

初回肺結核治療中において短期間に多剤耐性化した結核菌の遺伝子解析

—臨床分離株を用いて—

1,3,4 稲垣 孝行 1,2 中川 拓 5 前田 伸司 5 村瀬 良朗
6 市川 和哉 1,3,8 森山 誠 3 打矢 恵一 7 八木 哲也
3 二改 俊章 1,2 小川 賢二

要旨：〔緒言〕初回肺結核治療中に多剤耐性結核となった患者由来の菌株について多剤耐性化前後における遺伝子解析を行い、臨床的背景と併せて耐性化の原因を検討した。〔方法〕多剤耐性化前後の検体について、薬剤感受性試験、スポリゴタイピング、VNTR型別解析、薬剤耐性遺伝子の解析を実施し、臨床的背景についても検討した。〔結果〕薬剤感受性試験の結果、INHとRFPに対して、多剤耐性化前後で感受性から耐性に変化した。薬剤耐性遺伝子の変化は、耐性化後に*rpoB*の変異S531Lがみられた。スポリゴタイピングの結果、北京型株であった。VNTR型別解析では、35領域すべてで一一致した。宿主には、合併症として糖尿病があった。〔考察〕菌遺伝子解析の結果、再感染やポリクローナル感染ではなかった。北京型株の中でも耐性化が起りやすい遺伝子系統に含まれていた。合併症として糖尿病があり、耐性化が起りやすい宿主であった。宿主側と菌側共に耐性化が起りやすい因子があり、短期間に多剤耐性化したと考えられた。耐性化のリスクが高い患者で排菌が続く場合は、RFP耐性遺伝子迅速検出法を用いて、定期的に薬剤耐性化をmonitoringする必要があることが示唆された。

キーワード：多剤耐性結核、スポリゴタイピング、VNTR型別解析、薬剤耐性遺伝子、糖尿病、北京型結核菌

緒 言

結核の治療は、isoniazid (INH) と rifampicin (RFP) を中心とした、多剤併用療法が行われている¹⁾。このINHとRFPの両薬剤に耐性を示す多剤耐性結核 (multi-drug resistant tuberculosis: MDR-TB) は、薬剤感受性結核に比べて治療困難となるケースが多く、治療成功率はおよそ70%程度であり、集団感染事例も報告されており、世界的に問題となっている²⁾。結核菌の薬剤耐性は遺伝子の突然変異により生じ、INHで10⁶個に1個、RFPで10⁸個に1個程度の頻度とされており、この原因として、適切な薬剤管理がなされずに患者側の不規則な服用や医療従事者側の不適切な治療によってつくられる man-made

disease とされている³⁾。

1990年代に結核菌の遺伝子研究は、急速に進展し、結核菌遺伝子型別解析手法により結核菌の多様性が明らかとなった⁴⁾⁵⁾。1995年に Soolingen ら⁶⁾は東アジアで分離される結核菌の多くが特徴的な遺伝子型を示すことを見出し、この遺伝子型に属する株を結核菌北京遺伝子型 (Beijing genotype strain, 以下、北京型株) と命名している。この北京型株は、わが国で分離される結核菌の70~80%を占めており、他の遺伝系統と比べて、薬剤耐性と関連が高いことが示唆されている⁷⁾。

そこで本研究は、初回結核治療中において短期間に多剤耐性結核となった患者から得られた菌株を対象とし、多剤耐性化前後での菌遺伝子の網羅的解析を実施し、臨

¹国立病院機構東名古屋病院臨床研究部、²同呼吸器内科、³名城大学薬学部微生物学研究室、⁴高山赤十字病院薬剤部、⁵結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部結核菌情報科、⁶名古屋大学医学部附属病院薬剤部、⁷同中央感染制御部、⁸国立病院機構名古屋医療センター薬剤科

連絡先：小川賢二、国立病院機構東名古屋病院臨床研究部/呼吸器内科、〒465-8620 愛知県名古屋市名東区梅森坂5-101 (E-mail: ogawak@toumei.hosp.go.jp)

(Received 4 Feb. 2013 / Accepted 23 Apr. 2013)

床的背景と併せて耐性化の原因について検討した。

方 法

(1) 症例

52歳日本人女性。結核治療歴なし。入院2年前に2型糖尿病と指摘されていたが放置しており、投薬等はなされていなかった。入院時のHbA1c (JDS) 値は8.6%であり血糖コントロール不良の状態であった。アルコール依存症あり。喫煙歴なし。半年前より咳、痰、食欲不振、体重減少、発熱、呼吸困難があった。20xx年x月他院にて肺結核症と診断され同月独立行政法人国立病院機構東名古屋病院（以下、当院）に転院となった。入院時の胸部X線による学会分類はbII2 (Fig. 1 (a)), 喀痰塗抹(3+)であった。アルコール多飲による肝機能障害およびX線画像とCRP上昇所見から肺炎の合併も疑われたため、入院当初はINHおよび結核菌やグラム陰性菌に感受性のある isepamicin (ISP) で治療を開始し、CRPの改善を認めたため12日後にINH + ethambutol (EB) に変更し、治療開始26日目に肝機能障害が改善したためRFPを加えINH + RFP + EBの3剤治療となった。症状および画像は明らかな改善を認めた (Fig. 1 (b)) が、培養陽性の排菌が5カ月間持続していた。入院時の結核菌薬剤感受性検査ではINHとRFPともに感受性であったが、治療開始5カ月目の薬剤感受性検査にてINHとRFPのみ耐性である多剤耐性結核菌が検出された。このとき、EB, pyrazinamide (PZA), streptomycin (SM), kanamycin (KM), enviomycin (EVM), ethionamide prothionamide (TH), paraaminosalicylic acid (PAS), cycloserine (CS), levofloxacin (LVFX) の薬剤感受性検査の結果はすべて感受性であった。治療開始日から耐性菌が検出されるまでの期間は153日 (5.1カ月) であった。入院治療中であり、服薬コンプライアンスは良好であった。なお体重が

38 kgと少なく当初全身状態も不良であったため、抗結核薬の投与量はINH 200 mg/day, RFP 300 mg/day, EB 500 mg/dayと、RFPおよびEBが推奨投与量よりもわずかに少量であった。また多剤耐性菌であることが判明した直後よりEB + SM (0.75 g/day) + PZA (1.0 g/day) + LVFX (375 mg/day) にて治療を開始し、1カ月後には培養が陰性化、胸部X線画像もさらに改善した (Fig. 1 (c))。

