

薬剤耐性結核菌の全ゲノムを用いた分子疫学解析 (第一報)

微生物部

水越 文徳 船渡川 圭次 桐谷 礼子
前 国立病院機構 東京病院

小林 信之

順天堂大学医学部 微生物学講座

切替 富美子 切替 照雄

要旨

日本において結核は未だに罹患率が高く、依然として中蔓延国とされている。投薬により治療は可能であるが、薬剤耐性の結核菌 (MTB) の出現リスクもあり、それによって治療効率が低下し、患者の予後が不良となる。特に、多剤耐性 (MDR) MTB、超多剤耐性 (XDR) MTB の出現は、公衆衛生及び臨床上で重大な問題となっている。本研究では、全国で分離された薬剤耐性 MTB の全ゲノム情報を解読し、患者の性別・国籍・年齢や薬剤耐性パターンと併せて、菌株の遺伝子系統について解析した。解析した 254 株は 5 つの Lineage に属し、日本人と外国籍の患者由来 MTB はそれぞれ異なる分布となった。イソニアジド (INH) 耐性 MTB は 188 株、リファンピシン (RFP) 耐性 MTB は 12 株、INH と RFP に耐性を示す MDR- MTB は 54 株だった。MDR-MTB のうち、他の主要薬剤にも耐性がある XDR-MTB は 9 株で、全ての株が日本人患者由来だった。

キーワード: 結核菌、薬剤耐性、多剤耐性、超多剤耐性、全ゲノム

1 はじめに

世界保健機関 (World Health Organization; WHO) によると、2017 年では約 1000 万人が新たに結核を発症し、130 万人が結核で死亡した。このように、結核は世界中で猛威を振るい、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¹⁾。日本においても厚生労働省によると、2017 年の日本の結核罹患率 (人口 10 万人対の新登録結核患者数) は、13.3 人である²⁾。この結核罹患率は米国 (2016 年; 2.7 人) の 4.9 倍、カナダ (2016 年; 4.8 人) の 2.8 倍であり、他の先進国と比較すると日本は極めて高い値である²⁾。さらに、日本における外国出生者の新登録結核患者数は 1530 人で、2012 年に千人を超えてから増加傾向が続いている²⁾。

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が、薬剤耐性菌の出現のリスクがある。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; RFP) が効かない多剤耐性 (multidrug-resistant; MDR) 結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*; MTB)、加えてフルオロキノロン系又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 の出現は、公衆衛生、臨床上で重大な問題となっている。日本においても、新規に登録された結核患者から分離された MTB において、INH 耐性が 4.9%、RFP 耐性が 1.1%、INH と RFP の両方に耐性である MDR が 0.7% である²⁾。

しかしながら、国内における結核菌を対象とした全ゲノムの大規模な分子疫学解析は、これまで殆ど報告されていない。そこで、結核に関する将来的な医療対策や疫学研究の基盤を構築することを目的とし、全国で分離された薬剤耐性 MTB の全ゲノムを解析し、患者の性別・国

籍・年齢や薬剤耐性パターンと併せて、菌株の遺伝子系統について解析した。

2 材料と方法

2.1 材料

2015 年 4 月から 2017 年 3 月に全国の国立病院機構の病院で分離された薬剤耐性 MTB について、次世代型シーケンサーで全ゲノムが解読できた 254 株を対象とした (表 1)。

2.2 方法

薬剤感受性テストは、ウェルパック S 培地 (日本ビーシー製造株式会社) を用いて実施した。また、DNA の抽出、次世代型シーケンサーによる全ゲノム解読は、以前の報告と同様の方法で行った³⁾。

患者の性別、国籍、年齢などの情報と併せて、薬剤感受性と全ゲノムデータを解析した。菌株のタイピング (Lineage 解析、北京型) は、全ゲノムの情報を用いて

表 1 検体数

	株数	日本人患者 由来株	外国籍患者 由来株
Total	254	202	52
北海道	9	8	1
東北	2	2	0
関東	122	94	28
中部	32	23	9
関西	41	39	2
中国	14	8	6
四国	6	3	3
九州	28	25	3

