

[総 説]

結核菌における pyrazinamide 薬剤感受性試験

青野昭男

公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

(令和4年7月29日受付)

わが国の2021年の結核罹患率は人口10万人対10.1で、今なお公衆衛生上非常に重要な感染症の一つである。結核の化学療法は多剤併用が原則で、標準的治療法および多剤耐性結核の治療に関する提言が示すように、pyrazinamide (PZA) は結核の化学療法において重要な役割を担っている。プロドラッグであるPZAは、結核菌の持つ酵素pyrazinamidase (PZase) によりpyrazinoic acid (POA) に変化することで抗菌活性を示す。PZAの抗菌活性はpHに大きく左右され、酸性領域のpH 5.0-5.5で高くなる。PZA耐性に関与する遺伝子の中心は*pncA* 遺伝子であり、*pncA* 遺伝子の変異と非常に良く相関する試験がピラジナミダーゼ試験である。我々はピラジナミダーゼ活性を吸光度を用いて数値化して測定する方法を報告しており、手技も簡便であることから臨床検査への導入も可能と思われる。PZA薬剤感受性試験には偽耐性が多いことが報告されており、より正確にPZA耐性を評価するためには、遺伝子型と表現型の薬剤感受性試験を組み合わせることが必要であると考えられる。

Key words: pyrazinamide, 結核菌, 薬剤感受性試験

近年のわが国の結核動向

結核の統計 2021¹⁾によると、直近のわが国の新登録結核患者数は12,739人であり、人口10万人対罹患率(罹患率)は10.1であった。感染症法における二類感染症に分類される結核は、今なお公衆衛生上における重要な感染症の一つであると言える。結核の低蔓延国としての目安として、罹患率が10以下であることが挙げられる。2020年の統計で罹患率が10.1まで低下したものの、近年の新型コロナウイルス感染症の影響を考慮した場合、流行以前の10年間の新登録結核患者数の年間減少率は5.0%であったのに対して、2019年から2020年では11.9%と2倍以上減少していた¹⁾。マスク着用などの感染対策の効果も否定できないものの、定期健診や接触者健診による患者発見の機会の極端な減少により、結核患者が見逃されていた可能性が懸念されている。

我が国の結核の特徴は年齢別の患者数の分布(図1)に示されるように、高齢者が中心である。また20-30歳代に小さいながらピークを認め、外国出生者による結核が大きな要因となっている。全結核に占める外国出生患者の割合は11.1%であるのに対し、20-30歳代の割合は71.3%と高く、また在留外国人統計をもとにした2020年の外国出生結核患者の罹患率は人口10万対48.9で、全体の罹患率である10.1の4.8倍であった。これはすでに低蔓延国となっている欧米諸国にみられる傾向と同じ現象であり、近い将来における日本の結核の姿をみることができる。

結核の化学療法

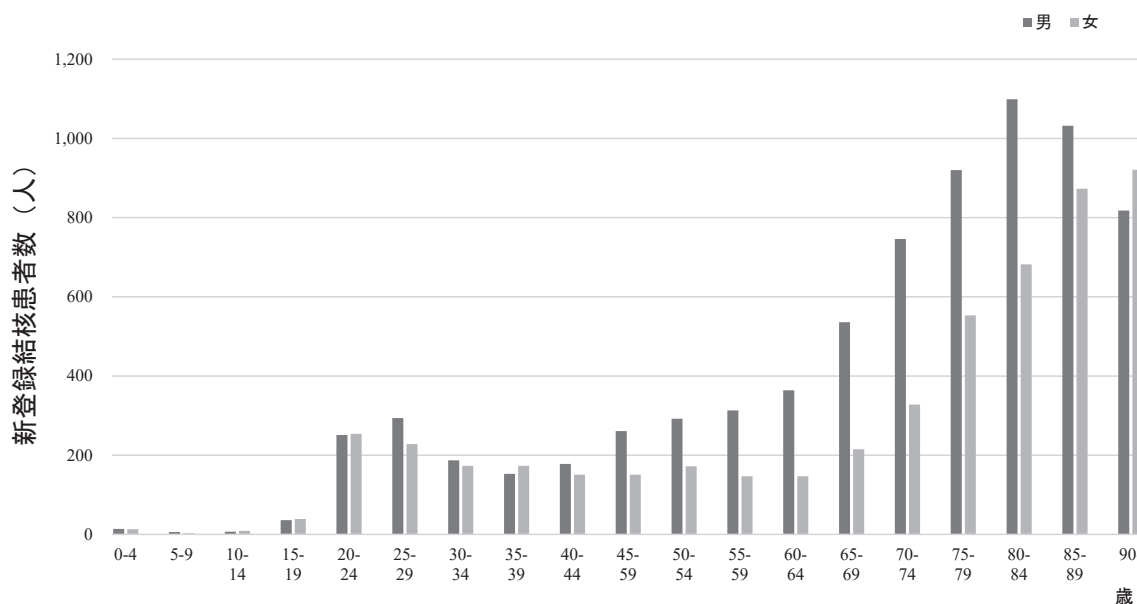
結核の化学療法は多剤併用が原則である。標準的治療法²⁾は原則としてrifampicin (RFP), isoniazid (INH) およびpyrazinamide (PZA) の3剤にethambutol (EB) もしくはstreptomycin (SM) を加えた4剤併用で初期強化期2ヵ月間治療後、続く維持期はRFPとINHを継続する全治療期間6ヵ月である(表1)。