(2) 使用検体

使用検体は、上記症例患者の多剤耐性化直前にあたる治療開始4カ月目に得られた喀痰検体および多剤耐性化直後にあたる治療開始5カ月目に得られた喀痰検体をそれぞれ喀痰溶解酵素 (スプタザイム) で溶解および均一化し、N-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム (NALC-NaOH) 法により前処理を行い、Mycobacteria growth indicator tube (以下MGIT)/BACTEC MGIT 960 システム (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) により培養後、ミドルブルック7H11-C寒天培地 (極東製薬工業株式会社) にて分離培養し、各4コロニーずつ採取した後、再びMGIT/BACTEC MGIT 960 システムを用いて培養した⁸⁾。

(3) 実験方法

① 薬剤感受性試験

「BACTEC MGIT 960 AST結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ」(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) (以下、MGIT法) を用いてINH, RFP, EB, およびSMに対する感受性の判定を行った。

② DNAの抽出

5 mLのMGIT液体培地を用いて37°Cで1~3週間培養を行った後、0.5 mLをマイコプロス液体培地 (極東製薬工業株式会社) で、吸光度 (530 nm) が0.2になるまで増菌培養を行った。DNAの抽出は、illustra bacteria genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare) を用いてマニュアル

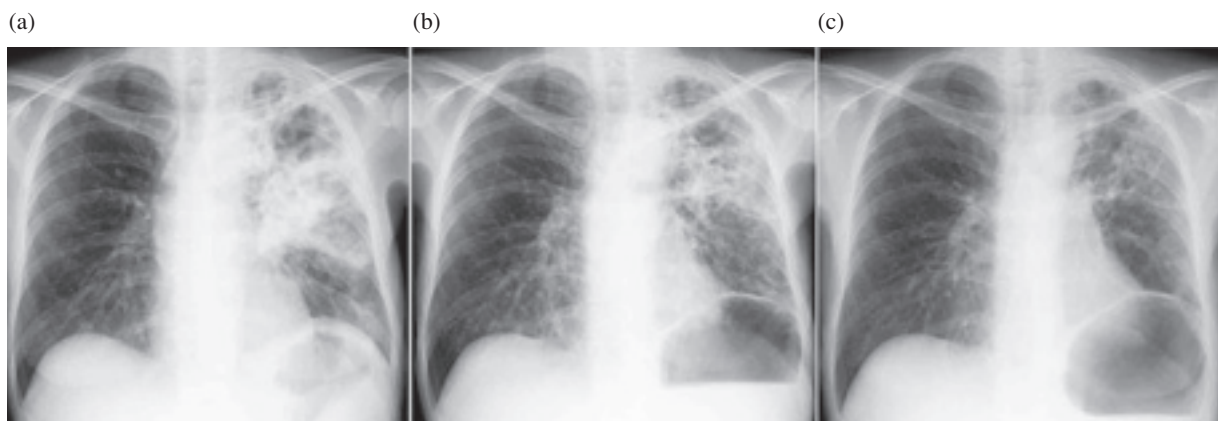


Fig. 1 (a) Chest radiograph finding on admission to hospital, (b) Chest radiograph finding at 4 months after start of first-line therapy at MDR-TB diagnosis, (c) Chest radiograph finding at 3 months after start of anti-MDR-TB therapy

に従い、DNAを抽出した。また、陽性コントロールとして、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv由来DNAを以下の実験に用いた。

③スポリゴタイピング

プライマーは、DRa (5'末端がビオチンラベル化されたGGTTTTGGGTCTGACGAC)とDRb (CCGAGAGGGGA CGGAAAC)を用いた。2 μ LのDNA溶液にPromega PCR Master mix (プロメガ株式会社) 10 μ L, 100 μ M各プライマー 0.2 μ Lを加え、全量20 μ Lになるように滅菌精製水で調整した。PCRは、96 $^{\circ}$ C 3分間のプレヒーティング後、96 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 30秒で28サイクル増幅し、最後に72 $^{\circ}$ C 5分間伸張反応を行った。PCR産物は、メンブレン上に固相化したKamerbeekら⁹⁾が報告した43の合成オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせ、洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを結合させ、基質を加え発色させた。その後、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)を用いてX線フィルムに露光した。

④VNTR型別解析

プライマーは、前田ら¹⁰⁾が報告した35領域のVNTR型別解析に用いられたものを使用した。PCR反応は、Takara EX Taq Hot Start Version (Takara bio社)を用いて行った。1 μ LのDNA溶液にTakara EX Taq Hot Start Version (5 U/ μ L) 0.1 μ L, 2.5 mM dNTPmix 2 μ L, 2x GC buffer I (Takara) 10 μ L, 25 μ M各プライマー 0.5 μ Lを加え、全量20 μ Lになるように滅菌精製水で調整した。PCRは、GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems Japan, Ltd.)を用いて、94 $^{\circ}$ C 5分間のプレヒーティング後、94 $^{\circ}$ C 30秒、63 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 3分で35サイクル増幅し、最後に72 $^{\circ}$ C 7分間伸張反応を行った。PCR産物は、1.2~4%アガロースゲル (E-gel: Invitrogen) で電気泳動した。電気泳動後のゲルはGel-Doc (Bio-Rad Laboratories, Inc.)で撮影し、解析ソフトQuantity-One (Bio-Rad Laboratories, Inc.)を用いて対象VNTR領域の塩基対数を推定した。

⑤薬剤耐性遺伝子のシーケンス解析

RFPの薬剤耐性に関する遺伝子の解析は、*rpoB*遺伝子変異領域を対象とした。プライマーは、Rossauら¹¹⁾が報告したIP-1, IP-2を用いて*rpoB*遺伝子変異領域のシーケンス解析を実施した (Table 1)。

INHの薬剤耐性に関する遺伝子の解析は、*katG*, *inhA*, *ahpC*, *inhA* promoter, *fabG1*, *furA* 遺伝子変異領域を対象とした。プライマーは、Andoら¹²⁾が報告した-129 *furA*とCardosoら¹³⁾が報告したKatG-5, KatG-4とKatG-9, KatG-8とKatG-13に加え、独自に作成したKatG-216247とKatG-216052の4組のプライマーセットをそれぞれ用いて、*furA*および*katG*遺伝子変異領域のシーケンス解析

を行った (Table 1)。*inhA*, *inhA* promoter, *fabG1* 遺伝子変異領域は、Andoら¹²⁾が報告した-200*fabG1*, および*inhA*+40を用いて、シーケンス解析を行った (Table 1)。*ahpC* 遺伝子変異領域は、Cardosoら¹³⁾が報告したAhpC-1, AhpC-2を用いて、シーケンス解析を行った (Table 1)。PCR後に複数バンドが認められた領域については、iBase[™] Power System (Invitrogen) および、E-gel[®]Clone Well Agarose Gels (Invitrogen)を用いて標的とするサイズのPCR産物のゲル抽出を実施した後、シーケンス解析を行った。

