

リファンピシン耐性 *Mycobacterium kansasii* における *rpoB* 変異の解明

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ⁴岩本 朋忠
²富田 元久 ¹岡田 全司 ³坂谷 光則

要旨：〔目的〕 *M. kansasii* における RFP 耐性機序の解明。〔方法〕 2001年1月1日から2005年11月30日の期間中、独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離同定された *M. kansasii* 314株を対象に薬剤感受性試験を実施し、RFP耐性と判定された *M. kansasii* について *rpoB* 遺伝子解析を行った。〔結果〕 薬剤感受性試験の結果 RFP耐性と判定された *M. kansasii* は314株中3株 (0.96%) であり、最小発育阻止濃度 (MIC値) はすべて $1\mu\text{g/ml}$ 以上を示した。*rpoB* 遺伝子変異のシークエンス解析において、RFP耐性菌株すべてに *rpoB* 遺伝子領域の変異を認めた (コドン513, 516)。〔考察〕 *M. kansasii* の *rpoB* 遺伝子変異は結核菌と同じ hot spot 領域 (69 bp) にあり、結核菌同様 RFP耐性と強い関連性が示された。

キーワード： *Mycobacterium kansasii*, RFP耐性, *rpoB* 遺伝子, 薬剤感受性試験

はじめに

Mycobacterium kansasii (*M. kansasii*) は非結核性抗酸菌 (NTM) の中でも、*Mycobacterium avium* complex (MAC) に次いで全国的に広く症例報告されている菌種であり¹⁾、病原性も他の NTM に比べて強いとされている一方、NTM の中でも最も化学療法の有効性が認められている。結核菌に準じた薬剤感受性試験は通常 NTM に対して臨床的に有効な成績が得られないが、唯一 *M. kansasii* のリファンピシン (RFP) 感受性検査結果は臨床上有益である^{2)~4)}。しかし *M. kansasii* の RFP耐性化における遺伝子変異のメカニズムの報告は少ない⁵⁾。そこで今回われわれは *M. kansasii* の遺伝子レベルでの RFP耐性機序を解明するため、現行の薬剤感受性試験で RFP耐性と判定された菌株の *rpoB* 遺伝子変異解析を行った。

方 法

対 象

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて2001年1月1日から2005年11月30日の期間中に分

離同定された *M. kansasii* 314株。すべての菌株の鑑別・同定は、アキュプロープ マイコバクテリウム カンサシ 研究用 (極東製薬) で行った。

薬剤感受性試験

小川培地を用いるニチビー抗酸菌検査用ウエルバック培地 S (日本ビーシー) と液体培地を用いる抗酸菌薬剤感受性検査プロスミック NTM (極東製薬) で実施した。

コントロール菌液の作成

感受性コントロールとして *M. kansasii* 標準菌株 ATCC 12478 を BBL ミドルブルック 7H9 プロス 4 ml に培養した菌液を用いた (KCHK1001S)。また耐性コントロールとして使用するため、われわれは誘導 RFP耐性 *M. kansasii* (KCHK1001R) を作成した。まず KCHK1001S 同様、同標準菌株を BBL ミドルブルック 7H9 プロス 4 ml に接種し、McFarland No. 0.5 に調整した菌液を滅菌生理食塩水で5倍希釈した。次にバクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性試験用ミジットシリーズのリファンピシンを含む MGIT チューブ (最終薬剤濃度 $1.0\mu\text{g/ml}$) を2倍希釈して128倍までの薬剤濃度系列を作成した (リファ

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター、²臨床検査科、³内科、⁴神戸市環境保健研究所

連絡先：吉田志緒美，独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター，〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
 (Received 1 Feb. 2006/ Accepted 25 Apr. 2006)

ンピシン保存溶液)。後はバクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性試験用ミジットシリーズの説明書に記載されたプロトコールに従い、菌液 500 μ l と希釈されたリファンピシン保存溶液 100 μ l を通常の RIF と表示されたミジットチューブに無菌的に添加した。バクテック MGIT 960 にて 37°C で培養し、陽性を示した最高濃度の菌液を用いて再度希釈系列にて培養を継続した。最終的にプロスミック NTM の RFP 感受性検査で MIC 値が 32 μ g/ml 以上の値を示すまで継代培養を続け、耐性コントロールとした。

