

多剤耐性結核菌における Rifampicin と Rifabutin の交差耐性の検討

近松 絹代 水野 和重 山田 博之 御手洗 聡

要旨:〔目的〕多剤耐性結核菌 (MDR-TB) に対する Rifampicin (RFP) と Rifabutin (RBT) の交差耐性を評価すること。〔方法〕2002年度に実施された結核療法研究協議会による耐性結核菌調査において収集されたMDR-TB 44株と、全感受性結核菌97株について、CLSI M24-Aに記載された方法に従ってRFPとRBTの感受性検査を実施した。また、Rifamycin耐性に関連する *rpoB* の81 bpの遺伝子領域をシーケンスし、変異を解析した。〔結果〕MDR-TB 44株中、RBTに交差耐性を示したのは32株 (72.7%) であった。*rpoB* の変異は43株 (97.7%) に認められ、RBT耐性株ではcodon 526あるいは531にアミノ酸置換が認められたが、codon 531にアミノ酸置換があった株のうち2株はRBTに感受性であった。その他のRBT感受性株ではcodon 506-508の欠失、511、512、516でのアミノ酸置換が認められた。全感受性の97株については、RBTもすべて感受性であった。〔考察〕MDR-TBに対してRBTが有効である可能性が約27%あることが示された。MDR-TBに対するRBTの感受性検査を一般の検査室で実施することは、労力や施設基準の面で困難である。*rpoB* の遺伝子変異解析によって高精度にRBT感受性を予測することが可能であり、遺伝子解析の臨床的有用性が高いと考えられた。

キーワード: Rifampicin, Rifabutin, 多剤耐性結核菌, *rpoB*

目 的

薬剤感受性結核菌感染が一般的に6~9カ月の標準療法によって治癒するのに対して、薬剤耐性を有する結核菌の感染の場合、一般に治療期間が長くなるとともに治療効果も減少する。特に多剤耐性結核菌に感染すると基本的に1952年のIsoniazid (INH) 導入以前の治療法となり、効率的な治癒が期待できなくなる。

多剤耐性結核の治療については、現在さまざまな新薬の開発が進んでいる¹⁾。日本では1973年のRifampicin (RFP) 導入以来新しい抗結核薬が認められていなかったが、2008年7月に同じRifamycin系の薬剤であるRifabutin (RBT) (ミコブテイン®) の製造販売が承認された。RBTはRFP耐性の結核菌に対しても有効である可能性が示されており、RFPが使用できない場合の代替薬剤としての期待が高い。今回、われわれは多剤耐性結核菌 (Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: MDR-

TB) に対するRBTの感受性状況を明らかにすることを目的として研究を実施した。

方 法

対象としたMDR-TBは、2002年度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で収集された44株を使用した。これらの株については、1%小川培地を用いた標準的比率法によりMDR-TBであることを確認している。また、薬剤耐性をもたない臨床分離結核菌97株も対象とした。感受性検査はCLSI M24-A (Clinical and Laboratory Standards Institute) に記載された方法に従い、Middlebrook7H10 (Becton Dickinson, MD, USA) にOADCエンリッチメント (Becton Dickinson, MD, USA) を添加した培地を用い、耐性比率1%、薬剤濃度RBT 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、RFP 1.0 $\mu\text{g/ml}$ を基準濃度として実施した。RBTについてはファイザーより源末の供与を受けた。

結 果

MDR-TBについては *rpoB* 遺伝子のうち Rifampicin Resistance Determining Region (RRDR) の81 bpを増幅するようプライマーを設計し²⁾, PCR産物について BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) および ABI3137 automatic sequencer (Applied Biosystems) によりダイレクトシーケンシングを実施し, *rpoB* の遺伝子変異を特定した。

MDR-TB 44株の薬剤感受性検査結果とアミノ酸変異について Table に示した。MDR-TB 44株はすべて RFP 耐性であり, そのうち12株 (27.3%) が RBT について感受性であった。MDR-TB 44株中43株 (97.7%) について, RRDR に遺伝子変異が認められた。97株の RFP 感受性菌について, RBT はすべて感受性であった。

考 察

今回日本全国から収集された MDR-TB を含む結核菌 141 株について RFP と RBT の薬剤感受性検査を実施し, 交差耐性について検討した。*rpoB* の RRDR 領域内における遺伝子変異は97.7%に認められており, これまでの報告^{2)~4)}と同様であった。Yang ら⁵⁾は codon 513 あるいは 531 にアミノ酸変異を有する RFP 耐性結核菌は RBT にも耐性であるが, codon 516, 529 のアミノ酸変異, codon 518 の欠失, codon 514 へのアミノ酸挿入では RFP 耐性であっても RBT 感受性であると報告している。Senol ら⁶⁾はトルコでの分離株を対象にした研究で73.1%の RBT/RFP 交差耐性を報告しており, Balabanova ら⁷⁾はロシアでの分離株について同様に交差耐性88.2%を報告している。今回のわれわれの研究では, RFP と RBT の交差耐性率は72.7%であり, これらの報告とほぼ同じと考えられた。また, RFP 耐性・RBT 感受性の12株のうち10株では codon 506-508 での欠失, 511, 512 あるいは 516 でのアミノ酸変異が認められ, codon 526 あるいは 531 に変異を有する株は2株のみであった。一方 codon

