

平成23年度から25年度に搬入された薬剤耐性結核菌の遺伝子型解析と薬剤感受性パターン

向川 純^a, 山本 宣和^a, 平井 昭彦^a, 貞升 健志^b, 甲斐 明美^b

平成23年度から25年度に薬剤耐性結核菌監視事業で当センターに搬入された薬剤耐性結核菌74株 (SM耐性菌23株, INH耐性菌17株, INH及びSM耐性菌16株, 多剤耐性菌16株, EB, RFP耐性各1株) の遺伝子型並びに薬剤感受性について調査を実施した. このうち41株はVNTR法による遺伝子型解析で9のクラスターに分類された. 最大クラスターはSM耐性を示す14株で, 過去に分離された同一VNTR型のSM耐性菌40株ともほぼ同一の特徴であった. 2番目に大きなクラスターはINH単独あるいはINHとSM両剤に耐性の9株であった. 第3のクラスターはINH単独耐性の4株, 第4, 第5のクラスターはINHとSM両剤に耐性のそれぞれ3株, 第6のクラスターはINH単独耐性の2株, 第7, 8のクラスターはSM単独耐性の2株, クラスター9は多剤耐性の2株であった. クラスターを形成しない株は33株であった.

キーワード: 薬剤耐性結核菌監視事業, 薬剤感受性試験, 遺伝子型, VNTR法, クラスター形成,

はじめに

かつて「国民病」, 「不治の病」と恐れられた結核は, 医療技術の進歩, 栄養事情の向上, 有効な抗結核薬の開発, 国をあげての結核対策により着実に減少し「過去の病気」として関心が薄れてきたが, 多剤耐性結核菌など耐性菌の出現により新たな脅威となっている. この薬剤耐性結核菌の遺伝子型, 蔓延状況を調査し, 感染拡大阻止対策の資料とするため, 東京都福祉保健局では平成18年より都内における薬剤耐性結核菌監視事業を開始した.

当センターでは, 平成24年より結核菌遺伝子型別検査に従来の Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法に代え, Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) 法を導入した. 今回は平成23年4月から26年3月までに当センターに薬剤耐性結核菌監視事業で搬入された結核菌のVNTR法を用いた遺伝子型並びに薬剤感受性についてまとめたので報告する.

実験方法

1. 材料

平成23年4月から26年3月までに, 薬剤耐性結核菌監視事業で都内医療機関等より搬入された結核菌74株を用いた.

2. 薬剤感受性試験

液体培地に接種した菌を, McFarland No.1 (吸光度530nm, OD=0.2, 湿菌濃度1mg/mL) の濃度まで培養し, ブロスミック MTB-I 法 (極東製薬) を用いて最小発育阻止濃度 (MIC 値) を調査した. 使用した薬剤は, ストレプトマイシン (SM), エタンブトール (EB), カナマイシン (KM), イソニアジド (INH), リファンピシン (RFP), リファブチン (RBT), レボフロキサシン (LVFX), シブ

ロフロキサシン (CPFX) である.

3. DNA の抽出

DNA 抽出は, 既報¹⁾のとおりに行った. すなわち, BSL-3 施設内の安全キャビネット内で結核菌を小川培地から回収し, 80°C で20分間加熱殺菌後, プロテナーゼ K・SDS・フェノール・クロロフォルム法でDNAを抽出した.

4. VNTR 法

VNTR法の検査領域, 並びに領域数については横山ら¹⁵⁾の論文を参考に24領域を選定し使用した. 用いた24領域と各領域の蛍光プライマーのセットは表1に示したように, 結核菌多重反復配列領域のうち, Supply ら⁵⁾の Mycobacterium Interspersed Repetitive Unit (MIRU) の7領域 (MIRU4, 10, 16, 26, 31, 39, 40), Frothingham ら⁶⁾の Exact Tandem repeat (ETR) の2領域 (ETR-A, C), Roring ら⁷⁾の Queen's University of Belfast (QUB) の7領域 (QUB11a, 11b, 15, 18, 26, 3232, 3336), Le Fleche ら⁸⁾の5領域 (Mtub04, 21, 24, 30, 39), そして Smittipat ら⁹⁾の VNTR2372, VNTR3820, VNTR4120 の計24領域について, 各菌株のゲノム遺伝子を鋳型にそれぞれの蛍光プライマーと Taq DNA polymerase を用いた PCR 法で各領域を増幅後, PCR 産物の DNA サイズを ABI3130 シークエンサーで測定し, フラグメント解析ソフトである Gene Mapper にて反復数を計算した. 各領域の反復数の算定は和田ら¹⁰⁾による標準株の反復数に従い決定した. また VNTR 法で24領域中23領域以上が一致した菌株を同一クラスターとした.

