

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

抗酸菌の omni log に関する研究

研究分担者 松本 智成（大阪府結核予防会大阪病院・診断検査部・部長）
研究協力者 飯沼 由嗣（金沢医科大学・臨床感染症学講座・教授）
研究協力者 鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所・生物学部細菌研究室・主任研究員）
研究協力者 星野 仁彦（国立感染症研究所・ハンセン氏病研究センター・感染制御部・室長）

研究要旨

この研究では、最終的には結核菌遺伝子上の遺伝子群パターンの有無で菌の性質を類推するタイピング法の開発を目的とした。

はじめに、より簡便に既存の型別法を簡便に行なうことを目標として結核菌の VNTR 法の簡便化を図った。本 VNTR ラダーマーカを用いた同定方法は熟練を要さずより正確な結核菌の型判別が行なえることを明らかにした。この方法は MRSA-POT 法や後述する結核菌 SGIP 法にも理論的に応用可能である。

次に、実際に MRSA-POT 法の型別は MRSA の性質を反映しているかを検討する目的で、既存の遺伝子タイピング法であり機能遺伝子の有無でタイピングする MRSA-POT 法の結果と細菌の機能で分類する omni log 法での結果を比較した。市中感染型の代表として USA300 を 1 株、POT 法で POT1 値が 106 である菌株を 4 株、院内感染型の代表として POT1 値が 93 である 4 株をそれぞれ omni log にて解析した。その結果市中感染株は、院内感染株に対して亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムに対して抵抗性があることが明らかにした。このことにより Small Genomic Island (SGI) の有無で判定する POT 表現法が細菌の表現系と相関している可能性をしめした。

これらを結核菌に応用する目的で結核菌の遺伝子上の機能を有すると推測される結核菌遺伝子群のパターン (small genomic island pattern) による新規解析法 (TB-SGIP 法；つまり結核菌版の POT 法) を開発した。今後 TB-SGIP 法の結果と omni log 法の比較検討を行う予定である。

A. 研究目的

結核菌の型別は、形態、生化学性状、遺伝子の差異によって分類される。現在は、遺伝子による型別が主流であり IS6110 RFLP、スポリゴタイピング、VNTR 解析、SNP 解析、whole genome 解析が用いられるがこれらの解析にて得られた結果からは結核菌の性状を推測する事は理論上不可能である。結核菌には北京株など感染力が強いと言われている株が存在し、株による特徴が推測出来る分子疫学解析法が求められる。既存の遺伝子型別法において機能を反映すると推測される方

法として Small Genomic Island (SGI) の有無で型別する方法が候補にあがり MRSA における POT 法が含まれる。しかしながら POT パターンにより機能が類推できるかは知られていない。我々は、まずは POT 法がよく使用される MRSA 株において市中感染型の代表として USA300 株 1 株、POT 法で POT1 値が 106 である 4 株、院内感染型の代表として POT1 値が 93 である 4 株をそれぞれ omni log にて解析し POT 法により性質の差を反映できるのかを比較した。

次に、遺伝子型別法は、感染源の追跡調査や感染防止策を検討する上で重要であるが型別判定を正確に行なう必要がある。今回、

より簡便に結核菌の VNTR 法による型判別を行なう目的で、キャピラリー電気泳動装置を使用して特定の VNTR loci において、今まで検出できた全ての反復数における DNA 断片を 1 つにプールした VNTR ラダーマーカーを作成し VNTR ラダーマーカー測定の有効性の検討を行った。

最後に、MRSA-POT法に相当する結核菌遺伝子上のSGIパターンの有無による新規結核菌分子疫学解析法 Small genomic island pattern (SGIP)による解析法開発を目的とした。

B. 研究方法

DNA ラダーマーカーを用いた同定方法の開発

Supply 's 15-MIRU において、反復数が同定済みの結核菌ゲノム DNA は反復数を再確認後、各反復数の PCR 産物を混合して Supply 's 15-MIRU の領域ごとの VNTR ラダーマーカーを作成し、QIAxcel Advanced System 付属の ScreenGel Software に登録した。130 株の結核菌分離株 DNA の各領域における PCR 産物を QIAxcel Advanced System で測定し、VNTR ラダーマーカーと直接比較を行ない、各結核菌株の VNTR 反復数を決定した。また、現在使用している i-chip SV1210(日立化成株式会社)より検出された遺伝子型別を QIAxcel Advanced System で得られた遺伝子型別と比較した。

MRSA-POT と omni log 法の比較

市中感染型の代表として USA300 株 1 株、POT 法で POT1 値が 106 である 4 株、院内感染型の代表として POT1 値が 93 である 4 株をそれぞれ omni log にて解析した。