⑥一塩基多型およびDNA修復遺伝子の解析

一塩基多型に関する遺伝子の解析は、ゲノム上の位置である797736, 909166, 1477596, 1548149, 1692069, 1892017, 2376135, 2532616, 2825581, 4137829の合計10領域を対象とし、DNA修復遺伝子に関する遺伝子の解析は、*mutT2*, *mutT4*, *ogt*領域を対象とした。各領域は、Hanekomら¹⁴⁾によって報告されたAmplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR法を応用したプライマーを用いた (Table 1)¹⁵⁾。1892017領域および*mutT4*領域に関しては、Hanekomら¹⁴⁾が報告したプライマーでは、複数バンドの増幅が認められたり、増幅が認められなかった (data not shown) ため、独自に作成したプライマー*mutT4*codon48F2, 1892017SNP6R2を組み合わせて使用した (Table 1)。野生型検出用プライマーセットに標的とするPCR産物の増幅が認められた場合は野生型と判定し、変異型検出用プライマーセットに標的とするPCR産物の増幅が認められた場合は変異型と判定した。

⑦大規模ゲノム欠失 (Regions of difference: RD) の解析

大規模ゲノム欠失に関する遺伝子の解析は、RD142, RD150, RD181領域を対象とした。RD142領域は、Tsolakiら¹⁶⁾が報告したTB-RD142-Fと独自に作成したRD142R3をプライマーに用いた。RD150領域およびRD181領域は、それぞれTsolakiらが報告したTB-RD150-FとTB-RD150-R, TB-RD181-FとTB-RD181-Rをプライマーに用いた (Table 1)。RD142の場合には、3780 bpに増幅が認められた時、RD142 (+: 欠失なし)と判定し、806 bpに増幅が認められた時、RD142 (-: 欠失)と判定した。RD150の場合には、3267 bpに増幅が認められた時、RD150 (+)と判定し、780 bpに増幅が認められた時、RD150 (-)と判定した。RD181の場合には、1713 bpに増幅が認められた時、RD181 (+)と判定し、1002 bpに増幅が認められた時、RD181 (-)と判定した。

⑧ゲノムの特定領域 (NTF領域) への挿入配列 (IS 6110) の有無

プライマーは、Plikaytisら¹⁷⁾が報告したMDR-6, およびWadaら¹⁸⁾が報告したMDR-6rを使用した。判定基準は、302 bpに増幅が認められた場合にancient型と判定し、

Table 1 PCR primer sequences used in this study

Target gene	Primer	Primer sequence (5' to 3')	Reference	Target gene	Primer	Primer sequence (5' to 3')	Reference
<i>rpoB</i>	IP-1	GGTCGGCATGTCGGGATGG	Rossau ⁽¹⁾	797736	797736 wt F	CAGTCATCTGTTGATGTTT	Hanekom ⁽⁴⁾
	IP-2	GCACGTGCGGGAACCTCCAGC	Rossau ⁽¹⁾	797736	797736 mut F	CAGTCATCTGTTGATGTTT	Hanekom ⁽⁴⁾
<i>furA</i> and <i>katG</i>	-129 <i>furA</i>	GCTCATCGGAACATACGAAG	Ando ⁽²⁾	909166	797736 R	ACGCCATAAGCACTTCACAC	Hanekom ⁽⁴⁾
	KatG-5	CAGATCCCGTACCGCTGTA	Cardoso ⁽³⁾	909166	909166 wt F	CACGTTTGACCGGATCCCGC	Hanekom ⁽⁴⁾
	KatG-4	CCTGGCTCGCGGATGA	Cardoso ⁽³⁾	909166	909166 mut F	CACGTTTGACCGGATCCCGT	Hanekom ⁽⁴⁾
	KatG-9	CTCGGTGGATCAGCTTGTACC	Cardoso ⁽³⁾	909166	909166 R	CGTCCCAAGGACAGTCAAG	Hanekom ⁽⁴⁾
	KatG-8	GAGGAAJTGCCGACGAGT	Cardoso ⁽³⁾	1477596	1477596 wt F	GCCCGGCCAGGGTTAATAGC	Hanekom ⁽⁴⁾
	KatG-13	TCTCAGGGCACTGAGCGTAA	Cardoso ⁽³⁾	1477596	1477596 mut F	GCCCGGCCAGGGTTAATAGT	Hanekom ⁽⁴⁾
	KatG-216247	AGCCATGCATGAGCATTTATCC	This study	1477596	1477596 R	CCGGTAAACCAAATGGCCAC	Hanekom ⁽⁴⁾
	KatG-216052	GTACATGCTGCTCGACAAAG	This study	1548149	1548149 F	CGACGTGACATGGCTGGATT	Hanekom ⁽⁴⁾
	-200/ <i>fabG1</i>	TTCGTAGGGCGTCAATACAC	Ando ⁽²⁾	1548149	1548149 wt R	CCGACAACTCAGCGATACC	Hanekom ⁽⁴⁾
<i>inhA</i> , <i>inhA</i> promoter and <i>fabG1</i>	<i>inhA</i> + 40	CCGAACGACAGCAGCAGGAC	Ando ⁽²⁾	1692069	1548149 mut R	CCGACAACTCAGCGATACT	Hanekom ⁽⁴⁾
	AhpC-1	GCCTGGGTGTTCTGTCATCTGGT	Cardoso ⁽³⁾	1692069	1692069 F	CGACCCGTGATCGCATGTA	Hanekom ⁽⁴⁾
<i>ahpC</i>	AhpC-2	CCCAACGTCCACTGGCTCATA	Cardoso ⁽³⁾	1692069	1692069 wt R	CACCGAGTCAACCGGCCTTC	Hanekom ⁽⁴⁾
					1692069 mut R	CACCGAGTCAACCGGCCTTC	Hanekom ⁽⁴⁾
<i>nutT2</i>	mutT2 (codon 58) wt F	AGAGCTCGCCGAAAGAACCGG	Hanekom ⁽⁴⁾	1892017	1892017 wt F	CCACGTTTCTTGATGCCTAT	Hanekom ⁽⁴⁾
	mutT2 (codon 58) mut F	AGAGCTCGCCGAAAGAACCGC	Hanekom ⁽⁴⁾	1892017	1892017 mut F	CCACGTTTCTTGATGCCTAC	Hanekom ⁽⁴⁾
	mutT2 (codon 58) R	AAGCAGATGCACCGCATAGG	Hanekom ⁽⁴⁾	1892017	1892017SNP6R2	GTGTCCGGCAAAATATGCAGT	This study
<i>nutT4</i>	mutT4codon48F2	TCCCTCGCCCAACGAAATAAGTC	This study	2376135	2376135 wt F	GTTGATGTATATCGCGGACA	Hanekom ⁽⁴⁾
	mutT4 (codon 48) wt R	CGAGGTGAGCGGATCG	Hanekom ⁽⁴⁾	2376135	2376135 mut F	GTTGATGTATATCGCGGAGG	Hanekom ⁽⁴⁾
	mutT4 (codon 48) mut R	CGAGGTGAGCGGATCC	Hanekom ⁽⁴⁾	2376135	2376135 R	GCCCGCGAATTAGAACAGC	Hanekom ⁽⁴⁾
	ogt (codon 12) F	CCGACGAGGAAAGATCGCAT	Hanekom ⁽⁴⁾	2532616	2532616 F	CTGCTTCGACACCTTTAAAGGC	Hanekom ⁽⁴⁾
<i>ogt</i>	ogt (codon 12) wt R	GCCCGCCAGGGTTAATAGC	Hanekom ⁽⁴⁾	2532616	2532616 wt R	ATGCCCAACCGCCAGTGGGC	Hanekom ⁽⁴⁾
	ogt (codon 12) mut R	GCCCGCCAGGGTTAATAGT	Hanekom ⁽⁴⁾	2532616	2532616 mut R	ATGCCCAACCGCCAGTGGGT	Hanekom ⁽⁴⁾
	ogt (codon 37) F	CCATCGGGCCATTAACCCT	Hanekom ⁽⁴⁾	2825581	2825581 wt F	TGACGGTCCGGATTCTTGGGT	Hanekom ⁽⁴⁾
	ogt (codon 37) wt R	TCGGGTGCCAGTGTGCGC	Hanekom ⁽⁴⁾	2825581	2825581 mut F	TGACGGTCCGGATTCTTGGGG	Hanekom ⁽⁴⁾
	ogt (codon 37) mut R	TCGGGTGCCAGTGTGCGA	Hanekom ⁽⁴⁾	2825581	2825581 R	AGCCCAAGGATACTGAGCG	Hanekom ⁽⁴⁾
				4137829	4137829 wt F	AGATGGCCTACCGGATCACC	Hanekom ⁽⁴⁾
RD142	TB-RD142-F	TCCCGACGACGAACAACGAC	Tsolaki ⁽⁶⁾	4137829	4137829 mut F	AGATGGCCTACCGGATCACT	Hanekom ⁽⁴⁾
	RD142R3	TCGGCACCCGGCAAGGTTC	This study	4137829	4137829 R	GACCGAGTCCGCAACAGTTTCC	Hanekom ⁽⁴⁾
RD150	TB-RD150-F	TGTGGCTGGCTCGGCAATAG	Tsolaki ⁽⁶⁾	Ancient type or modern type	MDR-6	CCAGATATCGGGTGTGCGAC	Pitkayitis ⁽⁷⁾
	TB-RD150-R	CGGGACGGCAAAACGGGTGAT	Tsolaki ⁽⁶⁾	W strains or non-W strains	MDR-6r	TGCGGTTTTCGAAATCTAAACCC	Waddi ⁽⁸⁾
RD181	TB-RD181-F	CGCAACGGCCGCGGTGAACCTCT	Tsolaki ⁽⁶⁾	MDR-7	MDR-7r	CGCGAGATCTCATCGCAACCC	Pitkayitis ⁽⁷⁾
	TB-RD181-R	CGGGCGGCTGGGGAAACCTT	Tsolaki ⁽⁶⁾	MDR-7r	MDR-7r	GTACGAAACAGCAGCGGTGGCG	Waddi ⁽⁸⁾

