

2) 抗酸菌検査の最近の進歩

新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座細菌学分野

山本 達男・小原 竜軌

種池 郁恵・小塩 精一

Recent Progress in Diagnosis of Acid-Fast Bacilli

Tatsuo YAMAMOTO, Tatsuki OHARA,
Ikue TANEIKE and Seiichi KOJIO*Division of Bacteriology, Department of
Infectious Control and International Medicine,
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences*

Mycobacterium tuberculosis, a virulent member of acid-fast bacilli, can invade alveolar macrophages in vivo and inhibits antimicrobial functions. It triggers a signal transduction process in mammalian cells that leads to cytoskeletal rearrangement. The bacterial proteins responsible for the invasion process have been studied by a comparison of the genome sequences between *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG. The genome sequences (including insertion sequences) are important targets for molecular diagnosis. Drug resistance, e.g., nearly 80% of resistance to isoniazid (a prophylaxis agent), can now be diagnosed based on DNA techniques. Recently, a rapid, serological test has become available for *M. tuberculosis* infection.

Key words: Acid-fast bacilli, *Mycobacterium tuberculosis*, pathogenicity,
diagnosis, molecular epidemiology, drug resistance
抗酸菌, 結核菌, 病原性, 診断, 分子疫学, 薬剤耐性

はじめに

結核は開発途上国のみならず先進国でも緊急に対策を講じなければならない深刻な再興感染症の一つである。1993年にWHOは、患者数が750万人で死亡者数が

250万人にもものぼる現実(1990年)と世界の幾つかの地域で結核の制御が困難である事実を踏まえて、「結核非常事態宣言」を発表している。より新しい報告でも死亡者数は150万人で(1998年)、単一の病原体による死亡者数としては最大である。我が国でも、感染者数は依然

Reprint requests to: Tatsuo Yamamoto,
Division of Bacteriology, Department of
Infectious Control and International
Medicine, Niigata University Graduate
School of Medical and Dental Sciences,
757 Ichibancho, Asahimachidori,
Niigata, Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1番町757
新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講
座細菌学分野 山本 達男

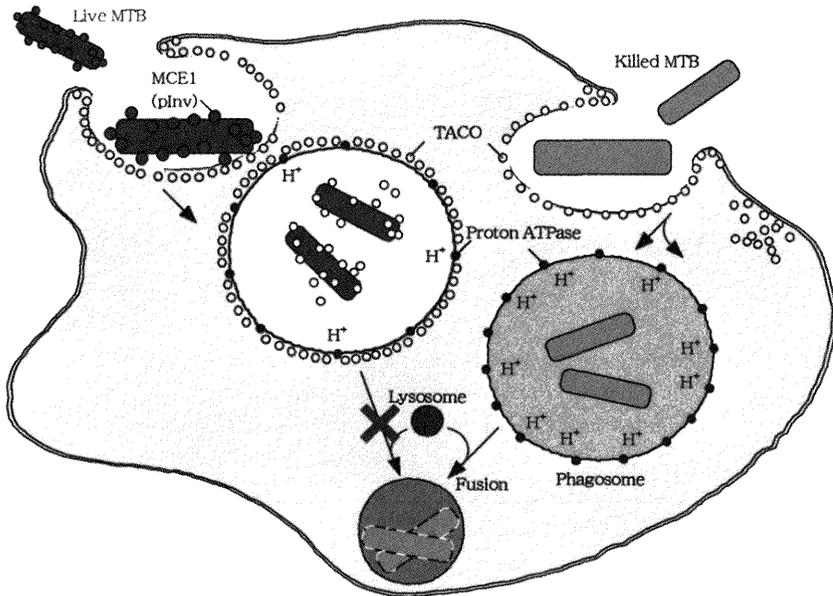


図1 結核菌の肺胞マクロファージへの侵入とそこでの生存
Live MTB, 生きた結核菌; killed MTB, 死菌

約4万2千人, 死亡者数は約2千7百人のレベルにあり(1997年), 学校や高齢者関係施設での集団感染や院内感染などが制御困難な状態で, 多剤耐性菌の増加も危惧されることから, 厚生省(当時)は平成11年7月に「結核緊急事態宣言」を発表した。新潟県下でも平成11年に深刻な集団院内感染が発生している。

