

## 結核菌の薬剤耐性と遺伝子変異について

北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所

教授 中島 千絵, 教授 鈴木 定彦

結核はかつて不治の病と恐れられていたが、抗結核薬の登場により正しく治療を行えば完治可能な病となった。ただし、菌が抗結核薬に対する耐性を獲得している場合は話が変わり、とりわけ複数の薬が効かない多剤耐性菌の治療は困難を極め、不治の病の時代へ逆戻りとなる恐れがある。1940年代のストレプトマイシン以降、現在までの間に市場に投入された抗結核薬は、近年承認されたものも含め全て、既に耐性結核菌の出現が報告されている。

### 結核菌の薬剤耐性獲得メカニズム

結核菌は、他の多くの病原菌と異なりプラスミド等の移動性の遺伝子媒体を持たず、菌間で遺伝子のやり取りを行わない。従って、薬剤耐性獲得はもっぱら薬剤の標的となる分子をコードする遺伝子上の変異となる。薬剤耐性を調べる最良の方法は薬剤感受性試験であるが、増殖が遅く判定までに数週間を要する結核の場合は、培養を介さない遺伝子学的診断法は好都合である。薬剤耐性を与える変異には、薬剤排出ポンプの増強等の比較的軽度の耐性を与えるものもあるが、高度耐性を招く変異は大きく2つ、薬剤結合部位の構造変化と薬剤活性化酵素の失活に分けられる。

### 1. 薬剤結合部位の構造変化による耐性化

通常、薬剤の標的は菌にとって重要な分子であり、その活性を抑えることによって菌の増殖を阻止する。薬剤の結合部位に変異が入り、形が変われば菌は薬剤耐性となるが、これらの分子は菌の生存において必須であるため、活性が影響を受ける様な変異は菌にとって負担 (fitness cost) が大きく受け入れ難い。従って菌が許容できる変異は限られ、臨床現場で見られる薬剤耐性変異の種類は概ね決まっている。一次選択薬であるリファンピシンの標的であるRNAポリメラーゼβサブユニット(コード遺伝子: *rpoB*) や、キノロンの標的であるジャイレースAサブユニット (*gyrA*) 上の変異がこれに当たる。RpoB上で最も頻繁に見られる変異は450番目のセリンがロイシンに置換したS450Lであり、菌にとって最も負担の少ない変異であることが知られている<sup>1)</sup>。これらの限られた点変異の

有無を調べることにより、耐性判定が可能となる。

### 2. 薬剤活性化酵素の失活による耐性化

イソニアジドやピラジナミドはプロドラッグの形で投与され、菌体内の酵素の作用により活性型となる。従って、これらの酵素、各々カタラーゼKatG及びピラジナミダーゼPncAが失活すれば、菌は耐性を獲得する。酵素の失活 (loss-of-function) を招く変異であれば良いため、コード遺伝子の欠失も含め変異の種類は多種多様で、特定の点変異の検出による診断は難しい。

ただし、イソニアジドを活性化するKatGについては、菌がマクロファージの食胞内において産生される過酸化物を還元する際に重要な役割を果たしているため、この活性を失った菌はマクロファージ内での生存能を損なう。このカタラーゼ活性を殆ど損なうことなくイソニアジドの活性化能を損なう変異としてKatG S315Tがあり、この変異を獲得した株はイソニアジド耐性を保ったまま体内で増殖し、次の宿主へ感染することができる<sup>2)</sup>。現在、世界で蔓延している多剤耐性株の大半がこの変異を獲得しており、その優位さが理解できる。

### 多剤耐性結核菌の蔓延

日本や他の結核低蔓延国では多剤耐性結核の伝播の例は多くなく、発生しても通常はコントロール可能である。しかし、世界的に見るとその増加、蔓延が問題となっており、新患における多剤耐性結核の割合は3~4%、治療歴がある場合は18%と推定されている<sup>3)</sup>。また、旧ソビエト連邦の構成国で多剤耐性結核が蔓延している国では、初感染時に既に30~40%が多剤耐性であると推定されるため、こうした国では当初から薬剤耐性の有無を確認すべきであろう。多剤耐性結核が増えている原因は個々の患者の治療の失敗ではなく、多剤耐性菌の伝播による可能性の方が高いという解析結果が報告されている<sup>4)</sup>。