1.5 kbに増幅が認められた場合にmodern型と判定した。また、W型と非W型を判定するためにプライマーとしてPlikaytisら¹⁷⁾が報告したMDR-7、およびWadaら¹⁸⁾が報告したMDR-7rを使用し、1.5 kbに増幅が認められた場合にW型と判定し、280 bpに増幅が認められた場合に非W型と判定した。

⑨北京型株における各サブグループ解析

一塩基多型を用いたサブグループ解析では、Iwamotoら¹⁹⁾とFilliolら²⁰⁾の方法を用いた。VNTRを用いたサブグループ解析は、Wadaら¹⁸⁾の方法を用いた。また、B1サブグループに属する菌株83株 (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2008.01431.x/full>) と本症例菌株を比較するため、各アレルプロファイルを基に、マンハッタン距離を求め、系統樹をFitch-Margoliash法にて推定し、Tree Viewにより系統樹を作成した。

結 果

(1) 薬剤感受性試験

MGIT法による薬剤感受性試験の結果、多剤耐性化前の分離株4株では、INH、RFP、EB、SMのすべての抗結核薬で感受性と判定され、多剤耐性化後の分離株4株では、INHとRFPが耐性、EBとSMが感受性と判定された。

(2) スポリゴタイピング

すべての分離株8株は、43カ所のスパーサー中、1-34部分が陰性、35-43部分が陽性であった (Fig. 2)。

(3) VNTR型別解析

すべての分離株8株は、35領域の反復数が一致した (Table 2)。また、VNTR型別解析を用いたサブグループ解析では、B1サブグループに属していた (Fig. 3)。

(4) 薬剤耐性遺伝子

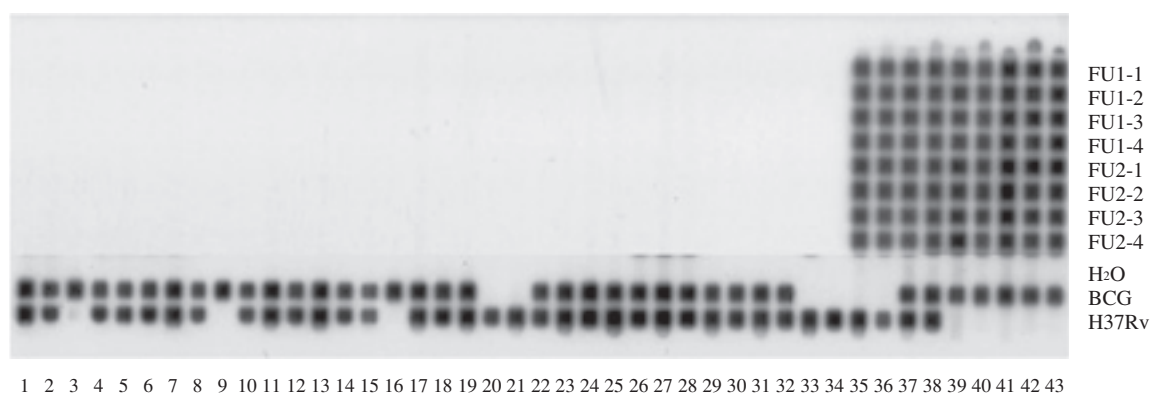


Fig. 2 Hybridization patterns (spoligotypes) from clinical strains of MDR-TB in this study, *M. bovis* BCG, and *M. tuberculosis* H37Rv. A membrane with 43 spacer oligonucleotides was used (vertical lines). The spoligotype of the clinical strains of MDR-TB corresponds to that of strains from the described Beijing genotype group.