結果及び考察

1. 薬剤感受性試験の結果

^a 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

表1. VNTR法24領域の蛍光プライマー

プライマー名	蛍光色素	塩基配列	プライマー名	塩基配列
1 MIRU4-F	FAM	GTCAAACAGGTCACAACGAGAGGAA	MIRU4-R	CCTCCACAATCAACACACTGGTCAT
2 MIRU10-F	VIC	ACCGTCTTATCGGACTGCACTATCAA	MIRU10-R	CACCTTGGTGATCAGCTACCTCGAT
3 MIRU16-F	NED	CGGGTCCAGTCCAAGTACCTCAAT	MIRU16-R	GATCCTCTGATTGCCCTGACCTA
4 MIRU26-F	PET	GCGGATAGGTCTACCGTCGAAATC	MIRU26-R	TCCGGGTCATACAGCATGATCA
5 MIRU31-F	FAM	CGTCGAAGAGAGCCCTCATCAATCAT	MIRU31-R	AACCTGCTGACCGATGGCAATATC
6 MIRU40-F	VIC	GATTCCAACAAGACGCAGATCAAGA	MIRU40-R	TCAGGTCTTCTCTCACGCTCTCG
7 ETR-A-F	NED	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	ETR-A-R	CGAAGCCTGGGGTCCCAGGATTT
8 ETR-C-F	PET	GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG	ETR-C-R	GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG
9 Mtub04-F	FAM	GTCCAGGTTGCAAGAGATGG	Mtub04-R	GGCATCCTCAACAACCGTAG
10 Mtub21-F	VIC	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC	Mtub21-R	CAACATCGCCTGGTTCTGTA
11 Mtub30-F	NED	AGTCACCTTTCCTACCACTCGTAAC	Mtub30-R	ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAAG
12 Mtub39-F	PET	AATCACGGTAACCTGGGTTGTTT	Mtub39-R	GATGCATGTTGACCCCGTAG
13 QUB11b-F	FAM	CGTAAGGGGATGCGGAAATAGG	QUB11b-R	CGAAGTGAATGGTGGCAT
14 QUB26-F	VIC	GAGCCAAATCAGGTCCGG	QUB26-R	GAGGTATCAACGGGCTTGT
15 QUB4156-F	NED	TGGTCGCTACGCATCGTGTCCGCCGT	QUB4156-R	TACCACCCGGGAGTTTAC
16 Mtub24-F	PET	CACTAGCTGCGTCACTGG	Mtub24-R	GCTGATTCCCACGAAAG
17 QUB11a-F	FAM	CCCATCCCCTTAGCACATTTCGA	QUB11a-R	TTCAGGGGGATCCGGGA
18 QUB15-F	VIC	TACATTCGCGCCAAAGG	QUB15-R	AGGGGTTCTCGGTCAACC
19 QUB18-F	NED	ATCGTCAGTGCAGGAATAGT	QUB18-R	AATACCGGGGATATCGGTTT
20 QUB3232-F	PET	CAGACCCGGGTCATCAAC	QUB3232-R	CCAAGGCGGCAATGTTGTT
21 QUB3336-F	FAM	TGTCAGAGCTTATCGACCAC	QUB3336-R	CGACGGTATCGAGACGAC
22 VNTR3820-F	VIC	TGCGCGGTGAATGAGACG	VNTR3820-R	ACCTTCATCTTGGCGAC
23 VNTR4120-F	NED	GTTACCCGGAGCCAACC	VNTR4120-R	GAGGTGGTTTCGTGGTTCG
24 VNTR2372-F	PET	ACCTCCGTTCCGATAATC	VNTR2372-R	CAGCTTTCAGCTCCACA

