

## 結核菌における薬剤耐性遺伝子変異検出の有用性の検討

安中 めぐみ<sup>a</sup>, 久保田 寛顕<sup>a</sup>, 長谷川 乃映瑠<sup>a</sup>, 伊藤 仁<sup>a</sup>, 小林 甲斐<sup>a</sup>, 森 功次<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>b</sup>, 千葉 隆司<sup>b</sup>

結核の治療は4剤以上の多剤併用で行われることが標準的であり、患者検体から菌が分離された場合は治療薬剤に対する薬剤感受性を把握することが求められる。本検討では、二週間から三週間を必要とする薬剤感受性試験の判定に先立ち、分離菌の遺伝子解析により治療薬剤に対する耐性の有無が判定できるかについて、ゲノム解析を用いて検出される薬剤耐性遺伝子変異と培養による薬剤感受性試験の結果との比較により行った。検討には2019年度から2023年度にかけて積極的疫学調査において搬入された255株の結核菌を供試した。薬剤耐性変異の検出に対する薬剤感受性試験の耐性・感性を判断する根拠となる感度、特異度を算出したところ、感度は58%から100%、特異度は91%から100%の範囲と薬剤により異なる結果を示した。例として、ピラジナミドでは58%という著しく低い感度となった一方、リファンピシンでは薬剤耐性変異と薬剤感受性が完全に一致し、感度、特異度ともに100%という結果を得た。以上のことから、一部の薬剤に対しては薬剤感受性試験の結果は薬剤耐性変異の検出により迅速に推定できると考えられるが、ピラジナミドをはじめ全ての薬剤に対して一様に適用するにはさらなる検討が必要であると考えられた。

**キーワード**：結核，薬剤感受性試験，薬剤耐性変異，次世代シーケンサー，ゲノム解析

### はじめに

結核は二類感染症として全数把握疾患に指定されている感染症であり、東京都健康安全研究センターでは積極的疫学調査の一環として、都内保健所から搬入された結核菌株について検査を実施している。

結核の治療は、4剤以上の多剤併用で行われることが標準的であり、その方法は厚生労働省による告示「結核医療の基準」<sup>1)</sup>で示され、改正が重ねられてきた。同告示では、治療開始時には培養検査を含む結核菌検査を行い、対象とする病変が結核菌によるものであることを確認するとともに、培養検査陽性の場合には薬剤感受性検査を行うことが記されている。

細菌の薬剤感受性試験は、薬剤の存在下で菌の発育を調べることで行われる。一日でコンフルエントになる大腸菌や腸球菌などと比較し、結核菌の発育は遅く、薬剤感受性の判定には二週間から三週間の期間を要する。この期間を短縮する方策として、近年、遺伝子解析により薬剤耐性変異の有無を検索する方法が期待されている<sup>2)</sup>。本検討では、次世代シーケンサー（NGS）を用いたゲノム解析により薬剤耐性変異に関連する領域について網羅的な塩基配列の蓄積を行い、薬剤感受性試験の結果と比較することで、その有用性を評価することを試みた。

### 実験方法

#### 1. 供試結核菌株

2019年度から2023年度にかけ、東京都健康安全研究セン

ターに搬入された結核菌株のうち、薬剤感受性試験を実施した255株を対象とした。

#### 2. 薬剤感受性試験

結核菌感受性PZA液体培地（極東製薬工業）により、ピラジナミド（PZA）の薬剤感受性を判定した。加えて、結核菌感受性ビットスペクトルSR（極東製薬工業）により、リファンピシン（RFP）、イソニアジド（INH）、エタンブトール（EB）、ストレプトマイシン（SM）、レボフロキサシン（LVFX）、カナマイシン（KM）、エチオナミド（TH）の薬剤感受性についてそれぞれ判定した。

#### 3. NGSによるデータ取得

界面活性剤存在下でジルコニアビーズ破碎を行った後、熱処理した結核菌株に対してRNase処理を施し、フェノールクロロホルム沈殿法または市販のDNA精製カラム（QIAquick column, キアゲン）を用いてDNAを精製した。次に、精製したDNAをもとにNextera XT Library Preparation Kit（イルミナ）を用いてライブラリ調製を行った後、MiSeq Reagent Kit v3（イルミナ）によって2×300塩基のfastqデータを取得した。

#### 4. 薬剤耐性変異の検出

Windows Subsystem for Linux（WSL）2上にインストールしたTB profiler<sup>3)</sup>（<https://github.com/jodyphelan/TBProfiler/>）により、取得したfastqデータを解析し、各薬剤の薬剤耐性

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

変異を検出した。

5. 薬剤感受性試験と薬剤耐性変異の比較

薬剤感受性試験により得られた各薬剤に対する判定結果を基準とし、これを薬剤耐性変異の検出により決定できるかという観点から比較を行った。薬剤耐性変異が検出された株のうち、薬剤感受性試験で耐性と判定された株数 (a) と感性和判定された株数 (b) , ならびに薬剤耐性変異が検出されなかった株のうち、薬剤感受性試験で耐性と判定された株数 (c) と感性和判定された株数 (d) からゲノム解析による判定の感度 $a/(a+c)$ , 特異度 $d/(b+d)$ , 偽陰性率 $c/(a+c)$ ,  $\kappa$  指数  $((a+d)/(a+b+c+d)-((a+c)/(a+b)+(b+d)/(c+d))/(a+b+c+d)^2)/(1-((a+c)/(a+b)+(b+d)/(c+d))/(a+b+c+d)^2)$  を算出した (表1) .

