

の簡易法として Line Probe Assay (LiPA) を報告している。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%だけで、残りの約20%は耐性、感受性両方のキャプチャーオリゴヌクレオチドに弱いシグナルを与えるものとして検出される。DNA チップ用いたものとしては Gingeras ら⁵⁰⁾、Troesh ら⁵¹⁾が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に関する報告をした。また、Head ら⁵²⁾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。シーケンシングアレーを用いているために莫大な数のスポットになってしまうのがその理由と考えられる。これはコストの面だけでなく結果の解析も複雑なものになってしまう。我々の技術は低い密度の DNA アレーを用いる事にその主眼を置き、薬剤耐性の鑑別を可能にしている。この事はコストの低減化と結果の解析の簡便化を意味している。

終わりに

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上の変異の多くが解明されてきている。また、これらの迅速検出の方法も数多くに報告されてきている。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。しかし、これで十分と言えるわけではない。今後、基礎的な面だけでなく多くの耐性に関与する遺伝子変異の解明が待たれるとともに、応用面ではより迅速で簡便な耐性検査を目指しての検出法の改良、開発が期待される。

文 献

- Middlebrook, G. (1957) Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc* 69 : 471-472.
- Shoeb, H. A., Bowman, B. U. Jr, Ottolenghi, A. C., Merola, A. J. (1985) Enzymatic and nonenzymatic superoxide-generating reactions of isoniazid. *Antimicrob Agents Chemother*. 27 : 408-12.
- McClure, W. R., Cech, C. L. (1987) On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem*. 253 : 8949-56.
- Winder, F. G. (1982) Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the mycobacteria, p.353-438. In C. Ratledge and J. Stanford (ed.), *The biology of the mycobacteria*, vol. 1. Academic Press, London.
- Butler, W. R., Kilburn, J. O. (1983) Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyradinamide and its relation to pyradinamidase activity. *Antimicrob. Agents Chemother*. 36 : 180-184.
- Takayama, K., Kilburn, J. O. (1989) Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 33 : 1493-9.
- Yamada, T., Nagata, A., Ono, Y., Suzuki, Y., Yamanouchi, T. (1985) Alteration of ribosomes and RNA polymerase in drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 27 : 921-4.
- Gale, E. F., Cundliffe, E., Reynolds, P. E., Richmond, M. H., and Waring, M. J. (1981) *The molecular basis of antibiotic action*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Moazed, D., and Cohn M. L. (1987) Interaction of antibiotics with functional sites in ribosomal RNA. *Nature* 327 : 389-394.
- Lando, D., Cousin, M. A., Privat de Garilhe, M. (1973) Misreading, a fundamental aspect of the mechanism of action of several aminoglycosides. *Biochemistry*. 12 : 4528-33.
- De Stasio, E. A., Moazed, D., Noller, H. F., Dahlberg, A. E. (1989) Mutations in 16S ribosomal RNA disrupt antibiotic-RNA interactions. *EMBO J* 8 : 1213.
- Lambert, M. P., and Neuhaus, F. C. (1972) Mechanism of D-cycloserine action: alanine racemase from *E. coli* W. *J. Bacteriol*, 110 : 978-987.
- Hooper, D. C., and Wolfson, J. S. (ed.) (1993) *Quinolone antimicrobial agents*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- David, H. L. (1970) Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol*. 20 : 810-4.
- Zhang, Y., Young, D. B. (1993) Molecular mechanisms of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol* 1 : 109-13.
- Altamirano, M., Marostenmaki, J., Wong, A., FitzGerald, M., Black, W. A., Smith, J. A. (1994) Mutations in the catalase-peroxidase gene from

- isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis.* **169** : 1162–5.
- 17) Wengenack, N. L., Todorovic, S., Yu, L., Rusnak, F. (1998) Evidence for differential binding of isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis* KatG and the isoniazid-resistant mutant KatG (S315T). *Biochemistry.* **37** : 15825–34.
 - 18) Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., Jacobs, W. R. Jr. (1994) inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263** : 227.
 - 19) Zhang, Y., Dhandayuthapani, S., Deretic, V. (1996) Molecular basis for the exquisite sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 13212.
 - 20) Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M. J., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T. (1993) Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341** : 647–650.
 - 21) Suzuki, Y., Katsukawa, C., Inoue, K., Yin, Y., Tasaka, H., Ueba, N., Makino, M. (1995) Mutations in rpoB gene of rifampicin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Kansenshogaku Zasshi* **69** : 413.
 - 22) Taniguchi, H., Aramaki, H., Nikaido, Y., Mizuguchi, Y., Nakamura, M., Koga, T., Yoshida, S. (1996) Rifampicin resistance and mutation of the rpoB gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* **144** : 103–8.
 - 23) Yuen, L. K., Leslie, D., Coloe, P. J. (1999) Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *J Clin Microbiol.* **37** : 3844–50.
 - 24) Sintchenko, V., Chew, W. K., Jelfs, P. J., Gilbert, G. L. (1999) Mutations in rpoB gene and rifabutin susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *Pathology.* **31** : 257–60.
 - 25) Pozzi, G., Meloni, M., Iona, E., Orru, G., Thoresen, O. F., Ricci, M. L., Oggioni, M. R., Fattorini, L., Orefici, G. (1999) Protein, Nucleotide rpoB mutations in multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. *J Clin Microbiol.* **37** : 1197–9.
 - 26) Williams, D. L., Spring, L., Collins, L., Miller, L. P., Heifets, L. B., Gangadharam, P. R., Gillis, T. P. (1998) Contribution of rpoB mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **42** : 1853–7.
 - 27) Yang, B., Koga, H., Ohno, H., Ogawa, K., Fukuda, M., Hirakata, Y., Maesaki, S., Tomono, K., Tashiro, T., Kohno, S. (1998) Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and rpoB mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* **42** : 621–8.
 - 28) Scorpio, A., Zhang, Y. (1996) Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase / nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* **2** : 662–667.
 - 29) Hirano, K., Takahashi, M., Kazumi, Y., Fukasawa, Y., Abe, C. (1997) Mutation in pncA is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* **78** : 117.
 - 30) Scorpio, A., Lindholm-Levy, P., Heifets, L., Gilman, R., Siddiqi, S., Cynamon, M., Zhang, Y. (1997) Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **41** : 540–3.
 - 31) Belanger, A. E., Besra, G. S., Ford, M. E., Mikusova, K., Belisle, J. T., Brennan, P. J., Inamine, J. M. (1996) The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 11919.
 - 32) Telenti, A., Philipp, W. J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K. E., Wiele, B., Musser, J. M., Jacobs, W. R. Jr. (1997) The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* **3** : 567.
 - 33) Sreevatsan, S., Stockbauer, K. E., Pan, X., Kreiswirth, B. N., Moghazeh, S. L., Jacobs, W. R. Jr., Telenti, A., Musser, J. M. (1997) Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : critical role of embB mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **41** : 1677.
 - 34) Ramaswamy, S. V., Amin, A. G., Goksel, S., Stager, C. E., Dou, S. J., El Sahly, H., Moghazeh, S. L., Kreiswirth, B. N., Musser, J. M. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated

- with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44** : 326–36.
- 35) Douglass, J., Steyn, L. M. (1993) A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* **167** : 1505.
- 36) Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, A., Bottger, E. C. (1993) Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* **9** : 1239.
- 37) Katsukawa, C., Tamaru, A., Miyata, Y., Abe, C., Makino, M., Suzuki, Y. (1997) Characterization of the *rpsL* and *rrs* genes of streptomycin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Appl Microbiol* **83** : 634.
- 38) Taniguchi, H., Chang, B., Abe, C., Nikaido, Y., Mizuguchi, Y., Yoshida, S. (1997) Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. *J Bacteriol* **179** : 4795.
- 39) Suzuki, Y., Katsukawa, C., Tamaru, A., Abe, C., Makino, M., Mizuguchi Y, Taniguchi H. (1998) Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* **36** : 1220.
- 40) Alangaden, G. J., Kreiswirth, B. N., Aouad, A., Khetarpal, M., Igno, F. R., Moghazeh, S. L., Manavathu, E. K., Lerner, S. A. (1998) Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **42** : 1295–7.
- 41) Caceres, N. E., Harris, N. B., Wellehan, J. F., Feng, Z., Kapur, V., Barletta, R. G. (1997) Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **179** : 5046.
- 42) Cambau, E., Sougakoff, W., Besson, M., Truffot-Pernot, C., Grosset, J., Jarlier, V. (1994) Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. *J. Infect Dis* **170** : 479.
- 43) Xu, C., Kreiswirth, B. N., Sreevatsan, S., Musser, J. M., Drlica, K. (1996) Fluoroquinolone resistance associated with specific gyrase mutations in clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* **174** : 1127–30.
- 44) Guillemin, I., Jarlier, V., Cambau, E. (1998) Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* **42** : 2084–8.
- 45) Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Schmidheini, T., Bodmer, T. (1993) Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* **37** : 2054–8.
- 46) Williams, D. L., Spring, L., Gillis, T. P., Salfinger, M., Persing, D. H. (1998) Evaluation of a polymerase chain reaction-based universal heteroduplex generator assay for direct detection of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *Clin Infect Dis.* **26** : 446–50.
- 47) Piatek, A. S., Tyagi, S., Pol, A. C., Telenti, A., Miller, L. P., Kramer, F. R., Alland, D. (1998) Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotechnol* **16** : 359.
- 48) 鈴木定彦, 市原竜生, 田丸亜貴, アミン・ルフル, 勝川千尋, 牧野正直, 阿部千代治. (2000) DNA チップによる結核菌の耐性診断. *Bio Industry* **17** (5) : 36–44.
- 49) De Beenhouwer, H., Lhiang, Z., Jannes, G., Mijs, W., Machtelinckx, L., Rossau, R., Traore, H., Portaels, F. (1995) Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tuber Lung Dis.* **76** : 425–30.
- 50) Gingeras, T.R., Ghandour, G., Wang, E., Berno, A., Small, P. M., Drobniowski, F., Alland, D., Desmond, E., Holodniy, M., Drenkow, J. (1998) Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res.* **8** : 435–48.
- 51) Troesch, A., Nguyen, H., Miyada, C. G., Desvarenne, S., Gingeras, T. R., Kaplan, P. M., Cros, P., Mabilat, C. (1999) *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol.* **37** : 49–55.
- 52) Head, S. R., Parikh, K., Rogers, Y. H., Bishai, W., Goelet, P., Boyce-Jacino, M. T. (1999) Solid-phase sequence scanning for drug resistance detection in tuberculosis. *Mol Cell Probes.* **13** : 81–7.

