

23. HRM（高解像度融解曲線）解析を用いた結核菌の薬剤耐性迅速診断法

○永井佑樹（所属：三重県保健環境研究所）

山口哲夫（旧所属：三重県保健環境研究所）

【要約】

結核菌の薬剤耐性検出には、感受性試験の実施が不可欠であるが、結核菌は増殖速度が遅く結果を得るのに時間を要する。そこで今回、迅速な薬剤耐性の遺伝子診断方法として、real-time PCR を用いた HRM (High Resolution Melting) 解析により、結核菌の薬剤耐性を検出できるかどうかを検討した。その結果 *rpoB* では A516V、H526A、H526T、S531L、A516G / S531L、*katG* では S315T、S315A、*mab-inhA* では -15C / T、-8T / C、*embB* では M306I、*rpsL* では K88Q、K43R の薬剤耐性に関与する変異を検出することができ、シーケンス解析の結果とも一致した。今回実施した HRM 解析は、低コストで迅速、簡便な方法であり多検体の検出も可能となることから薬剤耐性を検出するのに有用な方法であると考えられる。

【目的】

結核は、現在でも公衆衛生上重要な問題となる感染症の一つであるが、中でも多剤耐性結核菌 (MDR-TB) の拡大や超多剤耐性結核菌 (XDR-TB) の出現は、診断、治療、感染拡大防止等のあらゆる側面において深刻な問題であり、世界的にも結核対策の脅威となっている¹⁾。結核菌の薬剤耐性検出には、感受性試験が不可欠であるが、結核菌は増殖が遅く、感受性試験の結果を得るのに時間を要することから、より迅速な試験法の開発が求められている。また結核菌の薬剤耐性は、特定の染色体遺伝子の突然変異によるものとされており、これまでに、プラスミドやトランスポゾンといった可動性遺伝因子 (mobile genetic element) による耐性化は報告されていない。そこで、この薬剤耐性に関連する遺伝子の変異を検出することにより、薬剤耐性を検出する試みがなされているが、今回、迅速な薬剤耐性の遺伝子診断方法として real-time PCR を用いた HRM 解析により結核菌の薬剤耐性を検出できるかどうかを検討した。

【材料と方法】

1. 検体

結核菌検査を実施している病院から分与された臨床分離株を 2% ビット培地で培養後、ISOPLANT (NIPPON GENE) により DNA 抽出を行い検体とした。また DNA sample の No.14-10、14-11、14-8、15-18、14-7、2X-1-14 に関しては、結核研究所から提供され

たものを使用した。さらに Validation test を実施するため、臨床分離株 40 株（菌株 No.2011029～2011068）を blind sample として使用した。

2.DNA 増幅およびシーケンス解析

ターゲットとする領域は rifampicin (RIF) 耐性に関与する *rpoB*、isoniazid (INH) 耐性に関与する *katG*、*mab-inhA*、ethambutol (EB)耐性に関与する *embB* および streptomycin (SM) 耐性に関与する *rpsL*、*rrs*を対象とした。PCR でこれらの領域を増幅した後、その増幅産物を QIA quick PCR purification Kit (Qiagen)を用いて精製し、シーケンス反応用テンプレートとした。シーケンスは BigDye Terminators v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用し、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。データの解析は GENETYX software ver8 (Genetyx)を用いて実施し、H37Rv とのアライメントにより薬剤耐性に関連する変異の有無を判定した。

3.HRM 解析

HRM 解析のための primer は、Primer3 software および LightCycler Probe Design Software 2.0 (Roche Diagnostics) を用いて設計した²⁾。また PCR の精度を高めるため増幅産物のサイズは 300bp 以下とし、HPLC 精製 grade の primer を使用した。Real-time PCR は全て LightCycler480 (Roche Diagnostics)を用いて実施し、HRM Master Kit (Roche Diagnostics) により反応液を調製した。HRM 反応には、2×HRM Master 10 μ l、Forward, Reverse primer (10 μ M) 各 0.4 μ l、MgCl₂ (25mM) 2.4 μ l、PCR grade water 2.8 μ l、template DNA 2 μ l を混合し反応液とした。Real-time PCR で増幅後のデータ解析は、LightCycler 480 Gene Scanning Software Version 1.5 (Roche Diagnostics) を用いて実施し、薬剤耐性に関連する変異を検出できるかどうか検討した。

