

# Annual Review 神経 2011

2011年1月25日発行

中外医学社

## 1) 結核性髄膜炎に対する迅速・高感度診断法

崇徳会長岡西病院神経内科医長 高橋輝行

同 神経内科 田村正人  
日本大学医学部神経内科

崇徳会長岡西病院精神科 田宮 崇

同 神経内科 高須俊明  
日本大学医学部神経内科

**key words** polymerase chain reaction (PCR), nested PCR, real-time (TaqMan<sup>®</sup>) PCR, quantitative nested real-time (QNRT) PCR, wide range (WR)-QNRT-PCR

### 要 旨

現在、結核性髄膜炎 tuberculous meningitis (TBM) の臨床診断における最大の問題点は、“Gold standard”である細菌学的手法が時間を要する上に診断率が低いことにある。実地臨床の場では従来の細菌学的手法に替わる新しい診断的検査法が望まれており、近年、polymerase chain reaction (PCR) 法をはじめとする各種の結核菌の核酸増幅法が髄液を用いた簡便で迅速な検査法として臨床応用されている。しかし、その陽性率は施設や測定方法によりいまだ一定していない。現在、その検出感度の向上を図るべく様々な取り組みが成されており、中でも、Nested PCR法の導入が画期的な成果を挙げつつある。さらに、定量性を加味した新しいTBMの迅速・高感度診断法として、Quantitative Nested Real-time (QNRT) PCR法の開発などの大きな発展と成果が報告されつつある。

### 動 向

結核は長年、我が国における死亡原因の主座を占めて来たが、近年の環境の整備や栄養状態の向上、さらに抗結核薬の普及に伴いその死亡率は2006年には1.8人（人口10万人対）と著減して

いる<sup>1)</sup>。しかし、世界保健機関（WHO）の2007年の報告では、年間で推計約880万人が新規に結核に罹患し、約160万人が結核で死亡している<sup>2)</sup>。さらに、それらの大部分（約80%）はアジア・アフリカ地域の発展途上国にて占められており、その主たる原因として貧困や栄養失調、HIV/AIDSの流行等が挙げられている<sup>2)</sup>。したがって、結核は世界的には依然として死亡原因の主座を占めており、人類の重大な脅威であり続けている。

中枢神経系結核、すなわち結核性髄膜炎 tuberculous meningitis (TBM) は主としてヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の中枢神経系への感染により生じ、結核の最も重篤な病態の一つとされる。その死亡率はいまだ約30%と高率であり、さらに重篤な合併症・後遺症を残す場合が23%の患者に認められる<sup>3)</sup>。TBMは亜急性の経過を取る髄膜炎の代表的なものであり、治療を開始するまでの時間が直接予後に大きく影響する、内科的緊急疾患の一つとされる。しかし、TBMは初期には髄液所見が典型的でないことも多く、従来の“Gold standard”である髄液の塗抹・培養による結核菌の検出は、その検出率が20～30%程度と低く、加えて結核菌の培養には4～8週と時間を要することから、現

在でもTBMの診断は依然として困難である場合が多い<sup>4,5)</sup>。したがって実地臨床の場では、従来の細菌学的手法に替わるTBMの迅速かつ確実な新しい診断法が期待されている。近年、polymerase chain reaction(PCR)法をはじめとする各種の結核菌の核酸増幅法が、髄液を用いた簡便で迅速な検査法として臨床応用されている<sup>6-12)</sup>。現在、これらの核酸増幅法の一部は保険適用を受け、商業的展開により急速に普及している<sup>6-12)</sup>。しかし、その陽性率は施設や測定方法により一定しておらず、検出感度の向上を図るべく多くの施設で様々な取り組みが成されている。本稿ではTBMに対する迅速・高感度診断法について、核酸増幅法の進歩と展開をPCR法を中心に概説する。

## A. 結核菌の核酸増幅法

結核菌の核酸増幅法とは、喀痰や髄液等の臨床検体から結核菌群のDNAあるいはRNAを抽出・増幅して結核菌の存在を証明する検査法のことであり、前者の代表がPCR法である。また、現行の核酸増幅法の中には、検査キットや全自動化測定システムとして商業ベースで大規模に展開されているものもある<sup>6-12)</sup>。ここでは、PCR法の原理を中心に、その最近の発展について概説する。

### 1. PCR法の原理

PCR法の原理の概略を図1Aに示す。2本鎖DNAは水溶液中で高温になると変性し、1本鎖DNAに分かれる。変性により1本鎖となったDNAを含む溶液を冷却すると、相補的なDNA鎖が互いに結合し再び2本鎖となる(アニーリング)。PCR法では、増幅対象となる鋳型DNA、DNAポリメラーゼ、およびプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドを予め混合し、前述の変性とアニーリングを反復して行う。すなわち、鋳型

となる1本鎖DNAへプライマーがアニーリングし、その部位を起点にDNAポリメラーゼが作用して鋳型と相補的な2本鎖DNAが合成される。この温度差を利用した、変性・アニーリング・2本鎖DNA合成の工程を1サイクルとし、これをn回(通常20~30回)繰り返すことで、対象となるDNA断片を指数関数的(2のn乗)に増幅し得る。その際、Taq<sup>®</sup>ポリメラーゼなどの好熱菌の耐熱性DNAポリメラーゼの使用により、高温の変性を反復しても連続反応が可能となる。増幅したDNA断片をアガロースゲルで電気泳動し、その分子量に応じて分離する。その後、臭化エチジウムを溶解した核酸染色溶液にゲルを浸漬する。臭化エチジウムで染色されたDNA断片は紫外線を照射すると蛍光を発するので、その存在が確認できる。