新規結核菌遺伝子型別解析 ; TB-SGIP の開発

結核菌遺伝子配列から代表的な結核菌菌株で遺伝子群の保有の有無の差がある small genomic island (SGI) を選び出しその SGI 有無を PCR にて解析し VNTR 、スポリゴタイピング、IS6110 RFLP と比較した。

倫理面への配慮

検体の扱いには個人情報漏れないように配慮した。

C. 研究結果

DNA ラダーマーカーを用いた同定方法の開発

QIAxcel Advanced System で同定された各領域の反復数は、i-chip SV1210 で得られたそれらと比較検討した結果、高い相関を示した。また、QIAxcel Advanced System を用いた VNTR の反復数の同定は、従来の分子量マーカーを用いて PCR 産物の鎖長の推定を行なう方法と同等またはそれ以上の精度を持つことがわかった。

MRSA-POT と omni log 法の比較

市中感染型の代表として USA300 株 1 株、POT 法で POT1 値が 106 である 4 株、院内感染型の代表として POT1 値が 93 である 4 株をそれぞれ omni log にて解析した結果、市中感染株は、院内感染株に対して亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムに対して抵抗性があることが明らかとなった。

また、上記を検証するために培地に亜硝酸ナトリウムおよび安息香酸ナトリウムを加え市中感染型と院内感染型の MRSA の各薬剤への抵抗性を検証したが同様の結果が得られた。

新規結核菌遺伝子型別解析 ; TB-SGIP の開発

結核菌 43 株を用いた SGIP による解析はスポリゴタイピングとほぼ同程度の解像度が得られ、特に北京株と T3-Osaka 株の検出に有用であった。また、VNTR からえら得た minimum spanning tree と SGIP を比較した結果、ほぼ同等の結果が得られ SGIP による解析は結核菌の進化様式を表す可能性があることが明らかになった。

D. 考察

我々の研究にて化粧品等の防腐剤として使用される亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムに抵抗性があることより外用剤に使用される亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムの使用が市中感染型 MRSA のリスクと関連する可能性が明らかとなった。さらに今回の研究により Small Genomic Island の有無で判定する POT 表現法が細菌の機能と関連している可能性が示唆され、今後 small genomic island 上の遺伝子の性質が判明すれば MRSA-POT 表記と表現系の関係が明らかになる可能性がある。

結核菌は北京株など感染力が強いと言われて

いる株が存在し、株による特徴が推測出来る解析法が求められる。Small genomic islandには機能を有するであろう遺伝子が含まれ、patternの有無を調べることで、それらに含まれる遺伝子の有無がわかる。将来的にはその有無で結核菌の株間の機能の差異が推測出来る可能性がある。今後、今回開発したTB-SGIP法とomni-log法を比較していき仮説を検証する予定である。

また我々は、VNTRラダーマーカーを用いた同定方法は熟練を要さずより正確な結核菌の型判別が行なえることを明らかにしたが、この方法は結核菌に対するSGIP法やMRSAに対するPOT法に対して応用可能である。

E. 結論

今回の我々の研究から遺伝子上のsmall genomic island patternによる解析法の一つであるMRSA-POT法が菌の性質を示すことより、今後small genomic island上の遺伝子の性質が判明すればMRSA-POT表記と表現系の関係が明らかになる可能性がある。また同時に、我々はMRSA-POTの結核菌版である結核菌のsmall genomic island patternによる新しい分子型別法TB-SGIPを開発した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Tomoshige Matsumoto, Masahiro Suzuki, Yoshitsugu Inuma, Shinji Maeda, Hiromi Ano, Yuriko Koshii, Tomomi Murakawa, Koichi Suzuki and Yoshihiko Hoshino **A Molecular Typing Methodology of *Mycobacterium tuberculosis* using Small Genomic Islet Patterns (TB-SGIP): A Novel Genotyping Methodology to Discriminate Clinical Strains between Beijing Family and T3-OSAKA** *Journal of Infectious Diseases and Therapeutics*, 2014, 2 pp35-45
- 2). Tomoshige Matsumoto, **Incidence of Influenza after Vaccination in Southeast Osaka, Japan** *Journal of Infectious Diseases and Therapeutics*, 2014, 2, 5-11
- 3). Tomoshige Matsumoto, Masako Ohno, and Junichi Azuma **Future of**

pharmacogenetics-based therapy for tuberculosis *Pharmacogenomics* 15(5) 1-7, 2014

4). Tomoshige Matsumoto, Yukio Hirayama, Yuka Hisamitsu, Megumi Fukumura, Akemi Hirata, Kumi Tanaka, Masashi Kurokawa, Yoshitaka Tamura, Hisakko Yoshida, Koichi Suzuki, Takayuki Nagai, Ichiro Kawase, Yoshihiko Hoshino **Simultaneous and Longitudinal Comparison of Interferon Gamma Release Assays Among Health Care Workers in Japan** *Journal of Mycobacterial Diseases*. 11/2013; 3:134.

5). Tomoshige Matsumoto, Yuriko Koshii, Kazu Sakane, Tomomi Murakawa, Yukio Hirayama, Hisako Yoshida, Masashi Kurokawa, Yoshitaka Tamura, Takayuki Nagai, Ichiro Kawase **A novel approach to automated genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a panel of 15 MIRU VNTRs.** *Journal of microbiological methods* 04/2013

6). Tomoshige Matsumoto, Hideo Ogata, Emiko Toyota, Katsuhiro Suzuki, Takefumi Saito, Akira Fujita, Toshinori Suetake, Kinuyo Chikamatsu, Kazue Mizuno, Satoshi Mitarai **Clinical evaluation of a line probe assay kit for the identification of mycobacterium species and detection of drug-resistant mycobacterium tuberculosis** *Kekkaku: [Tuberculosis]* 03/2013; 88(3):291-296.

2. 学会発表

- 1) 1) 松本智成、平山 幸雄、白山 敬之、岡藤 浩平、板東 千昌、久光 由香、福村 恵、平田 明美、田中 久美、黒川 雅史、田村 嘉孝、永井 崇之、太田 三徳、川瀬 一郎
「当センター同一職員 120 名検体における QFT2G と 3G の比較」第 87 回実験結核研究会 広島国際会議場・広島 2012/5/92)
- 2) 松本智成「当センター職員同一血液検体における QFT2G と 3G との比較試験、および 5 年前の QFT2G 結果との比較検討」第 2 回結核診断研究会 広島国際会議場・広島 2012/5/9

- 3) 黒川 雅史、田村 嘉孝、韓 由紀、松本 智成、永井 崇之、川瀬 一郎「当院における結核菌薬剤耐性率の推移について」 第 87 回日本結核病学会総会 広島国際会議場・広島 2012/5/10
- 4) 松本 智成「結核合併関節リウマチ患者 12 名に対する抗 TNF 製剤投与の安全性と有効性：続報」 第 87 回日本結核病学会総会 広島国際会議場・広島 2012/5/10
- 5) 永井 崇之、黒川 雅史、田村 嘉孝、韓 由紀、松本 智成、川瀬 一郎「当院における多剤耐性肺結核 89 例の治療成績」 第 87 回日本結核病学会総会 広島国際会議場・広島 2012/5/11
- 6) 松本智成 第 25 回日本臨床微生物学会総会 ベーシックレクチャー「多剤耐性菌の分子疫学解析」平成 26 年 2 月 2 日 名古屋国際会議場 名古屋
- 7) 松本智成、永井崇之、田村義孝、黒川雅史、川瀬一郎、藤井隆、相良憲幸 第 89 回日本結核病学会総会 一般演題 QIAxcel™ Advanced System を使用した結核菌 Supply ' s 15-MIRU VNTR 解析 2014 年 5 月 9 日 長良川国際会議場
- 8) 竹中日登美、山田淳子、山田泰子、松本智成 第 89 回日本結核病学会総会 一般演題 患者理解度からみた教育方法の課題 2014 年 5 月 9 日 長良川国際会議場
- 9) 松本智成、永井崇之、田村義孝、黒川雅史、川瀬一郎、藤井隆、相良憲幸 第 89 回

- 日本結核病学会総会 一般演題 結核合併関節リウマチ、クローン病患者 24 名に対する抗 TNF 製剤および抗 IL-6 受容体抗体製剤投与の安全性と有効性(第 3 報) 2014 年 5 月 9 日 長良川国際会議場
- 10) 松本智成 第 89 回日本結核病学会総会 シンポジウム 抗酸菌の分子疫学解析 2014 年 5 月 9 日 長良川国際会議場
 - 11) 松本智成 第 89 回日本結核病学会総会・東ソー株式会社共催アフターヌーンセミナー 1 抗酸菌核酸増幅検査の展望 2014 年 5 月 9 日 長良川国際会議場 5 階 国際会議室
 - 12) 松本智成 第 113 回日本結核病学会近畿地方会・第 83 回日本呼吸器学会近畿地方会 教育講演「呼吸器内科医が知っておくべき生物学的製剤と抗酸菌症」 2004 年 6 月 28 日 姫路商工会議所

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他