

症例報告

DNA 診断が有用であった結核症合併エイズの1症例

大友 幸二・菅原 勇

結核予防会結核研究所基礎研究部分子病理学科

増 永 敦 子

東京大学医科学研究所付属病院検査科病理

A CASE OF AIDS WITH PLEUROPULMONARY TUBERCULOSIS IN WHICH PCR WAS USEFUL IN MAKING DEFINITIVE DIAGNOSIS

Koji OHTOMO*, Isamu SUGAWARA
and Atsuko MASUNAGA

A case of 24-year-old male patient with AIDS complicated with pleuropulmonary tuberculosis was presented. It was difficult initially to make a definite diagnosis of tuberculosis by routine sputum culture and pleural biopsy. DNA diagnosis of tuberculosis using PCR is useful in some clinical cases.

Key words : PCR, AIDS, *M. tuberculosis*, DNA diagnosis

キーワード : ポリメラーゼ連鎖反応, エイズ, 結核菌, DNA 診断

はじめに

日本における後天性免疫不全症候群 (AIDS) 症例は年々増加し, その合併症の1つとして抗酸菌感染症も増加の傾向にある¹⁾。AIDSに合併する抗酸菌感染症は全身性で非定型的な結核症状を呈し, 臨床所見からただちに結核を疑うことが困難な場合もあり, あらゆる検体から抗酸菌の検出を行うことをすすめている²⁾。

喀痰の抗酸菌検査陰性。胸水貯留で臨床的に抗酸菌感染症を疑い, 胸水吸引に伴う胸膜生検を施行した。病理組織学的に幼若な肉芽腫で抗酸菌染色陰性のため抗酸菌症と病理確定診断ができなかった。このパラフィン組織切片からDNA診断により結核症と確定診断が可能であった1例を経験したので報告する。

症 例

症 例 : 24歳, 男性。

既往歴 : 小学生の時, 気管支喘息。輸血歴なし。生活面では薬物の使用歴なし。家族は両親, 妹2人ともに健在。

現病歴 : 95年, ザンビアに赴任。9月, 現地女性と親しくなり交際。10月, 1週間にわたる38~39℃の発熱あったが放置。96年11月, 40℃の発熱と頭痛があり, ザンビアの医師と自己の判断でマラリアと考え, クロロキンを服用し, 高熱はおさまったが, 37℃台の微熱と下痢が持続する。97年2月, ザンビアの病院でHIV陽性と判明。3月に帰国し, 19日, 東京大学医科学研究所付属病院に受診。HIV検査のため4月5日まで入院。17日, 外来の定期診察で左胸水貯留を指摘され, 臨床上結核を

別刷り請求先 :

大友 幸二
結核予防会結核研究所基礎研究部分子病理学科
〒204-0022 東京都清瀬市松山3-1-24

* From the Molecular Pathology Division, The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-tuberculosis Association, 3-1-24 Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204-0022 Japan.

(Received 26 Dec. 1997/Accepted 8 Apr. 1998)

表1 入院時検査所見

Hematology		Serology		Chemistry	
WBC	5980 / μ l	IgG	1501 mg/dl	T-P	6.9 g/dl
Ly	34.3 %	IgA	443 mg/dl	Alb	4.1 g/dl
CD4	437 / μ l	IgM	111 mg/dl	GOT	24 IU/l
CD8	894 / μ l	CMV-IgG	(+)	GPT	32 IU/l
		CMV-IgA	(+)	LDH	353 IU/l
T4/T8 ratio	0.48	EBV-IgG	(\times 80)	ALP	191 IU/l
		EBV-IgM	(\times 10)	LAP	71 IU/l
Hb	16.1 g/dl	HCV	(-)	AMY	136 IU/l
		HBV	(-)	ZTT	20.9 U
		<i>Cryptococcus</i>	(-)	TTT	8.4 U
		<i>Candida</i>	(-)	BUN	8.1 mg/dl
		<i>Toxoplasma</i>	(-)	TG	181 mg/dl
		W.'s reaction	(-)	Tcho	118 mg/dl
Other					
Tuberculin reaction		10 \times 9/28 \times 26 mm			
Sputum : Smear, culture		- <i>Mycobacterium</i> (-)			

表2 胸水検査所見

Cells	8500 / μ l
Rivalta	(+)
Protein	5.3 g/dl
Glucose	82 mg/dl
TG	32 mg/dl
Tcho	83 mg/dl
AMY	97 IU/l
LDH	896 IU/l
ADA	63.1 IU/l
<i>Mycobacterium</i> :	
Smear	(-)
Culture	(-)

