

## 第 69 回総会会長講演

## 抗酸菌症に対する分子生物学的アプローチ

原 耕 平

長崎大学医学部第 2 内科

受付 平成 6 年 11 月 4 日

The 69th Annual Meeting President Lecture

APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGY FOR RAPID  
DETECTION OF MYCOBACTERIA

Kohei HARA \*

(Received 4 November 1994)

The application of molecular biology techniques for the rapid detection of mycobacteria in clinical specimens was evaluated. The DNA probe method was found to be accurate and rapid for identification of mycobacteria, but its low sensitivity needs improving. The nested polymerase chain reaction (PCR) targeting *Pab* gene was specific and sensitive enough for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. The overall sensitivity and specificity of this method were excellent, 97% and 92%, respectively. Additionally, a novel method for the rapid detection of mycobacteria other than *M. tuberculosis* was developed using a combined method of PCR and DNA probe. The gene encoding 16S ribosomal RNA in mycobacteria was first amplified by PCR, and then PCR products were identified using an acridinium-ester labeled DNA probe. This method was as useful as that of the PCR for *M. tuberculosis* described above. The DNA probe method was also applied for drug sensitivity testing, which needs three to four weeks by conventional methods. The quantity of ribosomal RNA in mycobacteria cultured with or without the addition of drugs was compared. Three days after the start of culture, the strains sensitive for isoniazid or rifampicin showed remarkable decreases of ribosomal RNA, compared with the drug-free samples, while the resistant strains showed no difference. Another method for determining the drug resistance of mycobacteria consists of detection of the gene which is related to the resistance. The deletion of catalase-peroxidase gene suggested a gene related to isoniazid resistance was observed in 15% of isoniazid-resistant strains. On the other hand, mutation in the RNA polymerase gene relating to rifampicin resistance was detected in 67% of rifampicin-resistant strains. The application of molecular biology techniques may be an useful future strategy for the diagnosis of mycobacteriosis.

---

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

**Key words :** Mycobacteriosis, Molecular biology, Rapid detection, Drug susceptibility

**キーワード :** 抗酸菌症, 分子生物学, 迅速検出, 薬剤感受性

はじめに

先人の多大な功績により世界の結核症は順調に衰退し、21世紀早々には撲滅宣言が聞かれるのも夢ではない。ところが、近年における結核の歴史は新たな局面を迎えようとしている。つまり、全世界には開発途上国を中心として未だに年間1000万人もの発病者が出ていること、エイズ患者の爆発的な増加に伴う抗酸菌症の流行<sup>1)</sup>、多剤耐性結核菌の蔓延<sup>2)</sup>など、解決すべき問題は今なお山積している。いずれにしても、結核の予防対策、早期診断、早期治療が重要であることに変わりはなく、抗酸菌に対する優れた薬剤の開発とともに、診断の面でも従来の技術を上回る、迅速で正確な診断法の確立が強く望まれてきた。

私たちの教室では、抗酸菌に対する新しい迅速検出法として、近年進歩が著しい分子生物学の技術を応用した方法を検討してきた。本講演ではこれまでの教室の成績を中心に発表するとともに、今後さらに種々の検査に対する応用の可能性も含めて、将来の展望について述べたものである。

1. 結核の現状

日本での結核症は1950年代には300万人、60年代には160万人と多数の患者が発生したが、化学療法の普及とともに以後は毎年10%の割合で罹患率は低下した。しかし、1980年頃から減少傾向に鈍化がみられはじめ、85年以降の年間患者発生数は約5万人台を推移し、ほとんど横ばい状態が続いている。しかも、この傾向が若年者に強いということは、とくに注目すべき問題といえる。

同様の傾向は私たちの教室においてもみられた(図1, 2)。1975年から約18年間の入院患者数と、その中に占める30歳未満の若年者数を調べてみると、85年以降の患者数と若年者数はいずれも減少傾向が鈍化し、若年者の占める割合もほとんど横ばい状態で、むしろ上昇の傾向さえうかがえる。平成4年の結核サーベイランス年報により提起された問題点もやはり同様で、小児結核は著しく減少して先進国並みの罹患率に低下したものの、未だに中高年齢者の罹患率が非常に高く、しかも活動性・感染性の肺結核患者の割合が年々増加していることは、他人への感染の機会も多くなったことを物語っている。実際に20歳代や30歳代の若者に罹患率の小さなピーク