【結果】

HRM 解析の結果、*rpoB*では A516V (GAC→GTC)、H526A (CAC→GAC)、H526T (CAC→TAC)、S531L (TCG→TTG)の検出が可能となり、さらに S531L (TCG→TTG)と A516G (GAC→GGC)の double mutation を含む検体も有意に分離することができた(Fig 1A)。また *katG*では S315T (AGC→ACC)、S315A (AGC→AAC)、*mab-inhA* では-15C / T、-8T / C の変異をそれぞれ検出することができ INH 耐性に関する主要な変異の検出も可能であった(Fig 1B,C)。さらに *embB*では EB 耐性に関与する M306I の変異を検出することができ (Fig 1D)、同様に *rpsL*では、K88Q (AAG→CAG)、K43R (AAG→AGG)、*rrs*では 513A / C の変異をそれぞれ検出することが可能となった(Fig 1E,F)。HRM 解析と感受性試験との比較では、INH および SM でそれぞれ 1 検体ずつ相違した結果がみられたが (data not shown)、HRM 解析とシーケンス解析との比較では全て一致した結果が得られた

(Table1)。

さらに blind sample の 40 検体を用いて HRM 解析により validation を実施した結果、*rpsL* で K88R (AAG→AGG)、K43R (AAG→AGG)、*katG* で S315T (AGC→ACC)、*mab-inhA* で-15C / T の変異を持った 4 検体をそれぞれ検出することができ、感受性試験およびシーケンス解析の結果とも一致していた(data not shown)。また HRM 解析で wild type すなわち陰性と判定された検体は、シーケンス解析の結果、今回の HRM 解析でカバーできる領域内での mutation は確認されなかった。

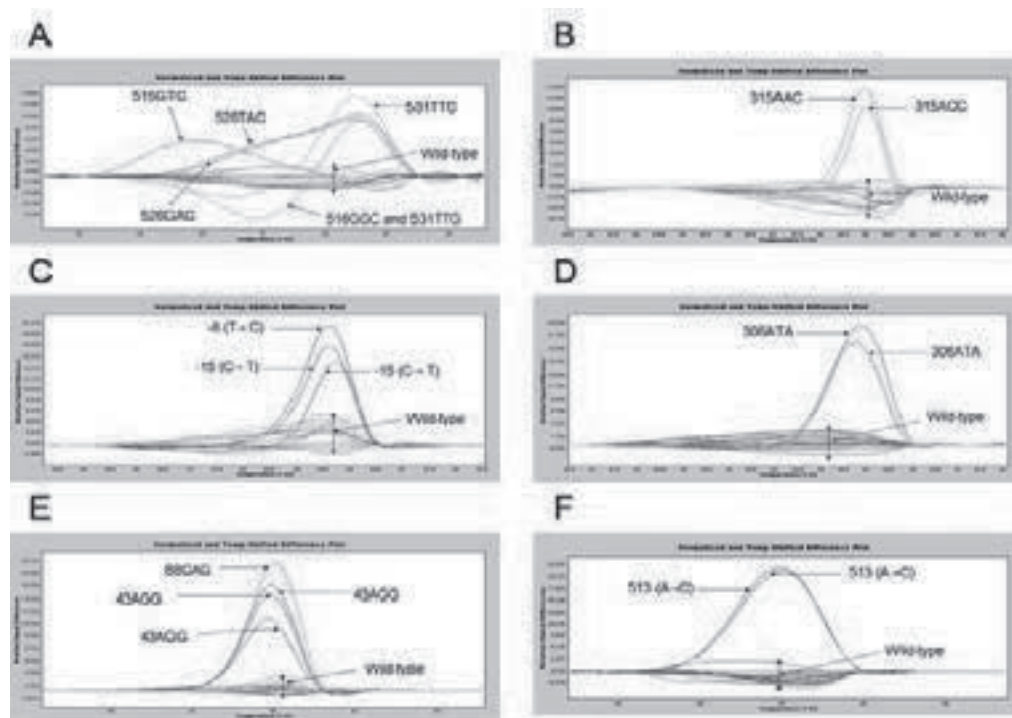


Fig.1 The difference plot curves of *rpoB* (A), *katG* (B), *mab-inhA* (C), *embB* (D), *rpsL* (E), and *rrs* (F).

【今後の展望】

結核菌では RFP 耐性株の約 95%以上に *rpoB* の異常が認められ、特に Hot spot と呼ばれる codon507 から 533 の領域に変異が集中してみられることがわかっている³⁾。そのため現時点では遺伝子的早期耐性診断の有用性が最も高いとされるが、今回使用した primer set は hot spot を全てカバーしており、RRDR (RFP resistant determining region) 内の変異を検出するのに有用な方法と考えられる。また結核菌の INH 耐性は主に *katG* と *inhA* の promoter 領域 (*mab-inhA*) の変異が関与しているとされており、その中でも *katG* では codon315 の変異が最も多く、*inhA* の promoter 領域である *mab-inhA* では -24、-16、-8、-15 の変異が多いとされている⁴⁾。一方、EB 耐性には *embAB* の変異が関わっていると考えられており、その中でも *embB* の codon 306 の変異が最も多く、MDR-TB との関連性も指摘されている^{5,6)}。そのため重要な分子 indicator とされる *embB306* を検出できる本法は非常に有用性が高いと考えられる。また SM 耐性には主に *rpsL* と *rrs* が関与