PCRによる *rpoB* 遺伝子増幅

小川培地からエーゼで 2~3 mm 径コロニー 2 個分を目安として採取し、1.5 ml マイクロチューブに分注したインスタジーン DNA 精製マトリックス (BIO-RAD) 200 μ l に懸濁した。56°C, 15~30 分処理後 10 秒間 vortex し、正確に 100°C, 8 分間処理した後直ちに放冷した。10 秒間 vortex し、12000 rpm, 3 分遠心した上清を polymerase chain reaction (PCR) に用いた。*rpoB* 遺伝子増幅のために、次のプライマーを使用した; MK1: 5'-GCG GAT GAC CAC CCA GGA CG-3' と MK2: 5'-GCG CGG TCC TC[C/T] TCG TCG GC-3'。PCR 条件は 95°C 3 分の熱変性の後、94°C 1 分, 60°C 1 分, 72°C 1 分を 30 サイクル行った。最後に 72°C 7 分間伸張した。得られた PCR 産物は、1.5% アガロースゲル電気泳動で確認した。

PCR産物の DNA シークエンス

rpoB 遺伝子の塩基配列は、290 bp の PCR 産物を用いて BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (ABI) にて決定した。

フィノス LiPA Rif TB

フィノス LiPA Rif TB (ニプロ) は抗酸菌から抽出、増幅されたピオチン化 DNA を用いて、結核菌群の *rpoB* 遺伝子内の変異を検出する Line Probe Assay である⁹⁾。10 種類のプローブを固相化したストリップに NaOH 変性した検体を添加して、ハイブリダイズする。洗浄後、ピオチン-アビジン結合を行い、基質 (NBT/BCIP) を用いた発色反応から、検体が結合したプローブ部位が発色する。発色したプローブの位置から、結核菌群の検出なら

びに *rpoB* 遺伝子内の変異の有無の判定を行う。今回 *M. kansasii* に対しても結核菌同様、同キットによる *rpoB* 変異の検出が可能かどうか検討した。

結 果

薬剤感受性試験の RFP 耐性判定基準値は、結核菌に準拠したウエルバック法では 40 μ g/ml だが、プロスミック NTM 法では、National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS: 現 Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI]) の判定基準から 1 μ g/ml とした^{7,8)}。ウエルバック法、プロスミック NTM 法ともに RFP 耐性と判定された *M. kansasii* は 314 株中 3 株であった。菌株 A はウエルバック法、プロスミック NTM 法共に耐性と判定され、MIC 値は 2 μ g/ml だった。菌株 B, C は、両薬剤感受性試験で耐性と判定され、MIC 値はそれぞれ 16 μ g/ml と 32 μ g/ml であった。菌株 KCHK1001S は RFP 感受性 (MIC 値 0.06 μ g/ml) であった (Table)。また今回ウエルバック法とプロスミック NTM 法の間で RFP 感受性結果の相違は認められなかった。

シークエンス解析の結果、菌株 KCHK1001S の *rpoB* 遺伝子の hot spot 領域 (69 bp) の塩基配列は結核菌の塩基配列と 87% の相同性が見られ (GenBank #L27989)、すでに報告されている *rpoB* 遺伝子の塩基配列と同一であった (GenBank #AF060301)。

薬剤感受性試験で RFP 感受性と判定された *M. kansasii* 45 株についてシークエンス解析を実施した結果、*rpoB* 遺伝子変異を認めなかった。しかし RFP 耐性 *M. kansasii* の *rpoB* 遺伝子の塩基配列は薬剤感受性試験で RFP 耐性となった *M. kansasii* 3 株および、菌株 KCHK1001R すべてに変異を認めた。菌株 A はコドン 516 においてアスパラギン酸からアラニンへの変異を認めた (GAC \rightarrow GCC)。菌株 B, C はコドン 513 においてグルタミンからグルタミン酸への変異を認めた (CAG \rightarrow GAG)。菌株 KCHK1001R はコドン 526 においてヒスチジンからアルギニンへの変異を認めた (CAC \rightarrow CGC) (Fig. 1)。

