

[総 説]

結核検査の進歩とその臨床応用

長谷川直樹

慶應義塾大学医学部感染症学教室・慶應義塾大学病院感染制御部

(令和2年2月3日受付)

我が国の結核罹患率は漸減しており、2018年には12.3/10万であった。今後ますます減少し、数年で罹患率10を下回る低蔓延国になると予想される。一方、昨今若年者を中心に外国生まれの患者が増加しているが我が国の若者の大多数が結核未感染者であること、患者の多くは高齢者であり、通院の難しい症例も増加すること、結核の感染様式が極めて対策の難しい空気感染であること、などを鑑みると、活動性結核症例を的確に、かつ迅速に発見することが必要になる。診断の要は菌の検出であるが、昨今の核酸増幅法や遺伝子解析技術の進歩により診断法は大きく変化している。本稿では、臨床微生物学の観点から昨今の結核菌検査法や現在注目されている視点などについて概説する。核酸増幅検査では、検体の前処理から核酸の抽出、増幅、検出まで、全検査工程が自動化された機器が開発され実用化され、検査所要時間と感度から診断だけでなく隔離解除の判断にも活用されるようになってきた。さらに薬剤感受性試験も培養菌を用いる表現型検査から薬剤耐性関連遺伝子を検出するgenotype検査も注目されている。今後、これらの新技術の併用により検体採取から数時間にて、結核菌の検出と薬剤感受性まで判明するようになり、結核診療を一変させると予想されるが、その真価を最大に生かすために最も重要な点は良質な検体を得ることである。

Key words: Tuberculosis, IGRA, 全自動遺伝子検査, 隔離解除, 薬剤感受性試験

はじめに

WHOによれば疫学的データの乏しい国、地域もあり正確な数字は不明であるが、結核患者総数は緩やかな減少傾向にある¹⁾。しかし結核は地球上の人類の5人に1人が既感染で、毎年約1000万人が発病し、130万人が死亡する(世界の死因第10位)今でも地球で最大規模の感染症である¹⁾。そのため、様々な角度から多くの研究が進められてきたが、いまだその病態には不明な点も多い。一方技術革新とともに結核菌の検出や結核の免疫応答を評価する検査方法には著しく進歩している。その全てに言及することはできないが、本項では臨床微生物学の視点から結核の診断や治療、病態に関して著者が注目する点について紹介する。

1. 塗抹鏡検/培養検査の進歩

結核菌の存在を証明できれば結核症の診断は確定するが、菌検出には一般的に培養検査が行われる。かつて我が国では鶏卵から作成された小川培地が主流であったが2000年ごろから液体培地(多くはMiddlebrook 7H9培地)を用いる培養法が導入され²⁾³⁾、検出感度の向上や培養所要時間の短縮により、CDC (Center for diseases and control) が推奨する

“薬剤感受性の結果を30日以内に臨床現場に報告する”との目標⁴⁾⁵⁾を達成できる症例も出てきた。また液体培地の導入は、NALC-NaOH法による検体の前処置により、集菌塗抹鏡検法を普及させ、検体鏡検査の検出力も向上した³⁾。集菌塗抹鏡検法の結果は、表1にあげる簡易法にて表記される⁶⁾。近年塗抹検査には通常前処理し均等化した検体を用いられるが、臨床現場では検体の一部を採取し前処理なしで塗抹鏡検する直接塗抹検査法の結果表記法であるガフキー号数が用いられる場合が今でも散見される。微生物検査の現場からガフキー号数を廃し、集菌塗抹法の結果表記を正しく表記することを臨床側に徹底する必要がある。

喀痰は患者が咯出するために、患者に依存する要素が多く、必ずしも1回で良質な検体が採取されるとは限らず、実際に累積で3回までは検出率が向上することが知られており⁷⁾、異なる日にできるだけ早朝に3回検体を採取することが推奨されているが⁸⁾、より質の高い検体を採取するために高調食塩水の吸入による誘発喀痰採取や、排痰誘発をする機器の使用なども推奨されている⁹⁾。しかし早朝採取にこだわらず患者に検査について十分な説明をして集積喀痰を用いるなどにより、患者の受診負担も少ない2回の検査でも良いとする報告もある¹⁰⁾¹¹⁾。

微生物検査で最も重要なことは良質な検体を用いることである、ということ¹²⁾をもっと深く理解しているのは微生物検査技師である。今後は微生物検査技師が、特に患者に依存する採痰などに積極的にかかわることは重要である。

著者連絡先：(〒160-8582) 東京都新宿区信濃町 35
慶應義塾大学医学部感染症学教室・慶應義塾大学病院感染制御部
長谷川直樹
TEL: 03-3352-1211 内線 62745
FAX: 03-5363-3711
E-mail: n-hasegawa@z8.keio.jp

表1. 集菌塗抹鏡検における検出菌記載法

記載法	蛍光法	Ziehl-Neelsen 法	相当するガフキー (G) 号数
-	0/30 視野	0/300 視野	G0
±	1 ~ 2/30 視野	1 ~ 2/300 視野	G1
1+	1 ~ 19/10 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

直接塗抹法以外ではガフキー号数での表記をおこなわない

2. 核酸増幅検査の進歩

1) 全自動遺伝子検査の発展

現在、結核診断には喀痰や気管支肺胞洗浄液などの検体からの結核菌群遺伝子検査は不可欠であり、特に塗抹陽性検体の迅速同定、診断に活用されている。我が国ではコバス Taqman MTB 試薬を用いるリアルタイム遺伝子解析装置コバス Taqman48 (ロシュ・ダイアグノスティクス) が広く用いられてきた。本法では、最大 48 検体を同時処理可能で、大量検体を比較的安価に検査できる¹²⁾。一方、前処理、核酸抽出などの用手的作業があり全工程に約 3 時間を要するが、近年、NALC (N-acetyl-L-cystein)-NaOH 処理済み検体を用い、検査過程を自動化迅速化した、TRC (transcription reverse transcription concerted reaction) 法を用いる TRC Ready MTB (東ソー)¹³⁾や PCR 法の過程を自動化した GENECUBE (東洋紡)¹⁴⁾が開発され、簡易な操作で検査の随時性、迅速性を向上させ、結核菌群遺伝子検査を約 1 時間前後にまで短縮した。

2) LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法

栄研化学により開発された LAMP 法は迅速性、簡便性と装置の小型化により、結核菌群遺伝子検査を小規模医療機関でも迅速に行える検査に発展させた。LAMP 法は等温増幅し濁度測定により検出するが、簡易な核酸抽出法である PURE (Procedure for Ultra Rapid Extraction) 法を併用すれば、用手過程が簡素化され専門外の技師でも自動遺伝子検査装置に匹敵する検査時間で結果が得られる¹⁶⁾。

3) ミュータスワコー MTB 法

PCR 反応から測定までの混合・攪拌・洗浄・分離・検出等の操作を約数 cm のチップ上で全自動で行う μ TAS (micro Total Analysis System) 技術を用いた全自動遺伝子検査装置、ミュータスワコー MTB (富士フイルム・和光純薬) が 2016 年に実用化された。本法の適応検体種は培養液及び NALC-NaOH 処理後の喀痰で、4 検体を約 45 分で同時測定できる。臨床性能評価試験でコバス Taqman48 との一致率は 98.6% と報告されている¹⁷⁾。

4) Xpert MTB/RIF

Xpert MTB/RIF は我が国では 2016 年 11 月に販売開始されたが、Xpert MTB/RIF はカートリッジ型の試薬を用い、カートリッジ内で核酸抽出からリアルタイム PCR 反応および検出までが全自動で完結する。適応検体種は喀痰に限られるが、NALC-NaOH 処理前の検体でも分析可能である。喀痰に Xpert MTB/RIF 用の検体前処理液を添加し振動攪拌して 15 分間反応させた後にピペットで検体を試薬カートリッジに添加し、あとは Gene Xpert システムに架設すれば

全自動で約 120 分で結果が判明する¹⁸⁾。分析モジュール数に応じて 2 検体~16 検体までを個別に測定が可能な機器がある。日本の 5 施設からの 427 検体を解析した検討では培養法との比較で感度 86.8%、特異度 96.8% であり、コバス Taqman MTB および TRC Rapid M.TB と比較し検出性能に有意差はなかったと報告されている¹⁹⁾。なお、感度を向上させ測定時間を 80 分以下に短縮した Xpert MTB/RIF ultra が実用化され、WHO も推奨しており、日本でも早期に利用可能となることが期待される²⁰⁾。

5) WHO による推奨

LAMP 法や Gene Xpert システムでは検体の NALC-NaOH 処理不要かつ検体の処理、操作も簡単で、微生物検査技師等が不在の施設や、夜間、休日など微生物検査技師が不在時でも簡単な操作で約 1 時間で結核菌群遺伝子検査が可能であり、Point of care (POC) 検査として有用である。国際的には WHO による推奨の下、2011 年以後 LAMP 法や Gene Xpert システム、特に後者が多くの途上国で結核診断目的で広く活用されてきた²¹⁾²²⁾。それは途上国では精度の高い塗抹鏡検検査を実施できる検査技師の確保が難しく、複数回の塗抹鏡検検査を指示しても再来院しない、などの問題があり、活動性結核を確実に発見し治療導入する、という結核蔓延国において最も重要な結核対策を効率的に推進するには、課題の多い塗抹検査よりも、導入にコストを要しても操作性が簡単で、より感度高く、迅速に結果を得られる遺伝子検査を POC 検査として導入することが効率的であると認識されたためである²³⁾。単時間でしかも感度が高い全自動遺伝子検査が普及すれば将来には塗抹検査が不要になる可能性を示唆する報告もある²⁴⁾。

3. 結核疑い例の隔離解除基準の変化

現在我が国では結核が疑われた場合には空気感染拡大阻止のために陰圧管理が可能な部屋へ隔離し、喀痰抗酸菌塗抹鏡検が 3 回陰性であれば隔離解除可能としている²⁵⁾。米国では 2013 年に FDA (Food and Drug Administration) より Xpert MTB/RIF が承認されたが、その塗抹検査よりも高い検出力と迅速性を生かして隔離後より早期に隔離解除を判断する方策として、先行研究に基づき²⁶⁾²⁷⁾2016 年には APHL (Association of Public Health Laboratories) と NTCA (National Tuberculosis Controllers Association) から 8 時間以上空けて採取した喀痰を別の検体、つまり 2 回目の検体として扱い、Xpert MTB/RIF が 2 回連続して陰性であれば、隔離を解除可、と提唱された²⁸⁾。患者の感染性は、咳の有無や程度と飛沫に含まれる菌数などに依存するが、感染性のある排菌量の目安は、集菌法を用いた喀痰抗酸菌塗抹鏡検にて + - 以上、つまり喀痰 1 mL 中に最低 6000 個以上結核菌が存在する状態と考えられる。しかし、実際には分子疫学的検討から複数回の塗抹陰性が確認された例を発端とする結核感染事例は多数報告されている²⁹⁾。これは喀痰塗抹鏡検陰性者の中には、極めて排菌量の少ない例から塗抹陽性に近い排菌量の患者もいることを示唆する。例えば 1 mL に 4000 個の菌数が存在しても塗抹検査では陰性になるが、この患者が咳を繰り返せば喀出される菌数は多く、空調が不十分な環境では感染する可能性は高くなると考えられる。一方、核酸増幅法の検出感