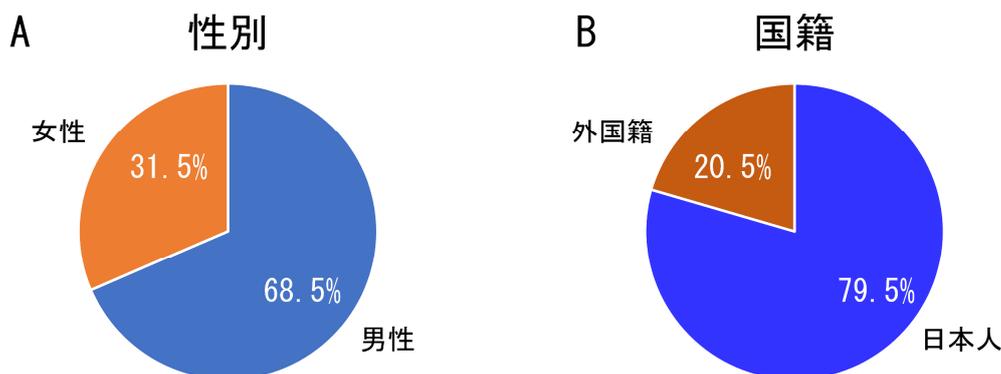


図1 薬剤耐性MTBが分離された患者の性別・国籍

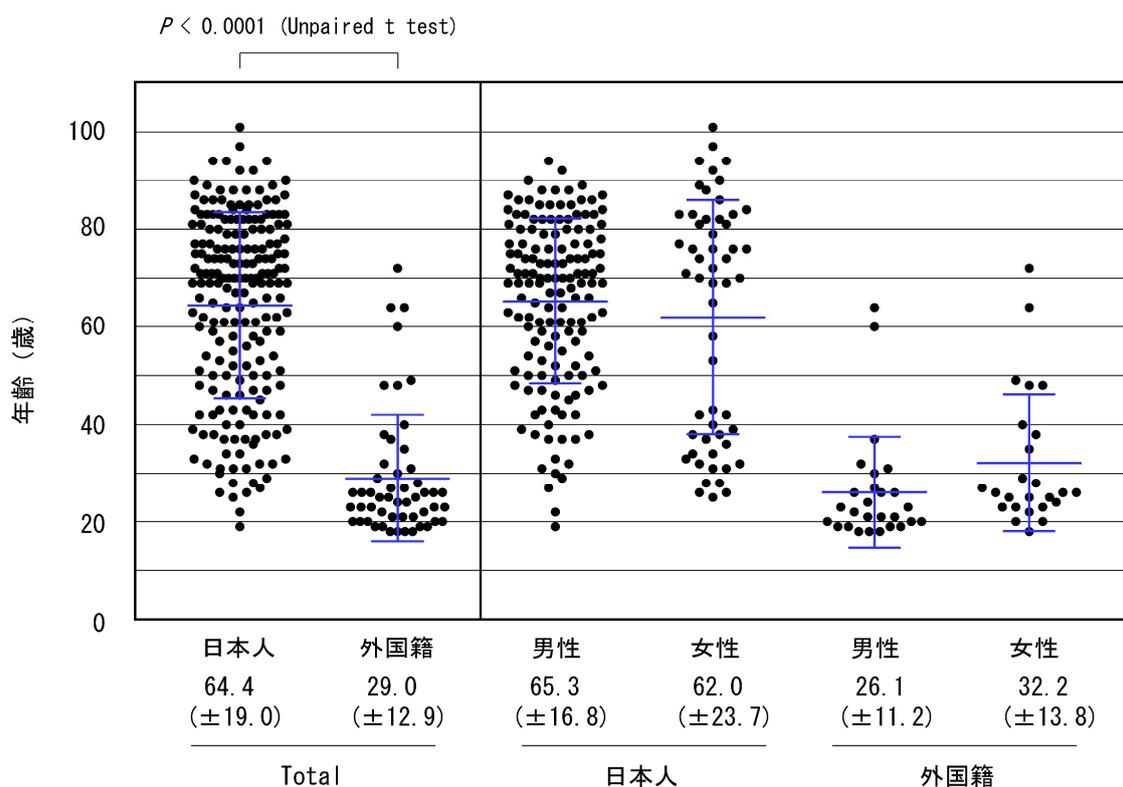


図2 薬剤耐性MTBが分離された患者の年齢比較

オンライン解析システム Mycobacterium tuberculosis complex (CASTB)で実施した^{4,5)}。CASTBより254株のSNPコンカテマーを取得し、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)、FigTree v1.4.0. softwareを用いて近隣結合法 (neighbor-joining methods; NJ法)による系統樹を構築した^{6,7)}。

統計的な解析は、患者年齢ではMTBの採取時の年齢を基に、Unpaired t test、一元配置分散分析 (One-way ANOVA)を用いて比較した。また、薬剤耐性パターンと治療歴・国籍の比較は、Fisher's exact testを用いた。

3 結果

3.1 薬剤耐性MTBの疫学解析

薬剤耐性MTB 254株が分離された患者の疫学的特徴について解析を実施した。患者の性別は、男性が174人

(68.5%)、女性が80人(31.5%)だった。(男女比2.175)(図1A)。日本人患者由来のMTBは202株(79.5%)、外国籍患者由来のMTBは52株(20.5%)だった(図1B)。それらの外国籍の内訳は、中国(18人)、ベトナム(12人)、フィリピン(10名)、ミャンマー(3名)、インドネシア(2名)、ネパール(2名)、モンゴル(2名)、インド(1名)、韓国(1名)、ペルー(1名)であった。

対象となった254人の患者年齢の平均は 57.2 ± 22.9 歳(範囲;18-101歳)で、国籍別では日本人(64.4 ± 19.0 歳)に比べて、外国籍の患者(29.0 ± 12.9 歳)は有意に若かった(Unpaired t test; $P < 0.0001$)(図2)。男女別の年齢で比較しても有意差はなかったが(One-way ANOVA)、日本人の女性の年齢分布において二峰性の特徴を示した(図2)。

INH耐性	188
RFP耐性	12
MDR (XDRを除く)	45
XDR	9

日本人 (粹なし)
外国人籍 (粹あり)

