

原 著

臨床分離結核菌株の PCR-direct sequence 法による
pncA 遺伝子変異の検討: Pyrazinamide 耐性に関連して

帆 足 茂 久 · 田 井 久 量

東京慈恵会医科大学内科学講座第4 (第三病院)

玉 利 真由美

東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター

pncA GENE MUTATIONS IN CLINICAL ISOLATES OF TUBERCLE BACILLUS
BY POLYMERASE CHAIN REACTION-DIRECT SEQUENCING METHOD:
IN RELATIONSHIP TO PYRAZINAMIDE RESISTANCE

Shigehisa HOASHI*, Hisakazu TAI, and Mayumi TAMARI

We screened clinical isolates of tubercle bacillus for mutations in the *pncA* gene, which encodes pyrazinamidase (PZase), by polymerase chain reaction (PCR)-direct sequencing method. Sixty-eight strains of tubercle bacillus were isolated from 32 patients with pulmonary tuberculosis. The patients were treated with antituberculous agents including pyrazinamide (PZA) for 2 months. Thirty-two of the 68 strains were isolated from sputum samples collected from the patients before treatment; 29 strains and 7 strains were collected after 1 month and 2 months of treatment, respectively. The *pncA* genes in these strains, were assessed for mutations by direct sequencing of PCR products using an automated sequencer. Similarly, we examined two clinical isolates (ka567 and minami22) of tubercle bacillus, determined to be deficient in PZase activity by the Wayne method. A PZA-sensitive strain (H37Rv, ATCC27294), and a PZA-resistant strain (H37Rv-PZA-R, ATCC35828) were used as negative and positive controls for mutations in the *pncA* gene, respectively. None of the 68 strains demonstrated any mutations in the *pncA* gene; however, the 2 PZase-deficient strains had missense mutations in the *pncA* gene resulting in an amino acid substitution from His82 to Arg in clone ka567, and from Ala171 to Val in clone minami22.

Key words : Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Pyrazinamide, *pncA* gene, PCR-direct sequence, Point mutation

キーワード : 薬剤耐性結核菌, ピラジナミド, *pncA* 遺伝子, PCR-direct sequence, 点突然変異

別刷り請求先:

帆足 茂久

東京慈恵会医科大学内科学講座第4 (第三病院)
〒201-8601 東京都狛江市和泉本町4-11-1

* From the Department of Internal Medicine IV, Daisan Hospital, The Jikei University School of Medicine, 4-11-1, Izumihon-chou, Komae-shi, Tokyo 201-8601 Japan.

(Received 25 Sep. 1998/ Accepted 11 Dec. 1998)

はじめに

1996年4月から肺結核初回標準治療法に、治療初期2カ月間 pyrazinamide (PZA) を含む短期化学療法が加えられた¹⁾。PZA を含む短期化学療法で菌培養陰性化率の上昇、治療期間の短縮、治療終了後の再排菌率の低下が認められている²⁾³⁾。

PZA は結核菌に対して酸性の環境下にて強力な殺菌作用を有している⁴⁾。その作用機序については、PZA が結核菌細胞内に存在する pyrazinamidase (PZase) によって加水分解されて pyrazinoic acid となり、殺菌作用を示す⁴⁾と考えられている。

結核治療上、PZA に対する結核菌の薬剤感受性試験が必要である。しかし、PZA に対する薬剤感受性試験は PZA が酸性環境下で抗菌力を有するため、酸性の培地にて行わなければならない、わが国で広く用いられている小川培地での PZA 耐性の基準は提示されていない。現在、寒天培地や¹⁴CO₂ を使用した BACTEC radiometric method⁵⁾ などでの薬剤感受性試験が行われているが、PZA 耐性の minimum inhibitory concentration (MIC) 値は pH や培地により異なるため、PZA の薬剤感受性試験は確立されていない。

1996年に Scorpio ら⁶⁾により PZase を code する *pncA* 遺伝子が発見された。彼らは結核菌において *pncA* 遺伝子変異により PZase の活性消失が認められ、さらに *pncA* 遺伝子に変異を有していた結核菌は BACTEC radiometric method にて PZA 耐性であつ

たと報告した⁷⁾。このような報告から結核菌の PZA 耐性を判定する方法として結核菌の *pncA* 遺伝子変異を検出することは有用であると考えられる。

そこで今回、われわれは PZA を加えた初回標準治療法が行われた肺結核患者の治療前後の喀痰より検出された臨床分離結核菌株および PZase 活性陰性の結核菌株について polymerase chain reaction (PCR)-direct sequence 法を用いて *pncA* 遺伝子変異を検討した。