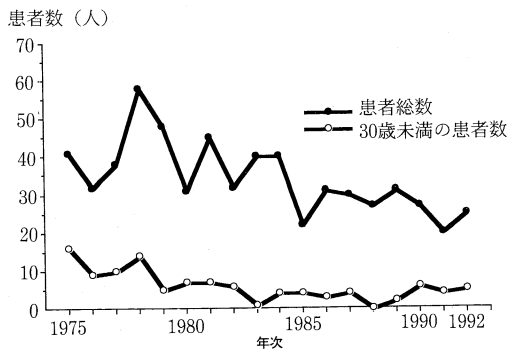


図1 長崎大学第2内科に入院した結核症患者総数の年次推移と若年者結核症患者数

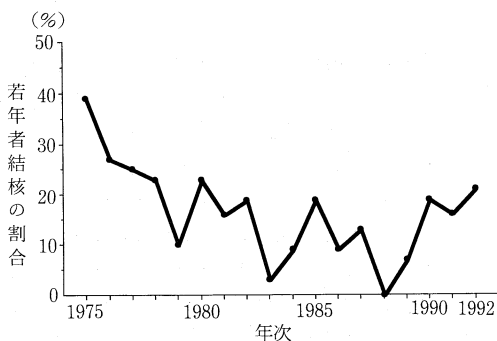


図2 長崎大学第2内科に入院した若年者結核症患者の割合の年次推移

がみられ、中高年者と接する機会が多い若者が、排菌者から容易に感染して発病する危険性が示唆されている。そのほか、今後増加すると予測されるエイズ患者での抗酸菌症、移民・難民・ホームレスの人々の結核、さらにそれらの人々に蔓延する多剤耐性結核菌など、予期せぬ事態が起こり始めている。

2. 結核菌の検出法

約100年前コッホにより結核菌が発見されて以来、染色法や培養技術は急速に進歩した。しかし、残念ながらその後の新しい診断技術の進歩はほとんどなく、菌体成分を検出するための各種クロマトグラフィー法は広く普及するには至らず、また免疫学的に抗体を検出する方法も感染早期の診断には検討の余地を残している。

Ziehl-Neelsen 染色による抗酸菌の塗抹検査は安価

で簡便で、どこの施設でも容易に施行することができる優れた方法である。しかし、低い感度と菌の同定が不可能であるという欠点は避けられない。また、その後が開発された蛍光法は感度の点ではやや改善されたものの、非特異的な反応に対する経験的な熟練を要する。

一方、培養検査には小川培地が通常用いられてきた。感度は良好なもの、培養期間が長いために臨床的な迅速診断には不適當である。また、近年開発された BACTEC 法は培養期間が約半分に短縮できる優れた方法ではあるが、放射性同位元素を使用するために広く普及するには至っていない。さらに近年、小川培地が変わる新しい培養法として期待されているのが MB チェックである。液体培地と固形培地の両者の利点を活かした方法として注目されているが、やはり培養期間の大幅な短縮は困難なようである<sup>3)</sup>。

### 3. 抗酸菌の遺伝子 (DNA) 診断

近年の分子生物学における技術の進歩は著しく、とくに遺伝子の解析技術が急速に進み、各分野での応用が盛んになった。私たちが抗酸菌、レジオネラ、嫌気性菌、マイコプラズマなどの各種感染症の起炎菌検出のために応用し、いわゆる微生物の遺伝子診断あるいは DNA 診断法を開発してきた。この方法は迅速性や特異性に優れており、塗抹・培養法をしのぐ検査法といっても過言ではない。

