

## 結核菌群遺伝子検査に関する最近のトピックス

うわ みの よし ふみ は せがわ なお き  
 上 蓑 義 典<sup>1,2)</sup> : 長谷川 直 樹<sup>2)</sup>  
 Yoshifumi UWAMINO Naoki HASEGAWA

## はじめに

微生物検査の領域において、現在最も成長を遂げつつある分野が遺伝子検査である。各社が競って、全自動遺伝子検査や迅速遺伝子検査法の開発および臨床応用を進めており、保険収載される項目も徐々に増えてきている。

結核菌の検出は、診療上および感染管理上も迅速性が要求されるが、結核菌群の発育は緩徐であることから、通常の培養・同定法を用いてもある程度の早期診断が可能な一般細菌感染症に比べ、遺伝子検査を用いて少しでも早く菌の存在や薬剤耐性を検知することが重要になってくる。その意味で、結核菌群の遺伝子検査は、臨床現場からの要求も高く、市場規模も大きい領域と言え、諸外国に比べるとやや遅まきながら着実に変化を遂げつつある。

今回、抗酸菌検査ガイド 2016 の出版以降に新たに結核菌群検出遺伝子検査のラインナップに加わった試薬について紹介するとともに、結核菌群の薬剤耐性遺伝子検査として保険収載され利用可能となった試薬について紹介する。

## I. 全自動遺伝子検査の発展

喀痰や気管支肺胞洗浄液検体に対する結核菌群遺伝子検査は、現在、結核の診断に必須である。多くの医療施設において、抗酸菌塗抹染色検査陽性の際に、結核菌群遺伝子検査を実施し、陽性であれば活動性結核と診断する、というプラクティスは常識と

して定着している。この点では、結核菌群遺伝子検査は“常識”の領域まで普及した唯一無二の微生物遺伝子検査ともいえる。

この結核菌群検出遺伝子検査の市場はロシュ・ダイアグノスティクスよりリアルタイム遺伝子解析装置コバス Taqman48 用試薬として、2006 年に販売開始されたリアルタイム PCR 試薬であるコバス Taqman MTB が圧倒的なシェアを占める状況が続いてきた。本製品は、最大 48 検体の同時処理が可能であることや、大量処理時の 1 テストあたりの価格が比較的安価であるという特徴を持つ。さらに、診断薬として承認を得ている検体種が非常に幅広いこと、*Mycobacterium avium complex* に対する核酸検出も同一装置で結核菌群と並行して検査可能である等の優位性がある。しかしながら、Hands on time が 3 時間を要すること、核酸抽出、前処理の過程でいくつかの用手的過程を要することから、検査技師の多い施設においてはバッチ処理にて検査を行う場合が多く迅速検査となりにくい状況にある。

そこに、検査過程を自動化迅速化することにより検査室の負担を軽減し、検査の随時性迅速性を向上させたのが TRC (transcription reverse transcription concerted reaction) 法を用いる TRC Ready M.TB (東ソー) や PCR 法の増幅、検出を自動で行う GENE-CUBE (東洋紡) である。これらの登場により結核菌群遺伝子検査は所要時間 1 時間前後にまで短縮された。また、NALC (N-acetyl-L-cystein)-NaOH 処理済み検体から比較的容易に結核菌群核酸遺伝子検査を行うことが可能となった。

さらに、栄研化学の開発した LAMP (Loop-Mediat-

1) 慶應義塾大学医学部臨床検査医学  
 2) 慶應義塾大学医学部感染制御センター  
 ☎160-8582 東京都新宿区信濃町35

Department of Laboratory Medicine,  
 Center for infectious diseases and infection control,  
 Keio University School of Medicine  
 (Shinanomachi 35, Shinjuku-ku, Tokyo)

ed Isothermal Amplification) 法は迅速性、簡便性と装置の小型化により、結核菌群遺伝子検査を小規模医療機関でも迅速に行える検査にまで変貌させた。LAMP 法は等温増幅および濁度測定を行うことにより検出するため検出装置が非常にシンプルで小型であり、また検出時間も短時間となっている。さらに PURE (Procedure for Ultra Rapid Extraction) 法による簡易な核酸抽出法を組み合わせることで、全自動遺伝子検査装置に匹敵する用手過程の省略および簡略化を実現した。また導入コストも低く、専門外の技師であっても短時間で遺伝子検査を行うことが可能となった。実際に、多くの中規模医療機関で外来における結核のスクリーニング検査として LAMP 法が行われるようになった。

さらに、2016 年秋に 2 種類の結核菌群核酸遺伝子試薬が販売開始された。富士フイルム和光純薬のミュータスワコー MTB とセフィエドの Xpert MTB/RIF である。いずれも全自動遺伝子検査の名のとおり極めて少ない用手操作で検査可能という特色を持つ。

