



Title	日本で臨床分離された迅速発育抗酸菌株における疫学的特徴、および薬剤感受性に関する研究
Author(s)	鎌田, 啓佑; Kamada, Keisuke
Description	配架番号 : 2518
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14054号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14054
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94722
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Kamada.pdf



学位論文

日本で臨床分離された迅速発育抗酸菌株における

疫学的特徴、および薬剤感受性に関する研究

(Studies on epidemiological characteristics and drug susceptibility
profile of Rapidly Growing Mycobacteria clinically isolated in Japan)

2020 年 3 月

北海道大学

鎌田 啓佑

Keisuke Kamada

学位論文

日本で臨床分離された迅速発育抗酸菌株における

疫学的特徴、および薬剤感受性に関する研究

(Studies of epidemiological characteristics and drug susceptibility
profile of Rapidly Growing Mycobacteria clinically isolated in Japan)

2020 年 3 月

北海道大学

鎌田 啓佑

Keisuke Kamada

目次

発表論文目録および学会発表目録……………1 頁

要旨……………3 頁

略語表……………7 頁

緒言……………9 頁

第一章 日本における迅速発育抗酸菌の疫学と地域差

緒言……………13 頁

方法……………15 頁

結果……………19 頁

考察……………27 頁

第二章 日本における迅速発育抗酸菌の薬剤感受性

緒言……………29 頁

方法……………31 頁

結果……………35 頁

考察……………47 頁

総括および結論	51 頁
謝辞	53 頁
利益相反	54 頁
引用文献	55 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である

1. Keisuke Kamada, Atsushi Yoshida, Yasutomo Itakura, Shigekazu Iguchi, Yuko Arai, Yutaka Uzawa, Satoshi Konno, Masahiro Shimojima, Ken Kikuchi, Nationwide surveillance of antimicrobial susceptibility for 509 rapidly growing mycobacteria strains isolated from clinical specimens in Japan

Journal of antimicrobial and chemotherapy

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 鎌田 啓佑、吉田 敦、水島 遼、板倉 泰朋、井口 成一、荒井 裕子、鵜沢 豊、菊池 賢、霜島 正浩
迅速発育抗酸菌同定における superoxide dismutase A (*sodA*) 遺伝子シーケンシングの評価
第2回抗酸菌研究会
2017年11月23-24日
国立感染症研究所（東京）
2. 鎌田 啓佑、吉田 敦、水島 遼、井口 成一、板倉 泰朋、菊池 賢、霜島 正浩
日本国内における迅速発育抗酸菌の疫学とその特徴
第29回臨床微生物学会
2018年2月9-11日
長良川国際会議場（岐阜）
3. Keisuke Kamada, Atsushi Yoshida, Ryo Mizushima, Yasutomo Itakura, Shigekazu Iguchi, Yuko Arai, Yutaka Uzawa, Masahiro Shimojima, Ken Kikuchi
Geographical Distribution and Regional Difference among Clinical Isolates of

Rapidly Growing Mycobacteria Species in Japan
29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease
April 13-16, 2019
RAI Amsterdam (Amsterdam)

4. Keisuke Kamada, Atsushi Yoshida, Ryo Mizushima, Yasutomo Itakura, Shigekazu Iguchi, Yuko Arai, Yutaka Uzawa, Masahiro Shimojima, Ken Kikuchi
Antimicrobial Susceptibilities to 24 drugs of 491 Rapidly Growing Mycobacteria from Clinical Isolates in Japan
29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease
April 13-16, 2019
RAI Amsterdam (Amsterdam)

要旨

【背景と目的】

迅速発育抗酸菌による感染症は近年増加傾向にあるが、菌種同士が近縁であることから正確な菌種同定のためには煩雑な遺伝子学的手法が必要となることもあり十分な検査が行われてこなかった。そのため日本国内における疫学的な地域差は十分にわかっていない。また、迅速発育抗酸菌には *Mycobacteroides abscessus* group=MAG を始めとして難治性の感染症の原因となる菌種が多いが、薬剤感受性試験についてもこれまで商業ベースでの測定が出来ず、日本国内で分離される迅速発育抗酸菌の薬剤感受性は大部分が不明なままであった。今回の我々の目的は大きく分けて2つある。一つ目は菌種同定のために十分な遺伝子学的手法を用いることで正確な菌種同定を行い、日本で分離される迅速発育抗酸菌の地域や検体種別による差異を評価することである(第一章)。二つ目は日本の迅速発育抗酸菌の薬剤感受性プロファイルを明らかにすると同時に、今後、新規治療薬の候補となり得る薬剤の探索を行うことである。(第二章)。

【材料と方法】

第一章：2012年1月から2019年3月までに日本全国各地でヒト臨床検体から分離された RGM 532 株(下気道 428 株、非下気道 79 株 皮膚軟部組織 27 株、膿瘍 17 株、CAPD 関連 13 株、血液 11 株、耳漏 6 株、骨 2 株、その他 3 株、不明 8 株)を対象とした。菌種同定は house keeping gene(*hsp65*, *rpoB*, *sodA*)の遺伝子シーケンス解析を行った。MAG と同定された菌株に対しては全株で PCR-based typing scheme と *erm*(41)遺伝子のシーケンス解析を用いて亜種を評価した。

第二章：薬剤感受性試験は上記の株のうちの 509 株に対する 24 種の抗菌薬 MIC を CLSI M24A-2 に準じて微量液体希釈法を用いて測定した。また薬剤耐性株については *rrl*, *rrs*, *gyrA*, *gyrB* 遺伝子などの遺伝子変異を必要に応じて調査した。

【結果】

第一章：全体で 15 菌種が同定され下気道検体、非下気道検体のいずれでも分離された上位 3 菌種は同一であったが、それぞれにおいて MAG が占める割合は非下気道検体では下気道検体と比較して有意に低かった。また、北日本ではその他の地域と比較して分離された迅速発育抗酸菌の中で MAG が占める割合が有意に高かった。沖縄は他地域と比較して *Mycobacteroides abscessus* subsp. *abscessus*=MAB における C28 sequevar の割合が有意に高かった。

第二章：最も多くの菌種に対して感受性が良好であった薬剤は amikacin と linezolid であった。大部分の RGM 菌種において arbekacin、sitafloxacin がそれぞれアミノグリコシド系抗菌薬、キノロン系抗菌薬のなかで最も低い MIC 値を示した。cefmetazole は cefoxitin と同じセファマイシン系抗菌薬の一種で全ての菌種で類似した MIC 値を示した。

また、MAB における rifabutin MIC ≤ 2 mg/L を示す菌株の割合が有意に *Mycobacteroides abscessus* subsp. *massiliense*=MMA よりも高いことがわかった。*M. fortuitum* の中に少ないながらもキノロン系抗菌薬に対して耐性を示す株が存在しその中の一部が QRDR 領域にアミノ酸変異(S83W)をもつことが明らかになった。

【考察】

第一章：下気道検体から分離される RGM 菌種と非下気道検体から分離される RGM 菌種の特徴をこれまで不明だった MAG の亜種にまで踏み込んで明らかにした。非下気道検体から分離される MAG の割合は下気道検体から分離される MAG の割合と比較して有意に低いこと (68.4% vs 35.9%)、また、非下気道検体から分離される MAG の亜種は MMA が有意であるのに対して (54.6%)、下気道検体から分離される MAG の亜種は MAB が有意 (58.8%) であることがわかった。同一地域内での検体種別間で MAG の中の優位な亜種が異なることは過去に示されておらず今回の我々の調査は貴重な疫学情報といえる。

また、北日本(北海道+東北)で分離される RGM が他地域と比較して MAG の割合が高いことが示されたがこれは北日本から集められた検体のほとんどが下気道検体であったことも関係しているかと思われた。しかし全ての地域の下気

道検体のみで同様の検討を行っても同様の結果となった。北日本は平均気温、日照時間、降水量などが他地域と比較してより低値であることから分離頻度の差異を生んだ原因として気候条件の関与を第一に考えたが、分離された菌種間でのこれらのパラメータの統計学的な有意差は示せなかった。

MAB における C28 sequevar を有する菌株の割合が沖縄では非常に高く国内の他地域よりも台湾からの報告に近い値であった。C28 sequevar を有する菌株はマクロライド感受性であることが多いことから、沖縄での MAB 感染症は国内の他地域で分離された MAB と比較して治療予後が良い可能性がある。

第二章：RGM に対する arbekacin の MIC に関する報告はこれまでには無かったが、今回の研究で対象となったほぼ全ての RGM 菌種で arbekacin の MIC 値はアミノグリコシド系抗菌薬の中で最も低かった。過去の報告で sitafloxacin の MIC 値が他のキノロン系抗菌薬と比較して低いこと示唆されていたがより多くの菌種でも同様の結果であることを今回の研究で示した。また、cefmetazole は cefoxitin と同じセファマイシン系抗菌薬の一種で全ての菌種で類似した MIC 値を示したことから日本のように cefoxitin を使用できない地域では、cefmetazole は治療薬の選択肢になり得るかもしれない。近年、rifabutin は内服可能な MAG の治療薬としてその有効性が示唆されているが、これまでに CLSI の推奨する CAMHB 培地で微量液体希釈法を用いて測定された MIC 値についてはまとまった報告はなかった。今回我々は、多数の菌株を対象に rifabutin MIC 値を測定し、さらに MAB に対する MIC が MMA に対する MIC よりも低いことを示した。MAB は clarithromycin だけでなくキノロン系抗菌薬にも非常に高い耐性率を示しており、内服可能な治療薬の探索が喫緊の課題であることから、今後 rifabutin がその役割を果たす可能性があるか十分に検証していく必要がある。

【結論】

第一章：下気道検体と比較して非下気道検体から分離される RGM では MAG が占める割合が少ない。また北日本で分離される RGM は MAG の割合が高い。沖縄で分離される MAB は国内の他地域と比較して治療予後がよいとされる *erm*(41)C28 sequevar を有する割合が高い。

第二章：日本で分離された RGM15 菌種の薬剤感受性プロファイルを示した。

Arbekacin, sitafloxacin は RGM 感染症に対する新規標準治療薬の選択肢となる可能性を秘めている。また rifabutin は MAB に対する内服可能な治療薬の候補となりうる。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ABK	arbekacin
AMC	amoxicillin / clavulanic acid
AMK	amikacin
AZM	azithromycin
CAPD	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
CIP	ciprofloxacin
CLR	clarithromycin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMZ	cefmetazole
CRO	ceftriaxone
DOR	doripenem
EB	ethanbutol
ET	early time
FEP	cefepime
FOX	cefoxitin
FRP	faropenem
GEN	gentamycin
<i>hsp65</i>	heat shock protein 65
IPM	imipenem
LT	late time
LVX	levofloxacin
LZD	linezolid
MAB	<i>Mycobacterioides abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>
MAG	<i>Mycobacterioides abscessus</i> group
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry
MBO	<i>Mycobacterioides abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>
MCHL	<i>Mycobacterioides chelonae</i>
MEP	meropenem
MFRT	<i>Mycobacterium fortuitum</i>

MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MIN	minocycline
MLST	multilocus sequence typing
MMA	<i>Mycobacteloides abscesssus</i> subsp. <i>massiliense</i>
MXF	moxifloxacin
NTM	non tuberculous mycobacteria
PCR	polymerase chain reaction
RFB	rifabutin
RGM	rapidly growing mycobacteria
<i>rpoB</i>	RNA polymerase <i>B</i> subunit
<i>sodA</i>	superoxide dismutase A
STF	sitafloxacin
SXT	trimethoprim / sulfamethoxazole
TGC	tigecycline
TOB	tobramycin

緒言

迅速発育抗酸菌(rapidly growing mycobacteria=RGM)は非結核性抗酸菌のうち、培地塗布後、1週間以内に発育しコロニーを形成するものを指す。非結核性抗酸菌は近年、新菌種の報告が相次いでおり 200 菌種を超えるが、そのうち RGM は約 100 菌種と半分程度を占めている(Forbes et al., 2018)。非結核性抗酸菌(non tuberculous mycobacteria: NTM)による感染症は近年、世界的に増加傾向であることが指摘されており、本邦でも結核による感染症が減少傾向であることとは対照的に NTM による感染症が増加していることが示唆されている(Namkoong et al., 2016)。また NTM 感染症の中でどのような菌種による感染が多いかという疫学情報は地域ごとに差異があることが知られているが RGM が占める割合は世界各地域の中でも特に東アジアで高いことが報告されている(Hoefsloot et al., 2013)。前述の本邦での報告では増加しつつある NTM の中でも特に RGM の主要菌種である *Mycobacteroides abscessus* group による肺感染症が過去 15 年で 5 倍に増加していることが示唆されている(Namkoong et al., 2016)。

今回、著者が RGM を研究テーマとして選んだ最も大きな理由は、RGM によって引き起こされる感染症の多彩さ、およびその難治性にある。呼吸器内科または感染症科の臨床医として肺感染症だけではなく、皮膚軟部組織感染、血流感染を始めとする多彩な肺外感染症の診療にあたる中で、再発を繰り返すなど治療に難渋しそして時に不幸な転帰を辿る症例も多く経験したことが研究を進めていく上での最も大きな動機となった。治療失敗症例では点滴抗菌薬を併用する初期治療から、外来に移行するために内服抗菌薬へ変更することが病状悪化へとつながることが多く有効な内服治療薬レジメンをどのように組み立てていくかが最も重要な点であると考える。