材料と方法

1. 材料

1996年4月以降、当院に入院した肺結核患者32名の喀痰より検出された臨床分離結核菌68株、および国立感染症研究所細菌部山崎利雄先生より供与された PZase 活性陰性の臨床分離結核菌2株 (か567および南22) を対象とした。臨床分離結核菌68株の内訳は、治療前の32菌株 (32名) と同一患者の治療1カ月後の29菌株 (29名) および治療2カ月後の7菌株 (7名) である。結核菌の同定は AccuProbe 法 (中外製薬) にて行われた。肺結核患者は、年齢20~84歳 (平均48歳)、男性21名、女性11名の計32名であった。全例初回治療例であり、初期2カ月間 PZA を含む Isoniazid (INH)・Rifampicin (RFP) および Ethambutol (EB) または Streptomycin (SM) の4剤併用その後、4カ月間 INH・RFP あるいは INH・RFP・EB の2~3剤を併用する合計6カ月間の標準治療法が行われた。

PZase 活性は PZA 培地に結核菌株を接種し、37℃にて4日間培養した後、1%硫酸 (II) アンモニウム鉄を加え、冷蔵4時間後、培地がピンク色に発色を示していれば PZase 活性ありと判断する Wayne の方法⁸⁾ によって行われた。また、対照として *pncA* 遺伝子に変異のみられない PZase 活性陽性の標準結核菌株として H37Rv (ATCC27294) を、*pncA* 遺伝子に変異を有する PZase 活性陰性の PZA 耐性結核菌株として H37Rv-PZA-R (ATCC35828) を用いた。

2. 方法

結核菌から DNA を抽出し、*pncA* 遺伝子内および外部の特定部位に設計した primer を用いて PCR 法を行った。その後 PCR 産物を精製し、sequence 反応を行い、auto-sequencer を用いて塩基配列を決定した。

1) 結核菌 DNA の抽出

山崎ら⁹⁾の方法と同様に小川培地から結核菌のコロニーを1白金耳採取し、アセトン、TritonX 処理を行った後、フェノール、クロロホルム処理、その後、上清をエタノール沈殿し結核菌 DNA を抽出した。

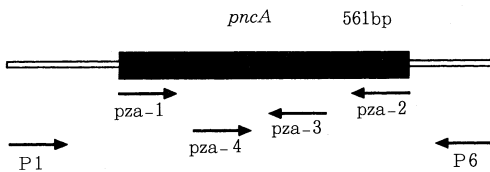
2) *pncA* 遺伝子の primer 設計 (図1および表)

図1 *pncA* 遺伝子内に作成した primer の位置

表 作成した primer の塩基配列

	5'	塩基配列	3'
pza-1		TGCGGGCGTTGATCATCGT	
pza-2		TCAGGAGCTGCAAACCAAC	
pza-3		TTCGAAGCCGCTGTACGCT	
pza-4		TCTGGACACGTCGGCAATC	
P1		GTCGGTCATGTTGCGGATCG	
P6		GCTTTGCGGCGAGCGCTCCA	

1996年に Scorpio ら⁶⁾が報告した PZase を code する *pncA* 遺伝子の塩基配列に基づき、図1の矢印の箇所に primer をそれぞれ表のように、Tm60℃にて設計し、annealing の温度は58℃とした。

3) PCR 法

PCR の条件は first denature が94℃ 2分、その後 denature 94℃40秒、annealing 58℃40秒、extention 72℃ 1分30秒を35サイクル、final extention は72℃10分とした。sence primer として pza-1、antisense primer として pza-2 を使用した。

4) PCR 産物の精製

PCR 産物を Suprec-02カラム (宝酒造株式会社) にて処理し primer と dNTPs を除去した。

5) sequence 反応

pza-1 と pza-2 を用いて、dideoxy chain termination method¹⁰⁾により Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems Division, Perkin Elmer Corp.) にて反応させた後、フェノール、クロロホルム処理とエタノール沈殿を行い、auto-sequencer (ABI-PRISM373) を用いて塩基配列を双方向より決定した。sequence の一

部が不明瞭な検体に関しては、*pncA* 遺伝子の内側に作成した primer の pza-3あるいは pza-4 (表) を用いて同様に sequence 反応を行った。さらに、*pncA* 遺伝子の上流域と終止 codon の変異を調べるため、Scorpio ら⁷⁾が報告した P1 と P6 の primer (図1および表) を用いて前述と同じ条件の PCR 反応を行い同様の実験を行った。

得られた塩基配列を対照と比較し、遺伝子変異の有無を検討した。

結 果

1) H37Rv, 当院臨床分離結核菌の1株およびH37Rv-PZA-Rの sequence の比較を図2に示した。当院臨床分離結核菌株は H37Rv と同一の塩基配列であった。H37-PZA-R は Scorpio ら⁶⁾の報告と同様に256番目の塩基 G が欠失していた。PZA を加えた肺結核初回標準治療法が行われた32名の患者の喀痰より検出された治療前32菌株、治療1カ月後27菌株および2カ月後9菌株の結核菌計68株すべてにおいて *pncA* 遺伝子上には点突然変異、塩基の挿入、欠失等は認めず、また報告されている上流域の変異⁷⁾¹¹⁾もみられなかった。

