

## 感染症の診断と治療

—その新しい流れ—

東京大学医科学研究所 島田 馨

Current Trends of Diagnosis and Treatment in Infectious Diseases

Kaoru SHIMADA

Department of Research, Tokyo University of Medicine

DNA probes are the newest diagnostic reagents now in clinical use to detect or speciate infectious microorganisms. An understanding of the fundamental aspects of DNA probes and knowledge of their clinical applications will provide clinicians new informations in recent progress in infectious diseases.

New types of monoclonal antilipopolysaccharide (LPS) antibody and monoclonal anti-TNF antibody are under clinical investigations in patients with sepsis syndrome for prophylaxis of endotoxin shock. The results so far reported seem to be promising.

Key words: DNA probe, anti TNF antibody, PCR

DNA 診断, 抗 TNF 抗体, PCR

本年4月の医学会総会では、いずれの分野でも分子生物学的アプローチを用いた発表が多かった。感染症の診断、治療もこの潮流と無縁ではない。

### 新しい診断の流れ

#### DNA プローブによる診断

病原微生物の同定は培養、形態学的検査、生化学的検査、血清学的検査、などを組み合わせて行ってきたが、DNA 診断は遺伝子の方から同定を進める根源的な同定法である。これが可能になった根底には遺伝子が採れる、あるいは遺伝のクローニングが可能となったことがある。一つの遺伝子をピュアに精製でき、これを増やすことが

でき、標識してプローブとして目標とする遺伝子を探知できるようになったのである。

DNA は遺伝情報の担い手であり、過去20年間にわたって細菌の系統分類学に積極的に利用され、細菌の分類を大きく変えてきた。その手法の一つに GC % の決定がある。DNA はアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T) の4種類の塩基を持つが、二重らせんの2本の鎖の塩基配列は相補的であり、2本の鎖は塩基対の間に生じる水素結合によって結び付いている。Aは常にTと、Gは常にCと対になる。GとC間の水素結合は3本、AとT間の水素結合は2本であるため、AT 間の結合は GC 間の結合より不安定である。2本

Reprint requests to: Kaoru SHIMADA,  
Dept. Infectious Diseases, Inst. Med. Sci.,  
Univ. Tokyo.

別刷請求先: 〒108 東京都港区白金台4-6-1  
東京大学医科学研究所感染症研究部

島田 馨

鎖 DNA は一定の条件下で加熱すると水素結合が切れて1本鎖となる。1本鎖 DNA 形成のマーカ-は 260 nm の吸光度の上昇であり、2本鎖 DNA 液の石英セルの温度を上昇させると DNA が次第に1本鎖に解裂して吸光度が上昇する。GC 間の結合は AT 間の結合より安定なため、DNA の GC 含量が大きければ1本鎖にするには高い温度が必要となる。このようにして GC % を求めることができる。細菌の GC % は25%から75%まで幅広いが、species 内では±2%以内なため同定の良い指標となる。

現在、細菌検査室レベルで実用化されている DNA 診断は結核菌、非定型抗酸菌、レジオネラ、マイコプラズマ、クラミチア、りん菌などの DNA プローブによる同定がある。

これらは従来の検査手技では迅速性に難点があった微生物であるが、DNA プローブ特異性、迅速性共に優れ、この問題は解決された。一般に遅発育菌やリケッチア、ウイルスなどは DNA 診断の良い対象である。

DNA プローブで探索する DNA (又は RNA) は染色体上のものに限る必要はない。細胞内ではリボソ-マル RNA (rRNA) をコードしている遺伝子が大量の rRNA を産生する。細菌細胞は約 10,000 個のリボソ-ムを持つので、rRNA をコードしている染色体 DNA を探索するより rRNA を探索するほうが 10,000 倍も感度が優れていることになる。しかも rRNA は各種生物で構造が比較的良く保存されていて、可変領域では20~30塩基配列で非常に種特異性を示す部分が認められているので、これに相補的な DNA を合成すれば DNA-RNA ハイブリダイゼーションで効率良く菌を検出、同定できる。現在、広く利用されているジーンプローブ社のキットはこの考えに基づいたものである。用いられる DNA プローブは、検出しようとしている微生物の rRNA に相補的な1本鎖 DNA で、これに化学発光物質であるアクリジニウムエステルを標識したものである。検体をソニケーターあるいは蛋白分解酵素で溶菌させて rRNA を抽出し、DNA プローブと反応させて、3) 次に未反応のアクリジニウムエステル標識 DNA プローブを加水分解試薬で失活させ、4) ハイブリダイズした RNA : DNA ハイブリッドの化学発光を測定し、5) その測定値より目標とした微生物であるか否かを判定する。検体の溶菌処理に15分、ハイブリダイゼーションのインキュベーションに15分~20分、セレクション(未反応のアクリジニウムエステル標識 DNA プローブを加水分解)のためインキュベーションに5分を必要とするので、その

他の操作を入れても 1.5~2 時間で同定が完了する。

ジーンプローブ社の *M. pneumoniae* 用 DNA プローブで咽頭スワブ、喀痰などから *M. pneumoniae* 検出を培養法と比較した成績では sensitivity が 88.5~100%、specificity が 88.8~98.1% と感度、特異性とも優れている<sup>1)2)</sup>。

レジオネラ用の DNA プローブは検体中に  $10^4 \sim 10^5$ /ml の菌数を必要とし、感度に若干問題が有る。培地上の集落の同定に用いるのには問題は無い。しかし検体からの直接検出には蛍光抗体法以外により方法が無いので、検体に直接プローブを当ててレジオネラの有無を調べることも行なわれている。結核菌や非定型抗酸菌用の DNA プローブも  $10^5$ /ml 以上の菌数が必要であり、これは Ziehl-Neelsen 法の Gaffky 1号の感度より劣るので抗酸菌染色による検査や培養を省略することはできない。感度の低いのは抗酸菌の構造が強固で破壊されにくいと考えられており、溶菌処理法の改良が必要である。現在の処、抗酸菌用のプローブの用途は検出された抗酸菌の菌種の同定が主である。

市販の抗酸菌用 DNA プローブは菌種ごとに用意されているのにたいし、レジオネラ用 DNA プローブはレジオネラ属の genus level の同定用であって、25菌種あるレジオネラの species level での同定はできない。このため江崎らはレジオネラ属の25菌種の基準株の全染色体 DNA をマイクロプレイトに固定し、分離したレジオネラから DNA を抽出し、これをフォトビオチンで標識した後マイクロプレイトに固定してある基準株の DNA と DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行ない、ビオチン標識 DNA を酵素抗体法で定量して species level まで同定する方法を考案した<sup>3)</sup>。この方法を用いると、全25菌種の DNA プローブを作成、保持しておく必要はなく、経済的である。

#### DNA 増幅による感染症診断

抗酸菌の DNA プローブでも分かるように、現在のキットでは感度にやや問題が残っている。これを解決するには DNA を増幅して検出すれば良い。Polymerase chain reaction (PCR) は目標とする DNA 断片の in vitro での増幅を極めて容易にした。PCR の実際は 1) 増幅したい DNA 部分の両端の20塩基ほどのオリゴヌクレオチドをプライマーとして合成する。2) 目標とする DNA を 95℃、2分の条件で熱変性して1本鎖 DNA とし、3) これにプライマーを結合させる(アニーリング、条件は50℃、2分程度)、4) 次に耐熱性の DNA 合成酵素である Taq ポリメラーゼを作用させて相補的

な DNA を合成する (72°C, 2分程度), この場合プライマーは反応の開始点と終了点となる。この熱変性, アニリング, 合成のサイクルを繰り返すことで, 短時間内に10万~100万倍の増幅が可能であり, これに標識した DNA プローブをハイブリダイズして目標の DNA を探索するのが PCR 法の原理である。

#### PCR を用いた結核菌の検出<sup>4)5)</sup>

増幅する DNA は結核菌に特有の遺伝子配列の部分であるが, 65 kd の熱ショック蛋白をコードしている遺伝子部分を増幅している報告が多い。菊池らも熱ショック蛋白の遺伝子の一部を増幅し遺伝子診断を試みているが, 全身性播種性結核の診断に威力を発揮した例を紹介する<sup>5)</sup>。37歳の女性で約1月前より38~39°Cの発熱が続いていた。血液疾患や尿路感染や胆道感染は否定された。胸部X線写真に異常陰影はなく, 播種性結核を念頭に置いて読影しても粟粒影は認められなかった。肝生検を行なったが肝に類上皮細胞の出現はみられたものの肉芽腫形成はなく, 肝組織の染色, 培養とも結核菌陰性であった。しかし肝組織, 血液, 血液の単核球成分より DNA を抽出し, 結核菌の熱ショック蛋白の遺伝子部分のプライマーを用いて DNA を増幅, プローブでハイブリダイズするといずれの検体からも結核菌の遺伝子が証明され播種性結核と診断, 抗結核療法で約2月後に平熱に復した。このように PCR を用いた結核菌の検出は間もなく実用の域に達するものと期待される。

#### PCR を用いた *Pneumocystis carinii* の検出<sup>6)</sup>

エイズの最も多い感染症である *P. carinii* 肺炎は, *P. carinii* の培養が不可能なため, 診断は染色による他はなかった。*P. carinii* は99%が trophozoite で, 1%が cyst の形で存在する。Trophozoite はギムザ染色で染色されるが, 喀痰内に存在する他の細胞成分との鑑別が容易ではなく, cyst はグロコット染色で容易に鑑別できるものの, 数が少なく感度が極めて低いのが検出の隘路であった。そこで *P. carinii* の 5sRNA を持つ120の全塩基配列を決定し, これをコードしている遺伝子部分を PCR で増幅, 検出する方法で遺伝子診断を試みた。エイズ, あるいは腎移植患者のカリニ肺炎の喀痰, 経皮肺穿刺吸引の検体から全例 *P. carinii* の DNA が検出され, カリニ肺炎以外の呼吸器感染症の喀痰からは検出されず, カリニ肺炎の遺伝子診断は今後極めて実用性の高いものと考えられる。