フィノス LiPA Rif TB の結果、RFP 感受性ならびに RFP 耐性 *M. kansasii*, KCHK1001S, KCHK1001R すべて

Table Results of RFP susceptibility testing and sequences

Strains	Wellpack*	BrothMIC NTM (MIC)	Sequence
A	RFP resistant	R (2 μ g/ml)	codon 516 (GAC \rightarrow GCC)
B	RFP resistant	R (16 μ g/ml)	codon 513 (CAG \rightarrow GAG)
C	RFP resistant	R (32 μ g/ml)	codon 513 (CAG \rightarrow GAG)
KCHK1001R	RFP resistant	R (32 μ g/ml)	codon 526 (CAC \rightarrow CGC)
KCHK1001S	RFP susceptible	S (0.06 μ g/ml)	

*Ogawa medium based drug susceptibility test

RFP: rifampicin R: rifampicin resistance S: rifampicin susceptible

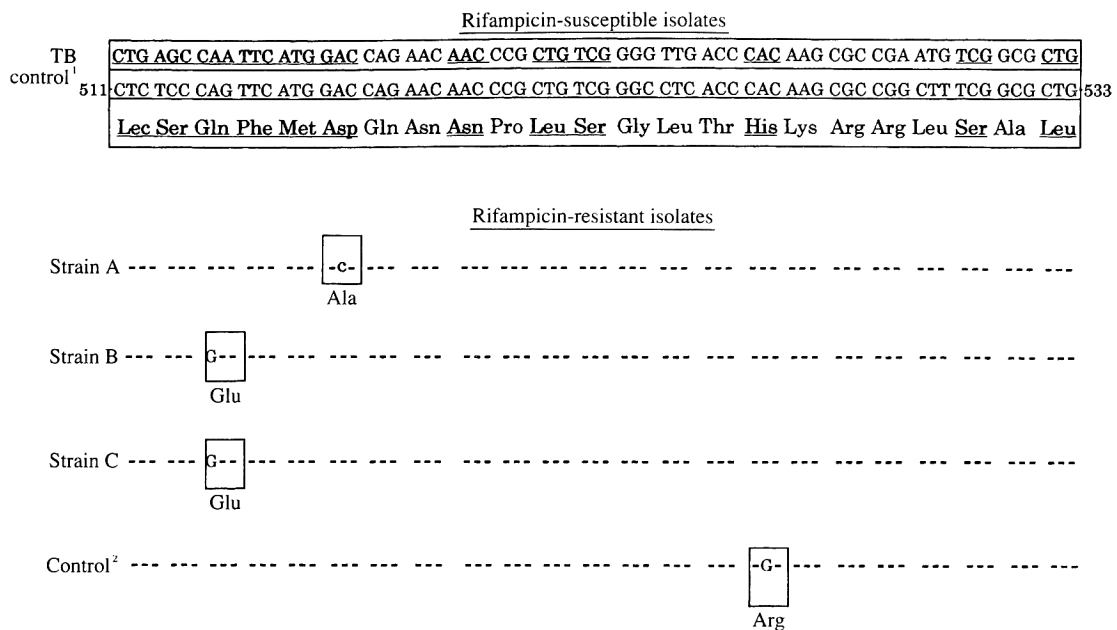


Fig. 1 *rpoB* gene sequences of one rifampicin-susceptible and four rifampicin-resistant strains of *Mycobacterium kansasii*, with the *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) sequence shown for comparison.