疑われ入院。INH 0.3g, RFP 0.45g, PZA 1.5g, EB 1.0g の4剤で治療開始。18日, 胸膜生検と胸水検査を施行。21日, 病理組織診断で結核ないしMACを考え, 抗酸菌染色を行い陰性のため確定診断できず。パラフィン切片より *M. tbc*, MAC のDNA診断を当研究所に依頼。23日, *M. tbc* (+), MAC (-) と報告。5月15日, 治療効果あり全身状態良好で退院。

入院時身長176cm, 体重58kg, 体温36.7°C, 脈拍92/分, 整。

入院時検査成績(表1), 血液学的検査は白血球5980/ μ l, リンパ球34.3%。リンパ球分画はCD4 437/ μ l, CD8 894/ μ l, T4/T8比0.48, と低下を認めた。ヘモグロビン16.1g/dl。

血清学的検査はIgG 1501mg/dl, IgA 443mg/dl, IgM 111mg/dlと正常範囲内。CMV, EBV陽性。HCV, HBV, *Cryptococcus*, *candida*, *Toxoplasma*, W.'s反応は陰性。

生化学検査は総コレステロール118mg/dlとやや低めであったが他は正常値範囲内。

ツベルクリン反応陽性。喀痰で塗抹, 培養とも抗酸菌陰性。

4月18日の胸水検査所見(表2): 細胞数8500/ μ lと増加。リバルタ反応陽性。ADA 63.1IU/lと高値を示した。塗抹で抗酸菌, 陰性。

レントゲン所見: 4月17日外来受診時, 左胸水貯留を認めた。肺野に病変は認められなかった(図1-a)。5月15日退院時レントゲン写真(図1-b)。抗結核剤治療後, 左胸水は消失し, 著明に改善を認めた。

左胸膜生検病理組織診断(図2): 多数の炎症性細胞浸潤からなる類上皮細胞肉芽腫を形成し, その中に多核巨細胞が散見される。壊死病変は見られず, 典型的な結核病変ではないが, *M. tbc*やMACが疑われる。特殊染色で抗酸菌, 真菌, ニューモチスチス・カリニは陰性。

組織切片の脱パラフィンとDNAの抽出: 生検パラフィン組織をエタノール消毒をしたミクロトーム・ナイフで6-7 μ mの厚さの切片6枚を1.5mlエッペン・チューブにとり, キシロール1ml, 2回, 純アルコール1ml, 2回, 95%アルコール, 70%アルコールと順次試薬を移し, 各段階で混和, 遠心(12000G, 5分)沈殿し, ペレットを室温乾燥した。DNA抽出は, nucleon II

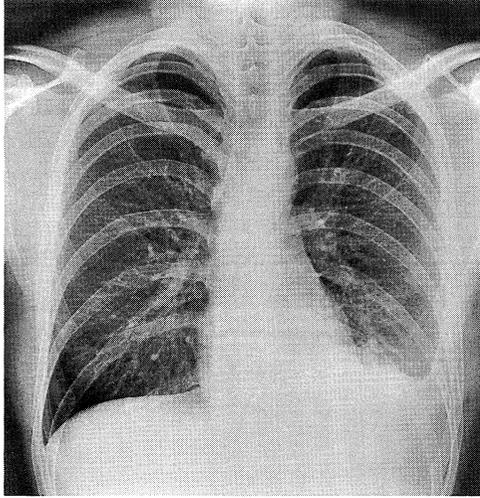


図 1-a 外来受診時レントゲン所見

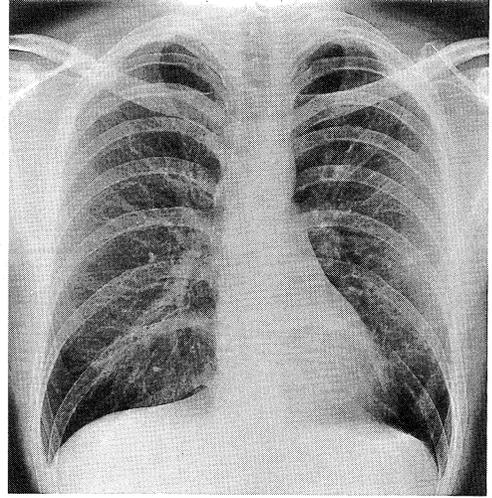
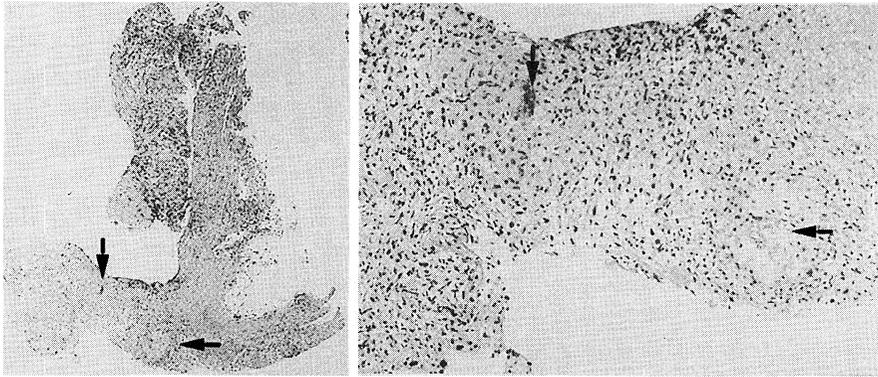