RGM 感染症についてはいくつかの解決されていない大きな問題点が存在する。まず、第一の問題点は菌種同定法である。長らく本邦では DDH マイコバクテリ

ア(極東製薬)キットによる菌種同定が行われてきたがこのキットでは非結核性抗酸菌は18菌種のみが同定可能でその中に含まれるRGMはわずか4菌種であった。通常の一般細菌で菌種同定の際に用いられる house keeping gene の一つである 16S-rRNA 遺伝子シーケンス解析については RGM では菌種同士が近縁であるため判別が困難となるケースが多いことから (Stackebrandt et al., 2002)、RNA polymerase B subunit(*rpo-B*)遺伝子や heat shock protein65(*hsp65*) 遺伝子のシーケンス解析 (Adekambi et al., 2003; Telenti et al., 1993) や MALDI-TOFMS による質量分析 (Rodríguez-Sánchez et.al., 2015) などが近年用いられている。しかし、これらの検査間での優劣は十分に示されているとは言い切れず臨床の現場での最適な菌種同定法については未だ議論の余地が残るところである。

第二の問題点として本邦における RGM 感染症の疫学情報に不明点が多いことが挙げられる。RGM に限らず、抗酸菌の菌種分布は地域ごとに大きく異なっており、本邦の疫学情報を得ることは重要である。過去に複数の大規模臨床検査センターで収集された下気道検体から分離された NTM を対象とした調査では *M. abscessus* group による肺感染症は九州・沖縄地域で他の地域よりも多いことが示唆されている (Morimoto et al., 2017)。この結果は極めて意義のあるものではあったが菌種同定法が前述の DDH マイコバクテリアによるものであること、*M. abscessus* group における亜種に関する疫学 (亜種間のマクロライド感受性の差異によって治療予後にも差が生じる) や *M. abscessus* group 以外の菌種に関する疫学は不明であること、肺外感染症に関する疫学については完全に不明であることなど今後明らかにしていく必要のある課題が山積しているのが現状である。

第三の問題点は治療に関するものである。RGM 感染症は一般的に難治性で、慢性化し治療は抗菌薬を多剤併用し長期の治療期間を要するケースが非常に多い (Nessar et al., 2012)。有効な治療薬を判定するために治療開始前に薬剤感受性検査を施行することが CLSI では推奨されている (Wayne., 2011) が、本邦では長

らく商業ベースでの検査を行うことができず、ごく一部の専門機関でのみ感受性検査が施行され、多くの症例では感受性データなしでの治療を行わざるを得ない状況が続いていた。そのため RGM の薬剤感受性に関するプロファイルも他地域と比較して不明な点が多いのが現状である。近年、様々な抗菌薬の *M. abscessus* group に対する活性が報告されている (Pandey et al., 2019; Kim et al., 2017) が臨床試験はおろか、十分な数の臨床分離株における vitro での検証すら進んでいないものも多い。実際に現在推奨されている治療レジメンでは奏効率には限界があり新たな選択肢となる治療薬の探索が求められている状況である。

本研究では以上の 3 つの問題点を踏まえたうえで、東京女子医大感染症科に解析依頼のあった菌株だけでなく臨床検査センターである BML と提携し全国各地から 500 株以上の RGM 菌株を収集した。

まず第一章では日本を北海道、東北、関東、中部、近畿、中国、四国、九州、沖縄の 9 つの地域に分け国内で分離された RGM の菌種に地域的な疫学差が存在しないかどうかを検討し、また主要菌種については分離された地域をさらに都道府県単位で分類し、各菌株が分離された地域の平均気温、湿度、降水量、日照時間などの気象条件について菌種間で差異がないかどうかを検証した。またこれまでに報告の乏しかった非下気道検体由来の RGM の疫学についても調査を行いその特徴を示した。そして第二章では、国内で分離された RGM の薬剤感受性プロファイルを調査するために各菌種に対する 24 種の抗菌薬の MIC (最小発育阻止濃度) を測定した。この調査の中では特に RGM の中で最も分離される頻度の高い *M. abscessus* group については亜種同定のために erythromycin ribosome methyltransferase = *erm*(41) 遺伝子のシーケンス解析だけでなく PCR-based typing scheme (Shallom et al., 2013) まで施行した。また複数菌種にまたがり既知の薬剤耐性遺伝子である *rrl*, *rrs*, *gyrA*, *gyrB* 遺伝子変異の検索を必要に応じて行い本邦の各種抗菌薬耐性株の耐性遺伝子変異保有率を調査した。これらの調査を通じて今後新規治療薬の候補となる複数の薬剤を検証し報告することで、将来的に臨床試験における検証、ひいては新たな標準治療薬へとつながっていくことを期待したい。

これらの一連の研究は本邦における RGM 感染症の概観を把握し今後のより良い治療方法を探索していく上での統合的な研究である。

第一章 日本における迅速発育抗酸菌の疫学と地域差

【第一章緒言】

冒頭で述べたように、非結核性抗酸菌 (non tuberculosis mycobacteria: NTM) による感染症は世界的にみても増加傾向であり、特にアジアは非結核性抗酸菌による感染症の中で迅速発育抗酸菌 (rapidly growing mycobacteria=RGM) が占める割合が高い地域である (Hoefsloot et al., 2013)。本邦の調査でも RGM の中で臨床の現場で最も問題となることが多い菌種である *M. abscessus* group (MAG) による肺感染症は九州・沖縄地方で他の地域と比較して多い事 (Morimoto et al., 2017)、過去 15 年で 5 倍に増えているとの報告があり (Namkoong et al., 2016)、今後もさらに増加していく可能性が高い。過去の疫学調査では気温や降水量、湿度などの気象条件が NTM の活動性と関与していることが示唆されている (Han., 2008; Adjemian et al., 2014)。

MAG には subspecies *abscessus* =MAB, subspecies *massiliense* =MMA, subspecies *bolletii* =MBO の 3 つの亜種が存在する。一般的に MAB および MBO は *erm*(41) 遺伝子の働きによってマクロライド系抗菌薬に対して誘導耐性を示すのに対して MMA は *erm*(41) 遺伝子に deletion を有し、その機能を失うことでマクロライド系抗菌薬に対する薬剤感受性が保たれていることが多く、この違いは実際に過去の報告で治療予後にも大きな影響を与えることが知られており (Guo et al., 2018; Pasipanodya et al., 2017)、正確な亜種同定が重要である。また、MAB の中でも *erm*(41) 遺伝子において T28C の点変異が起きている C28 sequevar 株についてはやはり *erm*(41) 遺伝子の機能が失われマクロライド感受性を示すことが知られている (Bastian et al., 2011)。

しかし本邦でこれまで菌種同定に用いられてきた DDH マイコバクテリアや MALDI-TOFMS では亜種決定が困難であるだけでなく、前述の house keeping gene のシーケンス解析でも単一遺伝子の解析では正確性を欠くとの報告がある (Macheras et al., 2009)。そのため MAG の亜種決定のための遺伝子学的手法がこれまでに複数報告されているが (Shallom et al., 2013; Nakanaga et al., 2014)、そのような手法を用いて得られた亜種や MAB の C28 sequevar に関する疫学情報も本邦にはこれまでまとまったものが存在しなかった。またここま

では MAG について述べてきたが、本邦では気道検体由来の菌株でも MAG 以外の RGM 菌種に関わる疫学や非気道検体から分離された（すなわち肺外感染症）RGM に関する疫学的特徴は不明な点が非常に多い。

今回我々は日本全国から下気道検体だけでなく非下気道検体由来の RGM も収集し、従来の報告よりもより詳細な遺伝子学的情報を基にした正確な菌種同定を行った。分離された RGM を地域間で比較することにより本邦における RGM 疫学の地域差を検討するとともに、そのような地域差に最も寄与している気候条件の検索を試みた。

方法

本研究は東京女子医科大学倫理審査委員会で倫理審査不要と判断された。

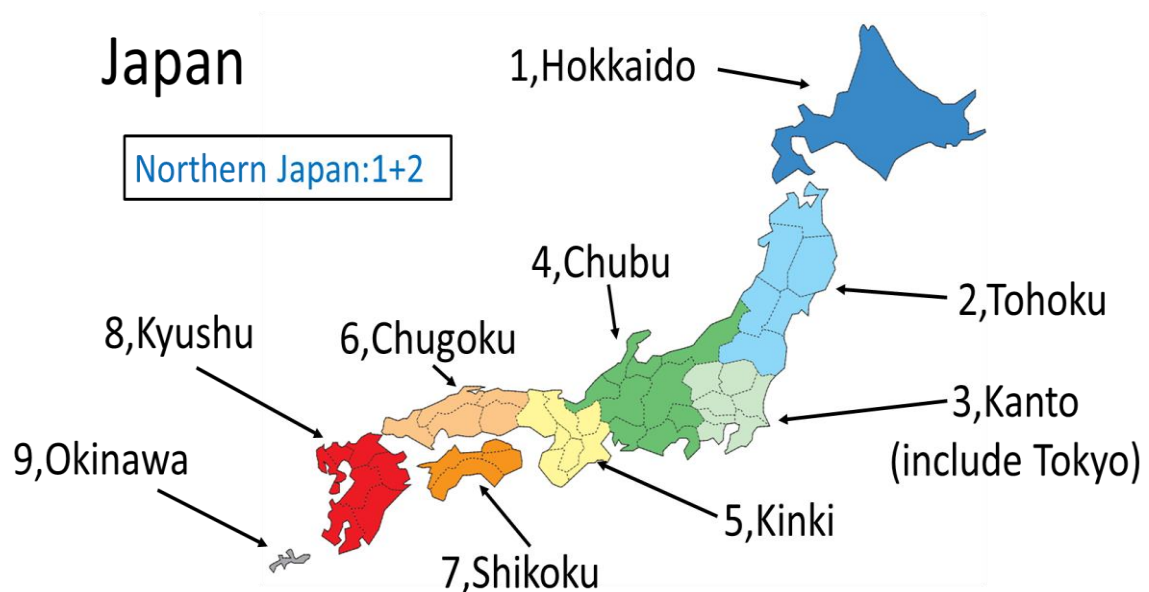
臨床検体から分離された菌株

2012 年 1 月から 2019 年 3 月までに日本全国各地でヒト臨床検体から分離された RGM 532 株(下気道 428 株、非下気道 79 株 皮膚軟部組織 27 株、膿瘍 17 株、CAPD 関連 13 株、血液 11 株、耳漏 6 株、骨 2 株、その他 3 株、 不明 8 株)を対象とした。418 株は日本の主要な臨床検査センターの一つである BML から提供を受けたもので残りの 114 株は国内の様々な医療機関から東京女子医大感染症科に菌株解析の依頼があったものである。本研究に組み込まれた菌株は以下の 3 つの基準を満たしている。

- i) 培養開始から 7 日以内に培地にコロニー形成したもの
- ii) ii)塗抹鏡検にて抗酸菌であることが確認されたもの
- iii) iii)菌株が複数回検出されている患者については最初の 1 株のみ

菌株の分離された地域

47 都道府県を 9 つの地域（北海道、東北、関東、中部、近畿、四国、中国、九州、沖縄）に分け、それぞれの地域から分離された菌株数とその検体種別の一覧を図 1 に示す。



	total	下気道(BML)	非下気道(BML)	不明
Hokkaido	29	29 (28)	0	0
Tohoku	20	18 (17)	2 (0)	0
Kanto	231	160 (135)	66 (5)	5 (2)
Chubu	79	70 (68)	8 (3)	1 (1)
Kinki	59	52 (51)	6 (2)	1 (1)
Chugoku	20	20 (20)	0	0
Shikoku	10	8 (7)	2 (0)	0
Kyushu	42	39 (38)	2 (2)	1 (1)
Okinawa	37	31 (31)	6 (6)	0
unknown	5	0	0	5 (0)
total	532	427 (395)	92 (18)	13 (5)

図 1. 日本の地域区分と各地域から分離された RGM 菌株

DNA 抽出

全ての菌株はトリプチケースソイ 5%ヒツジ血液寒天培地に塗布し 35°Cでサブカルチャーを行った上で、ISOPLANTII (Nippon GENE, Tokyo)を用いて添付

されているプロトコールに従い DNA を抽出した。

菌種同定のための PCR

菌種同定のために全ての菌株でハウスキーピング遺伝子である *rpoB*, *hsp65*, *sodA* の PCR を施行した。また、MAG については亜種決定のために追加検査として *erm*(41) 遺伝子の PCR だけでなく whole genome sequence のデータを基に発案された亜種判別法を施行した。使用したプライマーは以下に示す。

表 1. 第一章で使用したプライマー

Gene	Primer	sequence (5'-3')
<i>hsp65</i>	Tb11 (Forward)	ACCAACGATGGTGTGTCCAT
	Tb12 (Reverse)	CTTGTCGAACCGCATACCT
<i>rpoB</i>	MycoF (Forward)	GGCAAGGTCACCCCGAAGGG
	MycoR (Reverse)	AGCGGCTGCTGGGTGATCATC
<i>sodA</i>	sodF (Forward)	ACATCTCGGGTCAGATCAACGAGC
	sodR (Reverse)	GACGTTCTTGTACTGCAGGTA
<i>erm</i> (41)	<i>erm</i> (41)f (Forward)	GACCGGGGCCTTCTTCGTGAT
	<i>erm</i> (41)r1 (Reverse)	GACTTCCCCGCACCGATTCC
MAG PCR-based typing scheme		
MAB_4751	Forward	CCCGCATGCAGCTGGCCGCGCA
	Reverse	GCGCCAGTGGTGGGGCCACCCGT
MAB_2396	Forward	AGGCGGCCACCGACGTCGCGATGGA
	Reverse	TGCGCCCGCCCAGCGCGTATCCG
MAB_2697c	Forward	GACTCCGGTGGCCGCGGCGA
	Reverse	GCCGGAGCGCTGGGTGGGCT
MAB_4792	Forward	GCGGTGACGACCGCGGGGGCGAT
	Reverse	TCGGGGCAGGCCAGGGCGCCTA