2020年のわが国における新登録肺結核患者で、薬剤感受性結果が判明しているのは5,209人である。このうちRFPおよびINH共に耐性を示す、多剤耐性は46人で0.9%¹⁾であるものの、日本結核・非結核性抗酸菌症学会治療委員会は、本邦における医療状況を考慮したうえでの、多剤耐性結核の治療に関する考え方をまとめている³⁾。その中で薬剤感受性試験結果がすべて判明した時点での治療の考え方として、選択薬剤の優先順位を示している。感受性が確認されたlevofloxacin (LVFX), bedaquiline (BDQ) の2剤を基本とし、次いで殺菌効果からlinezolid (LZD), さらにEB, PZA, delamanid (DLM), clofazimine (CFZ) およびcycloserine (CS) の6剤が使用を考慮すべき薬剤として挙げている。

結核治療におけるピラジナミドの役割

1950年代にPZAは40-70 mg/kg/dayで投与され肝障害、関節痛(高尿酸血症による)などの副作用が強く、肝障害による死亡例も報告され、わが国では使用されなかった。しかし現在は20-25 mg/kg/dayが推奨されており、治療期間の短縮に有用ということで再評価され、最初の2ヵ月間に限りPZAを使用する化学療法が、肺結核初回標準療法の一つとなっている。2015年に堀田ら⁴⁾は治療開始の2ヵ月間にPZAを25 mg/kg/dayの用量で上乗せした場合の薬剤関連肝障害の発症リスクについて後方視的コホート研究の結果、PZA

著者連絡先: (〒204-8533) 東京都清瀬市松山 3-1-24
公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部
青野昭男



文献1より引用して作成

図1. 新登録結核患者数, 性, 年齢階級別 (2020)

表1. 初回標準治療例の標準的治療法

原則として RFP, INH, PZA を用いる下記の治療法を用いる。 RFP+INH+PZA に EB (または SM) の 4 剤併用で初期強化期 2 カ月間治療後, 維持期は RFP+INH を 4 カ月継続し, 全治療期間 6 カ月 (180 日) とする。 なお, 下記の条件がある場合には維持期を 3 カ月延長し, 維持期を 7 カ月, 全治療期間 9 カ月 (270 日) とすることができる。
(1) 結核再治療例
(2) 治療開始時結核が重症: 有空洞 (特に広汎空洞型) 例, 粟粒結核, 結核性髄膜炎
(3) 排菌陰性化遅延: 初期 2 カ月の治療後も培養陽性
(4) 免疫低下を伴う合併症: HIV 感染, 糖尿病, 塵肺, 関節リウマチ等の自己免疫疾患など
(5) 免疫抑制剤等の使用: 副腎皮質ステロイド剤, その他の免疫抑制剤
(6) その他: 骨関節結核で病巣の改善が遅延している場合など

「結核医療の基準」の改定—2018 年より改変

の上乗せは薬剤関連肝障害の増加に関与しないことを報告している。

結核の標準的治療薬および多剤耐性結核の治療薬の選択肢である PZA は, 結核治療の要となる薬剤のひとつである。一方で多剤耐性結核菌の約 60% が PZA 耐性であることが報告されている⁵⁾⁶⁾。多剤耐性結核菌の治療は薬剤の選択肢がより限定的であり, 不適切な薬剤感受性試験結果はさらに選択肢を狭める結果となりかねない。化学療法の実施にあたり薬剤感受性試験による薬剤評価の確認は必要不可欠であり, 結核菌における PZA も例外ではなく, 治療効果をより正確に予測するために, 薬剤感受性試験の精度の向上は非常に重要な課題である。