FU1-1~4: before MDR-TB. FU2-1~4: after MDR-TB. H₂O: negative control. BCG: *M. bovis* BCG. H37Rv: *M. tuberculosis* H37Rv.

Table 2 Allele profile of *M. tuberculosis* H37Rv and clinical strains of MDR-TB in the VNTR loci

	MIR2	MIR4	MIR10	MIR16	MIR20	MIR23	MIR24	MIR26	MIR27	MIR31	MIR39	MIR40	ETR-A	ETR-B	ETR-C	ETR-F	QUB11a	QUB11b	QUB3232	Mtub21	VNTR3820	VNTR4120	QUB4156	Mtub04	Mtub29	Mtub34	Mtub39	VNTR1895	QUB3336	QUB23	Mtub24	VNTR2372	Mtub30	QUB15	QUB26	VNTR subgroup (**)	
JATA-VNTR (*b)			○				○		○									○	○			○	○					○		○	○			○	○		
15-MIRU-VNTR (*c)			○	○					○	○	○	○						○	○			○	○					○					○			○	
24-MIRU-VNTR (*c)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○												○	○	○	○							○		○	
Hypervariable loci (*d)																	○	○			○	○															
Reference strain <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	2	3	3	2	2	6	1	3	3	3	2	1	3	3	4	3	2	5	4	1	3	2	3	2	4	3	5	4	8	6	4	2	2	4	5	-	
Clinical isolates Susceptible strain (before MDR-TB)	2	2	1	4	2	5	1	6	3	6	3	3	4	2	7	3	9	7	13	3	14	11	6	4	4	4	3	3	4	7	8	2	4	4	4	8	B1
Resistant strain (after MDR-TB)	2	2	1	4	2	5	1	6	3	6	3	3	4	2	7	3	9	7	13	3	14	11	6	4	4	3	3	4	7	8	2	4	4	4	8	B1	

*a: VNTR subgroup from Wada et al. (2009); reference 18. *b: JATA-VNTR from Maeda et al. (2008); reference 10.

*c: 15, 24-MIRU-VNTR from Supply et al. (2006); reference 27. *d: Hypervariable loci from Iwamoto et al. (2007); reference 28.

Table 3 Results of DNA sequencing mutations analyzed, Types of sequences designations, Point mutations in indicated putative repair gene, Regions of difference, and IS6110 in the NTF region for clinical isolates of MDR-TB used in this study.

Reference strain <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Clinical isolates	DNA sequencing mutations analyzed				Types of sequences designations				Point mutations in indicated putative repair gene			Regions of difference			IS6110 in the NTF region									
	<i>rpoB</i>	<i>furA-katG</i>	<i>inhA promoter-fabG1-inhA</i>	<i>ahpC</i>	979736	906166	1477596	1548149	1692069	1892017	2376135	2532616	2825581	4137829	ST subgroup	<i>mutT2</i>	<i>mutT4</i>	<i>ogt</i>	RD 181	RD 142	RD 150	Ancient type or modern type	W strains or Non-W strains	
Susceptible strain (before MDR-TB)	-	-	-	-	C	C	C	C	A	A	T	A	G	T	C	-	WT	WT	WT	+	+	+	Ancient type	Non-W strains
Resistant strain (after MDR-TB)	S531L	-	-	-	T	T	C	C	G	A	T	A	G	G	C	ST3	WT	WT	WT	-	+	+	Ancient type	Non-W strains
	-	-	-	-	T	C	C	G	A	T	A	G	G	C	ST3	WT	WT	WT	-	+	+	Ancient type	Non-W strains	

- : no mutation or absence, + : presence, WT: wild type

RFP耐性遺伝子の *rpoB* 領域は、耐性化後の分離株4株のみでコドン531のSer (S) のLeu (L) への変異が認められた (S531L)。耐性化前の分離株4株は、*rpoB* 領域の変異が認められなかった (Table 3)。INH耐性遺伝子の *katG*, *inhA*, *ahpC*, *fabG1*, *furA*, *inhA promoter* 領域は、すべての分離株8株で耐性化前後の変異が認められなかった。

(5) 一塩基多型, DNA修復遺伝子, 大規模ゲノム欠失, NTF領域への挿入配列

すべての分離株8株は、同一のパターンを示していた (Table 3)。一塩基多型の結果, STサブグループ解析では, ST3サブグループと一致した (Table 3)。DNA修復遺伝子は、すべての領域で野生型を示していた (Table 3)。大規模ゲノム欠失は, RD181 (-), RD142 (+), RD150 (+) であった (Table 3)。NTF領域へのIS6110の挿入の有無による分類では, ancient型および非W型と判定された (Table 3)。

考 察

菌遺伝子解析の結果, 多剤耐性化前後での遺伝子の違いは, RFP耐性遺伝子のみであった。RFP耐性株の約95%がRFP耐性遺伝子の *rpoB* 領域の変異とされており, 本症例においても例外ではなかった²¹⁾。一方, INH耐性遺

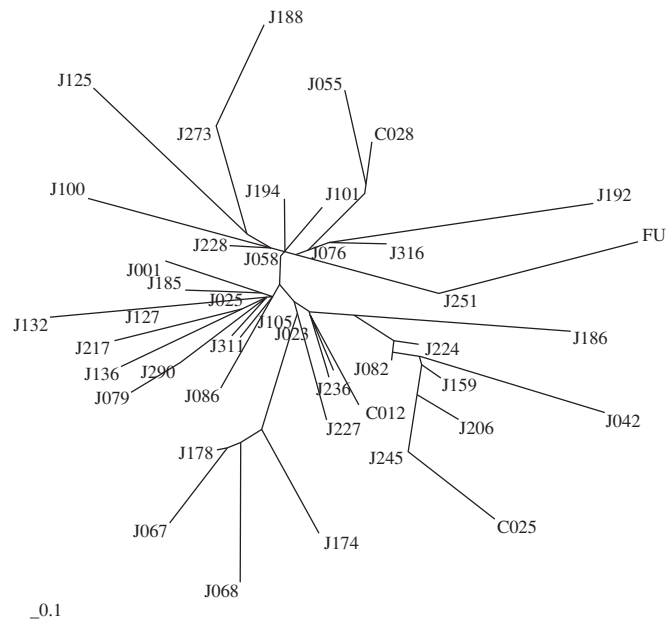


Fig. 3 Dendrogram constructed from VNTR typing results of *M. tuberculosis* isolates from 84 clinical strains; data from 83 clinical strains are based on previous studies (Wada et al., 2009; reference 18) and one clinical strain is based on data obtained in this study (FU). All isolates represent one cluster (B1). The dendrogram was constructed from a distance matrix using Fitch-Margoliash analysis according to the VNTR markers. The Manhattan distance is indicated at the bottom.