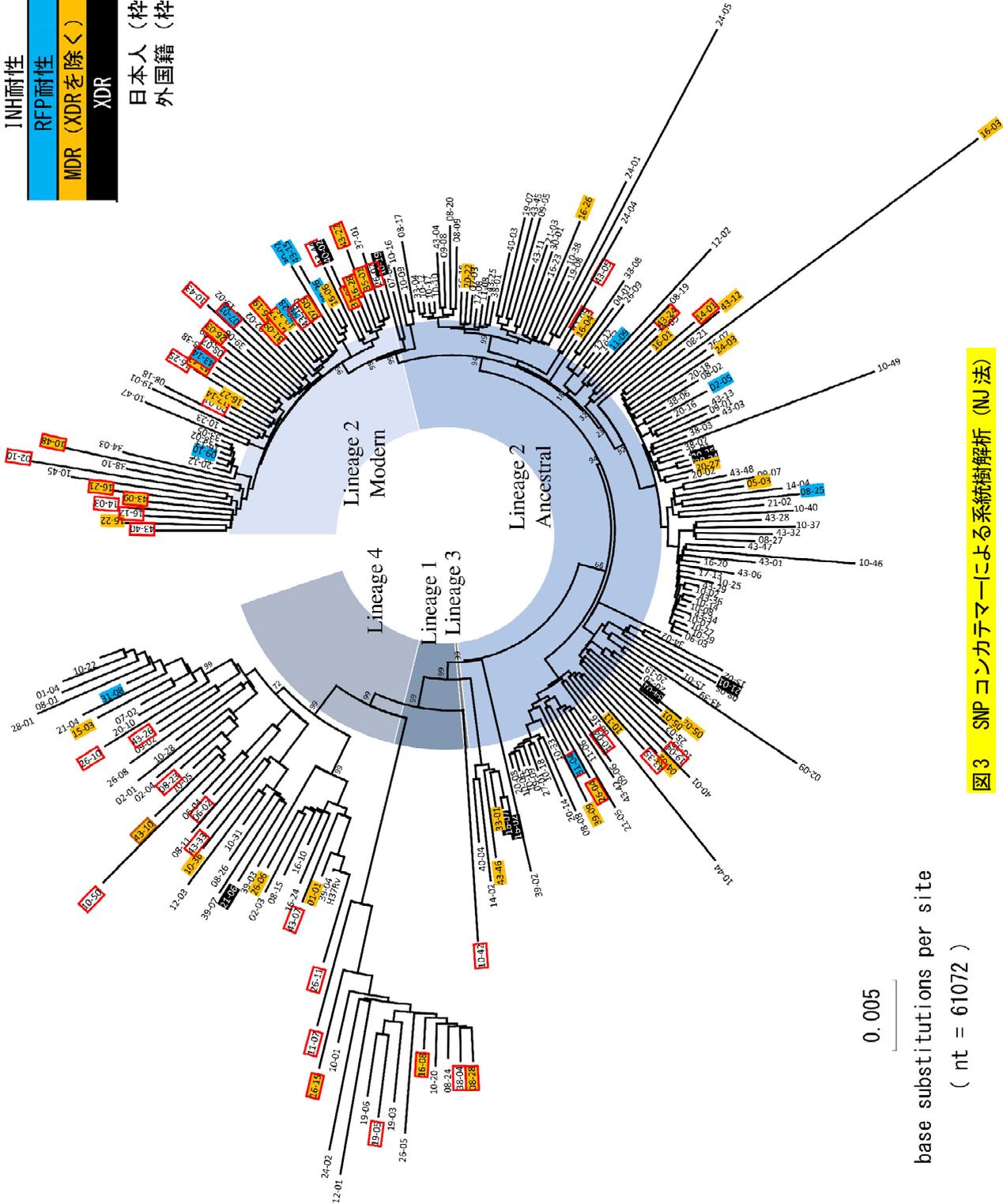


図3 SNPコンカテマーによる系統樹解析 (NJ法)

表2 Lineage 及び北京型の分布と薬剤耐性パターン

Lineage (北京型)	Lineage 1	Lineage 2 Ancestral	Lineage 2 Modern	Lineage 3	Lineage 4	Total
Sub-total	14 (6)	143 (9)	56 (27)	1 (1)	40 (9)	254 (52)
INH 耐性	11 (3)	113 (5)	30 (12)	1 (1)	33 (8)	188 (29)
RFP 耐性	0	4 (1)	7 (2)	0	1 (0)	12 (3)
MDR (XDR を除く MDR)	3 (3)	19 (3)	18 (13)	0	5 (1)	45 (20)
XDR	0	7 (0)	1 (0)	0	1 (0)	9 (0)

