

薬剤感受性検査で RFP 感受性, line probe assay で RFP 耐性となる結核菌の検討

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

要旨:〔目的〕薬剤感受性検査で RFP 感受性, line probe assay で RFP 耐性となる結核菌の検討。〔対象〕国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにおいて分離され, 薬剤感受性検査で RFP 感受性と判定されたにもかかわらず, 臨床的に同薬剤に対する治療効果が乏しい肺結核症患者由来の 6 株と, 判定結果が薬剤感受性検査間で一致しない 9 株の合計 15 株。〔方法〕3 種類の薬剤感受性検査を実施し, 遺伝子診断としてジェノスカラー・Rif TB を使用した。同時にシーケンス解析による *rpoB* 遺伝子変異領域部位の特定を行った。〔結果〕薬剤感受性検査の結果, 15 株すべてはいずれかの方法で RFP 感受性もしくは判定保留を示した。プロスミック MTB-1 法を用いた最小発育阻止濃度 (MIC) は 0.25~4 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であった。一方ジェノスカラー・Rif TB においてすべての株は変異型を示し, シーケンス解析でも *rpoB* 遺伝子領域に変異が確認され RFP 耐性と判定された。〔結論〕今回われわれは通常の薬剤感受性検査で耐性と判定されない低レベルの RFP 耐性結核菌に対して薬剤耐性遺伝子検査を行うことにより正しい感受性結果を得ることができた。

キーワード: 結核菌, 薬剤感受性検査, 薬剤耐性遺伝子, *rpoB*, MIC

はじめに

多剤耐性結核菌 (MDR-TB) の出現と蔓延を防止するためには, 有効な薬剤の選択を可能とする迅速かつ正確な結核菌の薬剤感受性検査の実施が欠かせない。一次抗結核薬剤の 1 つであるリファンピシン (RFP) の迅速な感受性判定は多剤併用療法を施行していくうえで非常に重要であるが, 正確な感受性判定には一定の熟練が必要である。また結核菌の発育速度が遅いため判定までに時間がかかるという問題点もある。一方, 近年結核菌の薬剤耐性に関連する遺伝子の解明が進んでおり, 遺伝子変異の有無を検出することによって迅速な薬剤感受性判定を可能とする各種キットが開発されている^{1)~3)}。今回われわれは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おいて RFP 感受性と判定されたにもかかわらず, RFP の臨床効果が乏しい肺結核症 6 症例を経験した。そこで, これらの症例由来の臨床分離菌株に対して

最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し, line probe assay を応用した RFP 耐性結核菌検出キット⁴⁾を用いて *rpoB* 遺伝子中の変異の検出を行った。さらにシーケンス解析による *rpoB* 遺伝子変異領域の特定を行い, 薬剤感受性判定の正確性を検討した。また比率法で判定される薬剤感受性検査では判定結果が菌の発育状況に左右されやすく, とくに長期治療中の肺結核症患者からの分離菌株で不安定な場合があることから⁵⁾, RFP 感受性結果が複数回の薬剤感受性検査ごとに異なる症例についても同様の方法で RFP 感受性判定を試みた。

対象と方法

〔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おいて薬剤感受性検査で RFP 感受性と判定されたにもかかわらず, RFP の臨床効果が乏しい肺結核症 6 症例由来の臨床分離菌 6 株をグループ 1 とした。グループ 1 の

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研究検査科, ³内科

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 4 Feb. 2008/Accepted 28 Apr. 2008)

うち5症例は初回治療例であったが、1症例 (No. 6) については前回治療歴があり、その際実施した薬剤感受性検査結果はRFP感受性と判定されていたが、10カ月後、再排菌を起こし再入院するに至った。しかし再治療時におけるRFPの臨床的効果が芳しくなかったため、この症例におけるRFPに対する感受性の変化を検討するために前回入院時の菌株6^sについても同様に調べた。

RFP感受性結果が薬剤感受性検査ごとに異なるもしくは発育不良で判定不能となった臨床分離結核菌9株 (3症例) はグループ2として、同様にRFPに対する感受性検査を実施した。

耐性結核菌検出キットの精度評価として上記以外に、薬剤感受性検査結果と臨床的効果に相関が認められた肺結核症例由来菌15株 (RFP感受性7株, RFP耐性8株) とH37Rv株をコントロール対照として用いた。