ここでは, 結核菌(抗酸菌)の細菌学, とくに病原性, 迅速診断, 分子疫学, 薬剤耐性に焦点をあわせ, 最近の知見を紹介し, 今後の対策を考える。

1. 病原性

結核菌は侵入性細菌で, 感染での主要な標的は肺胞マクロファージである(図1)。マクロファージに接すると, 菌体表層蛋白によって細胞のシグナル伝達系を修飾し, 細胞骨格蛋白を再構築して感染構造を作りあげる。初期の段階では, 補体レセプター, マンノースレセプター, あるいは Tol 様レセプター (TLR) などの関与が考えられている。シグナル伝達系の修飾は, *mce* (mycobacterium cell entry) 遺伝子がコードする Mce1A 蛋白が司る。結核菌ゲノムには Mce オペロンが4コピー存在していて, Mce1A はこのうちの Mce1 コピーに存在する A 遺伝子 (*mce1A*) がコードしている。

Mce1A 配列をもった蛋白は細胞に強く侵入するようになる。

結核菌の全ゲノム配列が1998年に解読された。結核菌は, 大腸菌が7セットもつ(ヘリコバクター・ピロリでも2セットもつ)リボソーム RNA 遺伝子をたった1セットしかもっていない。蛋白合成能力の悪い細菌であることが分かった。また, 弱毒性の BCG がもつゲノムとの比較が精力的になされており(図2), (強毒性の)結核菌の病原性領域(遺伝子)の同定が進んでいる。

結核菌はマクロファージ内で, 殺菌作用に強く抵抗する(図1)。1つのメカニズムは, 侵入する部位の膜にコレステロールを集積させることで, ファゴソームの膜に TACO 蛋白 (tryptophane aspartate-containing coat protein) を集合させ, 結合状態を維持して, ファゴソームとリソソームの融合 (P-L fusion) を阻止することによる。結核菌が死ぬと, TACO 蛋白は消失し, P-L fusion が起こってしまう。

また, ファゴソームの膜に約70nmの孔をあけ, α 抗原などの細菌蛋白を細胞質内に注入する。このような蛋白が P-L fusion を阻止している可能性も考えられている。さらに, 結核菌はプロトンポンプを含む小胞体

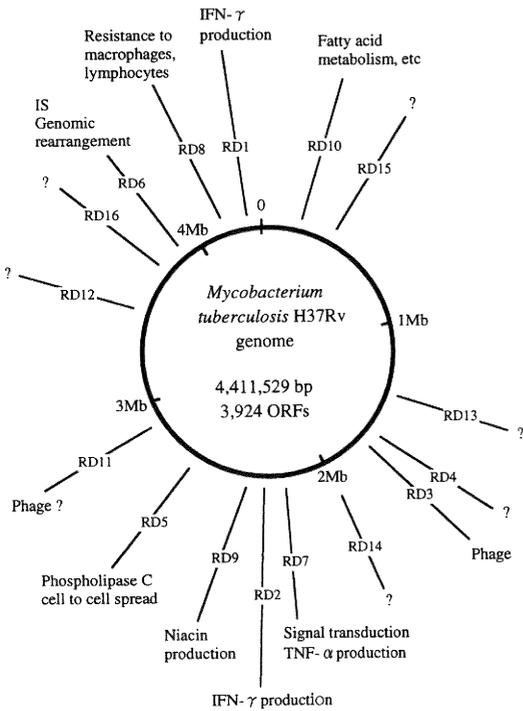


図2 結核菌のゲノムと弱毒性ワクチン株 BCG (Pasteur 亜株) での欠落領域

RD (genomic regions of difference) は BCG で欠落している領域。例えば、RD1 には、T cell を活性化し、T cell から IFN- γ を産生させる EAST-6 (early secreted antigenic target 6-kDa protein) や CFP-10 (culture filtrate protein 10; 別名 MTSA-10, *M. tuberculosis*-specific antigen 10) をコードする遺伝子が含まれる。また、RD7 には、結核菌の細胞侵入と侵入過程でのシグナル伝達に関する Mce1 オペロンのコピー (Mce3 オペロン) が存在する。

との融合を阻止することで、ファゴソーム内の pH の低下を防いでいる。結核菌は、感染によって誘導される活性酸素 (O_2^-) や NO にも抵抗する。

マクロファージは、補体レセプターを介して侵入する細菌を認識すると、NADPH を活性化させ、活性酸素を放出する。また、細菌を貪食すると 1 型サブセットの CD4⁺ T 細胞 (Th1) に抗原提示して Th1 を活性化させる。活性化 Th1 は IFN- γ などのサイトカインを産生してマクロファージを活性化、活性化マクロファ

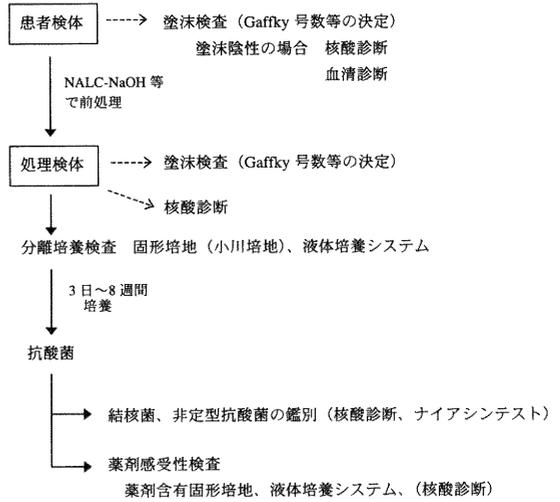


図3 新しい検査法を含めた診断の流れ

ジはサイトカイン IL-12 を産生して Th1 に働きかける。この一連の活性化サイクルの中で、活性化マクロファージは炎症性サイトカイン TNF- α を産生するが、その他に NO 合成酵素を誘導することで殺菌物質 NO を産生する。強毒菌である結核菌は、感染過程でこのようなシグナル伝達を巧みに逃避・抑制している。たとえば、菌体表層に AraLAM (アラビノスを付加したりポアラビノマンナン) をもった弱毒性抗酸菌の場合には、CD14/TLR から取り込まれると、マクロファージを活性化してしまう。これに対して、ManLAM (マンノスを付加したりポアラビノマンナン) を菌体表層にもった結核菌の場合には、CD14/TLR には結合せず (別の TLR からとりこまれて)、マクロファージを活性化しない。

2. 細菌学的診断

細菌学的な結核診断では、結核菌の検出と同定、結核菌の薬剤感受性検査、そして宿主側の検査を迅速に行う (図3)。流行が疑われる場合にはさらに分子疫学解析 (後述) を行う。

1) 結核菌の検出と同定

喀痰を塗沫し、抗酸染色してガフキー号数を決定する。30分で判定が可能。

検査システムがより整っている施設では、例えば、喀痰を 2~3 倍量の NALC-NaOH で前処理し (20分)、リン酸緩衝液を加えて中和、遠心 (3000xg, 20分) 後、

沈渣に1 ml のリン酸緩衝液を加えて再懸濁し、この懸濁液を使って以下の3項目の検査を行う。

- ①上記と同様の手順でガフキー号数を決定する。
- ②少量(0.5 ml)を全自動抗酸菌培養システム(MGIT, Mycobacteria Growth Indicator Tube)に摂取し、抗酸菌の増殖を検出する。MGITの場合、1台で最大960本の検体の増殖監視が可能で、各チューブの底の蛍光発色を1時間毎に自動記録する。チューブ内で菌が増殖し、液体培地中の酸素を消費すると、チューブの底の試薬がオレンジ色(365 nm)の蛍光を発する仕組みになっている。未治療で、ガフキー号数が7~10の場合には、摂取後3~4日(1週間以内)で発育が記録され、ガフキー号数が3前後では2週間程度での発育が目安となる。非定型抗酸菌、例えば分離頻度の高いMAC(*M. avium* complex; *M. avium* と *M. intracellulare* を含む)の場合には7~10日が増殖の目安で、結核菌の場合より数日は早く検出される。

全自動抗酸菌培養システムには他に、BACTEC 460 System(抗酸菌の標識パルミチン酸代謝により生じる $^{14}\text{CO}_2$ を検出する)、MB/BacT Microbial Detection System(抗酸菌の代謝によって産生される CO_2 が溶解した際に生じる水素イオンを検出する)がある。また、Septi-Check AFBの場合には、液体培地に接した固形培地上に形成されるコロニーを肉眼で確認する。結核菌の検出に要する日数は2~3週間で、非定型抗酸菌で1~3週間。

- ③以下の市販の核酸増幅キットを用いて核酸診断を行う。
 - (a) PCRキット: 16SリボソームRNA遺伝子を標的にしたもので、結核菌群(*M. tuberculosis*の5亜種で、*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*を含む)とMACを検出する。検出感度(検出できる最少の菌数)は10個前後で、所用時間は約5時間。
 - (b) TMA(Transcription-Mediated Amplification)法: 結核菌が $10^3 \sim 10^4$ 個ももっているリボソームRNA(16S rRNA)を標的とする為に感度が高い。この方法では、まず、逆転写酵素がもつ3つの作用(RNAに対する相補的なDNAの合成、RNA鎖の分解、DNAに対する相補的なDNAの合成)で16S rRNAから2本鎖DNAを作りだし、次にこの2本鎖DNAにRNAポリメラーゼを加えて、100から1000分子ものメッセージRNA(もとの16S rRNA相当)を作り、この16S rRNAを材料にして、また100倍か

ら1000倍ものRNAを増幅していく。産物(RNA)をアクリジニウムエステルで標識したDNAとハイブリダイゼーション(結合)させ、標識ハイブリド(RNA・DNA)を抽出した後で化学発光させて機械で読みとる。検出感度は1.2個~数個の結核菌で、所用時間は約3~4時間。(c) LCR(Ligase Chain Reaction)法: 結核菌のDNAに結合した2つのプライマーの間をDNAポリメラーゼとリガーゼでつなぎ、PCR産物と同じようなDNA断片を繰り返し作製する。4つのプライマーを用いて(ちなみにPCR法ではプライマーの数は2つ)、より多くの産物を作る。増幅産物(DNA断片)をELISA法でケイ光発光させて、機械で読みとる。検出感度は約30個の結核菌で、所用時間は約4時間。

一方、培養した菌の鑑別にはDNAプローブ法が用いられる。アクリジニウムエステルで標識したDNA(プローブ)を被検菌の16S rRNAにハイブリド(結合)させ、化学発光させて読みとる。結核菌群とMACを鑑別する。DNAプローブ法は、増幅の操作を含まないので、少量の菌つまり喀痰中の結核菌の検出には向かない。

3. 薬剤耐性

結核の化学療法には、イソニアジド(INH)、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(EMB)、ピラジナミド(PZA)の5薬剤がよく用いられる。化学療法の標準的な処方方は3通りである。

- ①2 HRZS(またはE)/4HR(Eを加えてもよい): 治療初期の2ヶ月間にイソニアジド、リファンピシン、ピラジナミド、ストレプトマイシン(またはエタンブトール)の4剤併用療法を行い、その後、維持療法としてイソニアジド、リファンピシンの2剤併用療法を4ヶ月間行う計6ヶ月間の治療法。
- ②6 HRS(E)/3~6 HR: 治療初期の6ヶ月間にイソニアジド、リファンピシン、ストレプトマイシン(またはエタンブトール)の3剤併用療法を行い、その後の3~6ヶ月間にイソニアジド、リファンピシンの2剤併用療法を行う計9~12ヶ月間の治療法。ただし、ストレプトマイシンは始めの2~3ヶ月間は毎日、以降は週2回投与する。
- ③6~9 HR: 6~9ヶ月間イソニアジド、リファンピシンの2剤併用療法を行う。また、患者(塗沫陽性者)に接触した人の中で、ツベ

ルクリン反応で感染者と診断された場合には、特に集団感染の場合には、イソニアジドによる化学予防が行われる。我が国では6ヶ月間の服用（予防内服）が標準である。ただし、結核菌の臨床分離株の中には、イソニアジド耐性が我が国の場合で4.4%、世界で4.1%存在している。

イソニアジドは結核菌の細胞壁成分であるミコール酸の合成を阻害し、菌体内に有害飽和脂肪酸を蓄積させる（図4A, 左側）。イソニアジド自身には抗菌作用がなく、ヘム結合性カタラーゼ・ペルオキシダーゼ（KatG）の作用で活性型のイソニアジド（INH*）に変換される。活性型イソニアジドの作用点は、脂肪酸の合成経路で働くエノイル ACP (acyl carrier protein) レダクターゼ (InhA) で、InhA・NADH・INH*の強固な複合体を形成して、InhAの酵素活性を阻害する。

イソニアジド耐性は、①KatGが変異して活性型への変換が起こらない場合、②InhAが変異して、活性型イソニアジドの作用点が少なくなった場合、③アルキルヒドロペルオキシダーゼ (AhpC) が変異し、活性が高まって、過酸化水素やイソニアジドに関連した過酸化物の還元能力が高くなった場合（一般に、KatGの活性が低下すると、AhpCの活性が上昇する）にみられる（図4A, 右側；図4B）。MIC >10 $\mu\text{g/ml}$ の高度耐性には KatG 変異が関与し、MIC 0.1~0.5 $\mu\text{g/ml}$ の耐性には InhA 変異が関与するケースが多い。耐性変異は、例えば、InhA 変異→KatG 変異→AhpC 変異の様に移行することがある。現在、このような耐性変異の約80%をDNA診断することができる。なお、わが国のイソニアジド耐性基準は0.2 $\mu\text{g/ml}$ である。

リファンピシンは、RNAポリメラーゼの β サブユニットに強い親和性を持ち、mRNA上のRNAポリメラーゼに強く結合して、mRNA合成の開始段階を阻害する。耐性は、 β サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子（長さ3516塩基対）の変異による。

ストレプトマイシンはリボソームの30Sサブユニットに結合し、蛋白質の合成を阻害する。耐性の獲得は、細胞内への透過性の低下、酵素による不活化、リボソームの親和性の低下等による。このうち、リボソームの親和性の低下は、30Sサブユニットを構成するS12蛋白や16S rRNAの変異による。S12蛋白をコードする *rpsL* 遺伝子（長さ372塩基対）、16S rRNAをコードする *rrs* 遺伝子（長さ1537塩基対）のミスセンス変異により高度の耐性が獲得される。

エタンプトールは、細胞壁の主要構成成分であるアラ

ビノガラクトタン (arabinogalactan, AG) の合成を阻害して結核菌を死滅させる。耐性は、 β -D-arabino-furonosyl-1-monophosphoryl decaprenol (DPA) からアラビナン (arabinan) への転換を触媒する arabinosyl transferase 遺伝子 (*embB*; 長さ3294塩基対) の変異による。*embCAB* 遺伝子領域のコピー数が増加し、arabinosyl transferase が過剰発現された場合にも耐性となる。

ピラジナミドは、感染マクロファージのファゴソーム内に入り、そこで菌体内に取り込まれ、*pncA* 遺伝子にコードされた pyrazinamidase (PZase) によって pyrazinoic acid (POA) に代謝され、この POA が再度ファゴソーム内に蓄積して、殺菌作用を示すと考えられている。耐性の大部分は *pncA* 遺伝子（長さ558塩基対）の点突然変異による。*pncA* が変異した耐性菌では、pyrazinamidase の活性が低下していて、ピラジナミドが POA に変換されにくくなっている。

耐性変異を標的とした DNA チップの開発が進んでいる。

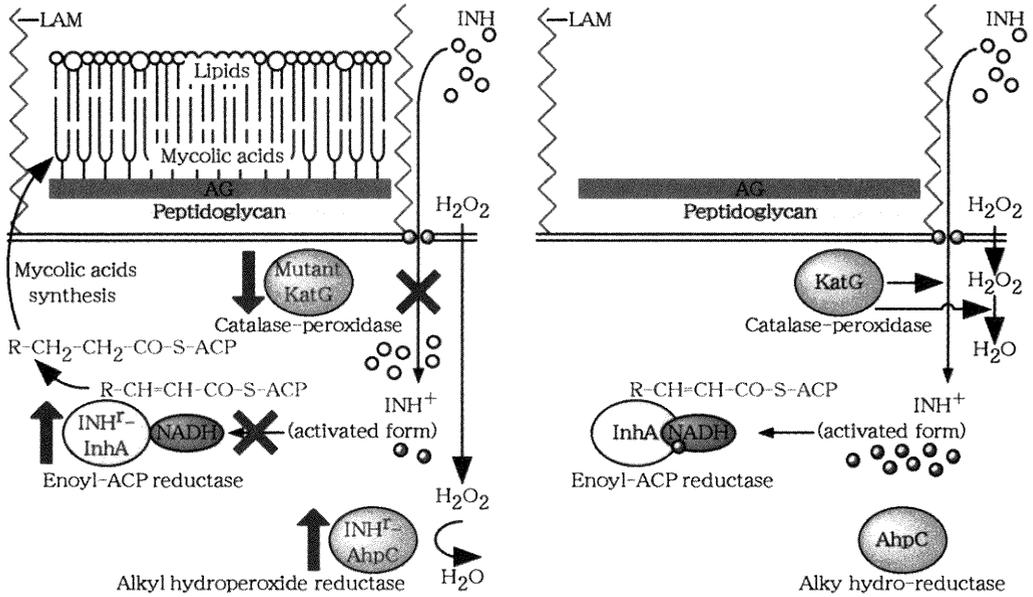
4. 分子疫学

分子疫学解析を行うことによって、結核が新潟県下で、わが国で、そして世界でどのような形で広まっているのかを知ることができる。また、「同一の感染源が、2家族以上にまたがり、20人以上に感染した」結核集団感染が発生した場合、その集団感染が同一菌による流行であるか否かを知ることができる。

結核菌は IS6110 と呼ぶ挿入配列 (insertion sequence, IS; 細胞内で DNA から別な DNA へと“動きまわる” DNA 断片) を染色体 DNA の上にもっている（図5A）。結核菌の場合、菌株毎（患者株毎）に IS6110 の存在様式が異なる。IS6110 を1個もつ菌株もあれば、20個以上もつ菌株もある。新潟では15個前後をもつ株が多い。また、DNA 上の挿入位置と挿入方向も異なる（例、図5B）。結果として、患者株の DNA を分離し、IS6110 のまん中を1カ所だけ切断する制限酵素 (*PvuII*) で切断し、IS6110 をもった DNA 断片の数とサイズを電気泳動で解析すると、菌株毎に異なったパターンが得られる。患者株を一つ一つ特定することができる為、DNA 指紋法とも呼ばれている。また、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析とも言う。

図5C は新潟県下で発生した家族感染の解析結果を示したものである。患者は44歳の男性で、その後12歳の

A



B

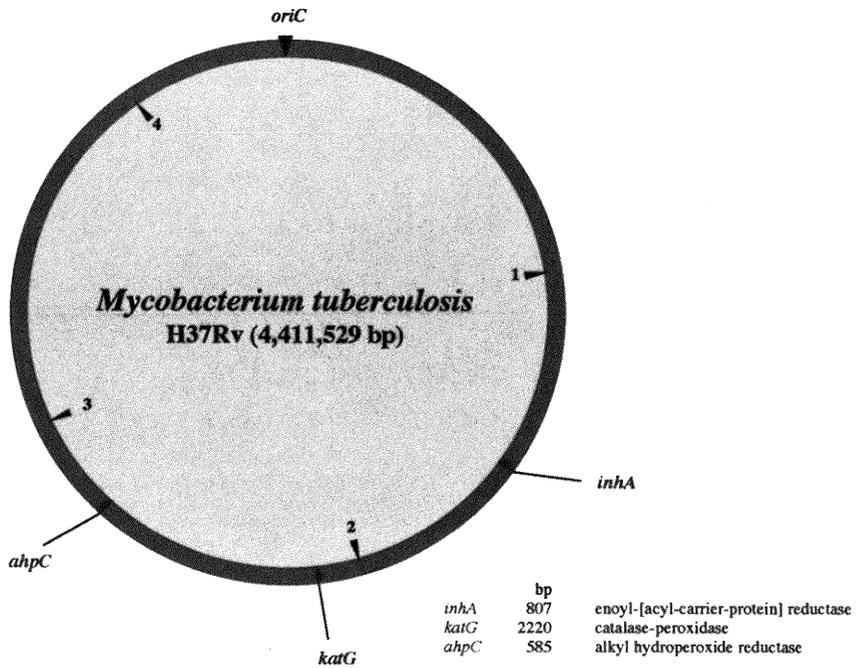


図4 イソニアジドの作用と耐性メカニズム (A) そして耐性遺伝子のゲノム上の位置 (B)