#### ① DNA プローブ法

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、操作法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。結核菌群と *Mycobacterium avium* complex (MAC) の ribosomal RNA をそれぞれ特異的に検出するプローブが使用され、結核菌では従来の生化学法との間に 100% の一致率がみられた。また、従来法で MAC と同定された菌株の中に別の菌種が約 1% 含まれていたことが判明し、より正確な同定のためには欠かせない方法であると思われた<sup>4)</sup>。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はあるが、欠点として感度の低さが挙げられる<sup>5)</sup>。つまり正確な同定のためには最低でも  $10^5 \sim 10^6$  CFU の菌数が必要で、実際の臨床検体から直接抗酸菌を検出するには不向きである。このような欠点を補うことを目的として、次に PCR の応用を検討した。

#### ② PCR 法

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

作法や器具が簡便なために、短期間のうちに広く普及するに至った。近年では感染症の分野においても盛んに応用され始め、とくに分離・培養が困難なウイルスなどに対する開発が盛んである。そこで私たちは、培養に長期間を要する結核菌に対する PCR の応用について検討した。

PCR で最も重要な因子は primer の設定で、これにより感度と特異性がほぼ決定する。抗酸菌に特異的な各種遺伝子の塩基配列がしだいに明らかになる中で、すでに古賀らが報告したように、38 kDa の蛋白抗原をコードする遺伝子 (Pab 遺伝子) を目的とした PCR が結核菌群に対して最も特異的であった<sup>6)</sup>。一方、感度に関しては、Pab 遺伝子はゲノム中に 1 コピーしか存在しないために、第 1 段階のみの PCR の検出限界は結核菌 DNA 量で 10 pg (菌数による検討では 100 CFU) 程度であった。そこで、臨床応用のためには少しでも感度を上げる工夫が必要となり、第 2 段階の PCR を行う、いわゆる nested PCR を計画した。これによって感度が約 1000 倍上昇し、10 fg (菌数による検討では 0.1 CFU) まで検出が可能となった。

この PCR 法を用いて、Miyazaki らは各種臨床材料から得られた 417 検体中の結核菌の検出を試みた (表 1)<sup>7)</sup>。各検体とも塗抹・培養が陽性の場合には、PCR もほとんど陽性の結果が得られた。一方、塗抹・培養の陽性率が低いといわれている胸水、髄液、腹水、血液、尿などの体液では、塗抹・培養は陰性でも PCR が陽性の検体が少なからず発見された。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からのもので、抗結核薬による治療にも反応したことから、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。総合的には、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うち約 8% は PCR が陽性で特異性は 92% であり、いずれにおいても優れた成績が得られた。

この中でとくに興味深かった症例としては、腹水の PCR が陽性を示した結核性腹膜炎の症例<sup>8)</sup>、あるいは習慣性流産の女性で、搔爬時の子宮内膜と月経血の PCR が陽性であった子宮内膜結核症の症例<sup>9)</sup> などがみられた。これらの症例はいずれも後日培養陽性の結果が確認され、PCR の早期診断に対する有用性が示唆された。

一方、平成 5 年 4 月から約 3 カ月間、宮崎らがフィリピンで PCR を指導する機会を得た。当然のことながら国によって結核症の頻度や検体の種類はかなり異なる。フィリピンでは小児の結核性髄膜炎が多いことから、検体としては髄液が最も多くみられた。PCR が検討された 44 検体での特異性は 94% と高かったものの、偽陰性

表 各種臨床検体からの結核菌検出法の比較

検 体	検 体 数								計
	P C R		+		-				
	培 養		+	-	+	-			
	塗 抹		+	-	+	-	+	-	
喀痰	26	2	5	2				81	116
胸水		4		7		1		98	110
胃液	7	2	5			1		29	44
気管支洗浄液	4	1						28	33
髄液		3		4				25	32
腹水				3				6	9
血液				4				20	24
尿		2		4				22	28
骨髓								4	4
生検組織	1			3				8	12
膿	1	1		1				2	5
計	39	15	10	28		2		323	417

が3検体にみられ感度は77%と低値を示した。この原因について検討したところ、私たちの教室では採取された検体は直ちに-20°C以下に保存され、遅くとも1週間以内に検査が施行されたのに対し、フィリピンでは多くの検体が-20°C以上で長期間放置されたために偽陰性率が23%と高い値を示したものと推測された。つまりPCRの検体はできるだけ低温で短期間の保存に留める必要があるという貴重な経験が得られた。しかし一方で、塗抹・培養が陰性でもPCRが陽性の検体は両国とも7~8%の頻度に見られ、PCRはいずれの国においても有用であることが再確認された。