伝子については、今回検討したすべての領域で変異は認められなかった。日本結核病学会の“薬剤耐性結核の医療に関する提言”では、INH耐性遺伝子とそれぞれの説明可能な耐性菌の頻度が示されており、*katG*は60~70%、*inhA*は<10%、*ahpC*は0~20%と記載がある²²⁾。しかし、上記INH耐性遺伝子のうち最も変異が起こる箇所である*katG* S315Tと*inhA* C-15Tが変異を占める割合は、ヨーロッパ地域分離株が82.8%~89.3%に対し、アジア地域分離株で47.9%~69.2%と報告されており²³⁾、主なINH耐性遺伝子の変異率が低いため、本症例においてもこれらの領域において耐性変異が特定できなかった一因であると考えられた。また、ST26サブグループ中のMDR-TBでは、変異箇所が*rpoB* S531Lで85.7%と*katG* S315Tで71.4%と高値であるのに対し、ST3サブグループでは、変異箇所が*katG* S315Tで50%、*rpoB* S531Lで23.5%と低く、変異箇所が分散していることが特徴であり、薬物選択圧への順応のメカニズムが北京型株中のサブグループごとに異なる可能性があることが報告されている¹⁹⁾。本症例についてもST3サブグループに属していたため、INHの変異箇所が特定できなかった可能性が考えられた。そこで、2010年にAndoら¹²⁾が日本国内で分離されたINH耐性株において新たな変異箇所として報告した*inhA*と*inhA* promoter領域の中間部である*fabG1*領域、および*katG*領域の上流部である*furA*領域についても検討したが変異は認められなかった。結核菌の抗結核薬に対する耐性獲得はすべて染色体遺伝子の突然変異や不特定の塩基配列の挿入、あるいは欠損などで起こるとされている²⁴⁾。そのため、調査した遺伝子とは別の領域に変異があると考えられた。本症例のINH耐性株とINH感受性株の両菌株のゲノムを比較すれば、新たなINH耐性遺伝子を発見できる可能性があり、今後さらに調査すべき課題として残った。従って、治療中に排菌が長期に持続する症例など、耐性化の疑いがある場合には、日本国内分離株で主なINH耐性遺伝子に変異を示さない可能性が高いことを念頭にRFP耐性遺伝子迅速検出法²⁵⁾を積極的に使用して、定期的に薬剤耐性化のmonitoringを実施する必要があると考えられた。

北京型株を特定する“gold standard”は、スポリゴタイプイングである²⁶⁾。本症例における分離株はすべて北京型株として特徴的な43カ所のスペーサー中、1-34部分が陰性、35-43部分が陽性であった。北京型株と薬剤耐性菌に関して、欧州域から収集された多剤耐性結核菌株2,500株を用いた分子疫学調査により、北京型株が多剤耐性結核の発生において主要な役割を果たしていることが示唆されている⁷⁾。しかし、日本国内の結核菌の約70~80%が北京型株であるため、スポリゴタイプイングでの解析では多様性が少なく、VNTR型別解析法など別の方

法を用いて更なる解析が必要であるとされている²⁶⁾。そこで、前田ら¹⁰⁾が報告した35領域のVNTR型別解析を試みたところ、検討したすべての領域で同一の反復数を示した。前田ら¹⁰⁾は、2~3カ所以上のコピー数が異なる場合、別株と考えるべきであり、1~2カ所のコピー数が異なる場合は変異の可能性があり他の領域の分析結果を参考にして総合的に判定すべきと考察している。つまり、Supplyら²⁷⁾が推奨している世界標準法である15, 24 Optimized MIRU-VNTR型別解析法や前田ら¹⁰⁾が北京型株の割合が高い地域でVNTR標準法として利用できる方法として報告しているJATA-VNTR型別解析法を含めたすべての領域が完全に一致している本症例からの分離株においては、多剤耐性化が再感染やポリクローナル感染ではなかったことを示唆する。加えて今回の菌株では、アレル頻度が高く北京型株のようにvariationが少ない菌株を詳細に区別するのに有用なHypervariable Lociの4領域²⁸⁾についてもすべて一致していたことから、間違いなく多剤耐性化が再感染やポリクローナル感染によるものではないと考えられた。

Wadaら¹⁸⁾は、VNTR型別解析を用いて北京型株をさらに5つのサブグループに分類しており、B1およびB4サブグループに最も多く耐性菌が分布していたと報告した。本症例において、VNTR型別解析では、B1サブグループに属していた。また、Iwamotoら¹⁹⁾は、一塩基多型によるサブグループ解析において、ST26サブグループおよびST3サブグループが北京型株の中でも多剤耐性結核/超多剤耐性結核になりやすいと報告しており、本症例もST3サブグループに属していた。従って、北京型の中でも最も耐性化が起こりやすい遺伝子系統の一部に含まれていることが明らかとなった。ただし、B1株中で少し外れた位置にあり、本症例のような治療中に短期間で多剤耐性化するというまれなケースとの相関がある可能性が考えられた。更なる検討が今後の課題であることが示唆された。

ancient型とmodern型、W株については、NTF領域へのIS6110の挿入がないものをancient型、1個の挿入がmodern型、modern型の中でも2個の挿入がW株であるとしている²⁹⁾。また、1990年代にニューヨークにおける多剤耐性結核集団感染事例の原因菌は、北京型株のmodern型に属するW株であり、ancient型よりもmodern型のほうが薬剤耐性を伴った流行を起こしやすい可能性が指摘されている⁵⁾。日本国内分離株は、ancient型でRD181が欠損している株が全体の6割程度を占めており、本症例も一致している³⁰⁾。つまり、遺伝系統的な分類において日本に多く存在する株が多剤耐性化を引き起こす可能性があり、modern型だけでなくancient型に関しても耐性化に注意すべき菌株であると考えられた。