DNA シークエンス解析

PCR 産物を 1.2% アガロースゲルに電気泳動し、目的のバンドが得られていることを確認した。PCR 産物に対して ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, Tokyo) を用いて精製し、サンガー法で DNA シークエンス解析を行った。

菌種同定のための DNA シーケンス比較と系統樹作成

得られた各菌株の DNA シーケンスは遺伝子ごとに各菌種の標準菌株の DNA シーケンスと比較し系統樹を作成した。系統樹は GENETYX ver.13 (GENETYX, Tokyo)で Kimura's two parameter correction model (1000 bootstrap 値)を用いた neighbor-joining 法によって作成した。

気象情報

主要 3 菌種については各菌株が分離された 47 都道府県の気象情報（年間平均気温、降水量、相対湿度、日照時間）をそれぞれ菌種ごとにプロットし菌種間で差異が認められないかどうかを確認した。これらの気象情報は統計局より公表されている「統計でみる都道府県のすがた 2019」を参照した。

統計学的解析

統計学的解析はフィッシャーの正確検定（気象情報の比較の際のみ Kruskal-Wallis 検定）を使用し、判定は $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。すべての統計解析は統計解析ソフトである GraphPad Prism ver. 8.2.0 for Windows(GraphPad Software, San Diego California USA)を用いて行った。

結果

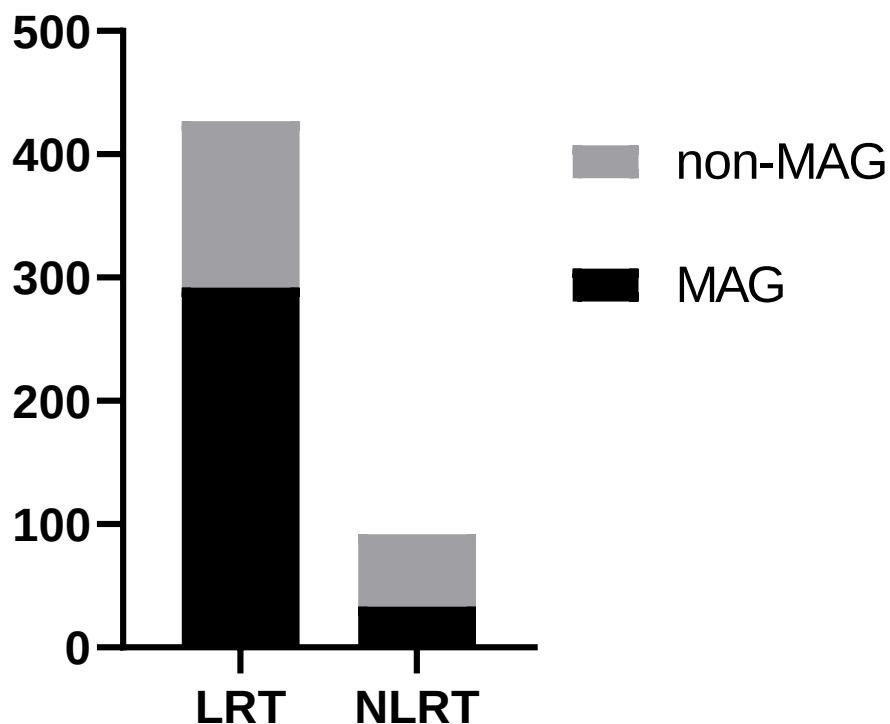
菌種種別と同定された菌種の結果を表 2 に示す。

15 菌種が同定され最も多かったのは MAG で全体の 63% を占めた。*M. peregrinum*, *M. senegalense*, *M. sphagni* の 3 菌種は下気道検体からのみに分離され、*M. mageritense*, *M. mucogenicum*, *M. wolinskyi*, *M. canariasense*, *M. immunogenum* の 5 菌種は下気道検体よりも非下気道検体からより多く分離された。また皮膚軟部組織由来の菌株は MAG, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. mageritense* の 4 菌種のみが分離されたのに対し、膿瘍や血液からは 8 菌種が分離されより多彩な起因菌が関与していることが示唆された。

表 2. 検体種別ごとの分離された RGM 菌種

	total	下気道	非下気道									不明
			非下気道	皮膚	膿瘍	CAPD関連	血液	耳漏	骨	その他		
			total	軟部組織								
MAG												
subsp <i>abscessus</i>	190	170	15	2	4	3	1	2	2	1	5	
subsp <i>massiliense</i>	138	115	18	6	2	2	4	4			5	
subsp <i>bolletii</i>	4	4	0									
unclassified	3	3	0									
<i>M. fortuitum</i>	91	71	20	9	4	3	1		1	2		
<i>M. chelonae</i>	60	39	20	12	3	1	2			2	1	
<i>M. peregrinum</i>	11	11	0									
<i>M. mageritense</i>	10	1	8	3	1	2	1			1	1	
<i>M. septicum</i>	5	4	1				1					
<i>M. mucogenicum</i>	4	1	2		1		1				1	
<i>M. porcinum</i>	3	2	1		1							
<i>M. wolinskyi</i>	3	0	3		2		1					
<i>M. goodii</i>	2	1	1							1		
<i>M. iranicum</i>	2	1	1			1						
<i>M. senegalence</i>	3	3	0									
<i>M. canariasense</i>	1	0	1				1					
<i>M. immunogenum</i>	1	0	1		1							
<i>M. sphagni</i>	1	1	0									
total	532	427	92	33	18	12	13	6	3	7	13	

MAG/nonMAG proportion



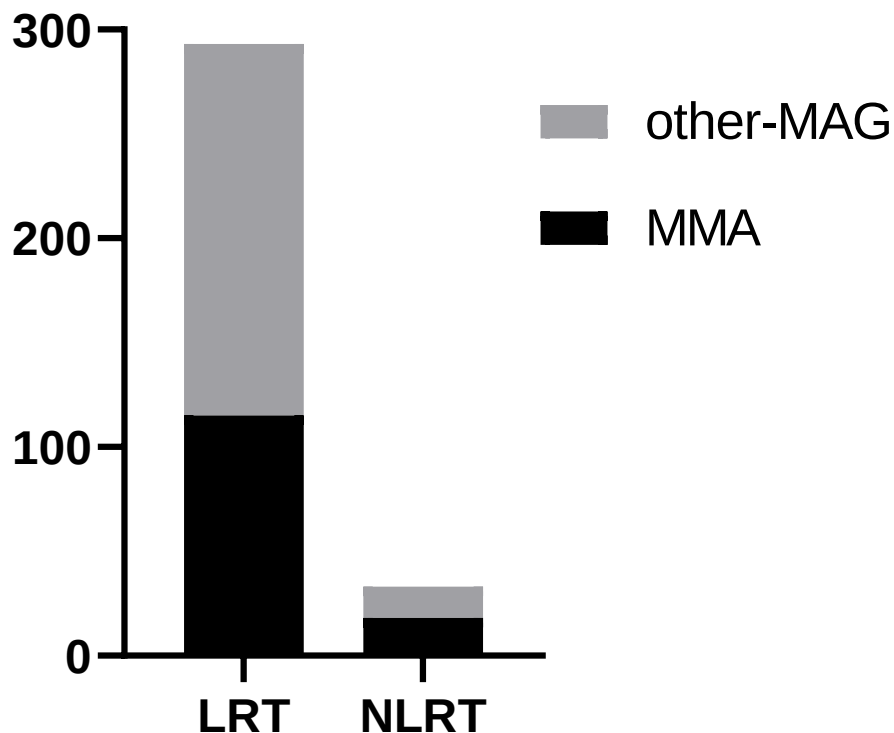
下気道(LRT=Lower Respiratory Tract)

非下気道(NLRT=Non- Lower Respiratory Tract)

図 2. 下気道検体と非下気道検体から分離された RGM 菌種の中で MAG が占める割合

下気道検体、非下気道検体のいずれでも分離された上位 3 菌種は同一であったが、それぞれにおいて MAG が占める割合は図 2 に示す通り非下気道検体では下気道検体と比較して有意に低かった。(非下気道検体 35.9% (33/92) vs 下気道検体 68.4% (292/427), $p < 0.001$, OR 0.26, 95%CI:0.16-0.42)

MMA/MAG proportion



下気道(LRT=Lower Respiratory Tract)

非下気道(NLRT=Non- Lower Respiratory Tract)

Other-MAG=MAB+MBO

図 3. 分離された MAG における MMA が占める割合の検体種別間の差異

下気道検体由来の MAG と非下気道検体由来の MAG の亜種を比較すると、非下気道検体由来の MAG の中で MMA の割合が高い傾向にあった。(非下気道検体 54.6% (18/33) vs 下気道検体 39.3% (115/293), $p=0.096$, OR 1.86, 95%CI:0.93 to 3.84)

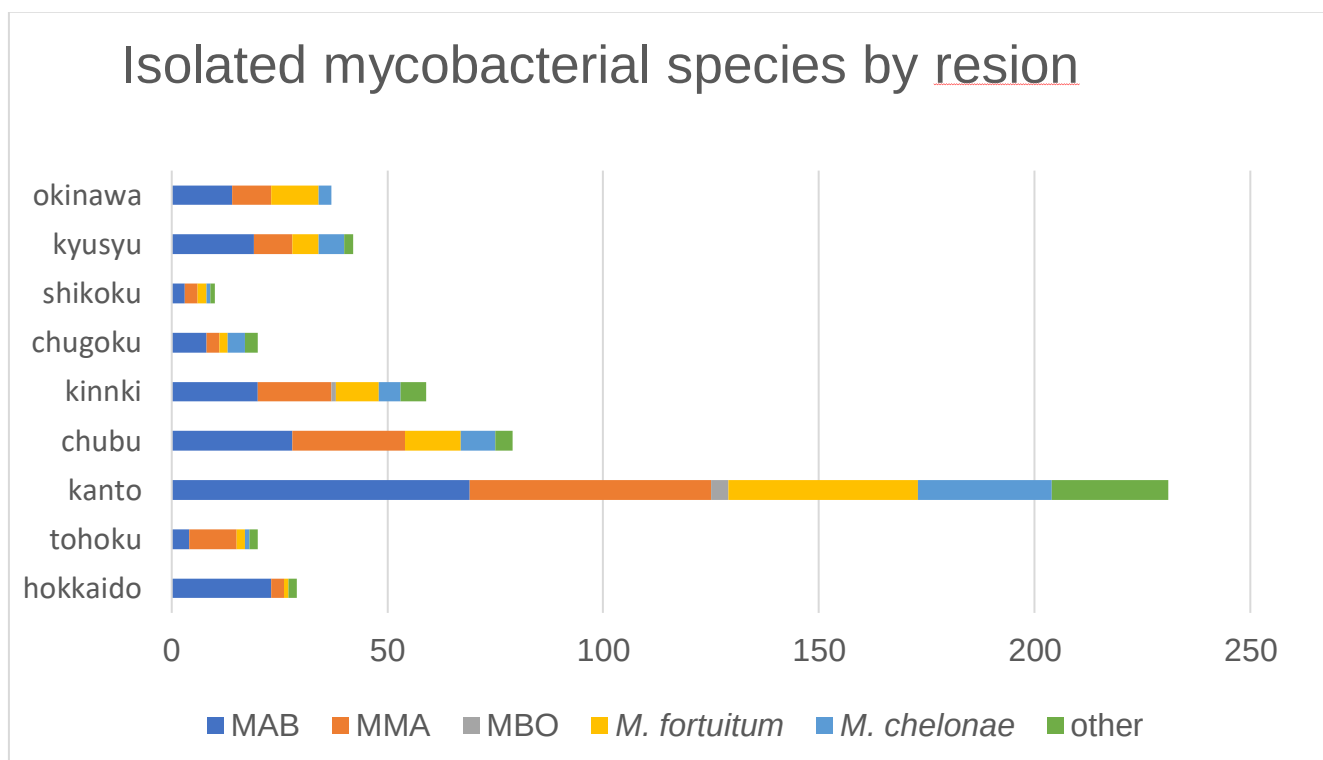


図 4. 地域ごとの分離された菌種の特徴

各地域で分離された菌株の中で MAG が占める割合は北海道 89.7%(26/29)、東北 75%(15/20)、関東 55.8%(129/231)、中部 68.4%(54/79)、近畿 64.4%(38/59)、中国 55%(11/20)、四国 60%(6/10)、九州 66.7%(28/42)、沖縄 62.2%(23/37)であった。