PCRの有用性は体液中の結核菌を検出するのみでなく、結核性リンパ節炎や腎結核などの生検組織や古い病理標本などからの菌検出にも応用が可能である。さらに、菌の証明のみでなく菌の局在や生体側の免疫反応を観察するために、DNAプローブ法を組織学的に応用したin situ hybridizationを施行することもできる。この方法を用いると、Ziehl-Neelsen染色では同定できなかった抗酸菌も、菌種特異的なプローブにより同定が可能となることから、今後さらに詳細な検討が期待される。

#### 4. PCR法とDNAプローブ法を併用した 抗酸菌の迅速同定法

PCRによる結核菌の迅速検出とともに、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期待され

ている。種々の抗酸菌に対して別々のprimerでPCRを施行する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無駄が多い。そこで、橋本らはPCR法とDNAプローブ法のそれぞれの利点を活かして併用した、新しい抗酸菌の迅速検出ならびに同定法を考案した<sup>10)</sup>。つまり、第1段階として検体中に存在するすべての抗酸菌を検出できるPCRを施行し、陽性の検体のみを選択する。次に第2段階として、増幅されたPCR産物を用いてDNAプローブ(ACCUPROBE)法により同定するという方法である。PCRに用いたprimerは抗酸菌の16S ribosomal RNAをコードする遺伝子を目的としたもので、一般細菌や一部の抗酸菌では陰性で、結核菌群やヒトの非定型抗酸菌症で頻度の高いMACや*M. kansasii*に対しては陽性を示した。本法の感度は良好で、結核菌に対しては10fgまで、MACに対しては100fgまで検出が可能で、臨床的にも良好な成績が得られている。

#### 5. DNAプローブ法を用いた抗酸菌の 薬剤感受性検査

抗酸菌の検出・同定とともに、臨床的に極めて重要な検査は菌の薬剤感受性検査である。通常は薬剤を含有した小川培地に菌を接種して3~4週後にコロニーの有無で判定する。この検査を迅速に行うために、宮本らはDNAプローブ法の応用を検討した。図3のように、薬

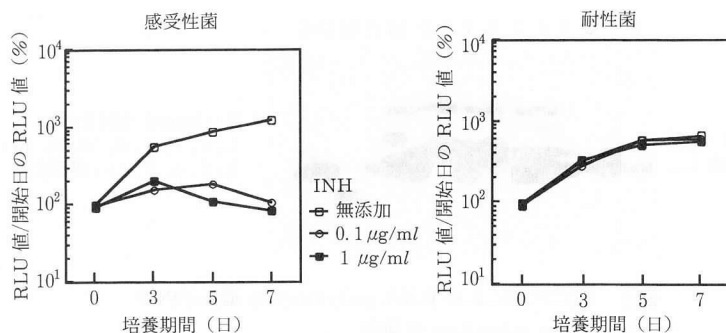


図3 ACCUPROBEによる薬剤感受性検査

剤無添加群とINHを添加した群のACCUPROBEに対する反応性を比較した結果、感受性菌では3日目から無添加群との間に大きな差がみられたのに対し、耐性菌ではほとんど差がみられなかった。この方法を用いると、早くて3日目までに感受性の判定ができるものと期待され、現在さらに詳細に検討中である。

6. 薬剤耐性結核菌の遺伝子診断

DNAプローブ法の応用で薬剤感受性検査の迅速化が確立できるとしても、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。たとえば培養陰性でPCR陽性の検体では薬剤感受性検査は施行できない。そこで、大野らはPCRを用いた耐性菌の判定法について検討を行った。長崎大学中央検査部細菌室および関連施設からINHあるいはRFPに耐性が疑われた結核菌41株を集め、microtiter法による感受性検査を施行するとともに、PCRによるINHあるいはRFPの耐性遺伝子の検出を試みた。まずINH耐性との関連が報告されてい