526 あるいは 531 に変異を有する34株については, 2株を除いて RBT でも耐性と判定され, Yang ら⁵⁾の報告と同様であった。

今回の研究により, MDR-TB の治療を行ううえで RBT が有効である可能性が約30%あることが示された。RBT の有効性を評価するためには薬剤感受性検査を実施する必要があるが, MDR-TB に対する RBT の薬剤感受性検査を一般の検査室で実施することは, 労力や施設基準の面で容易であるとは言えない。感染症法による特定三種病原体である MDR-TB を移動 (輸送) することも困難であるため, 感受性検査の実施が困難と思われるが, 今回の研究を含めて示されているように *rpoB* の遺伝子変異解析によって高精度に RBT 感受性を予測することが可能であり, 遺伝子解析の臨床的有用性が高いと考えられた。

謝 辞

本研究に当たり, 結核療法研究協議会の2002年度耐性結核菌調査において収集された多剤耐性結核菌を使用させて頂きました。菌の収集に御協力いただいた結核療法研究協議会委員の方々に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 土井教生: 次世代の抗酸菌化学療法の展望. 結核. 2009; 84: 133-140.
- 2) Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al.: Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 2380-2386.
- 3) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993; 341: 647-650.
- 4) 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.
- 5) Yang B, Koga H, Ohno H, et al.: Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and

Table Rifampicin/Rifabutin susceptibility, and corresponding *rpoB* mutations in MDR-TB isolates

Strain No.	Rifampicin	Rifabutin	Position of amino acid and substitution
1 (1)	Resistant	Susceptible	L511P, D516A
2, 3 (2)	Resistant	Susceptible	L511P, D516G
4-7 (4)	Resistant	Susceptible	D516V
8 (1)	Resistant	Susceptible	L511P, S512G
9 (1)	Resistant	Susceptible	506-508 (deletion)
10 (1)	Resistant	Susceptible	none
11, 12 (2)	Resistant	Susceptible	S531L
13 (1)	Resistant	Resistant	H526Y
14, 15 (2)	Resistant	Resistant	H526D
16-44 (29)	Resistant	Resistant	S531L

- KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother. 1998 ; 42 : 621–628.
- 6) Senol G, Erbaycu A, Ozsöz A : Incidence of cross resistance between rifampicin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* strains in Izmir, Turkey. J Chemother. 2005 ; 17 : 380–384.
- 7) Balabanova Y, Ruddy M, Hubb J, et al. : Multidrug-resistant tuberculosis in Russia : clinical characteristics, analysis of second-line drug resistance and development of standardized therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005 ; 24 : 136–139.

Short Report

**CROSS-RESISTANCE BETWEEN RIFAMPICIN AND RIFABUTIN
AMONG MULTI-DRUG RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS**

Kinuyo CHIKAMATSU, Kazue MIZUNO, Hiroyuki YAMADA, and Satoshi MITARAI

Abstract [Objective] To compare the susceptibility of rifampicin (RFP) and rifabutin (RBT) against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB).

[Method] A total of 44 confirmed MDR-TB strains collected by Ryoken consortium and 97 susceptible *M. tuberculosis* strains were tested for the susceptibility to RBT, following CLSI M24-A laboratory standard. The core 81 bp region of *rpoB* gene was sequenced for MDR-TB strains, and the mutations were defined.

[Results] Among the 44 MDR-TB strains tested, 12 strains were susceptible to RBT. The genetic alterations were identified in 43 of 44 MDR-TB strains. The RBT susceptible strains had alterations mainly at codons 506–508, 511, 512, and 516. The mutation at codons 526 and 531 closely related to RBT resistance with two exceptions. The overall cross-resistance between RFP and RBT was 72.7%.

[Discussion] RBT will be a candidate drug for the treatment of MDR-TB. In this study, approximately 27% of MDR-TB in Japan had susceptibility to RBT. However, the drug suscep-

tibility testing for RBT is not easy at general microbiology laboratory considering the preparation of medium and laboratory facilities. It is also difficult to transfer confirmed MDR-TB strains to one place to another for testing legally. The mutations at codons 526 and 531 in *rpoB* are closely related to RBT resistance and will be useful to predict its susceptibility.

Key words : Rifampicin, Rifabutin, Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *rpoB*

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

Correspondence to: Kinuyo Chikamatsu, Bacteriology division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: chikamatsu@jata.or.jp)