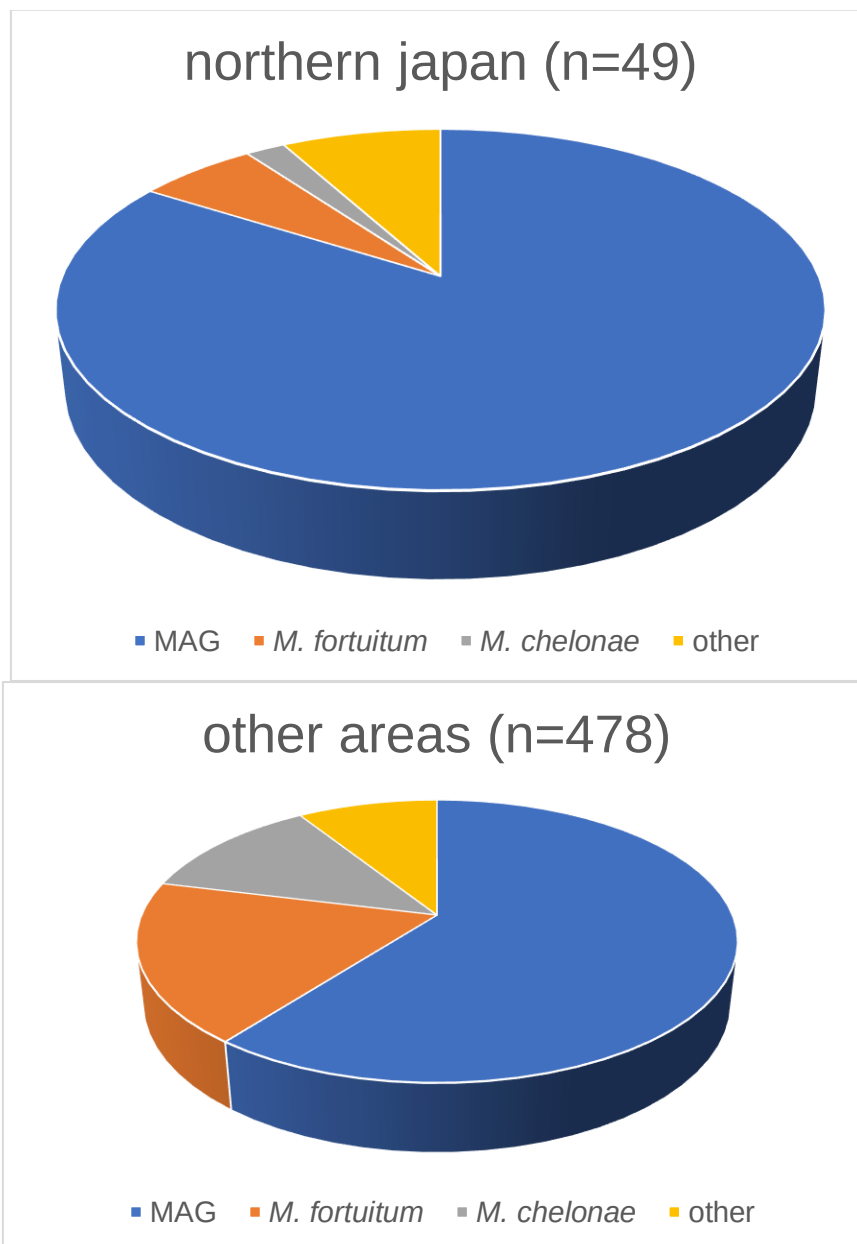


図 5. 北日本と他地域でそれぞれの地域で MAG が占める割合

北日本(北海道+東北)ではその他の地域と比較して有意に MAG が占める割合が高かった。(北日本 83.7% vs 他地域 60.5%, $p=0.001$, OR 3.35, 95%CI:1.56 to 7.07)

これらの結果は、北日本で非下気道検体から分離された菌株が少ない事が影響している可能性が考えられたが、下気道検体由来の菌株のみに限定して検討しても同様の結果が得られた。(北日本 87.2% vs 他地域 66.1%, $p=0.003$, OR 3.51, 95%CI:1.50 to 7.92)

表 3. *erm*(41) sequevar type とその SNP

SNP at sequevar 1 base											
Sequevar	G8(Gly)	T28(Trp)	G66(Arg)	A120(Ala)	T159(Gly)	G168(Val)	A238(Ile)	G255(Leu)	G279(Arg)	A330(Ile)	T336(Ser)
type1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
type2	●	C(Arg)	●	●	C	●	G(Val)	●	●	C	●
type3	●	C(Arg)	●	●	C	●	●	●	●	●	●
type4	●	●	●	●	C	●	G(Val)	●	●	C	●
type5	C(Ala)	C(Arg)	●	●	C	●	●	●	●	●	●
type6	●	●	●	●	C	●	G(Val)	A	T	C	C
type7	●	●	●	●	C	●	G(Val)	A	●	C	●
type8	●	●	●	●	●	C	●	●	●	●	●
type9	●	●	●	●	C	●	●	●	●	C	●
type10	●	●	●	G	C	●	G(Val)	A	T	C	C

表 4. 日本の地域と MAB *erm*(41)sequevar type

	total	type 1	type 2	type 4	type 7	type 8	type 9	type 10	other	unknown
Hokkaido	23	1	0	0	2	0	0	0	20	
Tohoku	4	2	2	0	0	0	0	0	0	
Kanto	69	27	5	13	9	3	1	3	7	1
Chubu	28	7	3	4	4	0	5	1	3	1
Kinki	20	5	2	4	2	0	0	2	5	
Chugoku	8	2	1	0	2	0	0	2	1	
Shikoku	2	0	0	0	2	0	0	0	0	
Kyushu	19	5	1	2	7	0	0	1	3	
Okinawa	13	2	8	0	1	0	0	2	0	
total	186	51	22	23	29	3	6	11	39	2

今回我々は 186 株の MAB に対して *erm*(41)遺伝子の PCR を施行した。そのうちの 2 株はシーケンス解析ができなかった。

C28 を示した sequevar は全て type2 であった。C28 sequevar を示した MAB は 12.0%(22/184)であり、地域別には北海道 0%(0/23)、東北 50%(2/4)、関東 7.2%(5/69)、中部 10.7%(3/28)、近畿 10.0%(2/20)、中国 12.5%(1/8)、四国 0%(0/2)、九州 5.2%(1/19)、沖縄 61.5%(8/13)という結果だった。沖縄とそれ以外の地域を比較すると、沖縄は他地域と比較して MAB における C28

sequevar の割合が有意に高かった。[61.5% vs 8.1%, $p < 0.001$, OR 18.06, 95%CI: 5.60 to 56.6]

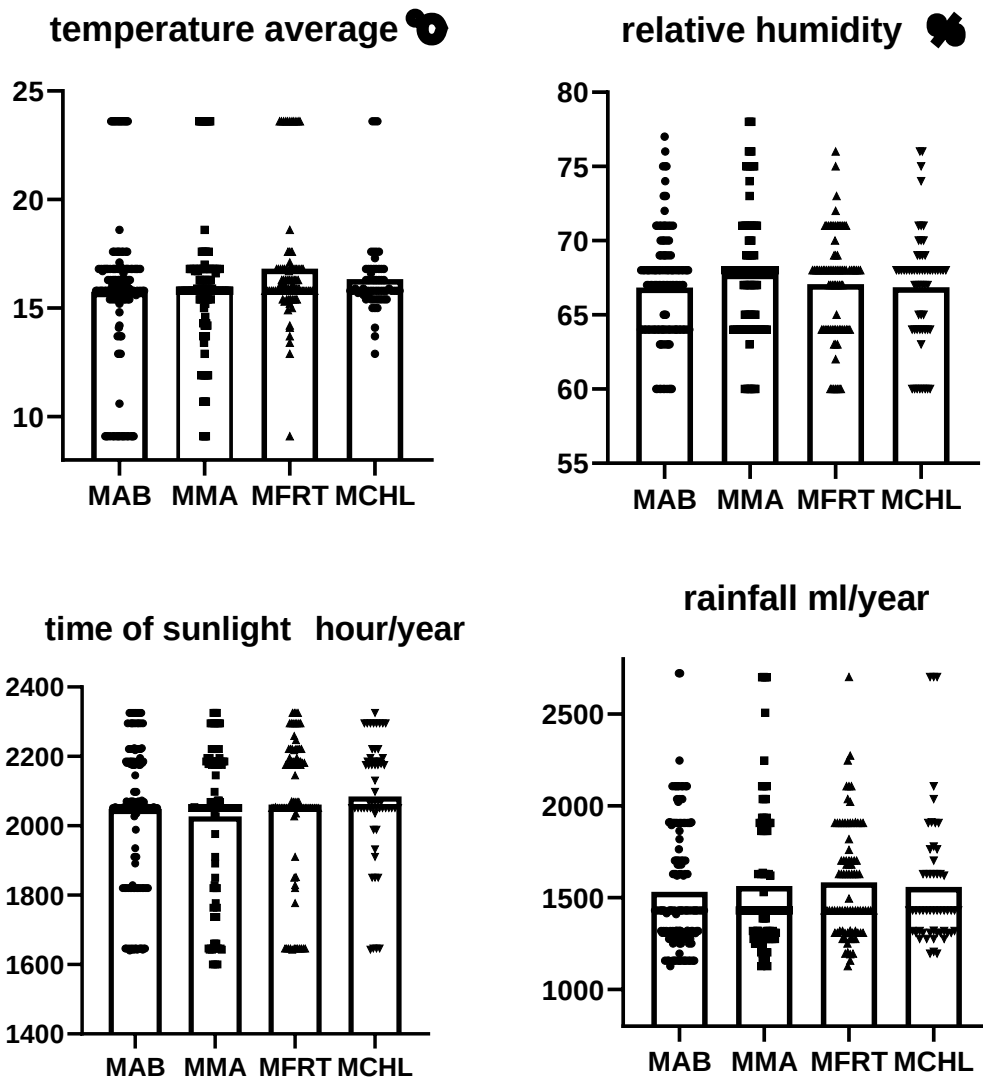


図 6. 主要菌種の各菌株が分離された地域の気候条件

分離された菌株数の多かった主要菌種(亜種) : *M. abscessus* subsp. *abscessus*=MAB, *M. abscessus* subsp. *massiliense*=MMA, *M. fortuitum*=MFRT, *M. chelonae*=MCHL の各菌株が分離された地域の気象情報(temperature average=年間平均気温、relative humidity=相対湿度、time of sunlight=年間日照時間、rain fall=年間降水量)をプロットし菌種間で比較した。地域の気象情報は統計局より発表されている都道府県のすがた 2019 よりデータを引用した。上記の 4 つの気候パラメータは菌種間で有意な差は認めなかったが年間平均気温については 15℃以下の地域で分離された株の割合は統計学的な有意差は認めなかったものの MAB 18.6%(35/188), MMA 19.7%(27/137), *M. fortuitum* 9.9%(9/91), *M. chelonae* 6.7%(4/60)となっており MAG と比較して *M. fortuitum* *M. chelonae* は低い傾向にあった。

考察

本章の結果から新たにわかったことを以下に挙げる。

まず第一に、下気道検体から分離される RGM 菌種と非下気道検体から分離される RGM 菌種の特徴を MAG の亜種にまで踏み込んで明らかにしたことである。両者は上位 3 菌種については一致しており、この 3 菌種は、過去に日本で主要臨床検査センターを対象とした下気道検体から分離された NTM を対象とした調査(Morimoto et al., 2017)での結果とも一致していた（この調査では菌種同定については DDH-マイコバクテリアが使用されており MAG 亜種は不明でその他の菌種についても同定精度という部分で検討の余地が残っていた）。上位 3 菌種は同一であったものの非下気道検体から分離される MAG の割合は下気道検体から分離される MAG の割合と比較して有意に低いこと(68.4% vs 35.9%)、また、非下気道検体から分離される MAG の亜種は MMA が有意であるのに対して(54.6%)、下気道検体から分離される MAG の亜種は MAB が有意(58.8%)であることがわかった。過去の国内の MAG の亜種を検討した報告ではいずれも下気道検体から分離された MAG を対象とした調査であり(Yoshida et al., 2013; Aono et al., 2019)、そのいずれも MAB が MMA と比較して多いという結果だった。非下気道検体から分離される RGM の疫学に関するものとしては、米国では 108 株中 52 株が MAG であったという報告(Henkle et al., 2017)があるが亜種に関する情報はなく今回の我々の調査は貴重な疫学情報といえる。

2 つめに重要な点は北日本(北海道+東北)で分離される RGM は他地域と比較して MAG の割合が高いことである。これは北日本から集められた検体のほとんどが下気道検体であったことも関係しているかと思われたが、全ての地域の下気道検体のみで同様の検討を行ってもやはり同様の結果となった。北日本は平均気温、日照時間、降水量などが他地域と比較してより低値であることが知られている。過去の文献では気温、降水量などが RGM の活動性と関与しているとも報告されていることから分離頻度の差異を生んだ原因として気候条件の関与を第一に考えた。今回の我々の研究では年平均気温が 15°C 以下の地域で分離される菌株の割合が *M. fortuitum*, *M. chelonae* は MAG と比較して低い傾向にあったが、統計学的な有意差は示せなかったため今後も菌株集積を引き続き

行い、今回調査したパラメータ以外の条件も検討していく必要がある。

3 つめは、MAB における C28 sequevar を有する菌株の割合が沖縄では他地域と比較して有意に高いことである。海外の MAB における C28 sequevar に関する疫学は概ね 10-20%と報告されているが(Brown-Elliott et al., 2015; Mougari et al., 2016)、日本での報告は 9%とするものと 4%とするものがあり(Yoshida et al., 2013; Aono et al., 2019)これらと比較してやや低い値になっている。今回の我々の研究では沖縄以外の地域は 8%と過去の報告とほぼ一致するものの、沖縄では 60%を超えており、有意に他地域よりも分離頻度が高かった。興味深いことに、台湾の非下気道検体を対象とした研究では MAB の 36%が C28 sequevar を有したことが報告されており(Lee et al., 2016)、沖縄の MAB は九州以北の MAB よりも台湾の MAB に遺伝子学的に近い可能性がある。また C28 sequevar を有する MAB はマクロライド感受性を示すことが多く(Bastian et al., 2011)、沖縄での MAB 感染症は他地域と比較して予後が良好である可能性がある。

今回の研究にはいくつかの限界がある。まず第 1 に、下気道検体から分離された菌株に複数回の検出という条件をつけていない点である。これは 2007 年の ATS/IDSA の NTM 感染症に関する statement(Griffith et al., 2007)で、細菌学的診断基準として喀痰検体で診断する場合には常在菌を除外するために複数回の検出が条件とされていることから今回の我々の研究には真の起因菌ではない菌株が混入している可能性がある。第 2 に、非下気道検体の大部分が関東地方から分離されたものである点が挙げられる。特に北日本では非下気道検体の分離が少なく、これが真に非下気道感染が少ない事を意味しているのかは今後の検討課題となる。第 3 に沖縄での C28 sequevar の分離頻度の高さについては今回、沖縄で分離された MAB の数自体が少ないことからより多くの菌株で再度検証する必要がある。