結核菌の薬剤耐性と関与遺伝子

大阪府立公衆衛生研究所病理課
同 微生物課

鈴木 定彦・鈴木 文
田丸 亜貴・勝川 千尋

Key words 薬剤耐性, 遺伝子, 変異, 診断

はじめに

結核が重要な再興感染症の1つとして注目されてきている理由は、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年を境に2年連続で増加したことにある。これと平行して結核による死亡者数も1997年から1998年で53人増加している。さらに薬剤耐性結核の存在も見のがすことができない。結核療法研究協議会による耐性結核に関するデータによると、1997年の治療歴のない患者からの結核菌が主要4薬剤[イソニアジド(INH), リファンピシン(RFP), エタンブトール(EB), ストレプトマイシン(SM)]のいずれかに耐性である割合が約1割であるのに対して、既治療例では4割を越えていた。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、既治療例ではその割合が約36%に減少していた。また、RFP, INHの両剤あるいはこれらに加えていくつかの薬剤に対して耐性をもつ多剤耐性結核(MDR-TB)の全耐性菌における割合も、未治療例

では約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た。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。また、図1に1977年から20年間の耐性結核に関するデータをグラフの形で示したが、未治療例、既治療例どちらにおいても1992年までの15年間に比べて1997年のデータでは増加傾向を示していた。また、1996年4月から初回標準治療方式の薬剤に採用されたピラジナミド(PZA)に対してもすでに耐性菌が出現してきている。

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迅速かつ正確に把握し、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必須であると考えられる。成長速度の著しく遅い結核菌においてこれを可能にするために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

Drug resistance of tuberculosis and its responsible genes.

Yasuhiko Suzuki(主任研究員), Aya Suzuki, Aki Tamaru, Chihiro Katsukawa(主任研究員)

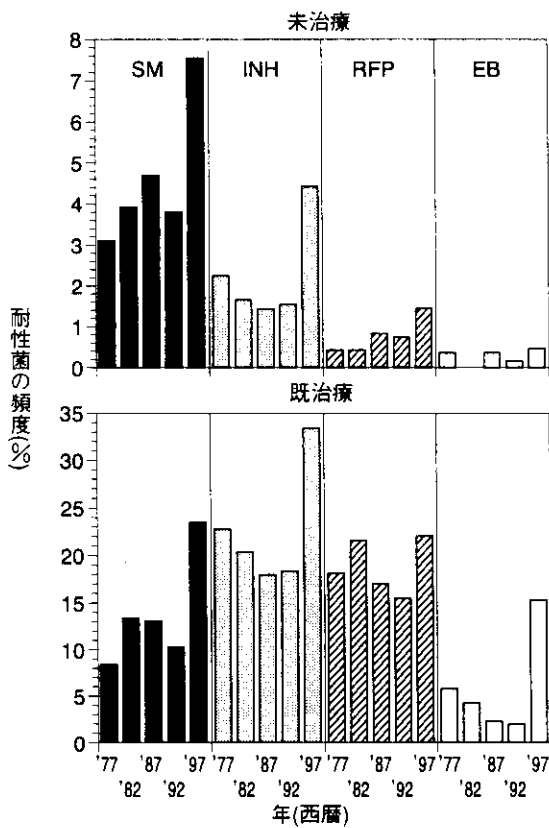


図1. 未治療例, 既治療例における薬剤耐性結核の割合の推移

て解析をすすめ、遺伝子診断へと応用することが重要と考えられる。

I. 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。プラスミドやトランスポゾンによって決定される耐性では抗生物質を分解あるいは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がよく研究されている。一方、染色体遺伝子が運ぶ薬剤耐性形質は主に突然変異によって決定される。変異の種類はさまざま、塩基置換、挿入、欠失が起こることによりそのコードする遺伝子に変化が起こり、結果として抗生物質の標的蛋白質あるいは抗生物

表1. 自然に存在する耐性結核菌の頻度

抗結核剤	耐性獲得頻度
RFP	10^{-8}
INH, SM, EB, KM, PAS	10^{-6}
TH, CPM, EVM, SC	10^{-3}

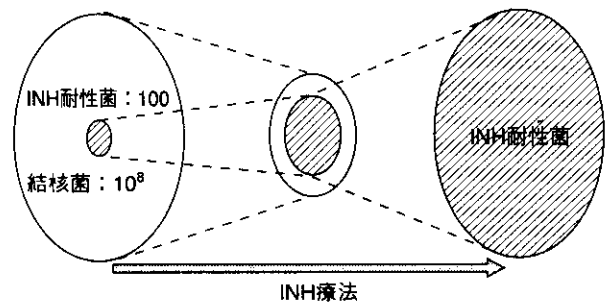


図2. INH単剤による感受性結核の治療と耐性獲得

質の活性化蛋白質の性質が変化して耐性となるものである。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明らかとなっている。つまり、結核菌は自然に起こる突然変異によって、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¹⁾(表1)。つまり低い頻度で自然に起こった耐性変異をもった菌が化学療法により生き残り、感受性菌がすべて死滅するために、結果としてすべての菌が耐性菌となるものである。

II. 多剤耐性結核の成立機序

結核空洞中には約 10^8 の結核菌が存在するとすると、これに対してINHを単剤投与した場合、 10^2 個の菌が耐性菌として生き残る。患者はいったん回復したかにみえるが生き残ったINH耐性菌により再び発症する可能性がある(図2)。このようにして再発したINH耐性結核にRFPを用いれば、同

様な機序によりRFP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。多剤耐性結核菌はこの繰り返しによりでき上がる。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、理論的には耐性菌の出現をほとんど考える必要がない。しかし、これはどちらにも感受性である場合で、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、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により的確な治療が可能となる。したがって、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1つと考えられている。

Ⅲ. 抗結核剤の作用機序と耐性に関する遺伝子

結核菌の薬剤耐性のメカニズムについては早くから研究が行われてきている。さまざまな手法を用いて研究がすすめられてきており、結論として、前述のごとく結核菌における薬剤耐性は、他の細菌でみられるような、プラスミド、トランスポゾンなど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た。以下の項ではそれぞれの薬剤の作用機序および耐性を決定する変異について解説する。

1. INH

INHの作用機序に関しては、最初に1954年にMiddlebrook²⁾が高濃度INH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。その後の研究によりINHはカタラーゼ

により活性され、ミコール酸の生合成をブロックすることが報告された。

さらなる研究により、カタラーゼ活性の消失の原因がcatalase-peroxydase遺伝子の欠損であることが、1992年、Zhangら³⁾により報告された。引き続き研究がすすめられた結果、katG遺伝子上の塩基置換、挿入または欠失によってもINH耐性となることが判明した⁴⁾。さらにINH耐性に関与する遺伝子として*inhA*、*ahpC/oxrR*が次々と同定された。これらはミコール酸の生合成に関与する遺伝子であった。これらすべてを合わせると、INH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. RFP

RFP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らかとなった。この現象は抗酸菌においても確認されている⁵⁾。

Telentiら⁶⁾は、結核菌のRNAポリメラーゼβサブユニットをコードする遺伝子(*rpoB*)上の点突然変異とRFP耐性の間に強い相関性があることを見いだした。われわれ⁷⁾は、日本で分離した結核菌においても同様な現象が見いだされることを報告した。その後も*rpoB*上の点突然変異と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*上に点突然変異が存在することが明らかとなった。また、変異の位置と種類によってRFPの誘導体に対する感受性が異なることも報告された⁸⁾。

3. PZA

PZA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PZA耐性結核菌の大多数がPZAをピラジン酸へと変換する酵素、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⁹⁾。

Scorpioら¹⁰⁾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、遺伝子上の点突然変異とPZA耐性の間に強い相関性があることを見いだした。また、野性型ピラジナミダーゼをPZA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PZA感受性に変換できることを見いだした。平野ら¹¹⁾は多くの臨床分離結核菌において*pncA*上の点突然変異とPZA耐性の間の相関性に関して研究をすすめた。他のグループも同様な報告をしている。これまで報告のあったデータとわれわれが得ているもの(未発表データ)を総合すると約93%のPZA耐性結核菌において*pncA*上に点突然変異が見いだされていることになる。

4. EB

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サンの分子量が著しく低下する現象がみられた¹²⁾。この結果から、EBがアラビノガラクトサ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サン-ペプチドグリカンの会合を破壊して細胞壁自体の透過性を亢進させると考えられる。

抗酸菌のEB耐性に関与する遺伝子は非定型抗酸菌 *Mycobacterium avium* において最初に報告され、*emb* オペロンと命名された。さらに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ている可能性が示された。その後Telentiら¹³⁾により、結核菌のEB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EB耐性結核菌の約70%において*embB* 遺伝子上に感受性株にみられない点突然変異がみられた。その後も同様な結果が他のグループから報告された¹⁴⁾。これらはわれわれが臨床分離菌において得ている結果(未発表データ)とよく一致している。

5. SM

大腸菌を用いて検討が行われた結果、SMは細菌のリボゾームに働くことが明らかにされた。結核菌においてもわれわれの研究から同様なことが明らかとなった¹⁵⁾。大腸菌においてはさらにSMが30Sリボゾームサブユニット上に不可逆的に結合し、蛋白合成開始の阻害およびミスリーディングを引き起こすことが証明された。SMは30Sリボゾームサブユニット上のS12蛋白質および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。

結核菌のSM耐性の遺伝子変異に関する最初の報告はDouglassとSteyn¹⁶⁾によってなされた。彼らの報告によれば、16Sリボゾーム遺伝子(*rrs*)の点突然変異とSM耐性に相関性があるという。Finkenら¹⁷⁾は*rrs* 遺伝子およびS12リボゾ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い、約76%のSM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だされることを報告した。われわれ¹⁸⁾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だ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。

6. カナマイシン(KM)

この抗生物質は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ェラーRNA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。

KM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リボゾームRNA遺伝子の1,400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。谷口ら¹⁹⁾は *Mycobacterium smegmatis* を用いた接合実験に

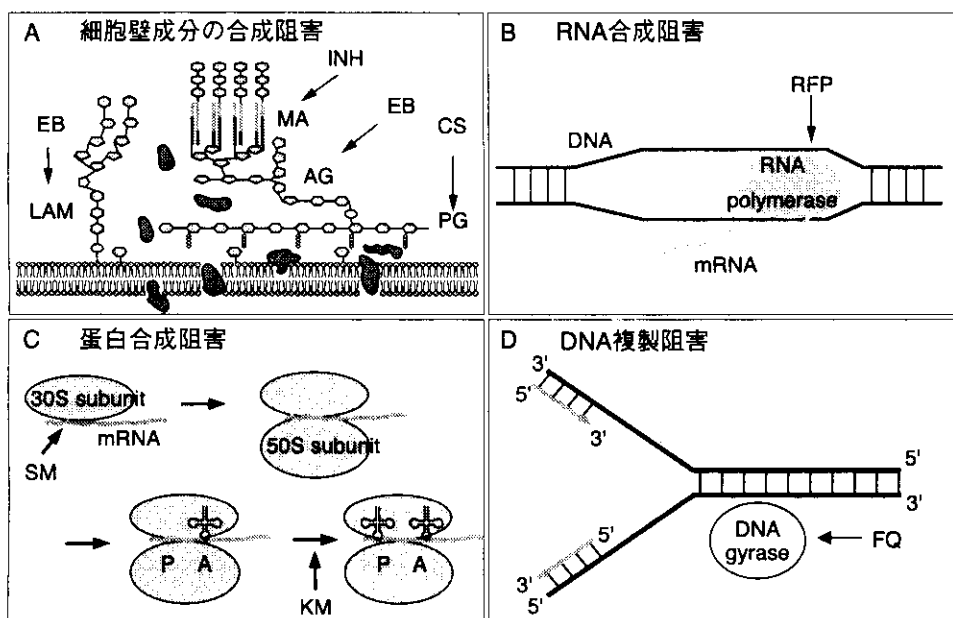


図3. 抗結核剤の作用機序

A: 細胞壁成分の合成阻害, B: RNA合成阻害, C: 蛋白合成阻害, D: DNA複製阻害

表2. 抗結核剤耐性に関与する遺伝子とそれらの関与率

薬剤	関与遺伝子	関与率
PZA	<i>pncA</i>	~93
RFP	<i>rpoB</i>	~95
INH	<i>katG, inhA, ahpC/oxyR</i>	~80
EB	<i>embB</i>	~68
SM	<i>rrs, rpsL</i>	~80
KM	<i>rrs</i>	~67
FQ	<i>gyrA</i>	~80
CS	<i>dar</i>	?*
Others	<i>tap</i>	?*

*関与率に関する報告はない。

より, *in vitro*で作成したKM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²⁰⁾は臨床分離結核菌のKM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みられることを見だし報

告した。

7. 他の薬剤

D-サイクロセリン(CS)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。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遺伝子の過剰発現が関与している可能性が示されている。

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ており, キノロン系薬剤(FQ)が抗結核剤として注目されてきている。FQ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。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耐性菌への効果が期待されている。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が

報告されている。われわれはわ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, 同様なことを見いだした(未発表データ)。

以上に抗結核剤の作用機序と耐性に関与する遺伝子について解説してきたが, 作用機序を図3, 耐性に関与する遺伝子を表2にまとめた。

おわりに

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RFPとPZA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。ここでは示さなかったが, 薬剤のくみ出し系の遺伝子上の変異の耐性への関与も検討されてきている。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。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, DNAチップ法などがある。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。しかし, 現段階でこれで十分といえるわけではない。その理由は現在までに解明されている変異と耐性の関係が薬剤耐性菌のすべてをカバーできていないからである。今後, さらに多くの耐性に関与する遺伝子変異の解明が必須である。より多くの遺伝子変異が解明されることが, より完成度の高い遺伝子診断へとつながるのである。

文 献

- 1) David HL : Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol* **20** : 810-814, 1970

- 2) Middlebrook G : Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc* **69** : 471-472, 1957
- 3) Zhang Y, Young DB : Molecular mechanisms of isoniazid : a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol* **1** : 109-113, 1993
- 4) Altamirano M, Marostenmaki J, Wong A, et al : Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* **169** : 1162-1165, 1994
- 5) Winder FG : Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the mycobacteria. *In The biology of the mycobacteria*, vol 1, ed by Ratledge C, Stanford J. London, Academic Press, 353-438. 1982
- 6) Telenti A, Imboden P, Marchesi F et al : Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341** : 647-650, 1993
- 7) Suzuki Y, Katsukawa C, Inoue K, et al : Mutations in *rpoB* gene of rifampicin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Kansenshougaku Zasshi* **69** : 413, 1995
- 8) Williams DL, Spring L, Collins L, et al : Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **42** : 1853-1857, 1998
- 9) Butler WR, Kilburn JO : Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide and its relation to pyrazinamidase activity. *Antimicrob Agents Chemother* **36** : 180-184, 1983
- 10) Scorpio A, Zhang Y : Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* **2** : 662-667, 1996
- 11) 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, 1997
- 12) Takayama K, Kilburn JO : Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **33** : 1493–1499, 1989
 - 13) Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, et al : The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* **3** : 567, 1997
 - 14) Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, et al : Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **41** : 1677, 1997
 - 15) Yamada T, Nagata A, Ono Y, et al : Alteration of ribosomes and RNA polymerase in drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **27** : 921–924, 1985
 - 16) Douglass J, Steyn LM : A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* **167** : 1505, 1993
 - 17) Finken M, Kirschner P, Meier A, et al : Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* **9** : 1239, 1993
 - 18) Katsukawa C, Tamaru A, Miyata Y, et al : Characterization of the *rpsL* and *rrs* genes of streptomycin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Appl Microbiol* **83** : 634, 1997
 - 19) Taniguchi H, Chang B, Abe C, et al : Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. *J Bacteriol* **179** : 4795, 1997
 - 20) Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, et al : Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* **36** : 1220, 1998

第15章 結核菌の耐性診断

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。本章では、結核菌の薬剤耐性に関係する遺伝子変異、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10万人を越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

* 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

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挙げるとともに、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^{-6} 、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。したがって、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らかとなった。

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 エタンブトール (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言えるものである。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作製し、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応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

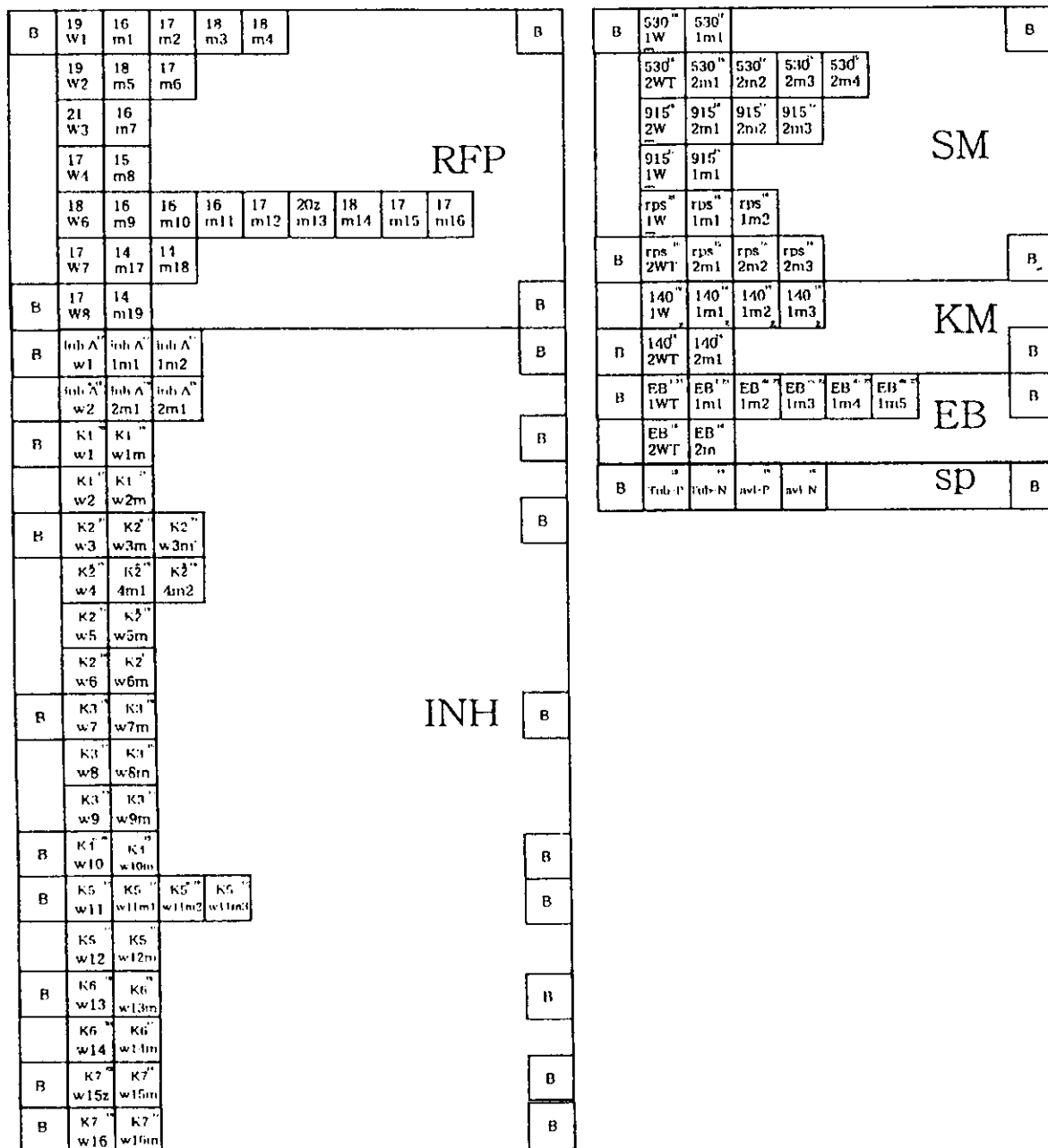


図1 筆者らが開発した薬剤耐性結核菌検出DNAチップ上のオリゴヌクレオチドの配置図

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) に分かれている。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。

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って解説を加える。

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、これらを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

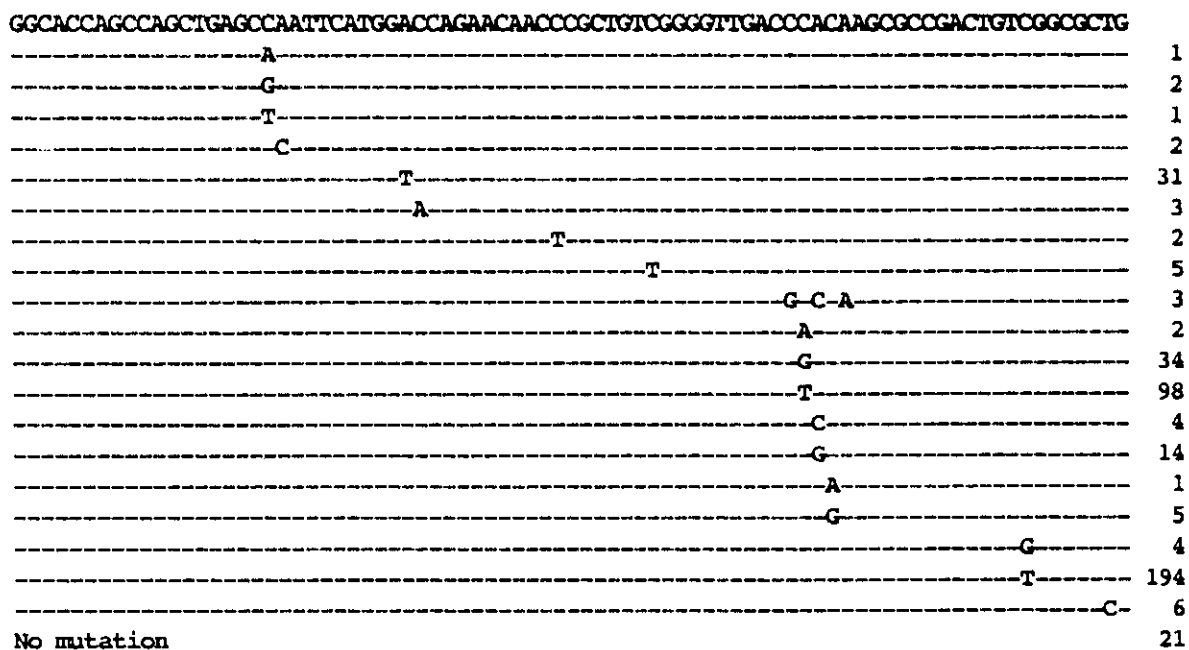


図2 RFP耐性と相関する変異が検出される*rpoB*遺伝子中の81塩基からなる領域の配列とそこに見られる変異およびその件数

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

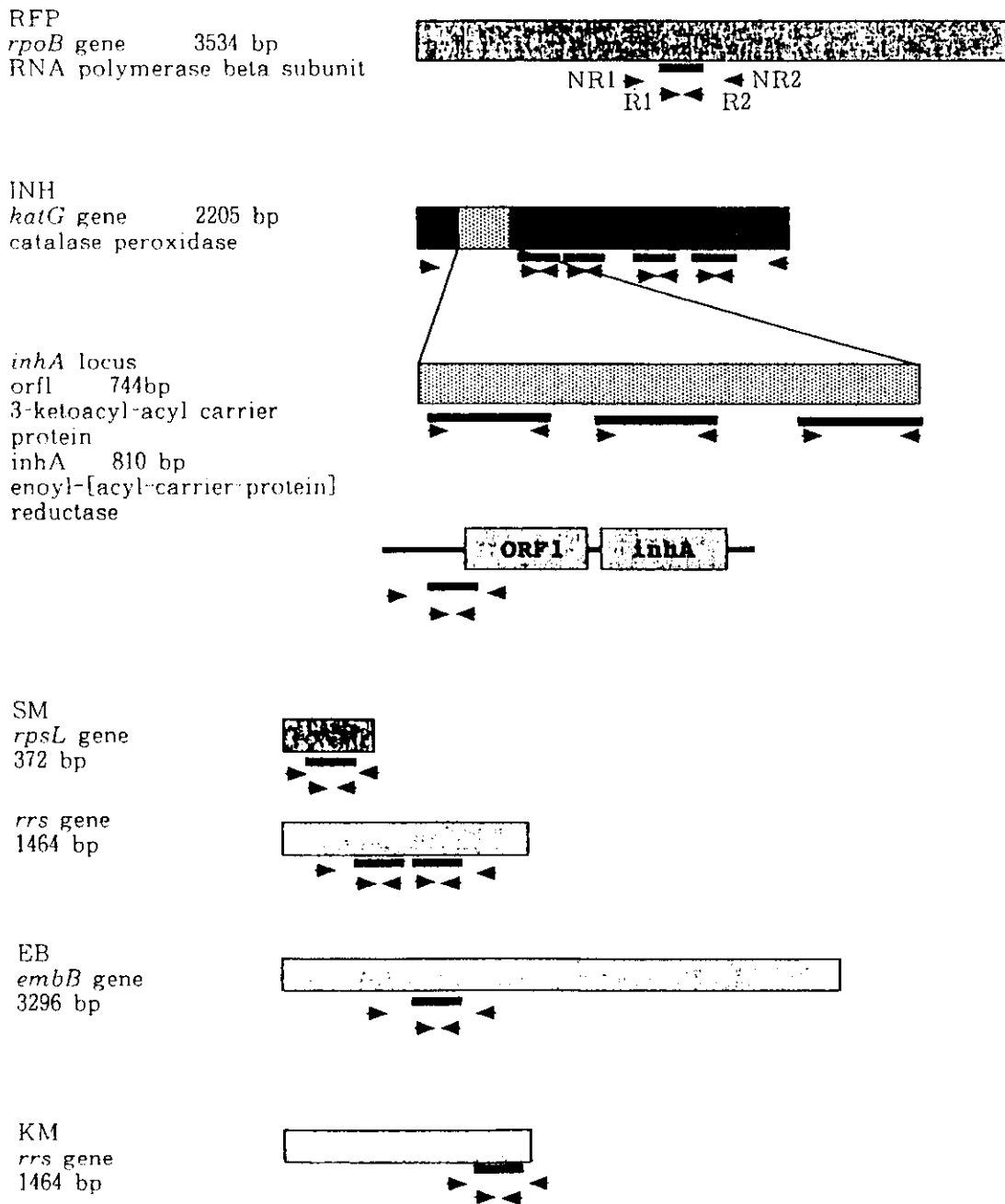


図3 プローブ合成のためのPCRストラテジー

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。

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：CGACTGTCGGCGCTG，耐性型CGACTGTGGGCGCTG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、zTaq 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℃を1分行っている。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，zTaq 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する変異の検出用プローブ作製のストラテジーも図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。

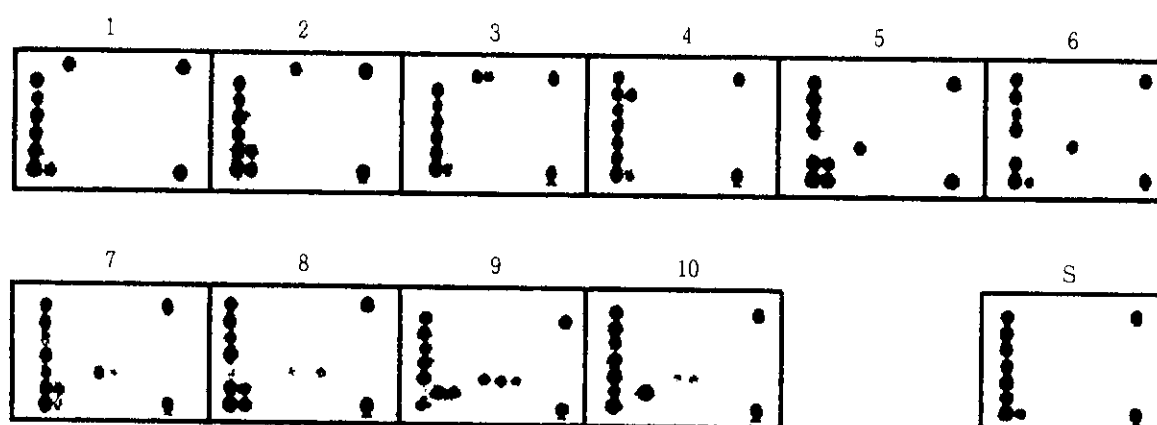


図4 DNAチップによるRFP耐性結核菌診断

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側に見られるが，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。

TMBメンブレン溶液（キルケガード&ベリー・ラボラトリー社）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と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イを用いて*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イ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イ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。これで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アレイ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