sequence (IS) 1245- Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 型別解析法、縦列反復数可変領域 (Mycobacterium Interspersed Repetitive Units : MIRU) を用いた MIRU- Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 型別解析法、そして、わが国では当微生物学研究室で初めてヒト臨床分離株に対して応用可能であることを証明した *Mycobacterium Avium* Tandem Repeats (MATR) 領域を用いた MATR-VNTR 型別解析法がそれぞれ報告されている。これらの3種類の分子疫学的解析法を比較した報告は無いため、本研究では肺 MAC 症由来 *M. avium* 臨床分離株 70 株を用いて、わが国で開発された MATR-VNTR 型別解析法の有用性を検討した。その結果、Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI)を用いた菌株鑑別能力において、IS1245-RFLP 型別解析法は 0.960、MIRU-VNTR 型別解析法は 0.949 であったのに対し、MATR-VNTR 型別解析法では 0.990 であり、MATR-VNTR 型別解析法の菌株鑑別能力が最も優れていたことを証明した。MATR-VNTR 型別解析法は、RFLP 型別解析法に比べて安価で、操作方法も簡便に行なえ、最も菌株鑑別能力が優れている。この結果から、現在、わが国において多施設で臨床データなどとともにデータベース化をすることにより、*M. avium* 感染症に対する感染経路の解明や罹患率が急増している原因の特定などの疫学調査に貢献している。今後、世界的に MATR-VNTR 型別解析法が普及することを期待している。

【第2章】 *Mycobacterium avium* complex の Clarithromycin耐性遺伝子迅速検出法の検討

CAMは、MAC症における薬剤感受性試験の結果とその臨床効果が相関する唯一の治療薬とされている。CAM耐性菌は、23S rRNA ドメインV領域にある2058 と 2059 番目のどちらかのアデニンに点変異が起ると報告されている。しかし、MAC症におけるCAMの薬剤感受性試験と薬剤耐性に関与する遺伝子変異との相関性について、これまで明確に確認されていなかった。そこで、NCCLS/CLSI標準法に準拠した微量液体希釈法を用いてMAC臨床分離株 245 株に対するCAMのMICの測定を行なった結果、感受性菌群 (219 株) と耐性菌群 (26 株) の2群に分かれた。また、23S rRNAドメインV領域のDNAシーケンス解析の結果、感受性菌では全ての検体で点変異が認められず野生型と判定された。一方、耐性菌では全ての検体で23S rRNAの点変異が確認されたことから、薬剤感受性試験と薬剤耐性遺伝子の変異には相関性があることを証明した。

さらには、遺伝子変異の検出法の一つである amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR法を応用し、CAM耐性遺伝子迅速検出法を開発し、有用性の検討を行なった。その結果、感受性菌は、全ての検体で野生型 (特異度 100 %) と判定された。耐性菌は、26 株中 22 株が変異型 (感度 84.6 %)、3株が混在型、1株が野生型であった。混在型も耐性として判定した場合には、感度 96.2 % (25/26) まで向上した。MAC症における薬剤感受性の判定は、これまで薬剤感受性試験のみであったが、ARMS-PCR法を用いた耐性遺伝子

迅速検出法は、感度・特異度が高く、通常 2 週間以上かかる薬剤感受性試験より約 1 日という早期に薬剤耐性の有無が判定できるだけでなく、感受性菌と耐性菌の混在型検体も迅速に検出することが可能であるため、臨床上有益な検査法であることを明らかにした。

【第3章】 Line Probe AssayによるRifampicin耐性遺伝子検査の有用性

肺結核症と確定診断された患者喀痰 110 検体を用いて、早期に結核における RFP 耐性の有無を検出できる Line Probe Assay (LiPA) を用いた RFP 耐性遺伝子検査と塗抹検査における陽性度との相関性を検討した。塗抹陽性検体は、73 検体中 69 検体で LiPA 陽性であった (感度 94.5 %)。塗抹陰性検体は、37 検体中 25 検体で LiPA 陽性であった (感度 67.6 %)。また、培養陰性検体や培養が困難な検体でも、半数以上の検体で LiPA 陽性となった。培養陽性となった 76 検体を薬剤感受性試験と比較したところ、RFP 感受性株はすべての検体で野生型を示したのに対し、RFP 耐性株は 8 検体中 6 検体で変異型を示した。本検査法は、これまでの薬剤感受性試験とは全く異なる薬剤耐性遺伝子の検出をする検査法であるため、本検査法を実施している施設が少なく、信頼性の評価が十分ではなく、一般に普及していなかった。今回の検討により、①塗抹検査の陽性度が LiPA による RFP 耐性遺伝子の検出を決定する要因の一つになることや、②従来の薬剤感受性試験で測定することが出来ない培養陰性検体や培養が困難な検体についても検出可能であること、③薬剤感受性試験との相関性が高い検査法であることを証明し、本検査法は、臨床上有益な検査法であることを明らかにした。本検査法は、新規入院患者における多剤耐性結核のスクリーニング、既入院中患者での早期に耐性の判定が必要な時、さらに培養が困難であった場合などに有用である。

【第4章】 初回肺結核治療中において短期間に多剤耐性化した結核菌の遺伝子解析

初回肺結核治療中に短期間に多剤耐性結核となった患者由来の菌株の多剤耐性化前後において、薬剤感受性試験および菌遺伝子解析 (薬剤耐性遺伝子、スポリゴタイピング、VNTR 型別解析、一塩基多型) を実施し、臨床的背景と併せて耐性化の原因を検討した。薬剤感受性試験の結果、INH と RFP に対して、多剤耐性化前後で感受性から耐性に変化した。結核菌の遺伝子解析の結果、多剤耐性化前後での違いは、RFP 耐性に関与する遺伝子のみであった。一方、INH 耐性遺伝子については、今回検討した全ての領域で変異は認められず、別の遺伝子領域に変異があると考えられた。スポリゴタイピングの結果、薬剤耐性との関連が高いことが示唆されている北京型株であることが明らかになった。VNTR 型別解析や一塩基多型の解析により、再感染やポリクローナル感染ではなく、北京型株の中でも耐性化が起こりやすい遺伝子系統 (B1・ST3 サブグループ) に含まれていた。患者は、合併症として 2 型糖尿病で血糖コントロール不良の状態であり、耐性化が起こりやすい宿主であった。結核における多剤耐性化は、適切な薬剤管理がなされずに患者側の不規則な服用や医療従事者側の不適切な治療によって引き起こされるため、統計的に再治療が必要な患者で耐性結核と診断されるまでに長期間 (中央値 30.9 ヶ月) 要すると報告されている。しかし、本症例は、初回肺結核治療中の短期間 (5.1 ヶ月) によるものであり、その原因として宿主側と菌側の両方に耐性化の要因があったため、多剤耐性結核になったことを明らかに

した。今後、RFP 耐性遺伝子迅速検出法を積極的に使用して、糖尿病患者など多剤耐性化のリスクが高い患者について定期的に薬剤耐性化をモニタリングすることや VNTR 型別解析法と一塩基多型の解析が多剤耐性結核の発現抑制に大きく貢献できると考えられた。また、これまでの報告では宿主側や菌側のみの耐性化要因の解析だけがなされており、本研究により患者の臨床的背景と菌遺伝子解析を併せて検討することが必要不可欠であることを明らかにした。

【総括】

1. MATR-VNTR 型別解析法は、*M. avium* における最も優れた分子疫学的解析法であることを証明した。現在、感染経路や罹患率が急増している原因の特定などの疫学調査に貢献している。

2. MAC 症治療における CAM の薬剤感受性試験と薬剤耐性遺伝子の変異との相関性を証明した。さらに、ARMS-PCR 法を用いた耐性遺伝子迅速検出法は、従来の薬剤感受性試験とは異なる視点からの臨床上有用な検査法であり、有用な薬剤が少ない肺 MAC 症の治療の一助となっている。

3. 結核における RFP 耐性遺伝子検査は、信頼性のある検査法であることを実証し、多剤耐性結核の蔓延を早期に防止するうえで必要不可欠な検査法であることを明らかにした。

4. 短期間に多剤耐性化した結核の要因は、菌遺伝子解析により北京型株の中でも耐性化が起こりやすい遺伝子系統であり、さらに宿主側においても耐性化のリスクが高い患者であったことを明らかにした。本研究により臨床的背景と菌遺伝子解析を併せて検討することが、多剤耐性結核の発現抑制に必要不可欠であることを立証した。

論文審査の結果の要旨

非結核性抗酸菌による疾患の感染経路は特定されておらず、ヒトからヒトへの感染は否定的であり、有効な薬剤が少ない難治性疾患である。一方、本邦における結核患者数は低開発国並で推移しており、多剤耐性結核菌が大きな社会問題となっている。本論文は、これらの問題を解決すべく次の4項目の研究を行いまとめたものである。1. 難治性の肺 *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex (MAC) 症における分子疫学的解析法の有用性と 2. Clarithromycin (CAM) 耐性遺伝子迅速検出法の検討。3. 多剤耐性結核の Rifampicin (RFP) 耐性遺伝子検査の有用性と 4. 短期間に多剤耐性化した結核菌の遺伝子解析に関する研究。以下に要約する。

1. *M. avium* について、抗酸菌の特定に用いられている各種分子疫学的解析法について有用性の比較検討をした。MATR-VNTR 型別解析法は、世界標準法等と比較して、最も優れた分子疫学的解析法であることを証明した。現在、感染経路や罹患率が急増している原因の特定などの疫学研究に大いに貢献している。2. MAC 症において、これまで確認されていなかった CAM の薬剤感受性試験と薬剤耐性に関与する遺伝子変異との相関性を証明した。CAM 耐性遺伝子迅速検出法を開発し、従来の薬剤感受性試験とは異なる視点からの臨床上有用な検査法であることを明らかにした。現在、有用な薬剤が少ない肺 MAC 症の治療の一助となっている。3. 結核における RFP 耐性遺伝子検査は、従来の薬剤感受性試験で測定することが出来ない培養が困難な検体等についても検出可能であること、薬剤感受性試験との相関性が高く、信頼性のある検査法であることを実証し、多剤耐性結核の蔓延を早期に防止するうえで必要不可欠な検査法であることを明らかにした。4. 初回肺結核治療中の短期間に多剤耐性結核になった症例について、多剤耐性化した要因は、菌遺伝子解析により耐性化が起こりやすい遺伝子系統であり、さらに宿主側においても耐性化のリスクが高い患者であったことを明らかにした。本研究により臨床的背景と菌遺伝子解析を併せて検討することが、多剤耐性結核の発現抑制に必要不可欠であることを立証した。以上述べたように、本論文は学位論文としての条件を備えていると評価できる。従って、学位を授与することを妥当なものと判断する。