第二章 日本における迅速発育抗酸菌の薬剤感受性

【第二章緒言】

NTM 感染症は世界各国で大きな問題となっており、特に日本を含む東アジアは他地域と比較して NTM の中で RGM による感染症が占める割合が多いとされている。MAB を始めとする RGM は抗菌薬に対し多剤耐性を示すことも多くしばしば標準的な治療が奏功しないことを経験する。これまでに RGM においてマクロライド誘導耐性に関与する *erm* 遺伝子(Bastian et al., 2011)やマクロライド獲得耐性に関与する *rrl* 遺伝子(Bastian et al., 2011)、アミノグリコシド獲得耐性に関与する *rrs* 遺伝子(Nessar et al., 2011)、キノロン系抗菌薬耐性に関与する *gyrA*, *gyrB* 遺伝子(Kim et al., 2018)などの抗菌薬耐性機序への関与が疑われる遺伝子変異と抗菌薬感受性との関係が検討されてきた。マクロライド誘導耐性とは、MAB、*M. fortuitum* などが持つ自然耐性であり、3 日間の培養期間ではマクロライドに感受性を示すものの、14 日間の培養期間では耐性となる。*erm* 遺伝子は複数存在することが知られており、菌種によって持つ遺伝子が異なる。MAB は *erm*(41), *M. fortuitum* は *erm*(39) (Nash et al., 2005)を持つことが知られている。この *erm*(41) 遺伝子は臨床においても非常に重要で、MMA ではこの遺伝子の一部を欠失していることから *erm*(41) 遺伝子は機能を失いマクロライド感受性を示し、その結果、肺感染症において MAB よりも治療奏効率が高くなることが知られている(Guo et al., 2018; Pasipanodya et al., 2017)。また MAB において *erm*(41) 遺伝子にはいくつかの sequevar type があることが報告されている。その中でも、T28C の変異を認める C28 sequevar は *erm*(41) 遺伝子の機能を失っておりマクロライド感受性を示すことが知られている(Bastian et al., 2011)。マクロライド獲得耐性は誘導耐性と異なり、3 日間の培養で耐性を示すことが特徴で *rrl* 遺伝子変異の関与が過去に報告されている(Bastian et al., 2011)。

このようにいくつかの耐性機序は明らかになってはいるものの、RGM の薬剤感受性にはまだ明らかになっていない疑問点が数多く残っている。まず第 1 に、過去の RGM の薬剤感受性を評価した規模の大きな研究は、菌種同定の点で遺伝子学的に十分な評価がされていない事もあり(van, Ingen et al., 2010)、疫学的な正確性に議論の余地が残っているという点である。また Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M24-A2(Wayne., 2011)では、RGM の薬

剤感受性試験では 11 の抗菌薬に対してのみ MIC breakpoint を設定しているが、それ以外の薬剤の MIC 値については十分に評価されているとは言い難い。これまでの RGM の薬剤感受性に関する報告は大部分が MAG に関するものでありその他の RGM 菌種についてはその傾向が特に強い。

さらに、breakpoint が設定されている薬剤についても臨床的治療効果との相関性については実証されておらず不明である。今後より多くの薬剤の RGM に対する MIC 値を蓄積していくことで新たな治療薬を模索していく必要がある。最後に前述の薬剤耐性に関わる遺伝子変異が実際に国内で分離された菌株においてどの程度の割合で生じているのかという疫学情報についても十分に解明されているとは言い難い状況である。

第二部での我々の目的は日本で臨床検体より分離された RGM 菌種に対して 24 種の抗菌薬の MIC を測定し菌種間での薬剤感受性の特徴の差異を示すこと、既知の薬剤耐性遺伝子変異を認める割合を調査すること、および今後の新規治療薬となり得る候補薬剤を探索することである。

方法

本研究は東京女子医科大学倫理審査委員会で倫理審査不要と判断された。

臨床検体から分離された菌株

2012 年 1 月から 2019 年 3 月までに日本全国各地でヒト臨床検体から分離された RGM 509 株(下気道 409 株、非下気道 87 株、不明 13 株)を対象とした。本研究に組み込まれた菌株は以下の 3 つの基準を満たしている。

- iv) 培養開始から 7 日以内に培地にコロニー形成したもの
- v) ii)塗抹鏡検にて抗酸菌であることが確認されたもの
- vi) iii)菌株が複数回検出されている患者については最初の 1 株のみ

DNA 抽出

全ての菌株はトリプチケースソイ 5%ヒツジ血液寒天培地に塗布し 35°Cでサブカルチャーを行った上で、ISOPLANT II (Nippon GENE, Tokyo)を用いて DNA を抽出した。

菌種同定のための PCR

菌種同定のために全ての菌株でハウスキーピング遺伝子である *rpoB*, *hsp65*, *sodA* の PCR を施行した。また、MAG については亜種決定のために追加検査として *erm*(41)遺伝子の PCR だけでなく過去に有用性が示された PCR-based typing scheme を用いて亜種を決定した。

その他の薬剤耐性遺伝子変異検索のための PCR

erm(41)遺伝子のほかに *rrl*遺伝子, *rrs* 遺伝子, *gyrA* 遺伝子, *gyrB* 遺伝子の PCR を施行しそれぞれ遺伝子シーケンス解析を行った。

PCR の際に使用したプライマーは以下に示す。

表 5. 第二章で使したプライマー

Gene	Primer	sequence (5'-3')
<i>hsp65</i>	Tb11 (Forward)	ACCAACGATGGTGTGTCCAT
	Tb12 (Reverse)	CTTGTCGAACCGCATACCCT
<i>rpoB</i>	MycoF (Forward)	GGCAAGGTCACCCCGAAGGG
	MycoR (Reverse)	AGCGGCTGCTGGGTGATCATC
<i>sodA</i>	sodF (Forward)	ACATCTCGGGTCAGATCAACGAGC
	sodR (Reverse)	GACGTTCTTGTACTGCAGGTA
<i>erm(41)</i>	erm(41)f (Forward)	GACCGGGGCCTTCTTCGTGAT
	erm(41)r1 (Reverse)	GACTTCCCCGCACCGATTCC
<i>rrl</i>	rrl3-F (Forward)	CTTGGGTGAAGCGGAGAAT
	rrl3-R (Reverse)	CAACCGCCCCAGTTAACTAC
<i>rrs</i>	rrs1-F (Forward)	ATGACGTCAAGTCATCATGCC
	rrs1-R (Reverse)	AGGTGATCCAGCCGCACCTTC
<i>gyrA</i>	RGM-gyrA-91F	ATGCAGCGCAGCTACATCG
	RGM-gyrA-550R	GSATGTTGGTGGCCATRC
<i>gyrB</i>	RGM-gyrB-1285F	CGCAAGAGYGCCACCGAYA
	RGM-gyrB-1579R	TCTTGTGRTAHCGCAGCTT
MAG PCR-based typing scheme		
MAB_4751	Forward	CCCGCATGCAGCTGGCCGCGCA
	Reverse	GCGCCAGTGGTGGGGCCACCCGT
MAB_2396	Forward	AGGCGGCCACCGACGTCGCGATGGA
	Reverse	TGCGCCCGCCCAGCGCGTATCCG
MAB_2697c	Forward	GACTCCGGTGGCCGCGGCGA
	Reverse	GCCGGAGCGCTGGGTGGGCT
MAB_4792	Forward	GCGGTGACGACCGCGGGGGCGAT
	Reverse	TCGGGGCAGGCCAGGGCGCCTA

抗菌薬に対する感受性試験

CLSI M24A-2 で推奨される RGM の薬剤感受性測定法に準じ、CAMHB 培地を用いた微量液体希釈法により、30℃で培養し各菌株に対する 24 種類の抗菌薬の MIC を測定した。菌液調製には濁度計(VITEK DENSICHEK, bioMerieux, France)を使用した。MIC の判定は 2 回行われ、1 回目は培養開始 3-5 日後のコントロールウェルにコロニー発育が最初に一定の基準以上認められたタイミ

ングで行った(Early Time=ET)。2 回目の判定は培養開始 14 日後に clarithromycin に対する誘導耐性を評価するために行った(Late Time=LT)。MIC を測定した抗菌薬は、tigecycline, linezolid, clarithromycin, azithromycin, arbekacin, amikacin, gentamycin, tobramycin, imipenem, doripenem, faropenem , levofloxacin, sitafloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin, cefmetazole, cefoxitin, ceftriaxone, cefepime, ethanbutol, rifabutin, minocycline, amoxicillin / clavulanic acid, trimethoprim / sulfamethoxazole の 24 薬剤とした。また CLSI M24A2 で MIC 測定再検が推奨されるケースではすべての株で再検を行った。CLSI が MIC break point を設定する薬剤については下記の表 6 に従って薬剤感受性を判定した。

表 6. RGM に対する 11 種の抗菌薬の MIC breakpoint

Antibiotics	MIC (mg/L) for category:		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
AMK	≤ 16	32	≥ 64
FOX	≤ 16	32-64	≥ 128
CIP	≤ 1	2	≥ 4
CAM	≤ 2	4	≥ 8
MIN	≤ 1	2-4	≥ 8
IPM	≤ 4	8-16	≥ 32
MEP	≤ 4	8-16	≥ 32
LNZ	≤ 8	16	≥ 32
MXF	≤ 1	2	≥ 4
SXT	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$
TOB	≤ 2	4	≥ 8

統計学的解析

統計学的解析はフィッシャーの正確検定を使用し、判定は $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。すべての統計解析は統計解析ソフトである GraphPad Prism ver. 8.2.0 for Windows(GraphPad Software, San Diego California USA)を用いて行った。

結果

RGM は 15 菌種同定された。詳細を表 7 に示す。このうちの 11 株(MAB 5 株, MMA 3 株, *M. chelonae* 2 株, *M. senegalense* 1 株)は培養開始 5 日目の時点でもコントロールウェル内の発育が不良であったため薬剤感受性試験の結果を得ることができなかった。

表 7. 薬剤感受性検査を施行した RGM 菌種と検体種別

Pathogens	No. of isolates									
	Total	下気道	非下気道							
			Total	皮膚 軟部組織	膿瘍	CAPD関連	血液	耳漏	骨	その他
MAG	321	280	31	8	6	4	4	6	2	1
subsp. <i>abscessus</i>	183	164	14	2	4	3	0	2	2	1
subsp. <i>massiliense</i>	133	111	17	6	2	1	4	4		
subsp. <i>bolletii</i>	5	5	0							
<i>M. fortuitum</i>	85	67	18	9	3	3	1		1	1
<i>M. chelonae</i>	57	37	19	12	2	1	2			2
<i>M. peregrinum</i>	11	11	0							
<i>M. mageritense</i>	10	1	8	3	1	2	1			1
<i>M. septicum</i>	5	4	1				1			
<i>M. mucogenicum</i>	4	1	2		1		1			
<i>M. porcinum</i>	3	2	1		1					
<i>M. wolinskyi</i>	3	0	3		2		1			
<i>M. senegalense</i>	3	3	0							
<i>M. goodii</i>	2	1	1							1
<i>M. iranicum</i>	2	1	1			1				
<i>M. canariensis</i>	1	0	1				1			
<i>M. immunogenum</i>	1	0	1		1					
<i>M. sphagnum</i>	1	1	0							
Total	509	409	87	32	17	11	12	6	3	6

続いて今回調査した各菌種の薬剤感受性(S=susceptible, I=intermediate, R=resistant)および MIC を表 8 に示す。MAG の中では MMA は amikacin と clarithromycin に感受性を示したが、MAB と MBO は amikacin のみに感受性を示した。

表 8. MAG の薬剤感受性

抗菌薬	<i>M. abscessus</i> group (MAG: n=313 ^a)			subsp. <i>abscessus</i> (MAB: n=178)			subsp. <i>massiliense</i> (MMA: n=130)		
	Susceptibility ^b % (n)			Susceptibility % (n)			Susceptibility % (n)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
LZD	33 (104)	19 (59)	48 (150)	30 (54)	19 (34)	51 (90)	37 (48)	19 (25)	44 (57)
CLR (ET)	82 (256)	6 (20)	12 (37)	74 (131)	11 (19)	15 (28)	93 (121)	1 (1)	6 (8)
CLR (LT)	43 (135)	3 (9)	54 (169)	11 (19)	3 (6)	86 (153)	89 (116)	2 (3)	9 (11)
AMK	87 (271)	12 (38)	1 (4)	90 (160)	9 (16)	1 (2)	82 (106)	17 (22)	1 (2)
TOB	2 (7)	9 (27)	89 (279)	3 (5)	12 (22)	85 (151)	1 (2)	4 (5)	95 (123)
IPM	25 (80)	59 (184)	16 (49)	27 (48)	58 (103)	15 (27)	25 (32)	60 (78)	15 (20)
CIP	2 (6)	4 (12)	94 (295)	3 (5)	6 (10)	91 (163)	1 (1)	1 (2)	98 (127)
MXF	5 (16)	6 (20)	89 (277)	6 (11)	9 (16)	85 (151)	4 (5)	3 (4)	93 (121)
FOX	23 (72)	69 (215)	8 (26)	25 (44)	67 (120)	8 (14)	22 (28)	69 (90)	9 (12)
MIN	6 (18) ^c	8 (25) ^c	86 (269) ^c	2 (4)	3 (5)	95 (169)	11 (14) ^c	16 (20) ^c	73 (95) ^c
SXT	19 (58)		81 (255)	21 (37)		79 (141)	16 (21)		84 (109)

^a 5株のMBOを含む

^b S: Susceptible, I: intermediate, R: resistant

^c MICが得られなかった1株を含む

亜種間で薬剤感受性の違いを認めたのは clarithromycin のみであった。
amikacin は感受性良好であったが、imipenem, linezolid, ceftioxin はいずれも
20-30%程度の低い感受性率であった。

