



結核菌群遺伝子の臨床検査の進歩

みたらい さとし
御手洗 聡
Satoshi MITARAI

I. はじめに

結核菌はヒトを宿主として呼吸器を中心とする全身の感染症を引き起こす。確定診断には結核菌群の分離同定が必須であるが、結核菌群は発育が極めて緩慢であり、専用の液体培地を用いても臨床検体からの分離に平均2週間を要するため、迅速な診断が困難である^{1,2)}。また、薬剤耐性結核の診断に欠かせない薬剤感受性試験も、結核菌の発育に依存した方法(表現形)を使用する限り、最短でも1週間程度の時間を必要とする。結核の診断が遅れるとそれだけ感染者が増加し、結果として患者の数も増加する。確実な感染制御のためには、高感度・高特異度で迅速な結核診断法が求められる。

遺伝子検査はこれらの要求を満たす現時点でほぼ唯一の検査法であり、現在もなお、さまざまな分野での開発が進んでいる。本稿では結核菌群の遺伝子検査の進歩について概説する。

II. 結核菌群の検出

結核菌群の検出で最も迅速なのは塗抹鏡検であるが、近年非結核性抗酸菌の分離率が増加しているため、抗酸菌塗抹陽性だけを以て結核菌群陽性とは言えない状況にある³⁾。また塗抹検査陽性になるには1mlあたり10,000個程度の菌数が必要となるため、感度・特異度共に臨床的には精度不十分な状況である。診断感度に関しては液体培養が最も高率であるが、前述のとおり検出までに時間がかかる上、培養

菌の菌種同定を行わなければならない。ちなみに、結核の統計によると、肺結核患者のうち塗抹陽性は約40%、培養陽性は約80%である⁴⁾。

塗抹・培養検査の問題点を解決するため、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法が発明されると、ほどなく結核菌群の検出に応用された^{5,6)}。PCRをはじめとする核酸増幅法は短時間で目的の遺伝子を人為的に増幅することが可能であり、結核菌検査のブレイクスルーとなった。特にプライマー/プローブのデザインによって結核菌群を特異的に検出することが可能となったため、基本的に「検出=同定」という図式が成立し、同定検査としても認識されている。初期の核酸増幅法は抗酸菌の遺伝子を増幅した後、結核菌群特異的なプローブを使用して菌種を同定するものであったが、近年の核酸増幅法検査はReal-time PCRやTranscription-Reverse Transcription Concerted reaction (TRC) 法などによって増幅と検出を同時に実施し、同定までの時間を短縮したものが主流となっている。現在国内で保険適用されている核酸増幅法検査を表1に示した。核酸増幅法の感度は塗抹検査と培養検査の中間で、一般的に塗抹陰性・培養陽性の検体の50~70%で陽性となる^{7~9)}。保険上は月に1回認められるが、塗抹や培養と同じく3回実施すれば診断感度は累積的に上昇する(なぜ、保険上3回連続検査が認められていないのか甚だ不思議でならない)。

これらの核酸増幅法は基本的に半自動である。現在、世界的には全自動核酸増幅装置であるGene Xpert (Cepheid, USA) と完全マニュアル操作であるTB-LAMP (栄研化学) が注目されている。Gene Xpert

表1 本邦で保険適用可能な抗酸菌核酸増幅法

製品名	増幅法	検出法と対象菌	時間
DNAプローブ「FR」-MTB	TMA	Hybridization protection assay (HPA) 結核菌群	約5時間
コバス® TaqMan® MTB	Real-time PCR	TaqMan probe 結核菌群	約3時間
TRC Rapid M. TB	TRC	INAF probe 結核菌群, <i>M. avium</i> complex, <i>M. kansasii</i>	約1.5時間
GENECUBE	PCR	QProbe (融解曲線解析) 結核菌群, <i>M. avium</i> complex	約50分
Loopamp® 結核菌群検出キット	LAMP	リアルタイム濁度測定 結核菌群	約50分

はマルチプラットフォームデバイスであり、さまざまな病原体の検出カートリッジの一つとして Xpert MTB/Rifがある。このカートリッジを使用すると、溶解・均質化・殺菌処理した検体から約2時間で、結核菌群の遺伝子とリファンピシン (RFP) 耐性遺伝子 (*rpoB*) の変異を Real-time PCR/Molecular Beacon により増幅・検出することが可能である。最新の報告では、結核診断精度は塗抹・培養陽性の結核で98% (95%CI, 97-99)、塗抹陰性・培養陽性の検体で68% (95%CI, 59-75) である。またRFP耐性の診断精度は感度94% (95%CI, 87-97)、特異度98% (95% CI, 97-99) とされている¹⁰⁾。最近では肺外検体に使用した報告もあり、われわれも便検体からの陽性検出を経験している¹¹⁾。

TB-LAMPキットはPURE (Procedure for Ultra Rapid Extraction, 栄研化学) キットと併せて使用するのが一般的であり、喀痰検体を前処理なしで使用できるのが特徴である。検体を受領してから検査終了まで1時間弱であり、Isothermalな反応なので原則として複雑な装置も必要ないことから、途上国の現場や一般医家のレベルで使用可能と考えられている⁹⁾。

Ⅲ. 抗酸菌種の同定

この稿のテーマからすると少し外れているが、遺伝子検査の真骨頂は菌種同定にあるといえる。日本ではDNA-DNA hybridization法による抗酸菌菌種同定キット (DDH マイコバクテリア, 極東製薬) が利用可能であるが、これはmg単位の大量の被検菌を必要とするため、基本的には固形培地で培養陽性となる必要がある。これに対して核酸増幅法を基礎

とする同定検査は微量の検体でも実施可能で、臨床的有用性が高い。良く使用されるのは16S rRNA等の遺伝子を増幅し、シーケンスの結果をデータベース上で比較し、99%以上の相同性で同一菌種とする方法である。厳密に言えば一部のハウスキーピング遺伝子の相同性を以て菌種の同定とすることは正しくないが、実践上はほとんどの場合機能する¹²⁾。

シーケンサーが簡単に利用できない場合もあり、上記の方法は必ずしも一般化していない。しかしながら、最近開発されたSPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA (Vircell, Spain) はPCR増幅後の検体にディップスティックを浸すだけで5種の結核菌群を含む19種類の抗酸菌を同定可能である¹³⁾。また、ハイブリダイゼーション過程を必要とするが、GenoType® *Mycobacterium* CM/AS (Hain Lifescience, Germany) は31種の非結核性抗酸菌を同定することが可能であり、必要な時間はおおよそ5時間とされている¹⁴⁾。これらのプローブを使用する検査ではあらかじめ決められた菌種しか同定できないので、希少な菌種についてはやはりシーケンス等を実施する必要があるが、本邦で分離される主要な抗酸菌はほとんどカバーすることが可能である。ちなみに、結核菌群は *M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. africanum*、*M. canetti*、*M. caprae*、*M. microti*、*M. pinipedii* で構成されているが、本邦で臨床的に分離される結核菌群のほとんどすべては *M. tuberculosis* である (一部BCGが分離される場合を除く)¹⁵⁾。

Ⅳ. 結核菌薬剤耐性の診断

結核菌の薬剤感受性試験の標準法は比率法などの表現形検査である。簡単に言えば結核菌を一定濃度

の薬剤に曝露し、発育の有無を調べる方法であるが、結核菌の発育速度に依存しているため、液体培地でも1週間程度、固形培地では2～6週間の時間がかかる¹⁶⁾。また、結核菌は強毒菌であり、ハザードレベルも高いので大量の生菌を使用する感受性試験は厳密なバイオリスク管理の下で実施されなければならない。これに対して遺伝子を利用した薬剤耐性検査は、最初に分離・同定した結核菌を殺菌して遺伝子を抽出してしまえば、その後の生物学的リスクを回避しながら検査を進めることができる。その上、核酸増幅法で増幅した遺伝子情報を利用すれば、結核菌の発育に依存せず迅速に耐性結核の検査が実施可能である。また、結核菌の耐性責任遺伝子はゲノム上にのみ存在し、薬剤ごとに遺伝子座が離れているので(図1)、薬剤ごとの耐性を独立事象として扱うことができる。ただし、利用可能な耐性遺伝子の情報(責任遺伝子とその変異型)量が薬剤ごとに異なっているのが現状なので、診断感度は薬剤ごとに異なる¹⁷⁾。

実際に耐性遺伝子による薬剤感受性試験の実施が最も有効なのはRFPである。先のXpert MTB/Rifの説明と前後するが、RFPの作用標的はDNA依存性RNAポリメラーゼである。RNAポリメラーゼのコアは2つの α 、1つの β およびもう1つの β' -subunitからなり、*rpoB*はその β -subunitをコードしている遺伝子である。*rpoB*の異常はRFPのRNAポリメラーゼ活性中心への親和性を減弱させて耐性を誘導している。基本的にRFPの耐性はこの機序のみで成立し、耐性変異のほとんどがRRDR(Refampicin

Resistance Determining Region, 81bp)に集中しているため、診断感度が高い。これまでに多くのRFP耐性結核菌株が解析されており、その95%程度に*rpoB*の異常が認められていることから、現時点では遺伝子学的早期耐性診断の有用性が最も期待できる。さらに変異型によって耐性度に差があり、RFPには耐性であってもRifabutinには感受性である株を遺伝子型で推定することも可能である¹⁸⁾。

日本において現在保険適用が認められている*rpoB*遺伝子での感受性試験はジェノスカラー®・Rif TB(ニプロ)のみである。これは、PCRにより増幅した*rpoB*遺伝子の一部(RRDR)に対して、耐性変異に特異的なDNAプローブを用いて変異を検出する。核酸増幅法を基礎としたラインプローブアッセイ(Line Probe Assay; LPA)キットなので、培養検体だけでなく、塗抹陽性患者における喀痰からの直接検出も可能である。臨床的検出感度は95%前後の報告が多く、特異度はほぼ100%とされている^{19,20)}。

もう一つの重要な抗結核薬はイソニアジド(INH)であるが、この耐性機序には複数の遺伝子が関与しており(*furA-katG*, *fabG1-inhA*, 等)、耐性変異も多種に及んでいる²¹⁾。地域的な変異の差異も報告されており、European-Americanタイプの結核菌に良く見られる*katG*の315位や*inhA*の-15位の変異だけでは本邦の遺伝子変異型をカバーできない。そのため、MTBDRplus(Hain Lifescience, Germany)などのLPAキットは本邦では十分な感度を示さないことが報告されている²²⁾。

一次抗結核薬としてもうひとつ重要な薬剤がピラ

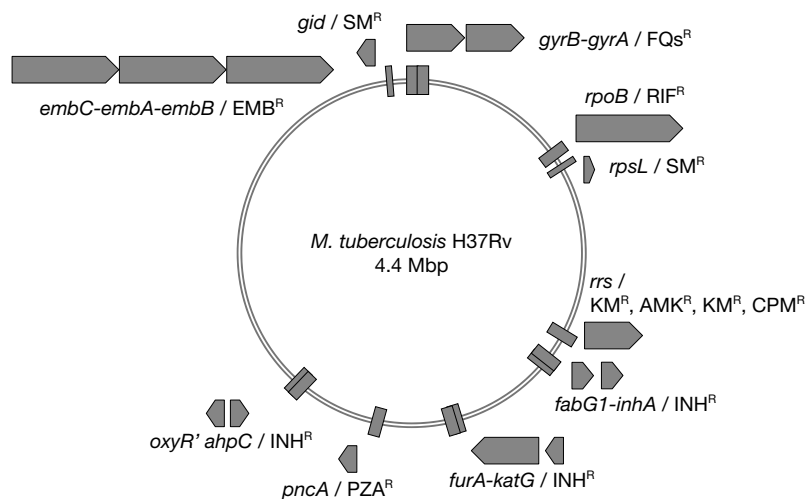


図1 結核菌ゲノム上の主要な抗結核薬耐性遺伝子位置

ジナミド (PZA) である。一般に PZA の表現形による薬剤感受性試験は液体培地でしか実施できない。また、培地 pH が低く設定されているので、約 10% の結核菌は発育せず、結果が得られない場合がある。さらに最近では MGIT AST PZA (ベクトン・ディッキンソン) キットで 42.1% の偽耐性が報告されている²³⁾。偽耐性の多くは凝塊形成による過剰な結核菌接種が原因と思われているが、PZA 濃度の設定が不適切とする報告もある²⁴⁾。いずれにしても表現形としての PZA の感受性試験は技術的な困難が伴う。

PZA は結核菌のもつ *pncA* がコードしているピラジナミダーゼで Pyrazinoic acid に変換されて作用するが、この *pncA* に変異が起こることによって多くの PZA 耐性が発生する。従来 *pncA* の遺伝子変異を調べるにはシーケンスを行うより方法がなかったが、2012 年 12 月にジェノスカラー・PZA TB (ニプロ) が LPA として保険収載され、臨床的に利用可能となった (図 2)。臨床分離結核菌 308 株 (含 PZA 耐性 58 株) による治験では感度 89.7%、特異度 96.0% と報告されている。PCR を応用した LPA の特性として臨床検体からも実施可能であり、同じ治験で感度・特異度ともに 100% となっている²⁵⁾。

V. 結核菌の遺伝子型別

臨床検査と言うほどに一般化している訳でもなく、現状直截に結核患者のマネジメントに役立つ

訳ではないが、結核菌の遺伝子型別 (Genotyping) も近年の進歩の一つである。初期には制限酵素によってゲノムを消化した際に発生する遺伝子長の多型 (Restriction Fragment Length Polymorphisms : RFLP) がよく用いられ、近年まで基本的に Gold standard と考えられてきた。しかし技術的に煩雑である上にタイピングデータの相互比較が難しいことから、最近ではいわゆる反復配列多型 (Variable Number Tandem Repeat : VNTR) による方法がよく利用される。これはゲノム中に存在する数~数十塩基を一単位とする繰返し配列で、それぞれの VNTR ローカスの前後にプライマーを設計して PCR で全体を増幅し、産物のサイズから反復コピー数を算出する。それぞれの VNTR ローカスにおける反復配列の数には多型性があり、それぞれのコピー数を羅列することで数列によるプロファイルが得られる。これは比較的簡単に実施が可能で、異なる出所の結核菌の異同を判断するのに用いられる。感染経路の解明や集団感染の有無の評価などに利用されている。検査室内での交叉汚染の確定などにも使用可能である。

最近では次世代型シーケンサーが普及しつつあり、安価・高速・正確になってきているので、今後は全ゲノム解析 (Whole Genome Sequence : WGS) による菌種・系統の同定や個別菌株の微小な変異に関する情報の解析が一般化するかも知れない。

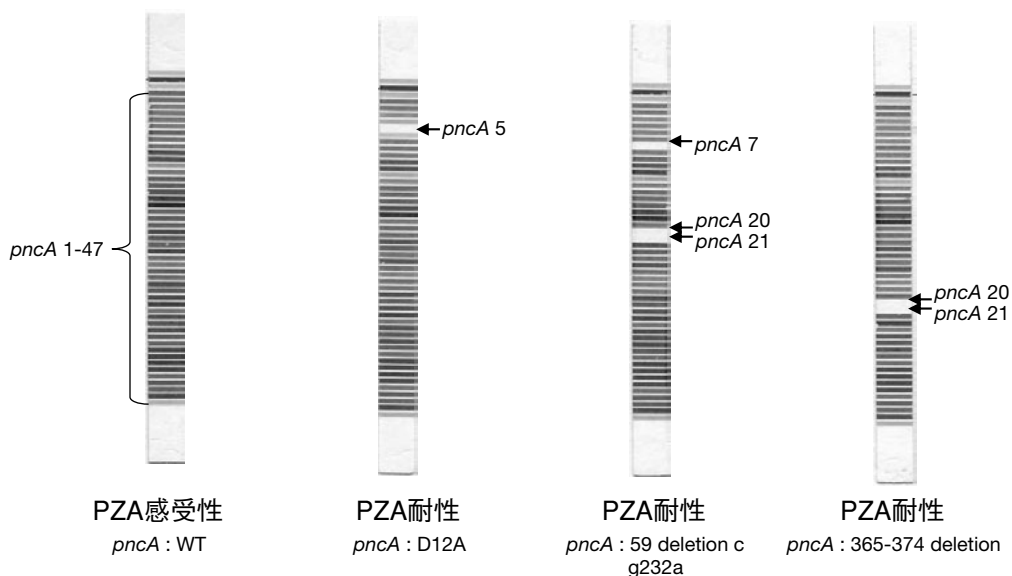


図 2 ジェノスカラー・PZA TB による PZA 薬剤感受性の判定例 (ニプロ提供)

VI. おわりに

遺伝子は比較的安定しており、バイオハザード上の問題も少ないことから抗酸菌の様な特殊な細菌の検査には適した材料と思われる。しかしながら、少なくとも現時点で遺伝子情報だけですべての検査を置き換えることはできない。結核菌の遺伝子情報の利点を最大限に利用しつつ、生物としての総体である表現形を理解することに努めなければならない。

文 献

- 1) 青野昭男, 桑原龍児, 光田昌江: MGIT[®]抗酸菌システムと従来法との比較. 日本臨床微生物学雑誌 **8**: 269-273, 1998.
- 2) Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. J Clin Microbiol. **37**: 3578-3582, 1999.
- 3) 佐藤滋樹. 非結核性抗酸菌症とくに MAC 症の全国疫学調査. 第 39 回非結核性抗酸菌症研究協議会報告. 大阪 2007.
- 4) 厚生労働省. 結核の統計 2012 年版. 結核予防会 2012.
- 5) 永井良三, 竹脇俊一, 和田昭仁, 奥住捷子, 飛田明子, 大久保昭行. PCR を用いた抗酸菌の迅速鑑別法の開発. 臨床病理 **38**: 1247-1253, 1990.
- 6) Bergmann JS, Woods GL. Clinical evaluation of the Roche AMPLICOR PCR *Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens. J Clin Microbiol. **34**: 1083-1085, 1996.
- 7) Bergmann JS, Keating WE, Woods GL. Clinical evaluation of the BDProbeTec ET system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. **38**: 863-865, 2000.
- 8) Boehme C C, Nabeta P, Henostroza G, Raqib R, Rahim Z, Gerhardt M, Sanga E, Hoelscher M, Notomi T, Hase T, Perkins M D. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. J Clin Microbiol. **45**: 1936-1940, 2007.
- 9) Mitarai S, Okumura M, Toyota E, Yoshiyama T, Aono A, Sejimo A, Azuma Y, Sugahara K, Nagasawa T, Nagayama N, Yamane A, Yano R, Kokuto H, Morimoto K, Ueyama M, Kubota M, Yi R, Ogata H, Kudoh S, Mori T. Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. **15**: 1211-1217, 2011.
- 10) Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien SM, Persing DH, Ruesch-Gerdes S, Gotuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkins MD. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med. **363**: 1005-1015, 2010.
- 11) Peter JG, Theron G, Muchinga TE, Govender U, Dheda K. The diagnostic accuracy of urine-based Xpert MTB/RIF in HIV-infected hospitalized patients who are smear-negative or sputum scarce. PLoS One. **7**: e39966, 2012.
- 12) Kazumi Y, Mitarai S. The evaluation of an identification algorithm for *Mycobacterium* species using the 16S rRNA coding gene and *rpoB*. Int J Myco. **1**: 21-28, 2012.
- 13) Quezel-Guerraz NM, Arriaza MM, Avila JA, Sánchez-Yebra Romera WE, Martínez-Lirola MJ; Indal-TB Group. Evaluation of the Speed-oligo[®] Mycobacteria assay for identification of *Mycobacterium* spp. from fresh liquid and solid cultures of human clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis. **68**: 123-131, 2010.
- 14) Lee AS, Jelfs P, Sintchenko V, Gilbert GL. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType *Mycobacterium* CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. J Med Microbiol. **58**: 900-904, 2009.
- 15) 上山雅子, 近松絹代, 吉山 崇, 尾形英雄, 工藤翔二, 御手洗聡. 臨床分離結核菌群における *M. bovis* の分離頻度. 第 84 回日本結核病学会総会 札幌 2009.
- 16) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 結核菌検査指針 2007 結核予防会 東京 2007.
- 17) Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. **13**: 1320-1330, 2009.
- 18) 近松絹代, 水野和重, 山田博之, 御手洗聡. 多剤耐性結核菌における Rifampicin と Rifabutin の交差耐性の検討. 結核 **84**: 631-633, 2009.
- 19) Hirano K, Abe C, Takahashi M. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J Clin Microbiol. **37**: 2663-2666, 1999.
- 20) Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother. **41**: 2093-2098, 1997.
- 21) Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, Kirikae T. Identification of *katG* mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. **54**: 1793-1799, 2010.
- 22) 近松絹代, 水野和重, 青野昭男, 山田博之, 菅本鉄広, 西山裕之, 御手洗聡. GenoType[®]MTBDR *plus* による多剤耐性結核菌同定に関する検討 結核 **86**: 697-702, 2011.
- 23) Chedore P, Bertucci L, Wolfe J, Sharma M, Jamieson F. Potential for erroneous results indicating resistance when using the Bactec MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J clin

- microbiol. **48** : 300-301, 2010.
- 24) Werngren J, Sturegard E, Jureen P, Angebyc K, Hoffner S, Schon T. Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide using wild-type MIC distributions and *pncA* gene sequencing. *Antimicrob Agent Chemother.* **56** : 1253-1257, 2012.
- 25) Mitarai S, Kato S, Ogata H, Aono A, Chikamatsu K, Mizuno K, Toyota E, Sejimo A, Suzuki K, Yoshida S, Saito T, Moriya A, Fujita A, Sato S, Matsumoto T, Ano H, Suetake T, Kondo Y, Kirikae T, Mori T. Comprehensive multicenter evaluation of a new line probe assay kit for identification of *Mycobacterium* species and detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* **50** : 884-890, 2012.