図 1-b 退院時レントゲン写真



対物×4

対物×40

矢印は多核巨細胞

図 2 左胸膜生検病理組織

(SCOTLAB社)を多少改良して用いた。簡単に述べると、①抽出緩衝液 600 μ l に、20mg/ml Proteinase K 30 μ l 加え、55 $^{\circ}$ C一晩。②10mg/ml RNase A 10 μ l, 37 $^{\circ}$ C 30分。③5M Sodium Perchlorate 室温30分後、65 $^{\circ}$ C 25分。④クロロホルム 550 μ l 加え、室温10分。2500rpm 1分。⑤Nucleon silica 80 μ l 加え3250rpm 3分。⑥上清を新しいチューブに移し、95%アルコール等量加え、14000 rpm 10分。⑦ペレットにして70%。アルコール 1ml, 14000 rpm 10分。⑧ペレットを乾燥後 50-100 μ l の TE (10mM Tris-1mM EDTA) で溶解した。

TB1-2 = *M. tuberculosis* 19KD antigen (320bp)

5'-⁹⁸¹AGCACGGCGATTGGAGTC¹⁰⁰⁰G-3'

5'-¹³⁰⁰ATCGTTTTCCGGCGGTATCT¹²⁸¹G-3'

IS6110 = *M. tuberculosis* (541bp)

5'-¹⁰⁵GTGCGGATGGTCCGACAGAGA¹²⁴T-3'

5'-⁵⁴⁵CTCGATGCCCTCACGGTTC⁶²⁶A-3'

AVI 1-2 = *M. avium* (275bp)

5'-¹⁶³AAG GACTTCACCTTCGTCT¹⁸²G-3'

5'-⁴³⁷AACTGGATCTCGTTGTTCCG⁴¹⁸G-3'

図 3 Primer Sets

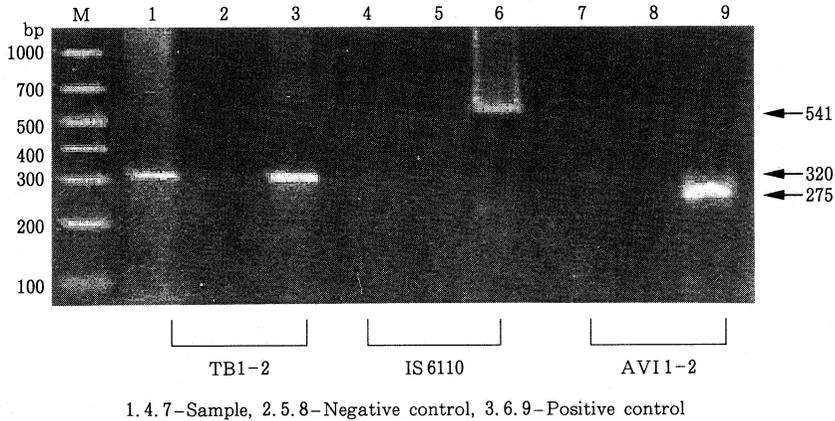


図4 左胸膜生検組織のPCRの結果

PCR: 試薬は AmpliTaq Gold with GeneAmp (PERKIN ELMER 社) を用い、プライマー (図3) は *M. tbc* の検索に TB1-2 (320bp) と IS6110 (541bp) を、MAC の検索には AVI1-2 (275bp) を用いた。PCR の条件はプレヒート 95℃, 10分。ディネーチャ 94℃, 1分。アニーリング 60℃, 1分。エクステンション 72℃, 2分の40サイクルで増幅した。

PCRの結果 (図4): 左胸膜生検組織のPCRの結果を示す。1~3はTB1-2のプライマーを4-6はIS6110のプライマーを、7-9はAV1-2プライマーを使用して検出した。1, 4, 7はサンプルで、2, 5, 8はネガティブ・コントロール、3, 6, 9はポジティブ・コントロールとした。サンプルの1レーンはTB1-2で320bpに陽性のバンドがみられる。4, 7レーンのIS6110とAV1-2では陰性であった。IS6110は541bpと長いため、パラフィン組織からの抽出DNAではPCRの増幅が困難な場合があり、このことを考慮に入れて、*M. tbc* と判定した。

