

2003年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－調査・共同研究に対する助成－

2004 年 2 月 23 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 菅 原 勇 

所属機関名 (財)結核予防会結核研究所

部署・役職 抗酸菌レプリカセンター・センター長

所在地 〒204-0022 東京都清瀬市松山3-1-24

電話 0424 93 5075 (直) 内線

1. 研究テーマ

中国河南省における多剤耐性結核の分子病理学的研究－リファンプリン耐性：カ点
もあいて

2. 研究期間 自 2003 年 4 月 1 日 ～ 至 2004 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 菅 原 勇

所属機関 (財)結核予防会結核研究所 職名 センター長

中国側研究者氏名 王 国 斌

所属機関 河南省胸科医院 職名 主任医師

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

中国河南省における多剤耐性結核の分子病理学的研究—リファンピシン耐性に力点を置いて

研究者氏名	菅原 勇
日本所属機関	(財) 結核予防会結核研究所
研究者氏名	王 国斌
中国所属機関	河南省胸科医院

要旨：

中国河南省胸科医院で、2001年1月1日から同12月31日までに集められた結核菌188検体のリファンピシン耐性を調べた。136検体がリファンピシン耐性で、そのうち125検体に *rpoB* 遺伝子の突然変異が、DNA シークエンス法で、見つかった。*rpoB* 遺伝子のクラスター領域に変異を有し、531、526番目の変異が多かった。これをHPLCを用いたヘテロデュプレックス法で解析しても、結果が一致した。これらの解析結果は、リファンピシン耐性率が非常に高いことを意味し、リファンピシン耐性を減少させる結核対策を取る必要がある。

Key Words： リファンピシン耐性、河南省、*rpoB*、多剤耐性結核

緒言：

中国河南省は、安徽省と同じく農業労働者が多い。農業労働者の収入も低いことから結核の治療も不十分だと考えられている。それ故、抗結核剤耐性結核の頻度も高いと考えられる。今回、薬剤感受性試験で、耐性と診断されたリファンピシン耐性結核菌を、95℃30分加熱処理した後、結核研究所に送ってもらい、遺伝子レベルでどのくらいリファンピシン耐性が存在するかを共同研究することにした。リファンピシン耐性に関する *rpoB* 遺伝子突然変異をDNA シークエンス法とHPLCを利用したヘテロデュプレックス法を用いて解析した。

対象と方法：

対象は、2001年1月1日から同12月31日まで中国河南省胸科医院外来を受診した結核患者から採取した結核菌188検体を用いた。この中には、結核再発例と初診例が混じっている。詳しい情報は、手に入っていない。これをLowenstein-Jensen培地で培養した後、95℃、30分間加熱処理した後、結核研究所に検査のため送られた。結核感受性試験は、リファンピシン40μg/mlの濃度で、Lowenstein-Jensen培地を用いた比率法で感受性、耐性を判定した。送られた検体から、型のごとく、DNAを抽出し、*rpoB* 遺伝子βunitのクラスターI領域をカバーするようにプライマを設計した。PCRで増幅したPCR産物を精製した。その後、精製産物を用いてDNAシークエンサ(ABI PRISM Model377)にて増幅産物の塩基配列を決定した。増幅産物の遺伝子突然変異の有無を別の方法(HPLCを用いたヘテロデュプレックス法)で解析した。対象として感受性結核菌H37Rvから得られたDNAを用いた。変性条件は、66.4℃を用いた。

結果：

リファンピシンを用いた薬剤感受性試験では、188検体中136検体(72.3%)が、リファンピシン耐性であった。そのうち125検体で *rpoB* 突然変異が認められた(92%)。これらの以上は、すべていわゆる *rpoB* 遺伝子のクラスターIの領域に入っていた。最も多かったのは、531番目の突然変異で、次に多いのが526番目の突然変異だった。この突然変異が、本当に正しいかどうかを別の方法(HPLCを用いたヘテロ

デュプレックス法、Transgenomics 社製）で検討した。図 1 にそのうちの数例を示している。感受性株である H37Rv（一番上）には、異常な波形が見られないが、突然変異がある結核菌では、矢印で示したように、異常な波形が見られた。この方法での、突然変異検出率は、完全に、DNA シークエンス法と一致した。

考察：

我々の予想に反して、リファンピシン耐性検出率が、以前の報告値より低かった。この症例には、再発例と初発例が混じっている。大部分は農業労働者で、年齢は、16 歳から 74 歳までであった。詳しい情報が、聞けない例もあった。それでも、どうしてこのようにリファンピシン耐性頻度が高いのか。共同研究者である王先生と話し合った結果、1) 売薬を飲んでいて、病院に行かない患者がいる、2) 結核の治療を受けていたが、医療代が払えず、途中で退院した患者が、悪化して再び外来に来た、3) 抗結核薬を、規則正しく飲まない患者がいる、が主な原因と考えられた。我々のデータは、多剤耐性結核を減少させる対策を立てる上で、有用な情報を与えてくれる。結核対策には、このようなデータベースの構築が必要である。

地方に行くと、十分に抗結核薬が供給されていないことが多い。従って、日本政府が既に行っているが、薬物の無償援助がもっと必要である。結核に他する意識を高めて、規則正しく薬物を服用させねばならない。WHO が薦めている DOTS(directly observed therapy short-course)を出来るだけ早く採用すべきである。

rpoB 突然変異を検出するのに用いた HPLC を用いた Heteroduplex 法は、簡便で、再現性がある。しかも、増幅産物を精製する必要がないので、DNA シークエンス法よりコストが安く済む。途上国での多剤耐性結核菌の診断に、非常に有用である。

リファンピシン耐性結核菌は、他の抗結核薬物にも耐性な結核菌が多い。次の、課題は、イソニアジッド耐性結核菌の頻度を調べることである。

参考文献：

1. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wiele B, Musser JM, and Jacobs WR. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to EMB. Nature Med 1997; 3: 567-570.
2. Telenti A et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993; 342: 647-650.
3. Cooksey RC, Morlock GP, Holloway BP, Limor J, and Hepburn M. Temperature-mediated heteroduplex analysis performed by using denaturing high-performance liquid chromatography to identify sequence polymorphisms in mycobacterium tuberculosis complex organisms. J. Clin Microbiol 2002; 40: 1610-1616.

作成日： 2004 年 2 月 23 日