

薬剤耐性結核菌株の薬剤耐性パターンと遺伝子変異の解析

東京都健康安全研究センター・微生物部

向川 純 遠藤美代子 柳川 義勢 諸角 聖

(平成 17 年 2 月 9 日受付)

(平成 17 年 4 月 19 日受理)

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance,
minimal inhibitory concentration, gene mutation

要 旨

平成 12 年 4 月～16 年 3 月までに東京都内において検出された薬剤耐性結核菌計 98 株について、常用 4 薬剤に対する薬剤感受性を検査し、MIC 値を測定した。単独耐性では SM 耐性が 27 株と一番多く、ついで INH 耐性株 16 株であった。複数の薬剤に耐性のものでは、INH と他の組み合わせのものが 51 株と最も多く、その中で INH、RFP 両薬剤に耐性の株は 38 株にのぼった。4 薬剤すべてに耐性を示した株が 19 株あり、そのうち 7 株は別に行った試験でニューキノロン系の抗菌剤にも耐性であった。薬剤耐性化に関与すると考えられている遺伝子変異を DNA シークエンス法で調査したところ、RFP 耐性株では、*rpoB* 遺伝子に変異のある株が 98% にみられた。INH に対して高度の耐性を示す株では *katG* 遺伝子上の欠損や挿入、あるいは *ahpC* 遺伝子の塩基に変異が見られ、中等度耐性の株では *katG* 遺伝子のアミノ酸変異、さらに低濃度耐性の株では *inhA* 遺伝子の塩基変異が見られた。SM の高度耐性株では、すべての株で *rpsL* 遺伝子のアミノ酸変異がみられ、低濃度耐性株では、*rrs* 遺伝子の塩基置換が 68% にみられた。EMB 耐性株では、*embB* 遺伝子のアミノ酸変異が 87% に見られた。

〔感染症誌 79: 388～396, 2005〕

序 文

結核菌は増殖が遅いため、従来の培養法による薬剤感受性試験では 2 週間以上の期間を要することから、治療と蔓延防止のための予防内服の実施に向けて、より迅速な試験法の開発が求められている。近年、結核菌の薬剤耐性とその遺伝子変異との関連が明らかにされつつあり^{1)～3)}、これを応用した遺伝子検査による薬剤感受性試験が確立されれば、迅速に結果が判明し、適切な治療と早期の蔓延防止対策や、医療費の減額、入院日数の減少なども期待できる。今回は、薬剤感受性試験に

遺伝子検査法を応用するための基礎データとするため、東京都内で分離された薬剤耐性結核菌について、耐性遺伝子の調査を行った。従来の培養法で薬剤感受性、最小発育阻止濃度 (MIC 値) を調査するとともに、遺伝子検査によって、各抗結核薬耐性化と関連するタンパク質、あるいは遺伝子上のアミノ酸変異、塩基変異を調査し、耐性の程度と変異部位の相関を解析したので報告する。

材料と方法

1. 供試菌株

平成 12 年 4 月～16 年 3 月までに東京都内において検出され、小川標準法でリファンピシン (RFP)、イソニアジド (INH)、ストレプトマイシン (SM)、エタンブトール (EMB) のどれかに耐性であることが判明した結核菌、計 98 株を対象と