表1. 感度, 特異度の算出に使用する数値

供試薬剤		薬剤感受性試験		
		耐性	感性	合計
ゲノム解析における薬剤耐性変異の検出	あり	a	b	a+b
	なし	c	d	c+d
	合計	a+c	b+d	a+b+c+d

結果及び考察

1. 薬剤感受性試験とゲノム解析の比較結果

255の供試株において得られた薬剤感受性試験結果と薬剤感受性検出結果を表2から表9に示した。各薬剤に対する遺伝子変異の種類は区別せず集計した。

表2. RFPにおける集計結果

RFP		薬剤感受性試験		
		耐性	感性	合計
ゲノム解析における薬剤耐性変異の検出	あり	26	0	26
	なし	0	229	229
	合計	26	229	255

表3. INHにおける集計結果

INH		薬剤感受性試験		
		耐性	感性	合計
ゲノム解析における薬剤耐性変異の検出	あり	52	12	64
	なし	3	188	191
	合計	55	200	255

表4. EBにおける集計結果

EB		薬剤感受性試験		
		耐性	感性	合計
ゲノム解析における薬剤耐性変異の検出	あり	13	1	14
	なし	5	236	241
	合計	18	237	255

表5. PZAにおける集計結果

PZA		薬剤感受性試験		
		耐性	感性	合計
ゲノム解析における薬剤耐性変異の検出	あり	7	6	13
	なし	5	237	242
	合計	12	243	255

表6. SMにおける集計結果

SM		薬剤感受性試験		
		耐性	感性	合計
ゲノム解析における薬剤耐性変異の検出	あり	64	11	75
	なし	3	177	180
	合計	67	188	255

表7. LVFXにおける集計結果

LVFX		薬剤感受性試験		
		耐性	感性	合計
ゲノム解析における薬剤耐性変異の検出	あり	4	0	4
	なし	1	250	251
	合計	5	250	255

表8. KMにおける集計結果

KM		薬剤感受性試験		
		耐性	感性	合計
ゲノム解析における薬剤耐性変異の検出	あり	3	0	3
	なし	0	252	252
	合計	3	252	255

表9. THにおける集計結果

TH		薬剤感受性試験		
		耐性	感性	合計
ゲノム解析における薬剤耐性変異の検出	あり	7	22	29
	なし	2	224	226
	合計	9	246	255

表10. 感度・特異度・偽陰性・κ指数の算出結果

供試薬剤	感度 (%)	特異度 (%)	偽陰性率 (%)	既報偽陰性率 (%)	κ指数
RFP	100	100	0	3	1.00
INH	95	94	5	6	0.84
EB	72	100	28	3	0.80
PZA	58	98	42	15	0.54
SM	96	94	4	7	0.86
LVFX	80	100	20	ND	0.89
KM	100	100	0	18	1.00
TH	78	91	22	ND	0.33

## 2. 薬剤耐性変異検出の感度と特異度

表2から表9の数値を用いて算出した、薬剤耐性変異検出による薬剤感受性判定の感度、特異度と偽陰性率を表10に示した。感度、特異度は薬剤によって異なり、感度については58%から100%、特異度については91%から100%の範囲であった。また、過去の報告<sup>4)</sup>での偽陰性率を表10に併記した。

## 3. 遺伝子検査による薬剤感受性の判断の有用性

本検討の結果、供試した8薬剤のうち培養による薬剤感受性試験と薬剤耐性遺伝子の検出が一致したものはRFPとKMの2薬剤のみであった。実際、過去の報告<sup>4)</sup>でもRFPにおける薬剤耐性変異と薬剤感受性の高い一致率（感度97%、特異度100%）が示されており、同薬剤に対してはDNAシーケンスなどによる遺伝子検査によってその感受性を判断できると考えられた。その一方、本検討ではKMも感度、特異度ともに100%であったが、過去の同様の研究<sup>4)</sup>における成績は感度82%、特異度99%と差異がみられた。過去の同様の研究<sup>4)</sup>における耐性株数は11株あり、本検討における耐性株の少なさ（3株）がこの差異を生んだ可能性が考えられる。