### 2. PCR法の発展

#### a. Nested PCR法

Nested PCR法は、外側と内側の2組のプライマーペアを使用して、2段階のPCRを連続して行う手法である(図1B)。すなわち、目的とするDNA領域に設定した外側のプライマーペアで第1段階のPCRを行う。次いで第1段階のPCR産物を鋳型として、内側のプライマーペアで第2段階のPCRを行う。その後、前述のごとく電気泳動を行い、目的とするDNA断片の増幅を確認する。

「Nested」の名前の由来は、外側と内側のプライマーペアにより、DNAの増幅が「入れ子式の箱」のように内向きに重ねて行われるためとされる。そもそもPCR法は、プライマーペアの特異性に基き目的とするDNA断片を増幅する手法である。しかし、時にプライマーの類似配列によりミスアニーリングが生じ、目的とするDNA断片の増幅以外に非特異的な増幅が起こる場合がある。このような非特異的断片を含むPCR産物を鋳型

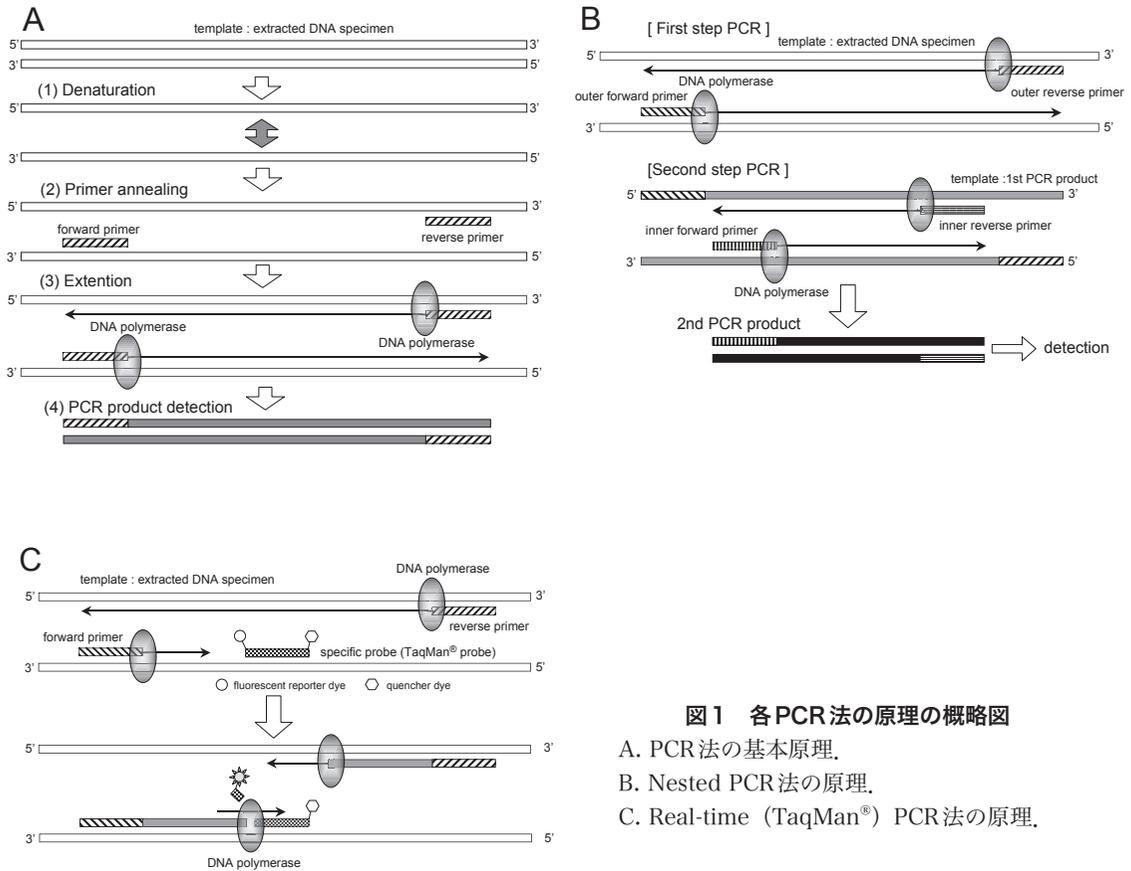


図1 各PCR法の原理の概略図

- A. PCR法の基本原理.
- B. Nested PCR法の原理.
- C. Real-time (TaqMan<sup>®</sup>) PCR法の原理.

にして第2段階のPCRを行うと、第2プライマーに類似した配列が非特異的断片中に存在する確率は極めて低くなるため、非特異的断片は増幅されず、目的とするDNA断片のみを増幅させることができる。Nested PCR法は2段階の増幅により、充分な量の目的とするDNA断片を得ることができるのに加え、非特異的断片の増幅を少なくし、標的配列に対する特異性を飛躍的に高める優れた手法と言える。

**b. Real-time (定量) PCR法**

Real-time PCR法は、PCRによるDNA断片の増幅過程を経時的 (real-time) に測定することで、その増幅率に基づき最初の鋳型DNAを定量する手法である。この定量は蛍光色素を用いて行われ、

2種類の方法がある。すなわち、2本鎖DNAに特異的に挿入 (インターカレート) して蛍光を発する色素 (SYBR green) を用いる方法と、増幅する塩基配列に特異的なオリゴDNAに、蛍光色素を結合させたプローブを用いる方法 (TaqMan<sup>®</sup>法) とである (図1C)。前者は全ての配列に対して同じ試薬 (SYBR green) を使用するので安価で汎用性も高いが、非特異的な2本鎖DNAも計測してしまう欠点がある。