DNA修復遺伝子について、Radらは、突然変異遺伝子の変異がDNAの修復に関与し、modern型北京型株においてDNA修復遺伝子の*mut*遺伝子の変異していたと報告している³¹⁾³²⁾。しかしその後、Iwamotoら¹⁹⁾は、*mut*遺伝子の変異と多剤耐性結核/超多剤耐性結核との間に統計学的な関係性がなかったと報告している。本症例では、DNA修復遺伝子における変異が認められず、DNA修復遺伝子と耐性化の関係性は低いと考えられた。

一方で、宿主側の背景要因に関して大森ら³³⁾は、「再治療」「外国人のうち最近5年以内に入国の外国人」で多剤耐性となるリスクが高く、「80歳未満」で抗結核薬に1剤以上耐性となるリスクが高いと多変量解析を用いて報告している。同様に、森ら³⁴⁾も性差は影響しないが、年齢差は圧倒的に「60歳未満」に偏っていたと報告している。本症例は、外国人・再治療例ではないが60歳未満(52歳)であり耐性化のリスクが高い宿主であると考えられた。また、森ら³⁴⁾は、MDR-TB患者の糖尿病の頻度が21%であり、日本の一般結核における糖尿病の頻度が14.8%でわずかに上回るが年齢層が低いことを考慮すると関連性を考える必要があると考察している。同様にChangら³⁵⁾は、新規結核患者192名(うち60名が糖尿病患者、132名が非糖尿病患者)において、治療開始1年後に糖尿病患者で3名(5.0%)、非糖尿病患者で1名(0.8%)がMDR-TBを発症し(P=0.056)、MDR-TBになりやすい傾向にあることを報告した。また、Restrepoら³⁶⁾は、2型糖尿病患者[特に慢性的に高血糖(HbA1c(NGSP)値>6.2%)でコントロール不良の2型糖尿病患者]において非糖尿病患者と比べて、結核への免疫応答に相違があったと報告している。Fisher-Hochら³⁷⁾は、この免疫機能障害により結核菌の耐性化が起りやすくなると考察している。例えば、2型糖尿病により活性酸素種の生成障害が起こることで、結核菌に対する酸化ストレスの保護に貢献する*katG*遺伝子の変異しやすくなる点を指摘している。従って、*rpoB*領域も免疫機能障害により変異を起こす可能性が考えられ、2型糖尿病で血糖コントロール不良の状態であったことにより、耐性化のリスクを高める要因となったと考えられた。

耐性化に至るまでの期間について、奥村ら³⁾は、結核と診断されてから耐性結核と診断されるまでMDR-TBで30.9カ月を要したと報告しており、一方で本症例は治療開始から耐性化まで153日(5.1カ月)であり、短期間に耐性化がみられた。本症例において考慮しなければならない点は、入院当初に肝機能障害や全身衰弱があり、INH+RFP+EB+PZAによる4剤使用の標準治療がすぐ開始できなかったこと、INH+RFP+EBの3剤治療時の投与量がRFPとEBで若干であるが標準投与量を下回っていたことが挙げられる。ただし、結核臨床の中で標

準的な抗結核薬の投与が難しい症例は日常的に存在しており、本症例と同様な投与量・投与スケジュールのケースでの結核菌の多剤耐性化を当院で経験したことはこれまでにない。これらの点を考慮すると菌側の耐性化因子を保有していただけでなく、年齢や糖尿病などの宿主側の耐性化因子も保有していたことに加えて、抗結核剤の投与量・投与スケジュールも影響を与えた可能性は否定できず、短期間に多剤耐性化したのではないかと考えられた。

今後、糖尿病患者など多剤耐性化のリスクが高い患者について、RFP耐性遺伝子迅速検出法を積極的に使用して、定期的な薬剤耐性化をmonitoringすることやVNTR型別解析法およびSNPsなどの菌遺伝子解析を実施することにより感染制御および、多剤耐性菌の発現抑制に大きく貢献できると考えられた。また、宿主側のみや菌側のみ耐性化要因の解析だけでなく、臨床背景と菌遺伝子解析を併せて検討することが必要不可欠であると考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多くのご助力をいただきました独立行政法人国立病院機構東名古屋病院検査科の皆様にご御礼申し上げます。絶えずご援助いただきました名城大学薬学部微生物学研究室の皆様へ深謝致します。多大なるご協力をいただきました吉岡史郎薬剤部長をはじめとする高山赤十字病院薬剤部の皆様へ心より感謝致します。

文 献

- 1) 日本結核病学会治療委員会：「結核医療の基準」の見直し—2008年。結核。2008；83：529-535。
- 2) 吉山 崇，尾形英雄，和田雅子：多剤耐性結核の治療成績。結核。2005；80：687-693。
- 3) 奥村昌夫，吉山 崇，尾形英雄，他：当院における多剤耐性結核症(MDR-TB)、超多剤耐性結核症(XDR-TB)の耐性化の過程についての検討。結核。2011；86：863-868。
- 4) 岩本朋忠：結核菌北京型ファミリーの集団遺伝学的解析から推察される日本国内定着型遺伝系統群の存在と遺伝系統別薬剤耐性化傾向の違い。結核。2009；84：755-759。
- 5) 村瀬良朗：結核菌遺伝系統別感染の特徴(北京型を中心に)。日本臨床。2011；69：1475-1481。
- 6) van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al.: Predominance of a Single Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Countries of East Asia. J Clin Microbiol. 1995；33：3234-3238。
- 7) Devaux I, Kremer K, Heersma H, et al.: Clusters of Multi-drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Cases, Europe.

- Emerg Infect Dis. 2009 ; 15 : 1052-1060.
- 8) Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al.: Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1999 ; 37 : 748-752.
 - 9) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al.: Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1999 ; 35 : 907-914.
 - 10) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他: 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム—JATA (12)-VNTR分析法の実際. *結核.* 2008 ; 83 : 673-678.
 - 11) Rossau R, Traore H, Beenhouwer HD, et al.: Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB Assay, a Reverse Hybridization Assay for the Simultaneous Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Its Resistance to Rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 ; 41 : 2093-2098.
 - 12) Ando H, Kondo Y, Suetake T, et al.: Identification of *katG* Mutations Associated with High-Level Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 ; 54 : 1793-1799.
 - 13) Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, et al.: Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 ; 48 : 3373-3381.
 - 14) Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, et al.: A Recently Evolved Sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strain Family Is Associated with an Increased Ability to Spread and Cause Disease. *J Clin Microbiol.* 2007 ; 45 : 1483-1490.
 - 15) Inagaki T, Yagi T, Ichikawa K, et al.: Evaluation of a rapid detection method of clarithromycin resistance genes in *Mycobacterium avium* complex isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2011 ; 66 : 722-729.
 - 16) Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, et al.: Genomic Deletions Classify the Beijing/W Strains as a Distinct Genetic Lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43 : 3185-3191.
 - 17) Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, et al.: Multiplex PCR Assay Specific for the Multidrug-Resistant Strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1994 ; 32 : 1542-1546.
 - 18) Wada T, Iwamoto T, Maeda S: Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 2009 ; 291 : 35-43.
 - 19) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al.: Population Structure Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family Indicates an Association between Certain Sublineages and Multidrug Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 ; 52 : 3805-3809.
 - 20) Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, et al.: Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol.* 2006 ; 188 : 759-772.
 - 21) Traore H, van Deun A, Shamputa IC, et al.: Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA and rifampin resistance in clinical specimens from tuberculosis patients by line probe assay. *J Clin Microbiol.* 2006 ; 44 : 4384-4388.
 - 22) 日本結核病学会治療委員会・社会保険委員会・抗酸菌検査法検討委員会: 薬剤耐性結核の医療に関する提言. *結核.* 2011 ; 86 : 523-528.
 - 23) 近松網代, 水野和重, 青野昭男, 他: GenoType®MTBDR *plus*による多剤耐性結核菌同定に関する検討. *結核.* 2011 ; 86 : 697-702.
 - 24) 向川 純, 遠藤美代子, 柳川義勢, 他: 薬剤耐性結核菌株の薬剤耐性パターンと遺伝子変異の解析. *感染症学雑誌.* 2005 ; 79 : 388-396.
 - 25) 稲垣孝行, 八木哲也, 市川和哉, 他: Line Probe AssayによるRifampicin耐性遺伝子検査の有用性: 患者喀痰を供試しての検討. *結核.* 2010 ; 85 : 703-709.
 - 26) Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, et al.: Analysis of the Allelic Diversity of the Mycobacterial Interspersed Repetitive Units in *Mycobacterium tuberculosis* Strains of the Beijing Family: Practical Implications and Evolutionary Considerations. *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 2438-2444.
 - 27) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006 ; 44 : 4498-4510.
 - 28) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 ; 270 : 67-74.
 - 29) 岩井和郎, 前田伸司, 村瀬良朗: 結核菌と結核症の考古学—その発生から世界流行まで. *結核.* 2010 ; 85 : 465-475.
 - 30) Kang HY, Wada T, Iwamoto T, et al.: Phylogeographical particularity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in South Korea based on international comparison with surrounding countries. *J Med Microbiol.* 2010 ; 59 : 1191-1197.
 - 31) van Soolingen D, Kremer K: Finding and ongoing research in the molecular epidemiology of tuberculosis. *結核.* 2009 ; 84 : 83-89.
 - 32) Rad ME, Bifani P, Martin C, et al.: Mutations in Putative Mutator Genes of *Mycobacterium tuberculosis* Strains of the W-Beijing Family. *Emerg Infect Dis.* 2003 ; 9 : 838-845.
 - 33) 大森正子, 下内 昭, 伊藤邦彦, 他: 結核サーベイランス情報からみた薬剤耐性結核患者の背景. *結核.* 2012 ; 87 : 357-365.
 - 34) 森 亨, 御手洗聡, 吉山 崇: 文献・資料からみた近年の日本における多剤耐性結核. *結核.* 2012 ; 87 : 565-575.

- 35) Chang JT, Dou HY, Yen CL, et al.: Effect of type 2 diabetes mellitus on the clinical severity and treatment outcome in patients with pulmonary tuberculosis: a potential role in the emergence of multidrug-resistance. *J Formos Med Assoc.* 2011 ; 110 : 372-381.
- 36) Restrepo BI, Fisher-Hoch SP, Pino PA, et al.: Tuberculosis in poorly controlled type 2 diabetes: altered cytokine expression in peripheral white blood cells. *Clin Infect Dis.* 2008 ; 47 : 634-641.
- 37) Fisher-Hoch SP, Whitney E, McCormick JB, et al.: Type 2 diabetes and multidrug-resistant tuberculosis. *Scand J Infect Dis.* 2008 ; 40 : 888-893.

—————Original Article—————

EXTENSIVE GENETIC ANALYSIS OF CLINICAL TUBERCULOSIS ISOLATES AND ANALYSIS OF HOST FACTORS TO EVALUATE RAPID DEVELOPMENT OF MULTIDRUG RESISTANCE DURING INITIAL TREATMENT

^{1,3,4}Takayuki INAGAKI, ^{1,2}Taku NAKAGAWA, ⁵Shinji MAEDA, ⁵Yoshiro MURASE, ⁶Kazuya ICHIKAWA, ^{1,3,8}Makoto MORIYAMA, ³Kei-ichi UCHIYA, ⁷Tetsuya YAGI, ³Toshiaki NIKAI, and ^{1,2}Kenji OGAWA

Abstract [Introduction] In this study, we aimed at determining the cause of resistance to tuberculosis treatment by performing genetic analyses of bacteria obtained from a patient who developed multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) during the initial course of treatment for tuberculosis.

[Methods] Specimens obtained before and after the development of MDR-TB were subjected to spoligotyping, drug-resistance gene analysis, and variable-number tandem repeat (VNTR) typing. The patient's clinical background was also reviewed.

[Results] After the development of resistance, the bacterial genome had changed with regard to only 1 mutation: S531L in the *rpoB* gene. Spoligotyping revealed that the genotype was that of the Beijing strain. VNTR typing confirmed all 35 loci. Review of the patient's clinical background showed that diabetes mellitus was present as a complication.

[Discussion] There was no evidence of reinfection or polyclonal infection. The strain belonged to a sublineage of the Beijing genotype that is a common precipitating cause of MDR-TB due to this genotype. The patient had diabetes mellitus and was thus vulnerable to the development of resistance. Factors associated with both the host and bacteria, therefore, contributed to the development of resistance in this

case, which seemed to result in the rapid development of MDR-TB.

Key words: Multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB), Spoligotyping, Variable-number tandem repeat (VNTR) typing, Drug-resistance gene, Diabetes mellitus, Beijing genotype strain

¹Department of Clinical Research and ²Pulmonary Medicine, National Hospital Organization Higashinagoya National Hospital; ³Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University; ⁴Department of Pharmacy, Takayama Red Cross Hospital; ⁵Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association; ⁶Department of Pharmacy and ⁷Department of Infectious Diseases, Center of National University Hospital for Infection Control, Nagoya University Hospital; ⁸Department of Pharmacy, National Hospital Organization Nagoya Medical Center

Correspondence to: Kenji Ogawa, National Hospital Organization Higashinagoya National Hospital, 5-101, Umemori-zaka, Meito-ku, Nagoya-shi, Aichi 468-8620 Japan.
(E-mail: ogawak@toumei.hosp.go.jp)