〔方法〕

菌株の同定は結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット (極東製薬工業) と結核菌群同定試薬キャピリアTB (日本ベクトン・ディッキンソン) で行った。

薬剤感受性検査は液体培地を用いるBACTEC MGIT 960 AST結核菌薬剤感受性検査用MGITシリーズ (MGIT-AST法, 日本ベクトン・ディッキンソン) と小川比率法に基づくウエルバック培地S (日本ビーシージーサプライ), Middlebrook 7H9液体培地を用いた微量液体希釈法によるプロスミックMTB-1 (極東製薬工業) を用いた。RFPの耐性基準濃度はMGIT-AST法では1.0 $\mu\text{g/ml}$, ウエルバック培地S法では40 $\mu\text{g/ml}$, プロスミックMTB-1法では4.0 $\mu\text{g/ml}$ とし, プロスミックMTB-1法のみ判定保留域として, 0.06~2.0 $\mu\text{g/ml}$ の基準を設け, 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 以下で感受性と判定した。MIC測定にはプロスミックMTB-1法を用いた。

RFP耐性結核菌検出として, line probe assayを用いた結核菌 *rpoB* 遺伝子の変異検出用試薬ジェノスカラー・Rif TB (ニプロ) を使用説明書に準拠して用いた。まず臨床分離菌株からインスタジーンDNA精製マトリックス (BIO-RAD) を用いてDNAを抽出, 精製し, 結核菌群 *rpoB* 遺伝子増幅試薬 (ニプロ) を使用して *rpoB* 遺伝子の polymerase chain reaction (PCR) 増幅を行った。得られたPCR増幅産物をLiPA検体として, ジェノスカラー・Rif TBにて *rpoB* 変異部位の検出を行った。

本試薬は発色確認用コントロール, 結核菌群特異的プローブおよび9種類の *rpoB* 遺伝子プローブが固相化されたストリップに, 増幅されたDNAをハイブリダイズさせ, 得られた発色パターンによって結核菌の同定ならびに *rpoB* 遺伝子型の判定を行う。 *rpoB* 遺伝子プローブは19~23個の塩基からなる部分的に重複した5種類の野生型プローブ (S1~S5) と, RFP耐性結核菌に見られ

る *rpoB* 遺伝子変異のうち頻度の高い4種類の変異の変異型プローブ (R2, R4a, R4b, R5) から構成されている。プローブS1~S5は野生型の塩基配列に対応し, 検体のDNA配列が野生型の場合5本の発色が見られ, RFP感受性と判定する。変異が存在する場合は相当するプローブに発色が見られず, RFP耐性と判定する。またD516V, H526Y, H526D, S531Lの変異が存在する場合はそれぞれのRプローブが対応し, 発色する。

すべての菌株に対してPCRによる *rpoB* 遺伝子変異領域 (69 bp) のシーケンス解析を行った。同時に van Embdenら⁹⁾の方法に準拠してIS6110-RFLP法を施行し, 菌株の異同を検討した。

結 果

薬剤感受性検査

供試菌15株の薬剤感受性検査の結果は3方法のうちいずれかの方法にて感受性もしくは判定保留と判定された。グループ1の6症例においては, MGIT-AST法とウエルバック培地S法で感受性と判定されたが, プロスミックMTB-1法では判定保留もしくは耐性と判定され, MIC値は0.25~4 $\mu\text{g/ml}$ であった。また症例6の場合, 再入院時において排菌された菌株6^sが判定保留を示していたが, 前回治療時の保存菌株6^sは3方法すべてに感受性と判定され, MIC値は0.03 $\mu\text{g/ml}$ であった (Table 1)。

グループ2の3症例 (1, 2, 3) におけるMIC値は0.25~4 $\mu\text{g/ml}$ であった。そのうち症例1における菌株1のMIC値は0.25 $\mu\text{g/ml}$ を示したが, 17カ月後に分離された菌株2では4 $\mu\text{g/ml}$ と上昇していた (Table 2)。

line probe assayならびにシーケンス解析

コントロール対照の15株とH37Rv株はジェノスカラー・Rif TBで薬剤感受性検査と同じ結果を示した。一方, グループ1および2における15菌株すべてはジェノスカラー・Rif TBで耐性と判定され, 変異のパターンはS1欠損, S2欠損, S3欠損, S4欠損と多型性を認めた。そのうち薬剤感受性検査結果が不安定なグループ2の症例1, 2, 3においては菌株間でキットごとの判定結果は変わらなかった。グループ1の症例6における前回治療保存菌株6^sは野生型を示し, 感受性と判定された。

