

表3 薬剤感受性試験成績

抗結核薬	試験濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	対照培地(10^{-4}) のコロニー数	1%	10%
INH	0.2		SまたはR	SまたはR
INH	1.0		SまたはR	SまたはR
RFP	40		SまたはR	SまたはR
PZA	ピラジナミダーゼ試験		SまたはR	
SM	10		SまたはR	SまたはR
EB	2.5		SまたはR	SまたはR
KM	20		SまたはR	SまたはR
EVM	20		SまたはR	SまたはR
TH	20		SまたはR	SまたはR
CS	30		SまたはR	SまたはR
PAS	0.5		SまたはR	SまたはR
LVFX	1.0		SまたはR	SまたはR

間接法では10,000倍希釈液（直接法では100倍希釈）接種対照培地のコロニー数と比較して、薬剤含有培地のコロニー数が多ければ耐性菌の割合が1%以上であり、1%の欄にR（耐性）と記録する。また対照培地のコロニー数の10倍以上であれば、10%の欄にRと記録する。1%あるいは10%未満であればそれぞれの欄にS（感受性）と記録する。治療には1%の成績を用いる。10%の成績は多剤耐性例の場合のみ参考にする。

PZAに対する感受性はピラジナミダーゼ試験で行う。ピラジナミダーゼ試験陽性例はS、陰性例はRと記録する。

LVFXは抗結核薬に指定されていないが、多剤耐性結核例に使われていることからここにあげた。

小川培地を用いる比率法は結核菌ならびに *Mycobacterium kansasii* に対する感受性を知るための試験法であり、*M. avium* complex など非結核性抗酸菌のための感受性試験法ではない。それゆえ、小川培地を用いた比率法による試験の成績は非結核性抗酸菌症の治療の目安にはならない。現在液体培地を用いた試験法が研究されており、非結核性抗酸菌の感受性を知る有効な方法が開発された際には検討が必要である。

米国の National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) は感受性試験の精度管理のためには卵培地ではなく Middlebrook の寒天培地または液体培地の使用を推奨している⁸⁾。日本結核病学会の委員会でもこのことは議論された。しかしわが国には、長い間小川培地を感受性試験に使用し、それで得られた成績を臨床医は治療に用いてきた経緯がある。臨床医の混乱をできるだけ避けるためにひとつ飛びに寒天培地または液体培地に移行することはやめ、試験濃度の変更と方法を比率法に変えることにとどめられた。もちろんわが国でも迅速で精度管理の容易な寒天または液体培地の導入について早急に検討する必要がある。

IX. 検査の精度管理

精度管理試験は検査成績の再現性と信頼性を確保するために定期的に行われるべきである。細菌学的検査は結核の診断や適切な治療をするうえで重要であり、高い精度が求められる。従来検査に加え新しい技術が導入されるようになり、より複雑になってきた。高い精度を保持するためには検査の工程をモニターする必要がある。また精度管理プログラムはすべての検査技師が実施可能なものでなければならない。

検査の精度管理の重要性を考え、新検査指針では1つの章として取り上げている。精度管理標本の作製、使用可能な標準菌株、あるいはその保存など、それぞれの検査について触れている。

おわりに

最後に検査の流れを図1に示した。「新結核菌検査指針」で取り上げた検査法のすべてを今すぐ受け入れることができる施設は少ないと考える。この検査指針の中で重視したことは検査の精度であり、高い精度を保持するために多くの方法を並列することはやめ、推奨する方法を一つに絞り記述することにし

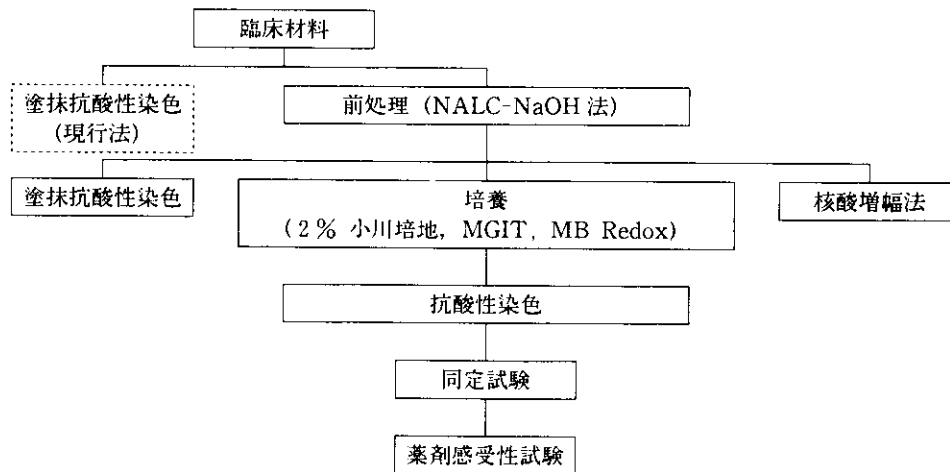


図1 抗酸菌検査の流れ

た。現在臨床に役立つ検査が求められている。ここに述べた新しい検査法を取り入れたとき、これまでより検査技師の作業量が増えることが予想される。しかしそれ以上の臨床的メリットも期待できるであろう。

どのような検査を行うかは担当医によりオーダーされる。検査に携わる検査技師のみならず医師や医療関係者にも結核菌検査指針の改定の主旨を理解してもらう必要がある。

文 献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：新結核菌検査指針。結核予防会，東京，2000。
- 2) 厚生省保健医療局結核・感染症対策室：結核定期外健康診断ガイドラインとその解説。結核予防会，東京，1993。
- 3) Kubica GPW, Dye E., Cohn M.L., Middlebrook G.: Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* **87**:775-779, 1963.
- 4) Tenover F.C., Crawford J.T., Huebner R.E., Geiter L. J., Horsburgh C.R., Good R.C.: Guest Commentary: The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* **31**:767-770, 1993.
- 5) Catanzaro A., Perry S., Clarridge J.E., Dunbar S., Goodnight-White S., LoBue P.A., Peter C., Pfyffer G. E., Sierra M.F., Weber R., Woods G., Mathews G., Jonas V., Smith K., Della-Latta P.: The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis. *JAMA* **283**:639-645, 2000.
- 6) 日本結核病学会予防・治療合同委員会：核酸増幅法による結核菌検査の臨床での利用について。結核 **70**: 711-712, 1995。
- 7) 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会：結核菌の薬剤感受性試験，特に試験濃度改変と比率法導入への提案。結核 **72**: 597-598, 1997。
- 8) Kiehn T.E., Cynamon M.H., Inderlied C.B., Roberts G. D., Siddiqi S.H., Wallace R.J., Warren N.G.: Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*; tentative standard. *NCCLS M-24T*, **15**:1-31, 1995.

結核の細菌学的診断

結核予防会結核研究所基礎研究部 阿部 千代治

Key words 結核菌, 塗抹検査, 液体培地

はじめに

ここ十数年の間に、抗酸菌の細菌学的検査に大きな進歩がみられた。それらは分離培養への液体培地の導入、核酸増幅法による結核菌の迅速検出、核酸の相同性や菌種特異抗原に対する抗体を用いる抗酸菌の鑑別・同定、耐性に関与する遺伝子を用いる耐性菌の検出などである。これらの検査法の一部は、本年5月に出版された日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編「新結核菌検査指針」に含まれている¹⁾。ここでは患者材料からの抗酸菌の検出、塗抹・培養検査と核酸増幅法について記述する。

I. 塗抹検査

臨床材料を塗抹し、抗酸性染色を行い鏡検することが、抗酸菌を検出するうえで最も簡便で迅速な方法である。検出感度は分離培養法や核酸増幅法に比べて劣るが、患者発見の重要な手段の1つである。また排菌の有無ないしその程度を知るこ

とは、患者管理上からも治療効果の判定のうえでも重要である。

1. 塗抹標本

塗抹検査についても指針の中で内容が書き改められた。わが国では、患者材料を直接ガラススライドに塗抹する方法を用いてきた。しかし、材料中に結核菌が均一に分散されているわけではなく、どの部分から材料を採取するかにより得られる結果は大きく異なる。欧米諸国では、前処理後に遠心濃縮し、集菌材料を塗抹する方法を採っている。わが国でも液体培地が普及し、遠心・集菌法は一般的になったことから、塗抹検査の精度を確保する意味からも遠心・集菌材料を塗抹することを勧める。しかし、病院の事情により直接塗抹法を用いる場合も出てくると考えられるが、その場合、遠心・集菌材料の塗抹も併せて行うことが必要である。

2. 塗抹標本の染色

多くの検査室ではチール・ネールゼン法で染色

している。しかし、材料中にほんのわずかし抗酸菌が存在しない場合には観察に多くの時間を要する。この点、暗い視野に明るく光って見える蛍光法は、観察が簡便であり見落としも少ないことから使用を勧める。問題は、抗酸菌以外にもしばしば蛍光を発するものがあり、読みすぎの恐れがあることである。200倍拡大で観察したときに、数視野に1個あるいはそれ以下の場合にはチール・ネールゼン法で確認する必要がある。その際、蛍光標本をチール・ネールゼン染色できるので、陽性の場所をノートに記載しておくことが容易である。

3. 結果の記録

これまで塗抹検査の結果をガフキー号数で記載してきたが、上にも記述したようにあまり細かく分けても意味がない。新しい結核菌検査指針では表1に示したように1+, 2+, 3+で記録することにした。結核定期外健康診断のガイドラインで重要度の算定にガフキー号数を用いている。解説書にも記載されているように、1+はG2, 2+はG5, 3+はG9相当として計算に用いることで対策のうえでも問題はない。全視野調べて1~2個(±)の場合は、同一の材料から塗抹標本を作り直すか、可能なら別の材料で再検査する必要がある。

留意点として、塗抹染色の結果から菌種名を決定することはできない。また染色性は異なるが抗酸菌以外にも弱抗酸性あるいは部分的抗酸性を示

す細菌があるので注意を要する。

II. 培養検査

分離培養による検出成績は塗抹染色の成績より高く、抗酸菌症の診断や治療に重要な情報を与えてくれる。抗酸菌が分離されることで、その後の菌種の同定や感受性試験の実施が可能になる。

水酸化ナトリウムによる前処理と3%小川培地による培養法は、諸外国で用いられている方法に比べ排菌量の多い場合には増殖支持力、雑菌による汚染からの防止や作業能率の点で勝っていた。しかし、化学療法が普及したこともあり、塗抹陽性・培養陰性菌の出現が問題になり、より栄養豊富な培地が要求されるようになった。さらに前処理に用いるアルカリの影響をできるだけ少なくすることも必要であり、そのためにN-アセチル-L-システイン・NaOH (NALC-NaOH)法が推奨されている¹⁾。

1. 液体培地を基礎とした培養システム

これまでも液体培地の有効性を否定する研究者はいなかったが、同時に前処理後でも材料中に生残する抗酸菌以外の微生物の増殖も高めることが予想され、わが国では使われなかった。欧米諸国では選択培地の開発に力が注がれ、5種の薬剤からなる抗菌補助剤PANTA(ポリミキシンB, アンフォテリシンB, ナリジクス酸, トリメトプリム,

表1. 鏡検における検出菌数記載法

記載法	蛍光法 (200倍拡大)	チール・ネールゼン法 (1,000倍拡大)	備考 (ガフキー号数)
—	0/30視野	0/300視野	G0
±	1~2/30視野	1~2/300視野	G1
1+	2~20/10視野	1~9/100視野	G2
2+	≥20/10視野	≥10/100視野	G5
3+	≥100/1視野	≥10/1視野	G9

アズロシリン)が確立された。これは液体培地を用いる新しい培養法の開発を可能にした。抗酸菌の検出に新しい考えを取り入れた培養法を以下に述べる。

1) Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)²⁾³⁾

溶存酸素に鋭敏なセンサーを用いた非放射性抗酸菌検査システムである。菌が増殖し培地中の溶存酸素を消費したときに酸素による蛍光の発光阻害は低下、365nm波長のUVトランスイルミネーターまたは長波長UV光を当てたときにオレンジ色の蛍光が観察される。インキュベーターを取り込んだ全自動培養装置MGIT 960(1時間おきに全検体の蛍光度を自動監視する)が開発されており、この装置を導入することにより観察が簡便になった。

2) Septi-Chek AFB⁴⁾

液体培地と固形培地の二相からなる培養システムである。液相部はMiddlebrook 7H9を基礎培地とし、PANTAと発育促進物質を含んでいる。スライドには3種類の固形培地が固められている。通常は8週まで観察し、固形培地上のコロニーの有無と液体培地中の菌の発育を検査する。

3) MB-Redox⁵⁾

検出のために酸化還元インジケーター(テトラゾリウム塩)を用いた抗酸菌培養システムである。抗酸菌を含む材料を接種した試験管では増殖に伴いインジケーターは還元され青紫色に変わる。陽

性例では着色した菌塊が試験管の底に観察される。鏡を用いると観察が容易である。

4) BacT/ALERT

炭酸ガスに鋭敏なセンサーを用いた迅速検出システムである。ボトルの底部に炭酸ガスセンサーが取り付けられており、半透性の膜で培地と仕切られている。増殖に伴い産生される炭酸ガスは膜を通過しセンサー部に入り、水に溶けたときに反応が起こり、H⁺の濃度が高まり、センサーは淡緑色に変わり、最終的に黄色になる。これはインキュベーターを取り込んだ全自動培養装置である。

2. 新しい培養法を用いた臨床材料からの抗酸菌の分離

液体培地を基礎としたMGITおよびMB-Redoxシステムによる抗酸菌の分離率を表2に示した。液体培地を基礎としたMGITおよびMB-Redoxの検出率は小川法と比べ有意に高かった⁵⁾。塗抹陰性材料でその差はより顕著であった。この傾向は結核菌のみならず非結核性抗酸菌でも同様であった。しかし、液体培地には発育せず卵培地にのみ発育した株もみられることから、日常の検査には液体培地と2%小川培地を1本ずつ使用することが勧められている。またMGITまたはMB-Redoxを用いることにより小川法より1週間早く結核菌を検出できることもわかった(表3)。成績は示さないがBacT/ALERTの検出感度および検出までに要する

表2. 種々の培地による587喀痰材料からの抗酸菌の分離

分離株(n)	分離株数(%)					
	MB-Redox	MGIT	2%小川	MB-Redox +2%小川	MGIT +2%小川	MB-Redox +MGIT
結核菌(133)	115(86.5)	122(91.7)	87(65.4)	124(93.2)	128(96.2)	129(97.0)
MOTT(70)	62(88.6)	63(90.0)	46(65.7)	66(94.3)	64(91.4)	69(98.6)
合計(203)	177(87.2)	185(91.1)	133(65.6)	190(93.6)	192(94.6)	198(97.5)

MOTT：非結核性抗酸菌

表3. すべての培養システムで陽性を示した材料からの検出までに要した日数

分離株(n)	検出までに要した平均日数(範囲)		
	MB-Redox	MGIT	2%小川
結核菌(80)	16.1(3~42)	15.9(3~44)	25.7(7~62)
MOTT(42)	11.0(4~50)	10.5(2~53)	19.4(4~70)

日数はMGITおよびMB-Redoxと同等である。Septi-Chek AFBは同等の検出感度をもつが、迅速性の点では前三者に劣る。

3. 抗MPB64抗体を用いる結核菌群の迅速鑑別⁶⁾

イムノクロマトグラフィー法(ICA)は簡便で迅速な診断法として急速に普及してきた。MPB64抗原は結核菌群に特異的であり、液体培地で培養早期に分泌される。抗MPB64モノクローナル抗体を用いたICA(MPB64-ICA)は結核菌群鑑別のためのキットである。液体培地で抗酸菌陽性のシグナルを示した培養の100 μ lを直接MPB64-ICAカセットに注入することにより迅速(15分以内)に結核菌群を鑑別できる。もちろん固形培地培養菌の鑑別にも使用できる。

III. 核酸増幅法による結核の迅速診断

数時間の内に試験管内で多量のDNAやRNAを増幅する技術が開発された。これらの手法は培養困難な微生物の検出や迅速な診断が要求される例で特に有効である。結核菌検出のためのキットもすでに3社から発売されている。

1. 市販のキット

1) アンプリコア・マイコバクテリア⁷⁾

PCR法を用いた増幅法であり、結核菌群、*M. avium*と*M. intracellulare*検出・同定のためのキットである。患者材料の採取後、6~7時間で試験は終了する。遺伝子の増幅と検出を全自動で行う機械

も開発されている。

2) DNAプローブ中外-MTD⁸⁾

結核菌のリボソームRNAを増幅する方法である。MTD法は逆転写酵素とRNAポリメラーゼを用いる増幅法であり、材料採取後3~4時間で10⁶個のRNAを増幅できる。

3) LCX M. ツベルクローシス・ダイナジーン

4本のプローブとDNA連結酵素であるリガーゼを用いてDNAを増幅する方法である。原理は、標的DNAの1本鎖に相補的な2本のプローブが結合し、次いでプローブ間の隙間はPCRで埋め、最後に耐熱性リガーゼで連結させ、2本鎖DNAを合成する。

2. 臨床材料からの結核菌の検出

結核菌のIS6110配列の541bp DNAを増幅するPCRとMTDの検出感度を塗抹法およびSepti-Chekによる培養法と比べた。表4に示したように、塗抹と培養の両者が陽性例は核酸増幅法ではほぼ全例陽性の反応を示したが、塗抹陰性・培養陽性例では核酸増幅法で陰性を示す例が少なくなかった⁸⁾。しかし、特異性に問題はなかった。アンプリコアおよびLCXの成績も同様である。すなわち核酸増幅法の感度は塗抹や小川法より高いが、液体培地による培養と同等である。

3. 核酸増幅法の評価

臨床材料に応用したときに偽陽性例に加え偽陰性例もみられることが報告されている。このことは定期的な精度管理が必要であることを示している。従来からの塗抹と培養検査は重要であり、核

表4. 核酸増幅法と従来からの塗抹および培養法との比較

臨床材料	PCR		MTD	
	陽性	陰性	陽性	陰性
塗抹陽性・培養陽性・結核菌	21	1	22	0
塗抹陰性・培養陽性・結核菌	5	5	7	3
MOTT培養陽性	0	18	0	18
塗抹陽性・培養陰性	1	2	1	2
塗抹陰性・培養陰性	5	77	4	78
計	32	103	34	101

核酸増幅法で代行することはできない。米国のCDCも同様のコメントを発表している。結核菌の検出がまれな喀痰以外の材料や結核の病気の進行が速いエイズ患者の診断には特に有効と思われる。この検査はコストの高い検査であり、経済性と検出感度を考慮し使用する必要がある。

おわりに

1993年に米国のCDCは結核患者の適切な管理と治療のために分離結核菌の同定と感受性試験の成績を30日以内に臨床医に報告することを求めている⁹⁾。しかし、小川培地による検査ではそれを実現することは不可能である。液体培地の導入は初代分離のみに留まらず、鑑別や感受性試験の時間の短縮にもつながることから、早急の導入が望まれる。他方、液体培地の有効性は認めているにもかかわらず、高価であることから日常の検査への導入を控えているのも事実であろう。

遺伝子のもつ特異性と遺伝子を用いた検査の特異性とは異なるものである。特に核酸増幅法は高感度であるがゆえに偽陽性の心配も必要である。核酸増幅法は塗抹や培養検査と同等の補助手段の1つとして用いるべきであり、診断は臨床症状なども含め総合的に下されるものであろう。

文 献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：新結核菌検査指針。東京，結核予防会，2000
- 2) 阿部千代治：酸素反応性蛍光センサーを用いた新しい抗酸菌迅速培養システムの検討。感染症誌 **70**：360-365, 1996
- 3) 斎藤 肇，螺良英郎，山中正彰，他：MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) の評価に関する10施設での共同研究。臨床と微生物 **24**：897-903, 1997
- 4) Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al: Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol **30**：878-881, 1992
- 5) 阿部千代治，平野和重，和田雅子，他：酸化還元インジケーターを用いた抗酸菌迅速培養システムMB-Redoxの評価。結核 **74**：707-713, 1999
- 6) Abe C, Hirano K, Tomiyama T: Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol **37**：3693-3697, 1999
- 7) 青木正和，片山 透，山岸文雄，他：PCR法を利用した抗酸菌DNA検出キット(アンプリコア™マイコバクテリウム)による臨床検体からの抗酸菌迅速検出。結核 **69**：593-605, 1994

-
- 8) Abe C, Hirano K, Wada M, et al : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test. J Clin Microbiol **31** : 3270-3274, 1993
- 9) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al : The Resurgence of Tuberculosis : Is your laboratory ready? J Clin Microbiol **31** : 767-770, 1993

結核菌について—最近の細菌学的知見—

阿部千代治

結核予防会結核研究所/あべ・ちよじ

はじめに ●

近年分子生物学が急速に進歩し、研究室や検査室で容易にDNAやRNAを操作することができるようになった。これらの技術は試験管内で培養が困難な菌や増殖が遅い結核菌の研究の促進に大いに貢献してきた。ここでは、近年公表された結核菌のゲノム構造、病原性に関する因子、抗結核薬耐性の分子機構について記述する。

結核菌のゲノム構造 ●

1998年に結核菌 H 37 Rv 株の全ゲノムの遺伝子配列が報告された¹⁾。ゲノムは4,411,529塩基対(bp)からなっており、ゲノムの大きさは現在明らかにされている中で大腸菌について2番目である(表1)。G+C含量は65.6%と高く、遺伝子全般にわたってG+C量は一定している。しかし、平均G+C量の高い領域、polymorphic G+C-rich sequence(PGRSs)を含む巨大遺伝子ファミリーもみついている。

結核菌 H 37 Rv 株はRFLP分析に用いている挿入配列 IS6110 を16コピー、より安定な配列として知られている IS1081 を6コピー含んでいる。ほかにも32種の挿入配列が見出された。挿入配列の大部分は遺伝子間あるいは非コード領域でしばしばtRNA遺伝子の近くに挿入されており、ほかの遺伝子に影響を与えていない。プロファージは二つ(phiRv1とphiRv2)みつかり、それらの遺伝子産物のいくつかはStreptomycesと非病原性抗酸菌由来のプロファージによりコードされている遺伝子と相同性をもっている。強毒M. bovisを継代し弱毒化する過程のなかでBCGはphiRv1プロファージを失っている。

遺伝子として働いている可能性のある領域(open reading frame)は3,924個存在し、これら

表1 結核菌 H37Rv 株のゲノム

ゲノムの大きさ: 4,411,529bp
G+C 含量: 65.6%
open reading frame: 3,924 個
40%: 機能が明らか
44%: ほかの遺伝子と類似性
16%: 機能不明
IS6110 コピー数: 16
シグマ因子: 13 個
脂肪酸代謝にかかわる遺伝子: 250 個

の遺伝子が働くことにより菌がその機能を発揮している。遺伝子の約40%は既存のデータベースとの比較からその機能が明らかであり、44%は何らかの遺伝子との類似性が見出されている。したがって残りの16%(600個くらい)が機能不明であり、そのうちの相当部分は結核菌特有の遺伝子であろうと推測されている。

結核菌は必須アミノ酸、ビタミン、補酵素を合成するのに必要な遺伝子をすべて保有している。また多糖体、アルコール、ケトン、カルボン酸を代謝できる。さらに脂質代謝に関する機能に加えてペントースリン酸経路とトリカルボン酸およびグリオキサリル酸サイクルに必須酵素もすべて保有している。

転写開始のレベルで情報発現に重要なシグマ因子が13個、100個以上の調節蛋白が同定された。セリン/スレオニン蛋白カイネース(STPKs)はシグナル伝達経路に機能し、休眠と細胞分裂のような重要な細胞機能の決定にかかわっているものと考えられる。

結核菌は多くの抗生物質に耐性である。この耐性は主に浸透性バリアとして作用している疎水性細胞表面層によるものであるが耐性決定子もゲノムにコードされている。例えばβ-ラクタマーゼやアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼの

- ◎ 結核菌 H37Rv のゲノムの大きさは 4.4Mb であり、G+C 含量が高い。
- ◎ 結核菌の遺伝子の 16% はその機能が不明である。
- ◎ 結核菌は大腸菌の 5 倍の脂肪酸代謝酵素をもっている。

ような加水分解あるいは薬剤修飾酵素、薬剤排出システムが見出されている。

結核菌はパルミチン酸やツベルクロステアリン酸のような単純な脂肪酸からミコール酸やフェノールフチオセロールアルコールのような長鎖で複雑な分子まで多様な親油性分子を産生する。細菌、哺乳類や植物に通常みられる脂質やポリケタイド生合成システムをすべて含んでいる。脂肪酸代謝にかかわる酵素が約 250 種存在しており、大腸菌の 50 種と比べ 5 倍であり、結核菌の大きな特徴である。

今後残り 16% の遺伝子の説明が待たれる。

病原性にかかわる因子 ●

微生物が病原性を発揮するためには粘膜表層に定着、宿主細胞へ侵入、宿主環境内で増殖、宿主防衛機構に抵抗、組織破壊を引き起こす必要がある。菌が宿主細胞に付着、侵入するために補体レセプター (CR)、マンノースレセプター (MR)、Fc レセプター、サーファクタント A レセプター (Sp-A)、CD 14、スカベンジャーレセプターなどを利用している。抗酸菌側のリガンドとして次の成分が知られている。CR 3 への結合にグルカン、MR への結合に 19 kDa リポ蛋白、45-47 kDa 糖蛋白とフォスファチジルイノシトールマンノシド (PIM)、Sp-A の結合に 60 kDa 蛋白が関与しているものと考えられている²⁾。リポアラビノマンナン (LAM) に対する抗体は結核菌の表層構造を認識するが結核菌表層に LAM を検出できないことから、MR への結合に関与するとは考えにくい。

鉄の獲得は細胞内寄生性細菌にとって特に重要である。結核菌の鉄キレーター (シデロフォア) であるエキソケリンはヒトの鉄結合蛋白から鉄を取り、細胞壁に結合しているミコバクチンにそれ

を渡すことができる。鉄依存リプレッサー (iron-dependent repressor: IdeR) 遺伝子が結核菌、*M. bovis*, *M. smegmatis* で見出された。*M. smegmatis* において、IdeR 遺伝子の変異株ではシデロフォア生合成の調節が抑制されている。IdeR の結合部位が 5 箇所結核菌で知られている。それらの下流には病原性の因子と考えられる遺伝子が存在している。このことは IdeR は病原性に必須な遺伝子の調節に重要であることを示している。

殺菌的に働く $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , O_2^- のような活性酸素や酸化窒素 (NO) は菌の表層バリアを通過できるが結核菌のもつスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) やカタラーゼ/パーオキシダーゼにより不活化される。2 種の酵素活性は結核菌の培養濾液と表層物質にみられたが非病原性抗酸菌にはみられなかった。

結核菌は、休眠状態で数十年間感染宿主内に存在する。16 kDa 熱ショック蛋白 (α -クリスタリン: Acr) は正常発育状態ではわずかしか産生されないが酸素制限下には強く誘導されることから酸素制限下の結核菌の抵抗性にかかわっていると考えられる。

シグマ因子のような転写調節因子は結核菌の環境への適応に役割を演じている。結核菌の *sigF* 遺伝子は枯草菌で芽胞形成やストレス応答にかかわる *sigF* および *sigB* と相同性をもつ。この因子は、指数増殖期の BCG 培養にはみられなかったが定常増殖期には強く誘導された。また指数増殖期の後期に抗結核薬に曝したとき量依存的に高められた (特に EB, RFP, SM, CS)。これらのことは、ヒトの結核感染あるいは化学療法下の宿主内における持続感染に重要な遺伝子を制御していることを示している³⁾。病原性に関与する遺伝子の発現調節に *sigA* がかかわっていることも報

- ☉ 鉄の獲得は細胞内寄生性細菌にとって重要である。
- ☉ 病原性遺伝子の発現調節にシグマ因子がかかわっている。
- ☉ 菌体糖脂質や多糖体が結核菌の病原性に関与している。

告された。

ほかの微生物と異なり結核菌に菌体外毒素の産生は認められず、表層物質に食作用の阻害活性もみられない。結核菌により引き起こされる宿主損傷は複数の成分による効果あるいは免疫機構の機能障害のどちらかに起因する。トレハロース 6,6'-ダイマイコレート (TDM) は種々の生物活性をもっている。TDM はマウスに毒性を示し、この毒性はサルファタイド添加で増強される。ほかにもフェノール糖脂質、アラビノマンナン、PIM、抗原 85 複合体、SL-1 などの物質が病原性にかかわっているものと考えられる。

宿主との反応に関与する結核菌成分について大分明らかになってきた。しかし結核菌と非結核性抗酸菌のヒトに示す病原性の違い、あるいは結核菌株間の病原性の違いにかかわる因子は不明である。前項で示したようにゲノム遺伝子の約 16% は機能が知られていない。今後これらの機能を明らかにすることにより病原性因子が解明されよう。

薬剤耐性の分子機構 ●

多くの INH 耐性菌にカタラーゼ活性の減弱がみられること、多剤耐性分離株ではカタラーゼ活性が完全に消失していることが知られている。ある高度耐性結核菌はカタラーゼとパーオキシダーゼの両者をコードしている *katG* 遺伝子を完全に欠失しており、INH 耐性分離株の約 50% は *katG* 遺伝子内に変異が認められる⁴⁾。INH は抗酸菌の無細胞系でミコール酸生合成を阻止する。このような INH 耐性の表現型を付与する遺伝子が分離され *inhA* と名づけられた。ほかにも β -ケトアシル ACP 合成酵素をコードしている *kasA* や低レベルの耐性を付与する遺伝子として *alkyl hydroperoxide reductase* をコードしている

表 2 薬剤耐性結核菌の耐性に関与する遺伝子の変異と頻度

抗結核薬	遺伝子	遺伝子の変異 (%)	野生型配列 (%)
INH	<i>katG</i> , <i>inhA</i> <i>ahpC</i> , <i>kasA</i>	92	8
RFP	<i>rpoB</i>	95	5
PZA	<i>pncA</i>	97	3
SM	<i>rpsL</i> , <i>rrs</i>	70	30
FQ*	<i>gyrA</i>	70	30

*:フルオロキノロン

ahpC が分離された(表 2)。

RFP の作用機構は RNA ポリメラーゼの β サブユニットに薬剤が結合することにより RNA の伸長と転写に影響を与えるものと考えられる。RFP 耐性菌の 95% 以上は RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子に変異がみられる。変異は 23 個のアミノ酸からなるホットスポット領域に集中して起こっている。

主要な抗結核薬の一つである PZA に耐性をもつ菌はピラジナミダーゼ (PZase) 活性を欠いている。PZase の役割は、細菌細胞内で PZA に作用し殺菌活性をもつ pyrazinoic acid に変えることにあり、PZA 耐性結核菌や自然耐性 *M. bovis* は PZase 活性を欠くため PZA に耐性を示すと考えられている。PZA 耐性菌の 95% は PZase をコードしている *pncA* に変異がみられる。

SM はアミノグリコシド抗生物質であり、30 S リボソームのサブユニットに作用し蛋白合成に影響を与える。SM 耐性菌ではリボソーム S 12 蛋白をコードしている *rpsL* 遺伝子と 16 S rRNA (*rrs*) 内の変異が明らかになっている。KM はほかのアミノグリコシド抗生物質と同様にリボソームに結合し蛋白合成に影響を与える。KM 耐性分離株の 70% は *rrs* 遺伝子の A 部位に変異がみられ

- 薬剤耐性に関与する遺伝子が明らかになってきた。
- 多剤耐性は個々の薬剤に対する耐性が独立して起こることにより発現する。
- 遺伝子で薬剤耐性菌が検出できる。

るが残りの30%はこの部位に変異がみられない。

抗酸菌はユニークな細胞壁構造をとっており、表層のミコール酸はアラビノガラクトン(AG)を介してペプチドグリカンと結合している。EMB耐性菌ではAGの重合を仲介する arabinosyl transferase をコードしている *embB* 遺伝子に変異がみられる。フルオロキノロン剤は結核菌に活性をもつことから多剤耐性結核の治療に用いられている。キノロン耐性結核菌はキノロンの細胞内標的である DNA gyrase の A サブユニットの構造遺伝子である *gyrA* の変異と関連している。

多剤耐性は複数の薬剤に耐性を付与する遺伝子座における変異あるいは薬剤の標的をコードしている遺伝子の個々に変異が起こることにより発現すると考えられる。しかしこれまで多剤耐性に関与する遺伝子の分離の報告はないことから、一つの細胞で個々の薬剤に対する耐性の発現が独立して起こることにより多剤耐性が発現されると考えられる。

耐性に関与する遺伝子の変異の検出についても、DNAチップ法、ラインプローブ法、分子ビーコン法などが研究されている⁵⁾。一部の薬剤についてはすでにキットによる検出も可能となったが、大部分の薬剤は複数の分子機構により耐性の発現が起こっていることなどから、日常の検査に応用できるまでにはさらに年月を要するであろう。

おわりに ●

結核は古い病気であるにもかかわらず未だ解明されていないことが沢山ある。感染した結核菌が

完全に殺されることなくどのような状態で数十年間潜在できるのか、結核のワクチンはなぜ生菌でなければならないかあるいは必須の抗原は何か、ヒトに対する病原性を規定している因子は何か、発育速度が遅い理由は発育のために必須な要素が培地に不足しているのかあるいは遺伝子の欠陥か、など重要なことがほとんどわかっていない。ここに記述したように機能のわかっていない遺伝子も多数あり、今後その機能を調べることによりこれらの問いに答えることができるだろう。



文 献

- 1) Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J. et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequences. *Nature* **393**: 537-544, 1998
- 2) Daffe, M., Etienne, G.: The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuberc Lung Dis* **79**: 153-169, 1999
- 3) Michele, T. M., Ko, C., Bishai, W. R.: Exposure to antibiotics induces expression of the *Mycobacterium tuberculosis sigF* gene: implications for chemotherapy against mycobacterial persistors. *Antimicrobiol Agents Chemother* **43**: 218-225, 1999
- 4) Ramaswamy, S., Musser, J. M.: Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuberc Lung Dis* **79**: 3-29, 1998
- 5) 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

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 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町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にいくつかの分子遺伝学的研究成果が臨床に活用されてきている。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の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/oxyR* 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) エタンブトール耐性: *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, Reyrat JM, Gicquel B: Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol*. 1998; 28: 413-420.

3 結核の細菌学的検査法

あべ ちよじ
 ■ 阿部 千代治
 結核予防会結核研究所基礎研究部



阿部 千代治
 1965年岩手大学農学部卒業。68年東京大学医科学研究所細菌研究部、81年ドイツ国マックスプランク免疫生物学研究所、85年結核予防会結核研究所、現在に至る。研究テーマは抗酸菌症の迅速診断。

Key words : 結核菌, 抗酸菌, 小川培地

はじめに

ここ十数年の間に抗酸菌の細菌学的検査に大きな進歩が見られた。液体培地を用いる結核菌の分離培養、核酸の相同性を利用した分離抗酸菌の鑑別・同定や患者材料から直接結核菌の遺伝子を検出する核酸増幅法などは既に多くの施設で日常検査に採り入れられている。これら検査法は本年5月に出版された日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編「新 結核菌検査指針」¹⁾に含まれている。この新しい検査指針の中で従来からの検査法も大幅に改定された。ここでは変更内容の紹介に加え、新しい検査法と従来の検査法をどのように組み合わせて使用すべきかについても触れた。

1. 検査材料

患者から採取された喀痰が適切かどうかは検査の精度を保持する上で重要である。担当の医師は直接確認し、不適切であれば再度患者に提出してもらう。日常の外来診察中に材料の確認が不可能であれば検査室の報告を参考にする。従って検査技師は塗抹染色の結果を担当の医師に報告する際に、塗抹鏡検の結果に加え喀痰材料の性状も付記

すべきである。幼児や高齢者など喀痰の排出が困難な場合に誘導喀痰や胃液の検査をする。

2. 検査の頻度

初診時に連続3日喀痰を採取し、塗抹および培養検査を行う。3回の塗抹および培養検査が陰性的の場合に、塗抹および培養検査を行った日とは別の日に気管支鏡を用いた検査を行うことができる。また3回の塗抹および培養検査に加え、診断時に核酸増幅法を1回行うことができる。これらの検査は保険診療で認められている。

3. 塗抹検査

(1) 直接塗抹と集菌材料の塗抹

わが国では、喀痰の濃厚な部分を採取し直接スライドガラスに塗抹する方法を採用してきた。しかし菌は材料の中に均一に分布しているわけではなく、採取部位により得られる結果は異なる。検査の精度を保持するために、均等化後遠心集菌材料(NALC-NaOH処理)を塗抹検査に供することを勧める。但し外来患者で検査の結果を急ぐ場合は直接塗抹で検査する。しかしこの場合も最終的

Laboratory diagnosis of the mycobacterioses : Chiyoji Abe, Department of Basic Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

表1. 鏡検における検出菌数記載法

記載法	蛍光法 (200倍)	チール・ネールゼン法 (1,000倍)	備考* (ガフキー号数)
—	0/30視野	0/300視野	G0
±	1~2/30視野	1~2/300視野	G1
1+	2~20/10視野	1~9/100視野	G2
2+	≥20/10視野	≥10/100視野	G5
3+	≥100/1視野	≥10/1視野	G9

*相当するガフキー号数

には集菌材料から塗抹標本を作製し、結果の確認をする。

(2) 蛍光染色

抗酸菌の染色にZiehl-Neelsen(Z-N)法と蛍光法が用いられている。材料中に菌が少ない場合にZ-N法では見落しする場合がある。これに対し蛍光法では、暗い視野の中に結核菌がオレンジ色に光って見えるので見落しが少ない。また観察に要する時間も短縮できることから、検査指針では塗抹材料の染色法として蛍光法を勧めている。但し蛍光法では糸屑などが光って見えることもあるので、1視野に1個あるいはそれ以下の場合にはZ-N法で確認する必要がある。この場合、蛍光染色標本をZ-N法で染色できる。

(3) 塗抹検査の結果の記録

わが国では塗抹検査の結果をガフキー号数で表している。しかし標本中の菌数は材料の採取部位や塗抹の厚薄により変動するので、細かく分けても意味がない。新結核菌検査指針ではガフキー号数での表示に代えて検出菌数を1+, 2+, 3+で表すことにした(表1)。このような表示は諸外国でも採用されている。結核定期外健康診断ガイドラインの中で感染危険度指数の算定にガフキー号数の使用が記載されているが、解説書²⁾にも記述されているように1+はガフキー2号, 2+は5号, 3+は9号と読み替えて算定に用いることで

問題は起こらない。これまでガフキー1号と表示していた例は±(要再検)と記述し、同一の材料または別の材料で再検査することとした。

4. 培養検査

(1) 検査材料の前処理

目的は検査材料を消化均等化し、含まれる雑菌を殺し抗酸菌のみを選択的に培養することにある。非結核性抗酸菌は結核菌よりもアルカリに対する抵抗性が弱く、処理後のコロニー形成単位に減少が見られる。したがって粘液溶解剤を加えることにより水酸化ナトリウムの濃度を低く抑えることが重要である。新検査指針では粘液溶解剤であるN-アセチル-L-システイン(NALC)を用いたNALC-NaOH法³⁾の使用を勧めている。NALC-NaOH法は、前処理剤による消化・均等化と遠心による集菌を組み合わせ、アルカリによる影響を極端に少なくした方法であり、諸外国でも用いられている。液体培地に接種する場合には均等化・集菌処理は必須であること、この方法で処理した材料を卵培地に接種した場合に検出率は高まることも報告されている⁴⁻⁵⁾。さらにNALC-NaOH処理検体は培養のみならず塗抹検査および核酸増幅法にも用いられる。

(2) 液体培地と卵培地

1993年に米国のCDCは結核菌の分離および鑑

表2 種々の培地によるS87喀痰材料からの抗酸菌の分離

分離菌(n)	分離株数(%)					
	MB Redox	MGIT	2%小川	MB Redox + 2%小川	MGIT + 2%小川	MB Redox + MGIT
結核菌 (133)	115(86.5)	122(91.7)	87(65.4)	124(93.2)	128(96.2)	129(97.0)
MOTT(70)	62(88.6)	63(90.0)	46(65.7)	66(94.3)	64(91.4)	69(98.6)
合計(203)	177(87.2)	185(91.1)	133(65.6)	190(93.6)	192(94.6)	198(97.5)

MOTT：非結核性抗酸菌

別・同定の結果を14日以内に、薬剤感受性試験の結果を30日以内に担当医に報告するよう勧告した⁶⁾。患者材料からの分離結果の報告までに要する時間の短縮は適切な治療を行う上で重要である。わが国では、卵培地を用いていることから上の勧告を満足させることは不可能である。液体培地の有用性は多くの人が認めている(表2)。一方卵培地で分離できても液体培地で分離できない抗酸菌が存在することも報告されている。結核菌検査指針では、初回分離に液体培地と卵培地を1本ずつ用いることを勧めている。しかし検査室の受容力や液体培地の価格の問題などがあり3回の培養検査に液体培地と卵培地を1本ずつ用いることが不可能な病院もあろう。液体培地の導入に際し施設内で十分に検討する必要がある。例えば、①液体と卵培地の両者を3日間、②2日を両者、1日を卵培地のみ、③2日を液体培地、1日を卵培地など。

卵培地は使わず液体培地のみを使用することを考えている施設もあると聞いている。しかし液体培養のみでは菌数が測定できないために非結核性抗酸菌症の診断^{7,8)}に不都合が生じること、結核菌と非結核性抗酸菌の両者が同時に分離されることがあり、その場合結核菌に対する薬剤感受性を誤ることなど問題が残る。

入院患者の退院の時期は原則として塗抹検査と小川培地による培養検査の結果によって判定され

ており、問題は生じていないことから治療中の患者の培養検査にはこれまでどうり小川培地のみを用いる。但し塗抹陽性が続いているにもかかわらず小川培地で結核菌が分離できない場合は液体培地による培養も加える。それは、薬剤耐性菌の中には液体培地で分離できても卵培地で発育し難い菌が存在するからである。

5. 核酸増幅法

数時間のうちに多量のDNAやRNAを増幅する技術が開発された。これらの手法は培養困難な微生物の検出や迅速な診断が要求される例で特に有効である。結核菌検出のためのキットは既に3社(DNAプローブ中外-MTD, アンプリコア・マイコバクテリア, LCX M. ツベルクローシス・ダイナジーン)から発売されている。これらキットの感度と特異性に差は認められない。

米国食品医薬品局(FDA)は核酸増幅法の承認の際に塗抹陰性例の感度が低いことからその適応を塗抹陽性例に限定した。その後、検体量を増やした改良型MTD(現在市販されているキット)がGen-Probe社から発売され、米国を中心とした評価研究で塗抹陰性例でも高い感度と特異性(陰性一致率)を示した⁹⁾ことから、先のFDAは改良型MTDを塗抹陰性例からの結核菌の検出および結核症を否定するための検査にも拡大すること

を承認した。

わが国では、初回診断時の3日間の塗抹および培養検査に加え、核酸増幅法による検査を1回保険診療で行うことができる。喀痰塗抹陽性の場合、患者管理の上で結核か非結核性抗酸菌症かを早急に鑑別する必要があり、検体の入手後1~2日で結果が得られる核酸増幅法による検査は有効である。

先の日本結核病学会予防・治療合同委員会勧告¹⁰⁾にも示されているように、核酸増幅法を治療中の患者の経過判定に使用しない。また結核菌が陰性の場合、多くの施設で塗抹陽性・塗抹陰性の別なく機械的に *M. avium* または *M. intracellulare* 試験が行われている。しかし現在市販されているキットは定性検査であり、検体中の菌量を知ることができないことから、非結核性抗酸菌症の診断基準との関連を考えたときに塗抹陰性検体への使用は留意すべきである。

6. 薬剤感受性試験

従来からの1%小川培地を用いる薬剤感受性試験について、試験濃度や判定方法について結核専門医の間に検討を望む意見が以前からあった。また結核療法研究協議会が行ったアンケート調査で、試験の結果が適切に利用されていない例もることが判明した。日本結核病学会では1996年に薬剤耐性検査検討委員会を設置し検討を重ね、1997年に小川培地を用いる比率法を新しい薬剤感受性試験法として提案した¹¹⁾。この提案を受けて、結核予防法による結核の適性医療の指針となる「結核医療の基準」の中で耐性判定薬剤濃度の改正（1999年11月）が行なわれた（表3）。

従来法との違いは試験濃度を1濃度にしたこと、Canettiらにより研究され¹²⁾、諸外国で用いられている濃度が採用されたことである。また判定について、耐性菌の割合が1%以上になれば1~2ヵ月以内に大多数が耐性菌で占められるようにな

表3. 小川培地による薬剤感受性試験に用いる薬剤の試験濃度

抗結核薬	略号	試験濃度 (µg/ml)
イソニアジド	INH	0.2 ^a , 1.0
リファンピシン	RFP	40
ピラジナミド ^b	PZA	
ストレプトマイシン	SM	10
エタンブトール	EB	2.5
カナマイシン	KM	20
エンビオマイシン	EVM	20
エチオナミド	TH	20
サイクロセリン	CS	30
パラアミノサリチル酸	PAS	0.5
レボフロキサシン ^c	LVFX	1.0

^a 基準値

^b PZAに対する感受性はピラジナミダーゼ試験で行う。

^c LVFXは抗結核薬に指定されていないが、多剤耐性結核例に使われていることからここにあげた。

るとする考えから耐性菌の割合が1%未満を感受性、1%以上を耐性とすることにした。この方法は、用いる培地は異なるが諸外国で採用している方法と同様であり、得られた結果は相互に比較可能である。

提案された小川培地を用いる比率法は結核菌並びに *M. kansasii* に対する感受性を知るための試験法であり、*M. avium complex* や迅速発育抗酸菌のための感受性試験法ではない。それゆえ、*M. kansasii* 以外の非結核性抗酸菌について小川培地を用いる比率法で薬剤感受性試験は行わない。非結核性抗酸菌の感受性を知る有効な方法が開発された際には検討が必要である。

ピラジナミド (PZA) のMIC値は培地のpHにより左右されることもあり、これまで標準となる感受性試験法は確立されていない。PZAは1950年代の初めに結核の治療に導入された。治療により出現したPZA耐性菌はピラジナミダーゼ活性を欠くこと、また通常ピラジナミダーゼ活性の消失とPZA耐性発現の間に相関がみられることが明らかになった。日本結核病学会はPZA感受性試験法としてピラジナミダーゼ試験を提案した¹³⁾。