1: KCHK1001S (rifampicin-susceptible control)

2: KCHK1001R (rifampicin-resistant control)

Underline codons in *M. tuberculosis*: common codons involved in rifampicin-resistance strains

においてTBプローブ、野生型(S)ならびに変異型(R)プローブに発色を示さなかった (Fig. 2)。

考 察

結核菌のRFP耐性化には *rpoB* 遺伝子の突然変異が強くかかわっており、RFP耐性結核菌の約95%が、 β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子の hot spot 領域に変異を認めている⁹⁾。今回検討したRFP耐性 *M. kansasii* についても、結核菌と同じ hot spot 領域に *rpoB* 遺伝子変異が確認され、RFP感受性 *M. kansasii* は *rpoB* 遺伝子変異が認められなかった。Kleinらは、RFP耐性 *M. kansasii* の *rpoB* 遺伝子変異は、結核菌のRFP耐性に強く関与が証明されている *rpoB* 遺伝子変異と同じ領域に存在し、*M. kansasii* についても *rpoB* 変異とRFP耐性とに強い関連性があると報告している⁵⁾。今回の *rpoB* 変異のシーケンス解析で、菌株B、Cはコドン513の変異があり、Kleinらと同じ遺伝子変異をもったタイプであったが、菌株Aはコドン516の変異をもち、Kleinらとは違う変異部位であった。また、Kleinらは臨床菌株3例、環境分離菌株1例にコドン531の変異が見られたと報告しているが、今回われわれの検証では、コドン531の変異は認められなかった。コドン531は結核菌で頻繁に変異しやすい部位であることから¹⁰⁾、今後データの蓄積によりコドン531に変異をもった菌株や、異なる変異部位を

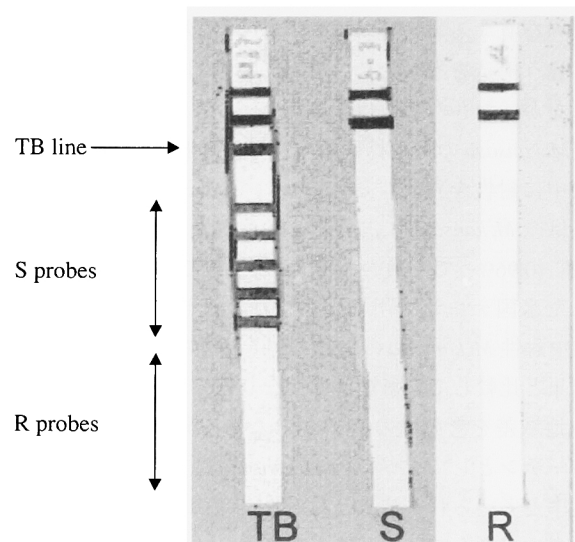


Fig. 2 The patterns of rifampicin-susceptible and resistant strains of *M. kansasii* by Line Probe Assay.

TB: *M. tuberculosis* (H37Rv) indicated the reaction of the TB line and the five S probes

S: KCHK1001S (rifampicin-susceptible strain of *M. kansasii*)

R: KCHK1001R (rifampicin-resistant strain of *M. kansasii*)

もった違うタイプの *M. kansasii* の存在も認められるであろう。またわれわれが作成した菌株 KCHK1001R の変異はコドン 526 であった。Klein らが作成した誘導 RFP 耐性 *M. kansasii* は今回われわれが MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズのリファンピシン感受性検査用チューブを用いた方法とは違い、ミドルブルック 7H11 培地を用いた手法で作成されているが、同じコドン 526 の部位に変異をもっていた⁵⁾。以上のことから *in vitro* で RFP 耐性を獲得した *M. kansasii* は、コドン 526 の遺伝子部位に変異を起こしやすい可能性が考えられる。同様に、菌株 KCHK1001S ならびに RFP 感受性 *M. kansasii* 45 株はすべてシーケンス解析において hot spot 領域に *rpoB* 遺伝子変異を認めなかったことから、RFP 感受性試験結果と *rpoB* 遺伝子変異の強い関連性が示唆された。

また、結核菌群と同じ 69 bp の hot spot 領域に変異をもつ RFP 耐性 *M. kansasii* が結核菌群と同じ遺伝子変異をもつならば、結核菌群に特異的なプローブと反応する可能性がある。そこでわれわれは結核菌群の *rpoB* 遺伝子の hot spot 領域の変異を検出するキットであるフィノス LiPA Rif TB を用いて、RFP 耐性 *M. kansasii* の反応を検討した。しかし *M. kansasii* に対してプローブの検出が全く認められなかった (Fig. 2)。Fig. 1 で示したシーケンス解析結果から、*M. kansasii* は結核菌と同じアミノ酸配列を有する *rpoB* 領域をもつが、塩基配列では結核菌と違う構造をもつため、*M. kansasii* は同キットでは反応しなかったものと思われる。