シーケンス解析の結果, 供試菌15株すべては *rpoB* 遺伝子領域に変異が確認できた。そのうちRFP耐性株の8株はS5領域に変異の認められた株が4株, S3領域においては2株, S1とS4領域に各1株認められた。グループ1における症例1, 2, 3は3症例ともに共通してアミノ酸コドン526部位にヒスチジン (His) からセリン (Ser) への遺伝子変異を認めた。症例4は516部位にアスパラギン酸 (Asp) からチロシン (Tyr) へ, 症例5は511部位にロイシン (Leu) からプロリン (Pro) へ, 症

Table 1 Group 1 : Rifampicin-resistant isolates by the line probe assay, despite susceptible by the drug susceptibility testings (6 cases)

Patient No.	Drug susceptibility testing				RFP resistance-conferring mutation	
	MGIT-AST ^a	Wellpack-S ^b	BrothMIC MTB-1 ^c : MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Line probe assay	Amino acid affected : Amino acid change	
1	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow AGC (Ser)
2	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow AGC (Ser)
3	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow AGC (Ser)
4	S	S	R	4	Δ S2	516 : GAC (Asp) \rightarrow TAC (Tyr)
5	S	S	I	1	Δ S1	511 : CTG (Leu) \rightarrow CCG (Pro)
6 ^s	S	S	S	0.03	WT	None : None
6	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow CTC (Leu)

S: Susceptible R: Resistant I: Intermediate WT: wild type

^a Resistant to rifampicin at 1.0 $\mu\text{g/ml}$ by BACTEC MGIT 960 AST^b Resistant to rifampicin at 40 $\mu\text{g/ml}$ by the proportion method on egg-based Ogawa medium^c Resistant to rifampicin at 4.0 $\mu\text{g/ml}$ by the broth micro-dilution method^s Strains from the case 6 during from the first therapy**Table 2** Group 2 : Rifampicin-resistant isolates by the line probe assay, whereas the different determinations by the drug susceptibility testings (3 cases)

Patient No.	Strain	Drug susceptibility testing				RFP resistance-conferring mutation		Time span (mo)
		MGIT-AST ^a	Wellpack-S ^b	BrothMIC MTB-1 ^c : MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Line probe assay	Amino acid affected : Amino acid change		
1	1	ND	S	I	0.25	Δ S3	522 : TCG (Ser) \rightarrow TTG (Leu)	0
	2	#*	R	R	4	Δ S3	522 : TCG (Ser) \rightarrow TTG (Leu)	17
2	1	R	S	R	4	Δ S1	509–511 Deletion	0
	2	R	S	R	4	Δ S1	509–511 Deletion	4
3	1	ND	S	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)	0
	2	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)	24
	3	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)	31
	4	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)	34
	5	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)	40

* Not grown ND: Not determined S: Susceptible R: Resistant I: Intermediate

^a Resistant to rifampicin at 1.0 $\mu\text{g/ml}$ by BACTEC MGIT 960 AST^b Resistant to rifampicin at 40 $\mu\text{g/ml}$ by the proportion method on egg-based Ogawa medium^c Resistant to rifampicin at 4.0 $\mu\text{g/ml}$ by the broth micro-dilution method

例6の菌株6は526部位にヒスチジン (His) からロイシン (Leu) への変異を認めた。しかし症例6の前回治療保存菌株6^sについては *rpoB* 遺伝子領域に変異は認められなかった (Table 1)。

グループ2において、症例1は522部位にセリン (Ser) からロイシン (Leu) への変異、症例2は509–511の欠失を認めた。症例3は526部位にヒスチジン (His) からシステイン (Cys) への変異が認められ、菌株間の遺伝子変異に変化は認められなかった (Table 2)。

RFLP法

グループ1の症例1, 2, 3は同じRFLPパターンを示した。症例6の2菌株も互いに同じパターンを示した。グループ2の症例1, 2, 3については治療中に排菌された菌株のRFLPパターンは変化を認めなかった。

考 察

わが国で従来広く用いられている薬剤感受性検査は、長らく小川培地を用いた絶対濃度法であったが、1997年に日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会が提案した比率法が標準となった⁷⁾。しかし操作の煩雑さや試験結果が得られるまで時間がかかることが問題とされている。MDR-TBにおいては時折発育がとて遅い菌が存在する場合があるために正確な判定が困難となることがある。

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の研究が進んでいる^{8)–12)}。RFPの場合、RNAポリメラーゼ β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子に変異が見られ、特に hot spot 領域 (69bp) の変異が RFP 耐性結核菌の95%に認められる¹³⁾。ジェノスカラー・Rif TBはこの *rpoB* 遺伝子変異を検出する試薬であり、迅速な RFP 感受性判定が可能である^{1) 2) 4) 14)}。

そこでわれわれは生物学的手法を用いる薬剤感受性検査で起こりうる、臨床経過とRFP感受性検査との間の齟齬が生じる症例や、複数回の感受性結果が変動するためRFP感受性判定が困難な症例を対象として、迅速かつ明確な判定が可能なRFP耐性結核菌検出キットを用いた遺伝子レベルでの感受性判定の有益性の検討を行った。

今回グループ1における6症例は、いずれかの薬剤感受性検査でRFP感受性、もしくは判定保留域と判定された。しかしプロミック MTB-1法で得られたMIC値は比較的高い値(0.25~4 µg/ml)を示したため、通常の薬剤感受性検査では耐性と判定されない低レベルのRFP耐性と考えられた。症例6の場合、再発時における菌株6のMIC値は初回発病時における菌株の値よりも上昇が認められた(0.03 µg/mlから0.25 µg/ml)ことからRFPの耐性化による再燃が考えられた。このような結核菌は通常の薬剤感受性検査では見過ごされやすく、薬剤耐性結核菌の早期発見のうえでもMIC値測定的重要性が示唆された。

グループ2における3症例のうち、症例1の菌株1についてはMGIT-AST法が当センターに導入される前に検出された検体であったため実施されていなかったが、ウエルバック培地S法ではRFP感受性、プロミック MTB-1法ではMIC値0.25 µg/mlの判定保留域であった。17カ月後に排菌された菌株2においてはMGIT-AST法では菌の発育不良による判定不能となり、他の2法ではRFP耐性と判定されMIC値も4 µg/mlと上昇していた。初回治療の場合と違って、いったん排菌が停止された後に再度排菌し治療を開始するときには耐性結核の頻度が高いことから¹⁵⁾、薬剤感受性検査を実施することは必須である。またAmerican Thoracic Society (ATS)のガイドラインでも患者が3カ月の治療の後にも培養陽性の喀痰を呈し続ける場合や、培養陰性の後に培養陽性となった場合には薬剤感受性検査を繰り返さなければならないとしている¹⁶⁾。今回のグループ2の検討で長期持続排菌症例にRFPの耐性化が認められたことから、長期持続排菌症例に対しては低レベル耐性結核菌の可能性を考慮し、薬剤感受性検査を繰り返す必要があると考えられた。

ある患者の生体内において感受性菌と耐性菌が混在している場合、薬剤感受性検査で耐性菌の割合が1%を超えると治療効果が乏しいという臨床的根拠からcritical pointを1%として採用している。遺伝子検査ではDNAの割合の優勢なほうがより増幅されるという特徴がある。したがって薬剤感受性検査と遺伝子検査は相関性が良好であると考えられる。稀なケースではあるが、薬剤感受性検査でRFP耐性と判定されたがジェノスカラー・Rif TBでwild typeと判定され、シーケンス解析では感受性菌と耐性菌が混在していた1菌株をHiranoらは報告

している⁴⁾。阿部らは、薬剤感受性検査で耐性と判定されたにもかかわらずジェノスカラー・Rif TBとシーケンス解析でwild typeと判定された4株を報告し、*rpoB*以外の遺伝子がRFP耐性に関与している可能性を述べている¹⁷⁾。今回の検討ではこのような例は含まれていなかったが、遺伝子検査を行ううえでは十分留意すべき点である。