表 9. MAG の薬剤 MIC(mg/L)一覧

抗菌薬	<i>M. abscessus</i> group (MAG: n=313)			subsp. <i>abscessus</i> (MAB: n=178)			subsp. <i>massiliense</i> (MMA: n=130)		
	range	MIC50	MIC90	range	MIC50	MIC90	range	MIC50	MIC90
LZD	<1 to >64	16	>64	<1 to >64	32	>64	<1 to >64	16	64
CLR (ET)	<0.12 to >32	0.5	8	<0.12 to >32	1	32	<0.12 to >32	0.25	1
CLR (LT)	<0.12 to >32	>32	>32	0.25 to >32	>32	>32	<0.12 to >32	1	4
AZM (ET)	<0.12 to >32	4	>32	0.25 to >32	8	>32	<0.12 to >32	1	4
AZM (LT)	<0.25 to >32	>32	>32	4 to >32	>32	>32	<0.25 to >32	8	32
ABK	<1 to 64	8	16	<1 to 64	8	16	<1 to 32	8	16
AMK	<1 to >128	16	32	<1 to >128	16	32	<1 to 64	16	32
GEN	<1 to >128	16	32	<1 to >128	16	32	<1 to 64	16	32
TOB	1 to >64	16	32	1 to >64	16	32	2 to >64	16	64
IPM	<0.5 to >64	8	32	<0.5 to >64	8	32	2 to >64	8	32
DOR	2 to >128	64	>128	2 to >128	64	128	8 to >128	64	>128
FRP	<1 to >128	128	>128	<1 to >128	128	>128	8 to >128	128	>128
LVX	<0.5 to >32	32	>32	<0.5 to >32	32	>32	4 to >32	32	>32
STF	0.12 to >4	2	>4	0.12 to >4	2	>4	0.25 to >4	2	>4
CIP	0.25 to >16	16	>16	0.25 to >16	16	>16	1 to >16	16	>16
MXF	0.12 to >8	8	>8	0.12 to >8	8	>8	1 to >8	>8	>8
CMZ	<1 to >128	32	128	<1 to >128	32	128	8 to >128	32	128
FOX	4 to >64	32	64	4 to >64	32	64	8 to >64	32	64
CRO	8 to >64	>64	>64	8 to >64	>64	>64	16 to >64	>64	>64
FEP	4 to >32	>32	>32	8 to >32	>32	>32	32 - >32	>32	>32
ETB	8 to >128	64	128	8 to >128	64	128	8 - >128	64	128
RFB	<0.125 to > 8	8	>8	<0.125 to > 8	4	>8	1 - > 8	8	>8
MIN	<0.5 to >32	>32	>32	<0.5 to >32	>32	>32	<0.5 to >32	16	>32
TGC	0.25 to >8	1	4	0.25 to >8	1	4	0.25 to >8	2	8
AMC	8/4 to >128/64	>128/64	>128/64	8/4 to >128/64	>128/64	>128/64	8/4 to >128/64	>128/64	>128/64
SXT	<0.25/4.8 to >8/152	8/152	>8/152	<0.25/4.8 to >8/152	8/152	>8/152	0.5/9.5 to >8/152	8/152	>8/152

表 10. *M. fortuitum*, *M. chelonae* の薬剤感受性および MIC

抗 菌 薬	<i>M. fortuitum</i>			<i>M. chelonae</i>		
	(n=85)			(n=55)		
	Susceptibility %			Susceptibility %		
	S	I	R	S	I	R
LZD	71	14	15	49	33	18
CLR (ET)	18	12	70	96	4	0
CLR (LT)	0	1	99	89	4	7
AMK	100	0	0	62	34	4
TOB	4	0	96	46	47	7
IPM	94	5	1	18	53	29
CIP	95	1	4	5	20	75
MXF	97	2	1	7	20	73
FOX	15	80	5	5	5	90
MIN	41	7	52	16	4	80
SXT	88		12	24		76

M. fortuitum は clarithromycin 耐性だが amikacin、imipenem、ciprofloxacin、moxifloxacin、trimethoprim / sulfamethoxazole などに対する薬剤感受性は良好であり、ciprofloxacin 耐性株は 3 株のみであった。*M. chelonae* の約 90% は clarithromycin に対して感受性を認めたが、amikacin、imipenem、cefoxitin、ciprofloxacin、moxifloxacin に対して低感受性である株の割合が高かった。治療におけるキードラッグの 1 つである tobramycin も感受性良好であったのは半数程度であった。

表 11. *M. fortuitum*, *M. chelonae* の薬剤 MIC(mg/L)一覧

	<i>M. fortuitum</i>			<i>M. chelonae</i>		
	(n=85)			(n=55)		
	range	MIC50	MIC90	range	MIC50	MIC90
LZD	<1 to >64	4	32	<1 to >64	16	32
CLR (ET)	<0.12 to 4	8	>32	<0.12 to >32	0.25	1
CLR (LT)	<0.12 to >32	>32	>32	<0.12 to >32	1	4
AZM (ET)	0.5 to >32	>32	>32	<0.12 to 16	2	8
AZM (LT)	16 to >32	>32	>32	0.25 to >32	8	32
ABK	<1 to 16	4	4	<1 to 16	4	8
AMK	<1 to 16	2	4	2 to 64	16	32
GEN	<1 to 128	8	16	2 to 32	8	16
TOB	2 to >64	32	64	<0.5 to 32	4	4
IPM	1 to >64	4	4	1 to >64	16	32
DOR	2 to 128	8	16	4 to >128	>128	>128
FRP	2 to >128	16	32	32 to >128	>128	>128
LVX	<0.5 to 32	<0.5	2	2 to >32	16	>32
STF	<0.03 to 1	0.12	0.25	0.25 to >4	1	4
CIP	<0.12 to >16	0.25	1	1 to >16	4	>16
MXF	<0.06 to >8	0.12	0.5	0.5 to >8	4	>8
CMZ	4 to >128	16	32	16 to >128	>128	>128
FOX	2 to >64	32	64	16 to >64	>64	>64
CRO	4 to >64	>64	>64	8 to >64	>64	>64
FEP	8 to >64	>32	>32	8 to >64	>32	>32
ETB	2 to >128	16	64	32 to >128	128	>128
RFB	0.25 to > 8	2	8	1 to > 8	8	>8
MIN	<0.5 to >32	8	>32	<0.5 to >32	32	>32
TGC	0.12 to 4	0.5	1	0.12 to 4	1	2
AMC	2/1 to >128/64	32/16	128/64	32/16 to >128/64	>128/64	>128/64
SXT	<0.25/4.8 to >8/152	1/19	4/76	<0.5/9.5 to >8/152	4/76	>152/8

表 12. *M. peregrinum*, *M. mageritense* の薬剤感受性

抗 菌 薬	<i>M. peregrinum</i>			<i>M. mageritense</i>		
	(n=11)			(n=10)		
	Susceptibility %			Susceptibility %		
	S	I	R	S	I	R
LZD	82	18	0	80	10	10
CLR (ET)	82	0	18	0	0	100
CLR (LT)	82	0	18	0	0	100
AMK	100	0	0	0	60	40
TOB	0	18	82	0	0	100
IPM	82	18	0	70	20	10
CIP	91	0	9	89 ^a	11 ^a	0 ^a
MXF	91	0	9	89 ^a	11 ^a	0 ^a
FOX	100	0	0	80	20	0
MIN	18	9	73	0	60	40
SXT	100		0	40		60

^a MIC値が得られなかった1株は除く

M. peregrinum は tobramycin, minocycline を除くすべての薬剤に対して感受性を示した。 *M. mageritense* は clarithromycin だけでなく amikacin にも耐性を示す一方、ciprofloxacin、moxifloxacin に対する感受性は良好であった。

表 13. *M. peregrinum*, *M. mageritense* の薬剤 MIC(mg/L)一覧

	<i>M. peregrinum</i>			<i>M. mageritense</i>		
	(n=11)			(n=10)		
	range	MIC50	MIC90	range	MIC50	MIC90
LZD	<1 to 16	4	16	1 to 32	4	16
CLR (ET)	<0.12 to 16	1	8	32 to >32	>32	>32
CLR (LT)	<0.12 to >32	1	>32	>32	>32	>32
AZM (ET)	0.25 to >32	2	>32	>32	>32	>32
AZM (LT)	0.5 to >32	16	>32	>32	>32	>32
ABK	<1 to 4	<1	4	8 to 64	32	64
AMK	<1 to 8	<1	2	32 to >128	64	128
GEN	<1 to 8	4	8	16 to >128	64	128
TOB	4 to 16	8	8	64 to >64	>64	>64
IPM	1 to 8	4	8	2 to 32	2	16
DOR	2 to 16	8	16	2 to 64	4	32
FRP	<1 to 32	8	16	2 to 128	4	32
LVX	<0.5 to 32	<0.5	4	16 to >32	<0.5	2
STF	<0.03 to 1	0.06	0.12	<0.03 to 0.5	0.06	0.25
CIP	<0.12 to >16	<0.12	0.5	0.25 to 2	0.25	2
MXF	<0.06 to 4	0.12	0.25	0.12 to 2	0.12	2
CMZ	4 to 64	4	8	4 to 16	8	16
FOX	8 to 16	8	16	16 to 32	16	32
CRO	>64	>64	>64	>64	>64	>64
FEP	>32	>32	>32	>32	>32	>32
ETB	2 to >128	16	64	16 to 128	32	64
RFB	0.5 to 8	2	4	2 to > 8	8	>8
MIN	<0.5 to 16	8	>32	2 to 32	4	8
TGC	0.12 to 4	0.5	1	0.12 to 1	0.25	1
AMC	8/4 to >128/64	128/64	>128/64	8/4 to 128/64	16/8	64/32
SXT	<0.25/4.8 to 1/19	<0.25/4.8	1/19	1/19 to >8/152	4/76	>8/152

CLSI が breakpoint を設定していない薬剤の MIC についてもいくつかの興味深い点が明らかになった。今回調査したすべての RGM 菌種で sitafloxacin の MIC がその他のキノロン系抗菌薬の MIC と比較して最も低かった。さらに *M. fortuitum* と *M. wolinskyi* を除いたすべての菌種で arbekacin の MIC がその他のアミノグリコシド系抗菌薬の MIC と比較して最も低かった。また cefmetazole の MIC は 全ての RGM 菌種で ceftiofur の MIC 以下であった。rifabutin の MIC₅₀ は MAB の方が MMA よりも低く、rifabutin MIC $\leq$ 2 mg/L を示す菌株の割合は有意に MAB の方が高かった(MAB: 50/178 <28.1%> vs MMA: 23/130 <17.7%>; p=0.041)。faropenem の MIC₅₀ は *M. iranica* を除くすべての RGM 菌種で imipenem よりも高値を示した。

今回調査した RGM 15 菌種では amikacin と linezolid が最も感受性が保たれている菌種が多かった。

表 14. 稀な菌種を含めた RGM 各菌種の薬剤感受性の特徴

	LZD	CLR	AMK	TOB	IPM	FOX	MXF	MIN	SXT
MAB	△	▲	◎	▲	△	△	▲	▲	▲
MMA	△	◎	◎	▲	△	▲	▲	▲	▲
<i>M. fortuitum</i>	○	▲	◎	▲	◎	▲	◎	△	◎
<i>M. chelonae</i>	△	◎	○	△	▲	▲	▲	▲	▲
<i>M. peregrinum</i>	◎	◎	◎	▲	◎	◎	◎	▲	◎
<i>M. mageritense</i>	◎	▲	▲	▲	○	◎	◎	▲	△
<i>M. septicum</i>	◎	▲	◎	▲	◎	△	◎	▲	◎
<i>M. mucogenicum</i>	◎	○	◎	▲	◎	◎	○	▲	◎
<i>M. porcinum</i>	○	▲	◎	▲	◎	○	◎	▲	◎
<i>M. wolinskyi</i>	◎	▲	◎	▲	▲	▲	◎	◎	▲
<i>M. senegalense</i>	○	○	◎	▲	○	○	◎	○	○
<i>M. goodii</i>	◎	▲	◎	▲	◎	○	◎	○	◎
<i>M. iranikum</i>	◎	◎	◎	▲	◎	◎	◎	◎	◎
<i>M. canariasisense</i>	◎	▲	◎	◎	▲	◎	◎	▲	◎
<i>M. immunogenum</i>	◎	○	▲	▲	▲	▲	▲	▲	◎
<i>M. sphagni</i>	◎	▲	◎	◎	○	▲	◎	▲	◎

◎Susceptible isolates >75%, ○Susceptible isolates 50–75%, △Susceptible isolates 25–50%, ▲Susceptible isolates 0–25%

表 15. MAB の *erm*(41) sequevar type と clarithromycin MIC の関係

	total	CLR MIC (mg/L)										not growing
		≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	32≤	
type1	49			1		1	1				45	1
type2	22		1	1	7	4	5		2	1	1	
type6	24					1				1	20	2
type7	29					1					27	1
type8	3					1					2	
type9	4										4	
type10	12					1				1	10	
jpn1	24										24	
jpn2	4										4	
other	9							1			7	1
unknown	3										3	
total	183		1	2	7	9	6	1	2	3	147	5

