

第75回総会シンポジウム

結核—分子遺伝学からのアプローチ

¹長谷川好規 ²阿部千代治 ³飯沼 由嗣 ⁴鈴木 定彦
²高橋 光良 ⁵水口 康雄

¹名古屋大学医学部第一内科, ²結核予防会結核研究所, ³名古屋大学附属病院検査部,
⁴大阪府立公衆衛生研究所, ⁵千葉県衛生研究所

The 75th Annual Meeting Symposium

MOLECULAR GENETIC APPROACHES TO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

^{1*}Yoshinori HASEGAWA, ²Chiyoji ABE, ³Yoshitsugu IINUMA, ⁴Yasuhiko SUZUKI,
²Mituyoshi TAKAHASHI, and ⁵Yasuo MIZUGUCHI

¹First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine,
²Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association,
³Department of Clinical Laboratory Medicine, Nagoya University Hospital,
⁴Department of Pathology, Osaka Prefectural Institute of Public Health,
⁵Chiba Prefectural Institute of Public Health

Recent progress of molecular genetics has been providing tools for new approaches to disease treatment and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. In 1998, Cole et al. reported the complete genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis*. The new information will provide us the knowledge and understanding of the biology of *Mycobacterium tuberculosis*. Further, it will provide us new conception of diagnosis and treatment of the disease. Four topics were selected in this symposium. Dr. Iinuma reviewed and prospected the clinical utility of nucleic acid amplification methods of *Mycobacterium tuberculosis*. Dr. Suzuki reviewed the molecular mechanism of acquired resistance to anti-TB drugs and reported the early detection of genetic mutation by new designed DNA tip method. Dr. Takahashi reviewed the method of molecular epidemiology and genetic elements as a tool for strain differentiation of tuberculosis. Dr. Mizuguchi interpreted the essential feature of mycobacterial genome maps, and genes and their biological activity. He also reviewed the importance and the utility of the complete genome sequence of tuberculosis in association with pathogenicity. These topics were summarized in this report, based on the symposium of "Molecular genetic approaches to *Mycobacterium tuberculosis*" in the 75th annual meeting of the Japanese Society for Tuberculosis.

* 〒466-8550 愛知県名古屋市長和区鶴舞町65

* 65, Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-8550 Japan.
 (Received 23 Oct. 2000)

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Molecular genetics, Gene amplification, Drug resistant gene, Molecular epidemiology, Genome sequence

キーワード: 結核, 分子遺伝学, 核酸増幅法, 薬剤耐性遺伝子, 分子疫学, 遺伝子配列

はじめに

近年の生物学の発展における分子生物学の果たした役割は大きく、医学の分野においても分子生物学的手法を用いた病態の解明や診断が開始され、さらには治療の分野にまでその応用が進められてきている。結核研究においても例外ではなく、結核菌自体のゲノム研究ばかりでなくすでいくつかの分子遺伝学的研究の成果が臨床に応用されてきている。結核菌のいわば設計図であるゲノムの全塩基配列が、1998年に Coleらによって発表されたが¹⁾、このような急速な進歩を遂げている結核菌のゲノム医学を背景とした今後の新しい結核研究とその臨床応用を展望することを目的として、第75回日本結核病学会では“結核—分子遺伝学からのアプローチ”と題するシンポジウムが企画された(座長 阿部千代治, 長谷川好規)。本稿では、シンポジウムで取り上げられた4つの話題; 1. 結核診断における核酸増幅法の位置づけ(飯沼由嗣), 2. 結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子の解析と迅速診断への応用(鈴木定彦), 3. 結核菌の分子疫学における現状と展望(高橋光良), 4. 結核菌におけるゲノム解析とその有用性(水口康雄)に関する各著者の研究とレビューについて報告する。

1. 結核診断における核酸増幅法の位置づけ

結核の診断技術は、核酸増幅法の応用により飛躍的に進歩した。しかし、その適応基準は一定のコンセンサスが得られていない。当初主として研究施設独自の(in-house) PCR (Polymerase Chain Reaction) が行われてきたが、現在は PCR 法 (AMPLICOR, Roche Diagnostic), TMA (Transcription Mediated Amplification) 法 (Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test, MTDR, Gen-Probe), SDA (Strand Displacement Amplification) 法 (BD ProbeTecR, Beckton Dickinson), LCR (Ligase Chain Reaction) 法 (LCX probe systemR, Abbott) など数多くの核酸増幅系の検出キットが発売され臨床の現場で利用されている。現在適応が認められているのは肺結核(疑)患者の喀痰および気管支洗浄液のみであるが、その感度については塗抹陽性培養陽性検体に関しては95%以上の非常に良好な結果が