考 察

AIDSの増加に伴い、日和見感染による種々の原因菌の特定が問題となっている。その合併症の1つとして抗酸菌感染症も増加の傾向にある¹⁾。AIDSに合併する抗酸菌症は全身性で非定型的な胸部X線写真所見、ツ反陰性、肺外病変を呈する場合があります。臨床所見からただちに結核を疑うことが困難な症例があるので、あらゆる検体からの培養だけでなく、Polymerase chain reaction (PCR) も用いて結核菌の検出を行うべきである²⁾。結核症を合併したAIDS症例の予後は10例中5例は死の転機をとっており、結核症が著しく予後を悪化さ

せている^{3) 4)}。AIDSにおける抗酸菌感染合併症例の早期診断が重要である⁴⁾。また、病理解剖所見では生前結核菌が証明されながら組織所見では結核病巣が見つかりにくい。結核病巣はリンパ球の浸潤、肉芽腫形成も乏しく定型的結核肉芽腫としての特徴を欠く³⁾。病理組織学的に従来の診断基準では確定診断が困難な場合も多々あり、多くの異なった検出方法を取り入れるべきと考える。

胸水の塗抹検査で抗酸菌陽性は少なく培養を合わせても15%以下⁵⁾、特に初期結核性胸膜炎の診断が得られず、胸水の細胞分画、生化学所見、ADA値、CEA値を参考に治療診断がなされることが少なくない⁶⁾。Witらは、84人の結核性胸水を検索し、胸水中の結核菌検出はPCR、培養、生検組織培養、生検組織検査はそれぞれ81%、52.8%、69.8%、77.3%と高感度の報告をしている⁷⁾。Vermaらは38人の結核性胸水のGC-rich repetitive sequenceのPCR陽性率は(63.2%)、生検組織検査73.3%としている⁸⁾。また、LassenceらはDNAの抽出を2法行い、プローブをIS6110を用いたPCRでは9/15(60%)、65Kdでは3/15(20%)と報告している⁹⁾。布施川らは胸水培養、ナイアシンテスト陽性検体中IS6110遺伝子で3/4(75%)、アンプリコアで1/4(25%)であったと報告している。アンプリコアの低感度はDNAの抽出過程が従来法に比べて省略され、インヒビター(ヘモグロビン、ヘパリン等)の存在を指摘している⁶⁾。

研究者によりPCRの感度は20~81%と大きなひらきがある。微量のDNAを確実に抽出すること、阻害物質を除去すること、用いるプライマーの選択などが感度を左右し、これらの条件を考慮することによりPCRの

感度と安定性を高めることができると考える。

今回の症例は、喀痰で抗酸菌検査陰性であったが、胸水貯留と胸水検査所見で臨床学的には抗酸菌症を疑い、治療を開始している。治療前に他の合併症との鑑別ができれば臨床的に、早期に的確な治療ができる。今回の経験から病理学的に幼若な肉芽腫で、抗酸菌染色陰性例でもDNA診断まで行うことを推奨したい。

本報告の一部は、第132回日本結核病学会関東支部地方会にて報告した。

文 献

- 1) 森 亨：日本におけるHIV感染抗酸菌症の実態，厚生省・厚生科学研究費補助金エイズ対策研究推進事業「エイズと日和見感染に関する臨床研究 平成7年度研究報告書」，1996，102-106.
- 2) 永井英明：HIV感染と抗酸菌症．医療．1997；6：251-255.
- 3) 藤野忠彦：エイズに合併する抗酸菌の病態に関する研究．厚生省・厚生科学研究費補助金エイズ対策研究推進事業「エイズと日和見感染に関する臨床研究 平成7年度研究報告書」，1996；107-111.
- 4) 中田 光：医学と医療の最前線—エイズと結核—．日本内科学会雑誌．1996；85（1）：129-34.
- 5) 青柳昭夫：結核の各病型—結核性胸膜炎—．臨床と微生物．1989；16：434-37.
- 6) 布施川久恵，宮地勇人，大島利夫，他：胸水，胃液からのPCR法による結核菌検出—IS 6110 遺伝子とアンプリコア™マイコバクテリウムの比較—．臨床病理．1995；43：9. 941-47.
- 7) de Wit D, Maartens G, Steyn L: A comparative study of the polymerase chain reaction and conventional procedures for the diagnosis of tuberculous pleural effusion.: Tubercle & Lung Disease. 1992；73（5）：262-7.
- 8) Verma A, Dasgupta N, Aggrawal AN, et al.: Utility of a *Mycobacterium tuberculosis* GC-rich repetitive sequence in the diagnosis of tuberculous pleural effusion by PCR, Indian Jou biochem biophy. 1995；32（6）：429-36.
- 9) de Lassence A, lecosier D, Pierre C, et al.: Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid patients with tuberculous pleurisy by muans of the polymerase chain reaction: comparison of two protocols Thorax. 1992；47（4）：265-9.