PZA の作用機序

プロドラッグである PZA は, 結核菌の持つ酵素 pyrazinamidase (PZase) により pyrazinoic acid (POA) に変化することで抗菌活性を示す。PZA の抗菌活性は pH に大きく左右され, 酸性領域の pH 5.0-5.5 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⁷⁾。Bactec™ MGIT™ 960 system (MGIT, Becton Dickinson) は液体培地の pH を 5.9 に調整し, 基準薬剤濃度を 100 µg/ml に調整することで PZA 薬剤感受性試験を測定することを可能にしており, PZase 試験の結果と高い相関を示している⁸⁾。

POA の作用機序については, 未だに論争的となっている。最近まで, PZA は酸性 pH でのみ結核菌の増殖を阻害し, POA は低分子量のカルボン酸であるため, 膜の透過性エネルギーに関与するイオノフォアとして作用すると考えられていた⁹⁾。しかしその後 POA はイオノフォアとしての作用が疑問視されている。また Ribosomal protein S1 (RpsA) リボソーム蛋白質 S1 や RNA や DNA の代謝に関与する蛋白質 Rv2783 を標的とする可能性が示されているが, 最近のエビデンスでは, PZA/POA の抗菌活性は trans-translation や RpsA とは独立していることが示されている¹⁰⁾。さらに POA を投与したマウスの肺から分離された POA 耐性結核菌株の塩基配列を解析したところ, コエンザイム A の生合

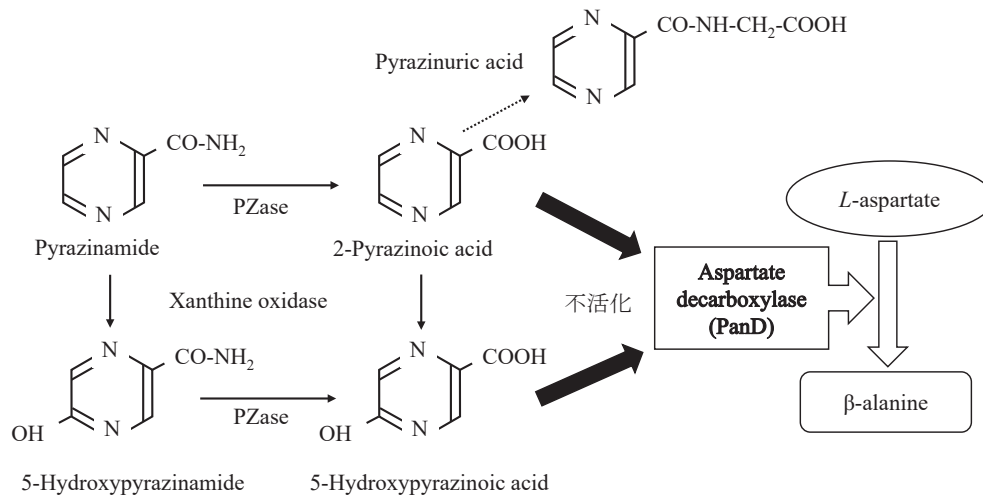


図2. Pyrazinamide 作用機序

Pyrazinamide は pyrazinamidase により pyrazinoic acid とそのアナログに代謝され、標的であるアスパラギン酸脱炭酸酵素 (PanD) を不活化する。これにより L-aspartate から β -alanine の生成を阻害し、抗菌活性を発揮するとされる。

表2. 外部精度評価における結核菌 pyrazinamide 薬剤感受性試験キットの評価

Indicator	KPZA (n=44)		MPZA (n=16)		PZA (n=6)		Appendix
	Mean	95%CI	Mean	95%CI	Mean	95%CI	
Sensitivity	0.951	0.828-0.991	1.000	—	0.966	0.874-0.994	
Specificity	0.695	0.536-0.820	0.488	0.245-0.735	0.643	0.508-0.760	KPZA>MPZA : p=0.0043
Efficiency	0.826	0.677-0.918	0.744	0.468-0.913	0.805	0.679-0.892	KPZA>MPZA : p=0.0152
kappa coefficient	0.645	0.489-0.781	0.488	0.245-0.735	0.610	0.475-0.730	KPZA>MPZA : p=0.0180

95% CI : 95% confidential interval, PZA : pyrazinamide, KPZA : Kyokuto PZA liquid medium, MPZA : MGIT AST PZA

文献20より引用

成に必要なアスパラギン酸脱炭酸酵素 (PanD) の遺伝子 *panD* の変異が *in vivo* での POA 耐性の主要なメカニズム (図2) を構成していることが明らかとなり、PanD が PZA の標的の一つであることが証明されている¹¹⁾。

PZA 耐性関連遺伝子

PZase は結核菌の持つ 561 bp 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¹²⁾。また PZA 耐性化に関与する遺伝子変異はいくつか報告されているが、その多くは *pncA* 遺伝子の変異によるものである。しかしこの遺伝子変異は *pncA* 遺伝子全体に散らばって分布しており耐性の評価が単純ではない。また Miotto らは多剤耐性結核 1,142 株を含む結核菌 1,950 株について、*pncA* 遺伝子の配列変異を評価する大規模多施設試験の結果を報告している。その評価で同義置換を含めた約 10% の変異は PZA 耐性と全く関連していなかったが、*pncA* 遺伝子は PZA 耐性の信頼性の高い遺伝子変異マーカーで、その診断精度は 89.5-98.8% の範囲にあると報告している。Werngren らは、低頻度の変異がサンガーシーケンスで見逃されることがあるため、8/26 (30.7%) の *pncA* 遺伝子に変異を認めない PZA 耐性株が、ヘテロ耐性 (耐性菌と感受性菌の混合感染) と関連していることを示している。

PZA 耐性における *rpsA* の役割については、文献上でも広く議論されており、この遺伝子の役割を支持する論文と否定する論文とがある¹⁵⁾¹⁶⁾。いくつかの研究では *rpsA* は PZA 耐性に関与していないと考えられているが、臨床結核菌分離株における *rpsA* 変異と PZA 耐性との関連は依然として不明であり、この関係を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

PZA 耐性の機序としての *panD* 遺伝子の変異は、POA の作用点である PanD 酵素の活性部位を変化させ POA の親和性の低下を引き起こす。結核菌における *panD* 遺伝子変異の発生頻度は *pncA* 遺伝子変異に比べ少数ではあるが、臨床分離の PZA 耐性結核菌において報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。

Modlin ら¹⁷⁾ はスウェーデンで収集された PZA 単剤耐性菌 19 株について *pncA* 以外の PZA 耐性関連遺伝子として *panD*、*rpsA* および *clpC1* をロングリードシーケンスで解析している。このなかで ClpC1 蛋白における変異 (Val63Ala) が POA 依存的に PanD のタンパク質分解に関与しているとし、*clpC1* 遺伝子変異と PZA 耐性との関連を報告している。我々も *pncA* に変異を持たない PZA 耐性株のゲノム解析を行っているが、*clpC1* 遺伝子変異は検出されていない。*pncA* 遺伝子以外の PZA 耐性の遺伝子変異マーカーについては、現在も議論的となっておりさらなる研究が必要であると考え

表 3. Diagnostic performance of LiPA in comparison with drug susceptibility testing

Antituberculosis drug (strip used in LiPA ^c)	Clinical isolates		Clinical samples (sputa)	
	Sensitivity ^a	Specificity ^b	Sensitivity ^a	Specificity ^b
RIF (NTM/MDR-TB strip)	98.9 (87/88)	97.3 (220/226)	100 (3/3)	100 (52/52)
INH (INH strip)	90.6 (125/138)	100 (176/176)	75.0 (3/4)	92.9 (39/42)
INH (NTM/MDR-TB strip)	61.6 (85/138)	100 (176/176)	50.0 (3/6)	97.8 (45/46)
PZA (PZA strip)	89.7 (52/58)	96.0 (240/250)	100 (4/4)	100 (52/52)
LVX (FQ strip)	93.0 (53/57)	100 (146/146)	100 (7/7)	100 (48/48)

^a Data are percentages (no. of drug-resistant samples by LiPA/no. of drug-resistant samples by DST).

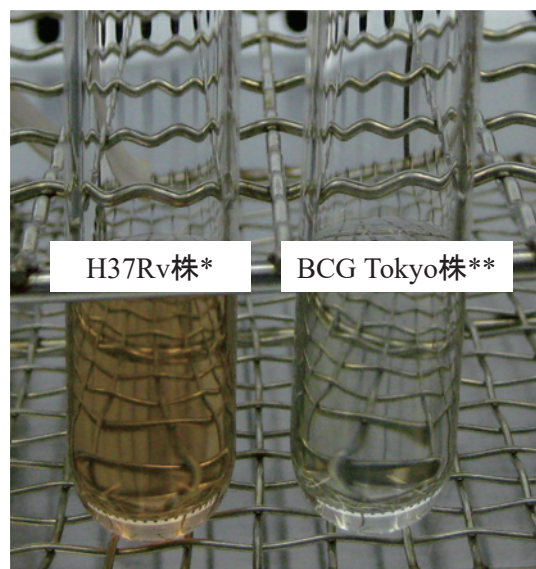
^b Data are percentages (no. of drug-susceptible samples by LiPA/no. of drug-susceptible samples by DST).

^c LiPA was performed using four strips, namely, NTM/MDR-TB, INH, PZA, and FQ strips (see the supplemental material). The NTM/MDR-TB strip was designed to identify four *Mycobacterium* species and to detect mutations associated with RIF resistance and INH resistance (C-15T and T-8C mutations in *P_{fabG1}-inhA* and S315T and S315N mutations in *katG*). The INH, PZA, and FQ strips were designed to detect mutations associated with INH, PZA, and FQ resistance of *M. tuberculosis*, respectively. The corresponding regions and mutations for each probe are shown in Table S1 in the supplemental material. The INH strip covered 46 regions of the following *M. tuberculosis* genes: *P_{fabG1}-inhA*, *inhA*, *fabG1*, *furA*, and *katG* (3). The PZA strip covered *pncA* (40), and the FQ strip covered *gyrA* (4).

文献 21 より引用

表 4. ピラジナミダーゼ簡易測定法 (培養陽性を示し結核菌の同定を確認した MGIT チューブから)

- ① 培養陽性を示した MGIT チューブに PZA 液 (8.4 mg/mL) 0.5 mL を添加 (MGIT チューブの PZA 濃度は 500 µg/mL)
- ② PZA 添加 MGIT チューブを 37℃ でさらに 1 週間培養 (培養中に数回転倒混和)
- ③ 1 週間後に培養液 4 mL を吸光度測定用試験管にとる
- ④ 培養液を入れた試験管で吸光度計を 0 合わせをする
- ⑤ 0.4 mL (1/10 量) の 1% 硫酸鉄アンモニウム水溶液 (用事調整) を加え混和
- ⑥ 約 30 秒後に吸光度を測定



*H37Rv株: ピラジナミダーゼ陽性, 吸光度0.35

**BCG Tokyo 株: ピラジナミダーゼ陰性, 吸光度0.05

図 3. ピラジナミダーゼ簡易測定法の結果

えられる。

PZA 薬剤感受性検査の問題点

MGIT を用いた PZA 薬剤感受性試験の結果と, PZase および *pncA* 遺伝子変異の結果との間で乖離する例が報告されている^{6,19)}。また我々は市販の PZA 薬剤感受性試験 2 法を評価し, PZA 薬剤感受性試験の精度上の問題点を指摘している²⁰⁾。この問題点は, PZA の薬剤感受性試験法で偽耐性が多いことを示している。さらに日本国内での PZA の薬剤感受性試験精度の現状を明らかにするため, PZA 感受性試験の外部精度評価を実施した。結果として感度は 96.6% (95% CI: 87.4-99.4%) であったが, 特異度が 64.3% (95% CI: 50.8-76.0%) となり (表 2), 一般検査室でも偽耐性が極めて多く認められることが明確となった²¹⁾。実際の臨床に置き換えると, 偽耐性情報を受けて PZA を中止された患者は治療期間を延長され, さらに再発率も増大するという直接的不利益を被ることとなる。

pncA 遺伝子変異を検出するキットに Line Probe 法 (ニプロ) があり, 我が国における多施設評価 (表 3) で感度 89.7%, 特異度 96.0% を示しその有用性を報告している²²⁾。この中で *pncA* G162S, D17D および G132D 変異は PZA 耐性に関与しないことを報告している。また PZase 陽性で *pncA* に変異を認めず PZA 耐性の株の存在を示しておりキットの限界としている。また PCR を原理とするキットの限界として, *pncA* 遺伝子を含めた数千 bp 規模の大規模欠失による PZA

耐性が報告されている⁶⁾²³⁾。この場合は *pncA* 遺伝子を増幅するプライマー結合部位を含めた欠失の可能性があり、PCR の増幅産物が得られずキットとして判定保留となり結果が得られない可能性がある。

PZA 薬剤感受性試験の今後の動向

PZA 薬剤感受性試験には偽耐性が多く確認させる。結核菌の PZA 耐性と最も相関性の高い PZA 関連遺伝子は *pncA* 遺伝子であり、この *pncA* 遺伝子の変異と非常に良く相関する試験がピラジナミダーゼ試験である⁶⁾²⁴⁾。しかし従来のピラジナミダーゼ試験は大量の結核菌 (10 mg 程度) を必要とし、判定も目視で行うなど、その操作性・安全性に問題がある。我々は培養陽性となった液体培地から直接にピラジナミダーゼ活性を、吸光度を用いて数値化して測定する方法 (表 4) (図 3) を報告しており²⁵⁾、PZA 薬剤感受性試験と比べ反応自体が安定しており、偽耐性を認めることはほとんどなく手技も簡便であることから、臨床検査への導入も可能と考えている。

全ゲノム解析の利用には多くの菌量を必要とするため、培養株を用いる必要があり検体から直接の利用は難しく、一般臨床検査への応用には至っていない。しかし近年マルチプレックス PCR を基礎として複数の薬剤耐性遺伝子を同時に増幅し、これを次世代シーケンサーでディープシーケンスする Deeplex[®] Myc-TB (GenoScreen, France) が開発され、臨床材料から直接に 12 系統の主要な薬剤耐性関連遺伝子を同時に解析可能とされている。PZA 関連遺伝子としては *pncA* が用いられており DLM, LZD および BDQ などの新薬を含めた迅速な耐性結核の診断を実現している²⁶⁾。

我々は遺伝子変異によらず菌自体の活性が菌の PZA に対する MIC を変動させる現象をとらえており、この揺れ幅が薬剤感受性試験結果に影響することを確認している。いかなるゲノム変異もなく、エビジェネティックな耐性機序を示唆する結果である。このことは薬剤感受性試験の条件設定が試験結果に影響するということであり、これは PZA のみに限らず他の薬剤でも同様に起こりうる。患者に投与された薬剤の臨床効果をより正確に予測できる方法を見つけ出すためには、あらゆる方向からのアプローチが必要になる。

ま と め

PZA の作用機序は PanD 酵素の補酵素 A の生成を POA が阻害することにより生じるとする説が有力である。PZA 耐性機序の中心は *pncA* 遺伝子変異であるものの *panD*, *rpsA* および *clpC1* など複数の遺伝子の関与が報告されている。しかし *pncA* 以外についてはさらなる研究の必要性が求められている。PZA に関するこれまでの多くの報告は、結核菌の PZA 感受性検査に関連する複雑さと課題を示しており、現時点で PZA 耐性を正確に確認するためには、遺伝子型と PZase 試験を含めた表現型の薬剤感受性試験を組み合わせることが必要であると考ええる。

利益相反：申告すべき利益相反はなし

文 献

- 1) 結核予防会編. 2021. 結核の統計 2021 結核予防会, 東京.
- 2) 日本結核病治療委員会. 2018. 「結核医療の基準」の改訂—2018 年. 結核 93: 61-68.
- 3) 日本結核 非結核性抗酸菌症学会治療委員会. 2020. 本邦での多剤耐性結核治療に対する考え方. 結核 95: 79-84.
- 4) 堀田信之, 宮沢直幹. 2015. 結核患者に対するピラジナミド投与と薬剤性肝障害. 結核 90: 401-405.
- 5) Whitfield, MG, HM Soeters, RM Warren, T York, SL Sampson, EM Streicher, PD van Helden, A van Rie. 2015. A global perspective on pyrazinamide resistance: systematic review and meta-analysis. PLoS One 10: e0133869.
- 6) Aono, A, K Chikamatsu, H Yamada, et al. 2014. Association between *pncA* Gene Mutations, Pyrazinamidase Activity, and Pyrazinamide Susceptibility Testing in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother 58: 4928-4930.
- 7) McDermott, W, R Tompsett. 1954. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments in vitro. Am. Rev. Tuberc. 70: 748-754.
- 8) 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.
- 9) Zhang, Y., A. Scorpio, H. Nikaido, et al. 1999. Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide. J. Bacteriol. 181: 2044-2049.
- 10) Dillon, N.A., N.D. Peterson, H.A. Feaga, et al. 2017. Antitubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA. Sci. Rep 7: 6135.
- 11) Gopal, P., M. Yee, J. Sarathy, et al. 2016. Pyrazinamide Resistance Is Caused by Two Distinct Mechanisms: Prevention of Coenzyme A Depletion and Loss of Virulence Factor Synthesis. ACS Infect. Dis. 2: 616-626.
- 12) 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.
- 13) Miotto, P, AM Cabibbe, S Feuerriegel, et al. 2014. *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. mBio 5: e01819-14.
- 14) Werngren, J, E Alm, M Mansjö. 2017. Non-*pncA* gene-mutated but pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: why is that? J Clin Microbiol 55: 1920-1927.
- 15) Shi, W, P Cui, H Niu, et al. 2019. Introducing RpsA point mutations D438A and D123A into the chromosome of *Mycobacterium tuberculosis* confirms their role in causing resistance to pyrazinamide. Antimicrob Agents Chemother 63: e02681-18.
- 16) Vallejos-Sánchez, K, JM Lopez, R Antiparra, et al. 2020. *Mycobacterium tuberculosis* ribosomal protein S1 (RpsA) and variants with truncated C-terminal end show absence of interaction with pyrazinoic acid. Sci Rep 10: 8356.
- 17) Modlin, SJ, T Marbach, J Werngren, et al. 2021. Atypical genetic basis of pyrazinamide resistance in mono-resistant

- Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 65: e01916-20.
- 18) Mok, S., E. Roycroft, PR. Flanagan, et al. 2021. Overcoming the challenges of pyrazinamide susceptibility testing in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy 65 (8): e02617-20.
 - 19) Louw, GE, RM Warren, PR Donald, et al. 2006. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 10 (7): 802-807.
 - 20) 青野昭男, 近松絹代, 五十嵐ゆり子, 他. 2015. Pyrazinamide 薬剤感受性試験法の評価. 日臨微誌 25: 50-55.
 - 21) 御手洗聡, 山田博之, 青野昭男, 他. 2017. 結核菌の pyrazinamide 感受性試験に関する外部精度評価. 結核 92: 519-527.
 - 22) 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 Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol 50: 884-890.
 - 23) 小林昌弘, 本木裕也, 青野昭男, 他. 2021. *pncA* 遺伝子の全欠損による PZA 単剤耐性肺結核. 感染症雑誌 95: 343-347.
 - 24) Wayne, LG. 1974. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis 109: 147-151.
 - 25) Aono, A, K Chikamatsu, H Yamada. 2018. A simplified pyrazinamidase test for pyrazinamide drug susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Microbiol. Methods 154: 52-54.
 - 26) Feuerriegel, S., T.A. Kohl, C. Utpatel. 2020. Rapid genomic first- and second-line drug resistance prediction from clinical *Mycobacterium tuberculosis* specimens using DeepL[®]-MycTB. European Respiratory Journal 2001796. <https://doi.org/10.1183/13993003.01796-2020>.

Pyrazinamide drug susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*

Akio Aono

Department of Mycobacterium Reference and Research, the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

The incidence of tuberculosis (TB) in Japan is 10.1 per 100,000 population in 2020, and it remains one of the most important infectious diseases in public health. Chemotherapy for TB is generally a combination of multiple drugs, and pyrazinamide (PZA) plays an important role in the standard of care and in the treatment of multidrug-resistant TB. PZA is a prodrug that is converted to pyrazinoic acid (POA) by pyrazinamidase (PZase), an enzyme possessed by *Mycobacterium tuberculosis*, and exhibits antibacterial activity. The antimicrobial activity of PZA is strongly influenced by pH and increases in the acidic range of pH 5.0 to 5.5. The *pncA* is the main gene involved in PZA resistance. In addition, *panD*, *rpsA*, and *clpC1* have been reported as potential responsible genes. A test that correlates very well with mutations in the *pncA* gene is the PZase test. We have reported a simple method to measure PZase activity quantitatively using absorbance. We believe that this method can be introduced into clinical practice because of its simplicity and ease of use. Many false resistances have been reported in the PZA drug susceptibility testing. We believe that a combination of genotypic and phenotypic drug susceptibility testing is necessary to more accurately assess PZA resistance.