図1に示すように、各菌株を薬剤感受性のみで分類すると、SM 単独耐性株が 23 株、INH 単独耐性株が 17 株、RFP、EB 単独耐性が 1 株ずつ、SM と INH の両剤耐性が 16 株であった。また多剤耐性結核菌は 16 株あり、3 株は INH、RFP 両剤に耐性、4 株は INH、RFP、SM の 3 薬剤に耐性、1 株は INH、RFP、EB の 3 薬剤に耐性、8 株は主要 4 薬剤である INH、RFP、SM、EB すべてに耐性であった。

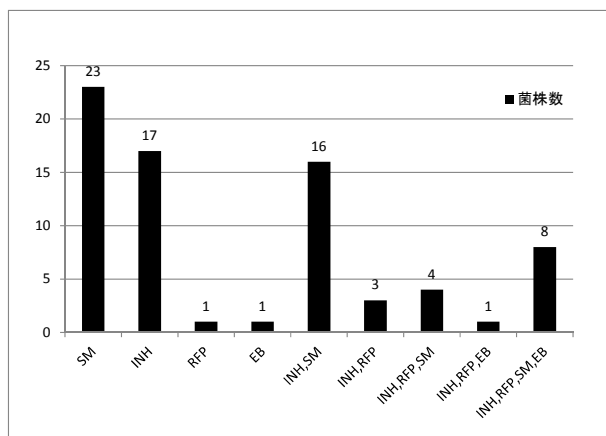


図1. 搬入菌株の薬剤耐性パターン

これらの結果は、既報の都内で分離された薬剤耐性結核菌の耐性パターンの調査結果^{2,14)}、単独耐性では SM、次に INH 耐性株が多く、RFP や EB の単独耐性株は少ない事、複数の薬剤に耐性の株は、INH と他の薬剤の組み合わせの株が多く、RFP と SM、EB の組み合わせはなかった事と同様である。

2. 遺伝子型別検査と薬剤感受性の結果

VNTR法で74株を解析した結果、9個のクラスター計41株とクラスターを形成しない33株に分類された(表2)。

表2. VNTR法によるクラスター形成

クラスター	薬剤耐性	株数	クラスター率
1	SM耐性	14	19%
2	INH, SM or INH耐性	9	12%
3	INH耐性	4	5%
4	INH, SM耐性	3	4%
5	INH, SM耐性	3	4%
6	INH耐性	2	3%
7	SM耐性	2	3%
8	SM耐性	2	3%
9	多剤耐性	2	3%
非形成		33	

最大クラスター1は表3に示した R843 など 14 株で、クラスター形成率は 19%、薬剤感受性は表4に示した通り SM 単独耐性で、MIC 値はすべて 128 $\mu\text{g/ml}$ 以上であり、VNTR法の解析では 24 領域中 1 領域の相違はあったが、それ以外はすべて一致していた。これらは過去に当センターにて 40 株検出されたいわゆる「M株」とも称されている SM 耐性の株^{11,12)}と同様の遺伝子型と薬剤感受性を示す株で、これらの株は感染事例が異なっているにもかかわらず VNTR法でのアリルプロファイルの相違がほとんどなく、あっても 1 領域であった事と一致している。本菌は、昔から都内各地の感染事例から多数分離され検査総数の 5%以上を占めている。また、国内各地か

らも同様の遺伝子型で SM 耐性の株が多数分離されていることが報告され¹⁾, どの地域から分離された株もほぼ同じアシルプロファイルとされている. 同一感染源による同時多発感染と考える研究者もいたが, 接触関係がない, あるいは不明な場合が多く, 同じ感染源から感染拡大・伝播した感染事例というより, この株の遺伝子型が安定していて変化しにくい, あるいは未分化でこれから変異が生じるため極めて類似しており, これらが日本各地に定着し, 小規模感染を繰り返してきた可能性が考えられる. 今回検討した 14 株も都内各地から分離された. 集団感染疑い事例でこの型の菌が検出されたときは, 同一感染源による感染かどうかは接触関係を含めて慎重に調査すべきで, 今後は全ゲノムシーケンス等の手段でさらに詳しい解析が必要と考えられる.