() の中は外国籍患者由来 MTB の株数を示す。

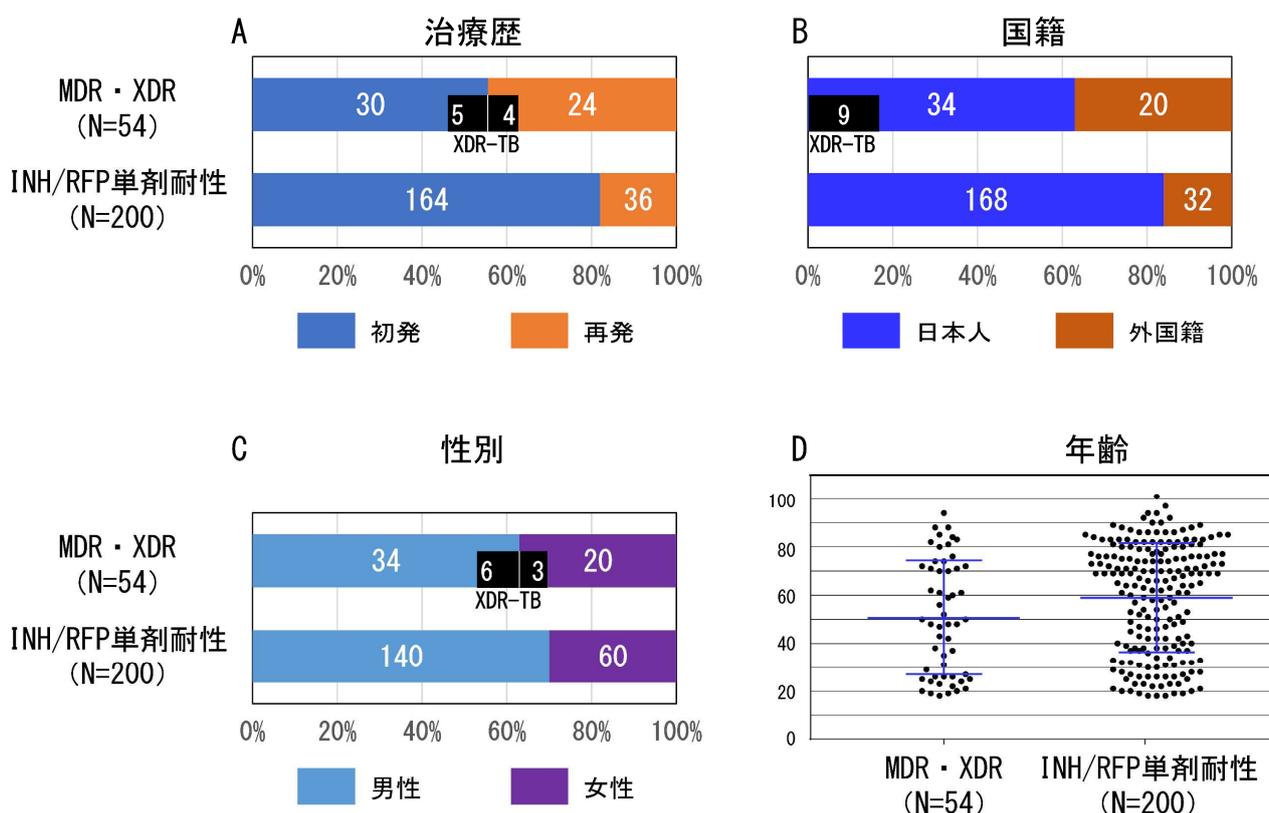


図4 MDR-MTB 感染患者と INH もしくは RFP 耐性 MTB 感染患者の比較

3.2 Lineage 分類と系統樹解析

解析した 254 株は 5 つの Lineage に属していた (図 3、表 2)。本邦の主流である Lineage 2 Ancestral 型が 143 株と最も多く、その殆どが日本人患者由来 MTB (134/143 ; 93.7%) だった。一方、東アジアで流行している Lineage 2 Modern 型は外国籍患者由来 MTB が半数を占め (27/56 ; 48.2%)、中国、ベトナム国籍が多かった。また、Lineage 1 型はフィリピン、Lineage 4 型は中国、フィリピン国籍が多かった。系統樹解析の結果では、MDR や特定の薬剤耐性株等が集中するクラスターは認められなかった。

