



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1689号
学位記番号	第1206号
氏名	山羽 悠介
授与年月日	平成 31年 3月 25日
学位論文の題名	Moxifloxacin resistance and genotyping of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare isolates in Japan (日本国内の Mycobacterium avium 及び Mycobacterium intracellulare の遺伝子型とモキシフロキサシン耐性について) Nagoya Medical Journal (accepted for publication)
論文審査担当者	主査： 長谷川 忠男 副査： 中西 良一, 新実 彰男

.....
(緒言)

Mycobacterium avium complex(MAC)症は標準治療を行ってもしばしば抵抗性を示し、重症例では fluoroquinolone(FQ)が代替薬として考慮される。既報の MAC 菌の FQ 感受性の報告での臨床分離株は MAC 症への前治療のない患者由来のものかは明らかではない。結核菌の FQ のメインターゲットは *gyrA* 遺伝子及び *gyrB* 遺伝子がコードする DNA ジャイレースで、FQ 耐性は GyrA、GyrB たんぱくのキノロン耐性決定領域(QRDR)のアミノ酸変異でおきる。しかし、MAC 菌におけるこの変異の報告はまだ少数である。抗酸菌の遺伝子型解析の報告では、variable numbers of tandem repeats (VNTR) 型別解析法により、*M. avium* クラスター間で FQ 薬である levofloxacin の感受性に有意差を認めた。一方、moxifloxacin (MFLX)の薬剤感受性は *M. avium* では違いはなかったが、*M. intracellulare* では有意差を認めたという報告もある。

本研究では、未治療の肺 MAC 症患者由来の *M. avium* と *M. intracellulare* 菌株の MFLX の感受性を調べた。また、MFLX 耐性株における *gyrA* 及び *gyrB* の変異の有無を調べるとともに VNTR 型別解析法での遺伝子型と薬剤感受性の関連を調べた。

(対象と方法)

菌株：

日本国内 8 施設から *M. avium* 154 株と *M. intracellulare* 35 株を収集した。すべての菌株は American Thoracic Society のガイドラインにより肺 MAC 症と診断された前治療歴を有しない患者の喀痰もしくは気管支洗浄液から得られた。

薬剤感受性：

MFLX に対する最少発育阻止濃度(MIC)は微量液体希釈法にて測定した。Clinical and Laboratory Standards Institute の基準に従って、MIC が 1 以下、2、4 μ g/ml 以上をそれぞれ感受性、中等度耐性、耐性とした。

DNA の抽出及び QRDR のシーケンス：

DNA は InstaGene Matrix を用いて抽出した。Primer3 ソフトウェアで *gyrA* 及び *gyrB* の QRDR を増幅可能なプライマーを設計し、PCR を行って、シーケンスした。

VNTR 型別解析：

M. avium は 15 の VNTR 領域、*M. intracellulare* は 16 の VNTR 領域に対して PCR を行い、PCR 産物のサイズから各 VNTR 領域の反復回数を決定した。PHYLIP ソフトウェアで各株間のマンハッタン距離を決定し、FigTree ソフトウェアで樹形図を作成した。

統計学的解析：

JMP version 9.0.0 を用いて、カテゴリ変数の群間比較はカイ二乗検定かフィッシャーの正確確率検定で行った。VNTR クラスター間の平均 log₂MIC 値の比較はマン・ホイットニーの U 検定で行った。P 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

(結果)

MFLX に対する薬剤感受性：

MFLX は *M. avium* 株の 76.6%(118/154)で感受性をみとめ、16.9% (26/154) で中等度耐性、6.5%(10/154)で耐性であった。*M. intracellulare* 株では、74.3%(26/35)で感受性を認め、17.1% (6/35)で中等度耐性、8.6%(3/35)で耐性であった。

gyrA 及び *gyrB* のシーケンス :