別刷請求先: (〒169-0073) 東京都新宿区百人町 3-24-1

東京都健康安全研究センター・微生物部
向川 純

Table 1 Oligonucleotides used for PCR amplification and sequencing

Drugs	Target gene	Sequence of primers for PCR	reference
RFP	<i>rpoB</i>	5'-CGACCACTTCGGCAACCG-3' 5'-TCGATCGGGCACATCCGG-3'	Kim, et al (5)
INH	<i>katG</i>	5'-TTTCGGCGCATGGCCATGA-3' 5'-ACAGCCACCGAGCACGAC-3'	Haas,et al (6)
	<i>inhA-1</i>	5'-GCTGAGTCACACCGACAAACG-3' 5'-CCAGGACTGAACGGGATACGA-3'	Fang, et al (7)
	<i>inhA-2</i>	5'-GCAAAACGAGGAGCACCTGGC-3' 5'-AATACGCCGAGATGTGGATGC-3'	Fang, et al (7)
	<i>ahpC</i>	5'-CTTGCGGCACTGCTGAACCAC-3' 5'-ACAGGTCACCGCCGATGAGAG-3'	Fang, et al (7)
SM	<i>rpsL</i>	5'-GGTAGATGCCAACCATCC-3' 5'-GACCAACGGACGCTTGGG-3'	Katsukawa,et al (8)
	<i>rrs</i>	5'-GGTCCGGGTTCTCTCGGATTT-3' 5'-ACATGCTCCGCCGCTTGTGC-3'	Katsukawa, et al (8)
EMB	<i>embB</i>	5'-GGGCGGGGCTCAATTGCC-3' 5'-GCGCATCCACAGACTGGCGTC-3'	Mokrousov, et al (9)

して検討した。結核菌の培養および菌体の回収はすべて P3 施設内で行った。

2. 薬剤感受性試験

本試験は MGIT 法(ベクトンディキンソン社)、ならびにビットスペクトル SR 法で耐性の有無を判定し、MIC 値をブロスミック MTB-I 法(極東製薬)で測定した。

MGIT 法は、MGIT 液体培地に発育した菌を、INH (0.1μg/mL)、RFP (1μg/mL)、SM (0.8μg/mL)、EMB (3.5μg/mL) をそれぞれの濃度に添加した MGIT 培地に接種し、薬剤を入れないコントロール培地で菌発育陽性になった後、2 日以内に発育したものを耐性と判定した。

ビットスペクトル SR 法では吸光度 530nm OD=0.1 の菌液を 10 倍希釈して、準備されている培地の各ウエルに 20μL 接種し、数週間培養し、コントロールのウエルとその発育状況を比較し判定した。

ブロスミック MTB-I 法では、OD=0.16~0.2 の菌懸濁液を接種用培地に 210μL 加え、薬剤乾燥固着マイクロプレートの各ウエルに 200μL ずつ分注し、37℃、5%CO₂ 条件下に 7 日間培養し発育の有無を判定した。

3. 薬剤耐性に関する遺伝子の解析

菌体からの DNA の抽出は、前報⁴⁾の材料および方法の 2. RFLP 解析に記載した SDS - プロテナーゼ K - フェノール・クロロフォルム法で行った。RFP の薬剤耐性に関与する遺伝子の解析は *rpoB* を、INH 耐性では *katG*、*inhA*、*ahpC* を、SM 耐性では *rpsL*、*rrs* を、EMB 耐性では *embB* の各遺伝子を対象に行った。各遺伝子領域を Table 1 に示したプライマー^{5)~9)}を用い PCR 法で増幅し、Montage PCR Centrifugal Filter Device (Millipore 社)を用いて DNA を精製後、ABI PRISM310 (Applied Biosystems 社)を用い、Dye Terminator 法でサイクルシーケンスを行った。

成 績

1. 薬剤感受性試験

Fig. 1 に、MGIT 法による薬剤感受性検査、結果を示した。供試した 98 株のうち、単独耐性では SM 耐性が 27 株と一番多く、INH 耐性株 16 株、RFP 耐性株 2 株、EMB 耐性株 2 株であった。複数の薬剤に耐性を示したものは、INH と他の組み合わせのものが 51 株と最も多く、その中で INH、RFP 両薬剤に耐性の株は 38 株であった。4 薬剤すべてに耐性を示した株は 19 株で、ビットスペクトル SR 法、ブロスミック MTB-I 法での試験結果から、そのうち 7 株がニューキノロン系の抗

菌剤にも耐性であることが判明した。

2. 薬剤耐性株の遺伝子変異調査成績

1) RFP 耐性株の遺伝子解析結果

Fig. 2 に示したように、RFP 耐性 40 株のうち、RNA polymerase *B* subunit をコードしている *rpoB* 遺伝子の、コドン 516 番目の Asp (1 文字記

号では D)、526 番目の His (H)、531 番目の Ser (S) のいずれかに変異のあるものが 39 株あり、アミノ酸置換と MIC 値の相関を見ると、516 番目の Asp (D) が Val (V) に変異した株は 4~8 μ g/mL と中等度であったが、Tyr (Y) に変異した株は 32 mg/ μ L 以上と高度耐性であった。また、526 番目の His (H) が Tyr (Y)、Asp (D)、Arg (R) に変異した株はいずれも高度耐性であった。しかし、Leu (L) に変異した株は、感受性と耐性の境界と考えられ、判定保留となる MIC 値 0.5 μ g/mL を示した。531 番目の変異はすべて Ser (S) から Leu (L) への変異であり、変異のみられた株の大部分は MIC 値 32 μ g/mL 以上の高度耐性株であったが、一部の菌株で 4 μ g/mL ないし 8 μ g/mL の MIC 値を示すものもあった。また今回解析した中に、この領域に変異がないのに RFP 耐性の株が 1 株あった。

2) INH 耐性株の遺伝子解析結果

Fig. 3 に、INH 耐性 67 株の MIC 値と遺伝子変異状況を示した。*katG* 遺伝子に欠失、挿入あるいはアミノ酸変異のあるものが 21 株で、4 種類の変

Fig. 1 Number of strains resistant to drugs

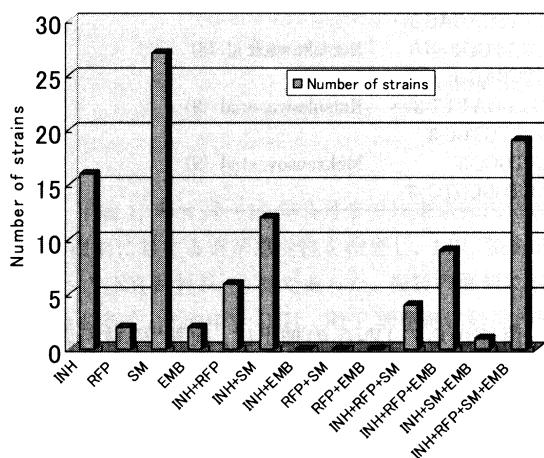


Fig. 2 Association between MIC to rifampicin and amino acid mutation in *rpoB* gene

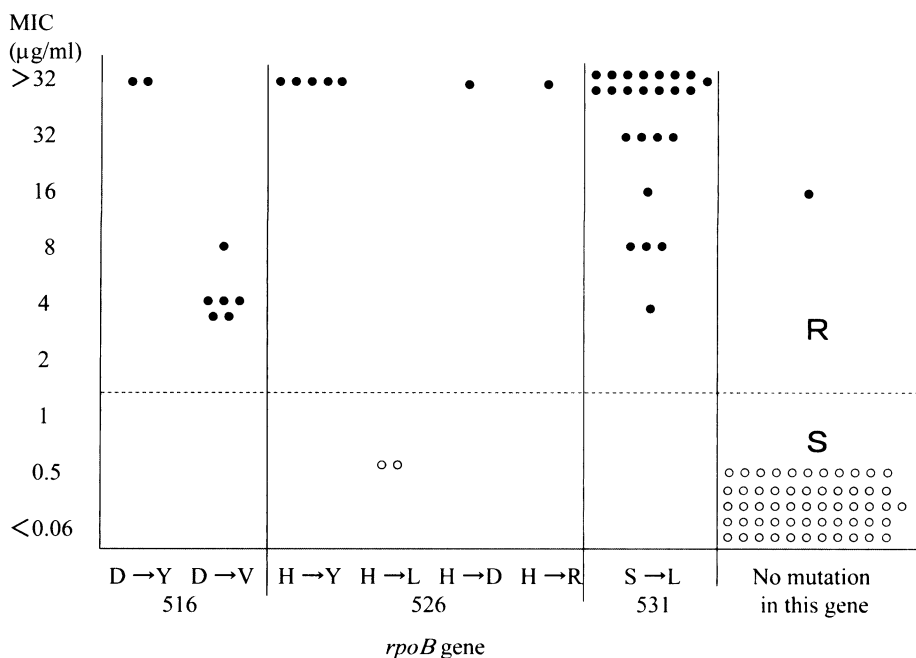
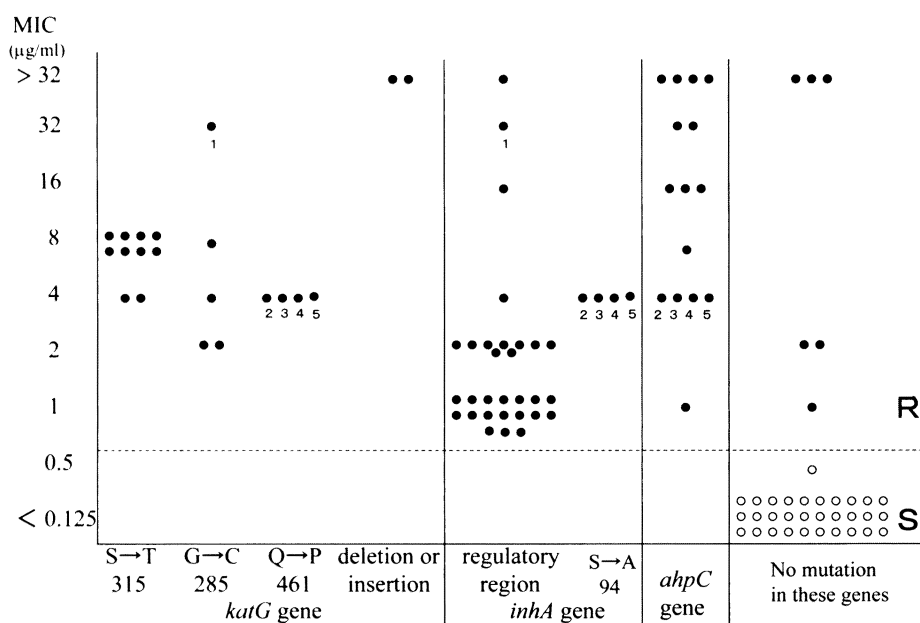


Fig. 3 Association between MIC to isoniazid and amino acid or nucleic acid mutation in *katG*, *inhA*, or *ahpC* gene.

No. 1 to 5 are INH resistant strains which have multilocus gene mutations.



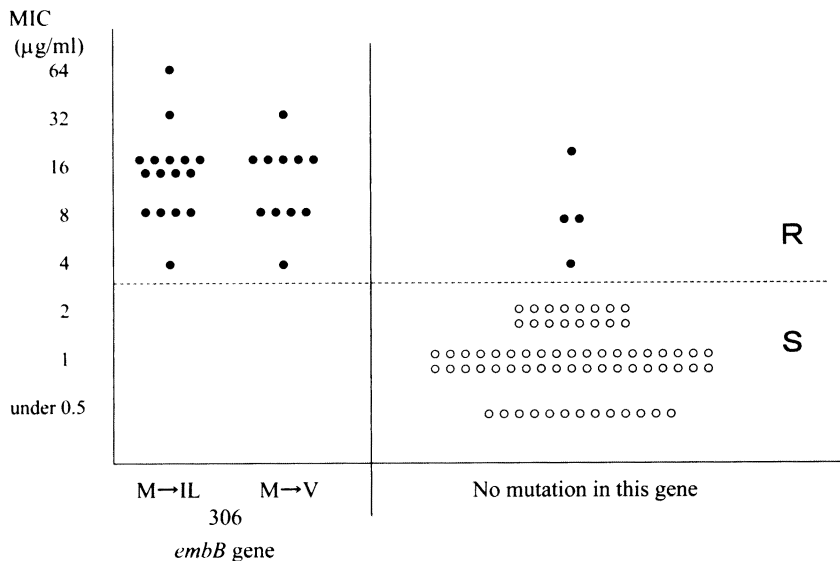
異がみられた。*inhA* 遺伝子の変異は3種類で34株、そして*ahpC* 遺伝子の変異は5種類で15株見られた。また、これらの遺伝子に変異のない耐性株が6株あった。*katG* 遺伝子に欠損・挿入のある株はMIC値が32μg/mL以上の高度耐性株で、コドン315のSer (S) がThr (T) に変異した株 (S315T) ではMIC値は4~8μg/mL、コドン285のGly (G) がCys (C) に変異したもの (G285C) は、2~32μg/mL、コドン461のGln (Q) がPro (P) に変異したもの (Q461P) のMIC値は4μg/mLであった。G285Cで32μg/mLと高いMIC値を示した株は、同時に*inhA* 遺伝子にも変異があり (番号1の株) その株を除くと、G285Cの株のMIC値は2~8μg/mLであった。

inhA 遺伝子の変異は、主としてその調節領域に存在し、転写開始点の上流-15のCがTに置換したものが31株中30株、-17番目のCがTに置換したものが1株あった。これらの株のMIC値はほとんどが1~4μg/mLであったが、MIC値16μg/mL以上を示す株が3株あり、この中には前述の

katG 遺伝子変異を同時に持つ株も含まれていた。*inhA* 遺伝子でコドン94のSer (S) がAla (A) に変異した (S94A) 4株 (番号2から5) はいずれも同時に*katG* 遺伝子のコドン461のGln (Q) のPro (P) への変異 (Q461P) と、*ahpC* 遺伝子の調節領域の-51のGからAへの変異を持つ株で、それぞれ2000年から2003年に分離された同一患者由来の株で、MIC値は4μg/mLであった。

ahpC 遺伝子に変異をもつ耐性株は15株あり、Fig. 4に*ahpC* 遺伝子の調節領域の変異とMIC値について示した。16~32μg/mL以上の高いMIC値を示す株は9株で、転写開始点より上流の-81あるいは-54のCがTへ変異していた。8μg/mL以下のMIC値を示す株は6株で、-88あるいは-51、-48のGがAへ変異していた。

ビットスペクトルSR法でINHに不完全耐性 (INH0.2耐性, INH1.0感受性) であった37株のMIC値は大部分1~4μg/mLで、37株中、31株で*inhA* 遺伝子に、6株で*katG* 遺伝子に、5株で*ahpC* 遺伝子に変異が見られた。また、これらの遺伝子

Fig. 6 Association between MIC to ethambutol and amino acid mutation in *embB* gene

の10株にMIC値8μg/mL以下の耐性がみられた。

4) EMB耐性株の遺伝子解析結果

EMB耐性の31株で、耐性化に関与する遺伝子と考えられる*embB*遺伝子を解析したところ、Fig. 6に示すとおり、コドン306のMet(M)がIle(IL)へ変異していた株16株、Val(V)へ変異していた株11株の合計27株が確認された。また、この変異のない株でMIC値4μg/mL以上の耐性株が4株あった。

考 察

今回、薬剤耐性結核菌計98株について、主要抗結核薬であるINH、RFP、SM、EMBに対する感受性を調査し、MIC値を調査した。今回調査した結核菌株は、初回治療例と既治療例が混じったものであるが、阿部¹⁰⁾の報告と同様、単独耐性ではSM耐性(27.6%)が一番多く、続いてINH耐性(16.3%)で、RFP単独耐性(2%)と、EB単独耐性(2%)は少数であった。4薬剤にすべて耐性を示した19株のうち7株が、ニューキノロン系の抗菌剤にも耐性であったが、ニューキノロン系の抗菌剤にのみ耐性を示す株はなく、多剤耐性菌の治療に同抗菌剤が用いられ、耐性を獲得したものと

推察される。またINH単独耐性の株が16%も検出されたことから、感染拡大を防ぐための予防内服を行う際は、初発者の菌株における薬剤感受性検査成績を重視する必要があるだろう。

結核菌の抗結核薬に対する耐性獲得はすべて染色体遺伝子の突然変異や不特定の塩基配列の挿入、あるいは欠損などで起こると考えられており^{1)~3)}、現在までにRFPにおけるRNA polymerase β subunit遺伝子(*rpoB*)、INHにおけるcatalase-peroxidase遺伝子(*katG*)、enoyl-ACP-reductase遺伝子(*ahpC*)、SMにおけるribosomal protein S12遺伝子(*rpsL*)および16S rRNA遺伝子(*rrs*)、EMBにおけるarabinosyl transferase遺伝子(*embB*)などが耐性化に関与する遺伝子として報告されている^{1)~3)}。今回、抗結核薬に対する耐性と、これらの遺伝子の変異についての相関を調査した。

RFPは、結核菌のRNA polymeraseのβ subunitに結合し、RNA鎖形成の開始を阻害し抗菌活性を発揮する³⁾。RFP耐性菌では、β subunit上の23個のアミノ酸をコードするホットスポット領域に変異が集中して起こることが報告されて

いる³¹。今回の結果からも、Fig. 2 に示したように、調査した RFP 耐性株の 98% でこの領域にアミノ酸変異があった。また変異するアミノ酸によって MIC 値が異なることも判明した。531 番目の Ser に関しては不明の点もあるが、他のアミノ酸変異では、変異するアミノ酸の種類によって、RFP と RNA polymerase β subunit の結合の親和性に変化するため、耐性の程度に差が生じたと考えられる。

INH は結核菌の細胞壁特異成分であるミコール酸の合成を阻害することで抗菌作用を示すと考えられている³²。INH は *katG* 遺伝子の産物である catalase-peroxidase 活性によって酸化され活性化型となるため、*katG* 遺伝子上の塩基置換や挿入、または欠損によってカタラーゼ活性を失った *katG* 変異株では INH の活性化が起きず耐性となると考えられている。我々の成績においても、*katG* 遺伝子に欠損や挿入がある株は、高度耐性を示し、S315T, G285C では、それより低い MIC 値 4~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の耐性を示した。これは van Soolingen ら¹¹の報告と一致する成績でもあった。コドン 315 の Met は catalase-peroxidase 活性の発現に重要なアミノ酸残基であり、この変異によって INH との結合活性が低下することが報告されている¹²。コドン 285 の Gly も同様の役割を持つと推定される。

INH の標的タンパク質と考えられる enoyl-ACP-reductase をコードする *inhA* 遺伝子上の変異も INH 耐性に関与すると報告されている³³。*inhA* 遺伝子上の変異によって INH-NAD 複合体との親和性が低下したり、発現調節部位の変異により、enoyl-ACP-reductase の過剰生産がおき、INH に耐性化すると考えられる。今回の成績からも、INH に対して MIC 値 1~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の低濃度耐性株で、タンパク質をコードする遺伝子上のアミノ酸変異が 9.8% の株に、*inhA* 遺伝子の調節領域における変異が 65.9% の株に認められた。これらの低濃度耐性株は、ビットスペクトル SR 法ではすべての株で不完全耐性 (INH 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 耐性, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 感受性) と判定され、吉多ら¹³の報告と一致した。低濃度耐性株は *inhA* 遺伝子に変異のあ

るものが多いことが推定される。*inhA* 遺伝子変異株の中には、MIC 値 16~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高度耐性株が 3 株あり、2 株については不明であるが、1 株は *inhA* 遺伝子と *katG* 遺伝子に二重の変異を持ち、二重の変異によって耐性度が高くなったものと考えられる。

ahpC は alkylhydroperoxidase をコードする遺伝子であるが、その調節領域の中の変異も INH 耐性に関与することが報告されている³⁴。今回の結果からも、この遺伝子の調節領域中、特定の塩基置換と耐性化に相関が観察された。Sherman ら¹⁴は、この変異した調節領域の下流にレポーター遺伝子を接続して、その遺伝子発現の増減を調査しているが、調節領域の塩基変異によって、プロモーター強度が増大し、下流にある *ahpC* 遺伝子の産物である alkylhydroperoxidase の発現量が増し、その結果 INH に耐性化したことを推定させる。*ahpC* 遺伝子の調節領域に変異のある株のなかで、同時に *katG* の Q461P、*inhA* の S94A という変異を持つものがあり、MIC 値は 4 $\mu\text{g}/\text{L}$ と低い値を示した。耐性化の機構に、この 3 カ所の変異が同時に起きることが必要なのか、あるいは 2 カ所は耐性化に関係なく、残りの 1 カ所のみが関与するのかなど、今後の検討が必要である。

SM 耐性菌では、16SrRNA の 530 ステムループ領域、900 ステムループ領域、及びこれらの領域と結合する S12 タンパク質のコドン 43、88 のアミノ酸の変異が耐性化と相関することが報告されている⁸。今回の調査においては、S12 タンパク質の特定のアミノ酸変異によって SM に対する高濃度の耐性化、また 16SrRNA の塩基置換によって低濃度の耐性化が観察された。変異のおこる遺伝子によって耐性の程度が変わることが、INH と同様に SM でも観察された。今回、培養法で SM 耐性と判定された菌株のうち、84.1% がこれらの領域に変異を持っていた。

EMB 耐性菌で *embB* 遺伝子のコドン 306 の Met のアミノ酸変異が 87.1% の株に検出された。このアミノ酸変異によって、*embB* 遺伝子の産物であるアラビノシルトランスフェラーゼの活性が低下し、細胞壁の生合成が阻害されたことが推察

される。embB の他の領域、あるいは embA、embC における変異も EMB 耐性化と関係するという報告¹⁵⁾もあり、我々はこれらの遺伝子の調査も行っている。

今回解析した菌株中には、薬剤に耐性を示すにもかかわらず、調査した遺伝子に変異が認められない株があった。これらの株は、調査した遺伝子の別の領域、あるいは別の遺伝子に変異をもつことも考えられ、さらなる調査・解析を行っている。

ハイブリダイゼーション法¹⁶⁾や DNA マイクロアレー法²⁾を用いて、これらの変異を同定し、薬剤感受性の診断に用いられる検査キットが一部に開発されている。またリアルタイム PCR を用いた検出系¹⁷⁾の開発も報告されている。今後、さらに耐性化に関与する遺伝子群の解明が進み、これらの遺伝子変異を病院の検査室でも簡単に検出できる検査キットが開発されれば、迅速で的確な臨床診断、ならびに予防内服の資料として役立てられると考えられる。

謝辞：本研究にご協力いただいた、東京都立府中病院呼吸器科・藤田 明先生、検査科・中澤幸明、豊川 敬、野村勝美、坂本芳子、浦 邦子、新藤純子、鹿目芳夫の各氏、ならびに東京都健康安全研究センター前ウイルス科長・村田以和夫氏に感謝いたします。本論文の要旨は第 78 回日本感染症学会（2004 年 4 月、東京）にて報告した。

文 献

- 阿部千代治：薬剤感受性試験の新しい考え方、資料と展望 1998；25：1—12.
- 鈴木定彦、田丸亜貴、Amin Ruhul、勝川千尋：結核菌の薬剤耐性獲得機序の解析と迅速診断への展開、防衛防衛 2000；28：561—73.
- Zhang Y, Telenti A：Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In：Molecular genetics of *Mycobacteria*, Hatfull GF, Jacobs WR, ed. ASM press, Washington D.C., 2000；p. 235—254.
- 向川 純、下島優香子、村田以和夫、遠藤美代子、柳川義勢、諸角 聖：結核集団感染の分子疫学的解析における Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) 法の有用性、感染症誌 2003；77：1040—8.
- Kim BJ, Lee SH, Lyn MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, et al.：Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol 1999；37：1714—20.
- Haas WH, Schilke K, Brand J, Amthor B, Weyer K, Fourie PB, et al.：Molecular Analysis of *katG* Gene Mutation in Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Africa. Antimicrob Agents Chemother 1997；41：1601—3.
- Fang Z, Doig C, Rayner A, Kenna DT, Watt B, Forbes KJ：Molecular Evidence for Heterogeneity of the Multiple Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Population in Scotland (1990 to 1997). J Clin Microbiol 1999；37：998—1003.
- Katsukawa C, Tamaru A, Miyata Y, Abe C, Makino M, Suzuki Y：Characterization of the *rpsL* and *rrs* genes of streptomycin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. J Appl Microbiol 1997；83：634—640.
- Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Otten T, Vyshnevskiy B：Detection of Ethambutol Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting *embB* 306 Mutations. J Clin Microbiol 2002；40：1617—20.
- 阿部千代治：日本および世界の薬剤耐性結核の現状、結核 2001；76：699—706.
- van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, Kuiper E, Rinder H, Borgdorff MW：Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. J Infect Dis 2000；182：1788—90.
- Wengenack NL, Todoroviv S, Yu L, Rusnak F：Evidence for Differential Binding of Isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis katG* and the Isoniazid Resistant Mutant *katG* (S315T). Biochemistry 1998；37：15825—34.
- 吉多仁子、阿野裕美、石田智恵子、谷川信子、菊池正紀、高嶋哲也、他：INH 0.1μg/ml 耐性株のプロスミック MTB-I 法を用いた検討、結核 2002；77：533—5.
- Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry III CE, et al.：Compensatory *ahpC* Gene Expression in Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Science 1996；272：1641—3.
- Ramaswamy SV, Amin AG, Goksel S, Stager CE, Dou S-J, Sahly HN, et al.：Molecular Genetic Analysis of Nucleotide Polymorphisms Associated with Ethambutol Resistance in Human Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2000；44：326—36.
- 阿部千代治、尾形英雄、河田兼光、平賀 通、高嶋哲也、末竹寿紀：Line Probe Assay (LiPa) によ

るリファンピシン耐性結核菌の検出. 結核
2000 ; 75 : 575—81.

- 17) Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J :
Use of Real-Time PCR and Fluorimetry for Rapid

Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance
Associated Mutations in *Mycobacterium tuberculo-*
sis. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 3194—9.

Anti-drug Pattern of Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and Analysis of Mutation in Drug-target Genes

Jun MUKAIGAWA, Miyoko ENDOH, Yoshitoki YANAGAWA & Satoshi MOROZUMI

Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

The antimycobacterial susceptibility test was performed and minimal inhibitory concentration (MIC) to drugs was determined in 98 strains of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) isolated in Tokyo from 2000 to 2003, to find which were resistant to any of the four main anti-MTB drugs, isoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM), and ethambutol (EMB). 27 strains of them were resistant only to SM, and 16 strains were resistant only to INH. 51 strains of them were resistant to not only INH but also other drugs. 38 strains were resistant to both INH and RFP. 19 strains were resistant to all four drugs, including 7 strains resistant to new quinolon anti-biotics also.

Nucleotide or amino-acid mutations in drug resistant MTB genome were determined by DNA sequencing method. Mutation of codon 516, 526, or 531 of *rpoB* gene was detected in 98% of MTBs resistant to RFP. Deletion or insertion of *katG* gene or nucleotide mutation at regulatory region of *ahpC* gene was detected in MTBs highly resistant to INH. Amino acid mutation of *katG* gene, especially at codon 315, was detected in MTBs resistant to INH intermediate. Nucleotide mutations at regulatory region of *inhA* gene were detected in MTBs resistant to INH at low level. Amino acid mutation at codon 43 or 88 of *rpsL* gene was detected in MTBs highly resistant to SM, and nucleotide mutation at 512, 513, or 516 of *rrs* gene was detected in MTBs resistant to SM at low level. Amino acid mutation at codon 306 of *embB* gene was detected in 87% of MTBs resistant to EMB.