MAB の *erm*(41) 遺伝子のシーケンス配列は 180 株から得られた。*erm*(41) sequevar type の SNP と sequevar type ごとの clarithromycin (LT) MIC を示す。残りの 3 株については PCR を複数回施行し目的のサイズの生成物も得たが、背景の noise のためシーケンス配列は不明であった。MAB180 株の中には *erm*(41) シーケンス配列に欠失を持つ株は認めなかった一方、MMA133 株の中には 2 株のみ欠失がなく T28sequevar を呈する株を認めた。この 2 株の clarithromycin (LT) MIC はそれぞれ 0.5mg/L, 8mg/L であった。この 2 株以外の MMA の *erm*(41) 遺伝子のシーケンス配列は全て同一であった。今回の調査で MAB における C28 sequevar の割合は 12.2%(22/180)でそのすべてが type2 であった。これまで報告されていない sequevar type がいくつか見つかった。特に分離頻度の高かった 2 種を jpn1, jpn2 と名付けた。これらの sequevar type は type10 と類似しており、塩基配列に若干の差異はあるもののアミノ酸配列は同一であった。この新しい 2 つの sequevar type は全ての株が clarithromycin に対して耐性であった。MAB T28 sequevar 158 株のうち clarithromycin (LT) MIC ≤4mg/L を示したのは 7 株のみで sequevar type 1, 6, 7, 8, 10 が含まれていた。

表 16. MAG clarithromycin 獲得耐性株と *rrl* 遺伝子変異

MAG subspecies (n=37)	CLR MIC (mg/L)			
	8	16	32	32<
MAB T28 (24)				
WT	3	3	4	10
A2058C				2
unknown		1	1	
MAB C28 (2)				
WT		1	1	
MAB unknown (2)				
WT				1
A2057G	1			
MMA (8)				
WT	1	1		3
A2058C				1
A2058G				2
MBO (1)				
A2059G				1

MAG で clarithromycin 獲得耐性を示した 37 株を対象に *rrl* 遺伝子変異の有無を調べた結果を示す。*rrl* 遺伝子変異を認めたのは MAB T28 sequevar 2/24 株, MAB C28 sequevar 0/2 株, MAB sequevar 不明, MBO 1/1 株, MMA 3/8 株であった。clarithromycin 獲得耐性を示した株の中で MMA は MAB T28 sequevar よりも高い割合で *rrl* 遺伝子変異を有したが有意差は認めなかった。(MAB

8.3% vs MMA 37.5%, $p=0.085$)

amikacin 低感受性($MIC \geq 32$ mg/L)を示した MAG、*M. chelonae*, *M. mageritense* の計 73 株で *rrs* 遺伝子変異を有する株は 1 株もなかった。また、*M. fortuitum* の中で ciprofloxacin 耐性であった株が 3 株で *gyrA*, *gyrB* 遺伝子変異を伴っていたのは 1 株のみであった。*gyrA* に遺伝子変異を認めた株は C268G 変異によってアミノ酸配列も S83W に変化していた。ciprofloxacin 感受性株の中で *gyrA*, *gyrB* 遺伝子変異を有する株は認めなかった。

考察

今回我々は、日本で臨床検体から分離された多数の RGM 菌株を対象に遺伝子学的手法を用いて正確に菌種同定された RGM の 24 種抗菌薬に対する薬剤感受性を評価した。この 24 薬剤の中には CLSI が MIC breakpoint を設定していないが今後、RGM 感染症に対する治療薬の候補となり得る薬剤が含まれていた。またこれまでの RGM に関わる薬剤感受性の報告は大部分が MAG に関するものであったが、その他 14 菌種に関しても日本における薬剤感受性の特徴を明らかにした。その結果、大部分の RGM 菌種において arbekacin、sifloxacin がそれぞれアミノグリコシド系抗菌薬、キノロン系抗菌薬のなかで最も低い MIC 値を示すことがわかった。MAG については正確な亜種決定のために PCR-based typing scheme を追加で施行し、亜種間の薬剤感受性プロファイルを比較した結果、MAB における rifabutin MIC ≤ 2 mg/L を示す菌株の割合が有意に MMA よりも高いことが示された。また薬剤耐性株については既知の薬剤耐性遺伝子の変異についても積極的に検索し日本における疫学情報を明らかにしたが、日本には *M. fortuitum* の中に少ないながらもキノロン系抗菌薬に対して耐性を示す株が存在しその中の一部が QRDR 領域に遺伝子変異をもつこと、MAG, *M. chelonae*, *M. mageritense* における amikacin 低感受性株において *rrs* 変異を有する株が少ない可能性などが示された。

米国での *rrl* 遺伝子変異を持たない MAB 349 株を対象とした調査では *erm*(41) sequevar type と clarithromycin 耐性の関係が報告されている (Brown-Elliott et al., 2015a)。この 349 株のうち clarithromycin MIC 8mg/L を示した 85 株の中で sequevar type 4, 6, 7, 8, 9, 10 を有した株はわずか 7 株のみであったことからこれらの sequevar type は clarithromycin 耐性と関与していることが示唆されてきた。しかし米国以外の地域ではこれまで同様の検証は為されていなかった。今回我々は、MAB 180 株の調査で、clarithromycin MIC 8mg/L を示した 26 株のうち type 4, 6, 7, 8, 9, 10 のいずれかの type を有した株はわずか 4 株であったことを示した。この結果は上述の米国での調査結果と概ね矛盾しておらず、これらの sequevar type がマクロライド耐性を予測する一つの因子であること、CLSI が MAB におけるマクロライド誘導耐性を評価するために *erm*(41) sequevar type 決定を推奨していることを支持するものとなった。

rrl 遺伝子変異は MAG における clarithromycin 獲得耐性株の中でも MAB T28 sequevar よりも MAB C28 sequevar や MMA で起こりやすいことが過去に報告されている (Bastian et al., 2011; Aono et al., 2019)。今回の我々の調査でも MAB T28 sequevar (8.3%, 2/24), MAB C28 sequevar (0%, 0/2), and MMA (37.5%, 3/8) と MMA で高い傾向にはあったが統計学的な有意差は示せなかった。MAG 全体としてマクロライド獲得耐性は *rrl* 遺伝子変異以外の機序で生じていることが示唆されたが、その機序は不明であり解明のために今後さらなる研究が必要である。

また今回調査した MAG の amikacin 低感受性株の中には *rrs* 遺伝子変異を有する株は 1 株も認めなかったが、過去のフランスにおける MAG 165 株の調査では amikacin MIC >64mg/L を呈した 8 株のうち 7 株で *rrs* 遺伝子に A1408G の変異を認めたことが報告されており amikacin MIC >64mg/L が *rrs* 遺伝子変異を疑う一つの基準になることが示唆されている (Mougari et al., 2016)。今回の我々の調査では amikacin MIC >64mg/L を呈した MAG は 1 株のみであり、日本ではフランスと比較して amikacin 獲得耐性を示す MAG 株が少ない可能性が示唆された。

M. fortuitum の薬剤感受性は過去の報告と同様に clarithromycin 耐性を有したがアミノグリコシド系、カルバペネム系、キノロン系抗菌薬に対しては良好な感受性を示した (Aono et al., 2019; Hatakeyama et al., 2017)。 *M. fortuitum* がその他の NTM と比較してキノロン系抗菌薬に対する感受性が良好である理由の 1 つとして *gyrA* がコードする QRDR における 83 番目のアミノ酸が serine であることが報告されている (Guillemin et al., 1998)。しかしこれまでに、 *M. fortuitum* におけるキノロン系抗菌薬耐性株で *gyrA* 遺伝子変異が証明された報告は 1 つのみで、その報告も S83 の変異を示したものではなかった (Zheng et al., 2017)³⁵。今回の我々の調査では *M. fortuitum* の中で 3.5% (3/85) にキノロン耐性株を認め、そしてそのうちの 1 株で S83W の変異が生じていることが示された。また QRDR 領域に遺伝子変異を認めないキノロン耐性株の存在も明らかとなり、今後その機序の解明が待たれる。日本では日常臨床においてキノロン系抗菌薬の不適切使用が多いことが報告されており (Uda et al., 2019)、今後 *M. fortuitum* においてキノロン系抗菌薬耐性株が増加する可能性がある。キノロン系抗菌薬は内服可能な抗菌薬として *M. fortuitum* による感染症の治療で

重要な役割を果たしており耐性株が増加した場合、治療に難渋することが懸念される。

M. chelonae は約 10%の株が clarithromycin 耐性を示し、これまでの国内での報告とほぼ同様の結果であった(Aono et al., 2019; Hatakeyama et al., 2017)。また tobramycin に対する薬剤感受性に関しては英国では 54%³⁷ に対して日本では 83%(Hatakeyama et al., 2017)という報告と 17%(Aono et al., 2019)であったという報告があり定まっていない。今回の我々の調査では tobramycin 感受性株の割合は約 40%とこの 3つの報告の平均に近い値であり、日本で分離される *M. chelonae* において tobramycin に対して感受性である株の割合が海外と比較して違いがあるかどうかは今後も検討を続けていく必要がある。*M. chelonae* の amikacin 低感受性株の中にも MAG と同様に *rrs* 遺伝子変異を有する株は 1 株も認めなかった。amikacin, tobramycin に対して耐性である *M. chelonae* 感染症では arbekacin は今後、治療薬の選択肢の一つになる可能性がある。

M. peregrinum は感受性検査を行った大部分の抗菌薬に対して感受性を示した。*M. mageritense* は過去の報告通り clarithromycin に対して耐性を示すだけでなく amikacin に対しても耐性を示した(Wallace et al., 2002)。このうちの 3 株は amikacin MIC > 64mg / L であったが *rrs* 遺伝子変異株は認めなかった。*M. mageritense* の amikacin 耐性機序は現時点で不明であり今後の研究が待たれる。その一方でキノロン系、cefoxitin, linezolid に対する感受性は良好であった。

その他の稀な RGM 菌種の薬剤感受性に関するまとまった報告は乏しいが *M. mucogenicum* と *M. immunogenum* は clarithromycin に対して耐性を示す一方、linezolid, amikacin, trimethoprim / sulfamethoxazole に対して感受性を示すことが報告されている(Brown-Elliott et al., 2015b)。今回の研究で我々はこれら稀な菌種についても株数は少ないものの薬剤感受性の特徴を示した。これらの菌種は全体の特徴として linezolid、キノロン系抗菌薬、trimethoprim / sulfamethoxazole に対して特に感受性を示すことが多かった。

RGM に対する arbekacin の MIC に関する報告はこれまでに無かったが、今

回の研究で対象となったほぼ全ての RGM 菌種で arbekacin の MIC 値はアミノグリコシド系抗菌薬の中で最も低かった。また、過去の報告で MAG, *M. fortuitum*, *M. chelonae* の 3 菌種については sitafloxacin の MIC 値が他のキノロン系抗菌薬と比較して低いことが示されていたが(Aono et al., 2019)、より多くの菌種でも同様の結果であることを今回の研究で示した。また、cefmetazole は cefoxitin と同じセファマイシン系抗菌薬の一種で過去のサンプル数の少ない報告と同様に全ての菌種で類似した MIC 値を示した(Huang et al., 2008; Pang et al., 2015)。日本のように cefoxitin を使用できない地域では、cefmetazole は治療薬の選択肢になり得るかもしれない。また近年、rifabutin は内服可能な MAG の治療薬としてその有効性が示唆されているが(Crabol et al., 2016; Aziz et al., 2017)、これまでに CLSI の推奨する CAMHB 培地で微量液体希釈法を用いて測定された MIC 値の報告にはまとまったものがなかった。今回我々は、多数の菌株を対象に rifabutin MIC 値を測定し、さらに MAB に対する MIC が MMA に対する MIC よりも低いことを示した。MAB は clarithromycin だけでなくキノロン系抗菌薬にも非常に高い耐性率を示しており、内服可能な治療薬の探索が喫緊の課題であることから、今後 rifabutin がその役割を果たす可能性があるか十分に検証していく必要がある。

今回の我々の研究にはいくつかの限界がある。第一に、今回の研究では下気道検体由来の RGM 菌株の組み入れ基準に複数回の検出という条件をつけていないことである。2007 年の NTM 肺感染症に関する ATS/IDSA のステートメントでは喀痰検査で微生物学的に診断を確定させるためには少なくとも 2 回以上の培養陽性を条件とすることが記されており(Griffith et al., 2007)、我々の研究では真の起因菌だけでなく colonization しているだけの菌株を含んでいる可能性がある。第二に、全ての菌株で抗菌薬の先行投与があったかどうか、あった場合にどのような抗菌薬が投与されたかという情報が不明な点である。また稀な菌種については菌株が少なく薬剤感受性の特徴として報告するには正確性を欠いている可能性がある。しかし以上の点を鑑みても今回の我々の研究は日本における RGM の疫学的情報に関する多くの重要な点を明らかにし、新たな治療薬の探索においても今後の研究における pilot study になり得る。今後も継続的に菌株および薬剤感受性情報の集積を継続し、将来的には実臨床における治療効果と各薬剤の MIC 値の相関性について臨床試験での検証が必要である。

総括および結論

■我々は日本各地で臨床検体より分離された RGM 菌株を収集し、遺伝子学的に適切な菌種同定を行った上で、これまで明らかになっていなかった日本の RGM の疫学を検体種別および地域、気候などを軸に検証し以下の新たな知見を得た。

- ・下気道検体、非下気道検体のいずれでも分離された上位 3 菌種は同一であったが、MAG が占める割合は非下気道検体では下気道検体と比較して有意に低かった。(非下気道検体 35.9% (33/92) vs 下気道検体 68.4% (292/427), $p<0.001$, OR 0.26, 95%CI:0.16-0.42)

- ・北日本(北海道+東北)ではその他の地域と比較して有意に MAG が占める割合が高かった。(北日本 83.7% vs 他地域 60.5%, $p=0.001$, OR 3.35, 95%CI:1.56 to 7.07)

- ・主要菌種(MAG, *M. fortuitum*, *M. chelonae*)の中で 15°C以下の地域で分離された株の割合は統計学的な有意差は認めなかったものの MAB 18.6%(35/188), MMA 19.7%(27/137), *M. fortuitum* 9.9%(9/91), *M. chelonae* 6.7%(4/60)となっており *M. fortuitum* *M. chelonae* は低い傾向にあった。

- ・沖縄は他地域と比較して MAB における C28 sequevar の割合が有意に高かった。(61.5% vs 8.1%, $p<0.001$, OR 18.06, 95%CI: 5.60 to 56.6)

■また我々はこれらの RGM 15 菌種に対して薬剤感受性試験を行い、菌種ごとの薬剤感受性の特徴や薬剤耐性遺伝子に関する疫学情報を得るだけでなく、今後の治療薬の候補となり得る薬剤の探索を行い、以下の新たな知見を明らかにした。

- ・最も多くの菌種に対して感受性が良好であった薬剤は amikacin と linezolid であった

- ・ 大部分の RGM 菌種において arbekacin、 sitafloxacin がそれぞれアミノグリコシド系抗菌薬、キノロン系抗菌薬のなかで最も低い MIC 値を示すこと

- ・ MAB における rifabutin MIC ≤ 2 mg/L を示す菌株の割合が有意に MMA よりも高いこと

- ・ cefmetazole は cefoxitin と同じセファマイシン系抗菌薬の一種で全ての菌種で類似した MIC 値を示した。

- ・ 日本には *M. fortuitum* の中に少ないながらもキノロン系抗菌薬に対して耐性を示す株が存在しその中の一部が QRDR 領域にアミノ酸変異(S83W)をもつことを明らかにした。

これまで、日本で臨床検体より分離される RGM の大部分は遺伝子学的に正確な菌種同定が行われておらず、薬剤感受性測定が行われることなく感染症に対する治療が開始されることもしばしばあった。また感受性検査が行われていてもそのほとんどが CLSI の推奨に沿った適切な形では行われておらず、疫学情報の多くが闇に包まれていた。今回の我々の 2 つの報告は日本で分離された RGM の現状を明らかにするだけでなく、これまで調べてこられなかった薬剤の MIC 値を多数の菌種および菌株を対象に調査することで臨床現場において渴望される新たな治療薬の候補を示すことができた。難治である RGM 感染症の治療失敗を減らしていくためには新たな治療薬の開発だけではなく既存の抗菌薬の活用が非常に重要であり、今回の研究を pilot study として臨床研究につなげ、より良い治療法を発見することを今後の目標としたい。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた北海道大学大学院医学研究科内科学講座呼吸器内科学分野 今野 哲 教授と西村 正治 前教授に深謝いたします。並びに適切な助言と直接のご指導を賜りました東京女子医科大学総合感染症・感染制御部感染症科の菊池 賢 教授、吉田 敦 准教授をはじめ、私の研究を支えてくださった皆様に感謝の意を表します。

本研究は、JSPS 特別研究員奨励費 JP19K08938 の助成を受けたものである。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Adekambi, T., Colson, P., and Drancourt, M. (2003). *rpoB* -Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *Microbiology*. *41*, 5699-5708.

Adjemian, J., Olivier, K.N., and Prevots, D.R. (2014). Nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in the United States: Screening practices and environmental risk. *Am J Respir Crit Care Med*. *190*, 581-586.

Aono, A., Morimoto, K., Chikamatsu, K., Yamada, H., Igarashi, Y., Murase, Y., Takaki, A., and Mitarai, S. (2019). Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacteroides* (*Mycobacterium*) *abscessus* complex, *Mycolicibacterium* (*Mycobacterium*) *fortuitum*, and *Mycobacteroides* (*Mycobacterium*) *chelonae*. *J Infect Chemother*. *25*, 117-123.

Aziz, D.B., Low, J.L., Wu, M.L., Gengenbacher, M., Teo, J.W.P., Dartois, V., and Dick, T. (2017). Rifabutin Is Active against *Mycobacterium abscessus* Complex. *Antimicrob Agents Chemother*. *61*, e00155-17.

Bastian, S., Veziris, N., Roux, A.L., Brossier, F., Gaillard, J.L., Jarlier, and V., Cambau, E. (2011). Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm*(41) and *rrl* sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. *55*, 775-781.

Broda, A., Jebbari, H., Beaton, K., Mitchell, S., and Drobniewski, F. (2013). Comparative drug resistance of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates from patients with and without cystic fibrosis in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*. *51*, 217-223.

Brown-Elliott, B.A., Vasireddy, S., Vasireddy, R., Iakhiaeva, E., Howard, S.T., Nash, K., Parodi, N., Strong, A., Gee, M., Smith, T, et al. (2015a).

Utility of sequencing the *erm*(41) gene in isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* with low and intermediate clarithromycin MICs. J Clin Microbiol. 53, 1211-1215.

Brown-Elliott, B.A., Hanson, K., Vasireddy, S., Iakhiaeva, E., Nash, K.A., Vasireddy, R., Parodi, N., Smith, T., Gee, M., Strong, A., et al. (2015b). Absence of a functional *erm* gene in isolates of *Mycobacterium immunogenum* and the *Mycobacterium mucogenicum* group, based on in vitro clarithromycin susceptibility. J Clin Microbiol. 53, 875-878.

Craboli, Y., Catherinot, E., Veziris, N., Jullien, V., and Lortholary, O. (2016). Rifabutin: Where do we stand in 2016? J Antimicrob Chemother. 71, 1759-1771.

Forbes, B.A., Hall, G.S., Miller, M.B., Novak, SM., Rowlinson, MC., Salfinger, M., Somoskövi, A., Warshauer, D.M., and Wilson, M.L. (2018). Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 31, e00038-17.

Griffith, D.E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B.A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S.M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M.F., et al. (2007). An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 175, 367-416.

Guillemin, I., Jarlier, V., and Cambau, E. (1998). Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in Mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 42, 2084-2088.

Guo, Q., Chu, H., Ye, M., Zhang, Z., Li, B., Yang, S., Ma, W., and Yu, F. (2018). The Clarithromycin Susceptibility Genotype Affects the Treatment

Outcome of Patients with *Mycobacterium abscessus* Lung Disease. Antimicrob Agents Chemother. 62, e02360-17.

Han X.Y. (2008). Seasonality of clinical isolation of rapidly growing mycobacteria. Epidemiol Infect. 136, 1188-1191.

Hatakeyama, S., Ohama, Y., Okazaki, M., Nukui, Y., and Moriya, K. (2017). Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan. BMC Infect Dis. 17, 197-203.

Henkle, E., Hedberg, K., Schafer, S.D., and Winthrop, K.L. (2017). Surveillance of extrapulmonary nontuberculous mycobacteria infections, Oregon, USA, 2007–2012. Emerg Infect Dis. 23, 1627-1630.

Hoefsloot, W., van Ingen, J., Andrejak, C., Angeby, K., Bauriaud, R., Bemer, P., Beylis, N., Boeree, M.J., Cacho, J., Chihota, V., et al. (2013). The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. Eur Respir J. 42, 1604-1613.

Huang, T.S., Lee, S.S., Hsueh, P.R., Tsai, H.C., Chen, Y.S., Wann, S.R., Leu, H.S., Ko, W.C., Yan, J.J., Yuan, S.Z., et al. (2008). Antimicrobial resistance of rapidly growing mycobacteria in Western Taiwan: SMART Program 2002. J Formos Med Assoc. 107, 281-287.

Kim, S.Y., Jhun, B.W., Moon, S.M., Shin, S.H., Jeon, K., Kwon, O.J., Yoo, I.Y., Huh, H.J., Ki, C.S., Lee, N.Y., et al. (2018). Mutations in *gyrA* and *gyrB* in Moxifloxacin-Resistant *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium abscessus* Complex Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 62, e00527-18.

Kim, T.S., Choe, J.H., Kim, Y.J., Yang, C.S., Kwon, H.J., Jeong, J., Kim, G.,

Park, D.E., Jo, E.K., and Cho, Y.L., et al. (2017). Activity of LCB01-0371, a Novel Oxazolidinone, against *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother. *61*, e02752-16.

Lee, M.C., Sun, P.L., Wu, T.L., Wang, L.H., Yang, C.H., Chung, W.H., Kuo, A.J., Liu, T.P., Lu, J.J., Chiu, C.H., et al. (2017). Antimicrobial resistance in *Mycobacterium abscessus* complex isolated from patients with skin and soft tissue infections at a tertiary teaching hospital in Taiwan. J Antimicrob Chemother. *72*, 2782-2786.

Macheras, E., Roux, A.L., Ripoll, F., Sivadon-Tardy, V., Gutierrez, C., Gaillard, J.L., and Heym, B. (2009). Inaccuracy of single-target sequencing for discriminating species of the *Mycobacterium abscessus* group. J Clin Microbiol. *47*, 2596-2600.

Morimoto, K., Hasegawa, N., Izumi, K., Namkoong, H., Uchimura, K., Yoshiyama, T., Hoshino, Y., Kurashima, A., Sokunaga, J., Shibuya, S., et al. (2017). A Laboratory-based Analysis of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in Japan from 2012 to 2013. Ann Am Thorac Soc. *14*, 49-56.

Mougari, F., Amarsy, R., Veziris, N., Bastian, S., Brossier, F., Berçot, B., Raskine, L., and Cambau, E. (2016). Standardized interpretation of antibiotic susceptibility testing and resistance genotyping for *Mycobacterium abscessus* with regard to subspecies and *erm41* sequevar. J Antimicrob Chemother. *71*, 2208-2212.

Nakanaga, K., Sekizuka, T., Fukano, H., Sakakibara, Y., Takeuchi, F., Wada, S., Ishii, N., Makino, M., Kuroda, M., and Hoshino, Y. (2014). Discrimination of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* from *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* in clinical isolates by multiplex PCR. J Clin Microbiol. *52*, 251-259.

Namkoong, H., Kurashima, A., Morimoto, K., Hoshino, Y., Hasegawa, N., Ato, M., and Mitarai, S. (2016). Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan. *Emerg Infect Dis.* 22, 1116-1117.

Nash, K.A., Zhang, Y., Brown-Elliott, B.A., and Wallace, R.J. Jr. (2005). Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother.* 55, 170-177.

Nessar, R., Reyrat, J.M., Murray, A., and Gicquel, B. (2011). Genetic analysis of new 16s rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother.* 66, 1719-1724.

Nessar, R., Cambau, E., Reyrat, J.M., Murray, A., and Gicquel, B. (2012). *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother.* 67, 810-818.

Pandey, R., Chen, L., Manca, C., Jenkins, S., Glaser, L., Vinnard, C., Stone, G., Lee, J., Mathema, B., Nuermberger, E.L., et al. (2019). Dual β -Lactam Combinations Highly Active against *Mycobacterium abscessus* Complex In Vitro. *MBio.* 10, e02895-18.

Pang, H., Li, G., Zhao, X., Liu, H., Wan, K., and Yu, P. (2015). Drug susceptibility testing of 31 antimicrobial agents on rapidly growing mycobacteria isolates from China. *Biomed Res Int.* 2015 :419392.

Pasipanodya, J.G., Ogbonna, D., Ferro, B.E., Magombedze, G., Srivastava, S., Deshpande, D., and Gumbo, T. (2017). Systematic Review and Meta-analyses of the Effect of Chemotherapy on Pulmonary Mycobacterium abscessus Outcomes and Disease Recurrence. *Antimicrob Agents Chemother.* 61, e01206-17

Rodríguez-Sánchez, B., Ruiz-Serrano, M.J., Marín, M., López, Roa, P., Rodríguez-Créixems, M., and Bouza, E. (2015). Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nontuberculous Mycobacteria from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol.* *53*, 2737-2740.

Shallom, S.J., Gardina, P.J., Myers, T.G., Sebastian, Y., Conville, P., Calhoun, L.B., Tettelin, H., Olivier, K.N., Uzel, G., Sampaio, E.P., et al. (2013). New rapid scheme for distinguishing the subspecies of the *Mycobacterium abscessus* group and identifying *Mycobacterium massiliense* isolates with inducible clarithromycin resistance. *J Clin Microbiol.* *51*, 2943-2949.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, GM., Grimont, P.A., Kämpfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., et al. (2002). *Int J Syst Evol Microbiol.* *52*, 1043-1047.

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E.C., and Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* *31*, 175-178.

Uda, K., Okubo, Y., Kinoshita, N., Morisaki, N., Kasai, M., Horikoshi, Y., and Miyairi, I. (2019). Nationwide survey of indications for oral antimicrobial prescription for pediatric patients from 2013 to 2016 in Japan. *J Infect Chemother.* *25*, 758-763.

van, Ingen, J., van, der, Laan, T., Dekhuijzen, R., Boeree, M., and van, Soolingen, D. (2010). In vitro drug susceptibility of 2275 clinical non-tuberculous *Mycobacterium* isolates of 49 species in The Netherlands. *Int J Antimicrob Agents.* *35*, 169-173.

Wallace, R.J, Jr., Brown-Elliott, B.A., Hall, L., Roberts, G., Wilson, R.W., Mann, L.B., Crist, C.J., Chiu, S.H., Dunlap, R., Garcia, M.J, et al. (2002). Clinical and Laboratory Features of *Mycobacterium mageritense*. J Clin Microbiol. 40, 2930-2935.

Wayne, P.A., (2011). Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, Nocardiae and other aerobic actinomycetes. Approved standard.. CLSI document M24-A2.

Yoshida, S., Tsuyuguchi, K., Suzuki, K., Tomita, M., Okada, M., Hayashi, S., Iwamoto, T., and Saito, H. (2013). Further isolation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and subsp. *bolletii* in different regions of Japan and susceptibility of these isolates to antimicrobial agents. Int J Antimicrob Agents. 42, 226-231.

Zheng, H.W., Pang, Y., He, G.X., Song, Y.Y., and Zhao, Y.L. (2017). Antimicrobial Susceptibility Testing and Molecular Characterization of *Mycobacterium fortuitum* Isolates in China. Biomed Environ Sci. 30, 376-379.

統計でみる都道府県のすがた 2019 URL(http://www.stat.go.jp/data/k-sugata/pdf/all_ken2019.pdf) アクセス日 2019/11/11