る catalase-peroxidase 遺伝子の欠損を検出するためのPCRを行った<sup>11)</sup>。その結果、図4のように症例2, 3, 4の株で遺伝子欠損が発見され、これらの株はいずれもINHのMICが64 µg/ml以上の高度耐性菌であった。一方、RFPに対する耐性化とRNA polymerase 遺伝子との関係も注目されており、結核菌や大腸菌ではこの遺伝子内の point mutation が耐性化の原因であると報告されている<sup>12)</sup>。近年、point mutation を容易に検出できる方法として、一本鎖DNAの電気泳動度を比較する方法、いわゆる single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) 法が考案された。この方法により全菌株のRNA polymerase 遺伝子内の変異の有無を検討した結果、図5のように耐性菌ではコントロールと比較して明らかに泳動度の異なるバンドが出現した<sup>13)</sup>。

以上の結果をまとめると(図6), catalase-peroxidase 遺伝子の欠損率はINH耐性菌の中の15%で、とくに高度耐性株に欠損が多くみられた。しかし、欠損株

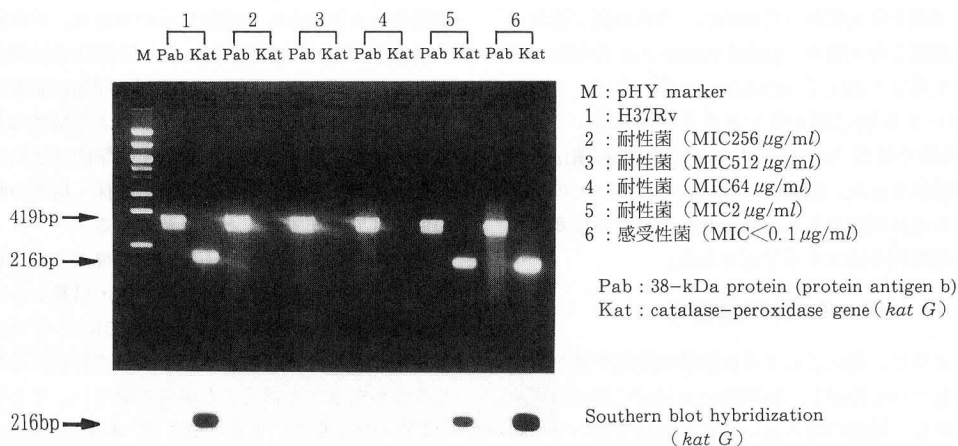


図4 PCRによるcatalase-peroxidase遺伝子欠損の検出

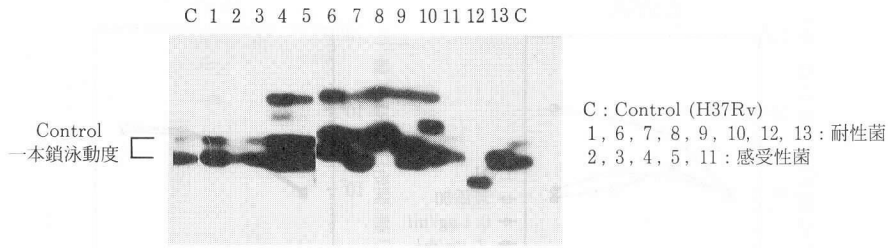


図5 SSCP法によるRNA polymerase 遺伝子内の point mutation の検出

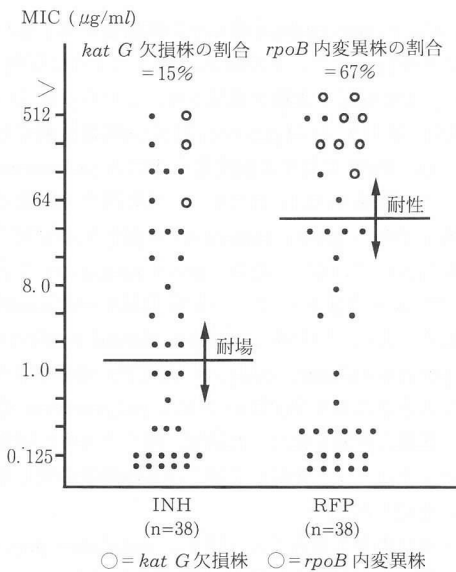


図6 INH と RFP に対する薬剤感受性成績と耐性遺伝子との関係

の頻度が予想よりも低かったために、今後は同じ遺伝子内の別の部位での欠損や、point mutation の有無、あるいは全く異なる遺伝子 (*inhA* gene<sup>14)</sup> など) との関連性についても検討が必要であると思われる。一方、RFP 耐性菌では 67% に RNA polymerase 遺伝子内の変異が検出された。頻度としてはかなり高いもので、臨床応用も充分可能であると思われ、今後さらに変異の部位や塩基配列を決定する予定である。