しており、*rpsL*では codon 43 の Lys から Arg への変異が最も多く、主に SM の高度耐性への関与が報告されている。*rrs*では 513A / C の変異が多く、SM の低レベルあるいは中レベルの耐性に関与しているとされており、本法では、SM 耐性に関与する *rpsL* および *rrs* 内で最も頻度の高い mutation を検出することが可能となった。上記の他にも結核菌の薬剤耐性と遺伝子変異との関連性については数多く報告されているが、今回の実験系では、結核菌の主要な 4 薬剤の耐性に関与する変異（6 遺伝子）の中で、最も頻度の高いとされる position の変異を検出することが可能となった。

今回実施した HRM 解析は、PCR 後の増幅産物を解析する一つの方法であり、ゲノムの多様性（SNPs や insertion、deletion など）の分析に利用されているが、SSCP やハイブリダイゼーション法など従来の変異検出方法に比べて簡便であり、特異性、感度、迅速性などの点でも優れた方法である。さらに標識 probe を必要とせず、primer 間の変異の位置にかかわらず検出可能であることからコストパフォーマンスの点でも優れており HRM 解析は結核菌の薬剤耐性の遺伝子変異をスクリーニングするのに有用な方法であることが示唆された。しかし、結核菌の薬剤耐性では、必ずしも既知の領域のみが薬剤耐性に関わっているとは限らず、さらに本法では silent mutation を陽性と判定してしまうなど技術的にも限界がある。しかし既治療の患者では、耐性率が非常に高いことや、耐性菌罹患率の高い地域からの外国人結核の増加等を考えると、培養の結果を待たずに遺伝子変異の有無を検出し、あらかじめ薬剤耐性の可能性をスクリーニングすることは、患者に対する適切な治療や耐性菌の拡大防止等を推進するうえでも非常に重要であると思われる。

Table1. Mutations detected by HRM assay in *rpoB*, *katG*, *mab-inhA*, *embB*, *rpsL* and *rrs*

Target	Location	Nucleotide change	Amino acid change	Strain No
<i>rpoB</i>	516	GAC→GTC	Asp→Val	ref 14-8
	526	CAC→GAC	His→Asn	ref 14-10
	526	CAC→TAC	His→Tyr	ref 14-11
	531	TCG→TTG	Ser→Leu	2000009
	531	TCG→TTG	Ser→Leu	2008406
	533	CTG→CCG	Leu→Pro	2000201
	516 and 531	GAC→GGC	Asp→Gly	2000110
		TCG→TTG	Ser→Leu	
<i>katG</i>	315	AGC→ACC	Ser→Thr	2008406
	315	AGC→AAC	Ser→Asn	ref 15-18
	315	AGC→ACC	Ser→Thr	2000201
<i>mab-inhA</i>	-8	T→C (T216C)		ref 2X-1-14
	-15	C→T (C209T)		ref 14-7
	-15	C→T (C209T)		2009199
	-15	C→T (C209T)		2000009
	-15	C→T (C209T)		2009294
<i>embB</i>	306	ATG→ATA	Met→Ile	2000110
	306	ATG→ATA	Met→Ile	2008406
<i>rpsL</i>	43	AAG→AGG	Lys→Arg	2009294
	43	AAG→AGG	Lys→Arg	2000009
	43	AAG→AGG	Lys→Arg	2000201
	88	AAG→CAG	Lys→Gln	2008406
<i>rrs</i>	513	A→C		2009199
	513	A→C		2000110

【参考文献】

- 1) Murase Y, Maeda S, Yamada H, et al. (2010) Clonal expansion of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, Japan. *Emerg Infect Dis*; 16,948-954.
- 2) Nagai Y, Iwade Y, Hayakawa E, et al. (2013) High resolution melting curve assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Chemother*: (in press).
- 3) Miller PL, Crawford TJ, Shinnick MT. (1994) The *rpoB* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 38,805-811.
- 4) Ramaswamy S, Musser JM. (1998) Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis*; 79,3-29.
- 5) Starks M, Gumusboga A, Plikaytis B. (2009) Mutation at *embB* Codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 53,1061-1066.
- 6) Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X. (1997) Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Critical role of *embB* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother*; 41,1677-1681.
- 7) Johnson R, Streicher EM, Louw GE. (2006) Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Issues Mol. Biol*; 8,97-112.

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成を頂きました公益財団法人大同生命厚生事業団に深謝致します。

【経費使途明細】

研究用消耗品費	248,010 円
3130pop-7 ポリマー	
Buffer(10×) with EDTA	
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	
5× Sequencing Buffer	
Big DyeXterminator	
DNA 合成	
旅費	52,000 円
合計	300,010 円