3.3 薬剤耐性パターンによる疫学的及び臨床的特徴

INH 耐性 MTB は 188 株、RFP 耐性 MTB は 12 株、MDR-MTB は 54 株だった (表 2)。MDR-MTB のうち、XDR-MTB は 9 株で、全て日本人患者由来の株だった。また、MDR-MTB の 20 株が外国籍患者から分離され、それらの内訳は、中国

(6 人)、フィリピン (4 名)、ベトナム (3 人)、ミャンマー (3 名)、モンゴル (2 名)、インドネシア (1 名)、ネパール (1 名) であった。

XDR を含む MDR-MTB 感染患者 (n=54) と INH 又は RFP の単剤耐性 MTB 感染患者 (n=200) の特徴を比較した (図 4)。初発・再発を比較すると有意差が認められ、単剤耐性 MTB 感染患者に比べて、MDR-MTB 感染患者は再発が多かった (Fisher's exact test ; $p < 0.001$) (図 4A)。9 株の XDR-MTB のうち、5 株が初発の患者から分離された。また、外国籍患者由来の MTB は、単剤耐性 MTB では 16.0% (32/200) だったのに対して、MDR-MTB (20/54) では 37.0% と有意に多かった (Fisher's exact test ; $p = 0.0019$) (図 4B)。

性別 (男性の割合) では、MDR-MTB 感染患者が 63.0% (34/54)、単剤耐性 MTB 感染患者が 70.0% (140/200) で有意差は認められなかった (Unpaired t test ; $p = 0.0193$)

(図 4C)。年齢については、MDR-MTB 感染患者が 50.7±23.4 歳、単剤耐性 MTB 感染患者が 58.9±22.5 歳で有意差はなかった (Fisher's exact test ; $p=0.327$) (図 4D)。

4 考察

WHO の報告では、世界的にも INH 耐性 (FRP 感受性) MTB は 7.1% の新規感染者、7.9% の再発患者から分離され、さらに MDR を含む RFP 耐性 MTB は 3.5% の新規患者、18% の再発患者から分離されている¹⁾。MDR-MTB は世界的にも増加傾向にあり、その分布は拡散している⁸⁾。本研究では、外国籍患者由来 MTB について、INH もしくは RFP 単剤耐性 MTB の割合では 16.0% だったが、MDR-MTB では 37.0% と有意に多かった。これらの MDR-MTB が分離された患者の国籍は、東アジア、東南アジアであり、MDR-MTB が多く分離される地域でもある⁸⁾。中国、北京の調査では、分離された MTB のうち INH 耐性は約 17%、RFP 耐性は約 10%、さらに MDR は 9% であった⁹⁾。MDR-MTB の分離率について、フィリピンでは新規感染者は 2.6%、再発は 28%、ベトナムでは新規感染者は 4.1%、再発は 17%、と報告されており¹⁾、いずれの地域も日本より薬剤耐性 MTB の比率は高い。また、MDR-MTB が多い国からの移民によって、MDR-MTB がヨーロッパなどの世界各地で増加している可能性が報告されている^{10,11)}。グローバル化により海外由来株が日本の結核菌の Lineage 分布に影響を与えていることもあり^{3,12)}、海外から流入する株を監視していくことが重要である。

本研究の結果でも、MDR-MTB は再発した患者から分離される確率が高く、再発した場合の投薬には十分な注意が必要である。確立されている結核治療は 6 か月以上も要し、他の感染症と比べて治療期間が長い。そのため適切な投薬を行わないと耐性菌の出現のリスクが非常に高くなる。したがって、過去に結核の既往歴がある患者の治療においては、薬剤感受性試験の結果を十分に留意しなくてはならない。

XDR-MTB の 9 株全てが日本人患者から分離された。日本では、近年、ベダキリンが新たに抗結核薬として位置づけられ、日本で結核の治療に用いられている薬剤の種類は多い^{13,14)}。日本において多様化した抗結核薬の投与が薬剤耐性 MTB の出現パターンに影響を与える可能性が示唆される。また、9 株のうち 5 株が初発の患者から分離され、日本人の間で XDR-MTB が伝搬している可能性が考えられる。XDR-MTB の感染性などについては不明ではあるが、薬剤の選択圧から逃れることから感受性 MTB よりも拡散しやすい可能性もある。したがって、XDR-MTB 感染源・感染経路を解明し、それを断つことが重要である。

薬剤耐性 MTB について、日本人と外国籍の患者由来株では疫学的、臨床的に異なる特徴を示した。また、日本における薬剤の多様性は、XDR-MTB の出現に影響してい

る可能性も懸念される。今後、国内の薬剤耐性 MTB の疫学や臨床治療 (薬剤耐性など) の対策や制圧に有用性が高い情報を還元するために、全ゲノム情報を基に薬剤耐性遺伝子を詳細に解析し、性状や分子疫学的特徴を明らかにする予定である。

5 参考文献

- 1) World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2018. Global tuberculosis report 2018, 2018. (Available from: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
- 2) 厚生労働省、東京、日本、平成 29 年結核登録者情報調査年報集計結果、2018. (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00001.html)
- 3) Mizukoshi F, Miyoshi-Akiyama T, Iwai H, Suzuki T, Kiritani R, Kirikae T, Funatogawa K. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from Tochigi prefecture, a local region of Japan, BMC Infect Dis, 25;17(1):365, 2017.
- 4) The comprehensive analysis server for the Mycobacterium tuberculosis complex (CASTB) (<http://castb.ri.ncgm.go.jp/CASTB/>)
- 5) Iwai H, Kato-Miyazawa M, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T, CASTB (the comprehensive analysis server for the Mycobacterium tuberculosis complex): A publicly accessible web server for epidemiological analyses, drug-resistance prediction and phylogenetic comparison of clinical isolates, Tuberculosis (Edinb) 95, 843-844, 2015.
- 6) Kumar S, Stecher G, Tamura K, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, Mol Biol Evol, 33, 1870-1874, 2016.
- 7) Rambaut A, FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees, University of Edinburgh, (Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)
- 8) Lange C, Chesov D, Heyckendorf J, Leung CC, Udwadia Z, Dheda K, Drug-resistant tuberculosis: An update on disease burden, diagnosis and treatment, Respirology, 23, 656-673, 2018.
- 9) Liu Y, Zhang X, Zhang Y, Sun Y, Yao C, Wang W, Li C, Characterization of Mycobacterium tuberculosis strains in Beijing, China: drug susceptibility phenotypes and Beijing genotype family transmission, BMC Infect Dis, 14;18(1):658, 2018.
- 10) van der Werf MJ, Hollo V, Ködmön C, Multidrug-resistant tuberculosis and migration to Europe. Clin Microbiol Infect, 23, 578-579, 2017.
- 11) Lönnroth K, Mor Z, Erkers C, Bruchfeld J,

- Nathavitharana RR, van der Werf MJ, Lange C, Tuberculosis in migrants in low-incidence countries: epidemiology and intervention entry points, *Int J Tuberc Lung Dis*, 21, 624-637, 2017.
- 12) Kato-Miyazawa M, Miyoshi-Akiyama T, Kanno Y, Takasaki J, Kirikae T, Kobayashi N, Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from foreign-born and Japan-born residents in Tokyo, *Clin Microbiol Infect*, 21(3):248. e1-8, 2015.
- 13) 厚生労働省、東京、健感発 0418 第 1 号、「結核医療の基準」の一部改正について、平成 30 年 4 月 18 日、2018.
- 14) 日本結核病学会、結核診療ガイド、V 章 結核の治療、東京、南江堂、87-107、2018.