M. kansasii の野生株は基本的に RFP 感受性であり、治療中に耐性を獲得するといわれている⁴⁾¹¹⁾。今回の検証では全 *M. kansasii* に占める RFP 耐性菌の割合は 314 株中 3 株 (0.96%) であり、1989 年から 1992 年の間に実施された米国テキサス州での大規模な疫学調査 (464 株) で RFP 耐性 *M. kansasii* の占める割合が 17 株 (4%)⁴⁾ だった結果と比較しても耐性率はかなり低い。実施期間の違いや地域差を考慮する必要があるが、薬剤感受性試験をルーチンとしてすべての *M. kansasii* に実施することは非効率と考えられる結果となった。今後コスト面での対応も含めて考えていく必要がある。

今回 RFP 耐性 *M. kansasii* は、結核菌群と同じ hot spot

領域に *rpoB* 遺伝子変異を認めたが、RFP 感受性 *M. kansasii* は *rpoB* 遺伝子変異を認めなかった。これらのことから、RFP 耐性 *M. kansasii* と *rpoB* 遺伝子変異との間に強い関連性が証明された。

文 献

- 1) The Mycobacteriosis Research Group of the Japanese National Chest Hospitals: Rapid increase of the incidence of lung disease due to *Mycobacterium kansasii* in Japan. *Chest*. 1983; 83: 890-892.
- 2) American Thoracic Society: Diagnosis and treatment of disease caused by non-tuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: S1-S25.
- 3) Yates MD, Collins CH: Sensitivity of opportunist mycobacteria to rifampicin and ethambutol. *Tubercle*. 1981; 62: 117-121.
- 4) Wallace RJ Jr, Dunbar D, Brown BA, et al.: Rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. *Clin Infect Dis*. 1994; 18: 736-743.
- 5) Klein JL, Brown TJ, French GL: Rifampin resistance in *Mycobacterium kansasii* is associated with *rpoB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 3056-3058.
- 6) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他: Line Probe Assay (LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核*. 2000; 75: 575-581.
- 7) Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards document. 2003; M24-A: 23.
- 8) Wallace RJ Jr, Nash DR, Steele LC, et al.: Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by microdilution MIC method with 7H9 broth. *J Clin Microbiol*. 1986; 24: 976-981.
- 9) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993; 341: 647-650.
- 10) Morlock GP, Plikaytis BB, Crawford JT: Characterization of spontaneous *in vitro*-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 3298-3301.
- 11) Ahn CH, Wallace RJ Jr, Steele LC, et al.: Sulfonamide-containing regimens for disease caused by rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. *Am Rev Respir Dis*. 1987; 135: 10-16.

Original Article

DETECTION OF *rpoB* MUTATIONS IN RIFAMPICIN-RESISTANT
MYCOBACTERIUM KANSASII

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ⁴Tomotada IWAMOTO,
⁴Motohisa TOMITA, ¹Masaji OKADA, ³Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] To detect rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*).

[Methods] We examined the *M. kansasii* isolates from sputum of patients at National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center from January 1, 2001 to November 30, 2005 using drug-susceptibility testing, and analyzed 69-bp fragment of *rpoB* gene in rifampicin-resistant strains.

[Results] Three strains from 314 isolates were determined as rifampicin resistant using drug-susceptibility testing. Those strains showed a rise in minimum inhibitory concentration (MIC), and had the mutations in *rpoB* gene. These point mutations in codons 513 and 516 were common mutations found in rifampicin-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*.

[Discussion] We verified the association between *rpoB*

gene mutations and rifampicin resistance in *M. kansasii*.

Key words: *Mycobacterium kansasii*, Rifampicin-resistance, *rpoB* mutations, Drug-susceptibility test

¹Clinical Research Center, ²Department of Clinical Laboratory, ³Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ⁴Kobe Institute of Health

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)