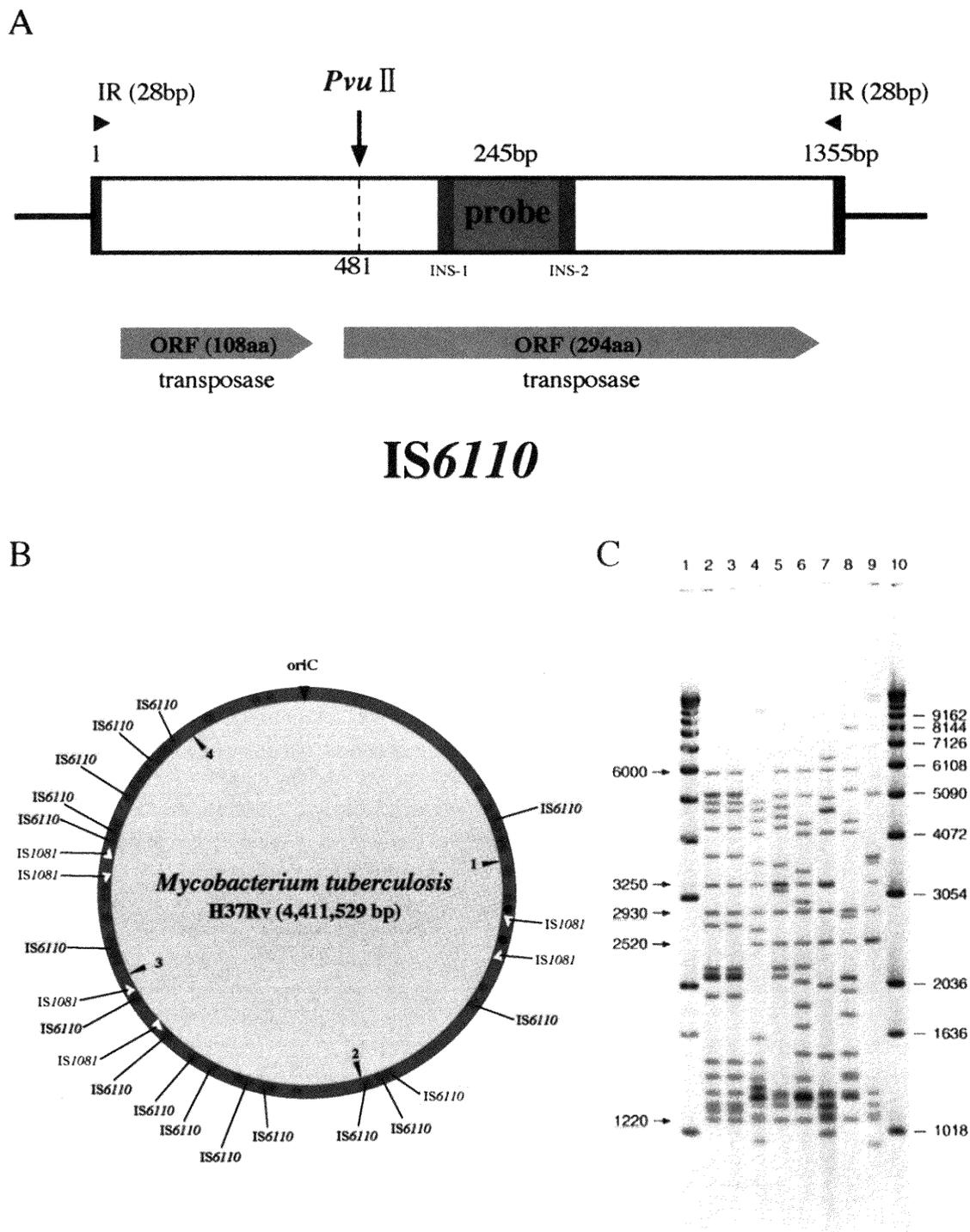


図5 結核菌の分子疫学解析に用いる IS6110 の構造 (A), ゲノム上での分布 (B), そして新潟での解析例 (C)

同居の娘が家族検診(胸部X線検査)で、男性患者と接触の機会があった別居の68歳の母親が定期検診(胸部X線検査)で、それぞれ感染が判明した。この3人から分離した結核菌をDNA診断した結果、父親と娘が同一株で(lane 2 & 3)、祖母の菌株(lane 4)はそれらとは異なったものであった。娘は父親から、祖母は別の汚染源から感染したことが判明した。新潟の結核は都市型で、異なった菌型が多く存在していることも分かる(lane 5-9)。

なお、MACはIS6110をもっていないので以上の解析では陰性結果となる。MACの分子疫学解析にはIS1245を用いる。

5. 宿主側の検査

学生の入学時(臨床実習前)あるいは医療従事者の雇用時に、ツベルクリン反応検査の二段階試験(1~3週間の間隔をおいた2回のツベルクリン反応検査で、プースター効果による最大反応値をみる為の試験)を行い、ベースラインの反応成績を記録する。その後結核感染源との接触が疑われた場合には再検査をするが、この記録を対照として用いる。再検査で発赤径が対照より10mm以上大きくなった場合には結核感染と判断され、予防内服の対照となる。

ツベルクリン反応では、皮内注射によって注入された抗原(PPD, purified protein derivative)にT cellが反応し、産生されたIFN- γ などのサイトカインによってマクロファージが集積、活性化され、さらにサイトカインによる遅延型炎症反応が惹起されて、毛細血管増殖と血管拡張による発赤、マクロファージ浸潤や繊維素析出による硬結、血漿滲出や組織障害による水泡と壊死といった組織反応が形成される。

平成10年に某産婦人科で発生した新生児劇症結核の症例では、新生児が肺結核で死亡、感染源として母親(33才)が特定された。この母親は、間質性肺炎と診断され長期間ステロイド投与をうけていて、(細胞性免疫の低下をきたして)「ツ」反陰性であった。しかし、血清抗cord factor抗体測定で強陽性と判明し、結核と診断された。さらに月経血でPCR(TB+)と判明した。

現在、このような結核の血清学的な診断法(sero-diagnosis)が極めてホットな話題となっている。

おわりに

人々の生命を地球的な規模で脅かす新興・再興感染症に対峙する策として、米国のゴア副大統領(当時)は、

①世界規模での感染症情報システムの確立、②感染症に関する研究の充実と研修の実施、③市民の協力による感染症の予防と拡大の阻止、④国際協力による感染症の制圧の4項目をあげている。

再興感染症である結核の場合にも、診断・治療・予防の研究が急ピッチで進められていて、幾つかの領域で従来とは異なった検査システムが確立しつつある。培養が自動化され、菌種の診断と薬剤耐性検査が核酸法となり、分子疫学はroutineの技術となった。ただ、ツ反とBCGがその役目を終えて初めて結核対策が新しい段階を迎えるのであろう。

文 献

- 1) Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B.G.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537~544, 1998.
- 2) Ramaswamy, S., and Musser, J.M.: Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 79: 3~29, 1998.
- 3) Ohara, T., Taneike, I., Gejyo, F., Tsuchiya, T., and Yamamoto, T.: Molecular epidemiology of intrafamilial *Mycobacterium tuberculosis* infections in Niigata, Japan. *Acta Med Biol* 47: 169~173, 1999.
- 4) 光山正雄: 結核, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2001.
- 5) 矢野郁也: 大阪市内で発生した病院内新生児劇症結核と学校内集団感染例, 第20回「抗治研資料-12」

司会 新しい話題をわかりやすくお話いただき、ありがとうございます。どなたかご質問ございませんでしょうか? 話題が少し離れてもよろしいでしょうか? 結核の集団感染には大規模なものから小規模なものまで色々あ

りますが、これはホスト側に原因があるのか、あるいは特別な菌があるのか、しばしば話題になります。特別に感染を起こしやすい、流行を起こしやすい菌というのがあるのでしょうか？

山本 はい、結核菌に強毒株が存在するとの考え方もあります。ただ、高齢者の感染といった宿主側の問題の方が重要なかもしれません。強毒性という問題については、BCG と結核菌の比較でどの遺伝子が BCG にない、結核菌はこれを持っているから強毒性だというよ

うなことが現在解析されています。これから分かってくると思います。

司会 その他どなたかありませんでしょうか？どうもありがとうございました。それでは3席目に入ります。ツベルクリン反応や BCG は結核と関係のないかたでも良く分かっている事だと思いましたが、実はこの良く分かっている事が最近問題になってきております。そのような点を含めて、丸山先生おねがい致します。

3) 医療従事者の結核対策

ツベルクリン反応、BCG 接種の最近の見解

当院職員のツベルクリン2段階法の結果を中心に

国立療養所西新潟中央病院呼吸器科 丸山佳重

Prevention of Tuberculosis Infection Among Health Care Workers.
Recent Opinions on the Roles of the Tuberculin
Skin Testing and the BCG Vaccination.
Focus on the Result of Two-Step Tuberculin
Skin Testing in Our Hospital

Yoshie MARUYAMA

*Department of Respiratory Disease,
National Sanatorium Nishi-Niigata Central Hospital*

To obtain the baseline value of tuberculin reaction, two-step tuberculin skin testing was carried out in 307 employees out of 376 in our hospital with 100beds sanatorium for tuberculosis. As manners of dividing those healthcare workers to three groups, very high-risk group, risk group and others by the frequency of possible exposure to tuberculosis patients and/or their examination samples, the reaction of very high risk group is relatively higher than other two groups. However, overall positive rate is very high compared with general population. This result urged us more conscious about infection prevention of tuberculosis in our hospital. In this symposium, I would

Reprint requests to: Yoshie MARUYAMA,
Department of respiratory disease,
National Sanatorium Nishi-Niigata
Central Hospital Masago 1-14-1,
Niigata City, 950-2085 JAPAN

別刷請求先: 〒950-2085 新潟市真砂1-14-1
国立療養所西新潟中央病院呼吸器科

丸山佳重