表 3. クラスター1の VNTR 法による解析

		クラスター1													
領域	名称	R843	R868	R869	R913	R914	R958	R973	R981	R1063	R1092	R1113	R1115	R1118	R1129
580	MIRU4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
960	MIRU10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
1644	MIRU16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2996	MIRU26	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
3192	MIRU31	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
802	MIRU40	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2165	ETR-A	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
577	ETR-C	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
424	Mtub04	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1955	Mtub21	4	3	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	3
2401	Mtub30	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3690	Mtub39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2163b	QUB11b	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
4052	QUB26	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
4156	QUB4156	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2074	Mtub24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2163a	QUB11a	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
3155	QUB15	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1982	QUB18	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
3232	QUB3232	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
3336	QUB3336	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
3820	VNTR3820	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	18	14	14	14
4120	VNTR4120	10	9	9	9	9	9	10	9	10	9	9	9	9	9
2372	VNTR2372	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

網掛け部分: 異なる反復数

表 4. クラスター1の薬剤感受性

		クラスター1													
薬剤		R843	R868	R869	R913	R914	R958	R973	R981	R1063	R1092	R1113	R1115	R1118	R1129
SM	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
EB	1	1	1	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1	1	1
KM	1	1	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.5	1	0.5	1
INH	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
RFP	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03
RBT	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
LVFX	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CPFX	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

網掛け部分: 薬剤耐性

クラスター2は, 表5に示した R845 などの9株で, クラスター形成率は12%であった. 表6に示した通り, 7株は SM, INH 両剤に耐性であり, 2株は INH 単独耐

性で, SM 耐性株の MIC 値は 4~16 µg/ml, INH は 1~4 µg/ml であった. これらの株も昔から都内各地から分離されており, 今回も都内各地から分離された. VNTR 法で 22 領域は一致したが, QUB3336 が 10 の株 (6 株) と 13 の株 (3 株), ETR-A が 2 (1 株) と 4 (8 株) の株に分かれた. これらの株は 2011 年に報告したクラスター2¹⁾とほぼ同一の薬剤感受性と VNTR 法の結果を示した. またこれらと類似した遺伝子型の株は当センターでは過去に 15 株検出され, 薬剤感受性を調査した 12 株の内, 8 株が INH, SM 両剤耐性, 2 株が INH 耐性, 2 株は INH, RFP 両剤耐性の多剤耐性結核菌であった.

表 5. クラスター2, 3の VNTR 法による解析

		クラスター2							クラスター3					
領域	名称	R845	R871	R933	R947	R997	R1081	R1130	R1131	R1161	R959	R989	R1100	R1153
580	MIRU4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
960	MIRU10	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1
1644	MIRU16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2996	MIRU26	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
3192	MIRU31	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
802	MIRU40	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2165	ETR-A	4	4	4	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4
577	ETR-C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
424	Mtub04	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4
1955	Mtub21	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2401	Mtub30	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3690	Mtub39	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2163b	QUB11b	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	7	7	7
4052	QUB26	6	6	6	6	6	6	6	6	6	8	8	8	8
4156	QUB4156	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5
2074	Mtub24	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2
2163a	QUB11a	N.D	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9
3155	QUB15	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	4
1982	QUB18	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
3232	QUB3232	12	12	12	12	12	12	12	12	12	16	16	16	16
3336	QUB3336	10	13	13	10	13	10	10	10	10	7	7	7	7
3820	VNTR3820	7	7	7	7	7	7	7	7	7	14	14	14	14
4120	VNTR4120	8	8	8	8	8	8	8	8	8	12	14	12	12
2372	VNTR2372	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4

網掛け部分: 異なる反復数

表 6. クラスター2, 3の薬剤感受性

		クラスター2							クラスター3					
薬剤		R845	R871	R933	R947	R997	R1081	R1130	R1131	R1161	R959	R989	R1100	R1153
SM	4	1	2	4	4	16	4	8	4	1	1	1	0.5	
EB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
KM	1	1	1	2	0.5	2	1	1	1	1	1	1	2	
INH	1	4	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	
RFP	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	
RBT	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	
LVFX	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	
CPFX	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	

網掛け部分: 薬剤耐性

クラスター3は, 表5に示した R959 等の4株で, クラスター形成率は5%, 表6に示した通りすべて INH 単独耐性であった. MIC 値は 1 µg/ml で, VNTR4120 が 12 の株が 3 株, 14 の株が 1 株あった. 4 株のうち 3 株は都内北東部より分離された.