7. その他の補助診断

以上のように、遺伝子による抗酸菌の同定や薬剤耐性の判定法について検討し、臨床的にも良好な成績が得られた。しかし、検体の中にはいかなる方法を用いても結核菌が証明出来ない場合も少なくない。そのような症例に対しては、補助的診断法としてツベルクリン反応や血

中抗体価の測定など、免疫学的方法に頼らざるを得ない。小川らは結核症における特異的な免疫反応の検討を目的として、結核性胸膜炎患者の胸水中のサイトカインの定量と、免疫担当細胞中の mRNA の検出を試みた。mRNA の検出方法としては、cDNA を合成してから PCR を行う、いわゆる reverse transcription-coupled PCR (RT-PCR) 法を用いた。胸水中のサイトカインの中では TNF $\alpha$  が高値を示した症例が多く、癌性胸膜炎との鑑別においても、また血清中濃度との比較においても有意な上昇を認めた。これを単核球の mRNA レベルで検討してみると、結核性胸膜炎では他の疾患に比べて、強い TNF $\alpha$  の message が胸水にあるいは末梢血中の単核球で観察された。今後この方法が実際に補助的診断法として有用かどうか、さらに多くの臨床例で検討を進める予定である。

おわりに

分子生物学の進歩により DNA の取り扱いが極めて容易になり、PCR による微生物の検出が可能となった。しかし、PCR の感度の良さは長所であると同時に、一歩間違えると欠点となる微妙なものである。すなわち、極めて微量の DNA が汚染しても偽陽性の結果を生む原因となり、検査室においては深刻な問題に発展する。不注意な操作による汚染、エアロゾルによる飛散などを出来るだけ未然に防ぐために、分子生物学的技法に対する取り扱い者の安易な心構えを正し、塗抹・培養の時と同様の慎重さで操作することが必要である。

結核の歴史の中に、分子生物学の導入という新たな 1 ページが加わろうとしている。塗抹・培養から同定と薬剤感受性検査の結果が得られるまでに 2~3 カ月を要した時代から、今まさにすべてを 1 日で判定する時代に変わりつつある、と言っても過言ではない。そして 1 日も早くその日が来ることを切望して、本講演の結びとした。

(終わりに、座長の労をお取り頂いた日本結核病学会

理事長、青柳昭雄先生、ならびに本研究に協力頂いた教室の諸先生方に心から感謝申し上げます。)

### 文 献

- 1) Sunderum G, MacDonald RJ, Maniatis T, et al. : Tuberculosis as a manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). J Am Med Assoc. 1986 ; 256 : 362-366.
- 2) Beck-Sague C, et al. : Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections : factors in transmission to staff and HIV-infected patients. JAMA 1992 ; 268 : 1280-1286.
- 3) 青柳昭雄 : 9. ミコバクテリア感染症. 1. 結核の現状. 日本医師会雑誌. 1993 ; 110 : 198-201.
- 4) Maesaki S, Kohno S, Koga H, et al. : A clinical comparison between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections. Chest. 1993 ; 104 : 1408-1411.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 宿輪三郎, 神谷直昭, 千住雅博, 他 : Polymerase chain reaction (PCR) が診断に有用であった結核性腹膜炎の1例. 日本消化器病学会雑誌. 1993 ; 90 : 2956-2959.
- 9) 橋本敦郎, 古賀宏延, 河野 茂, 他 : PCR 法が診断に有用であった子宮内膜結核症の1例. 結核. 1994 ; 69 : 27-30.
- 10) 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.
- 11) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. : The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature. 1992 ; 358 : 591-593.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.