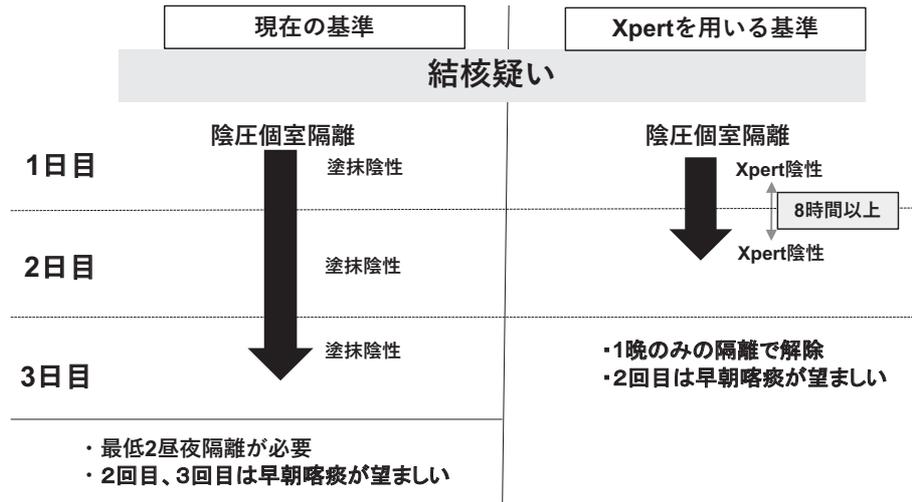


図1. 肺結核疑い例の隔離解除 文献28を参照し作成
Xpert: GeneXpert MTB/RIF

度は数十個/mLと言われるが、喀痰中に核酸増幅法の検出感度以下の菌数しか含まれない患者が、感染源になる可能性は低いと思われる。もちろん培養検査は核酸増幅法よりも感度が高く、核酸増幅法陰性でも培養で菌が検出されることはしばしば経験される。しかし、基本的に、核酸増幅法が複数回陰性で培養のみ陽性の例が感染源になることは極めて稀と考えられる³⁰⁾。

Xpert MTB/RIFによる隔離解除期間の短縮化に感ずる報告は最近増えているが³²⁾、医療経済的にも、従来の方法に比して費用対効果に優れることを示す報告もあり³³⁾、今後、我が国でも米国に準じたXpert MTB/RIFやLAMP法などの核酸増幅検査を用いる隔離解除基準を導入する施設も出てくるとと思われる(図1)。

4. 薬剤感受性試験

1) 表現型試験と遺伝子型試験

結核の治療の根幹は抗結核薬による化学療法であるが、結核菌の分裂速度が遅いこと、薬剤耐性菌の出現を阻止すること、などを考慮し、適切な複数の薬剤を併用し、適切な期間、確実に服薬することが重要である。この中で治療の成否に関わる最も重要な要因の一つは薬剤感受性であり、それが治療成績に関連していることは明らかである³⁴⁾。薬剤感受性試験実施結核患者における多剤耐性結核患者の割合は2012年以降0.6%程度で推移している。しかし2016年の新規多剤耐性結核患者49例のうち15例が外国出身者であるとのデータ³⁵⁾が示すように、外国出身者の薬剤耐性結核罹患率は高く、今後観光、就労、就学など様々な目的で多くの外国出身者の入国が想定されることから、我が国においても薬剤感受性試験の重要性はますます高まると考えられる。しかし分離培養菌を薬剤に曝露してその発育経過を用いて薬剤感受性試験を実施する場合(表現型試験)、発育支持力の強い液体培養を用いても検体採取から結果判明までに数週間、平均して約1ヶ月前後を要する。この状況を乗り越えるべく、最近では薬剤の耐性に関連する遺伝子の変異を検出する遺伝子型試験が注

目されている¹⁸⁾³⁶⁾。抗結核薬の耐性は基本的に薬物の作用部位や動態に関連する酵素の変異によるので、それらを検出することにより耐性の有無を判定することが可能である³⁷⁾。表2に主要な抗結核薬の耐性に関連する変異を示す。ピラジナミド耐性関連変異としては、pyrazinamidase/nicotinamidase 遺伝子である *pncA* 遺伝子の変異が知られているが、この遺伝子の変異がピラジナミド耐性の70-97%に関連するとされる³⁸⁾。イソニアジド耐性には catalase-peroxidase 遺伝子 (*katG*)、enoyl-ACP-reductase 遺伝子 (*inhA*)、などの複数の遺伝子変異が関連しており、これら複数の変異の蓄積により耐性度が上昇するとされている。リファンピシン耐性の98%は、その結合部位である結核菌のRNA polymerase のβ subunit 上の23個のアミノ酸をコードする *rpoB* 遺伝子の変異を伴うと報告されている³⁷⁾。

2) 我が国で使用可能な Genotype assay

1. ジェノスカラー (ニプロ)

我が国で開発されたジェノスカラー PZA-TB II, 同 INH-TB II, 同 RFP-TB II (ニプロ) は、結核菌のDNAのPCR増幅産物を、テストストリップ上のプローブとハイブリダイズさせ、それを発色させるラインプローブアッセイにてピラジナミドについては *pncA* 遺伝子、イソニアジドについては *katG*, *inhA* 変異および *inhA* 領域の upregulation を起こす変異として報告された *mabA*³⁹⁾ の3つの遺伝子、リファンピシンについては *rpoB* 遺伝子の変異を検出する。本法の特徴は培養菌株だけでなく、喀痰から直接検査することも可能であり、薬剤治療開始前に耐性を確認できることである。

2) Xpert MTB/RIF

先に紹介した全自動遺伝子検査試薬である Xpert MTB/RIF では RFP に限られるが *rpoB* をターゲットとして、RFP耐性を評価している¹⁸⁾。

3) 薬剤感受性試験の今後

上述の通り、現在のところ表現型試験での耐性を遺伝子型試験で全て説明できず、未知の薬剤耐性関連変異の存在、遺伝子変異では説明できない耐性機序の存在などが想定される

表 2. 主要な抗結核薬の薬剤耐性に関連する主な遺伝子

薬剤名(略称)	耐性関連遺伝子	機能	高度耐性に関連する変異	変異が入った時の MIC (mg/L)
Rifampicin (RFP)	<i>rpoB</i>	RNA の合成に関わる RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコード。変異により RFP が作用点に結合できなくなる。	S531L 20 種類以上の耐性関連変異	0.05 ~ 1
Isoniazid (INH)	<i>inhA</i>	細胞壁を構成するミコール酸の合成に関わるケトエノイルレダクターゼをコード。変異により INH が作用点に結合できなくなる。	C-15t+I194T C-15t+I194T	0.02 ~ 0.2
	<i>katG</i>	INH を活性体に変換する catalase-peroxidase をコード。変異により INH が薬理作用を発揮する活性型に変換されない。	S315L, S315N, S315T	
Pyrazinamide (PZA)	<i>pnc A</i>	PZA を活性型のピラジン酸に変換する pyrazinamidase をコード。変異により PZA が薬理作用を発揮する活性型に変換されなくなる。	L85P など 300 箇所以上の耐性関連変異あり。	16 ~ 100
Ethambutol (EB)	<i>embB</i>	細胞壁を構成する arabinogalactane と lipoarabinomannan の arabinan の重合を触媒する arabinosyltransferase をコード。変異により EB が作用点に結合できなくなる。	M306I, M306V, D354A, G406D G406C, G406S, Q497R	1 ~ 5
	<i>emA-embC</i>	同上	c-8t, c-12t, c-16t	
Streptomycin (SM)	<i>rpsL</i>	タンパク質の生合成を行うリボソーム粒子を構成するタンパク質の 1 つである S12 をコード。変異により SM が作用点に結合できなくなる。	K43R, K43T, K88Q, K88R	2 ~ 8
	<i>rrs</i>	リボソームの 30S サブユニットの構成成分である 16S リボソーム RNA をコード。変異により SM が作用点に結合できなくなる。	a514c, a514tc462t, c513t, c517t	

文献 34, 35 を参照し作成

ため、現在も表現型試験による薬剤感受性の評価が重要であることは明らかである。しかし、耐性との関連性が確立している主要な遺伝子変異を早期に検出できれば、当該薬剤の使用をやめたり、薬剤の変更や追加により治療レジメを最適化できる。一方、近年、全ゲノム解析の進歩により、薬剤耐性に関連する新たな変異の検討が精力的に進められており⁴⁰⁾、それらの情報が蓄積され耐性関連遺伝子変異のライブラリーが充実すれば従来の表現型試験に基づく感受性試験は不要になる可能性はある⁴¹⁾。実際全ての分離株を全ゲノム解析し薬剤耐性に関するデータを集積する国もでてきたが⁴²⁾、我が国でも検討が進められている⁴³⁾。

5. 結核菌の全ゲノム解析

解析技術の急速な進歩により、より速く、正確に、低コストで微生物の全ゲノム解析が可能になり、先記の薬剤耐性検査や国境を超えた広範囲におよぶ分子疫学検査に活かされている⁴⁴⁾⁴⁵⁾。さらに結核菌の進化の歴史や菌の微生物学的な特徴、さらに創薬に繋がる新たな情報も報告されている⁴⁶⁾。一方、実際には膨大なデータの管理と利用、菌情報に付随する個人情報管理、倫理的問題など研究を開始する前に取り決めるべき課題が未解決のまま、解析と解釈がおいつかないほどのデータが生み出され続けているのが現実である⁴⁷⁾。

6. 新たな活動性結核の診断技術

1) 尿中抗原検査

感染症領域では尿中抗原検査といえば、肺炎球菌やレジオネラが想起されるが、結核でも検討が進められてきた。特に結核には定着の概念はなく、菌以外に菌体成分が検出されるだけでも診断的意義は高い。ドイツの Alere 社からイムノク

ロマトグラフィ法を用いて結核菌の細胞壁の構成成分である lipoarabinomannan (LAM) を尿で検出するキットが実用化されているが、感度は十分と云えず普及していない⁴⁸⁾。一方、近年富士フイルム社により検出感度を向上させた尿中の LAM 検出キットが開発され⁴⁹⁾、HIV 陽性者例を対象に Alere 社製のキットとの比較試験が実施され、富士フイルム社製キットの検出感度が有意に高いことが報告された⁵⁰⁾。今後、HIV 陰性例における検討が期待されている。尿検体は患者に負担なく、また患者の病状を問わず採取可能であり、今後増加する気道系検体の採取が難しい超高齢者の結核や小児結核の診断に有用であろう。ただし感染性の判断や薬剤感受性の情報を得ることは難しいので、菌の検出に務めることは重要である。

2) 呼気分析

呼気中に含まれる結核菌が産生する結核菌特異的なガス成分の解析を活動性結核の診断に生かす開発が進められている⁵¹⁾。今のところ十分な感度は得られていないが、呼気検体は非侵襲的に採取され、肺結核ならば病変部由来の検体に相当する点は魅力的である。今後の研究の発展が期待される。

7. 感染と発病の鑑別

今後の我が国の結核対策における重要課題の一つは、潜在性結核感染者の中から発病の相対リスクが 4 を超える潜在性結核感染症を的確に選別し治療を行うことである⁵²⁾。しかし、潜在性結核感染している人が一夜にして活動性結核になるわけではなく、体内では潜在性結核感染の状態から発病に向かって刻々と変化しているが臨床的に捉えられない状態がしばらく続くことは理解される。近年、結核感染から発病に至る過程を連続的変化と捉える事が提唱されている⁵³⁾。結核感

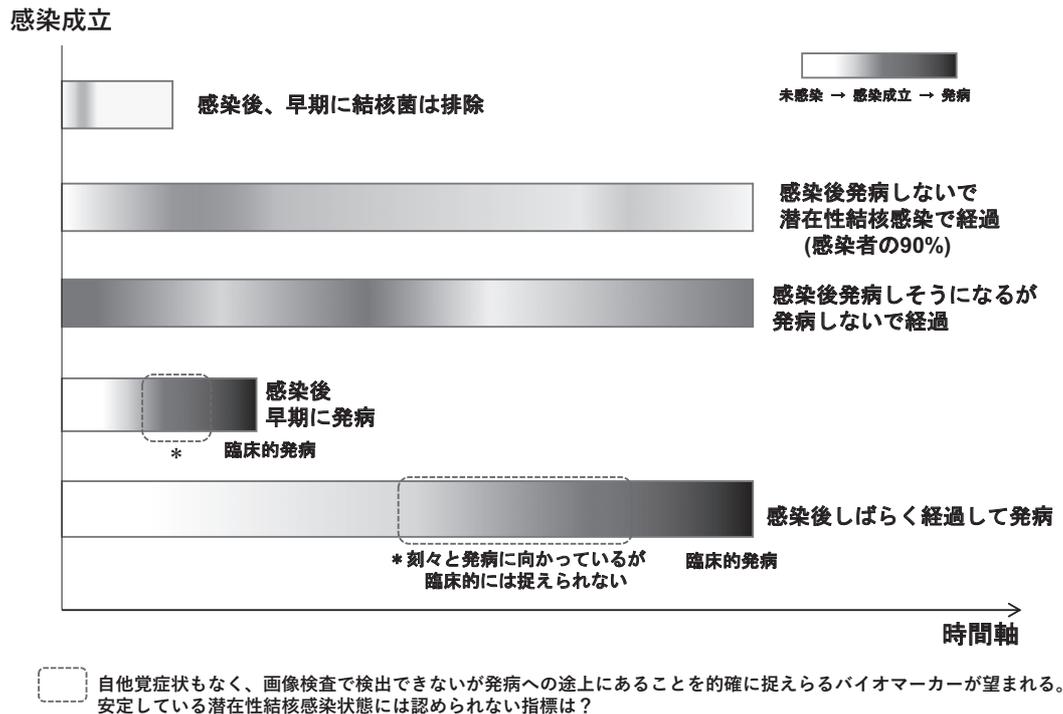


図2. さまざまな経過をたどる結核症

染者の中から発病の途上にあるもの、あるいは発病者を的確にとらえることができれば理想的である (図2)。

1) IGRA を用いた評価

IGRA 検査は結核菌が増殖に伴い産生し分泌するタンパク質である ESAT6, CFP10 を結核菌特異刺激抗原として末梢血、あるいは末梢血より分離された単核球に作用させ、血漿中の IFN γ の産生量を ELISA 法にて測定 (QuantiFERON[®]), あるいは IFN γ 産生細胞数を ELISPOT 法にて評価 (T-SPOT TB[®]) することにより、生理食塩水刺激による陰性コントロールおよび PHA (Phytohemagglutinin) 刺激に対する陽性コントロールの IFN γ の産生量あるいは IFN γ 産生細胞数と比較し結核に対する獲得免疫の有無を評価する事により結核感染を定性的に診断する体外検査である⁵⁴⁾⁵⁵⁾。しかし潜在性結核感染状態と発病を区別できない、活動性結核を対象にしても感度は 90~95% である、ハイリスクグループでも陽性者からの発病者は多くなく発病予測の指標としては十分な検査とは言えない^{54)~56)}、などの課題がある。一方、IGRA 検査は定性検査であるが、検査の過程で IFN γ の産生量や IFN γ 産生細胞数を定量するので、それらのデータを用いて発病リスクの高い感染者を抽出する検討が進められている。

1. QFT-GOLD PLUS

結核免疫において CD4 陽性リンパ球に加え、CD8 陽性細胞が重要な役割を担っていることは以前から知られている⁵⁷⁾⁵⁸⁾。特に CD8T 細胞は TNF α の作用を介して結核菌に感染しているマクロファージに傷害性を有する perforin や granulysin を産生する⁵⁷⁾。また、発病すると末梢血中の CD8 T 細胞の数が減少することより、CD8 陽性 T 細胞の発病抑制への関与を示唆する報告もある⁵⁹⁾。これらの点を鑑みて従来の CD4 陽性単核細胞だけでなく、CD8 陽性単核細胞の機

能を併せて評価するように改良された QFT-GOLD Plus が実用化された⁶⁰⁾。従来の QFT で用いられる刺激抗原のペプチドは MHC class II にのみ提示されるので CD4 陽性 T 細胞だけが刺激されていたが、QFT-GOLD Plus では MHC class I 上にも提示されるペプチド鎖の短い抗原が加えられ、CD8 陽性 T 細胞も刺激を受ける⁶⁰⁾。CD4 および CD8 陽性 T 細胞の IFN γ 産生能とその臨床的意義については今後の検討課題である。

なお、従来 QFT では採血後 8 時間以内の検査開始が勧められていたが、QFT-GOLD Plus ではヘパリン採血後、全血のまま冷蔵にて 32 時間保存可能としている。検体採取してから抗原刺激開始までの許容時間が延長されたことは臨床的には望ましいが、IGRA は生きた細胞を用いる生物学的検査であり精度の観点からは採血後ただちに検査を開始すべきである。前世代の QFT では採血後検査開始までの時間により IFN γ の産生量が変化し判定に影響することも報告されており⁶¹⁾、検体保存法が精度に及ぼす影響が危惧される。上巻らの検討では採血直後と全血で 32 時間保存冷蔵後に検査を実施した場合の検査結果には統計学的に有意な乖離はないことが示されたが⁶²⁾、検査者間での再現性など精度に関する検討は今後も重要と思われる。

2. TSPOT TB

陽性コントロールのスポット数に対する結核抗原刺激によるスポット数の比が潜在性結核感染者より発病者の方が大きいとの興味深い報告があり今後のさらなる検討が待たれる⁶³⁾。

2) RNAseq による評価

最近、血液中の mRNA の網羅的解析により、感染状態から発病に到るまでに発現が上昇するもの、低下するものも含めて経時的に変化することが報告されている⁶⁴⁾。その中から

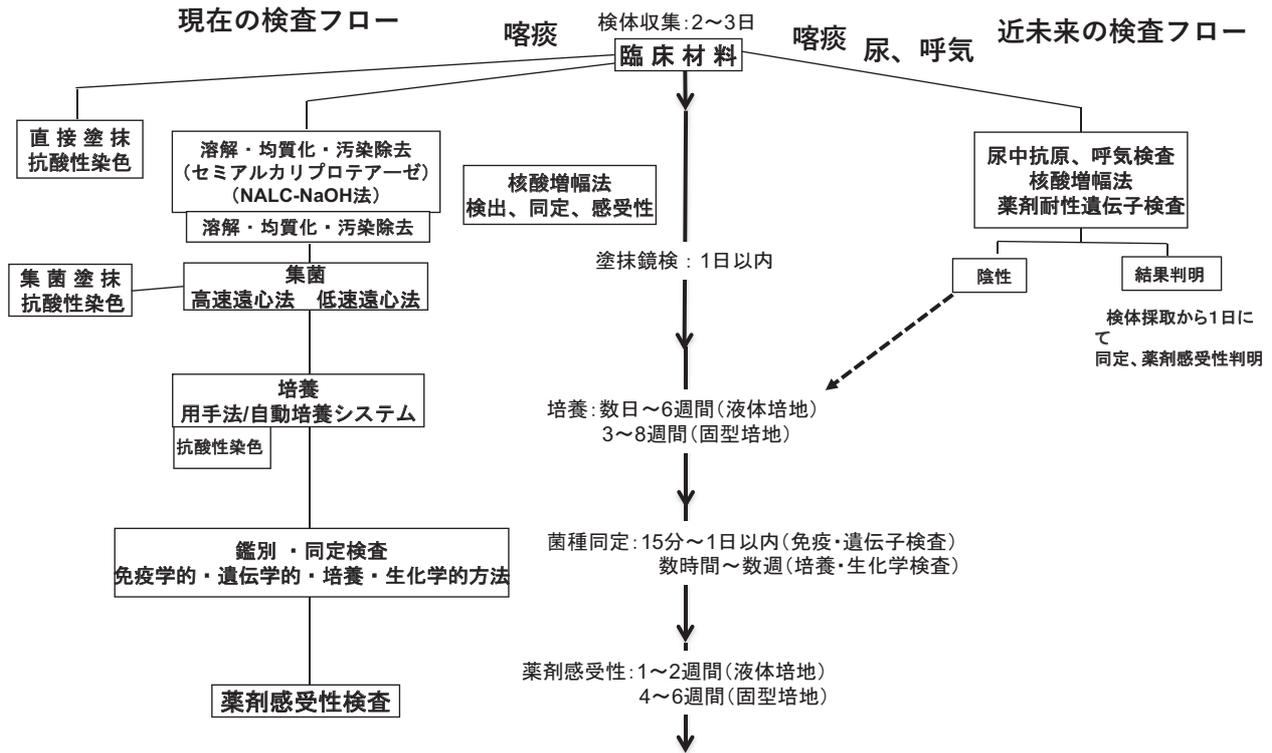


図3. 結核菌検査の流れ（肺結核を想定）

識別能の高い複数の mRNA を抽出しその発現状態を数式化することにより、将来発病する可能性を評価しうる事が報告されている⁶⁵⁾。本法を用いれば⁶⁶⁾⁶⁷⁾、まず IGRA で結核の感染をスクリーニングし、次いで発病に関連する mRNA の発現状態を評価することにより発病の可能性をより正確に、定量的に知る事が可能になると考えられる。

3) 液性免疫

最近結核に対する液性免疫が注目されている。結核高蔓延国であるウガンダに長期間在住しながら結核に感染しない者、つまり経年的にツベルクリン反応も IGRA も陽転しない者から採取した血清をマウスに投与し、結核菌を感染させたところ、それらの動物ではコントロール血清を投与された動物に比べて組織中の結核菌数が有意に減少することが報告され、結核に抑制的に機能する液性因子の存在が示唆された⁶⁸⁾。さらに 2019 年には気道粘膜に存在する結核特異 IgA 抗体が結核感染抑制効果を有することが報告され、結核の感染、発病に液性免疫が関与することが明らかになってきた⁶⁹⁾⁷⁰⁾。現在、抗原エピトープの解明が進められているが⁷¹⁾、今後これらのメカニズムの解明により発病阻止能を有する抗体を誘導するワクチンの開発への応用も期待される。

おわりに

結核は発育速度が遅く、現在も菌を分離培養し、さらに培養系を用いて薬剤感受性試験をおこなう検査の流れは今のところ日常的であるが、本稿で示した新規技術を結集することにより、もはや一般菌と同じ時間経過で検出、同定、薬剤感受性まで必要な微生物学的情報が数時間で得られるように

なってきた。遠くない将来に結核の臨床は大きく変わる可能性があるが（図3）、それを支えるのは微生物検査法の進歩であり、さらにそれを最大限に活かすために最も必要なのは良質な検体であることを最後に強調したい。

利益相反：なし

文 献

- 1) World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- 2) Hasegawa, N, T Miura, A Ishizaka, et al. 2002. Detection of mycobacteria in patients with pulmonary tuberculosis undergoing chemotherapy using MGIT and egg-based solid medium culture system. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 6: 447-453.
- 3) 三浦隆雄, 長谷川直樹, 鈴木喜久雄, 他. 2000. MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 抗酸菌検査システムの検出率と迅速性の評価. *日臨微誌* 10: 125-131.
- 4) Styrts, BA, TM Shinnick, JC Ridderhof, et al. 1997. Turn-around times for mycobacterial cultures. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1041-1042.
- 5) Shinnick, TM, MF Iademarco, JC Ridderhof, et al. 2005. National plan for reliable tuberculosis laboratory services using a systems approach. Recommendations from CDC and the association of public health laboratory task force on tuberculosis laboratory service. *MMWR.* 54 (RR06): 1-12.
- 6) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 2016. 抗酸菌検査ガイド.