得られているものの、塗抹陰性培養陽性検体では50~100%と結果のばらつきが大きい。特異性については、極めて良好であるが(98%以上)、化学療法開始後の検体では、死菌の遺伝子をも検出するため、偽陽性が出現する²⁾。肺外結核に関しては胸水、髄液など阻害物質が多く、菌量が少ない検体における核酸増幅法の応用が期待されているが満足いく結果は得られていない。Sequence Capture-PCR法による胸水中の結核菌の検出感度の向上が期待されており、さらなる検討が期待される³⁾。さらに新しいPCR技術であるリアルタイムPCR法が開発され、菌のviability診断のための定量的mRNA PCR検査により治療効果をみる試みがなされており、今後の研究の発展が期待される⁴⁾。しかし核酸増幅法は施設間により感度特異度に大きな差がみられることも事実であり、核酸増幅検査は今後さらに改良を重ねる必要があり、従来法(塗抹、培養)をreferenceとした精度 monitoring は現時点では必須である。

2. 結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子の解析と迅速診断への応用

薬剤耐性菌の蔓延を未然に防ぐためには迅速かつ簡便な耐性菌鑑別法が重要である。しかし成長速度の非常に遅い結核菌では通常の培養法では結果が得られるまでに長時間を要する。より迅速に耐性菌鑑別を行うためには遺伝子診断技術の導入が必要となる。これを可能とするためには耐性結核の成立機序を理解し、結核菌の薬剤耐性とそれに関与する遺伝子に関するデータの蓄積が不可欠である。結核菌の薬剤耐性のメカニズムについては早くから研究が行われてきている。結論として、結核菌における薬剤耐性は、他の細菌で見られるような、R-プラスミド、トランスポゾン等で伝播されるものでなく染色体上の遺伝子のそれぞれの薬剤の作用点あるいは活性化酵素に個々に変異が入った結果起こるものであることが判明している。それらの変異は以下の遺伝子上に見いだされている⁵⁾。

- (1) イソニアジド耐性: *KatG*, *inhA*, *ahpC/oxvR* 遺伝子
- (2) リファンピシン耐性: *rpoB*
- (3) ピラジナミド耐性: *pncA* 遺伝子
- (4) エタンプトール耐性: *embB* 遺伝子

- (5) ストレプトマイシン耐性：*rrs*, *rpsL* 遺伝子
- (6) カナマイシン耐性：*rrs* 遺伝子
- (7) キノロン系薬剤耐性：*gyrA* 遺伝子

現在、これらの情報を迅速診断法へと展開する試みが数多くなされている。実際に結核菌に応用されたものとしてPCR産物の直接塩基配列決定法、1本鎖DNA二次構造多型法、ヘテロ-デュプレックス法、PCR-RFLP法、分子ビーコン法等がある。これらの方法はそれぞれ長所と短所を併せ持った方法である。

本研究では、これらの方法の短所を補うことのできる方法の開発をめざしてDNAチップテクノロジーの導入を試みた(鈴木)。薬剤耐性に関与する遺伝子上の1塩基変異を検出できるハイブリダイゼーション法を目的として開発したDNAチップには各薬剤ごとに1つのブロックとして、それぞれの左端1列には感受性型、その右側には耐性型の15から20塩基からなるキャプチャーオリゴヌクレオチドを配置した。PCRによりプローブを合成し、これを用いてハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより耐性の判定を行ったところ90%のRFP耐性結核菌の検出が可能であった。またSM, KMおよびINHでは60~80%の耐性菌の検出が可能であることがわかった⁶⁾。

3. 結核菌の分子疫学における現状と展望

結核菌のゲノム内にランダムに挿入されているIS6110をプローブとしたRFLP分析が感染源追跡のための疫学的なマーカーとして利用できることが報告されている。ISの安定性については同一患者排菌例の29%が90日間で1本のバンドの変異が認められている⁷⁾。ISコピー数を1から5本保有している結核菌での疫学的な一致率は低く、この理由はIS6110がゲノム上のhot-spot regionと呼ばれる特異的な部分に挿入されるためと考えられており、二次的な‘分子時計’であるDR配列およびPGRS配列を用いる方法により再分析が可能となった。RFLPの手法がDNAのマイクログラム量で行っているために、現行では培養陽性菌に限られる。そのためにPPD陽転になった感染者の追跡はできないし、生菌からDNAを抽出することが要求されるので時間の浪費と特殊なバイオセーフティーの実験室が必要となる。RFLP分析の応用には次のようなものがある。

- (1) 検査室でのcross-contaminationの証明⁸⁾
- (2) 再燃と再感染の区別
- (3) 感染様式・感染源追跡の研究(分子疫学)
- (4) 薬剤感受性菌の耐性獲得後における菌の同一性を確認する場合
- (5) 結核菌流行株の解析
- (6) *M. bovis* BCG Tokyoと結核菌の分別⁹⁾