クラスター4から9の遺伝子型は表7に, 薬剤感受性

は表8にまとめた。

クラスター4はR825などの3株で、クラスター形成率は5%、すべてSM, INH両剤に耐性であった。SMのMIC値はすべて128 µg/ml以上であり、INHのMIC値は8~16 µg/mlであった。VNTR法で24領域はすべて一致した。2011年に報告したクラスター4のR689¹²⁾とほぼ同一の薬剤感受性とVNTR法の結果を示した。これらはすべて多摩地区より分離された。

クラスター5はR848などの3株で、すべてSM, INH両剤に耐性であり、クラスター形成率は4%、SMのMIC値は128 µg/ml以上で、INHのMIC値は1~2 µg/mlであった。VNTR法で24領域はすべて一致した。2011年に報告したその他の株中のR656¹²⁾とほぼ同一の薬剤感受性とVNTR法の結果を示した。これらは多摩地区から2株、都内東部から1株分離された。

クラスター6はR783とR784のINH単独耐性株で、クラスター形成率は3%、INHのMIC値は8 µg/ml、VNTR法で24領域すべて一致した。

クラスター7はR804とR1013のSM単独耐性株で、クラスター形成率は3%、MIC値はすべて128 µg/ml以上であり、VNTR法で24領域すべて一致していた。

クラスター8はR864とR912のSM単独耐性株で、クラスター形成率は3%、MIC値はすべて128 µg/ml以上であり、VNTR法で24領域すべて一致していた。

クラスター9はR746とR806の多剤耐性結核菌2株で、R746はINH, RFP, RBT, SM耐性、R806はさらにEBにも耐性であった。クラスター形成率は3%、SMのMIC値はともに128 µg/ml以上、INHのMIC値は1~2 µg/ml、RFPのMIC値は32 µg/ml以上、RBTは8 µg/ml、EBのMIC値は耐性株が8 µg/ml、もう一株は2 µg/mlでありVNTR法で24領域すべて一致した。R746は都内東部、R806は多摩地区から分離されたが、これらは平成22年度に報告したクラスター3¹²⁾の多剤耐性菌2株(R681, R732、ともに都内北部)とまったく同じVNTR型であり、薬剤感受性も類似していた。このような同一遺伝子型の多剤耐性結核菌が4年間に4株も分離されたことはこの株による感染拡大の可能性もあり、このクラスターについては接触者関係等のさらなる調査が必要と考えられる。

表7. クラスター4, 5, 6, 7, 8, 9のVNTR法による解析

領域 名称	クラスター4		クラスター5		クラスター6		クラスター7		クラスター8		クラスター9			
	R825	R918	R1144	R848	R853	R1070	R783	R784	R804	R1013	R864	R912	R746	R806
580 MIRU4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
960 MIRU10	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	1	1	3	3
1644 MIRU16	3	3	3	4	4	4	3	3	4	4	3	3	3	3
2996 MIRU26	5	5	5	7	7	7	5	5	5	5	9	9	7	7
3192 MIRU31	3	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4
802 MIRU40	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2165 ETR-A	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
577 ETR-C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
424 Mtub04	2	2	2	3	3	3	4	4	3	3	4	4	4	4
1955 Mtub21	1	1	1	3	3	3	4	4	3	3	3	3	4	4
2401 Mtub30	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3690 Mtub39	8	8	8	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2
2163b QUB11b	4	4	4	7	7	7	6	6	7	7	6	6	6	6
4052 QUB26	4	4	4	2	2	2	8	8	2	2	8	8	8	8
4156 QUB4156	3	3	3	5	5	5	3	3	5	5	5	5	3	3
2074 Mtub24	3	3	3	5	5	5	3	3	4	4	2	2	3	3
2163a QUB11a	2	2	2	8	8	8	8	8	8	8	9	9	8	8
3155 QUB15	4	4	4	6	6	6	4	4	5	5	4	4	4	4
1982 QUB18	5	5	5	9	9	9	8	8	10	10	10	10	8	8
3232 QUB3232	5	5	5	10	10	10	10	10	12	12	16	16	14	14
3336 QUB3336	10	10	10	7	7	7	5	5	4	4	7	7	7	7
3820 VNTR3820	5	5	5	17	17	17	14	14	12	12	14	14	14	14
4120 VNTR4120	2	2	2	9	9	9	6	6	10	10	10	10	6	6
2372 VNTR2372	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3	3