阿部らは230株中1株に低レベルRFP耐性菌があり、通常の薬剤感受性検査で感受性、ジェノスカラー・Rif TBとシーケンス解析で耐性となったとしている¹⁷⁾。この症例は標準化学療法で菌陰性化に成功したが、今回のグループ1の6症例はいずれも臨床的効果が乏しかった。臨床的経過をgold standardと考えるならば、遺伝子解析による感受性判定が生体内での薬剤感受性を正確に反映している可能性が示唆された。しかし薬剤耐性の機序はまだ未解明な面が残されており、薬剤感受性検査と併用することが重要である。薬剤感受性検査においても卵培地上で発育の悪い菌が液体培地上で発育する場合や、その逆の例もある。今回各薬剤感受性検査間で結果に不一致が生じた要因として、低レベルRFP耐性の可能性と同時に菌の発育状況が使用培地によって左右されることも十分考えられる。そのような場合、遺伝子検査結果を参考にすることは非常に有益であろう。

*rpoB*変異領域を5分類したうえで遺伝子変異の起こる頻度について検討したRossauらによると、RFP耐性菌193株中103株(53.4%)にS5領域の変異を認め、ついでS4領域(31.1%)、S2領域(10.4%)の変異と続き、S3領域は3.6%、S1領域は1.6%の割合で変異が認められるとしている¹⁸⁾。今回コントロール対照のRFP耐性株8株中S5領域に変異の認められたのは4株で、ついでS4領域に2株、S3領域とS1領域に各1株認められた。しかし供試菌15株では一番高頻度に変異が認められるS5領域に変異は認められなかった。

MDR-TBは薬剤耐性遺伝子の変異が多重に蓄積された菌株である。薬剤耐性獲得は菌の適応度(フィットネス)を低下させるものであり、適応に払う犠牲(フィットネス・コスト)を最小限に抑えられた菌株が耐性結核として優勢に出現するとも考えられている¹⁹⁾。Cavusogluらは*rpoB*遺伝子変異はコドン531、ついで526、516、511に多く認められたと報告している。そのなかでコドン531(S5領域)ではTCGからTTGへの変異、511(S1領域)ではCTGからCCGへの変異が高率に出現することから、この変異型は菌の生存するうえでの適応度が高い(フィットネス・コストが低い)ために優勢的であるのだろうと推察している²⁰⁾。今回、グループ1の症例5でコドン511に同様の変異を認めた。この菌株はフィットネス・コストが低い可能性が考えられた。続いて

Cavusogluらはコドン526と516には多様な変異型が認められ、これらの変異をもつ菌株は高レベルRFP耐性であることから¹⁰⁾²¹⁾、様々な塩基に容易に変化できるため高い薬剤耐性を獲得する能力をもつのであろうとしている²⁰⁾。今回の結果ではコドン516の変異は1株しかなかったが、コドン526では3種類の遺伝子変異を認めた。グループ2の症例3における2塩基変異(CAC→TGC)は他の報告でも見られたが²⁰⁾²²⁾、グループ1の症例1, 2, 3で認めた変異は今までに報告はない。*rpoB*遺伝子変異の多くはpoint mutationであるが、少数ながらコドンの欠失、挿入、2塩基変異などが様々なアミノ酸部位に報告されている²⁾²⁰⁾²¹⁾²³⁾。コドン526の変異の多様性から考えて、今回の変異も十分妥当なものであると考えられる。また耐性を獲得したと考えられるグループ1の症例6においてコドン526の変異を認めたことはこのアミノ酸変異の獲得耐性能力の高さを示唆するものである。

今回グループ2の症例1では、MIC値が上昇していたにもかかわらず*rpoB*遺伝子の変異は522(S3領域)のみで変化がなかった。Cavusogluらは30株に多重なアミノ酸変異を認めており、うち2株はコドン522~525の欠失と、515と533のdouble mutationを認めたが、残り28株は高頻度に表れる変異(531, 526, 516, 511)のいずれかを伴っていた²⁰⁾。またコドン522の変異はpoint mutationがほとんどであり、他の領域の変異を伴うという報告は現在のところ見当たらない^{4)9)18)20)~22)24)}。したがって、今回のコドン522の変異は多重に変異を蓄積しやすいと思われる高頻度変異とは連動せずに、耐性レベル