### 1. ミュータスワコー MTB

ミュータスワコー MTB は 2016 年 12 月 8 日に販売開始された。全自動遺伝子検査装置ミュータスワコー g1 用 PCR 検査試薬である。分析に必要な混合・攪拌・洗浄・分離・検出等の操作を数センチほどのチップ上で行う  $\mu$ TAS (micro Total Analysis System) 技術を使用しており、マイクロチップ内で PCR 法により増幅した産物をキャピラリーゲル電気泳動を行い測定する。

適応検体種は喀痰および培養液であり、喀痰を用いる場合 NALC-NaOH 処理済み喀痰を使用する必要がある。しかし、NALC-NaOH 処理後は、サンプルを抗酸菌前処理液に添加し転倒混和、静置を行った後、機械に試薬カートリッジとチップ核酸精製キットとともに架設すれば、PCR 反応から測定まで全自動で完了する。測定時間は約 45 分であり、4 検体同時測定が可能である。

臨床検体を用いた評価ではメーカーによる 147 検体を用いた臨床性能評価試験でコバス Taqman48 との一致率 98.6% と報告がある<sup>1)</sup>。また、亀田総合病院での臨床検体を用いた評価ではコバス Taqman48 との一致率 98.9%、液体培養法との一致率 94.5% と報告されている<sup>2)</sup>。

本製品は *M. avium*, *M. intracellulare* 検出試薬であるミュータスワコー MAC も発売されており、抗酸菌全般の遺伝子検査を全自動化・迅速化するには利便性の高い製品であるが、NALC-NaOH 処理を必要とすることと検体種が喀痰と培養液に限られるため、胃液や気管支肺胞洗浄液検体に対して使用しづらいという点に留意が必要である。

### 2. Xpert MTB/RIF

Xpert MTB/RIF は 2016 年 11 月 1 日に販売開始された。本製品はすでに 2011 年に WHO が recommendation を出し、途上国の結核診断を中心に幅広く活用されてきた。米国でも 2013 年に FDA の承認を得ており、さらに 2015 年には喀痰の Xpert MTB/RIF 検査 2 回陰性をもって隔離解除の判断にしていとの適応拡大まで取得している。そのような国際的な状況の中でようやく日本でも認可販売された。

全自動遺伝子検査装置 Gene Xpert システム用リアルタイム PCR 検査試薬は、カートリッジ型の試薬となっており、カートリッジ内で核酸抽出からリアルタイム PCR 反応および検出まで完結する形となっている。

適応検体種は喀痰であり、NALC-NaOH 処理前検体であっても分析可能という点は特筆すべき点である。喀痰に検体前処理液を添加し、ボルテックス後 15 分間反応させる。その後、試薬カートリッジ内にピペットを用いて検体を添加し、あとは Gene Xpert システムに架設すれば測定まで全自動で完了する。



(セフィエド社資料より)

図 1 Gene Xpert system

測定時間は約120分である。Gene Xpert システムは、カートリッジを収容する分析モジュール数に応じてさまざまなサイズの測定装置が用意されており、2検体～16検体を同時に測定可能である。また本装置はモジュール毎に完結した制御であるため、検査開始のタイミングが異なる複数の検体や異なる検査対象のカートリッジ試薬を合わせて測定できることから非常にオンデマンド性が高い。

日本の5施設からの427検体を解析した研究では培養法との比較で感度86.8%、特異度96.8%であり、コバス TaqMan MTB および TRC Rapid M.TB と比較し検出性能に有意な差はなかったと報告されている<sup>3)</sup>。

Gene Xpert 用試薬としては *M. avium*, *M. intracellulare* 検出試薬のラインナップはなく、また検体種が喀痰に限られるため、これまでコバス Taqman48 等で抗酸菌遺伝子検査を実施してきた施設などで完全に Gene Xpert に切り替える場合には、MAC の検査や適応外検体種の扱いなどについて予め十分に検討する必要がある。われわれの施設でも2017年9月より Gene Xpert を導入したが、上記の問題からコバス Taqman48 と併用している状況にある。われわれの施設では簡便性と迅速性から、隔離の判断が必要な際の迅速遺伝子検査として24時間体制で Gene Xpert を運用し、MAC 遺伝子検査や肺外検体の結核菌群遺伝子検査には、コバス Taqman48 を使用している。Gene Xpert の大きな利点は、NALC-NaOH 処理が不要で、モジュール毎に制御が可能であるという点である。このため、微生物検査技師等が不在の時間、不在の施設でも誰でもいつでも簡単に結核菌群遺伝子検査が可能になるというメリットがある。なお、この点では、LAMP 法も NALC-NaOH 処理不要で、非常に簡便であり、GenesXpert、LAMP の2法が Point of care (POC) 検査として WHO の recommendation を得ている点には納得がいく。

