

[原 著]

Pyrazinamide 薬剤感受性試験法の評価

青野昭男・近松絹代・五十嵐ゆり子・高木明子・山田博之・御手洗聡
結核予防会結核研究所細菌科

(平成 27 年 5 月 26 日受付, 平成 27 年 6 月 22 日受理)

近年 Pyrazinamide (PZA) の薬剤感受性試験について, pyrazinamidase (PZAse) および *pncA* 遺伝子変異との間での結果の乖離や, 表現型薬剤感受性試験が判定基準に一致せず判定保留となるなどの問題点が指摘されている。今回, 我々は本邦で分離された多剤耐性結核菌 77 株を用いて, PZAse 試験を基準とし, 極東 PZA および MGIT PZA による表現型薬剤感受性試験と *pncA* 遺伝子変異の有無による耐性判断について, それぞれの方法における検査精度を評価した。

結果として, PZAse 陽性を以て PZA 感受性とした場合, 極東 PZA は感度 88.1%, 特異度 85.7%, 一致率 87.0%, Kappa 係数 0.77 であった。MGIT PZA は感度 100%, 特異度 80.0%, 一致率 90.9%, Kappa 係数 0.81 であった。*pncA* 遺伝子変異は感度 100%, 特異度 97.1%, 一致率 98.7%, Kappa 係数 0.97 であった。PZAse の成績と最も一致したものは *pncA* 遺伝子変異の同定であった。極東 PZA において判定保留が 9 株 (11.7%) 認められ, 検査精度への影響を認めた。

今回の検討により, 結核菌の発育を評価する感受性試験はカットオフ値に問題があり, 特に境界付近で臨床的に不正確である可能性が示された。現時点では積極的な遺伝子診断の利用が正確な感受性を示すものと考えられた。

Key words: Pyrazinamide 薬剤感受性試験, pyrazinamidase, *pncA* 遺伝子変異

序 文

Pyrazinamide (PZA) は isoniazid (INH) および rifampin (RFP) と共に, 国際的に認められた標準初期強化治療に用いられる重要な薬剤の一つであり, マクロファージ内の半休止期の菌に対しても強い効果を示すとされている¹⁾。PZA はプロドラッグであり, 結核菌の持つ酵素 pyrazinamidase (PZAse) により pyrazinoic acid (POA) に変化して効果を示す。PZAse は結核菌の持つ 561bp の *pncA* 遺伝子によりコードされ, PZA 耐性と *pncA* 遺伝子の変異との間に相関が認められる^{2)~4)}。

PZA の抗菌活性は pH に大きく左右され, 酸性領域の pH 5.0 および 5.5 で高くなる。しかし結核菌は培地の pH を酸性側に傾けると発育が悪くなり, 薬剤感受性試験を正しく測定することが難しくなる⁵⁾。BD バクテック MGIT システム結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ ピラジナミド (MGIT PZA, 日本ベクトン・ディッキンソン) は液体培地の pH を 5.9 に調整し, テストプロトコールを調整することで PZA 薬剤感受性試験を測定することを可能にしている⁶⁾。また極東薬剤感受性 PZA 試薬 (極東 PZA, 極東製薬工業) は液体培地の pH を 6.0 に調整し, PZA 濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ と 400 $\mu\text{g/ml}$ の 2 点を用いて PZA の薬剤感受性試験を測定することができる。これらのキットは PZAse 試験の結果と高い相関を示すことが報告されている⁷⁾⁸⁾。

しかし近年, 上記のキットを用いた PZA 薬剤感受性試験や *pncA* 遺伝子変異の結果と PZAse 試験との間で, 結果の乖離する例が報告されている^{9)~11)}。さら

著者連絡先: (〒204-8533) 東京都清瀬市松山 3-1-24
結核予防会結核研究所細菌検査科
青野昭男
TEL: 042-493-5762
FAX: 042-492-4600
E-mail: aono@jata.or.jp

Table 1. Decision criteria for KYOKUTO PZA susceptibility test

Decision	PZA 100 tube	PZA 400 tube
Susceptible	No growth	
	Obviously smaller than PZA 0 tube	Obviously Smaller than PZA 0 tube
Resistant	Smaller than PZA 0 tube	Equivalent growth PZA 0 tube
	Equivalent growth PZA 0 tube	Equivalent growth PZA 0 tube