表8. クラスター4, 5, 6, 7, 8, 9の薬剤感受性

薬剤	クラスター4		クラスター5		クラスター6		クラスター7		クラスター8		クラスター9			
	R825	R918	R1144	R848	R853	R1070	R783	R784	R804	R1013	R864	R912	R746	R806
SM	>128	>128	>128	>128	>128	>128	0.5	0.5	>128	>128	>128	>128	>128	>128
EB	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	1	1	1	2	8
KM	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0.25	0.5
INH	8	16	8	2	1	2	8	8	0.125	0.125	0.125	0.125	2	1
RFP	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	>32	>32
RBT	0.008	≤0.004	≤0.004	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.015	0.015	8	8
LVFX	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.125	0.125	0.25	0.25
CPFX	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.125	0.125	0.25	0.25

網掛け部分：薬剤耐性

最後にクラスターを形成しなかった多剤耐性結核菌13株のVNTR並びに薬剤感受性の成績を示す(表9, 表10)。これらはVNTR法で遺伝子型による解析結果がすべて異なり、薬剤感受性もさまざまで、都内各地から分離された。これまで我々がVNTR法で検査した結核菌約600株にこれらの株と同じVNTRの結果を示すものはなかった。

表 9. クラスター9 以外の多剤耐性結核菌の VNTR 法による解析

領域	名称	多剤耐性株												
		R782	R785	R796	R1045	R1098	R759	R768	R812	R874	R925	R998	R1022	R1072
580	MIRU4	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
960	MIRU10	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	1
1644	MIRU16	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2996	MIRU26	7	7	7	3	6	7	6	8	7	7	7	6	7
3192	MIRU31	5	5	5	5	5	4	5	5	4	5	6	5	5
802	MIRU40	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3
2165	ETR-A	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
577	ETR-C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
424	Mtub04	4	3	2	2	4	3	4	4	4	4	4	3	4
1955	Mtub21	4	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	3	3
2401	Mtub30	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3690	Mtub39	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2163b	QUB11b	6	6	6	2	7	5	5	6	6	6	6	5	7
4052	QUB26	8	8	8	8	9	9	7	7	8	8	3	6	8
4156	QUB4156	3	5	4	4	5	2	3	3	3	3	3	4	5
2074	Mtub24	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	2
2163a	QUB11a	8	1	6	8	5	8	8	8	8	8	8	10	N.D
3155	QUB15	4	4	2	2	4	2	4	4	4	4	4	2	4
1982	QUB18	8	5	13	10	10	9	8	6	8	7	8	7	10
3232	QUB3232	14	16	13	7	15	12	12	14	8	14	11	10	15
3336	QUB3336	7	7	10	10	7	14	7	7	7	7	7	10	7
3820	VNTR3820	14	15	8	10	13	9	14	14	25	14	14	10	12
4120	VNTR4120	10	20	8	5	8	8	11	10	9	10	11	3	15
2372	VNTR2372	3	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	2

網掛け部分：異なる反復数

表 10. クラスター9 以外の多剤耐性結核菌の薬剤感受性

薬剤	多剤耐性株												
	R782	R785	R796	R1045	R1098	R759	R768	R812	R874	R925	R998	R1022	R1072
SM	32	0.5	4	4	1	1	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128
EB	2	8	8	8	2	4	4	8	8	4	1	8	8
KM	1	1	2	>128	2	1	0.5	32	1	1	1	1	4
INH	1	2	2	2	1	8	8	16	8	16	8	8	32
RFP	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
RBT	8	8	8	8	8	8	8	8	8	4	8	8	8
LVFX	0.25	0.25	0.25	1	0.5	4	0.25	8	4	0.25	0.25	2	0.25
CPEX	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	4	0.25	8	4	0.25	0.25	4	0.25

網掛け部分：薬剤耐性

ま と め

我々は平成24年度より24領域のVNTR法を用いた結核菌型別試験を開始した。横山らは首都圏で蔓延している結核菌の型別試験に24領域を用いたVNTR検査が株間の分別に十分であることを示したが¹⁵⁾、今回我々が調査した74株の薬剤耐性菌のうちクラスター形成株とそれぞれの薬剤感受性がほぼ一致したことからこの方法の高い検査精度が立証された。