なお、Xpert MTB/RIF は LAMP 法、TRC 法、 $\mu$ TAS 法などに比し、所要測定時間が長いという欠点を持つ。これについては感度を向上させ測定時間を80分以下に短縮した Xpert MTB/RIF ultra 試薬が国際的にはすでに使用されており、現在 WHO もこちらを推奨しており、日本でも早期に利用可能となることが望まれる。

## II. 薬剤耐性遺伝子検査に関する話題

結核の治療において、標準治療が可能かどうかということは、治療期間や予後も含めて非常に重要である。国内での薬剤感受性検査実施結核患者における多剤耐性結核患者の割合は2012年以降0.6%程度で推移している。しかし2016年の新規多剤耐性結核患者49例のうち15例が外国出身者というデータ<sup>4)</sup>が示すように、外国出身者の薬剤耐性結核罹患率は高いとされ、今後より多くの外国出身者が国内に流入してくることが想定されることから、わが国においても薬剤耐性検査の重要性はより一層増してくると考えられる。

これまでの薬剤耐性検査は概ね培養法をベースとしていることから、現在では結核の診断から耐性判明までに数週間を要している。この現状を乗り越えるべく、薬剤耐性遺伝子検査が承認販売開始された。

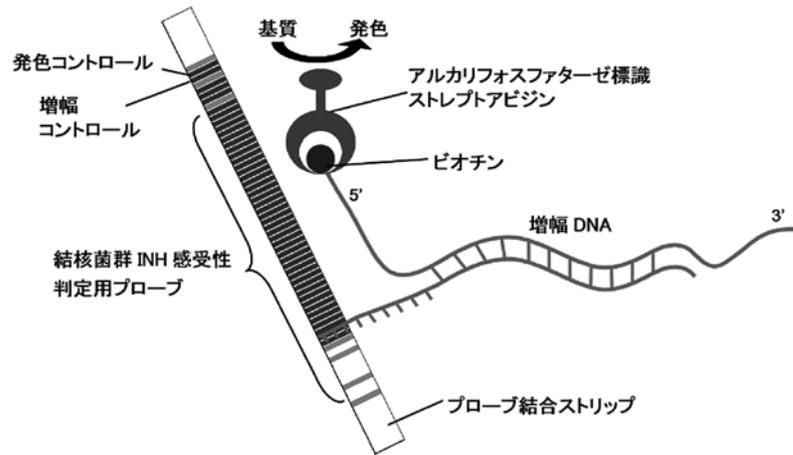
### 1. イソニアジド、ピラジナミド耐性遺伝子検査

ニプロのジェノスカラー PZA-TB II、ジェノスカラー INH-TB II は、ピラジナミド耐性変異、イソニアジド耐性変異をラインプローブアッセイにて検出する試薬である。ラインプローブアッセイは結核菌の DNA を PCR 反応により増幅させたものを、テストストリップ上のプローブとハイブリダイズさせ、ハイブリダイズしたものを発色させる方法である。プローブ配列と配列の異なる DNA はハイブリダイズしないため、変異遺伝子を含む場合、該当プローブ箇所の発色がなくなることから変異を検出できる。

もともと、ジェノスカラー PZA-TB、ジェノスカラー INH-TB としてそれぞれ2012年2013年より保険収載されていたものだが、増幅行程が2回必要であったものが1回になり作業手順が簡易化され使いやすい形で2018年3月より販売開始となっている。

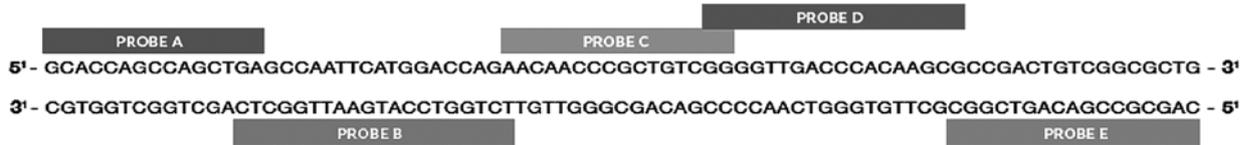
培養菌株だけでなく、喀痰から直接検査することも可能であり、結核の初回診断時に直ちに検査を行うことで、薬剤治療開始前に耐性を確認できるメリットは大きい。

ピラジナミド耐性変異としては、pyrazinamidase/nicotinamidase 遺伝子である *pncA* 遺伝子の変異が知られている。この遺伝子変異によりピラジナミド



(ニプロ社資料より)

図2 ジェノスカラー INH-TB II の測定原理

***rpoB* GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION**

(セフィエド社資料より)

図3 *rpoB* 遺伝子と Xpert MTB/RIF の検出プローブ

(図2, 3は巻末にカラーで掲載しています)

耐性の70-97%が説明可能とされ、ジェノスカラー PZA-TB II のターゲットとなっている。またイソニアジド耐性変異としては catalase-peroxidase 遺伝子 (*katG*), enoyl-ACP-reductase 遺伝子 (*inhA*), alkyl-hydroperoxidase reductase 遺伝子 (*ahpC*) などの複数の遺伝子変異が問題となる<sup>6)</sup>。ジェノスカラー INH-TB II は *KatG* 変異、*inhA* 変異および、*inhA* 領域の upregulation を起こす変異として報告<sup>7)</sup>された *mabA* 遺伝子の3つをターゲットとしている。これによりイソニアジド耐性のおよそ90%程度が検出可能とされている。

**2. リファンピシン耐性遺伝子検査**

リファンピシンは、結核菌の RNA polymerase の  $\beta$  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。リファンピシン耐性菌では、 $\beta$  subunit 上の23個のアミノ酸をコードする *rpoB* 遺伝子のホットスポット領域の変異が見られる場合が

多く、調査によっては98%でこの変異が認められた<sup>6)</sup>。

このリファンピシン耐性遺伝子検査としては2試薬があり、1つめはニプロのジェノスカラー RFP-TB II である。測定原理はイソニアジド、ピラジナミド耐性遺伝子検出試薬と同様、ラインプローブアッセイであり、すでに2016年より市販されている。

もう1つは全自動遺伝子検査試薬である Xpert MTB/RIF である。この試薬は *rpoB* をターゲットとして結核菌の遺伝子検査を行っており、その全領域を probeA-E でカバーしている。これにより、5つの probe 全てで増幅を認めた場合には、リファンピシン感受性結核といえ、4つの probe で増幅を認めた場合は、増幅が認められなかった probe 領域に変異があるリファンピシン耐性結核と判定することができる。

実際に、リファンピシン耐性を強く疑っていない症例においても、副次的にリファンピシン耐性が検

査されるため、われわれの施設でも、特に海外在住歴など耐性結核の検出リスクが高くない症例から、偶発的に超多剤耐性結核に相当する遺伝子変異を持つ多剤耐性結核菌を検出しており、結核菌群核酸検出検査と同時に薬剤耐性検査を行うメリットの大きさを実感した<sup>8)</sup>。

なお診療報酬上、リファンピシン耐性、イソニアジド耐性、ピラジナミド耐性遺伝子検査はいずれも820点とされている。結核菌群核酸検出検査(410点)と同時に実施した場合は、いずれかの算定となる。

## おわりに

微生物遺伝子検査は続々と診断薬として承認され、各社の競争が激しい分野となっている。しかし、全自動遺伝子検査装置などは初期投資費用も高く、それぞれの機器試薬の特性を理解した上で、自施設の抗酸菌診療において実際に臨床側から求められている検査を基軸に、それは自施設内で実施する必要があるものか、あるいは外注検査機関に任せるべきものか、任せてもよいものか、などを検査室側でも十分に検討した上で、賢く遺伝子検査を導入あるいは利用していく姿勢が重要である。

## 文 献

- 1) 佐々木智、寺嶋和宏、浜田貴俊ら. 全自動遺伝子解析装置ミュータスワコー g1 システム. 臨床病理 **66** : 507-514, 2018.
- 2) 戸口明宏、山田智、橋本幸平ら. 全自動遺伝子解析装置「ミュータスワコー g1」を用いた迅速抗酸菌検査の検討. 日本医学検査学会抄録集 66回 page46, 2017.
- 3) Kazunari Tsuyuguchi, Hideaki Nagai, Kenji Ogawa, et al. Performance evaluation of Xpert MTB/RIF in a moderate tuberculosis incidence compared with TaqMan MTB and TRC Rapid M.TB. J Infect Chemother **23** : 101-6, 2017.
- 4) 内村和広. 結核サーベイランスからみた日本の薬剤耐性結核と結核患者の治療成績の現状. IASR **38** : 235-7, 2017.
- 5) Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, et al. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber Lung Dis. **78** : 117-22, 1998.
- 6) 向川純, 遠藤美代子, 柳川義勢ら. 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. 感染症学雑誌 **79** : 388-96, 2017.
- 7) Ando H, Miyoshi-Akiyama T, Watanabe S, et al. A silent mutation in *mabA* confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology **91** : 538-547, 2014.
- 8) 青木渉, 上菟義典, 竹原朋宏ら. Xpert MTB/RIFにより迅速にリファンピシン耐性が判明した肺結核の1例. 日本化学療法学会雑誌 **66** : suplementA 258, 2018.