を上昇させている可能性がうかがえた。

今回の結果ではコドン531変異は見られなかったが、高い耐性獲得能力をもつコドン526, 516変異や、適応能力に優れたコドン511の変異を認めたことから、低レベルRFP耐性菌はRFP治療継続により高レベルのRFP耐性菌へと移行する危険性も考えられた。また今回検体数が少なかったことと、コドン526と531のdouble mutationが現時点で報告されていることから²⁰⁾²²⁾、今後コドン531変異が検出される可能性も考えられる。低レベルRFP耐性結核菌と*rpoB*遺伝子変異が起こる部位に何らかの菌側の遺伝的背景が関連しているかもしれないと考え、今後菌株数を増やして低レベルRFP耐性菌に特徴的な変異部位の詳細な検証を計画中である。

RFLP法による検討では、グループ1における症例1, 2, 3のRFLPパターンが一致し、薬剤感受性検査結果ならびに*rpoB*遺伝子解析結果も一致していた。これらの症例を示した3患者は居住地が近接し発病時期も近かったことから、疫学的にも同一菌株による感染と推測された。

Smallらは薬剤感受性検査とRFLPの比較で、再発した肺結核症17症例のうち6症例にRFLPは不変だったが薬剤感受性検査に変化が見られたことから、内因性再燃による再発と報告している²⁵⁾。グループ1における症例6は初診、再発の菌株間でRFLPパターンが一致し、再治療時における菌株のMIC値が上昇して耐性化していることから同一菌により耐性を獲得し、再燃したという考えがRFLP法から更に示唆された。グループ2におけ

Table 3 Comparison of the results of the line probe assay with three drug susceptibility testings for INH and RFP

Group and patients	Strains	Drug susceptible testings								Line probe assay	
		MGIT-AST		Wellpack-S			BrothMIC MTB-1				
		m-INH	m-RFP	INH.0.2	INH.1.0	RFP	INH	RFP	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
Group 1	1	R	S	R	S	S	R	I	0.25	Δ S4	
	2	R	S	R	S	S	R	I	0.25	Δ S4	
	3	R	S	R	S	S	I	I	0.25	Δ S4	
	4	R	S	S	S	S	S	R	4	Δ S2	
	5	R	S	R	R	S	R	I	1	Δ S1	
	6 [§]	R	S	R	S	S	R	S	0.03	WT	
Group 2	1	1	ND	ND	R	R	S	R	I	0.25	Δ S3
		2	#*	#*	R	R	R	R	R	4	Δ S3
	2	1	R	R	R	S	S	R	R	4	Δ S1
		2	R	R	R	S	S	R	R	4	Δ S1
	3	1	ND	ND	R	R	S	R	I	0.5	Δ S4
		2	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4
		3	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4
		4	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4
		5	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4

* Not grown ND: Not determined S: Susceptible R: Resistant I: Intermediate WT: wild type

§ Strains from the case 6 during the first therapy

る症例1, 2, 3のRFLPパターンは症例ごとに同じで、同一の菌による持続感染と考えられた。

RFP耐性結核菌の多くはイソニアジド (INH) 耐性を併せもつことが報告されており^{26) 27)}, 今回, Table 3で示したINHとRFPの薬剤感受性検査結果でも, 供試菌15株はすべて3種類の薬剤感受性検査のいずれかでINH耐性と判定されていた。2002年の結核療法研究協議会による全国調査では, 初回治療例の0.7%, 既治療例の9.8%でMDR-TBが認められたと報告されており²⁸⁾, 大多数のMDR-TBは不確実な服薬や中断により耐性を獲得したと考えられている。しかし今回グループ1の6症例のうち5症例は初回治療例であり, *rpoB* 遺伝子変異が存在するけれども, 薬剤感受性検査で耐性と判定されないため見逃されている比較的初期のMDR-TBの存在がうかがわれた。このような場合, RFP感受性菌と過小評価されたまま治療が続行され, 再発した際にはより深刻なMDR-TBに進行している危険性が少なからず存在すると考えられた。HIV陰性者におけるMDR-TBの外來性再感染事例^{29)~32)}が報告されており, 低レベルRFP耐性結核菌を早期に検出することはMDR-TBによる院内感染を防ぐためにも非常に重要である。本キットにより適切な治療法の迅速な選択が可能となり, 治療成績を高められる効果が期待できる。

ま と め

RFPに対する通常の薬剤感受性検査結果と臨床効果との間に乖離がある症例や, 長期排菌症例で薬剤感受性結果が不安定な場合, 低レベルRFP耐性結核菌による感染の可能性がある。その際MIC値の測定やline probe assayによる遺伝子変異の有無の検討が臨床的に有用であることが示唆された。