今回解析した74株のうち41株は9個のクラスターに分類された。最大のクラスター1はSM耐性株で、以前から都内各地や全国的に多数分離されてきた株である。2番目に大きいクラスターでINH, SM両剤耐性の株も毎年都内各地から分離されている株である。一方、まったくクラスターを形成しなかった株が33株あった。クラスターを形成した株には過去に類似株が多数分離されているも

のがあり、感染が拡大する可能性もあるので今後も注意が必要と考えられる。

多剤耐性結核菌のうち、クラスター9は過去にも同じ遺伝子型、類似した薬剤感受性の株が検査されている。他の多剤耐性菌は過去には検出されていないが、結核の主要治療薬であるINH, RFP両剤に耐性で治療が困難な多剤耐性菌の流行は脅威であり、今後クラスター9の株と同一の遺伝子型、薬剤感受性の株の出現に対するさらなる監視が必要である。

一方でこれまで検査した薬剤耐性結核菌株の収集地域には偏りが有り、都内の薬剤耐性結核菌サーベイランスの見地からすると流行状況を把握するためには今後都内全域から万遍なく耐性菌株を収集する必要がある。

今後、薬剤耐性結核菌のみならず、結核蔓延阻止のための分子疫学的情報提供のためには、東京都内におけるVNTR法による結核菌データベースを構築・充実し、新たに分離された株の由来、感染源調査を継続かつ積極的に行っていく必要がある。

文 献

- 1) 向川 純, 柳川義勢, 山田澄夫: 東京健安研七 年 報, **57**, 55-58, 2006.
- 2) 向川 純, 三宅啓文, 柳川義勢, 他: 東京健安研七 年 報, **58**, 57-61, 2007.
- 3) 向川 純, 三宅啓文, 吉田 勲, 他: 東京健安研七 年 報, **59**, 53-57, 2008.
- 4) 高橋光良, 安部千代治: 日細誌, **49**(5), 853-857, 1994.
- 5) Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3563-3571, 2001.
- 6) Frothingham, R. and Meeker-O'Connell, W. A.: *Microbiology.*, **144**, 3563-3571, 2002.
- 7) Roring, S., Scott, A., Brittain, D., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1189-1196, 2002.
- 8) Le Fleche, P., Fabre, M., Denoeud, F., et al.: *BMC Microbiology*, **2**, 37, 2002.
- 9) Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5034-5043, 2005.
- 10) 和田 崇之, 長谷 篤.: 結核, **85**, 845-852, 2010
- 11) 向川 純, 山本宣和, 三宅啓文, 他: 東京健安研七 年 報, **61**, 111-116, 2010.
- 12) 向川 純, 山本宣和, 三宅啓文, 他: 東京健安研七 年 報, **62**, 79-84, 2011.
- 13) 岩本朋忠, 藤山理世, 白井千香, 他: 結核, **85**, 411, 2010.
- 14) 向川 純, 遠藤美代子, 柳川義勢, 他: 感染症学雑誌, **79**, 388-396, 2005.
- 15) Yokoyama, E., Kishida, K., Uchimura, M., et al.: *Infect. Genet. Evol.* **7**, 499-508, 2007.

**Analysing the Genotype and Drug Sensitivity Pattern of Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains:
Isolated in Tokyo between 2011 and 2013**

Jun MUKAIGAWA^a, Nobukazu YAMAMOTO^a, Akihiko HIRAI^a,
Kenji SADAMASU^a and Akemi KAI^a

We analyzed the genotypes and drug sensitivity patterns of 74 drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Tokyo between April 2011 and March 2014. The samples were collected as part of a drug-resistant tubercle bacillus monitoring project of the Tokyo Metropolitan Government.

All 41 strains were classified into nine clusters using the Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) method. The largest cluster (No.1) included 14 streptomycin (SM) resistant strains. These strains showed similar allelic features as that of a previously described SM-resistant tubercle bacillus with the same VNTR pattern. The second cluster (No.2) included strains that were resistant to isoniazid (INH) or both INH and SM, the third cluster (No.3) included strains that were resistant to INH. Cluster No. 4, and No. 5 included strains that were resistant to both INH and SM. Strains in cluster No.6 were resistant to INH, while strains in clusters No.7, and No.8 were resistant to SM, and strains in cluster No.9 were multi-drug-resistant. The remaining 33 strains were not clustered.

Keywords: Drug-resistant tubercle bacillus monitoring project, Genotyping of tuberculosis, Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) method, Drug sensitivity test, Cluster formation

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan