

今村賞受賞記念講演

## 抗酸菌感染症に対する分子生物学的アプローチ

古賀宏延

長崎大学医学部第2内科

受付 平成7年7月19日

Commemorative Lecture of Receiving Imamura Memorial Prize

THE APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGY TO THE  
DIAGNOSIS OF MYCOBACTERIOSIS

Hironobu KOGA \*

(Received 19 July 1995)

The application of molecular biology techniques to the diagnosis of mycobacteriosis was evaluated. The hybridization protection assay (HPA) was found to be accurate and rapid in the identification of mycobacteria. The nested polymerase chain reaction (PCR) targeting the *Pab* gene was specific and sensitive enough for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. The overall sensitivity and specificity of the nested PCR were excellent, 97% and 92%, respectively. In addition, a novel method combining the PCR and the HPA for the rapid detection of MAC and *M. tuberculosis* was developed. This method was as useful as the nested PCR for *M. tuberculosis* above mentioned. The clinical usefulness of two commercially available mycobacteria detection kits, the MTD and the Amplicor, was evaluated and compared with that of the conventional smear and culture methods. The MTD showed the highest sensitivity, while the Amplicor showed the highest specificity. The HPA was also applied to drug susceptibility tests, which require 3 to 4 weeks by conventional methods. By this method, the results of resistance to isoniazid or rifampicin could be obtained after three days incubation. Another method for determining the drug resistance of mycobacteria is the detection of gene alterations related to the drug resistance. The deletion of the catalase-peroxidase gene related to isoniazid resistance was observed in 15% of isoniazid-resistant strains. On the other hand, point mutations in the RNA polymerase  $\beta$  subunit (*rpoB*) gene relating to rifampicin resistance were detected in 31% of rifampicin-resistant strains by the non-radioisotope PCR-SSCP analysis. In contrast, the PCR-direct sequencing analysis of a 69bp fragment in the *rpoB* gene of *M. tuberculosis* was useful in predicting rifampicin-resistant phenotypes. The application of molecular biology techniques may be a useful strategy for the diagnosis of mycobacteriosis in future.

---

\* From the Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852 Japan.

**Key words :** Mycobacteriosis, HPA, MTD, Amplicor, *rpoB* gene

**キーワード :** 抗酸菌症, HPA, MTD, アンプリコア, *rpoB* 遺伝子

## はじめに

1930年代より、一部の物理学者によって創始された分子生物学は、生命の神秘に迫る学問として大いに魅力に満ちたものであった。しかしその反面、学問の進歩はその後約40年間ほとんどみられず、唯一1953年のワトソンとクリックによるDNAの二重らせんモデルの提唱が脚光を浴びたにとどまった。ところが、1970年代を迎えた頃からこの分野での急速な進歩が訪れ始めた。なかでも制限酵素の発見、サザンブロット法の開発、塩基配列の迅速決定法やPCR法の開発など、DNAの解析技術が急速に進み、遺伝病や悪性疾患などの分野で盛んに応用されるようになった。

私たちが1989年より感染症の分野において、抗酸菌、レジオネラ、嫌気性菌、マイコプラズマなどの検出にこれらの技術的な応用を考え、いわゆる微生物の遺伝子診断あるいはDNA診断の臨床的有用性を検討してきた。

### I. DNAプローブ法による抗酸菌の同定

結核菌の遺伝子診断法として、まずはじめに開発されたのがDNAプローブ法である。当初は放射性同位元素を使用したために取り扱いがかなり制限されたが、現在ではAccuProbeとよばれる非放射性的のキットが市販され、操作や器具の簡略化とともに、短時間での抗酸菌同定が可能となった。このキットの感度と特異性は優れ、結核菌では従来法との間に100%の一致率がみられた<sup>1)</sup>。また、生化学法でMACと同定された菌株の中に別の菌種が約1%含まれていたとする報告<sup>2)</sup>などもみられ、より正確な菌種同定のためには欠かせない方法であると思われる。

このように、抗酸菌の同定手段として、DNAプローブ法は優れた方法であるが、欠点として検出感度の低さが挙げられる。最低でも $10^5$ から $10^6$ の菌数が必要なため<sup>2)</sup>、実際の臨床検体から抗酸菌を直接検出するには不向きである。このような欠点を補うために、私たちはPCRの応用を考えて臨床的検討を行った。