- 7) Al Zahrani, K, H Al Jahdali, L Poirier, et al. 2001. Yield of smear, culture and amplification tests from repeated sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5: 855-860.
- 8) Davis, JL, A Cattamanchi, LE Cuevas, et al. 2013. Diagnostic accuracy of same-day microscopy versus standard microscopy for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 13: 147-154.
- 9) Sakashita, K, A Fujita, M Takamori, et al. 2018. Efficiency of the Lung Flute for sputum induction in patients with presumed pulmonary tuberculosis. *Clin. Respir. J.* 12: 1503-1509.
- 10) Datta, S, L Shah, RH Gilman, et al. 2017. Comparison of sputum collection methods for tuberculosis diagnosis; a systematic review and pairwise and network meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 5: e760-e771.
- 11) Mase, SR, A Ramsy, V Ng, et al. 2007. Yield of serial sputum specimen examination in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. A systematic review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 11: 485-495.
- 12) Ho, J, GB Marks, GJ Fox. 2015. The impact of sputum quality on tuberculosis diagnosis: a systematic review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis* 19: 537-544.
- 13) 日暮芳己, 佐藤高彰, 平井鉄三, 他. 2009. コバス[®]TaqMan 48 の基礎的評価と臨床検体による評価. *結核* 84: 117-124.
- 14) 近松絹代, 五十嵐ゆり子, 青野昭男, 他. 2016. TRC Ready[®] MTB による *Mycobacterium tuberculosis* complex と TRC Ready[®] MAC による *Mycobacterium avium* および *Mycobacterium intracellulare* の同定精度評価. *結核* 91: 623-629.
- 15) Hida, Y, K Hisada, A Shimada, et al. 2012. Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by use of quenching probe PCR (geneCube). *J. Clin. Microbiol.* 50: 3604-3608.
- 16) Shete, PB, K Farr, L Strnad, et al. 2019. Diagnostic accuracy of TB-LAMP for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis* 19: 268.
- 17) 佐々木智, 寺嶋和宏, 浜田貴俊, 他. 2018. 全自動遺伝子解析装置 ムュータスワコー g1 システム. *臨床病理* 66: 507-514.
- 18) Boeheme, CC, P Nabeta, D Hillemann, et al. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* 363: 1005-1015.
- 19) Tsuyuguchi, K, H Nagai, K Ogawa, et al. 2017. Performance evaluation of Xpert MTB/RIF in a moderate tuberculosis incidence compared with TaqMan MTB and TRC Rapid M.TB. *J. Infect. Chemother.* 23: 101-106.
- 20) Opota, O, J Mazza-Stalder, G Greub, et al. 2019. The rapid molecular Xpert MTB/RIF ultra: towards improved tuberculosis diagnosis and rifampin resistance detection. *Clin. Microbiol. Infect.* 25: 1370-1376.
- 21) World Health Organization. Policy statement. 2011. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. WHO. www.who.int/tb/features_archive/xpert_rapid_tb.../en/ 2020年1月20日現在.
- 22) World Health Organization. 2016. Policy statement. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. WHO. www.who.int/tb/features_archive/TB_LAMP/en/ 2020年1月20日現在.
- 23) Urdea, M, LA Penny, LL Olmsted, et al. 2006. Requirements for high impact diagnostics in the developing world. *Nature* 444: 73-79.
- 24) Opota, O, L Senn, G Prod'hom, et al. 2016. Added value of molecular assay Xpert MTB/RIF compared to sputum smear microscopy to assess the risk of tuberculosis transmission in a low prevalence country. *Clin. Microbiol. Infect.* 22: 613-619.
- 25) 日本結核病学会. 2018. 結核診療ガイド, 南江堂.
- 26) Lippincott, CK, MB Miller, EB Popowitch, et al. 2014. Xpert MTB/RIF assay shortens airborne isolation for hospitalized patients with presumptive tuberculosis in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 59: 186-192.
- 27) Chaisson, LH, M Roemer, D Cantu, et al. 2014. Impact of Gene Xpert MTB/RIF assay on triage of respiratory isolation rooms for inpatients with presumed tuberculosis: a hypothetical trial. *Clin. Infect. Dis.* 59: 1353-1360.
- 28) Consensus statement on the use of Cepheid Xpert MTB/RIF[®] assay in making decisions to discontinue airborne infection isolation in healthcare settings. NTCA APHL, April 2016. http://www.tbcontrollers.org/docs/resources/NTCA_APHL_GeneXpert_Consensus_Statement_Final.pdf 2020年1月20日現在.
- 29) Tostmann, A, SV Kik, NA Kalisvaart, et al. 2008. Tuberculosis transmission by patients with smear-negative tuberculosis in a large cohort in the Netherlands. *Clin. Infect. Dis.* 47: 1135-1142.
- 30) Campos, M, A Quartin, E Mendes, et al. 2008. Feasibility of shortening respiratory isolation with a single sputum nucleic acid amplification test. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178: 300-305.
- 31) Xie, YL, WA Cronin, M Proschan, et al. 2018. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients who are nucleic acid amplification test negative. Feasibility of shortening respiratory isolation with a single sputum nucleic acid amplification test. *Clin. Infect. Dis.* 67: 1653-1659.
- 32) Luetkemeyer, A, C Firnhaber, MA Kendall, et al. 2016. Evaluation of Xpert/RIF versus AFB smear and culture to identify pulmonary tuberculosis in patients with suspected tuberculosis from low and higher prevalence settings. *Clin. Infect. Dis.* 62: 1081-1088.
- 33) Chaisson, LH, D Duong, A Cattamanchi, et al. 2018. Association of rapid molecular testing with duration of respiratory isolation for patients with possible tuberculosis in a US-Hospital. *JAMA. Intern. Med.* 178: 1380-1386.
- 34) Lange, C, K Dheda, D Chesov, et al. 2019. Management of

- drug-resistant tuberculosis. *Lancet* 394: 953-966.
- 35) 内村和広. 2017. 結核サーベイランスからみた日本の薬剤耐性結核と結核患者の治療成績の現状. *IASR*38: 235-237.
 - 36) Dreisen, M, Y Kondo, BC De Joug, et al. 2018. Evaluation of a novel line probe assay to detect resistance to pyrazinamide, a key drug used for tuberculosis treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* 24: 60-64.
 - 37) 向川 純, 遠藤美代子, 柳川義勢, 他. 2017. 薬剤耐性結核菌株の薬剤耐性パターンと遺伝子変異の解析. *感染症学雑誌* 79: 388-396.
 - 38) Hirano, K, M Takahashi, Y Kazumi, et al. 1988. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung Dis.* 78: 117-122.
 - 39) Ando, H, T Miyoshi-Akiyama, S Watanabe, et al. 2014. A silent mutation in *mabA* confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiol.* 91: 538-547.
 - 40) Allix-Béguec, C, I Arandjelovic, L Bi, et al. 2018. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing. *N Engl J Med* 379: 1403-1415.
 - 41) Gygli, SM, PM Keller, M Ballif, et al. 2019. Whole-genome sequencing for drug resistance profile prediction in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63: e02175-18.
 - 42) Tornheim, JA, AM Starks, TC Rodwell, et al. 2019. Building the framework for standardized clinical laboratory reporting of next-generation sequencing data for resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clin. Infect. Dis.* 69: 1631-1633.
 - 43) Takii, T, K Seki, Y Wakabayashi, et al. 2019. Whole-genome sequencing-based epidemiological analysis of anti-tuberculosis drug resistance genes in Japan in 2007: application of the genome research for Asian tuberculosis (GReAT) database. *Sci. Rep.* 9: 12823.
 - 44) Holt, KE, P McAdam, PVK Thai, et al. 2018. Frequent transmission of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage and positive selection for the EsxW Beijing variant in Vietnam. *Nat. Genet.* 50: 849-856.
 - 45) Manson, AL, KA Cohen, T Abeel, et al. 2017. Genomic analysis of globally diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains provides insights into the emergence and spread of multidrug resistance. *Nat. Genet.* 49: 395-402.
 - 46) Gagneux, S. 2018. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 16: 202-213.
 - 47) Meehan, CJ, GA Goig, TA Kohl, et al. 2019. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nat. Rev. Microbiol.* 17: 533-545.
 - 48) Shah, M, C Hanrahan, ZY Wang, et al. 2016. Lateral flow urine lipoarabinomannan assay for detecting active tuberculosis in HIV-positive adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 5: CD011420.
 - 49) Sigal, GB, A Pinter, TL Lowary, et al. 2018. A novel sensitive immunoassay targeting the 5-methylthio-xylofuranose-lipoarabinomannan epitope meets the WHO's performance target for tuberculosis diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 56: e01338-18.
 - 50) Broger, T, B Sossen, E du Toit, et al. 2019. Novel lipoarabinomannan point-of-care tuberculosis test for people with HIV: A diagnostic accuracy study. *Lancet Infect. Dis.* 19: 852-861.
 - 51) Saktiawati, AMI, DD Putera, A Setyawan, et al. 2019. Diagnosis of tuberculosis through breath test: A systematic review. *EBio. Medicine* 46: 202-214.
 - 52) 日本結核病学会予防委員会・治療委員会. 2013. 潜在性結核感染症治療指針. *結核* 88: 497-512.
 - 53) Drain, PK, KL Bajema, D Dowdy, et al. 2018. Incipient and subclinical tuberculosis: a clinical review of early stages and progression of infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 31: e00021-18.
 - 54) 日本結核病学会予防委員会. 2014. 潜在性結核感染症治療指針. *結核* 89: 717-725.
 - 55) Pai, M, CM Denkinger, SV Kik, et al. 2014. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 27: 3-20.
 - 56) Abubakker, I, F Drobniowski, J Southern, et al. 2018. Prognostic value of interferon- γ release assays and tuberculin skin test in predicting the development of active tuberculosis (UK PREDICT TB): a prospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 18: 1077-1087.
 - 57) Andersson, J, A Samarina, J Fink, et al. 2007. Impaired expression of perforin and granulysin in CD8+ T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 75: 5210-5222.
 - 58) Rozot, V, S Vigano, J Mazza-Stladet, et al. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *Eur. J. Immunol.* 43: 1568-1577.
 - 59) Rozot, V, A Patrizia, S Vigano, et al. 2015. Combined use of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4 and CD8 T-cell responses is a powerful specific CD4 and CD8 T-cell response is a powerful diagnostic tool of active tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 60: 432-437.
 - 60) Petruccioli, E, T Chiacchio, I Pepponi, et al. 2016. First characterization of the CD4 and CD8 T-cell responses to QuantiFERON-TB Plus. *J. Infect.* 73: 588-597.
 - 61) Gaur, RL, M Pai, N Banaei. 2013. Impact of blood volume, tube shaking, and incubation time on reproducibility of QuantiFERON-TB gold in-tube assay. *J. Clin. Microbiol.* 51: 3521-3526.
 - 62) Uwamino, Y, A Sakai, T Nishimura, et al. 2020. Effect of refrigeration of blood samples in lithium-heparin tubes on QuantiFERON TB Gold Plus test result. *J. Infect. Chemother.* 26: 312-314 doi: 10.1016/j.jiac.2019.10.002.
 - 63) Bosco, MJ, H Hou, L Mao, et al. 2017. The performance of the TBAg/PHA ratio in the diagnosis of active TB disease in immunocompromised patients. *Int. J. Infect. Dis.* 59: 55-60.
 - 64) Zak, DE, A Penn-Nicholson, TJ Scriba, et al. 2016. A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. *Lancet* 387: 2312-2322.
 - 65) Suliman, S, E Thompson, J Sutherland, et al. 2018. Four-

- gene pan-African blood signature predicts progression to tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 197: 1198-1208.
- 66) Singhania, A, RJ Wilkinson, M Rodrigue, et al. 2018. The value of transcriptomics in advancing knowledge of the immune response and diagnosis in tuberculosis. *Nat Immunol* 19: 1159-1168.
- 67) Warsinske, H, R Vashisht, P Khatri. 2019. Host-response-based gene signature for tuberculosis diagnosis: A systematic comparison of 16 signatures. *PLoS Med* 16: e1002786.
- 68) Lu, LL, MT Smith, KKQ Yu, et al. 2019. IFN- γ -independent immune markers of *Mycobacterium tuberculosis* exposure. *Nat. Med.* 25: 977-987.
- 69) Dijkman, K, CC Sombroek, RAW Vervenne, et al. 2019. Prevention of tuberculosis infection and disease by local BCG in repeatedly exposed rhesus macaques. *Nat. Med.* 25: 255-262.
- 70) Li, H, B Javid. 2018. Antibodies and tuberculosis: finally coming of age? *Nat. Rev. Immunol.* 18: 591-596.
- 71) Chen, T, C Blanc, Y Liu, et al. 2020. Capsular glycan recognition provides antibody-mediated immunity against tuberculosis. *J Clin Invest pii: 128459.*

Up-to-date of clinical microbiology of tuberculosis

Naoki Hasegawa

Department of Infectious Diseases, Keio University School of Medicine

Tuberculosis is the most prevalent world infectious diseases, emergence of annual 9.0-11.1 million newly developed active cases and 1.1-1.3 million deaths. While its detail pathophysiological disease mechanisms remain to be elucidated, recent rapid advances of technology including nuclear acid amplification, and genome analysis have made a series of innovative progress in the field of clinical microbiology such as detection of tuberculosis bacilli, detail trace analysis of transmission, antimycobacterial resistance and proper evaluation of disease status. Automated analysis of nuclear acid amplification procedure and detection enable to diagnose active tuberculosis in approximately only an hour with higher detection sensitivity compared to microscopic smear examination using concentrated method, which could eliminate smear examination in the future. even taking cost-benefit analysis into consideration. Sensitivity against major anti-tuberculosis medicine using clinical specimen could be evaluated in short time while the significance of phenotypic sensitivity examination. The significance of cellular immune system mediated by CD8 positive T lymphocyte or humoral immune system mediated by immunoglobulin in terms of controlling disease progression from latent infection to active diseases has recently started to gather much attention. In addition, recent progress in the RNAseq technique is expected to be able to effectively find subclinical patients with latent tuberculosis infection under developing active tuberculosis, being to be treated. Potential availability of noninvasively obtained sample such as breathe, saliva, and urine to diagnosis active tuberculous diseases is under development. Together with these recent advances of microbiological examinations would dramatically change clinical practice in the management of tuberculosis near future.