一方、後者では、TaqMan<sup>®</sup>プローブが増幅領域内に相補的に結合する様に設定され、5'末端に蛍光レポーターが、3'末端にクエンチャー (励起エネルギー吸収剤) が結合している (図1C)。したがって、未反応の状態ではクエンチャーにより蛍光レポーターの励起は抑制されている。PCR

を開始し鋳型DNAが1本鎖化すると、プローブはプライマーと共にアニーリングする。DNAポリメラーゼがプライマーを起点として相補鎖の合成を開始し、それがプローブの結合部位に達するとDNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によりプローブは分解され、相補鎖はそのまま「上書き」される。プローブの分解により蛍光レポーターはクエンチャーと分離するので蛍光を発する(図1C)。PCRの進行と比例して蛍光レポーターの分離が起こるので、蛍光強度は正確に指数関数的に増加する。この蛍光強度をPCRの各サイクル毎に測定し、増幅率を算定することで鋳型DNAの最初の量を正確に定量することが可能となる。TaqMan<sup>®</sup>法は、増幅する塩基配列に特異的な蛍光オリゴプローブを用いるので、目的のDNA断片のみを正確に定量可能な極めて優れた手法である。

### 3. 商業ベースで展開されている核酸増幅法

#### a. PCR法を応用した検査法

現在、商業ベースで広く普及しているPCR法を応用した結核の検査法は2種類があり、何れも製造元はRoche Diagnostics社(Switzerland)である。

**1) Amplicor<sup>®</sup> Mycobacterium Tuberculosis Test (Amplicor<sup>®</sup>法):** 本検査法は、専用のキットで検体からDNAを抽出し、それを鋳型に結核菌DNAの16s rRNAのコード領域の配列に特異的なプライマーを用いて、PCR法により標的配列を増幅する。増幅した16s rRNAのコード領域の一部を、同部位に特異的なオリゴDNAプローブを用いてハイブリダイゼーション法により検出する。Cobas Amplicore<sup>™</sup>は本検査キットを用いた専用の全自動化測定システムである。

**2) Cobas<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> MTB (Cobas<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup>法):** 本検査法は上述のAmplicor<sup>®</sup>法キットの後継品である。前者と同様に結核菌DNAの16s rRNAのコード領域を標的とし、その一部をReal-time (TaqMan<sup>®</sup>) PCRにより増幅する。増幅した標的配列は、同部位に特異的なTaqMan<sup>®</sup>プローブを用いて各増幅サイクル毎にリアルタイムにモニターしつつ測定される。Cobas<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> 48は本検査キットを用いた専用の全自動化測定システムである。

#### b. RNAを増幅する手法: MTD法

##### (Gen-Probe<sup>®</sup> Amplified<sup>™</sup> Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) Test)

本検査法は、結核菌群の16S rRNAの単一温度転写増幅法と液相ハイブリダイゼーション法を組み合わせた手法であり、製造元はGen-Probe社(USA)である。単一温度転写増幅法とは、43°Cの一定温度下で逆転写酵素とRNAポリメラーゼが協奏的に作用し、逆転写反応と転写反応のサイクルが形成され、指数関数的に標的RNAを転写増幅する手法である。増幅した16S rRNAは配列特異的なオリゴプローブを用いてハイブリダイズし検出される。

上記3法は、何れも米国食品医薬品局(FDA)の認可を受けており、我が国でも保険適用(410点)となっている。何れの手法も、結核が疑われる症例から採取した呼吸器由来の検体(=喀痰)のうちで、抗酸菌塗抹陽性のもものでは95%以上の感度で検出するが、塗抹陰性のもものでは60~90%の感度とされる。これら3法の髄液検体での感度やTBMの診断への評価については後述する。

## B. PCR法による結核性髄膜炎の診断

PCR法を中心とした核酸増幅法によるTBM

の診断について、過去の報告を表1にまとめる<sup>6-42)</sup>。PCR法の長所は、反応に要する時間が数時間であり、電気泳動の時間も含めて、ほぼ1日以内に結果が得られる点である。PCR法を用いたTBMの診断で最も問題となるのは、その感度と特異度であるが、両者を同時に向上させるためには、検体である髄液からの結核菌DNAの抽出・精製と、それを特異的かつ効率的に増幅可能なプライマーの設定が最重要の課題となる。前述のごとく、PCR法の原理は比較的単純で、検体中に目的とするDNAが1コピーでも存在すれば、その増幅と検出が理論的には可能である。しかし、実際には検体中に一定量以上のDNAが含まれていないと検出は困難である。そもそも、髄液中に含まれる結核菌量は極めて少なく、それが従来の細菌学的手法による結核菌の検出とTBMの診断を困難にしている最大の理由である。したがって、髄液中の少量の結核菌体から如何に効率的にDNAを抽出し回収するかが、PCR法による検出の決め手となるため、これまで多くの研究者がこの問題に精力的に取り組んできた。1990年代にShankarら<sup>14)</sup>、Kanekoら<sup>13)</sup>、およびLinら<sup>20)</sup>により、髄液からの結核菌DNAの抽出・精製法の改良が相次いで報告された。それらによると、proteinase Kと界面活性剤としてsodium dodecyl sulfate (SDS) とを含む細胞溶解液で髄液を処理した後、フェノール/クロロホルム法でDNAを抽出し、エタノール沈殿で精製する手法が良好な成績を挙げている。我々は、従来の報告を参考にさらに改良を加え、エタノール沈殿時に共沈剤であるEthachinmate<sup>®</sup> (Nippon Gene: Japan) を加えることで、さらなる回収率の向上を図った。しかし、上記のような従来型の抽出・精製法は、手間と時間が掛かりすぎるとして、すでに汎用されているQIAmp Blood Kit<sup>®</sup>やQIAmp DNA Mini Kit<sup>®</sup> (QIAGEN, USA) などの市販のDNA抽出キットを使用した報告もあ

る<sup>35)</sup>。しかし、これらの抽出キットは髄液中の少量の結核菌DNAの抽出・精製には向いておらず、我々の検討でも、その成績は従来型に比べて不良であった。

現在、結核菌DNAに特異的な塩基配列として、IS6110, 65kDa antigen, 16S rRNA, MPT64の4領域が広く知られている(表1)<sup>6-42)</sup>。それらの中で、PCR法で最も汎用されているのはIS6110である<sup>15,16,18,19,21,22,24,25,28,34,36,37,39)</sup>。この領域は、反復挿入配列であることから増幅効率が良好で、過去の多数の研究にて概ね高い検出感度(70~98%)が報告されている。また、16S rRNAのコード領域は、前述のRoche社のAmpricor<sup>®</sup>法、ならびにCobas<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup>法の標的配列である。しかし、過去の報告にて、何れの手法も髄液からの結核菌DNAの検出成績は不良であった(18~60%)<sup>6,8,10)</sup>。その最大の理由は、Roche社のPCR検出キットは、何れも結核菌が比較的少量に含まれる喀痰検体からの検出を主たる目的としており、髄液検体からの少量の結核菌DNAの検出には適合しないためと考えられる。加えて、16S rRNA自体を検出するGen-Probe社のMTD testでは、その髄液検体に対する検査感度はRoche社のそれとほぼ同等であった<sup>7,9,11,12)</sup>。また、MTD testは多数の施設でその改良が試みられており、いずれも良好な感度と特異度を示したと報告されてはいるが、それらは各施設内での使用に止まっている。近年のメタ解析では、TBMの診断において、上述の商業ベースで普及している結核菌の核酸増幅法は、感度56%、特異度98%であり、特に感度の点でTBMの診断を確定するには不十分と評価されている<sup>10)</sup>。一方、MPT64は、結核菌に特異的なMPB64タンパクのコード領域で、結核菌ゲノム上に1カ所しか存在せず、特異性の点では最も優れている<sup>13,14,16,17,20,23,26,27,32,33,38,40,41)</sup>。Leeら<sup>16)</sup>は主要3領域を比較検討し、PCR法を用いたTBM

表1 Performance of PCR-based assays for the diagnosing TBM

Author	reported year	Assay Technique	Specimens and Cases	Sensitivity %	Specificity %	Reference
<b>Commercially available NAA assays</b>						
Bonington A, et al.	1998	Roche Amplicor PCR	83 CSF / 69 patients (40 TBM, 29 non-TBM) : South Africa	60	100	6
Lang AM, et al.	1998	Modified Gen-Probe MTD	84 CSF and children (24 TBM, 60 non-TBM) : Dominica	83	100	7
Bonington A, et al.	2000	Roche Cobas Amplicor PCR	83 CSF / 69 patients (40 TBM, 29 non-TBM) : South Africa	17.5	100	8
Chedore P, et al.	2002	Gen-Probe MTD	311 CSF : Canada	† 93.8	† 99.3	9
Pai M, et al.	2003	Review and Meta-Analysis	14 studies with commercial NAA assays	56	98	10
Thwaites GE, et al.	2004	Gen-Probe MTD	341 CSF / 152 patients (73 TBM, 79 non TBM) : Vietnam	38	99	11
Cloud JL, et al.	2004	Modified Gen-Probe MTD	27 CSF specimens spiked with <i>M. tuberculosis</i>	17~100	100	12
<b>Other PCR-based Assays</b>						
Kaneko K, et al.	1990	MPT64 Single PCR	26 CSF and patients (6 TBM, 20 non-TBM) : Japan	83.3	100	13
Shanker P, et al.	1991	MPT64 Single PCR	85 CSF and patients (34 TBM, 51 non-TBM) : India	65	88	14
Donald PR, et al.	1993	IS6110 Single PCR	43 CSF / 20 TBM children : South Africa	80	-	15
Lee BW, et al.	1994	IS6110 / 65kDa antigen / MPT64 Single PCR	27 CSF and patients (6 TBM, 21 non-TBM) : Singapore	100 / 83 / 83	38 / 67 / 90	16
Liu PY, et al.	1994	MPT64 Nested PCR	100 CSF and patients (21 TBM, 79 non-TBM) : Taiwan	90	100	17
Folgueira L, et al.	1994	IS6110 Single PCR	25 AIDS patients (11 TBM, 14 non-TBM) : Spain	82	100	18
Scarpellini P, et al.	1995	IS6110 Nested PCR	68 CSF / 36 AIDS patients (12 TBM, 24 non-TBM) : Italy	100	100	19
Lin JJ, et al.	1995	MPT64 Single PCR	47 CSF / 45 patients (18 TBM, 27 non-TBM) : Taiwan	70	100	20
Kox LF, et al.	1995	IS6110 Single PCR	42 patients (24 TBM, 18 non-TBM) : The Netherlands	48	100	21
Nguyen L, et al.	1996	IS6110 Single PCR	136 TBM patients : Vietnam	32	100	22
Seth P, et al.	1996	MPT64 Single PCR	89 CSF and patients (40 TBM, 49 non-TBM) : India	85	94	23
Wei CY, et al.	1999	IS6110 / 65kDa antigen / MTP40 multiplex Nested PCR	11 CSF and patients (5 TBM, 6 non-TBM) : China	60	66	24
Caws M, et al.	2000	IS6110 Nested PCR	131 TBM patients : United Kingdom	† 75	† 94	25

Author	reported year	Assay Technique	Specimens and Cases	Sensitivity %	Specificity %	Reference
Martins LC, et al.	2000	MPT64 Nested PCR	73 specimens (30 PF, 26 PB, 17 CSF) : Brazil	† 70	† 88	26
Brienza VM, et al.	2001	MPT64 Nested PCR	91 patients (41 TBM, 50 non-TBM) : Brazil	53	100	27
Narayanan S, et al.	2001	IS6110 / TRC4 Single PCR	96 CSF and patients (67 TBM, 29 non-TBM) : India	80.5 / 91	79 / 76	28
Desai MM, et al.	2002	pKS10 Single PCR	120 CSF and patients (105 TBM, 15 non-TBM) : India	31	100	29
Rafi A, et al.	2003	Single PCR (target not available)	36 CSF and patients (29 TBM, 6 non-TBM) : Iran	86.2	100	30
Kulkarni SP, et al.	2005	38 kDa protein Single PCR	60 CSF and patients (30 TBM, 30 non-TBM) : India	90	100	31
Takahashi T, et al.	2005	MPT64 Nested PCR	29 CSF and patients (9 TBM, 20 non-TBM) : Japan	100	100	32
Takahashi T, et al.	2006	MPT64 QNRT-PCR	29 CSF and patients (9 TBM, 20 non-TBM) : Japan	100	100	33
Quan C, et al.	2006	IS6110 Single PCR	74 CSF and patients (25 TBM, 49 non-TBM) : China	75	93.7	34
Desai D, et al.	2006	Single PCR (target not available)	57 CSF and patients (30 TBM, 27 non-TBM) : India	66.7	100	35
Rafi W, et al.	2007	IS6110 Single PCR, MPT64 / 65kDa antigen Nested PCR	176 CSF and patients (75 TBM, 101 non-TBM) : India	98 / 91 / 51	100 / 91 / 92	36
Rafi W, et al.	2007	IS6110 uniplex (Single) PCR	945 CSF and patients (677 TBM, 268 non-TBM) : India	76.4	89.2	37
Takahashi T, et al.	2007	MPT64 QNRT-PCR	63 CSF / 28 patients (8 TBM, 20 non-TBM) : Japan	55.8	100	38
Deshpande PS, et al.	2007	IS6110 Single PCR	80 CSF and patients (51 TBM, 29 non-TBM) : India	91.4	75.9	39
Takahashi T, et al.	2008	MPT64 WR-QNRT-PCR	96 CSF / 53 patients (24 TBM, 29 non-TBM) : Japan	95.8	100	41
Haldar S, et al.	2009	devR qRT-PCR	167 CSF and patients (81 TBM, 86 non-TBM) : India	87.6	92	42

NAA : nucleic acid amplification, CSF : cerebrospinal fluid, PF : pleural fluids, PB : pleural biopsies,

QNRT-PCR : quantitative nested real-time PCR,

WR-QNRT-PCR : wide range quantitative nested real-time PCR, pRT-PCR : quantitative real-time PCR,

† : Results versus culture as gold standard

の迅速診断においてMPT64が感度と特異度で最も優れた標的配列であると報告している。

上述のごとく、PCR法によるTBMの診断精度の向上を図るため、これまで様々な改良が行われてきた<sup>13-42)</sup>。しかし、それらを上回る感度・特異度の飛躍的向上をもたらす画期的な手法とし

て、前述のNested PCR法の導入が挙げられる。Liuら<sup>17)</sup>は、臨床的にTBMが疑われた21症例から採取した髄液を対象に、MPT64を標的としてNested PCR法を施行し、24時間以内に感度90%、特異度100%でTBMを診断し得たと報告している。しかもその際、従来の1段階のPCR

法 (Single PCR) はほとんど検出感度に達せず、したがって従来のSingle PCR法に比べて、Nested PCR法は感度が約1000倍も優れていると報告している<sup>17)</sup>。実際、我々はLiuら<sup>17)</sup>と同様にMPT64を標的にプライマーを設定し、臨床的に高度にTBMが疑われた自験9症例から採取した髄液に対してNested PCR法を施行したところ、その感度と特異度は共に100%であった<sup>32)</sup>。一方、培養とSingle PCR法の陽性はともに2症例のみであった(22.2%)<sup>32)</sup>。さらに、Nested PCR法の最小検出感度についても検討し、同法は精製した結核菌DNA 1-10コピー相当まで検出可能であり、従来のSingle PCR法に比べて1000～10,000倍高感度であった<sup>32)</sup>。また、抗結核薬治療とPCR法の感度との関連については、Linら<sup>20)</sup>がSingle PCR法で、Scarpelliniら<sup>19)</sup>がNested PCR法で検討している。特にScarpelliniら<sup>19)</sup>は、連続的に髄液を採取し得た7症例に対し、IS6110を標的として経時的にNested PCR法を行い、治療が奏効した4症例では経過中に同法が陰性化し、残る死亡した3症例では陽性のままであったことから、Nested PCR法は治療効果の判定にも有用であると報告している。我々も、抗結核薬治療中の7症例から経時的に採取し得た27髄液検体に対してNested PCR法を施行したところ、11検体で陽性(40.7%)であり、さらに、治療が奏効した6症例では、その臨床症状の改善と相関して同法の陰性化を認めた<sup>32)</sup>。以上のごとく、Nested PCR法は感度・特異性とにも優れ、従来の結核菌培養やSingle PCR法が陰性である症例に対してその威力を発揮するので、TBMの迅速診断に加え抗結核薬治療の効果判定にも有用であり、その優位性は明らかである。

以上より、実地臨床におけるNested PCR法の広汎な普及が期待される場所であるが、実際にTBMの診断目的に同法を施行可能な施設は本邦ではいまだ極めて少ないのが現状である。その大

きな理由として、同法が従来法に比べてはるかに鋭敏である反面、その手順が複雑であり、そのためにコンタミネーションが起りやすく、精度管理が困難である点が挙げられる。そこで我々は、徹底したコンタミネーションの防止に加えて、Nested PCR法の手順を可能な限り規格化・標準化し同法の改良を図った。そして、その成果を背景に国内の臨床検査企業への技術移転に成功した。すなわち、メデカジャパン・ラボラトリー社(現:保健科学 東日本)にて2007年5月から髄液に対する結核菌DNA (MPT64) のNested PCR法の受託検査が開始となった。TBMの診断を目的に臨床検査としてNested PCR法が商業ベースで展開されたのは、本件が本邦初で、かつ唯一の実施例である(ただし、保険適用は受けていない)。

### C. 結核性髄膜炎に対する迅速・高感度診断法の新規開発

Nested PCR法の導入がTBMの迅速診断と抗結核薬治療の効果判定に飛躍的な進歩をもたらしたことは前述の通りである<sup>32)</sup>。しかし、Nested PCR法は定性的検査法であり、定量性は有さない。近年、我々は、Nested PCR法の高感度とReal-time PCR法の定量性を組み合わせたQuantitative Nested Real-time (QNRT) PCR法を考案した<sup>33,38)</sup>。さらに、QNRT-PCR法を改良し、より安定的に正確で広汎な検出範囲を有する“Wide Range (WR)” QNRT-PCR法 (WR法) を新規に開発した<sup>40,41)</sup>。すなわち、WR法は基本的にNested PCR法の原理を応用し、その第2段階をReal-time PCR法に置き換えている<sup>40,41)</sup> (図2A)。

WR法で最も重要なのは、髄液検体からのDNAの抽出効率と、2段階のPCR増幅を定量的に評価し補正するための内部標準の開発である<sup>40)</sup>。我々は、まず、結核菌DNAのMPT64の

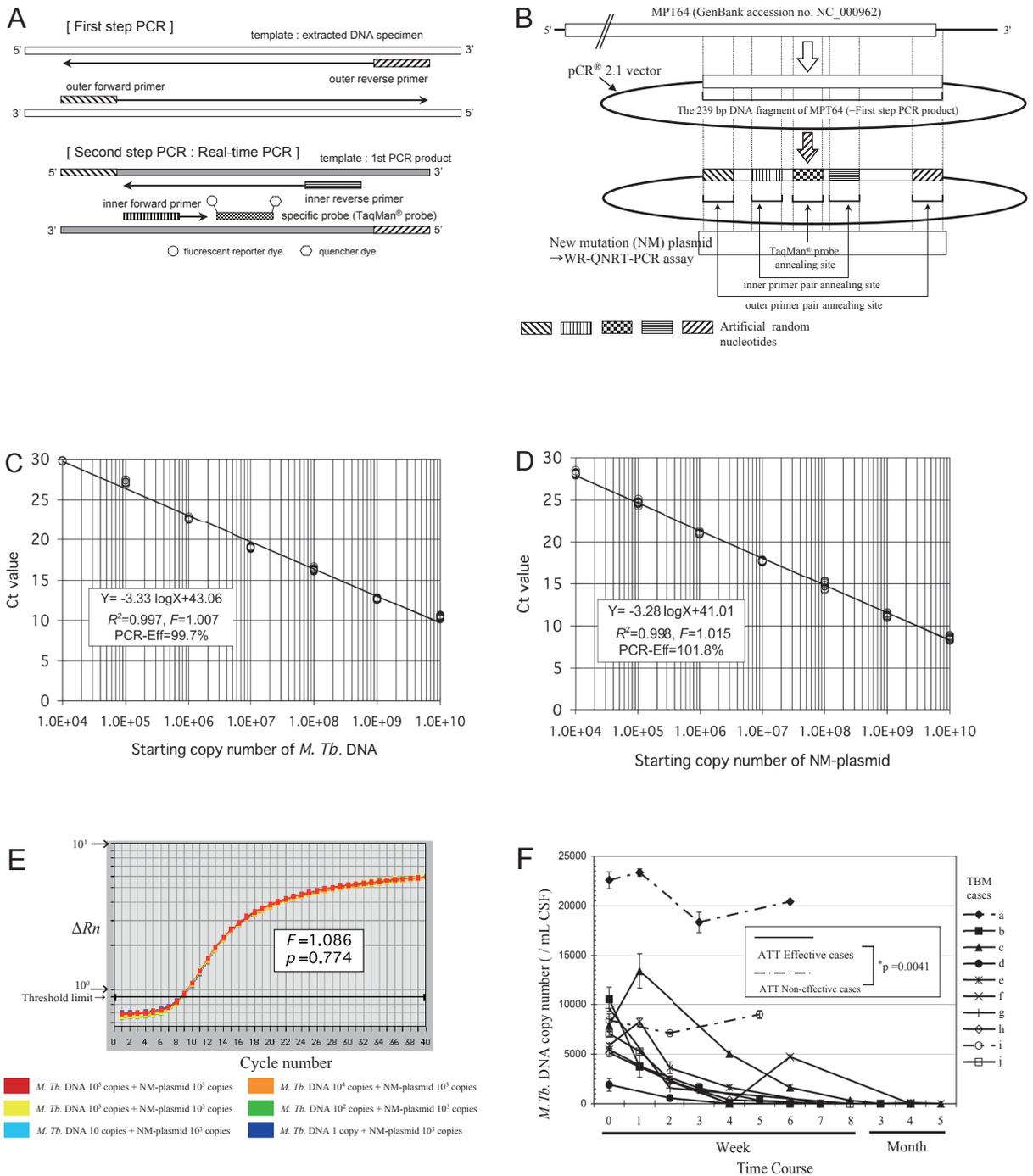


図2 Wide Range Quantitative Nested Real-time PCR (WR-QNRT-PCR) 法の原理と各データ

- A. WR-QNRT-PCR法の原理の概略図
- B. 内部標準: New Mutation プラスミドの概略図
- C. 結核菌DNA検出用の標準検量線
- D. 内部標準検出用の標準検量線
- E. 10<sup>3</sup>コピーに設定したNew Mutation プラスミドの増幅曲線
- F. TBM 10症例における結核菌DNAのコピー数の経時的変化とANOVAでの解析結果

配列の一部(239塩基対)をサブクローニングし(図2B), 次いで, このプラスミドを基に, 外側と内側のプライマーペアとTaqMan®プローブのアニーリング部位の計5カ所を, 全て人工的なランダム配列に置換したNew Mutation(NM)プラスミドを作成した<sup>40)</sup>(図2B). この5カ所の人工配列は, 何れもMPT64と互いに塩基数, 塩基組成は完全に同じであるが, 配列のみがランダムに異なるように設定されている<sup>40)</sup>. したがってMPT64とNMプラスミドに対する各プローブと2組のプライマーは, アニーリング効率が互いに等しいとみなすことができる<sup>40)</sup>. WR法では, 髄液検体中の結核菌DNAと内部標準(NMプラスミド)は同時に抽出され, アニーリング効率の等しいプライマーとTaqMan®プローブにより, 増幅・検出される. したがって, 理論上, 内部標準との増幅比から髄液検体中の結核菌DNAのコピー数を正確に算定することが可能である<sup>40)</sup>.

WR法では, 結核菌DNAと内部標準を定量的に検出するための2本の標準検量線が必要である<sup>40)</sup>. 結核菌DNA検出用の標準検量線では, その増幅効率は99.7%であり(図2C), 一方, 内部標準検出用のそれでは, 増幅効率は101.8%と(図2D), ほぼ一致し, その信頼性が十分に担保されている<sup>40)</sup>. さらに, 内部標準であるNMプラスミドを $10^3$ コピーに設定したところ,  $1 \sim 10^5$ コピー相当の結核菌DNAに対して, 統計学的に有意に均一な増幅を示した( $F=1,086$ )<sup>40)</sup>(図2E). 内部標準が結核菌DNAのコピー数に影響されず常に一定の値を取ることは, 安定的に正確で広汎な検出範囲を担保する上で極めて重要である<sup>40)</sup>.

我々は, 1998~2005年の間に, 自施設および他施設にて高度にTBMの疑われた24症例から採取した総計67髄液検体を対象にWR法を施行し, その有用性を検討した<sup>41)</sup>. この内の43髄液検体は自験10症例から抗結核薬治療中に経時的

に採取し得たものである. 24症例の入院時(治療前)に採取した髄液検体に対するWR法の成績は, 23例で陽性で, 感度95.8%, 特異度100%であった<sup>41)</sup>. また, その内の8症例は, 髄液の結核菌培養が陽性の診断確定例であったが, その全てでWR法も陽性であった. 加えて, 多変量ロジスティック回帰分析にて, WR法で算定した結核菌DNAのコピー数8000/ml髄液以上は, TBMの予後不良に対する独立した危険因子(OR=16.142, 95%CI=1.192-218.79, \* $p=0.0365$ )とみなしうることが示唆された<sup>41)</sup>. さらに, 抗結核薬治療中に10症例から採取した43髄液検体に対して, WR法は25検体で陽性(58.1%)を示した. その際, 同法で算定したコピー数は, 10症例の全てで著明な経時的変動を認め, かつその変動のパターンはANOVAにて抗結核薬治療の有効群と無効群の間で著明な有意差(\* $p=0.0041$ )を示しており(図2F), 治療効果の判定にも極めて有用であった<sup>41)</sup>.

## むすび

近年, 従来の細菌学的手法に替わり, TBMをより迅速かつ高感度に診断すべく様々な取り組みが成されてきた. 本稿ではそれらについて, 特に核酸増幅法の進歩と展開をPCR法を中心に概説した. その中でも, Nested PCR法の導入がTBMの診断に飛躍的な進歩と改善をもたらした点は特筆に値する. 現在, Nested PCR法の高感度とReal-time PCR法の定量性を組み合わせた, 新しいTBMの迅速・高感度診断法(WR-QNRT-PCR法)が報告されてはいるが, いまだ一般には普及していない. 定量性を加味した高感度検査法は, TBMの迅速かつ正確な診断のみならず, 予後の予測や抗結核薬治療の効果判定に対しても有用であり, 今後の実地臨床における普及が期待される.