### II. PCRによる抗酸菌の検出

PCRは1988年にはじめて報告された新しいDNAの増幅技術で、極めて画期的で優れた方法のわりには、操作法や器具が簡便であったために、短期間のうちに広く普及するようになった。

PCRで最大のキーポイントはプライマーの設定で、これにより感度と特異性はほぼ決定する。抗酸菌に特異的な各種遺伝子の塩基配列が次第に明らかになる中で、38 kDaの蛋白抗原をコードする遺伝子、protein antigen b (*Pab*) 遺伝子が結核菌に最も特異的であったために、私たちはこれを標的遺伝子としてPCRの検討を開始した<sup>3,4)</sup>。

PCRの特異性ととも重要な因子は感度である。私たちが目的とした*Pab*遺伝子は、結核菌群のゲノム中に1コピーしか存在しないために、第1段階PCRの検出感度はDNA量で約10 pgであった。この感度では臨床検体からの結核菌の検出率は塗抹・培養よりも低かったために、臨床応用するには少しでも感度を上げる工夫が必要となり、続いて第2段階PCRを行う、いわゆるnested PCRを検討した。これにより、感度は1,000倍上昇し、10 fgまで検出できるようになった。10 fgのDNA量は結核菌の2個分に相当するもので、臨床的にも応用可能な感度が得られた。同様に、菌数による検出限界を検討した結果、第1段階PCRでは100 CFU、第2段階では0.1 CFUであった。

以後、私たちはこのPCRを用いて臨床的検討を行い、各種臨床検体中の結核菌の検出を試みた。塗抹・培養が陽性の検体では、PCRもほぼ陽性の結果が得られ、塗抹・培養の陽性率が低いといわれる胸水、髄液、腹水、血液、尿などの体液からも高頻度にPCR陽性の検体が認められた<sup>4)</sup>。これらの検体は、いずれも臨床的に結核症が強く疑われた症例のもので、抗結核薬による治療にも反応し、PCRが早期診断と早期治療に大いに貢献したものと評価できる。417検体のまとめでは、偽陰性はわずか2検体のみでPCRの感度は97%、また塗抹・培養が陰性であった検体の中で、約8%はPCRが陽性で特異性は92%と、いずれも優れた成績が得られた。

### III. PCRとDNAプローブ法を併用した抗酸菌の迅速検出・同定法

一方、近年増加傾向にある非定型抗酸菌症に対しても、迅速診断が出来れば好都合である。そのためには、各種抗酸菌に対する個々のPCRを施行するという方法も考えられるが、未知の抗酸菌に対して複数のPCRを行うことは、操作上も経済的にもむだが多い。そこでPCRとDNAプローブ法の、それぞれの利点を活かして併用した、抗酸菌の迅速検出ならびに同定法を考案した<sup>5)</sup>。

表1 検体別各検査法の陽性率

	塗抹・培養 (n=34)	PCR (n=42)	MTD (n=46)	Amplicor (n=36)
喀痰	38.9%(7/18)	50.0%(12/24)	72.0%(18/25)	43.8%(7/16)
胃液	75.0%(3/4)	55.6%(5/9)	44.4%(4/9)	77.8%(7/9)
気管内採痰	8.3%(1/12)	33.3%(3/9)	58.3%(7/12)	18.2%(2/11)
計	32.4%(11/34)	47.6%(20/42)	63.0%(29/46)	44.4%(16/36)

臨床検体：肺結核症12症例から得られた46検体

つまり、検体中に含まれる多種の抗酸菌を検出できるPCRを施行し、陽性の検体のみをまず選択する。次に、増幅されたPCR産物を用いて、前述したAccuProbeで同定するという方法である。PCRに用いたプライマーは、抗酸菌の16S rRNAをコードする遺伝子を標的としたもので、検出感度は結核菌で10 fg、MACでは100 fgであり、臨床的にも十分応用可能な感度であると判断された。現在、すでにこの方法を用いて、臨床検体中の抗酸菌の検出を行っており、従来のPCRと同様に良好な成績が得られている。