・ If it applies to none of the criteria mentioned above, must be perform a reexamination or other examinations

・ This is made in reference to KYOKUTO PZA susceptibility test kit attachment document

に極東 PZA は目視にて判定をすることから、判定基準に一致しないものが判定保留となるケースが見受けられ、問題視されている。

今回、我々は MGIT PZA および極東 PZA による薬剤感受性試験と *pncA* 遺伝子の変異の有無による耐性判断について、我が国で分離された多剤耐性結核菌を用いて、PZA 薬剤感受性試験法として推奨されている¹²⁾PZAse 試験の結果を標準として、それぞれの方法における検査精度を比較検討した。

材料と方法

菌株

2002 年および 2007 年に実施された結核療法研究協議会による耐性結核菌全国調査により収集された結核菌のうち、多剤耐性結核菌 (MDR-TB) と判定された 80 株を対象とした。この内の 3 株は雑菌混入のため対象から除外し、最終的に 77 株を用いた。

PZA 薬剤感受性試験の測定

MGIT PZA の添付文書に従い PZA 濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ について比率法による薬剤感受性の測定を行った⁷⁾。菌株はマイコプロス (極東製薬工業) にて、吸光度 530 nm で OD 値 0.2 になるまで培養し、これを用いて接種菌液の調製を行った。OD 値 0.2 の菌液を滅菌精製水にて 10 倍と 100 倍に希釈し、10 倍希釈菌液を PZA 含有 MGIT チューブに 0.5 ml、100 倍希釈菌液を発育対照 MGIT チューブに 0.5 ml それぞれ接種した。PZA 薬剤感受性の培養と判定はバクテック MGIT960 を用いて行い、発育対照 MGIT チューブの発育値 (GU) が 400 に達した際に、PZA 含有チューブの GU が 100 を超えたものを耐性と判定した。

極東 PZA の添付文書に従い PZA 濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (PZA 100 培地)、PZA 濃度 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (PZA400 培地) および PZA 濃度 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (PZA0 培地) を用いて液体培地希釈法により測定を行った。菌株はマイコプロス (極東製薬工業) にて、吸光度 530 nm で OD 値 0.2

になるまで培養し、これを滅菌精製水にて 100 倍に希釈したものを接種菌液とし PZA 0、PZA 100 および PZA 400 培地に 0.1 ml ずつ接種した。37°C の通常大気で培養し、培養開始 1 日目に雑菌汚染がないか目視にて確認し、培養 7 日目に PZA 0 培地の試験管底の菌塊を目視にて観察し、極東 PZA 判定基準 (Table 1) に従い判定し、判定基準に一致しないものは判定保留とした。また PZA 0 培地の発育が不十分であった場合は培養を継続し、14 日以降でも発育を認めなければ判定不能とした。

PZAse 試験

PZAse 試験は Wayne の方法を用いて実施した¹³⁾。菌株は 2% 小川培地にて 3 週間培養したものを接種菌として用いた。試験培地の表面に大量の菌 (山盛り 1 白金耳) を接種し、37°C で 7 日間培養し使用直前に調製した 1% 硫酸鉄 (II) アンモニウム溶液を 1 ml 加え、室温に 30 分間放置し、寒天上層部に茶褐色の発色を認めたものを陽性とした。発色が認められない陰性試験管は 4°C に 4 時間放置し再度発色の有無を判定した。

pncA 遺伝子変異の解析

Sreevatsan ら¹⁴⁾の方法に従い *pncA* forward および *pncA* reverse Primer を用いて増幅後、PCR 産物を MagExtractorTM (TOYOBO) で精製、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および ABI 3137 automatic sequencer (Applied Biosystems) により、それぞれの領域についてダイレクトシーケンスを実施した。シーケンスの解析には GENETYX-WIN ver.5.2 (GENETYX Co., Japan) を使用し、H37Rv (ATCC 27294) のシーケンスと比較した。

結 果

対象 77 株において PZAse 陰性を示し PZA 耐性と判定された株が 42 株 (54.5%)、PZAse 陽性を示し

Table 2. Comparison of KYOKUTO PZA, MGIT PZA and *pncA* gene sequencing, PZAse activity as reference

		PZAse negative 42	PZAse positive 35	Total 77
Kyokuto PZA	Resistant	37	1	38
	Susceptible	0	30	30
	indeterminate	5	4	9
MGIT PZA	Resistant	42	7	49
	Susceptible	0	28	28
<i>pncA</i> gene	Mutation	42	1	43
	No mutation	0	34	34

Table 3. Performance of KYOKUTO PZA, MGIT PZA and *pncA* gene sequencing, PZAse as reference

N = 77	Sensitivity (%)	Specific (%)	Agreement (%)	Kappa coefficient
KYOKUTO PZA	88.1	85.7	87.0	0.77
MGIT PZA	100	80.0	90.9	0.81
<i>pncA</i> gene sequencing	100	97.1	98.7	0.97

PZA感受性と判定された株が35株(45.5%)であった。PZAseの結果を基準に極東PZA, MGIT PZA, *pncA* 遺伝子変異について比較した。極東PZAではPZAse陰性42株のうち37株が耐性を示し、感受性を示した株は認めなかったが、5株が判定保留となった。これに対しPZAse陽性35株では30株が感受性と判定され結果が一致したものの、1株が耐性を示し4株が判定保留を示した(Table 2)。極東PZAはPZAseに対し感度88.1%, 特異度85.7%, 一致率87.0%を示し、Kappa係数は0.77であった(Table 3)。

MGIT PZAについては、PZAse陰性42株のうち42株全てで耐性を示し結果が一致した。これに対しPZAse陽性35株では28株が感受性を示し結果が一致したが、7株が耐性と判定され結果の乖離を認めた(Table 2)。MGIT PZAはPZAseに対し感度100%, 特異度80.0%, 一致率90.9%を示し、Kappa係数は0.81であった(Table 3)。

pncA 遺伝子変異については、PZAse陰性42株のうち42株全てで*pncA* 遺伝子に変異を認め、PZA耐性と判定された。またPZAse陽性35株のうち34株は*pncA* 遺伝子変異を認めずPZA感受性と判定されたが、1株に変異を認めた(Table 2)。*pncA* 遺伝子変異はPZAseに対し感度100%, 特異度97.1%, 一致率98.7%を示し、Kappa係数は0.97であった(Table 3)。

PZAse試験を基準とした場合の各方法における結果の乖離は、77株中で極東PZAが10株(13.0%), MGIT PZAが7株(9.1%), *pncA*が1株(1.3%)であった。極東PZAで結果が乖離した10株中9株が判定保留を示し、これら9株のPZAse試験の結果は陽性が4株、陰性が5株であった(Table 4)。MGIT PZAで結果が乖離した7株は、全てMGIT PZA耐性でPZAse試験陽性であった(Table 5)。また*pncA* 遺伝子変異で結果が乖離した1株は、PZAse試験陽性で塩基配列392番目の位置にGuanineの挿入を認めるものであった(Table 6)。

考 察

pncA 遺伝子変異とPZAse試験の結果はよく相関することが知られており³⁾、今回のわれわれの結果も1株を除き全ての株において一致していた。結果の乖離する要因としては、遺伝子変異が耐性に関与しない、または感受性菌と耐性菌の混在がある、などが想定される。PZAse活性への*pncA* 遺伝子の関与は遺伝子の特定の部位に限定されず、遺伝子領域全体に渡ることが報告されており^{8)~10)}、今回の乖離を認めた株の遺伝子変異が、塩基配列392番目の位置への1塩基の挿入であることから、フレームシフトによりアミノ酸構造は131番目より下流域全体に影響すると考えられる。このため遺伝子変異がPZAse活性に関与していないとは考えにくい。Folkvardsenら¹⁵⁾は性状の異

Table 4. Discrepant results of 10 strains between PZAse activity and KYOKUTO PZA

Strain No.	KYOKUTO PZA			PZAse
	PZA 100	PZA 400	result	
4	+	+	resistant	positive
6	+ w	+ w	indeterminate	positive
27	+ w	+ w	indeterminate	positive
32	+ w	+ w	indeterminate	negative
83	+ w	+ w	indeterminate	negative
17	+	+ w	indeterminate	positive
31	+	+ w	indeterminate	negative
37	+	+ w	indeterminate	negative
65	+	+ w	indeterminate	negative
13	+	±	indeterminate	positive

+ : Equivalent growth PZA 0 tube +w: Smaller than PZA 0 tube
± : PZA 0 Obviously Smaller than PZA 0 tube

Table 5. Discrepant results of 7 strains between PZAse activity and MGIT PZA

Strain No.	MGIT PZA	PZAse
4	resistant	positive
6	resistant	positive
13	resistant	positive
17	resistant	positive
25	resistant	positive
50	resistant	positive
79	resistant	positive

Table 6. Discrepancies between PZAse activity and *pncA* gene sequencing

Strain No.	<i>pncA</i> gene sequencing	PZAse
4	G insertion at 392	positive

なる菌の混在が検査結果に与える影響について報告しており、今回の結果乖離の要因としても感受性菌と耐性菌の混在を上げることができる。

MGIT PZA 薬剤感受性試験で耐性を示した 49 株中 7 株が PZAse の結果と乖離し、そのうちの 6 株 (12.2%) で *pncA* 遺伝子変異を示さなかった。これまでの報告にも、MGIT PZA 耐性株のうち 7~15% 程度に *pncA* 遺伝子変異を認めないとしており¹⁾⁹⁾¹⁶⁾、今回の結果と同様と考えられる。Werngren ら¹¹⁾はこうした乖離は MIC 値が 100 µg/ml 近辺でみられることから MIC 値 64 µg/ml から 128 µg/ml までを中間とし、128 µg/ml より高いものを耐性とすることを提唱している。また Zhang ら⁴⁾は Bactec-460 system : Becton Dickinson に用いる PZA 評価濃度を 100 µg/ml の代わりに 300 µg/ml を用いることを提案するなど、MGIT による PZA 評価濃度を変更すべきとする考えもある。

MGIT PZA 耐性を示しながら PZAse 陽性を示し、結果の乖離した株が 7 株認められている (Table 5)。これは前述した MGIT における PZA の評価濃度の議論とは別に、PZA が PZAse によりピラジン酸に変換され抗菌活性を示すとす、従来から提唱されている作用機序²⁾³⁾とは別の作用機序の存在を示唆するものであり、Shi ら¹⁷⁾は結核菌のリボゾームにおける trans-translation に関与する S1 タンパク (RpsA) が PZA のターゲットであるとし、これをコードする遺伝子 *rpsA* の変異が結核菌の PZA 耐性に関与していると報告している。また Zhang ら¹⁸⁾はアスパラギン酸脱炭酸酵素をコードする *panD* 遺伝子の変異が、結核菌の PZA 耐性に関与すると報告している。今回の MGIT PZA と PZAse の結果の乖離に、こうした新たに報告された作用機序が関与するかは、さらなる検討が必要となる。

極東 PZA と PZAse の結果が乖離した 10 株のうち、9 株は極東 PZA の結果が判定保留であったことに起因する。極東 PZA において結果の乖離した株の PZA 100 および PZA 400 の発育性状を Table 4 に示した。目視にて判定する極東 PZA は発育性状が Table 1 の判定表の基準から外れたものは判定保留となる。即ち発育性状は数値化されていないため、数値判定に

比べ判定境界付近では結果の齟齬が起りやすいと考えられた。

今回の検討で、PZA 薬剤感受性試験法として推奨される PZAse 活性を基準として、各種の PZA 薬剤感受性測定法の精度を評価した。PZAse 試験の成績と最も一致したものは *pncA* 遺伝子変異の検索であった。*pncA* 遺伝子を利用した PZA の遺伝子診断キットとしては、ラインプローブ法が利用可能であり Mitarai ら⁹⁾がその有用性を報告している。しかし *pncA* 遺伝子以外に *rpsA* 遺伝子や *panD* 遺伝子を含め、これらすべてを用いての精度は未だ十分には明らかとはされていない。培養法による PZA 薬剤感受性試験は PZA の抗菌活性と結核菌の発育 pH に乖離があることから、遺伝子診断技術のさらなる進歩が期待される。

利益相反： 申告すべき利益相反はありません。

文 献

- Chedore, P., L. Bertucci, J. Wolfe, et al. 2010. Potential for erroneous results indicating resistance when using the Bactec MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Clin. Microbiol.* 48: 300-301.
- Heifets, L, P Lindholm-Levy. 1992. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. *Am Rev Respir Dis.* 145: 1223-1225.
- Scorpio, A., Y. Zhang. 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* 2: 662-667.
- Zhang, Y., S. Permar, Z. Sun. 2002. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Med. Microbiol.* 51: 42-49.
- McDermott, W, R Tompsett. 1954. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments in vitro. *Am. Rev. Tuberc.* 70: 748-754.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard—Second, M24-A2 edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Aono, A., K. Hirano, S. Hamasaki, et al. 2002. Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA): compared with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44: 347-352.
- Sekiguchi, J, T. Nakamura, T. Miyoshi-Akiyama, et al. 2007. Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2802-2807.
- Louw, G. E., R. M. Warren, P. R. Donald, et al. 2006. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10: 802-807.
- Marttila, H. J., M. Marjamaki, E. Vyshnevskaya, et al. 1999. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia. 1999. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1764-1766.
- Werngren, J, E Sturegård, P Juréen, et al. 2012. Re-evaluation of the Critical Concentration for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* against Pyrazinamide Using Wild-Type MIC Distributions and *pncA* Gene Sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (3): 1253. DOI: 10.1128/AAC.05894-11.
- 日本結核病学会抗酸菌検討委員会. 2007. 結核菌検査指針 2007, 結核予防会, 東京.
- Wayne, LG. 1974. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 109: 147-151.
- Sreevatsan, S, X. Pan, Y. Zhang, et al. 1997. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 636-640.
- Folkvardsen, DB, E. Svensson, VØ. Thomsen, et al. 2013. Can Molecular Methods Detect 1% Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*?. *J. Clin. Microbiol.* 2013. 51 (5): 1596. DOI: 10.1128/JCM.00472-13.
- Jonmalung, J., T. Prammananan, M. Leechawengwongs, et al. 2010. Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *BMC Microbiol* 10: 223.
- Shi, W, X Zhang, X Jiang, et al. 2011. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 333: 1630-1632.
- Zang, S, J Chen, W Shi, et al. 2013. Mutations in *panD* encoding aspartate decarboxylase are associated

- with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect* 2: e34.
- 19) Mitarai, S, S Kato, H Ogata, et al. 2012. Comprehensive multicenter evaluation of a new line probe assay kit for identification of *Mycobacterium* species and detection of drugresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 50: 884-890.

Evaluation of phenotypic and genotypic drug susceptibility testings for pyrazinamide

Akio Aono, Kinuyo Chikamatsu, Yuriko Igarashi, Akiko Takaki, Hiroyuki Yamada, Satoshi Mitarai
Department of Mycobacterium Reference and Research, The Research Institute of Tuberculosis,
Japan Anti-tuberculosis Association, Kiyose, Japan

Pyrazinamide (PZA) is the key drug for the treatment of tuberculosis. The inconsistencies between pyrazinamidase (PZAse) test, PZA drug susceptibility testing (DST) and *pncA* gene sequencing method are reported recently. In this study, we compared those three methods using 77 strains of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and investigated discrepant strains in detail. We performed KYOKUTO PZA and MGIT PZA tests and *pncA* gene sequencing, and compared the results with PZAse tests as referral. KYOKUTO PZA showed 88.1%, 85.7%, 87.0% and 0.77 of sensitivity, specificity, agreement and Kappa coefficient, respectively. Similarly, MGIT PZA showed 100%, 80.0%, 90.9% and 0.81, respectively. The mutations of *pncA* gene indicated 100%, 97.1%, 98.7% and 0.97, respectively. The highest agreement was observed between *pncA* gene sequencing method and PZAse test. In this study, current phenotypic DST methods were less accurate than genotypic method. The sequencing of *pncA* or equivalent test shall be encouraged for the accurate PZA susceptibility.