## 文献

- 1) 結核病類別死亡数および死亡率の年次推移. 結核の統計2007追加資料2007年. 財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター (<http://jata.or.jp/rit/ekigaku/>)
- 2) WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007, WHO/HTM/TB/2007.376 ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2007.
- 3) 松島敏春. 結核性髄膜炎. 結核. 1985; 60: 88-91.
- 4) 穂積昭則, 平田幸一. 結核性髄膜炎と頭蓋内結核種-髄液所見と臨床特徴-. 神経内科. 1998; 48: 411-5.
- 5) 高橋輝行, 小川克彦, 澤田滋正, 他. Isoniazid (INH) 髄注にて著明な改善をみとめた難治性結核性髄膜炎の1例. 臨床神経. 2003; 43: 20-5.
- 6) Bonington A, Strang JI, Klapper PE, et al. Use of Roche AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1251-4.
- 7) Lang AM, Feris-Iglesias J, Pena C, et al. Clinical evaluation of the Gen-Probe Amplified Direct Test for detection of Mycobacterium tuberculosis complex organisms in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1998; 36: 2191-4.
- 8) Bonington A, Strang JI, Klapper PE, et al. TB PCR in the early diagnosis of tuberculous meningitis: evaluation of the Roche semi-automated COBAS Amplicor MTB test with reference to the manual Amplicor MTB PCR test. Tuberc Lung Dis. 2000; 80: 191-6.
- 9) Chedore P, Jamieson FB. Rapid molecular diagnosis of tuberculous meningitis using the Gen-probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis direct test in a large Canadian public health laboratory. Int J Tuberc Lung Dis. 2002; 6: 913-9.
- 10) Pai M, Flores LL, Pai N, et al. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2003; 3: 633-43.
- 11) Thwaites GE, Caws M, Chau TT, et al. Comparison of conventional bacteriology with nucleic acid amplification (amplified mycobacterium direct test) for diagnosis of tuberculous meningitis before and after inception of antituberculosis chemotherapy. J Clin Microbiol. 2004; 42: 996-1002.
- 12) Cloud JL, Shutt C, Aldous W, et al. Evaluation of a modified gen-probe amplified direct test for detection of Mycobacterium tuberculosis complex organisms in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 2004; 42: 5341-4.
- 13) Kaneko K, Onodera O, Miyatake T, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction (PCR). Neurology. 1990; 40: 1617-8.
- 14) Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Lancet. 1991; 337: 5-7.
- 15) Donald PR, Victor TC, Jordaan AM, et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculous meningitis. Scand J Infect Dis. 1993; 25: 613-7.
- 16) Lee BW, Tan JA, Wong SC, et al. DNA amplification by the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Comparison of protocols involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, 65 kDa antigen, and MPB64. J Neurol Sci. 1994; 12: 173-9.
- 17) Liu PY, Shi ZY, Lau YJ, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a simplified nested amplification protocol. Neurology. 1994; 44: 1161-4.
- 18) Folgueira L, Delgado R, Palenque E, et al. Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis in AIDS patients. Neurology. 1994; 44: 1336-8.
- 19) Scarpellini P, Racca S, Cinque P, et al. Nested polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring treatment response in AIDS patients with tuberculous meningitis. AIDS. 1995; 9: 895-900.
- 20) Lin JJ, Harn HJ, Hsu YD, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. J Neurol. 1995; 242: 147-52.
- 21) Kox LF, Kuijper S, Kolk AH. Early diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Neurology. 1995; 45: 2228-32.
- 22) Nguyen LN, Kox LF, Pham LD, et al. The potential contribution of the polymerase chain reaction to the diagnosis of tuberculous me-

- ningitis. *Arch Neurol.* 1996; 53: 771-6.
- 23) Seth P, Ahuja GK, Bhanu NV, et al. Evaluation of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of clinically suspected tuberculous meningitis. *Tuber Lung Dis.* 1996; 77: 353-7.
- 24) Wei CY, Lee CN, Chu CH, et al. Determination of the sensitivity and specificity of PCR assays using different target dnas for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Kaohsiung J Med Sci.* 1999; 15: 396-405.
- 25) Caws M, Wilson SM, Clough C, et al. Role of IS6110-targeted PCR, culture, biochemical, clinical, and immunological criteria for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3150-5.
- 26) Martins LC, Paschoal IA, Von No-wakonski A, et al. Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33: 253-7.
- 27) Brienze VM, Tonon AP, Pereira FJ, et al. Low sensitivity of polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculous meningitis in south-eastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34: 389-93.
- 28) Narayanan S, Parandaman V, Narayanan PR, et al. Evaluation of PCR using TRC(4) and IS6110 primers in detection of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2006-8.
- 29) Desai MM, Pal RB. Polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *Indian J Med Sci.* 2002; 56: 546-52.
- 30) Rafi A, Naghily B. Efficiency of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculous meningitis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2003; 34: 357-60.
- 31) Kulkarni SP, Jaleel MA, Kadival GV. Evaluation of an in-house-developed PCR for the diagnosis of tuberculous meningitis in Indian children. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 369-73.
- 32) Takahashi T, Nakayama T, Tamura M, et al. Nested polymerase chain reaction for assessing the clinical course of tuberculous meningitis. *Neurology.* 2005; 64: 1789-93.
- 33) Takahashi T, Nakayama T. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 1029-39.
- 34) Quan C, Lu CZ, Qiao J, et al. Comparative evaluation of early diagnosis of tuberculous meningitis by different assays. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 3160-66.
- 35) Desai D, Nataraj G, Kulkarni S, et al. Utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculous meningitis. *Res Microbiol.* 2006; 157: 967-70.
- 36) Rafi W, Venkataswamy MM, Ravi V, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis: a comparative evaluation of in-house PCR assays involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, MPB-64 and 65 kDa antigen. *J Neurol Sci.* 2007; 252: 163-8
- 37) Rafi W, Venkataswamy MM, Nagarathna S, et al. Role of IS6110 uniplex PCR in the diagnosis of tuberculous meningitis: experience at a tertiary neurocentre. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11: 209-14.
- 38) Takahashi T, Tamura M, Takahashi SN, et al. Quantitative nested real-time PCR assay for assessing the clinical course of tuberculous meningitis. *J Neurol Sci.* 2007; 255: 69-76.
- 39) Deshpande PS, Kashyap RS, Ramteke SS, et al. Evaluation of the IS6110 PCR assay for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2007; 4: 10.
- 40) Takahashi T, Tamura M, Asami Y, et al. Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA: development and methodology. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 1708-15.
- 41) Takahashi T, Tamura M, Asami Y, et al. Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA: clinical application for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 1698-707.
- 42) Haldar S, Sharma N, Gupta VK, et al. Efficient diagnosis of tuberculous meningitis by detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in cerebrospinal fluid filtrates using PCR. *J Med Microbiol.* 2009; 58: 616-24.