#### IV. 抗酸菌迅速検出キットの検討

PCRが臨床的にも有用な迅速検出法であることに疑問の余地はないとしても、その検査手技はいささか複雑で、とても多くの一般検査室レベルで施行することは困難である。幸い、平成6年の8月以降、2種類の迅速検出キットが市販され、保険点数も認められるようになった。これを機会に私たちはこれらのキットを含めて各種検出法の臨床的な有用性に関する比較検討を行った。

従来法としての塗抹・培養法、私たちの教室で施行中の*Pab* 遺伝子に対する nested PCR 法 (*Pab*-PCR)、rRNAを増幅するMTD法(中外製薬株式会社)、およびrRNAをコードしているDNAを増幅するAmplicor(日本ロッシュ株式会社)の4種類の方法を比較した。その結果、*in vitro*における各迅速検出法の感度は、*Pab*-PCRとAmplicorが $1.8 \times 10^{-1}$  CFU、MTDが1.8 CFUで、各検査法間に有意差はみられなかった。一方、臨床検体の陽性率を各検査法間で比較してみると(表1)、喀痰ではMTDが72%と最も高く、胃液ではAmplicorが78%と最も高い成績で、*Pab*-PCRはいずれの検体においても2つのキットの中間の成績を示した。

また、従来法に対する各検査法の感度、特異性、一致率を検討した結果(表2)、*Pab*-PCRとAmplicorは特異性に優れており、そのために高い一致率を示した。

表2 各検査法における感度および特異性の比較

		PCR		MTD		Amplicor	
		+	-	+	-	+	-
塗抹 培養	+	9	2	11	1	7	1
	-	4	64	15	60	3	61
感度(%)		81.8		91.7		87.5	
特異性(%)		94.1		80.0		95.3	
一致率(%)		92.4		81.6		94.4	

一方、MTDは従来法で陰性であった検体からも15例で結核菌を検出したために、感度は優れたものの特異性と一致率は劣る成績であった。これらの成績から、臨床検体の種類によって適切な検出法を選択する必要性が示唆されたが、その結論を出すにはさらに多くの検体での検討を要すると思われる。

#### V. DNAプローブ法による薬剤感受性検査

抗酸菌の検出・同定とともに、臨床的にも極めて重要な検査は菌の薬剤感受性である。通常は薬剤を含有した培地に菌を接種し、3~4週後に増殖の有無で感受性を判定する。この検査を少しでも迅速に行うために、DNAプローブの応用を試みた<sup>6)</sup>。つまり菌の増殖の程度を、AccuProbeによるrelative light unit (RLU)の値で判定するもので、図1に示したように生菌数とRLUの変化はほぼ良好な相関関係がみられた。つまり、菌の生死あるいは活動性の程度は、AccuProbeによるrRNAの定量によってもある程度判定可能であることが示唆された。

この方法を用いて、薬剤添加による感受性菌と耐性菌の鑑別が可能かどうかを検討した。図2はINHを0.1あるいは1 μg/ml添加した時のもので、感受性菌では培養3日目には薬剤非添加の対照群よりも有意に低いRLUを示した。しかし、耐性菌では対照群と全く同様

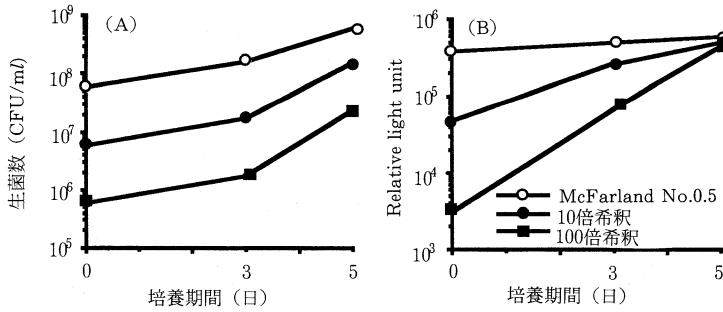


図1 種々の接種菌量における H37Rv の生菌数 (A) と RLU 値 (B) の経時的変化

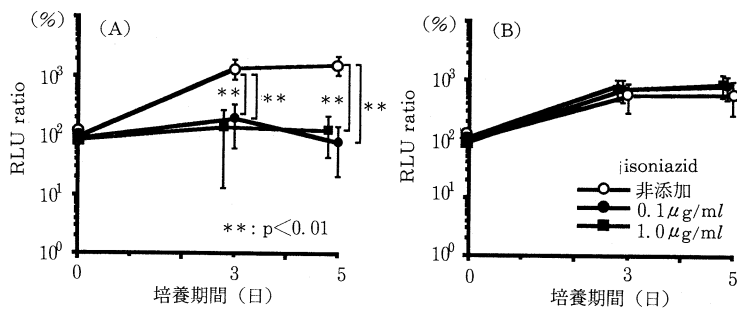


図2 INH 添加時と非添加時における INH 感受性菌 7 株 (A) および INH 耐性菌 6 株 (B) の RLU ratio の経時的変化

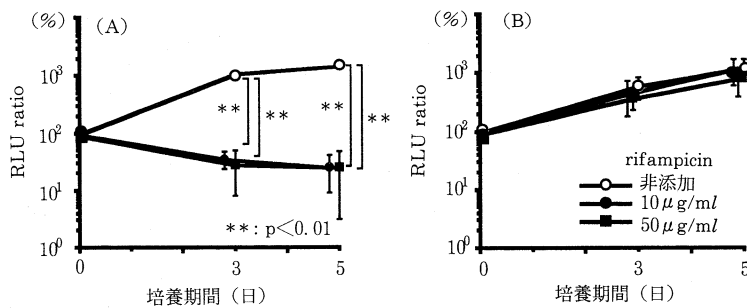


図3 RFP 添加時と非添加時における RFP 感受性菌 5 株 (A) および RFP 耐性菌 4 株 (B) の RLU ratio の経時的変化

の RLU を示した。

一方、図3には RFP 添加時のものを示したが、感受性菌では INH の場合よりもさらに強く RLU が低下し、耐性菌では対照群と全く差はみられなかった。この方法により、INH および RFP に対する結核菌の感受性成績を早くて3日目に判定することが可能であると考えら

れた。しかも、この方法は非放射性で安全であり、操作も簡便なことから、今後結核菌の迅速な薬剤感受性検査法になりうるものと思われた。

#### VI. 遺伝子検索による薬剤感受性判定

DNA プローブ法の応用で、薬剤感受性検査の迅速化

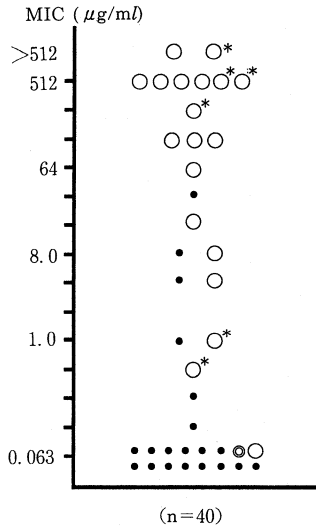


図4 RFPのMICと *rpoB* 遺伝子内の点突然変異との関係

- : *rpoB* 遺伝子内の点突然変異株
- : silent mutation 株
- \* : 非放射性 SSCP 法による異常株

が期待できるとしても、そのためには菌が培養されていることが前提条件である。たとえば、培養陰性、PCR陽性の検体ではいかなる薬剤感受性検査も施行できない。そこで、PCRを用いた耐性菌の判定法について検討した。

たとえば、RFP耐性にはRNA polymerase  $\beta$  subunit (*rpoB*) 遺伝子内の point mutation が深く関与していると報告されている<sup>7)</sup>。近年、point mutation を簡便に検出できる方法として、一本鎖DNAの電気泳動度をコントロールのDNAと比較する方法、いわゆる single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) 法が考案された。私たちは非放射性 SSCP 法と、PCR産物を用いた直接塩基配列決定法 (PCR direct sequence) を比較し、その有用性について検討した。その結果、図4に示したように、SSCP法で異常がみられた菌株は、RFPのMICが64  $\mu\text{g/ml}$ 以上の13株中4株(31%)のみで、すでに報告した放射性 SSCP 法においても67%程度の検出率であった<sup>8)</sup>。また、SSCP法で異常がみられたが感受性菌であったものが2株認められた。