M. avium の MFLX 感受性 3 株、中等度耐性 26 株、耐性 10 株と *M. intracellulare* の感受性 3 株、中等度耐性 6 株、耐性 3 株で *gyrA* と *gyrB* のシーケンスをした。*M. tuberculosis* GyrA の Ser95 に対応する部位で Thr96 のアミノ酸置換と GyrB の Gly520 に対応する部位で Thr522 のアミノ酸置換を有していたが、これらの置換は MFLX の感受性とは無関係に観察され、耐性に寄与しなかった。

遺伝子型とクラスター :

VNTR 型別解析で、*M. avium*154 株には 139 の VNTR 遺伝子型を認め、3 つのクラスターにわかれた。*M. intracellulare*35 株には 33 の VNTR 遺伝子型があり、2 つのクラスターにわかれた。

VNTR 型別解析による遺伝子型と MFLX の薬剤感受性の関係 :

M. avium ではクラスター A において、B 及び C よりも MFLX 耐性株が多かったが、有意差は認めなかった。平均 log₂ MIC 値はクラスター A において有意にクラスター C よりも高値を示した。*M. intracellulare* では 2 つのクラスター間で MFLX 感受性及び平均 log₂ MIC 値に有意差は認めなかった。

〈考察〉

本研究での MAC 菌の MFLX 耐性株の頻度は既報よりも少なかったが、MAC 症に対する前治療歴のない患者由来の菌株を用いていたことが要因と考えられた。

MAC の GyrA 及び GyrB の QRDR のアミノ酸配列は *M. tuberculosis* との比較で 1 置換は認めたが、MFLX 感受性株と耐性株のアミノ酸配列に違いを認めず、MAC 菌の MFLX 耐性に関与する QRDR のアミノ酸変異は同定できなかった。同様の結果が報告されており、MFLX 耐性には efflux pump など他のメカニズムの関与が考えられる。

本研究では、VNTR クラスターと levofloxacin 耐性に関連性を認めた既報よりも多い、未治療患者由来 *M. avium* 154 株で検討し、VNTR クラスターと MFLX 耐性に関連性を認めなかった。従って、VNTR のクラスターで MFLX 耐性を予測するのは困難と考えられた。

本研究の限界は、施設ごとで登録した菌株数にばらつきがあること、国内の *M. avium* と *M. intracellulare* の分布には地域差があること、*M. intracellulare* は 35 株と解析に十分でないことがある。また、MFLX 耐性の分子メカニズムを決定できなかったため、MFLX 耐性と遺伝子型との関連性を明らかにできなかった。

〈結論〉

未治療患者由来の *M. avium*、*M. intracellulare* の MFLX 耐性はそれぞれ 6.5%及び 8.6%であった。MFLX 耐性に関与する *gyrA*、*gyrB* の QRDR における遺伝子変異は認めなかった。VNTR 遺伝子型では MFLX 耐性の予測はできなかった。MAC 菌での FQ 耐性のメカニズムを明らかにするためにはさらなる検討が必要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

【発表の概略】

肺 *Mycobacterium avium* complex(MAC)症は標準治療を行ってもしばしば抵抗性を示し、重症例では moxifloxacin (MFLX)などの fluoroquinolone(FQ)が代替薬として考慮される。既報の MAC 菌の FQ 感受性の報告での臨床分離株は MAC 症への前治療のない患者由来のものか不明ではない。本研究では未治療の肺 MAC 症患者由来の MFLX の感受性を調べた。また、MFLX 耐性株における *gyrA* 及び *gyrB* の変異の有無を調べるとともに variable numbers of tandem repeats (VNTR) 型別解析法での遺伝子型と薬剤感受性の関連を調べた。日本国内 8 施設から前治療歴を有しない患者由来の *M. avium* 154 株と *M. intracellulare* 35 株を収集した。すべての菌株の MFLX に対する最少発育阻止濃度(MIC)を微量液体希釈法にて測定した。Clinical and Laboratory Standards Institute の基準に従って、MIC が 1 以下、2、4 μ g/ml 以上をそれぞれ感受性、中等度耐性、耐性とした。DNA は InstaGene Matrix を用いて抽出した。Primer3 ソフトウェアで *gyrA* 及び *gyrB* のキノロン耐性決定領域(QRDR)を増幅可能なプライマーを設計し PCR を行い、シーケンスした。VNTR 型別解析は、*M. avium* は 15 の VNTR 領域、*M. intracellulare* は 16 の VNTR 領域に対して PCR を行い、PCR 産物のサイズから各 VNTR 領域の反復回数を決定した。PHYLIP ソフトウェアで各株間のマンハッタン距離を決定し、FigTree ソフトウェアで樹形図を作成した。MFLX は *M. avium* 株の 76.6%(118/154)で感受性をみとめ、16.9% (26/154) で中等度耐性、6.5%(10/154)で耐性であった。*M. intracellulare* 株では、74.3%(26/35)で感受性を認め、17.1%(6/35)で中等度耐性、8.6%(3/35)で耐性であった。*M. avium* の MFLX 感受性 3 株、中等度耐性 26 株、耐性 10 株と *M. intracellulare* の感受性 3 株、中等度耐性 6 株、耐性 3 株で *gyrA* と *gyrB* のシーケンスをした。*M. tuberculosis* GyrA の Ser95 に対応する部位で Thr96 のアミノ酸置換と GyrB の Gly520 に対応する部位で Thr522 のアミノ酸置換を有していたが、これらの置換は MFLX の感受性とは無関係に観察され耐性に寄与しなかった。VNTR 型別解析で、*M. avium*154 株では 3 つ、*M. intracellulare*35 株では 2 つのクラスターにわかれた。*M. avium* ではクラスター A において、B 及び C よりも MFLX 耐性株が多かったが、有意差は認めなかった。平均 log₂ MIC 値はクラスター A において有意にクラスター C よりも高値を示した。*M. intracellulare* では 2 つのクラスター間で MFLX 感受性及び平均 log₂ MIC 値に有意差は認めなかった。本研究での MAC 菌の MFLX 耐性株の頻度は既報よりも少なかったが、MAC 症に対する前治療歴のない患者由来の菌株を用いていたことが要因と考えられた。MAC の GyrA 及び GyrB の QRDR のアミノ酸配列は *M. tuberculosis* との比較で 1 置換は認めたが、MFLX 感受性株と耐性株のアミノ酸配列に違いを認めず、MFLX 耐性に関与する QRDR のアミノ酸変異は同定できなかった。本研究では、VNTR クラスターと levofloxacin 耐性に関連性を認めた既報よりも多い、未治療患者由来 *M. avium* 154 株で検討し、VNTR クラスターと MFLX 耐性に関連性を認めなかった。従って、VNTR のクラスターで MFLX 耐性を予測するのは困難と考えられた。

【審議の内容】主査の長谷川教授より、①*gyrA*, *gyrB*の大きさ、②今回の遺伝子解析が QRDR 内のみで QRDR 外への検索をしなかった理由、③MAC 菌での *parC*, *parE*の有無について、④ tandem repeat の存在意義、等 11 項目の質問があった。第一副査の中西教授より、①肺 MAC 症の治療ガイドラインについて、②肺 MAC 症の患者に対する治療戦略としての MFLX の意義について、③MFLX 耐性の分子メカニズムを決定するために必要なこと、等 7 項目の質問があった。第二副査の新実教授より、①肺 MAC 症の病型分類について、②肺 MAC 症と肺結核症の治療適応の差異について、の 2 項目の質問があった。いずれの質問に対しても概ね十分な回答が得られ、本研究領域について深く理解すると共に、専攻分野に関する知識を習得しているものと判断された。よって本論文の著者には博士(医学)の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 長谷川 忠男

副査 中西 良一 新実 彰男