かつて、薬剤耐性を与える変異は、菌にとって重要な分子に構造変化を与えるため、生存に不利となり、他者への伝播はしにくいと考えられてきた。ところが、

多剤耐性菌株によるアウトブレイクが諸所で散見されるようになり、それらの菌では薬剤耐性を与える遺伝子変異に加え、その負荷を軽減するための補完的な変異 (compensatory mutation) が生じていることが全ゲノム解析によって示された<sup>5)</sup>。とりわけリファンピシン耐性株で優位となる RpoB S450L 変異株では、 $\beta$  サブユニットと共に RNA ポリメラーゼを構成する他のサブユニットをコードする *rpoC* や *rpoA* 上にアミノ酸置換を伴う変異が見られ、この補完変異を獲得した多剤耐性株ほど追加の薬剤耐性変異を獲得し、また他者へ伝播される可能性が高いという報告がある<sup>6)</sup>。また、Torres らが17年間に亘って同一地域から継続的に収集された耐性菌ゲノムを解析した結果、*rpoB* 変異株の一部はほぼ同時に補完変異を獲得しており、また残りの株も徐々に獲得していく様子が観察されているため<sup>7)</sup>、補完変異の獲得が、菌が耐性株として適応して行く上で重要であることが窺える。

#### 危険な多剤耐性株の識別

多剤耐性結核菌は全て患者本人にとっては危険だが、他者に移らないタイプのもは地域社会に対する危険度は低い。例えば、日本の高齢者に多く見られる KatG S315T 以外の KatG 変異を持つ耐性菌は、マクロファージ内で殺滅されるため通常の免疫機能を保つ他者への感染は起こらない。一方、アジア地域各所で蔓延している多剤耐性株の殆どは KatG S315T 変異を有しており、この変異は他者へ感染する危険な耐性株のマーカーとなる。また、結核菌の系統の中で日本を含めたアジアで多く見られる北京型は、他の系統よりも増殖スピードが速く、薬剤耐性に係る遺伝子変異を獲得しやすいことが知られている<sup>7)</sup>。実際、国境を越えた蔓延を示す多剤耐性株には、旧ソビエト連邦諸国で猛威を振るっている W148 株を含め北京型が多く見ら

れ、北京型であることも危険な株のマーカーとなると考えられる<sup>8)</sup>。

結核の場合は大半の薬剤耐性はゲノム上の変異で診断可能なため、低蔓延国における多剤耐性菌の薬剤感受性判定は、次世代シーケンサーを用いた方法が最も合理的と考えられる。ただし、多剤耐性結核が蔓延している多くの国では電力の安定供給や検査要員の確保といった問題を抱えており、より簡便な方法が現実的である。多剤耐性結核の蔓延を防ぐためには感染環を断ち切ることが最重要であるが、高蔓延国では患者数に対して収容施設の整備が追い付かないため、多剤耐性結核で排菌している患者を自宅へ帰している現状がある。もし、その感染菌が他者に移りやすく、更なる耐性を獲得しやすい危険な株か否かが簡便に判る方法があれば、そうした患者を優先的に収容する等の対策を取ることができる。

精密機器を使用せずに特定の遺伝子を増幅する方法として、栄研化学の LAMP 法を始めとした等温増幅法があり、それを核酸クロマトグラフィーと組み合わせ、*rpoB* 上の点変異を検出する方法が報告された<sup>9)</sup>。次世代シーケンサーを用いた大規模な全ゲノム解析から、今後も危険な株を示唆する情報が次々と報告されて来ることが予想されるが、それらのデータを元に簡易キットを作製する等、蔓延国の現場に還元して行く流れが必要である。

#### 参考文献:

- 1) Gagneux S et al, The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2006; 312: 1944-46.
- 2) Wengenack NL et al, Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* KatG(S315T) is a competent catalase-peroxidase with reduced activity toward isoniazid. *J Infect Dis*. 1997 Sep;176(3):722-7
- 3) WHO. 2023. Global tuberculosis report 2023
- 4) Kendall EA et al, Burden of transmitted multidrug resistance in epidemics of tuberculosis: a transmission modelling analysis. *Lancet Respir Med* 2015; 3: 963-72.
- 5) Comas I et al, Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet* 2011; 44: 106-10.
- 6) Going GA et al, Effect of compensatory evolution in the emergence and transmission of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Cape Town, South Africa: a genomic epidemiology study. *Lancet Microbe* 2023; 4(7):e506-e515.
- 7) Torres Ortiz A et al, Genomic signatures of pre-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* 2021; 12: 7312.
- 8) Merker M et al, Transcontinental spread and evolution of *Mycobacterium tuberculosis* W148 European/Russian clade toward extensively drug resistant tuberculosis. *Nat Commun*. 2022;13(1):5105.
- 9) Takarada Y et al, Rapid detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, based on isothermal DNA amplification and DNA chromatography. *J Microbiol Methods*. 2020;177:106062.