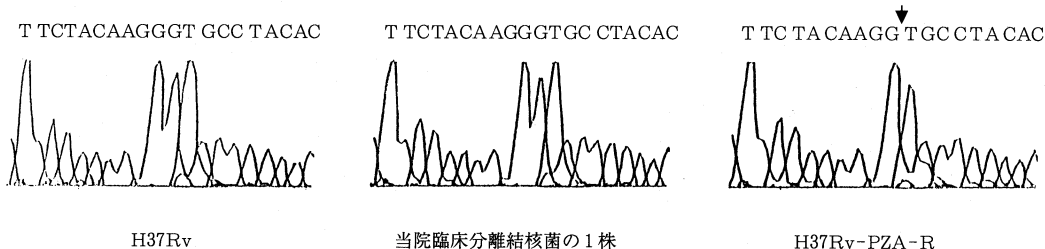


図2 H37Rv, 当院臨床分離結核菌の1株および H37Rv-PZA-Rの sequence の比較

H37Rv : *pncA* 遺伝子変異 (-) の標準結核菌株
 H37Rv-PZA-R : *pncA* 遺伝子変異 (+) の PZA 耐性結核菌株
 当院臨床分離結核菌は H37Rv と同一の塩基配列を示す。H37Rv-PZA-R では矢印の部位に塩基 G の欠失が認められる。

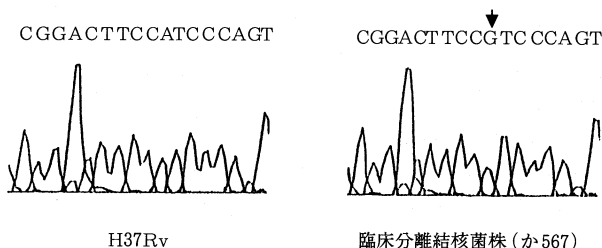


図3 H37Rv と PZase 活性陰性を示す臨床分離結核菌株 (株か567) の sequence の比較
 臨床分離結核菌株 (株か567) では245番目の塩基 (矢印) が A から G へ変異している。

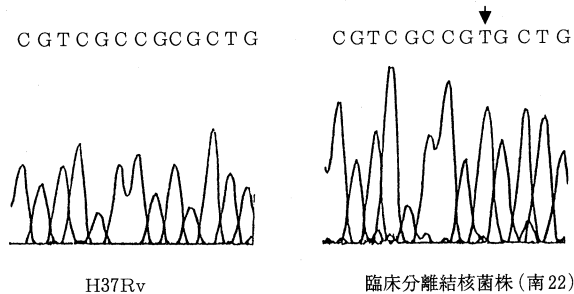


図4 H37RvとPZase活性陰性を示す臨床分離結核菌株(南22)のsequenceの比較
臨床分離結核菌株(南22)では512番目の塩基(矢印)がCからTに変異している。

2) 図3にH37RvとPZase活性陰性を示す臨床分離結核菌株(か567)のsequenceの比較を示した。菌株か567では245番目の塩基がAからGに変異(His82→Arg)していた。

同様に、図4に、H37RvとPZase活性陰性を示す臨床分離結核菌株(南22)のsequenceの比較を示した。菌株南22では、512番目の塩基がCからTに変異(Ala171→Val)していた。2菌株ともに他の部位でのsequenceはH37Rvと同一であった。

考 察

PZAに対する結核菌の薬剤感受性試験は確立されていない。結核菌の薬剤耐性は染色体上の突然変異から生じると考えられている。近年、結核菌の薬剤耐性遺伝子の研究が行われ、RFPの*rpoB*などの薬剤耐性遺伝子が報告されている¹²⁾。RFP耐性結核菌においては97%に*rpoB*の遺伝子変異がみられると報告されており¹²⁾、結核菌のRFP耐性は*rpoB*遺伝子変異を検出することによりほぼ可能である。SM耐性結核菌においては*rrs*遺伝子と*rpsL*遺伝子の変異が70%に認められている¹³⁾。

1997年、Scorpioら⁷⁾は*pncA*遺伝子変異がみられた結核菌33株でPZaseの活性消失が認められ、BACTEC radiometric method (pH6.0)にて29株はMIC 900 μ g/ml以上の高度PZA耐性、4株は300 μ g/ml以上のPZA耐性がみられたことを報告した。さらに彼らはBACTEC radiometric method (pH6.0)にてMIC 600 μ g/ml以上を示しPZA耐性と判定された結核菌5株において*pncA*遺伝子変異を認めずPZase活性も陽性であったためMIC値の再検査を行ったところ、1株は200 μ g/mlから300 μ g/mlの感受性と耐性の境界を示す濃度あるいは低濃度PZA耐性を示し、4株は200 μ g/ml以下のPZA感受性を示したMIC値による偽耐性例であったと報告している⁷⁾。