さらに変異の部位を確認するために行った塩基配列決定の結果からは、ほとんどの変異の部位と種類は Teleni や Kapur らの報告とほぼ一致したものの、いくつかの新しい知見が得られた。第一に、MICが64  $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌13株では、すべてに516番、526番あ

るいは531番のいずれかのコドンに point mutation がみられた。とくにコドン531番に point mutation があつた7株はすべて64  $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌であつた。第2に、7株でコドン526番に point mutation がみられたものの、従来の報告のように tyrosine への変異は1株も存在しなかつた。おそらくこの相違は地域差によるものと推測されるため、今後さらに多数の菌株での検討が必要であると思われる。第3に、コドン515番と533番に point mutation がみられた株がそれぞれ1株と2株あつたが、これらの3株はいずれも感受性菌であつた。つまり、この2つのコドンに point mutation がみられても、必ずしも耐性菌になるとは限らないことが示唆された。

以上より、SSCP法の臨床応用は感度と特異性の面でいまだ不十分であるため、多少繁雑ではあるものの、*rpoB* 遺伝子の直接塩基配列決定法の方が有用であると思われた。

一方、INH耐性との関係が深い遺伝子は catalase-peroxidase 遺伝子で、その欠損により耐性化すると報告されている<sup>9)</sup>。私たちの検討でも、この遺伝子の欠損株はすべてINHのMICが64  $\mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性菌であつたが、この遺伝子の欠損率はINH耐性菌の約15%にすぎなかつた。今後は同じ遺伝子内の別の部位での欠損や、point mutationの有無、あるいは *inhA*<sup>10)</sup>などの全く異なる遺伝子との関連性についても検討が必要であると思われる。

## 結 語

21世紀早々にも結核の根絶宣言が聞かれるのは夢ではない。しかしそのためには、結核の予防対策とともに、早期診断と早期治療が重要なことは言うまでもなく、この目的のために分子生物学的技術を利用する意義は大きい。結核菌の検出から同定・薬剤感受性検査に至るまで、すべてを1日で判定できる日が来るのも遠くはないと思われる。

(最後に、本研究に御協力頂いた教室の諸先生方、ならびに御指導を賜りました原 耕平名誉教授に感謝するとともに、発表の機会を与えて頂いた青木国雄会長、座長の労をお取り頂いた久世文幸教授、ならびに今村賞選考委員の諸先生方に心より深謝致します。)

## 文 献

- 1) Maesaki S, Kohno S, Koga H, et al. : A clinical comparison between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections. *Chest*. 1993 : 104 ; 1408-1411.
- 2) 後藤美江子, 奥住捷子, 岡 慎一, 他 : アクリジニ

- ウムエステル標識 DNA プローブ法による抗酸菌同定の有用性について. 感染症誌. 1992 ; 66 : 81-86.
- 3) 古賀宏延, 宮崎義継, 河野 茂, 他 : I. 抗酸菌感染症の迅速診断法. 5. 抗酸菌症に対する DNA probe 法と PCR 法. 結核. 1992 ; 67 : 795-802.
  - 4) Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, et al. : Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol. 1993 ; 31 : 2228-2232.
  - 5) 橋本敦郎, 古賀宏延, 河野 茂, 他 : Nested PCR 法と DNA プローブ法を併用した抗酸菌の迅速同定. 結核. 1994 ; 69 : 767-772.
  - 6) 宮本潤子, 古賀宏延, 河野 茂, 他 : Hybridization protection assay (HPA 法) を用いた結核菌の迅速薬剤感受性検査. 結核. 1995 ; 70 : 377-383.
  - 7) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. : Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. Antimicrob Agents Chemother. 1993 ; 37 : 2054-2058.
  - 8) 大野秀明, 古賀宏延, 河野 茂, 他 : PCR 法を用いた Rifampicin 耐性結核菌の迅速検出法に関する検討. 結核. 1994 ; 69 : 773-778.
  - 9) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. : The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature. 1992 ; 358 : 591-593.
  - 10) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. : *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 1994 ; 263 : 227-230.