文 献

- 鈴木定彦, 市原竜生, 田丸亜貴, 他: DNAチップによる結核菌の耐性診断. *Bio Industry*. 2000; 5: 36-44.
- Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, et al.: Use of the genotype MDRDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3699-3703.
- Lin SYG, Probert W, Lo M, et al.: Rapid detection of isoniazid and rifampin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex from cultures or smear-positive sputa by use of molecular beacons. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 4204-4208.
- 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.
- 阿野裕美, 松本智成, 吉多仁子, 他: 結核治療中患者から経時的に得られた結核菌株での, 薬剤耐性菌と感受性菌の割合の変化. *結核*. 2003; 78: 739-746.
- van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al.: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 406-409.
- 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 「新結核菌検査指針2000」. 結核予防会, 東京, 2000, 95-106.
- Zhang Y, Heym B, Allen B, et al.: The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 1992; 358: 591-593.
- Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al.: Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38: 2380-2386.
- Ohno H, Koga H, Kohno S, et al.: Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 1053-1056.
- 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.
- Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, et al.: Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 1677-1681.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993; 341: 647-650.
- 林 浩志, 竹村一男, 兒崎隆純, 他: マイクロアレイを用いた結核菌の検査. *臨床検査*. 2005; 49: 539-545.
- Abe C, Hirano K, Wada M, et al.: Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001; 5: 46-52.
- American Thoracic Society: Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161: 1376-1395.
- 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.
- Rossau R, Traore H, de Beenhouwer H, 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.
- Gagneux S, Long CD, Small PM, et al.: The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2006; 312: 1944-1946.
- Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guner S, et al.: Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 4435-4438.
- Hwang HY, Chang CY, Chang LL, et al.: Characterization

- of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Med Microbiol.* 2003 ; 52 : 239–245.
- 22) Valim ARM, Rossetti MLR, Ribeiro MO, et al.: Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol.* 2000 ; 38 : 3119–3122.
- 23) Matsiota-Bernard P, Vrioni G, Marinis E: Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 36 : 20–23.
- 24) Morlock GP, Plikaytis BB, Crawford JT: Characterization of spontaneous, in vitro-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 ; 44 : 3298–3301.
- 25) Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, et al.: Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med.* 1993 ; 328 : 1137–1144.
- 26) 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.
- 27) 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 : 273–278.
- 28) Tuberculosis Research Committee (Ryoken): Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: a nationwide survey, 2002. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007 ; 11 : 1129–1135.
- 29) Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, et al.: Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 ; 21 : 596–602.
- 30) 露口一成: 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例について. *複十字.* 2003 ; 293 : 8–11.
- 31) Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al.: Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 ; 163 : 717–720.
- 32) Bandera A, Gori A, Catozzi L, et al.: Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2001 ; 39 : 2213–2218.

————— Original Article —————

EVALUATION OF THE DISCREPANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS BETWEEN ANY ORDINARY SUSCEPTIBILITY TESTING AND *rpoB* GENE ANALYSIS BY THE LINE PROBE ASSAY

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiko SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ²Motohisa TOMITA, ¹Masaji OKADA, and ³Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] Evaluation of rifampicin-resistance by the line probe assay, for rifampicin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains which were classified as rifampicin-resistant by the phenotypic drug susceptibility testings.

[Materials and Methods] A total of 15 clinical isolates from NHO Kinki-chuo Chest Medical Center consisting of 6 rifampicin-resistant strains by the line probe assay despite susceptible result by the drug susceptibility testings, and 9 clinical isolates which showed the fluctuating results on repeated drug susceptibility testings. After we conducted 3 drug susceptibility testings and the line probe assay, we have examined the sequence analysis for confirming mutations in the *rpoB* gene.

[Results] All strains were determined rifampicin-susceptible or intermediate by the drug susceptibility testings with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) which ranged from 0.25 to 4 $\mu\text{g/ml}$ by BrothMIC MTB-1, whereas these isolates indicated rifampicin-resistance by the line probe assay and

revealed mutations in the hot-spot region (69 bp) by the sequence analysis.

[Conclusion] We verified that the line probe assay might be useful for the correct determination of drug susceptibility, especially about the low-level rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains.

Key words : *M. tuberculosis*, Drug susceptibility testing, Resistance-conferring mutation, *rpoB*, MIC

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

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)