(7) 結核菌の系統発生的解析

特に感染源追跡は各国の結核対策の現状を把握するために重要である。分子疫学は集団発生で感染源追跡を決定する補助や結核対策を評価する手段としてこれら両者を統合して行うことが有意義であると思われる。分子疫学は結核症の伝統的な疫学で生じた疑問を理解したうえで、科学的な有用性が付与され、種々のリスク因子を決定すべきであり、結核対策に密接に関係している重要な分析方法である。近年、spoligotypingで評価した結果、国により特異的なパターンを取ることが判ってきており、ISタイピングの特異パターンとの併用で薬剤耐性結核の由来等のモニタリングに利用できそうである。世界的にコンピュータを用いた患者管理を行っている。その結果、分析後同一パターンのクラスター解析から集団感染を予測して迅速な予防内服や対策を推進している¹⁰⁾。将来的に本邦でも分析管理部門と対策を行う自治体を分業したコード番号での管理体制が望まれる。

4. 結核菌におけるゲノム解析とその有用性

(1) 結核菌のゲノムの全構造とその特徴¹⁾

結核菌のH37Rv株のゲノムサイズは4,411,526bpで3,924個の遺伝子を持つとされる。これらの遺伝子が働くことにより結核菌が結核菌としての機能を発揮していることになる。このうち、約40%の遺伝子は既存のデータベースとの比較からその機能は明らかで、44%はその機能の推定が可能であり、残りの606個(16%)のものが機能不明であったとされる。そのほかにもプロファージの存在や、挿入配列の存在などH37Rv株のもつ特徴が種々明らかになった。特に結核菌がどのような代謝経路を有するか、その多くのものが明らかになったことで結核菌に対する理解が格段に深まったといえる。

(2) ゲノム解析結果の有用性¹¹⁾

これらの結果を利用することにより、個々の遺伝子の機能の解明(特に機能不明の遺伝子)、特定の遺伝子のクローニング、特定の遺伝子への変異の導入などに加えて、結核菌の病原性に関与する遺伝子の解析、免疫に関与する遺伝子、ワクチンの開発、抗結核化学療法剤の開発への利用、菌種内や菌種間のvariationの解明、菌の分類・同定・迅速診断への応用、などの新しい研究領域が開かれることを考えると、その意義は非常に大きいといえる。

(3) 結核菌の病原性の遺伝学¹²⁾

これらの研究領域の中で特に大きな興味を持たれるものの1つとして、結核菌の病原性に関与する遺伝子の同定が挙げられる。病原性に関与する遺伝子を特定する方法も種々考え出されており、これらの方法を駆使して、すでに多くの病原体で病原性に関与する遺伝子の解析が

行われている。結核菌においても多数の遺伝子産物が関与している可能性を示すデータが蓄積されつつある。

ま と め

結核菌のゲノムの全塩基配列が明らかにされてきたわけであるが、これですべてが分かったわけではなく、むしろ研究の新しい始まりであると考えられる。機能が不明な遺伝子の解明、またそれぞれの遺伝子がどのように関わり合いながら発現やその制御を行っているのか、病原性との関わりは何か、さらにはこれらの情報をどのように臨床に応用していくのかなどのさまざまな課題が山積みされている。今後は、これまでの遺伝子配列そのものの解析から、結核遺伝子の機能解析へと研究の重点が移って行くことが予想される。結核菌のゲノム医学を背景とした今後の新しい結核研究とその臨床応用のさらなる発展を期待したい。

文 献

- 1) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1999; 393: 537-544.
- 2) American Thoracic Society Workshop: Rapid diagnostic tests for tuberculosis, What is the appropriate use? *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155: 1804-1814.
- 3) Mangiapan G, Vokurka M, Schouls L, et al.: Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 1209-1215.
- 4) Desjardin LE, Perkins MD, Wolski K, et al.: Measurement of sputum *Mycobacterium tuberculosis* messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160: 203-210.
- 5) 鈴木定彦, 田丸亜貴, Amin Ruhul, 他: 結核菌の薬剤耐性獲得機序の解析と迅速診断への展開. 防菌防黴. 2000; 28: 561-573.
- 6) 鈴木定彦, 市原竜生, 田丸亜貴, 他: DNAチップによる結核菌の耐性診断. *Bio Industry*. 2000; 17: 36-44.
- 7) Yeh RW, de Leon AP, Agasino CB, et al.: Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis*. 1998; 177: 1107-1111.
- 8) 伊藤邦彦, 高橋光良, 吉山 崇, 他: 病院検査室における結核菌培養の Cross-contamination. *結核*. 1999; 74: 777-788.
- 9) Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, et al.: Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol Immunol*. 1993; 37: 289-294.
- 10) Gregory B, Woelffer BA, William Z, et al.: A computer-assisted molecular epidemiologic approach to confronting the reemergence of tuberculosis. *Am J Med Sci*. 1996; 311: 17-22.
- 11) Hatful FH, and Jacobs WR (eds): *Molecular genetics of Mycobacteria*. ASM press, Washington D.C. 2000.
- 12) Pelicic V, Reytrat JM, Gicquel B: Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol*. 1998; 28: 413-420.