

- patients with pulmonary Tuberculosis in Madras, India, by use of Direct-Repeat probe. *J Clin Microbiol* 33 : 3037~3039, 1995
- 3) Ross C, Raios K, Jackson K, et al : Molecular cloning of a highly repeated element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 30 : 942~946, 1992
 - 4) Kamerbeek J, Schouis L, Kolk A, et al : Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35 : 907~914, 1997
 - 5) 高橋光良, 阿部千代治 : ISタイピング法 : IS6110をプローブとしたRFLP分析による結核菌の亜分類. *日細誌* 49 (5・6) : 853~857, 1994
 - 6) Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : Recommendations for a Standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31 : 406~409, 1993
 - 7) Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, et al : Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol Immunol* 37 (4) : 289~294, 1993
 - 8) van Soolingen D, Hermans PWM, de Hass PEW, et al : Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains : evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29 : 2578~2586, 1991
 - 9) Yeh RW, de Leon AP, Agasino CB, et al : Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Genotypes. *J Infect Dis* 171 : 1504~1513, 1998
 - 10) Butler WR, Haas WH, Crawford JT : Automated DNA fingerprinting analysis of *Mycobacterium tuberculosis* using fluorescent detection of PCR products. *J Clin Microbiol* 34 : 1801~1803, 1996
 - 11) Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, et al : Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 31 : 2446~2450, 1993
 - 12) Takahashi M, Kazumi Y, Hirano K, et al : Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* infection based on RFLP analysis. *Kekkaku* 70 : 553~559 (Japanese), 1995
 - 13) Park Y, Bai G, Kim S : Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the western pacific region. *J Clin Microbiol* 38 : 191~197, 2000
 - 14) Yang ZH, de Hass PEW, van Soolingen D, et al : Restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992. Evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. *J Clin Microbiol* 32 : 3018~3025, 1994

DNA チップによる結核菌の耐性診断

Diagnosis of Drug Resistant Tuberculosis by DNA Chip

鈴木定彦*¹ 市原竜生*²田丸亜貴*³ アミン・ルフル*⁴勝川千尋*⁵ 牧野正直*⁶ 阿部千代治*⁷

効率の良い結核治療を行うためには、迅速な薬剤感受性試験が不可欠である。現在、これまでの培養をベースとした検査法に加え、遺伝子工学的手法の導入も行われてきている。本稿では、結核菌の薬剤耐性に関する遺伝子変異、およびこれらの遺伝子工学的な手法による検出について解説するとともに、筆者らが開発した低密度 DNA チップによる耐性診断法について詳述する。

1. はじめに

結核はかつて国民病と言われた重大な疾病で、年間死亡者が10万人を超える年が続いていたが、栄養事情の向上、衛生状態の改善、化学療法の普及等に伴って、死亡数および罹患率は着実に低下してきた。しかし、1998年には依然として2,795人が結核で死亡しており、この数は単独の感染症による死亡としてはC型肝炎に次ぐ2位であった¹⁾。現在、患者の多くは結核が流行していた時期に結核菌に感染した中高年の既感染者からの発病であり、若年層の結核患者は減少している。治療歴のない患者よりの結核菌が主要薬剤（リファ

ンピシン (RFP)、ストレプトマイシン (SM)、エタンブトール (EB)、イソニコチン酸ヒドラジド (INH)、カナマイシン (KM)) のいずれかに耐性である割合は5.6%であるのに対して、既治療例では27.8%と、約5倍にも跳ね上がっている。さらに、未治療例では耐性結核菌のほとんどが単剤耐性であるのに対して、既治療例では多剤耐性の割合が50%以上に激増している。

多剤耐性結核菌の蔓延を未然に防ぐためには、的確な治療を行い、耐性菌の出現を防ぐことが重要な課題と考えられる。そのためには結核菌の薬剤感受性を的確に把握し、治療に当たることが重要である。このような観点から薬剤耐性検査は重

* 1 Yasuhiko SUZUKI 大阪府立公衆衛生研究所 主任研究員

* 2 Tatsuo ICHIHARA 日清紡(株) 研究開発センター

* 3 Aki TAMARU 大阪府立公衆衛生研究所

* 4 Amin RUHUL 大阪府立公衆衛生研究所

* 5 Chihiro KATSUKAWA 大阪府立公衆衛生研究所

* 6 Masanao MAKINO 国立療養所邑久光明園

* 7 Chiyoji ABE 結核予防会 結核研究所

要であると言える。

これまでの結核菌の耐性診断は、培養をベースとした薬剤感受性試験が行われてきている。最も一般的な方法として、検査材料をアルカリで処理後、中和して、直接感受性培地に接種する直接法と分離培養により得られた集落から菌液を作り接種する間接法が用いられている。直接法では接種菌量の不均一性、前処理剤の影響等により結果が安定しないため現在は間接法に重きが置かれている。結核菌の増殖は他の細菌に比べて著しく遅く、間接法による薬剤感受性試験では結果が判明するまでに6～8週間を要する。これに対してベクトン・デッキンソン社の Bactec システムは、生菌より放出される二酸化炭素の量を定量することにより菌の増殖の有無を判定する方法であり、間接法でも約4週間で判定が可能であるが、培地中に放射性物質を含むため、わが国での日常業務での使用にはそぐわない。

現在、酸素非存在下でのみ蛍光を発する蛍光物質の tris 4, 7 - diphenyl - 1, 10 - phenantroline ruthenium (II) chloride をセンサーとした非放射性抗酸菌迅速検出システム MGIT 法が普及しつつある。しかし、本法によっても結果が得られるまでの日数は間接法で約4週間必要である。この他にもセプティチェック AFB, MB/BacT, MB REDOX 等がある。培養をベースとした感受性検査法で判定までの日数が短縮されたとはいえ、安定した結果が得られるまでにはやはり4週間程度は要する。

結核菌の生育速度から考えて、培養をベースとした方法ではこれ以上の迅速化を望むのは難しいと思われる。そこで考えられるのが遺伝子工学的手法をベースとした薬剤感受性試験である。また、DNA チップ技術を導入することによりさらなる迅速化も試みられてきた。

以下に結核菌の多剤耐性獲得機序、それに関係する遺伝子、および遺伝子工学的な手法による検出法のいくつかの実例を上げるとともに、筆者らが開発した低密度 DNA チップによる結核菌の耐性診断について詳述する。

2. 結核菌の多剤耐性獲得機序

結核菌の薬剤耐性獲得は「変異と選択」によって説明されている。つまり、結核菌は薬剤により異なる自然に起こる突然変異によって、様々な薬剤に対する耐性を獲得する。その頻度は薬剤により異なり、INH: 3.5×10^{-6} , SM: 3.8×10^{-7} , RFP: 3.1×10^{-8} , EB: 0.5×10^{-4} 等と推測されている。

仮に結核患者に対してある抗結核剤を単剤投与すると、一定の割合の耐性菌が生き残ることになる。一旦回復したかに見える患者も生き残った耐性菌により再び発症する。この時治療に2剤目の抗結核剤を用いれば、同様な機序により2剤目にも耐性となり、この結核菌は2剤に対して耐性を獲得する。このような機序により多剤耐性を獲得する。

初回治療の段階から単独療法ではなく2剤以上を併用した場合には、通常の結核患者では耐性菌の出現をほとんど考える必要はない。使用薬剤のどれに対しても耐性でない場合は2剤以上の併用で良い。しかし、2剤の併用療法を行った場合に、それらのうちのいずれかに対して耐性を獲得している結核菌により発病している患者では、ほぼ確実にもう一方の薬剤に対する耐性を獲得するものと考えてよい。この場合、治療に入る前に薬剤感受性に関する情報が得られていれば、耐性の薬剤は除外した他の複数の薬剤を選択することができ、新たな耐性菌の出現も考えなくて良い。従って、迅速に薬剤感受性を鑑別することは、結核の治療の面で最も重要な課題の一つと考えられている。

3. 結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子

結核菌の薬剤耐性のメカニズムについては数多くの研究が様々な生化学的手法、遺伝子工学的手法等を用いて進められてきており、それぞれの薬剤に対する耐性を決定する変異が明らかにされてきている。以下にそれらの解説を行う。

3.1 イソニアジド (INH) 耐性

INH 耐性結核菌の一部にカタラーゼ活性の欠

損があることについては以前から報告されてきている。Zhang ら²⁾により、その原因が catalase-peroxydase 遺伝子の欠損であることが 1992 年に報告された。さらにそれに続いて、INH 耐性に関与する遺伝子として *inhA*³⁾, *aphC/OxyR*⁴⁾ 遺伝子が同定された。これらの変異と 80% の INH 耐性との相関が見られる。

3.2 リファンピシン (RFP) 耐性

結核菌の RNA ポリメラーゼベータサブユニットをコードする遺伝子 (*rpoB*) 上の点突然変異とリファンピシン耐性の間に強い相関性があることが Telenti ら⁵⁾により報告された。筆者らは⁶⁾, 日本で分離された結核菌においても同様な現象が見出されることを報告した。その後も *rpoB* 上の 81 塩基コア領域における変異と RFP 耐性の間の相関性に関して多数の報告がなされ、約 95% の RFP 耐性結核菌において *rpoB* 上に変異が存在することが明かとなった。

3.3 ピラジナミド (PZA) 耐性

Scorpio ら⁷⁾は、結核菌のピラジナミダーゼをコードする遺伝子 (*pncA*) をクローニングし、さらにその遺伝子上の変異と PZA 耐性の間に強い相関性があることを見出した。平野らは⁸⁾, 多くの臨床分離結核菌において *pncA* 上の変異と PZA 耐性の間の相関性に関して研究を行い、約 93% の PZA 耐性結核菌において *pncA* 上に変異が存在することを報告した。

3.4 エタンプトール (EB) 耐性

Telenti ら⁹⁾, Sreevatsan ら¹⁰⁾により、EB 耐性結核菌の約 70% においてアラビノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 *embB* 上に、感受性株に見られない点突然変異が見られることが報告された。

3.5 ストレプトマイシン (SM) 耐性

SM 耐性結核菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子 (*rrs*) の変異と SM 耐性に相関性があることが

Douglass と Steyn¹¹⁾によって報告された。また、Finken¹²⁾らは、約 76% の SM 耐性菌において *rrs* 遺伝子または S12 リボソームタンパク質をコードする遺伝子 (*rpsL*) に変異が見出されることを報告した。筆者らは¹³⁾, 日本で分離された結核菌においても同様な現象が見出されることを報告した。その後も *rrs* あるいは *rpsL* 上の点突然変異と SM 耐性の間の相関性に関して多数の報告がなされ、約 80% の SM 耐性結核菌においてこれらの遺伝子上に点突然変異が存在することが明らかとなった。

3.6 カナマイシン (KM) 耐性

Mycobacterium smegmatis における KM およびバイオマイシン耐性の原因が *rrs* 上の変異であることが谷口ら¹⁴⁾により証明された。筆者ら¹⁵⁾は、臨床分離結核菌の KM 耐性菌株の同様の領域において変異が見られることを見出し報告した。これらの点突然変異は大腸菌において KM 耐性の原因として報告されているもの¹⁶⁾と同様であった。この領域はアミノグリコシド系抗生物質が結合し、ミスリーディングを引き起こす位置として報告されている。

3.7 その他の薬剤に対する耐性に関与する遺伝子

D-アラニンラセマーゼの過剰発現が D-サイクロセリン (CS) に対する耐性の原因である可能性が Caceres ら¹⁷⁾により示された。Cambau ら¹⁸⁾は、DNA ジャイレースをコードする遺伝子 *gyrA* 上の変異とニューキノロン系薬剤に対する耐性の相関について報告している。

4. これまでの遺伝子工学的手法による結核菌の耐性迅速診断

以上のように、抗結核剤 INH, RFP, PZA, EB, SM, KM に関しては、それぞれの薬剤耐性に関与する遺伝子が同定された。特に RFP と PZA においては、それぞれ約 95% および 93% の耐性菌を遺伝子変異により鑑別できるようになった。そ

れに伴ってこれらを迅速に検出する種々の試みがなされてきている。その一つは、PCR産物の直接塩基配列決定法であるが、大きな労力が必要となる点で、検査室での日常業務での使用にはそぐわない。PCR-SSCP法、ヘテロデュプレックス法といったPCR産物を一旦熱変性させた後徐々に変性をとぎ、塩基配列に特有な2次構造あるいは2本鎖形成を起こさせ、非変性ゲル電気泳動上での移動度の差を見る方法は1塩基の差も鑑別できるということになっているがDNA断片の長さに制限があること、泳動条件、解析が微妙であること等の欠点がある。PCRにより得られたDNA断片を一定の制限酵素で消化した後ゲル電気泳動で分析するPCR-RFLPはより手軽な方法といえるものである。しかし、この方法では目的の変異位置に制限酵素切断配列がある必要があり、一般的とは言えない。

Piatekら¹⁹⁾によりRFP耐性結核菌の画期的な迅速検出法が報告された。これは、分子ビーコンと呼ばれるステムループ構造を有するオリゴヌクレオチドで、その5'末端および3'末端にそれぞれ蛍光物質とクエンチャーが結合している。分子ビーコンが標的となるPCR産物と二重鎖を形成すると、蛍光物質とクエンチャーの物理的距離が遠くなるため、クエンチングがもはや起こらず、結果として蛍光を発する。彼らは、PCR反応液中にRFP耐性菌において変異が検出される81塩基コア領域をカバーする5本の分子ビーコンを製作し、これらを用いて実験を行い良好な結果を得ている。本法の利点は、PCR反応の後キャップを開けることなしに結果が判定できる点にある。この方法では、RFP耐性のような限局された領域の限られた種類の変異は検出可能であるが、多種類の変異の検出には向かない。

5. DNAチップによる薬剤耐性結核菌の迅速鑑別

以上のように、突然変異検出の方法は様々ある。しかし、これらの方法が結核菌の薬剤耐性全てに適用できるというわけではない。それぞれの長所、

短所を理解して使い分けることが必要であろう。

筆者らの研究グループは、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。前述したように、それぞれの薬剤耐性に関与する遺伝子が次々と明らかになってきており、それらの遺伝子上の変異の位置と耐性の関係も明らかとなっている。そこで1塩基変異をも検出できる条件でのハイブリダイゼーションを行い、これらの変異を検出することをコンセプトとして研究を進めた。つまり、これまでに明らかになっている薬剤耐性と関連のある塩基置換、挿入あるいは欠失を検出することにより耐性感受性を判別するものである。

筆者らの開発したDNAチップの配列図を図1に示す。このチップでは各薬剤ごとに1つのブロックとして、Bで示した所に陽性コントロールとしてビオチン化オリゴヌクレオチドを配置した。また、陽性コントロールスポットの内側の左端1列には感受性型DNAをキャプチャーするためのオリゴヌクレオチドを、その右側には耐性型DNAをキャプチャーするためのオリゴヌクレオチドを配置した。例えば、RFPブロックの最上段では1つの感受性型に対して4つの耐性型オリゴヌクレオチドを配置してある。総計すると、35個の感受性型オリゴヌクレオチド、67個の耐性型オリゴヌクレオチドおよび結核菌と*M. avium*複合体を鑑別するための4個のオリゴヌクレオチドを配置してある。これらの全てについて解説を加えることはあまりにも膨大になるため、このDNAチップ上のRFP耐性検出領域のみを例にとりて解説を加える。

様々な研究室からの報告を総合して考えると、約95%のRFP耐性結核菌が*rpoB*遺伝子のRFPの作用点付近に変異を有していることが判明した(図2)。これらを特異的に検出することができればRFP耐性結核菌の検出が可能である。そこで、これらカバーするオリゴヌクレオチドを合成し、これをポリカルボジイミドでコートしたガラス表面に共有結合させてDNAチップとした。

一例として、81塩基対の領域の中で最も高頻

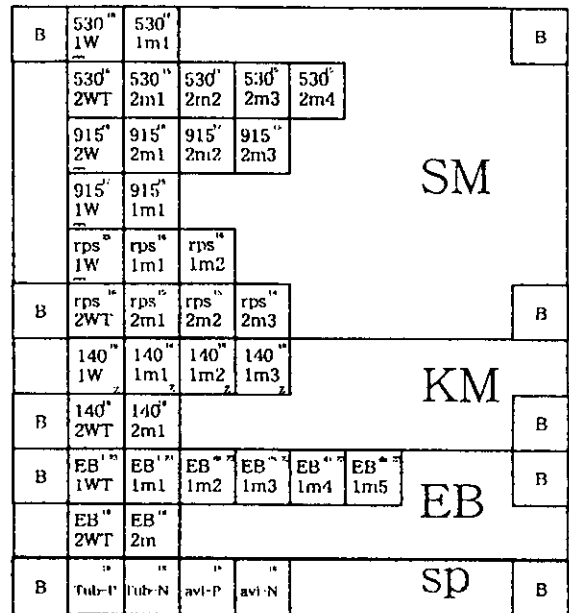
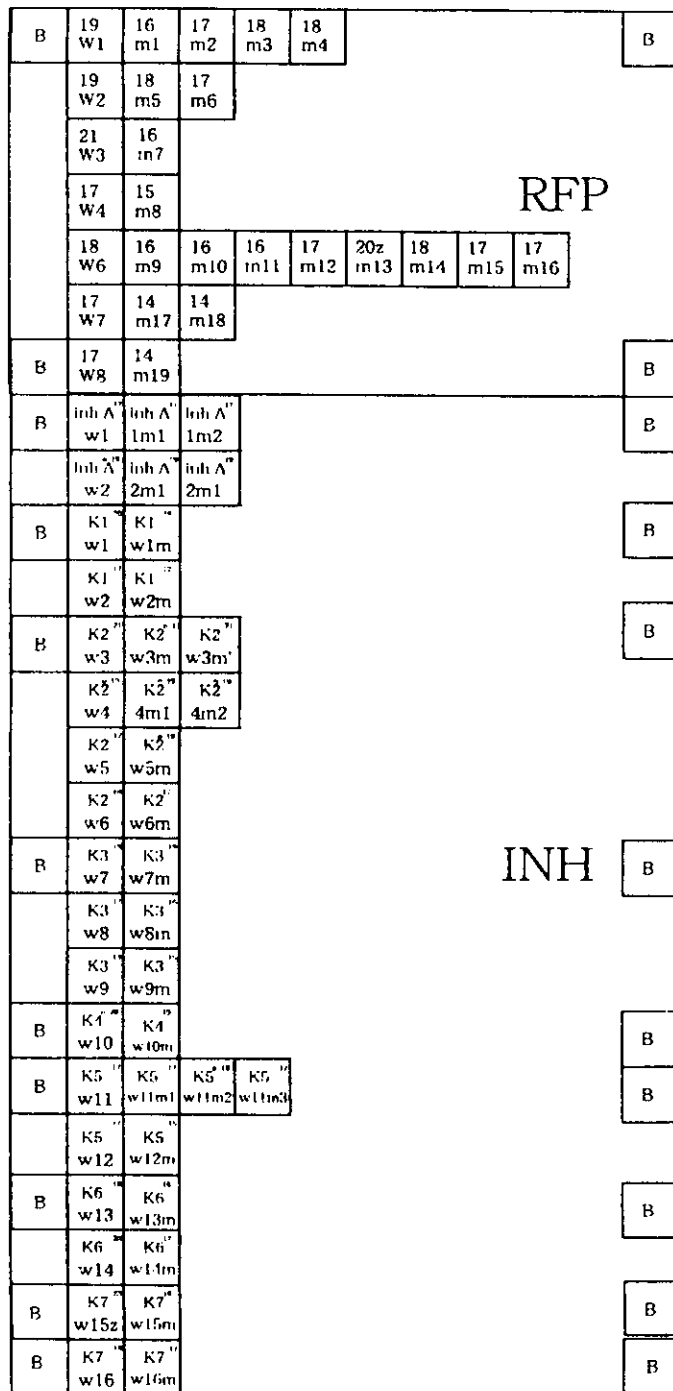


図1 筆者らが開発した薬剤耐性結核菌検出 DNA チップ上のオリゴヌクレオチドの配置図

Bの場所には陽性コントロールとしてビオチンを結合させてある。オリゴヌクレオチドはRFP, INH, SM, KM, EB耐性検出ブロックおよび結核菌と *M. avium* 複合体鑑別ブロック (sp) に別れている。それぞれの正方形の中の文字はスポットしたオリゴヌクレオチドの名前。

度に検出される変異の1つである76番目の塩基がCからTあるいはGへの変化を検出するためのオリゴヌクレオチドのデザインについて詳細に解説する。

最初にこの置換塩基を中央に配置したオリゴヌクレオチドを合成し、これを前述した方法で基盤に固定した。用いるオリゴヌクレオチドの長さは検出されるスポットの強さが最適となるように

GGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTTCATGGACCAGAACAACCCOGCTGTGGGGTTGACCCACAAGCGCGACTGTGGCGCTG	
-----A-----	1
-----G-----	2
-----T-----	1
-----C-----	2
-----T-----	31
-----A-----	3
-----T-----	2
-----T-----	5
-----G-C-A-----	3
-----A-----	2
-----G-----	34
-----T-----	98
-----C-----	4
-----G-----	14
-----A-----	1
-----G-----	5
-----G-----	4
-----T-----	194
-----C-----	6
No mutation	21

図2 RFP耐性と相関する変異が検出される *rpoB* 遺伝子中の81塩基からなる領域の配列とそこに見られる変異およびその件数

14 から 23 塩基までの間で1塩基ずつ長さの異なるものを合成し、実際の感受性型および耐性型プローブとハイブリダイゼーションを行い検討した。その結果として、感受性型と耐性型を判別するための最適なオリゴヌクレオチドを選定してこれを用いた。最終的に用いるオリゴヌクレオチドは感受性型：CGACTGTTCGGCGCTG, 耐性型CGACTGTGGCGCTG および CGACTGTTGGCGCTGとした。他のオリゴヌクレオチドも同様に合成し、吟味したのち用いた。プローブ合成のためのPCRはより迅速化を計る目的で、*z*Taq DNAポリメラーゼを用いた（宝酒造）。反応はプレヒート98℃1分、98℃5秒、55℃5秒、72℃20秒を50サイクルおよびポストリアクション72℃1分を行っている。反応液の組成は検体より抽出したDNA1μl、10倍濃縮反応緩衝液（酵素に添付）2μl、5mMデオキシヌクレオチド混合液（酵素に添付）2μl、50μMのプライマーペア（R1およびR2、図3）2μl、*z*Taq DNAポリメラーゼ0.2μlに滅菌蒸留水を加えて全量20μlとしている。臨床分離菌より得られたDNAを用

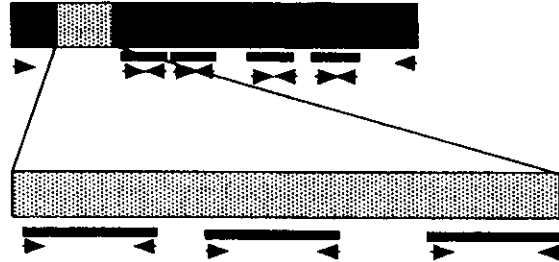
いる場合は、以上の反応で良好な結果が得られるが、喀痰等を出発材料とする場合は図3に示したプライマーペア（NR1およびNR2）にて1段階目のPCRを行い、その2μlをプライマーペア（R1およびR2）を用いたPCR反応に供することが望ましい。RFP以外の薬剤耐性に関係する変異の検出用プローブ作製の戦略も図3に示した。

このようにして合成したプローブを混合してハイブリダイゼーション用のプローブとして用いる。ハイブリダイゼーションは様々な溶液を用いて検討した結果、BM社製のArrayIt UniHyb Solutionが最適であることが判明したのでこれを用いている。42℃で1時間ハイブリダイゼーションを行った後、2×SSC溶液で洗浄し、次いで3モルのテトラメチルアンモニウムクロライド溶液で洗浄後、さらにTBST緩衝液（20mMトリス塩基、0.14M食塩、0.05%ツイーン20）にて洗浄後、TBSTにて希釈したABC-ペルオキシダーゼ（ベクタステイン社）と反応させた。TMBメンブレン溶液（キルケガード&ペリー・ラボラトリー

RFP
rpoB gene 3534 bp
 RNA polymerase beta subunit



INH
katG gene 2205 bp
 catalase-peroxidase



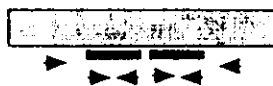
inhA locus
 orf1 744bp
 3-ketoacyl-acyl carrier
 protein
 inhA 810 bp
 enoyl-[acyl-carrier-protein]
 reductase



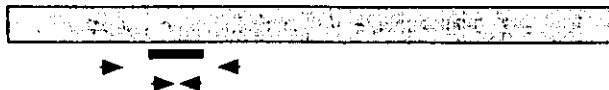
SM
rpsL gene
 372 bp



rrs gene
 1464 bp



EB
embB gene
 3296 bp



KM
rrs gene
 1464 bp

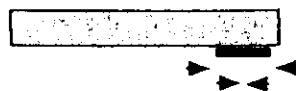


図3 プローブ合成のための PCR ストラテジー

矢印はプライマーの位置を示す。プライマーの上の棒線は増幅されるプローブを示す。それぞれのプライマーペアの右側のもの（アンチセンス）は5'末端がビオチン標識してある。

社)にて発色を行うことによりシグナルが得られる。得られたシグナルはコンピューターに接続したスキャナー（OA用、機種、透過型・反射型は問わない、300dpi程度で十分）にて取り込みを行う。以上の方法で得られた RFP 耐性の検出結果を図4に示す。

この方法で90%以上の RFP 耐性結核菌の検出

が可能であった。また SM, KM および INH ではそれぞれ約62%, 67% および 64% の耐性菌の検出が可能であった。EB に関しては現在詳細に検討しているが、67% の耐性菌の検出が可能となると予想される。

筆者らの研究の他に、ハイブリダイゼーション法を応用した薬剤耐性結核菌の迅速鑑別に関する方

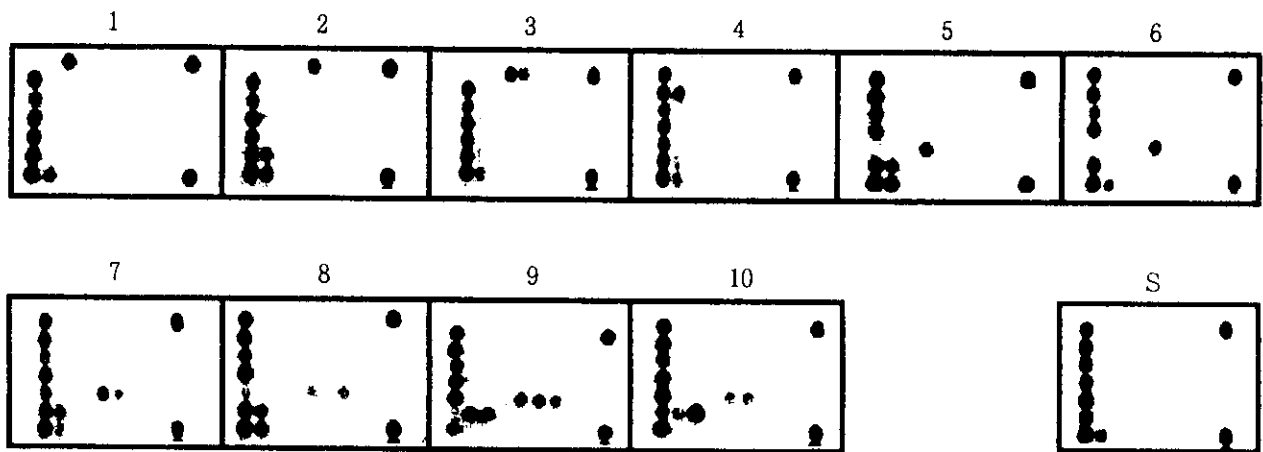


図4 DNAチップによるRFP耐性結核菌診断

1～10には耐性菌，Sには感受性菌より得られた結果を示す。感受性菌では最も強いシグナルが全て左端に見られるが，耐性菌ではこれらのうちの1つ以上が右側にシフトしているのがわかる。

法はいくつか報告されている。De Beenhouwer¹⁹⁾らは，RFP耐性結核菌の迅速鑑別のための簡易法としてLine Probe Assay (LiPA)を報告している。これは，前述したRFP耐性に関与する*rpoB*遺伝子の81塩基からなるコア領域をカバーする6本のオリゴヌクレオチドと耐性に関係する変異のうち，出現頻度の高いものをカバーする4本のキャプチャーオリゴヌクレオチドがメンブレン上に固定してあるものである。筆者らの方法同様に，PCR産物をこれにハイブリダイズさせることによりシグナルを得るものである。この方法では，耐性に関与する変異を検出するためのキャプチャーオリゴヌクレオチドの数が4本と少なく，ポジティブシグナルとして検出される変異は約75%で，残りの約20%は耐性，感受性どちらのキャプチャーオリゴヌクレオチドにも弱いシグナルを与えるものとして検出される。

この方法では，メンブレン上にキャプチャーオリゴヌクレオチドを結合させている点で，多数のキャプチャーオリゴヌクレオチドを結合できないという短所も同時に持っている。

高密度DNAチップ作製技術では先駆的存在であるアフィメトリックス社のGingeras²⁰⁾らは，高密度シーケンシングアレーを用いて*rpoB*遺伝子の塩基配列を決定することにより，RFP耐

性結核菌の迅速鑑別を可能とした。また，バイオメリック社のTroeshら²¹⁾も同様な報告をしている。また，オーキッドバイオコンピューター社のHeadら²²⁾は，中密度シーケンシングアレーを用いて迅速鑑別を可能とした。

これらの方法ではいずれもRFP耐性の検出についてしか報告されていない。その理由として，シーケンシングアレーを用いているために1塩基の配列を決定するために少なくとも4個のスポットが必要となる。リファンピシン耐性の鑑別だけで240スポット以上が必要となり，主要5剤の抗結核剤に対する耐性を検出するだけで莫大な数のスポットとなってしまふ。これはチップ作製のコストが高くなるばかりでなく，得られた結果の解析も複雑なものとなってしまふ。

これらに対して筆者らの技術は，より低い密度のDNAアレーを用いることにその主眼を置いている。これまでに得られている臨床分離薬剤耐性株における遺伝子変異に関する情報を総合することにより，より少ない数のキャプチャーオリゴヌクレオチドにより薬剤耐性の鑑別を可能にしている。このことは同時に得られた結果の解析の簡便化をも意味している。筆者らのチップでは，感受性型の配列をもつキャプチャーオリゴヌクレオチドを左端に配置している。ハイブリダイゼーショ

ンにより得られたシグナルが右に移動していれば即耐性と判定できる。また、現在全ての耐性菌の検出が可能であるというわけではないが、今後新たな耐性に関する遺伝子の報告があり次第簡単にスポットが追加できる点でも筆者らの方法は優れている。

6. おわりに

以上述べてきたように、結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子変異の多くが明らかとなってきた。また、これらを検出するための方法も多種多様に報告がなされてきている。なかでも、DNAチップ技術を応用した薬剤耐性鑑別法は群を抜いて優れた方法であると考えられる。

高密度、中密度 DNA アレイを用いたシーケンスチップ、低密度 DNA アレイを用いた変異検出チップ等がそれである。日常業務に使用するという目的から考えると、簡便かつ安価でしかも様々な施設での使用が可能であることが望まれる。そのためにはより低密度でかつ検出の簡便な方法が最も適していると考えられる。そういった観点から、より洗練された「結核菌耐性診断 DNA チップ」の完成をめざしてさらに改良を進めていきたい。

文 献

- 1) 結核予防会ホームページ, <http://www.jata.or.jp/rit/rj/sokuhou99.htm>
- 2) Y. Zhang *et al.*, *Nature*, **358**, 591(1992)
- 3) A. Banerjee *et al.*, *Science*, **263**, 227(1994)
- 4) A. Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13212(1996)
- 5) A. Telenti *et al.*, *Lancet*, **341**, 647-650(1993)
- 6) Y. Suzuki *et al.*, *感染症学雑誌*, **69**, 413(1995)
- 7) A. Scorpio, Y. Zhang, *Nat. Med.*, **2**, 662-667(1996)
- 8) K. Hirano *et al.*, *Tuber Lung Dis.*, **78**, 117(1997)
- 9) A. Telenti *et al.*, *Nat. Med.*, **3**, 567(1997)
- 10) S. Sreevatsan *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1677(1997)
- 11) J. Douglass, L. M. Steyn, *J. Infect Dis.*, **167**, 1505(1993)
- 12) M. Finken *et al.*, *Mol. Microbiol.*, **9**, 1239(1993)
- 13) C. Katsukawa *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, **83**, 634(1997)
- 14) H. Taniguchi *et al.*, *J. Bacteriol.*, **179**, 4795(1997)
- 15) Y. Suzuki *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1220(1998)
- 16) E. A. De Stasio *et al.*, *EMBO J.*, **8**, 1213(1989)
- 17) N. E. Caceres *et al.*, *J. Bacteriol.*, **179**, 5046(1997)
- 18) A. S. Piatek *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **16**, 359(1998)
- 19) H. De Beenhouwer *et al.*, *Tuber Lung Dis.*, **76**, 425(1995)
- 20) T. R. Gingeras *et al.*, *Genome Res.*, **8**, 435(1998)
- 21) A. Troesch *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 49(1999)
- 22) S. R. Head *et al.*, *Mol. Cell*, **13**, 81(1999)

【総説】

結核菌の薬剤耐性獲得機序の解析と
迅速診断への展開

鈴木 定彦, 田丸 亜貴,
Amin Ruhul, 勝川 千尋

Study of the Mechanism of Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* and its Application for Rapid Diagnosis.

Yasuhiko SUZUKI, Aki TAMARU, Amin Ruhul,
and Chihiro KATSUKAWA

Osaka Prefectural Institute of Public Health 1-3-69 Nakamichi,
Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

はじめに

再興感染症における重要な病原体として結核菌がクローズアップされてきている。その理由の一つは緩やかながらも減少してきていた結核の新規登録患者数が1996年の42,472人を境に1997年の42,715人、1998年の44,016人と2年連続で増加の傾向を見せたことによる(図1 A)。また、これと平行して結核による死亡者数も1997年の2,742人から1998年には2,795人と約50人増加している

(図1 B)。

もう一つの理由として薬剤耐性結核の存在も見のogaすことができない。5年ごとに公表される結核療法研究協議会による耐性結核に関する1997年のデータによると、治療歴のない患者よりの結核菌が主要4薬剤(イソニアゾール、リファンピシン、エタンブトール、ストレプトマイシン)のいずれかに耐性である割合は10.2%であるのに対して、既治療例では42.4%と、4倍

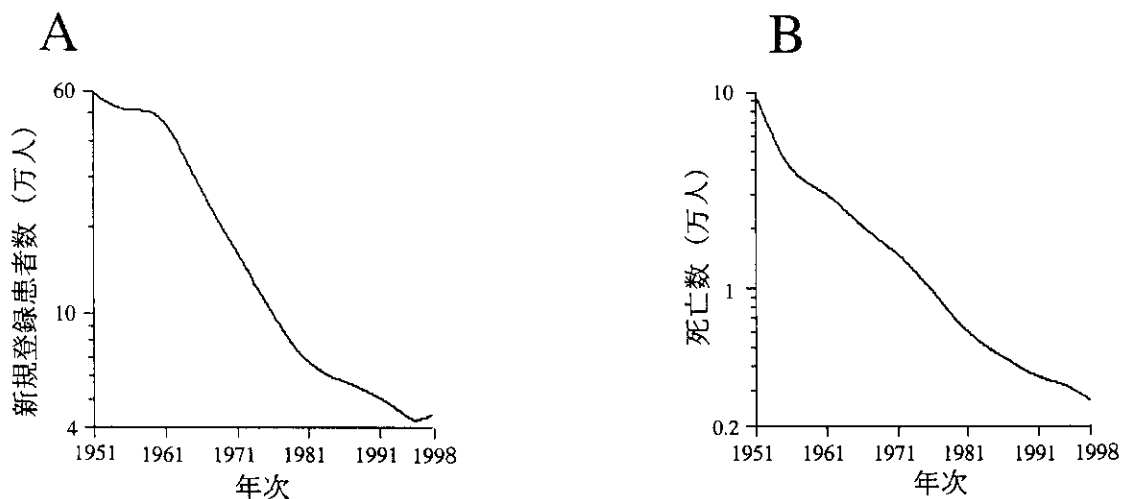


図1. 結核の (A) 新規登録患者数と (B) 死亡数の推移

以上にも跳ね上がっている。さらに、未治療例では耐性結核菌の約75%が単剤耐性であるのに対して、既治療例では約36%に減少している。また、結核に対して特に有効な薬剤であるリファンピシン、イソニコチン酸ヒドラジドの両剤あるいはそれらに加えていくつかの薬剤に対して耐性を持つ結核菌を特に多剤耐性結核(MDR-TB)と呼ぶが、このMDR-TBの率も未治療例では耐性結核菌の約8%であるのに対して既治療例では約46%と著しく増加している。このことは化学療法が容易ではない結核菌の出現を意味している。1977年から1997年までの20年間における5年ごとの結核療法研究協議会による耐性結核に関するデータをグラフの形で図2に示す。未治療例(図2A)、既治療例(図2B)どちらにおいても1977年から1992年までの15年間はさほどの増加は見られていなかったが1997年のデータは全く別のものであった。つまり未治療例、既治療例どちらにおいても著しい増加傾向を示していた。既治療例においてリファンピシン、イソニコチン酸ヒドラジド、エタンブトールおよびストレプトマイシンに15%以上の菌株が耐性を示していた。特にイソニコチン酸ヒドラジドに耐性を有する結核菌の頻度は高く33%であった。未治療例では既治療例に比して全体的に耐性頻度は低いものの最も高頻度のストレプトマイシンでは7.5%であった。

一方、副作用の重篤さ等の理由でこれまで用いられてきていなかったピラジナミドが1996年4月からは抗結

核剤のパネルに復帰し、治療薬の厚味を増した感はある。しかし、すでに我が国でも、ピラジナミドに対して耐性を持つ結核菌が出現してきていることを考えると、要注意であると言わざるをえない。

薬剤耐性結核菌の蔓延を未然に防ぐためには、的確な治療を行うことにより、新たな耐性菌の出現を未然に食い止めることが最重要課題であると考えられる。これを可能にするためには結核菌の薬剤感受性を的確に把握し、治療に当たることが重要である。このような観点から迅速な薬剤耐性検査は重要であると言える。

本稿では抗結核剤の作用メカニズム、結核菌の薬剤耐性獲得機序およびそれに関連する遺伝子変異について解説するとともに最近クローズアップされてきている遺伝子診断法とその従来法に対するアドバンテージについて、著者らの得ている結果も盛り込みつつ紹介したい。

抗結核剤の作用機序

抗結核剤の作用機序に関する報告は数多くなされている。以下にそれらを解説する。

1) イソニコチン酸ヒドラジド

イソニコチン酸ヒドラジドの作用機序に関する最初の知見はすでに1954年に Middlebrook¹⁾により示されていた。彼は高濃度イソニコチン酸ヒドラジド耐性結核菌ではカタラーゼ活性が欠如しているか著しく低いことを報告した。この報告に引き続いてイソニコチン酸ヒドラ

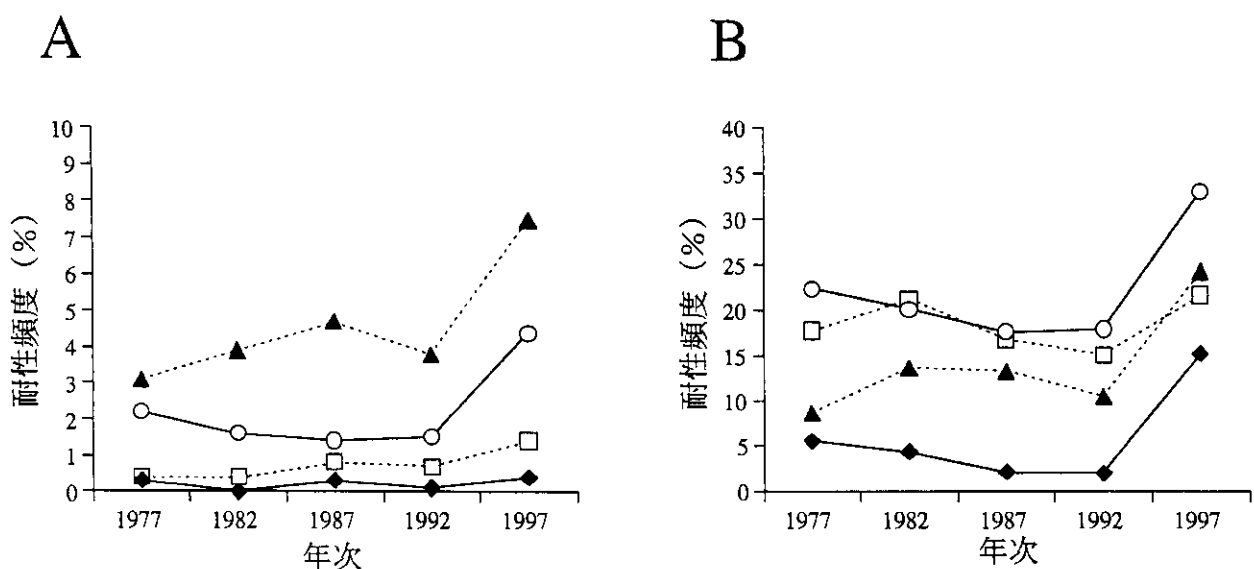


図2. 薬剤耐性結核の割合の推移

A: 未治療例, B: 既治療例。○: イソニコチン酸ヒドラジド耐性, □: リファンピシン耐性, ▲: ストレプトマイシン耐性, ◆: エタンブトール耐性

ジドはカタラーゼにより活性化されミコール酸の生合成をブロックすることが報告された²⁾。

2) リファンピシン

リファンピシンは細菌の DNA 依存 RNA ポリメラーゼに結合して RNA 合成開始の過程を特異的に阻害することが大腸菌を用いた系で明かとなった。RNA ポリメラーゼはコア酵素 (2つの α , β , β' の4分子からなる) とこれに結合したもう一つの蛋白質である σ サブユニットからなっている。ホロ酵素 (コア酵素に σ サブユニットが結合したもの) は染色体 DNA 上の RNA 転写指令配列であるプロモーターを認識して RNA の合成を行っている。リファンピシンは β サブユニットに結合して RNA ポリメラーゼの活性を阻害することが報告されている³⁾。この現象は抗酸菌においても確認された⁴⁾。

3) ピラジナミド

ピラジナミドに関してはいまだにその作用点が解明されていない。しかしこれまでの研究からピラジナミド耐性結核菌の大多数がピラジナミドをピラジン酸へと変換する酵素であるピラジナミダーゼの活性が消失あるいは

著しく低下していることが判明している⁵⁾。ピラジン酸が何に作用しているかを解明することが現在の重要課題となっている。

4) エタンブトール

この薬剤を低濃度で結核菌と同属の菌に作用させて培養した場合に菌体の表面に存在するアラビノガラクトランの分子量が著しく低下する現象が見られた⁶⁾。この結果からエタンブトールがアラビノガラクトランの生合成を阻害し、ひいてはそれを原因として細胞壁の最も重要な構成分子であるミコリル-アラビノガラクトラン-ペプチドグリカンの会合が破壊されて細胞壁自体の透過性が亢進すると考えられる。結核菌の細胞壁近傍の構造の模式図を図3に示す。

5) ストレプトマイシン

ストレプトマイシンの結核菌に対する詳細な機序は明らかとはなっていないが大腸菌等を用いて検討が行われた結果、ストレプトマイシンは細菌のリボゾームに働くことが明らかにされた。同様なことは結核菌においても我々の研究から明かとなった⁷⁾。大腸菌においてはさらに詳細な検討が進み、ストレプトマイシンが30S リボゾー

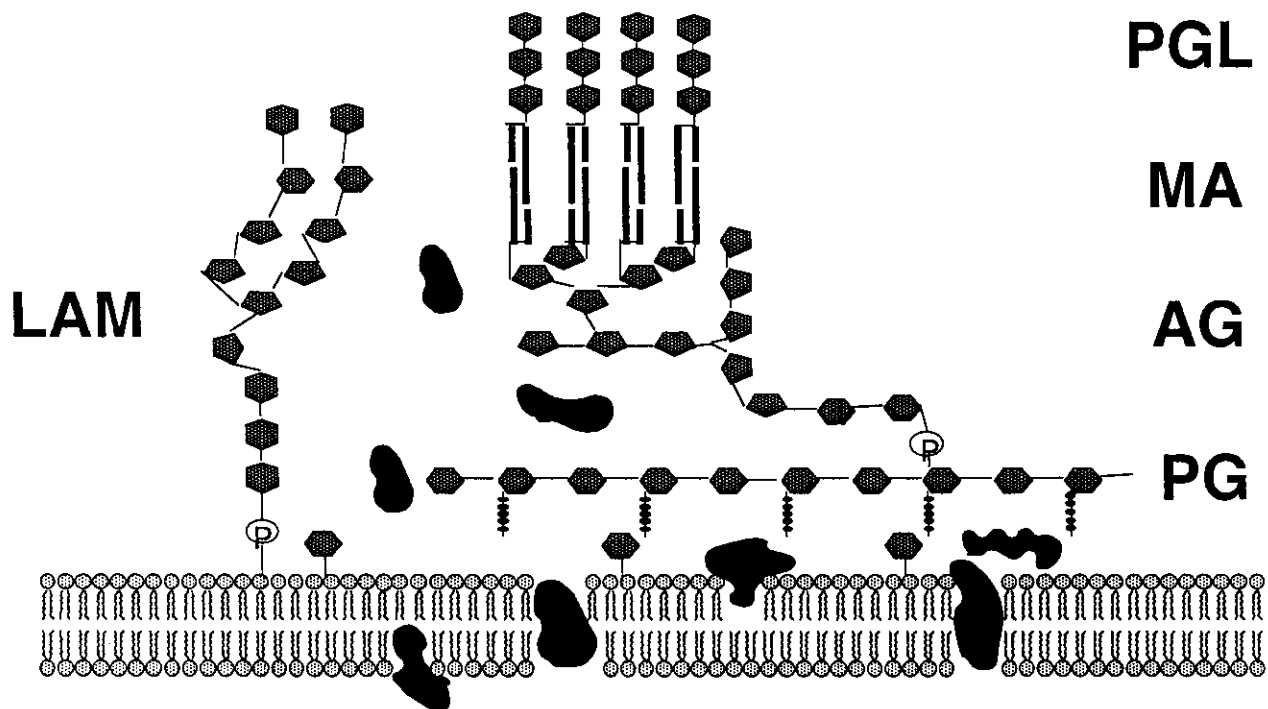


図3. 結核菌の表面構造

結核菌の表面には脂質2重層の上にペプチドグリカン (PG) が存在し、それと結合する形でアラビノガラクトラン (AG), ミコール酸 (MA), の順で存在している。ミコール酸のさらに外側にはペプチドグリコリピッド (PGL) が非共有結合で存在している。これらとは独立にリポアラビノマンナン (LAM) は細胞膜に GPI アンカーの形で存在している。

ムサブユニット上の50S リボゾームサブユニットとの接点付近に不可逆的に結合し、蛋白合成の開始阻害および読み誤りを引き起こすことが証明された。正確なストレプトマイシンの結合部位は30S リボゾームサブユニットの上に存在する S12蛋白質⁹⁾および30S リボゾームサブユニットの骨格と言うべき16S リボゾーム RNA 上の530ループおよび915番目の塩基近辺であるとされている⁹⁾。また、ストレプトマイシンのリボゾームへの結合親和性は S12蛋白質により影響をうけることも報告されている。

6) カナマイシン

この抗生物質はストレプトマイシンとは異なる場所に結合しリボゾームへの伸長因子 G の結合を阻害する。その結果としてメッセンジャー RNA-ペプチジルトランスファー RAN 複合体のペプチジル部位への転座を阻害することが知られている¹⁰⁾。大腸菌をモデルとした研究からカナマイシンは16S リボゾーム RNA 上の1408番目と1494番目の塩基に結合することが明らかとなっている¹¹⁾。

7) その他

D-サイクロセリンは D-アラニンのアナログであり、アラニンラセマーゼと D-アラニン-D-アラニン合成酵素の活性を阻害することで細胞壁の主成分の一つであるペプチドグリカンの合成を阻害することが報告されている¹²⁾。

キノロン系薬剤が抗結核剤として注目されてきている。これは多剤耐性結核菌出現により従来の抗結核剤以外の抗生物質使用が必要となってきたためである。標的である細菌の染色体は2重鎖 DNA であり、その複製には2重螺旋の分離が必要である。2重螺旋が分離された場合、それぞれの1本鎖 DNA にはねじれ(正の超螺旋)が生じる。DNA ジャイレースはこのねじれをほどきさらに負の超螺旋構造を形成させることにより DNA 複製をスタートさせる。キノロン系薬剤は DNA ジャイレースを阻害し、DNA 複製を阻害する薬剤として知られている¹³⁾。この機序は現在用いられている他の抗結核剤とは性格を異にするものである。そのため耐性結核菌への効果が期待されている。

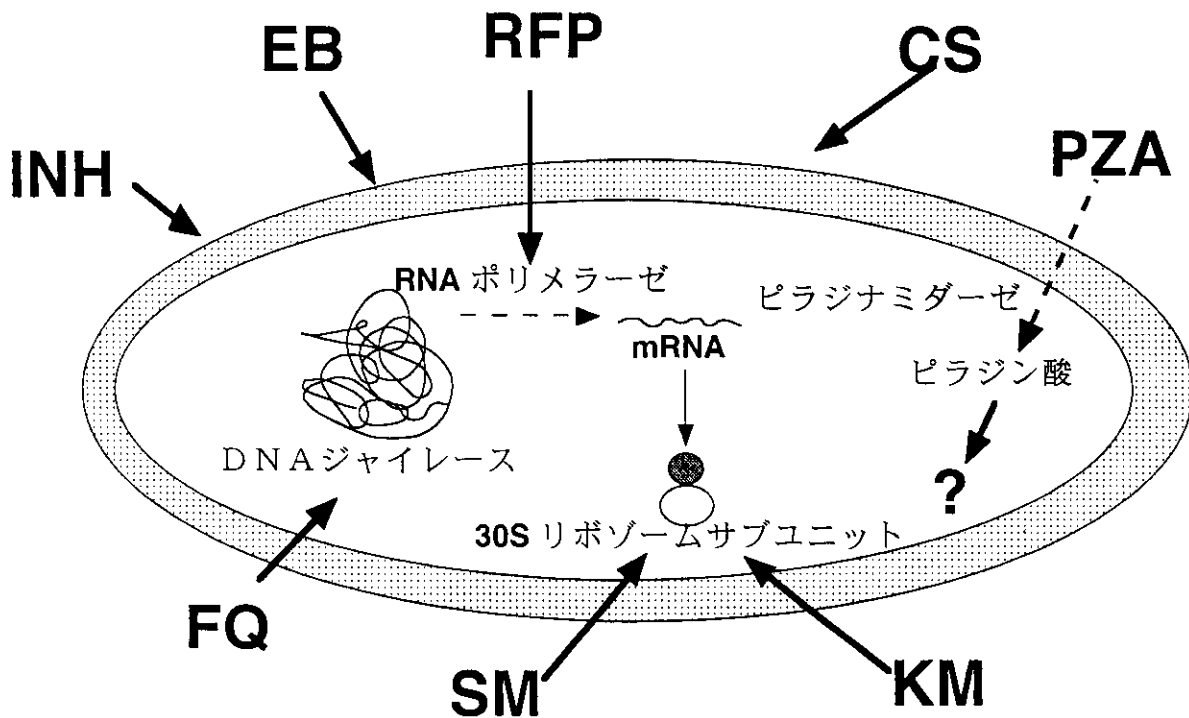


図4. 抗結核剤の作用部位

イソニコチン酸ヒドラジド (INH), エタンブトール (EB) およびサイクロセリン (CS) は細胞壁成分の合成を阻害する。リファンピシン (RFP) は RNA 合成, ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM) は蛋白合成, キノロン (FQ) は DNA 複製をそれぞれ阻害する。ピラジナミド (PZA) は結核菌の持つピラジナミダーゼによりピラジン酸へと代謝されて効果を発揮することは判明しているが、ピラジン酸の作用点は知られていない。

以上に抗結核剤の作用機序について解説してきたが、それらを図4にまとめた。

耐性獲得の遺伝的要因

一般に細菌が薬剤耐性を獲得する場合その形質はプラスミド、トランスポゾンあるいは染色体に存在する遺伝子により決定されている。これらのうちプラスミドやトランスポゾンによって決定される耐性にはグラム陰性、グラム陽性菌を通じて様々なものが報告されている。特にグラム陰性菌におけるβラクタマーゼの様な抗生物質を分解して不活化する酵素をコードする遺伝子を運ぶもの、最初に大腸菌で発見されたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼの様な抗生物質を修飾して不活化する酵素をコードする遺伝子を運ぶものなどがよく研究されている。染色体遺伝子が運ぶ薬剤耐性形質はおもに突然変異によって決定される。変異の種類は様々で、塩基置換、挿入、欠失がおこることによりそのコードする遺伝子に変化がおこり結果として抗生物質の標的の性質が変化して耐性となるものである。この例としてはリファンピシン耐性菌におけるRNAポリメラーゼβサブユニット遺伝子上の変異があげられる。大腸菌を用いた研究でリファンピシンは耐性菌由来の酵素には結合しないことが報告されている。遺伝子発現をコントロールしているプロモーター領域における塩基置換、挿入、欠失等の変異で酵素の産生が亢進し、結果として耐性形質が付与される現象も見い出されている。例えばD-サイクロセリン耐性の連鎖球菌で通常の8倍以上のD-アラニンレセマーゼが合成されていたという報告がある。この他にも大きな欠失によりある遺伝子領域が丸ごと消失して結果として耐性形質を獲得した例も見い出されている。

結核菌の薬剤耐性は染色体上の遺伝子変異によって決定されていることが多くの研究で明かとなっている。つ

表1. 各抗結核剤に対する耐性菌の存在頻度

薬剤	耐性頻度
RFP	1/10 ⁸
INH, SM, EB, KM, PAS	1/10 ⁶
TH, CPM, EVM, SC	1/10 ³

RFP: リファンピシン, INH: イソニコチン酸ヒドラジド, SM: ストレプトマイシン, EB: エタンプトール, KM: カナマイシン, PAS: パラアミノサリチル酸, TH: エチオナミド, CPM: カプレオマイシン, EVM: エンビオマイシン, SC: サイクロセリン。

まり、結核菌は自然に起こる突然変異によって、様々な薬剤に対する耐性を獲得するのである。その頻度は薬剤により異なることが報告されている¹⁴⁾(表1)。いわゆる『変異と選択 (Mutation and Selection)』、つまり低い頻度で自然に起こった耐性変異を持った菌が化学療法により生き残り、他は全て死滅するために結果として全ての菌が耐性菌となるものである。

多剤耐性結核の成立機序

一般的に結核空洞中には約10⁶の結核菌が存在する。これに対してイソニコチン酸ヒドラジドを単剤投与したとすると、100個の菌が耐性菌として生き残ることになる。単剤の投与でも大部分の結核菌は死滅させることができるため、患者は一旦回復に向かう。しかし生き残ったイソニコチン酸ヒドラジド耐性菌はその間にも増殖を続けており再び発症した時にはほとんど全ての結核菌がイソニコチン酸ヒドラジド耐性となってしまう(図5A)。このようにして再発症した耐性結核にリファンピシンを用いれば、同様な機序によりリファンピシンに対する耐性を獲得しこれら2剤に対して耐性を獲得したことになる(図5B)。この繰り返しにより多剤耐性結核菌が出現上がる。この場合初回治療の段階から2剤以上の薬剤を併用した場合には、結核菌の場合それぞれの薬剤に対する耐性はお互いに無関係に起こるという事実から考えると、理論的には10⁻⁶×10⁻⁸=10⁻¹⁴で、通常は耐性菌の出現をほとんど考える必要のないことになる(図5C)。さらに多剤併用療法を行うことにより治療効果はより確実なものとなる。

しかし、これは抗結核剤全てに感受性である場合の理論であって、2剤併用療法で、使用薬剤のどちらかに対して耐性を獲得している結核菌により発病している患者の場合には図5Bの場合と同様にほぼ確実にもう一方の薬剤に対する耐性を獲得するものと考えてよい。この場合化学療法に入る前に薬剤感受性に関する情報が得られていれば、耐性の薬剤は除外した他の複数の薬剤を選択することが出来、治療の失敗はなく、新たな耐性菌の出現も考えなくて良い(図5D)。従って、迅速に薬剤感受性を鑑別することは、結核の治療の面で最も重要な課題の一つと考えられている。

結核菌の薬剤耐性とそれに関与する遺伝子

結核菌の薬剤耐性のメカニズムについては早くから研

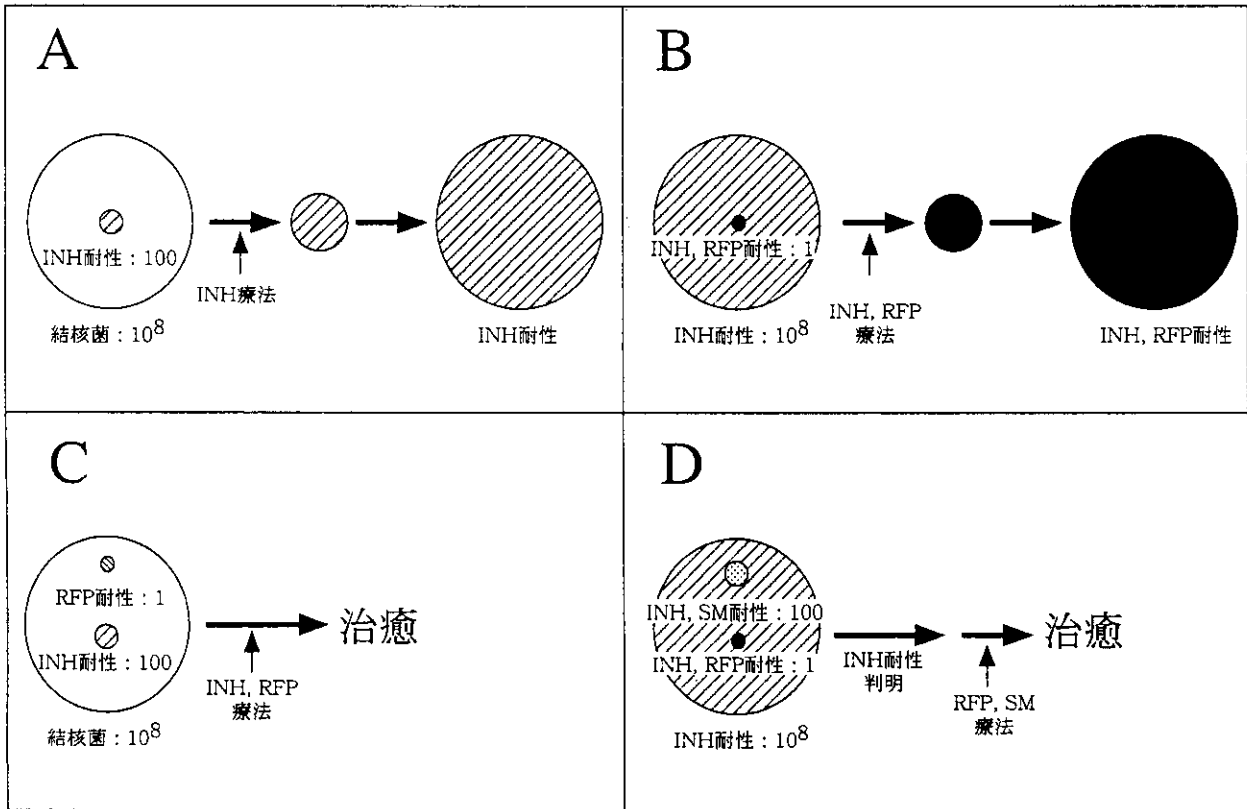


図5. 結核菌の耐性獲得と治癒

A: イソニコチン酸ヒドラジド (INH) 単剤による感受性結核の治療。B: INH 耐性結核に対するリファンピシン (RFP), INH の2剤による治療。C: 感受性結核に対する RFP, INH の2剤による治療。D: INH 耐性と判別後の RFP, ストレプトマイシン (SM) 2剤による治療。C, D では治療効果が期待できる。

究が行われてきている。様々な生化学的手法、遺伝子工学的手法等を用いて研究がすすめられてきており、その一つの結論として、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。以下の項ではそれぞれの薬剤に対する耐性を決定する変異について解説する。

1) イソニコチン酸ヒドラジド耐性

イソニコチン酸ヒドラジド耐性結核菌の一部にカタラーゼ活性の欠損があることについては以前から報告されてきたが、その原因が catalase-peroxydase 遺伝子の欠損であることは1992年 Zhang ら¹⁵⁾によりはじめて報告された。しかしこれだけでは全イソニコチン酸ヒドラジド耐性の1/5程度しか説明できなかったためさらに引き続き精力的に研究がすすめられた。その結果、katG 遺伝子上の塩基置換、挿入または欠失によって起こることが判明した^{16, 17)}。これらに加えてさらにイ

ソニコチン酸ヒドラジド耐性に関与するものとして inhA¹⁸⁾, aphC/oxyR¹⁹⁾ 遺伝子が次々と同定された。これら全てを合わせると、イソニコチン酸ヒドラジド耐性菌の約80%と相関している。今後残りの20%の耐性菌と相関している遺伝子の同定が望まれる。

2) リファンピシン耐性

Telenti ら²⁰⁾は結核菌の RNA ポリメラーゼベータサブユニットをコードする遺伝子 (rpoB) 上の点突然変異とリファンピシン耐性の間に強い相関性があることを見出した。われわれ²¹⁾、谷口ら²²⁾は日本で分離された結核菌においても同様な現象が見い出されることを報告した。その後も rpoB 上の点突然変異とリファンピシン耐性の間の相関性に関して多数の報告がなされ、約95%のリファンピシン耐性結核菌において rpoB 上に点突然変異が存在することが明かとなった^{23, 24, 25)}。また、rpoB 遺伝子上の変異の位置および種類によってリファンピシンの誘導体に対する感受性が異なることも報告された^{26, 27)}。rpoB 遺伝子上でこれまでに見い出

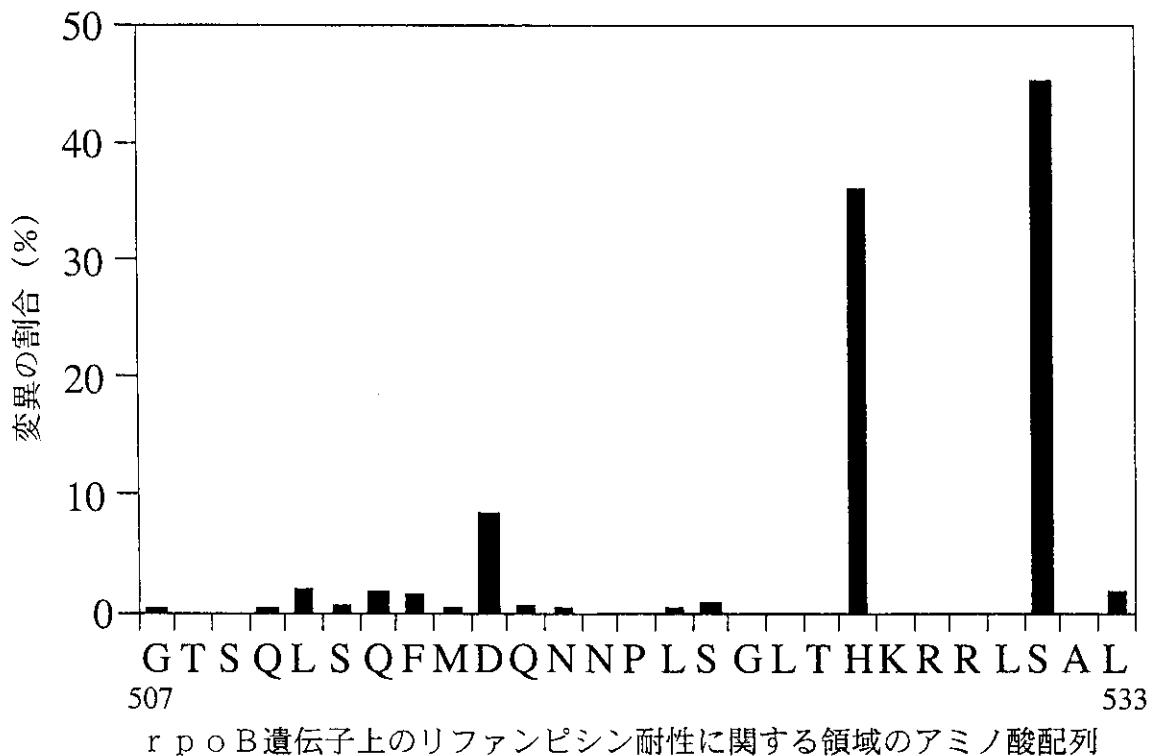


図6. リファンピシン耐性結核菌の *rpoB* 遺伝子上の変異位置とその割合。
横軸：リファンピシン耐性に関する領域のアミノ酸配列，縦軸：変異の割合。

されたリファンピシン耐性に関する点突然変異の位置とその頻度を図6に示す。

3) ピラジナミド耐性

Scorpio ら²⁸⁾は結核菌のピラジナミダーゼをコードする遺伝子 (*pncA*) をクローニングし、さらにその上の点突然変異とピラジナミド耐性の間に強い相関性があることを見出した。また、野性型ピラジナミダーゼをピラジナミド耐性菌に形質導入し、ピラジナミダーゼ活性を付与することによりその菌をピラジナミド感受性に変換できることを見出した。平野ら²⁹⁾、Scorpio ら³⁰⁾は多くの臨床分離結核菌において *pncA* 上の点突然変異とピラジナミド耐性の間の相関性に関して研究をすすめ、93%以上のピラジナミド耐性結核菌において *pncA* 上に点突然変異が存在することを報告した。我々も我が国の臨床分離菌を用いた検討で同様な結果を得ている (未発表データ)。

4) エタンブトール耐性

抗酸菌のエタンブトール耐性に関する遺伝子は Belanger ら³¹⁾によって非定型抗酸菌 *Mycobacterium avium* において最初に報告され *emb* オペロンと命名された。彼等の報告によるとこの遺伝子がコードしている

蛋白質はアラビノシルトランスフェラーゼ活性を有し、抗酸菌の細胞壁の特徴的な構成要素のうちアラビノガラクトタンとリポアラビノマンナンの生合成に関与している可能性が示された。その後 Telenti ら³²⁾、Sreevatsan ら³³⁾により、結核菌のエタンブトール耐性における *emb* オペロン上の変異の重要性に関する報告がなされた。つまりエタンブトール耐性結核菌の約70%において *embB* 上に感受性株に見られない点突然変異が見られた。その後も同様な結果が他のグループから報告された³⁴⁾。我々も臨床分離菌において同様な結果を得ている (未発表データ)。

5) ストレプトマイシン耐性

大腸菌を用いた研究によりストレプトマイシンが結合するリボゾーム上の位置がすでに明かとなっていた。これを基にした結核菌におけるストレプトマイシン耐性の遺伝子変異に関する最初の報告は Douglass と Steyn³⁵⁾によってなされた。彼らの報告によれば、16S リボゾーム RNA 遺伝子 (*rrs*) の点突然変異とストレプトマイシン耐性に相関性があるという。大腸菌において530ループと915領域の点突然変異がストレプトマイシンとリボゾームの親和性を低下させることが報告されていること

から考えて、結核菌においてもこの塩基置換がストレプトマイシン耐性において重要な働きをしていることは間違いないであろう。Finkenら³⁶⁾は *rrs* 遺伝子および 16S リボソーム蛋白質をコードする遺伝子 (*rpsL*) における点突然変異の分析を行ったところ、約76%のストレプトマイシン耐性菌において *rrs* あるいは *rpsL* 遺伝子上に点突然変異が見い出されることを報告した。われわれは³⁷⁾日本で分離された結核菌においても同様な現象が見い出されることを報告した。その後も *rrs* あるいは *rpsL* 上の点突然変異とストレプトマイシン耐性の間の相関性に関して多数の報告がなされ、約80%のストレプトマイシン耐性結核菌においてこれらの遺伝子上に点突然変異が存在することが明かとなった。

6) カナマイシン耐性

カナマイシン耐性の分子基盤に関する研究も大腸菌を用いて早くから行われてきており、16S リボソーム RNA 遺伝子の1400塩基付近に存在するステム領域の点変異と耐性の関係が報告されていた¹¹⁾。抗酸菌においては谷口ら³⁸⁾が *Mycobacterium smegmatis* を用いた接合実験により *in vitro* で作成したカナマイシンおよびバイオマイシン耐性菌における耐性の原因が *rrs* 上の1387, 1389および1473番目の塩基置換によるものであることを証明した。われわれ³⁹⁾は臨床分離結核菌のカナマイシン耐性菌株の同様の領域（それぞれ1400, 1401, 1483）において点突然変異が見られることを見出し報告した（表2）。これに少し遅れて Alangadenら⁴⁰⁾は、カナマイシンおよびアミカシン耐性結核菌において同様な変異が見られることを報告している。この領域はアミノグリコシド系抗生物質が結合し、ミスリーディングをひき起こす位置と報告されている。

7) その他の薬剤に対する耐性に関与する遺伝子

細胞壁の合成阻害剤 D-サイクロセリンは D-アラニンラセマーゼを阻害することが知られている。抗酸菌における D-サイクロセリンに対する耐性の原因としてもやはり D-アラニンラセマーゼの関与が Caceresらにより示された⁴¹⁾。彼らは D-サイクロセリン耐性

の *Mycobacterium smegmatis* において D-アラニンラセマーゼが過剰発現していることを報告している。

キノロン系薬剤は DNA ジャイレースの阻害剤として知られている。Cambauら⁴²⁾は DNA ジャイレースをコードする遺伝子のうち *gyrA* 上の点突然変異と耐性に強い相関性があることを報告している。その後も同様な結果が報告されている^{43, 44)}。我々は我が国の臨床分離株における *gyrA*, *gyrB* 上の点変異の検索を行い同様なことを見出した（未発表データ）。

結核菌の薬剤感受性試験

以上までに結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子変異について解説してきた。これらの結果を応用することにより迅速な耐性検査が可能となると考えられる。ここでは現在行われている培養をベースとした薬剤耐性試験に触れた後、今後期待できる遺伝子診断を可能にする手法について解説する。

培養をベースとした従来の試験

通常の培養法は直接法と間接法の2種類に別けられる。直接法とは、をアルカリで処理後、中和して直接感受性培地に接種する方法である。間接法は分離培養後発育した集落から菌液を作り、接種する方法である。直接法ではその性質上結果が安定しないこともあり、間接法に重きを置く傾向がある。しかし、結核菌の増殖は他の細菌に比べて著しく遅く、間接法による薬剤感受性試験では結果が判明するまでに6から8週間を要する。このような欠点を補うために培養法をベースとして様々な新しい方法が開発された。BACTEC システムでは生菌より放出される¹⁴CO₂を測定することで抗酸菌を迅速に検出する方法であるため結果が得られるまでの日数が半減できる。しかし、培地中に放射性二酸化炭素を含むため、我が国での日常業務での使用にはそぐわない。これに対して、非放射性抗酸菌迅速検出システムが MGIT である。このシステムでは酸素非存在下でのみ蛍光を発する蛍光物質をセンサーとしている。抗酸菌が増殖して、溶存酸素を消費した場合に、UV 照射下に蛍光が観測できる。本法により結果が得られるまでの日数を約1週間早めることができる。以上の他にも培養をベースとした検査法として、セプティチェック AFB, MB/BacT Microbial Detection System, MB REDOX 等がある。これらの培養をベースとした感受性検査法で判定までの日数が短

表2. カナマイシン耐性菌における16S リボソーム RNA 遺伝子上の変異の割合。

カナマイシン感受性/耐性	試験菌株数	変異検出された菌株数	割合(%)
感受性	68	0	0
耐性	39	26	66.7

縮されたとはいえ、感受性判定までに3週間程度は要する。この間は感受性が判らないまま治療を進めなければならない。このことは耐性菌を増やしてしまうというリスクをとまなうものである。それゆえ迅速な薬剤感受性試験の開発が望まれているが、これら方法では結核菌の生育速度から考えて、これ以上の迅速化は望むことができない。そこでこれまでに得られている薬剤耐性に関与する遺伝子に関する情報を応用した遺伝子工学的手法をベースとした薬剤感受性試験の開発が必要となってくる。以降はこのことについて詳述する。

結核菌の薬剤耐性遺伝子に関する情報の迅速診断法への展開

以上のように主要抗結核剤に関してはその薬剤耐性に関与する遺伝子が多数同定されている。特にリファンピシンとピラジナミドにおいては90%以上の耐性菌において耐性と遺伝子変異が相関していることが明らかとなっている。つまりこれらの変異をなんらかの方法で検出することにより迅速な薬剤感受性試験が可能となる。そこで次に点変異の迅速検出法のうち実際に結核菌に応用されたものを紹介する。

1) PCR 産物の直接塩基配列決定法

塩基置換と薬剤耐性の関係が明らかとなっているのであるから最も直接的な方法は塩基配列の決定である。つまり検体から PCR 法により目的の遺伝子を増幅させ、これを鋳型としてその塩基配列を決定する方法である。結果は非常に明解であるが、複数の薬剤に関して同時に行うことを考えると非常に大きな労力と費用が必要となる。この点で、日常業務での使用にはそぐわない。

2) 1本鎖 DNA 二次構造多型 (PCR-SSCP) 法とヘテロデュプレックス法

これらの方法は PCR 産物を一旦熱変性させた後徐々に変性をとぎ、PCR-SSCP法⁴⁵⁾では塩基配列に特有な2次構造をとらせ、ヘテロデュプレックス法では対照となる DNA 断片とアニールさせた後ゲル電気泳動上での移動度の差を見るものである(図7)。一般に1塩基の差も鑑別できるということにはなっているが、変性-アニールおよび電気泳動条件に微妙なものがある。また、一つの遺伝子について1反応を行う必要があり多検体を同時に行うためにはやはり非常に大きな労力が必要となる。

3) PCR-RFLP

この方法は PCR により得られた DNA 断片を一定の制限酵素で消化した後ゲル電気泳動で分析しその移動度の変化をにより点変異を検出するものである。カナマイシン耐性結核菌で *rrs* 遺伝子の1400, 1401, 1483番目に変異があるものはこの方法で検出できる³⁹⁾(図8)。また、ストレプトマイシン耐性菌の *rpsL* 上の変異の一

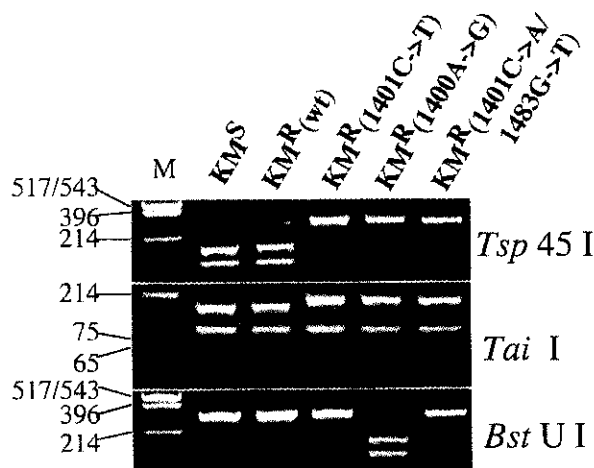


図8. PCR-RFLP 法によるカナマイシン耐性結核菌の判別。

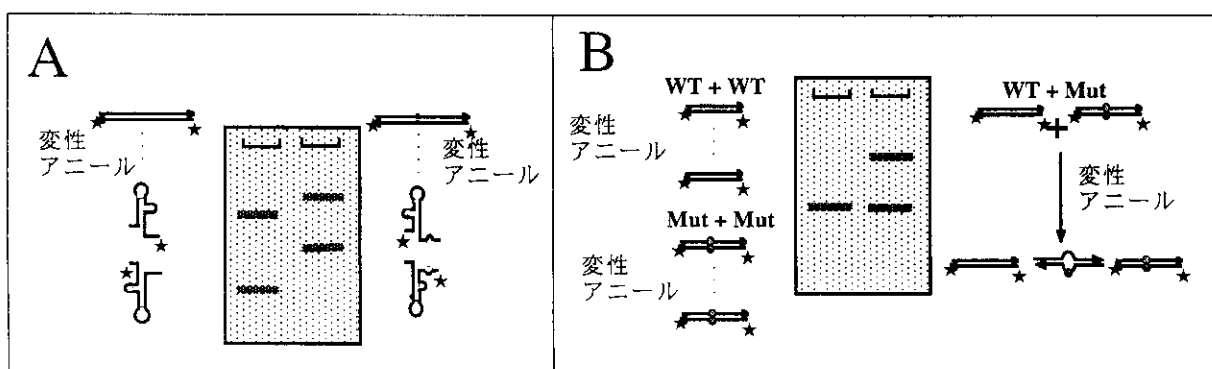


図7. SSCP 法 (A) とヘテロデュプレックス法 (B) の原理。

部もこの方法で検出が可能である。

4) 分子ビーコン

Piatek ら⁴⁷⁾によりリファンピシン耐性結核菌の画期的な迅速検出法が報告された。彼らは分子ビーコンと呼ばれる5'末端および3'末端にそれぞれ蛍光物質とクエンチャーが結合しているステムループ構造を有するオリゴヌクレオチドを用いて実験を行った。分子ビーコンが標的となるPCR産物とアニールすると、蛍光物質とクエンチャーが離れるため、蛍光を発するようになる。彼らはリファンピシン耐性菌において変異が検出される81塩基コア領域をカバーする5本の分子ビーコンを作成しこれらを用いて良好な結果を得ている。本法の利点はPCR反応の後キャップを開けることなしに結果が判定できる点にある。しかし実際結核菌の薬剤耐性検査に応用するとなると100本近くの分子ビーコンが必要となる。その点で改良の余地を残す方法と言える。

5) DNAチップ

我々の研究グループは以上述べてきた方法の短所を補

う事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。前述したように薬剤耐性に関与する遺伝子上の変異が解明されてきている。これらの変異を1塩基変異を検出できるハイブリダイゼーションにより検出する事を目指して研究を進めた。われわれが開発したDNAチップは各薬剤ごとに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キャプチャーオリゴヌクレオチドを配置している。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った。得られたシグナルはOA用スキャナーにて取込みを行う。われわれが開発したDNAチップの概要とRFP耐性の検出結果を図9に示す⁴⁸⁾。この方法で90%以上の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った。この研究の他にハイブリダイゼーション法を応用した薬剤耐性結核菌の迅速鑑別に関する方法はいくつか報告されている。De Beenhouwer⁴⁹⁾らはRFP耐性結核菌の迅速鑑別のため

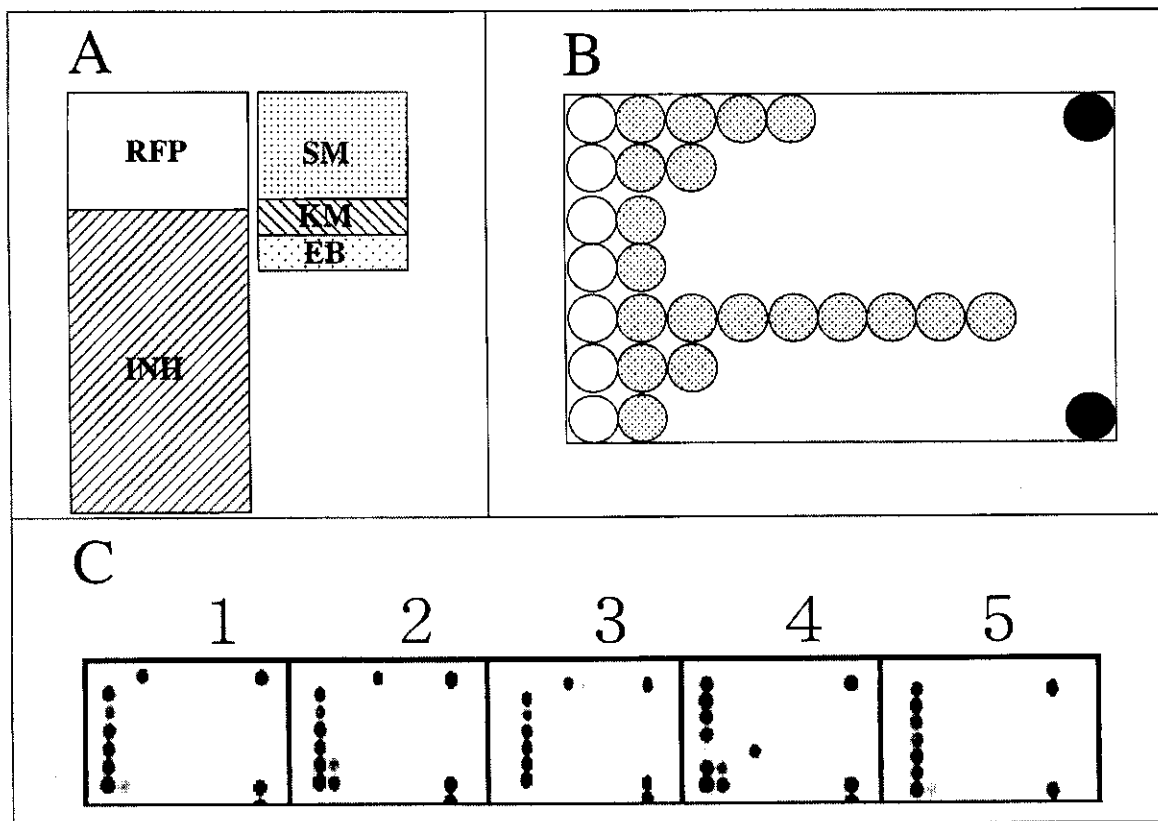


図9. DNAチップによる耐性結核菌の判別。

A: DNAチップ上の耐性判別ブロックの配列。これが1cm四方の領域に2セット配置したものを実際には用いている。B: リファンピシン耐性判別ブロックにおけるキャプチャーオリゴヌクレオチドの配列。○; 感受性オリゴ, ○; 耐性オリゴ, ●; コントロールオリゴ。C: 1~4; 耐性菌, 5; 感受性菌より得られた結果。