さらに、PZAの感度は既報<sup>4)</sup>と同様に低く、58%に留まった。偽陰性率が42%と高い結果であったが、ピラジナミダーゼ（PZAse）活性低下による表現型耐性の可能性も考えられる。その一方、判定の一致の程度を示す指標のひとつであるκ指数は、 $1 \leq \kappa \leq 0.2$ でごく軽度の一致、 $0.2 \leq \kappa \leq$

$0.4$ で軽度の一致、 $0.4 \leq \kappa \leq 0.6$ で中軽度の一致、 $0.6 \leq \kappa \leq 0.8$ で高度の一致、 $0.8 > \kappa$ でほぼ完全な一致とされることから、PZAやTHといった一部の薬剤を除いて集計したデータとしては概ね良好であるように見えた。しかし、例えば感度、特異度ともに94%を超えるINHについて255株を検査した場合、少なくとも5%にあたる12株から13株については正確に薬剤感受性を判断できないことになった。広域的な薬剤感受性のトレンドをみるといった調査には有効と考えられるものの、ひとつひとつの検査依頼に対応する方法としては、あらかじめ5%の見落としがあるという前提で行わねばならず、不向きであると考えられた。

また、従来から複数の薬剤に対する薬剤感受性を同時に試験できるピットスペクトルSRといった試薬キットが販売されている一方で、PZAに関しては専用の試薬キットを用いて個別に実施する必要がある。このため、PZAについて遺伝子検査の導入は有効と考えられたが、本検討の結果が示す通り既報と比較しても偽陰性率が高く、現時点では遺伝子検査の実装は困難と考えられた。

## ま と め

結核菌の薬剤感受性試験を補完する方法として、薬剤耐性変異検出の有用性を検討した。結果として、薬剤耐性変異の検出は利点である迅速性が期待されたが、いくつかの薬剤では薬剤感受性試験との差異がみられ、活用していくにはさらなる検討が必要であると考えられた。

WHOが2021年1月から超多剤耐性結核菌（XDR-TB）の

定義を変更<sup>5)</sup>し、日本でも2023年5月にWHO定義に合わせた三種病原体等であるXDR-TBの定義が変更<sup>6)</sup>となった。しかし、現時点ではそれに合わせた検査キットが市販されていないため、一般の検査室では検査ができなくなっている。その点を踏まえ、対応した遺伝子検査の活用状況も変化していくと考えられ、さらなる検討が必要であると考えられる。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省, 結核医療の基準, 平成 19 年厚生労働省告示第 121 号
- 2) Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., *et al.*: *J. Antimicrob. Chemother.*, **73**, 1138–1151, 2018.
- 3) Coll, F., McNerney, R., Preston, M.D., *et al.*: *Genome Med.*, **7**, 51, 2015.
- 4) Guiqing, H., Qingyong, Z., Jichan, S., *et al.*: *Microbiol. Spectr.*, **12**, e03341-23, 2024.
- 5) WHO, Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27–29 October 2020, 2021, <https://iris.who.int/handle/10665/338776>  
(2025年8月8日現在. なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- 6) 厚生労働省, 「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律等の一部を改正する法律」の一部の施行等について(通知), 令和 5 年厚生労働省健康局長通知, 健発 0526 第 4 号

**Examination of the Usefulness of Identified Drug Resistance-Associated Mutations in *Mycobacterium tuberculosis***

Megumi ANNAKA<sup>a</sup>, Hiroaki KUBOTA<sup>a</sup>, Noeru HASEGAWA<sup>a</sup>, Hitoshi ITO<sup>a</sup>, Kai KOBAYASHI<sup>a</sup>, Kohji MORI<sup>a</sup>,  
Kenji SADAMASU<sup>a</sup>, and Takashi CHIBA<sup>a</sup>

More than four antimicrobial agents are typically used to treat tuberculosis. However, antimicrobial susceptibility testing (AST) must be performed in parallel for *Mycobacterium tuberculosis* isolated from clinical specimens. In this study, we investigated whether AST results, which typically require 2–3 weeks, could be predicted through genetic analysis by identifying antimicrobial resistance-associated mutations. Using whole-genome sequencing, we comprehensively detected these mutations and compared the findings with AST results for 255 *M. tuberculosis* isolates collected between FY2019 and FY2023 in Tokyo, Japan. The sensitivity and specificity of genetic identification in predicting AST results varied depending on the antimicrobial agents, with the sensitivity ranging from 58% to 100%, and the specificity ranging from 91% to 100%. Notably, sensitivity for pyrazinamide was only 58%, whereas the results for rifampicin were fully consistent between both methods. We concluded that genetic identification of antimicrobial resistance is applicable to certain antimicrobial agents; however, further research is required before it can be reliably applied to all drugs, including pyrazinamide.

**Keywords:** tuberculosis, antimicrobial susceptibility testing, mutations, next generation sequencer, genomic analysis

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan