

原 著

Line Probe Assay (LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出

¹阿部千代治 ²尾形 英雄 ³河田 兼光 ⁴平賀 通
⁵高嶋 哲也 ⁶末竹 寿紀

¹結核予防会結核研究所, ²結核予防会複十字病院,
³国立療養所南横浜病院, ⁴国立療養所刀根山病院,
⁵大阪府立羽曳野病院, ⁶株式会社ニッショー総合研究所

DETECTION OF RIFAMPIN-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY LINE PROBE ASSAY (LiPA)

^{1*}Chiyoji ABE, ²Hideo OGATA, ³Kanemitsu KAWATA, ⁴Toru HIRAGA,
⁵Tetsuya TAKASHIMA, and ⁶Toshinori SUETAKE

^{1*}Research Institute of Tuberculosis and ²Fukujuji Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association,
³National Minami-Yokohama Hospital, ⁴Toneyama National Hospital,
⁵Osaka Prefectural Habikino Hospital, ⁶Nissho Corporation

A recently described reverse hybridization-based line probe assay is used for the rapid detection of the mutations in the *rpoB* genes of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and for the identification of the *M. tuberculosis* complex. A multicenter study that included 5 laboratories was performed to evaluate the line probe assay in comparison with the *in vitro* susceptibility test. A total of 406 mycobacteria isolates which were composed of 103 rifampin-resistant and 230 rifampin-susceptible *M. tuberculosis* isolates, and 73 mycobacteria other than tubercle bacilli (MOTT), were subjected to this study. All 333 *M. tuberculosis* isolates were discriminated correctly from MOTT bacilli by a line probe assay. Concordance rates with sequencing results for five wild-type probes (S probes) and four specific mutations (R probes) for detecting the mutations in the *rpoB* genes were both 100%. The overall concordance rate with the *in vitro* susceptibility testing results was 98.5% (328 of 333 isolates). These results indicate that a line probe assay kit may be useful for the rapid diagnosis of rifampin-resistant tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, *rpoB* gene, rifampin resistance, line probe assay

キーワード: 結核菌, *rpoB* 遺伝子, リファンピシン耐性, ラインプローブアッセイ

*〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24

* 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533
 Japan.
 (Received 5 Jun. 2000/Accepted 21 Jun. 2000)

はじめに

1970年代まで結核罹患率は順調に減少してきたが1980年頃よりその減少速度に鈍化がみられ、ここ1~2年はその傾向がより顕著になった。また集団感染や病院内感染も年々増加している。さらに一番恐れていた薬剤耐性菌による感染、とりわけイソニアジド (INH) とリファンピシン (RFP) の両者に耐性を獲得している多剤耐性結核菌 (MDR-TB) による集団感染も報告されている。厚生省はこのような結核の状況を踏まえ1999年7月に結核緊急事態宣言を発表した。

わが国では、結核菌の薬剤感受性試験を結核菌検査指針 (1979年; 厚生省監修) に基づき1%小川法で行っている。しかし、培地製造中および保存中に起こる卵培地への薬剤の吸着や試験結果が得られるまでに要する時間の長さが問題にされている。

近年分子遺伝学的手法の導入により結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子がINH¹⁾²⁾、RFP^{3)~8)}、ピラジナミド (PZA)⁹⁾¹⁰⁾、ストレプトマイシン (SM)¹¹⁾、エタンブトール (EB)¹²⁾、カナマイシン (KM)¹³⁾、フルオロキノロン耐性菌¹⁴⁾などで明らかにされてきている。RFP耐性については、耐性菌の95%以上が rRNA ポリメラーゼのβサブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子に変異がみられる。しかもその変異は23個のアミノ酸 (69 bp) からなるホットスポット領域に集中していることから遺伝子による検査が可能である。

Innogenetics 社 (ベルギー) により開発された INNO-LiPA Rif. TB は、リバースハイブリダイゼーション法に基づいた line probe 法 (LiPA) による結核菌群の鑑別に加え *rpoB* 遺伝子のホットスポット領域の変異を検出するキットである^{15)~18)}。検出に要する時間は、遺伝子の増幅を含め約5時間であり迅速に RFP に対する感受性が判定できる。今回、多施設共同で INNO-LiPA Rif. TB の有用性を評価した。

材料と方法

1. 使用菌株

1997年2月から1999年11月までの間に結核予防会複十字病院、国立療養所南横浜病院、国立療養所刀根山病院、大阪府立羽曳野病院で分離された結核菌333株および非結核性抗酸菌73株を研究に用いた。抗酸菌の鑑別・同定はアキュプローブ結核菌群およびマイコバクテリウム アビウム コンプレックス鑑別試験と DDH マイコバクテリアキットで行った。

2. 感受性試験

RFP に対する結核菌の感受性試験について、各施設では従来からの絶対濃度法 (基準値: 50 μg/ml), 結

核予防会結核研究所では日本結核病学会から新しく提案された比率法¹⁹⁾ (基準値: 40 μg/ml) を用いて行った。

3. PCR による *rpoB* 遺伝子の増幅

小川培地全面から約1/2エーゼの菌を採取し、0.5 ml の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁した。100℃で10分間処理後 PCR に用いた。*rpoB* 遺伝子の256 bp 増幅のために5'末端をピオチン標識した次の2つのプライマーを使用した; IP 1 (5'-GGT CGG CAT GTC GCG GAT GG-3') と IP 2 (5'-GCA CGT CGC GGA CCT CCA GC-3')。増幅のために、95℃ 60秒間の熱変性、55℃ 60秒間のアニーリング、72℃ 60秒間の合成の反応を30サイクル行った。最後に72℃に10分間保った。得られた増幅産物を LiPA 試験に用いた。

4. LiPA による変異の検出

line probe 法はリバースハイブリダイゼーションの原理に基づいた方法である。大きさが3×50 mm のストリップに特異的オリゴヌクレオチドがコートされており、厳しい条件下にピオチン標識 PCR 産物との間でハイブリダイゼーションが行われた。結合した DNA はアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンと BCIP/NBT 発色液を用いる系で検出した。ハイブリダイゼーション反応は0.1% SDS を含む SSC 緩衝液 (0.15M NaCl+0.015M ケン酸ナトリウム) を用い62℃で行った。ハイブリダイゼーションを含む一連の検出反応に自動化システム (AUTO-LiPA, Innogenetics, ベルギー) を用いた。詳細な操作手順を Table 1 に示した。

ストリップには発色を確認するためのプローブと結核菌群特異的プローブおよび9種の *rpoB* 遺伝子プローブがコートされている (Fig. 1)。19~23個の塩基からなる部分的に重複した5種の S プローブ (S1~S5) は野生型塩基配列とハイブリダイズする。もしこれらの領域に変異が存在すれば相当するプローブとは反応しない。加えて高頻度に見られる変異を確認するために4種の R プローブ (R2: Asp-516-Val, R4a: His-526-Tyr, R4b: His-526-Asp, R5: Ser-531-Leu) が S プローブの下に固定されている (Fig. 2)。

5. 塩基配列の決定

rpoB 遺伝子の塩基配列は Gene Rapid SEQ4×4 personal sequencing system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて決定した。

結 果

対象とした結核菌333株と非結核性抗酸菌73株の INNO-LiPA Rif. TB キットによる結核菌群の鑑別結果を Table 2 に示した。結核菌はすべて結核菌群特異

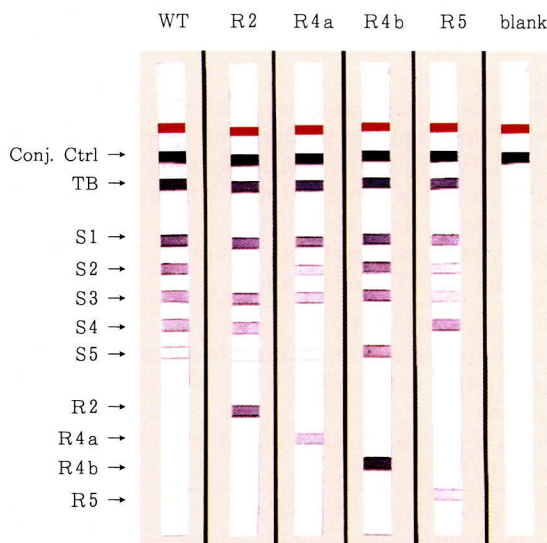


Fig. 2 Representative hybridization patterns obtained with line probe strips.

The conjugate control line (Conj. Ctrl) provides an internal control for the color development reaction. The TB line is a specific probe for the *M. tuberculosis* complex. The S and R probes are described in the legend to Fig. 1.

Table 2 Identification of the *M. tuberculosis* complex by line probe assay

Isolates (n)	Reaction with TB probe	
	Positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i> (333)	333	0
MOTT ^a (73)	0	73
Total (406)	333	73

^a Mycobacteria other than *M. tuberculosis*

塩基配列であった (Table 4)。また RFP に対する感受性試験で感受性の表現型を示したにもかかわらず LiPA 試験で Δ S1 変異の結果を与えたサンプル No. 100 は 511 番目のコドンに ctg \rightarrow cCg の変異 (Δ S1) を持っていた。1% 小川培地で最小発育阻止濃度を調べたとき、サンプル No. 100 の MIC 値は 40 μ g/ml であり、RFP 低度耐性菌であることが分かった。

培養による感受性試験との比較で、RFP 耐性株の検出キット LiPA の感度は 96.1%、特異性は 99.6%、全体の一致率は 98.5% であった。

考 察

世界保健機関 (WHO) と国際結核肺疾患予防連合 (IUATLD) は 1994 年に世界的規模で薬剤耐性結核のサーベイランスを開始し、これまでに 35 の国と地域からその成績が報告された²⁰⁾。MDR-TB の頻度が比較的高い国がいくつかあり、これらの国では結核対策プログラムを遂行するうえで脅威となっている。結核療法研究協議会の 1997 年の成績²¹⁾によると、わが国でも 5 年前と比べて MDR-TB の頻度が上昇していることが明らかになった。MDR-TB 患者の治療は非常に困難であり、より強力な治療と高額な治療費を必要とする^{22) 23)}。

一般に RFP 耐性の頻度は INH 耐性や SM 耐性より低い²⁰⁾、RFP 耐性菌はしばしば INH 耐性を伴う^{24) 25)}。それゆえ適切な患者の治療と結核対策のために、迅速で信頼性の高い結核菌の検出および薬剤感受性試験法の開発が望まれている。

RFP の作用機構は RNA ポリメラーゼの β サブユニットに薬剤が結合することにより RNA の伸長と転写に影響を与えるものと考えられている。RFP 耐性結核菌の約 95% は、 β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺

Table 3 Comparison of the results of the line probe assay with the *in vitro* susceptibility test

Susceptibility (n)	LiPA profile [No. (%) of isolates]	
	Mutation	Wild type
RFP-resistant (103)	99 (96.1)	4 (3.9)
RFP-sensitive (230)	1 (0.4)	229 (99.6)
Total (333)	100	232

Table 4 Discrepant results between *in vitro* susceptibility test and line probe assay

Sample	Susceptibility	LiPA profile	Sequencing ^a
100	Sensitive	ΔS1	511 cCg (ΔS1)
144	Resistant	Wild type	Wild type
170	Resistant	Wild type	Wild type
294	Resistant	Wild type	Wild type
322	Resistant	Wild type	Wild type

^a Capital letter in the codon indicates the change in nucleotide sequence.

伝子の約69塩基対からなるホットスポット領域に変異を持つが、感受性株には変異がみられないことが報告されている。INNO LiPA Rif. TB はリバースハイブリダイゼーションに基づいた方法であり、*rpoB* 遺伝子の変異を迅速に検出するキットである。結核菌臨床分離菌333株のうち328株(98.5%)はLiPAキットで正しくRFP感受性またはRFP耐性に判定できた(Table 3)。しかし培養法で耐性であった4株はLiPAで感受性のプロファイル(野生型)を示した。これら4株について、*rpoB* 遺伝子のホットスポット領域の塩基配列を調べたが、変異は認められずLiPAと一致した結果であった。これらの患者は治療成績からも多剤耐性結核と診断されており、分離菌はRFP耐性であった。RFP耐性結核菌の約5%はホットスポット領域に変異を検出できないことが他の報告にもみられる。これらの結果は、*rpoB* 遺伝子のホットスポット領域の変異に加え、他領域の変異または*rpoB* 遺伝子以外の遺伝子がRFP耐性に関与することを暗示している。同時に、このホットスポット領域を用いた試験では野生型と判定された株の中に5%程度RFP耐性菌が含まれることを留意する必要があることを示している。

培養法で感受性であった結核菌230株のうち1株(0.4%)はLiPAで耐性のプロファイル(ΔS1)を示した(Table 3とTable 4)。塩基配列の分析成績もアミノ酸置換(Leu511Pro)を示しており、LiPAの結果を支持

していた。培養法による感受性試験と異なる結果を示したサンプルNo.100に対するRFPのMIC値は40 μg/ml(1%小川培地による試験)であり、RFPに低度の耐性を獲得している菌であることが分かった。この患者は既治療例であったが、分離株は他の抗結核薬すべてに感受性であり標準化学療法で菌陰性化できた例である。

Table 5に示したように、高頻度に変異がみられたコドンはSer-531(54.4%, 56/103), His-526(7.8%, 8/103)およびAsp-516(10.7%, 11/103)であった。主にヨーロッパとアフリカで分離された結核菌を調べたRossauら¹⁵⁾、アジア諸国で分離された結核菌を用いたHiranoら¹⁶⁾、台湾で分離された結核菌を調べたLiuら¹⁸⁾およびニューヨーク市で分離された結核菌を分析したCookseyら¹⁷⁾の成績も同様であり、分離された国による偏りはみられなかった。このことはこれらのコドンでは高頻度に突然変異が起こることを示している。

2つのコドンに変異を持つ培養がLiPAにより6例検出され、変異は塩基配列の分析からも確認された。また野生型とR5のプロファイルを示した株(1株)は、遺伝子型の異なる菌の混在を示しており、このような場合でもLiPAにより変異の検出が可能であることが分かった。RFP耐性結核菌分離株の*rpoB* 遺伝子のホットスポット領域に挿入変異あるいは欠失変異を持つ株が存在すること⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、これらの中でPhe-514の挿入変異をLiPAキットで検出できない¹⁶⁾¹⁷⁾ことが報告されてい

Table 5 Frequency of mutations in rifampin-resistant isolates reported by five groups

LiPA profile	Frequency of mutations [No. (%) of isolates] ^a				
	This study	Rossau et al.	Hirano et al.	Liu et al.	Cooksey et al.
Wild type	4 (3.9)	4 (2.0)	6 (6.7)	5 (10)	5 (9.8)
ΔS1	8 (7.8)	3 (1.5)	6 (6.7)	7 (14)	1 (2.0)
ΔS2	0	5 (2.5)	1 (1.1)	0	2 (3.9)
ΔS3	2 (1.9)	7 (3.5)	1 (1.1)	0	0
ΔS4	3 (2.9)	20 (10.0)	3 (3.3)	8 (16)	0
ΔS5	7 (6.8)	17 (8.5)	2 (2.2)	0	2 (3.9)
R2	10 (9.7)	15 (7.5)	12 (13.3)	4 (8)	2 (3.9)
R4a	5 (4.9)	19 (9.5)	8 (8.9)	1 (2)	20 (39.2)
R4b	3 (2.9)	21 (10.5)	4 (4.4)	0	2 (3.9)
R5	54 (52.4)	86 (43.0)	46 (51.1)	23 (46)	17 (33.3)
Other	7 (6.8) ^b	3 (1.5) ^c	1 (1.1) ^d	2 (4) ^e	0
Total	103	200	90	50	51

^a Refer to the reports by Rossau et al.¹⁵⁾, Hirano et al.¹⁶⁾, Liu et al.¹⁸⁾, and Cooksey et al.¹⁷⁾

^b ΔS1/ΔS2 (1 strain), ΔS1/R2 (1), ΔS2/ΔS3 (3), ΔS2/R5 (1), and WT/R5 (1)

^c WT/R4a (1), WT/R5 (1), and WT/R4a/R5 (1)

^d WT/R2 (1)

^e ΔS1/ΔS4 (1) and WT/R2 (1)

る。しかし、この種の変異を持つ結核菌は今回検討した333株に含まれていなかった。

AUTO-LiPAはハイブリダイゼーションから発色までの操作を完全に自動化したシステムである。INNO-LiPA Rif. TBは、菌株の入手後PCRによる*rpoB*遺伝子の増幅(3時間)、その後AUTO-LiPAによる変異の検出(2時間)まで約5時間でRFPの感受性を検査できる迅速キットである。加えて培養法との比較で98.5%と非常に高い一致率を示した。1993年に米国のCDCは鑑別・同定と薬剤感受性を含めたすべての検査成績を4週間以内に臨床医のもとに報告すべきであると勧告した²⁶⁾。わが国では従来から小川培地を初代分離および薬剤感受性試験に用いており、すべての検査結果が得られるまでに早くても2カ月を要していた。LiPAは重要な抗結核薬の1つであるRFPに対する感受性を数時間で検査できることから、初代分離に小川培地を用いた場合でもCDCの勧告が満たされ、その使用は臨床の場で非常に有用と考えられる。

文 献

- 1) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al.: The catalase - peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature. 1992; 358: 591-593.
- 2) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al.: *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 1994; 263: 227-230.
- 3) Jin D, Gross CA: Characterization of the pleiotropic phenotypes of rifampin-resistant *rpoB* mutants of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1989; 171: 5229-5231.
- 4) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993; 341: 647-650.
- 5) Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al.: Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 2380-2386.
- 6) Suzuki Y, Katsukawa C, Inoue K, et al.: Mutations in *rpoB* gene of rifampicin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. J Jpn Assoc Infect Dis. 1995; 69: 413-419.
- 7) Taniguchi H, Aramaki H, Nikaido Y, et al.: Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett. 1996; 144: 103-108.
- 8) Ohno H, Koga H, Kohno S, et al.: Relation-

- ship between rifampin MICs and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 1053-1056.
- 9) Scorpio A, Zhang Y: Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med. 1996; 2: 662-667.
 - 10) Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, et al.: Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle Lung Dis. 1998; 78: 117-122.
 - 11) Finken M, Kirschner P, Meier A, et al.: Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. Mol Microbiol. 1993; 9: 1239-1246.
 - 12) Sreevatsan S, Stochbauer KE, Pan X, et al.: Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. critical role of *embB* mutations. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 1677-1681.
 - 13) Taniguchi H, Chang B, Abe C, et al.: Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. J Bacteriol. 1997; 179: 4795-4801.
 - 14) Cambau E, Sougakoff W, Besson M, et al.: Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. J Infect Dis. 1994; 170: 479-483.
 - 15) Rossau R, Traore H, de Beenhouwer H, et al.: Evaluation of the INNO-LiPA Rif.TB assay, a reverse hybridization assay for the stimulation detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 2093-2098.
 - 16) Hirano K, Abe C, Takahashi M: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J Clin Microbiol. 1999; 37: 2663-2666.
 - 17) Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, et al.: Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. J Clin Microbiol. 1997; 35: 1281-1283.
 - 18) Liu Y-C, Huang T-S, Huang W-K: Line probe assay for rapid detection of mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. J Formos Med Assoc. 1999; 98: 582-585.
 - 19) 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会: 結核菌の薬剤感受性試験, 特に試験濃度変化と比率法導入への提案. 結核. 1997; 72: 597-598.
 - 20) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: Anti-tuberculosis drug resistance in the world. 1998, Publication no. WHO/TB/97.229. WHO, Geneva, Switzerland.
 - 21) 結核療法研究協議会: 入院時薬剤耐性に関する研究, 1997. 平成11年度療研報告書.
 - 22) Goble M, Iseman MD, Madsen LA, et al.: Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. N Engl J Med. 1993; 328: 527-532.
 - 23) Mahmoudi A, Iseman MD: Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. JAMA. 1993; 270: 65-68.
 - 24) Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, et al.: Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. Lancet. 1994; 344: 293-298.
 - 25) Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, et al.: Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1969-1973.
 - 26) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 1993; 31: 767-770.