### 新しい治療の流れ

遺伝子治療：遺伝子治療はアデノシンデアミナーゼ欠

損症を対象に米国で始められ注目されている。一般に遺伝子治療の対象は先天性代謝異常が中心であり, 感染症で対象となる物は少ないと予想される。しかしエイズでは遺伝子治療を目指して研究が進められている。エイズの病原体 HIV の 9 kb の全遺伝子の塩基配列は解読され, それぞれの遺伝子の機能もだいぶ分かってきたが, HIV の増殖に特に重要なのが *tat* と *rev* と呼ばれる調節遺伝子である。*Tat* は HIV のすべての遺伝子を活性化し, 遺伝子からのメッセンジャー RNA (mRNA) の転写の開始を促進すると共に, すでに転写の始まっている mRNA の伸長を促進する。一方 *rev* は核内に有るウイルス性の mRNA の細胞質内輸送を亢進させる。この *tat* と *rev* に対するアンチセンスを合成して HIV の培養液に添加すると HIV の増殖が著明に抑制されるので, 将来臨床応用が可能になるかも知れない。ただしオリゴヌクレオチドであるアンチセンスの合成が今日では, 極めて高価であり, この方面の技術革新も必要である。

単クローン抗体の臨床応用：細胞融合の技術の進歩で高価の単クローン抗体の製造が可能となり, 抗サイトメガロウイルス (CMV) 単クローン抗体, 抗 LPS 単クローン抗体, 抗 TNF 単クローン抗体の臨床応用が始まっている。抗 CMV 抗体は主として CMV 網膜炎を対象に臨床試験が進められており, SLE に合併した CMV 網膜炎に著効例が報告されているが, エイズのように細胞性免疫の廃絶した例では効果がやや劣るようである。細菌の細胞壁にある LPS (lipopolysaccharide) はエンドトキシンショックの引金となり, 血管内皮細胞の障害作用のほか, マクロファージの TNF (tumor necrosis factor) 遺伝子を刺激して TNF mRNA への転写や翻訳を活性化する。この作用は短時間内に発揮され, LPS 刺激の2時間後に血中 TNF は最高値に達するが, このようにして産生された TNFこそショックの直接の原因物質と考えられている。副腎皮質ステロイドは LPS 刺激→TNF 遺伝子のシグナル伝達を抑えて抗 TNF 効果を発揮する。LPS は TNF 産生の引金になるほか TNF の効果そのものを増強させるので, 抗 LPS 抗体, 抗 TNF 抗体とも感染ショック, ひいては多臓器障害の予防に期待されている。抗 LPS 抗体, 抗 TNF 抗体を投与する時期が問題であるが, sepsis syndrome の臨床概念が提起されており<sup>7)</sup>, sepsis syndrome がこれらの抗体の投与時期とされる。Sepsis syndrome とは 1) 感染症が存在する所見が有り, 2) 体温が 38.3°C以上, または 35.6°C以下, 3) 呼吸数が20/分以上, 4)

心拍数が90/分以上, 5) 主要臓器の灌流障害が有る, すなわち乏尿, 血中乳酸上昇,  $PO_2/FIO_2$  280 以下などが認められる臨床症候群をさす. これらの単クローン抗体はマウス骨髄腫細胞と抗体産生細胞のハイブリドーマから造られたものでマウス型抗体であるから, 投与された患者には HAMA (human anti-murine antibody) が出現してくる. 現在まで HAMA に起因するアナフィラキシーショックの報告はないが注意を要する点であろう.

### 参 考 文 献

- 1) **Dular, R., et al.:** Comparison of Gen-Probe commercial kit and culture technique for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Gen Microbiol.*, **26**: 1068~1069, 1988.
  - 2) **Tilton, R.C., et al.:** DNA probe versus culture for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. *Diagn Microbial Infect Dis.*, **10**: 109~112, 1988.
  - 3) **Ezaki, T., et al.:** Simple and rapid identification of *Legionella* species with photobiotin-labeled DNA. *J Gen Appl Microbiol.*, **34**: 191~199, 1988.
  - 4) **Brisson-Noël, A., Aznar, C., Chureau, C., et al.:** Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet*, **338**: 364~366, 1991.
  - 5) **Kikuchi, Y., Oka, S. and Kimura, S.:** Clinical application of the polymerase chain reaction for a rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Jpn J Med.* in press.
  - 6) **Kitada, K., Oka, S., Kimura, S., et al.:** Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by the polymerase chain reaction; animal models and clinical application to noninvasive specimens. *J Clin Microbiol.*, **29**: 1985~1990, 1991.
  - 7) **Bone, R.C.:** Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea vor comparable definition. *Ann Intern Med.*, **114**: 332~333, 1991.
-