今回、PZAを加えた初回標準療法が行われた32名の肺結核患者の治療前後の喀痰より検出された臨床分離結核菌計68株およびPZase活性陰性の結核菌2株における*pncA*遺伝子変異の有無をPCR-direct sequence法を用い検討した。sequence反応はわれわれが作成した4つのprimerおよびこれらprimerの設定部位の外部にも遺伝子変異が存在する可能性も否定できないため、上流域と終止codonの変異を調べる目的でScorpioら⁷⁾が報告したP1とP6のprimerを用いた。

本検討では、治療前の結核菌32株(32名)に*pncA*遺伝子変異はみられなかった。また治療1カ月後29菌株および2カ月後7菌株の結核菌36株においても同様に遺伝子変異はみられなかった。Sreevatsanら¹¹⁾はPZA感受性を示す結核菌51株において、*pncA*遺伝子変異が認められなかったことを報告している。本検討の32名は治療3カ月以後には全例喀痰の塗抹・培養共に陰性となった。

PZase活性陰性の臨床分離結核菌2株(か567, 南22)についての*pncA*遺伝子変異の検討では、2菌株ともアミノ酸の置換を伴う点突然変異を有していた。菌株か567の変異部位については、これまで報告されていない。また、菌株南22に認められた変異部位に関してはAla171からProへの置換は報告⁷⁾されているが、Ala171からValへの置換の報告はみられない。これまでの報告から変異を起こす部位は、*pncA*遺伝子の全体に散在しており、点突然変異だけでもアミノ酸置換が25種報告されている⁷⁾¹¹⁾。今後、多数のPZase活性陰性菌の*pncA*遺伝子変異の検討が行われると、さらに多くのアミノ酸置換が報告されることが予想される。*pncA*遺伝子変異を検出するためには、変異が遺伝子上に散在しているため、遺伝子内塩基配列を直接決定できるPCR-direct sequence法が正確な方法と考えられる。

今後、PZase活性陰性結核菌における*pncA*遺伝子

変異の頻度, BACTEC methodによるPZA耐性のMIC値と*pncA*遺伝子変異との関連などについても検討する必要がある。

現在, 臨床検体中の結核菌を直接検出する迅速検査法として, PCR法を用いたAmplificor™(日本ロシユ)が用いられている。今後, 治療初期に用いられるPZAに対する結核菌の耐性を迅速に判定するため臨床検体より直接, 結核菌の*pncA*遺伝子変異の有無を検出する予定である。

結 語

PZAを含む初回標準治療法が行われた肺結核患者32名の喀痰より検出された結核菌68株(治療前32株, 治療1カ月および2カ月後の36株)およびPZase活性陰性の臨床分離結核菌2株を対象とし, PCR-direct sequence法を用い*pncA*遺伝子変異の有無を検討した。68菌株は*pncA*遺伝子の変異を認めなかった。PZase活性陰性の2菌株では, 過去に報告されていないアミノ酸置換がみられた。

本研究の要旨は第73回日本結核病学会総会(新潟)にて発表した。

謝 辞

菌株の供与をして戴いた国立感染症研究所細菌部山崎利雄先生に厚く御礼申し上げます。稿を終えるにあたり, 本研究に御指導と御校閲を賜りました東京慈恵会医科大学内科学講座第4望月正武主任教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省保健医療局結核難病感染症課: 結核医療の基準とその解説. 結核予防会. 1996.
- 2) 和田雅子, 吉山 崇, 吉川正洋, 他: 初回治療結核症に対するPyrazinamideを含んだ6カ月短期化学療法. 結核. 1994; 69: 671-680.
- 3) 亀田和彦: 今日におけるピラジナマイドの地位. 結核. 1995; 70: 445-455.
- 4) Konno K, Feldman FM, McDermott W, et al.: Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis. 1967; 95: 461-469.
- 5) Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al.: Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1992; 30: 878-881.
- 6) Scorpio A, Zhang Y: Mutation in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nature Med. 1996; 2: 662-667.
- 7) Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, et al.: Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 540-543.
- 8) Wayne LG: Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1974; 109: 147-151.
- 9) 山崎利雄, 中村玲子: ポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)法による抗酸菌の検出. 結核. 1992; 67: 441-447.
- 10) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5463-5467.
- 11) Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, et al.: Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 636-640.
- 12) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993; 342: 647-650.
- 13) 阿部千代治: 結核症の迅速診断. 結核. 1997; 72: 659-672.