

＜シンポジウム(3)-8-2＞中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩

結核性髄膜炎の遺伝子診断：PCR法による診断の進歩と今後の展開

高橋 輝行¹⁾ 田村 正人¹⁾²⁾ 高須 俊明¹⁾²⁾ 亀井 聡²⁾

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。近年、従来法に替わる新しい診断的検査法として、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法が臨床応用されており、中でも、Nested PCR法の導入がTBMの診断に画期的な成果を挙げている点の特筆に値する。さらに、定量性を加味した新しい高感度診断法として、Wide Range Quantitative Nested Real-time PCR法が開発され、今後の実地臨床での普及が期待されている。

(臨床神経 2013;53:1187-1190)

Key words：結核性髄膜炎、髄液、polymerase chain reaction (PCR)、Nested PCR、Wide Range Quantitative Nested Real-time (WR-QNRT) PCR

はじめに

中枢神経系結核、すなわち結核性髄膜炎 (tuberculous meningitis; TBM) は、結核のもっとも重篤な病態の一つとされ、その死亡率は未だ約30%と高率であり、重篤な合併症・後遺症を残すばあひも約23%の患者にみとめられる¹⁾²⁾。しかし、TBMは初期には髄液所見が典型的でない事も多く、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20~30%程度と低く、加えて培養には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ばあひが多い¹⁾²⁾。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^{1)~10)}。近年、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法が、髄液をもちいた簡便で迅速な検査法として臨床応用されており³⁾⁴⁾、そ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⁵⁾。しかし、PCR法の陽性率は施設や測定方法により未だ一定しておらず、その精度の向上を図るべく、様々な取り組みが成されている^{2)~10)}。

TBMの診断へのNested PCR法の導入

PCR法をもちいたTBMの診断でもっとも問題となるのは、その感度と特異度であるが、その両者の飛躍的向上をもたらす画期的な手法として、近年、Nested PCR法が注目されている^{6)~8)}。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を連続しておこなう手法である (Fig. 1)。同法は2段階の増幅により、充分な量の目的

とするDNA断片をえ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すぐれた手法である^{2)6)~8)}。Liuらは、髄液を対象にNested PCR法を施行し、感度90%、特異度100%でTBMを診断しえたのに加え、同法は従来の1段階のPCR法 (Single PCR法) に比べて感度が約1,000倍もすぐれていると報告している⁶⁾。われわれも髄液を対象に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。さらに、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1,000~10,000倍高感度であった⁸⁾。Nested PCR法は感度・特異性共にすぐれ、従来の手法が陰性である症例に対してとくにその威力を発揮するので、TBMの迅速診断における優位性は明らかである。しかしながら、本邦における実際のTBMの診断で、Nested PCR法は未だほとんど普及していないのが現状である²⁾。その大きな理由として、同法の手順が複雑で、コンタミネーションがおこりやすい点が挙げられる。そこでわれわれは、徹底した精度管理によりこの問題を克服し、2005年にメデカジャパン・ラボラトリー社 (現:保健科学東日本社) への技術移転に成功した。臨床検査としてTBMの診断目的にNested PCR法が商業ベースで展開されたのは、本件が本邦初で唯一の実施例である。(ただし、保険適用は受けていない)

TBMに対する迅速・高感度診断法の新規開発

近年、従来のPCR法にはない定量性を有する、Real-time PCR法が臨床検査に応用されつつある。そこでわれわれは、Nested PCR法の高感度とReal-time PCR法の定量性を組み

¹⁾ 医療法人崇徳会長岡西病院神経内科 [〒940-2081 新潟県長岡市三ツ郷屋町371-1]

²⁾ 日本大学医学部神経内科

(受付日:2013年5月31日)

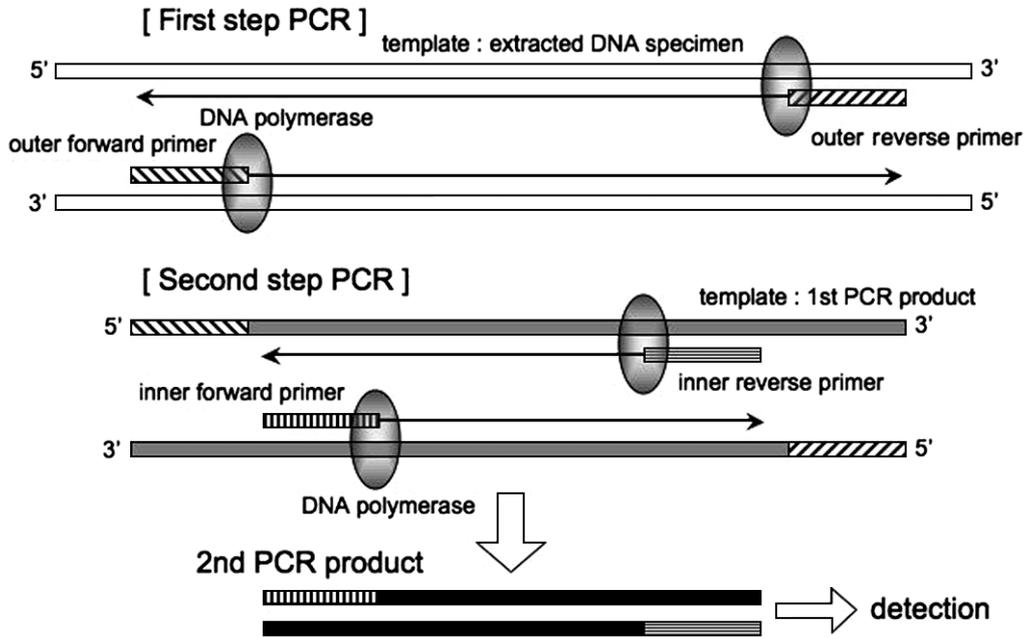


Fig. 1 Nested PCR 法の原理を示す概略図.

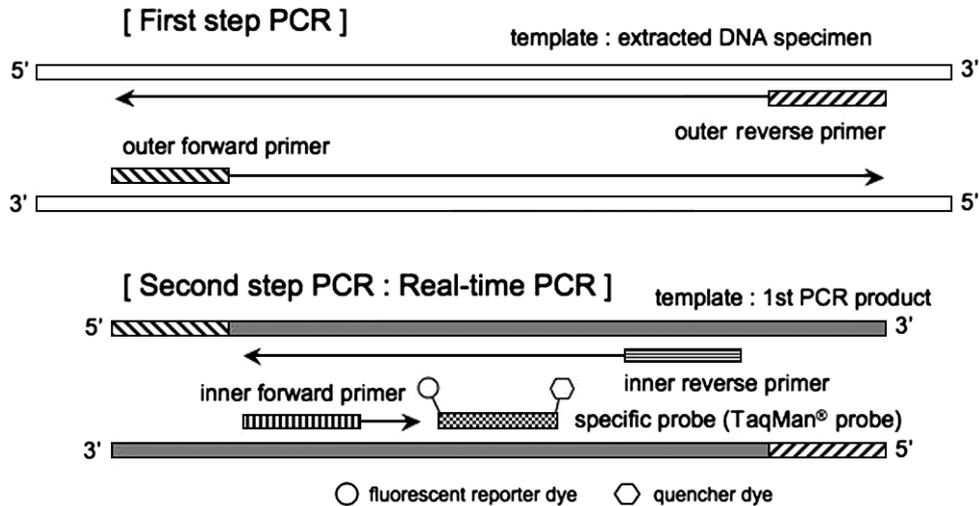


Fig. 2 WR-QNRT-PCR 法の原理を示す概略図.

合わせた画期的手法として、Wide Range Quantitative Nested Real-time PCR (WR-QNRT-PCR) 法 (WR 法) を新規に開発し、2012 年に特許を取得した (第 4989177 号)⁹⁾¹⁰⁾。同法は、基本的には 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 (Fig. 2)。この WR 法でもっとも重要なのは、髄液からの 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⁹⁾¹⁰⁾。われわれは、外側と内側の 2 組のプライマーと検出用プローブの結合部位の計 5 ヲ所を人工的なランダム配列に置換した “Mutation (M)” plasmid を内部標準として

独自に作製した。各人工配列は、結核菌の標的 DNA と配列はことなるが、塩基組成は同じに設定されている。したがって、内部標準 (M-plasmid) の増幅・検出効率は、標的である結核菌 DNA と同等と見なす事ができ、その増幅比から結核菌 DNA のコピー数の算定が可能となる⁹⁾¹⁰⁾。われわれは、臨床的に高度に TBM のうたがわれた 24 症例を対象に WR 法を施行し、感度 96.3%・特異度 100%のきわめてすぐれた成績をえた¹⁰⁾。また、WR 法で算定した髄液中の結核菌 DNA 8,000 コピー /ml 以上は、多変量ロジスティック回帰分析にて、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, * $p = 0.0365$) と見なしえる事が示唆された¹⁰⁾。さらに、臨床経過中に連続して採取しえた髄液に対して WR 法を施行したところ、結核菌 DNA のコピー数はいずれも著明な経時的変動をみとめ、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、治療効果の判定にも有用であった¹⁰⁾。

結 語

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、PCR 法を中心に様々な取り組みが成されている。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、未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。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) 松島敏春. 結核性髄膜炎. 結核 1985;60:88-91.
- 2) 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;48:411-415.

- 3) Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Lancet 1991;337:5-7.
- 4) Kox LF, Kuijper S, Kolk AH. Early diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Neurology 1995;45:2228-2232.
- 5) 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. Tuber Lung Dis 2000; 80:191-196.
- 6) Liu PY, Shi ZY, Lau YJ, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a simplified nested amplification protocol. Neurology 1994;44:1161-1164.
- 7) 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.
- 8) Takahashi T, Nakayama T, Tamura M, et al. Nested polymerase chain reaction for assessing the clinical course of tuberculous meningitis. Neurology 2005;64:1789-1793.
- 9) 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;46:1708-1715.
- 10) 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;46:1698-1707.

Abstract**Current advancement of the PCR-based molecular diagnosis for tuberculous meningitis**

Teruyuki Takahashi, M.D.¹⁾, Masato Tamura, M.D.^{1,2)}, Toshiaki Takasu, M.D.^{1,2)} and Satoshi Kamei, M.D.²⁾

¹⁾Department of Neurology, Nagaoka-Nishi Hospital

²⁾Division of Neurology, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine

Central nervous system (CNS) tuberculosis, particularly tuberculous meningitis (TBM), is one of the severest forms of tuberculosis. At present, the diagnosis of CNS tuberculosis remains a complex issue because the most widely used conventional “gold standard” based on bacteriological detection methods, such as direct smear and culture identification, cannot rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis* (*M.Tb*) bacilli in CSF specimens with sufficient sensitivity in the acute phase of TBM. Recently, instead of the conventional “gold standard”, the various molecular-based methods, such as polymerase chain reaction (PCR) assay, has emerged as a promising new method for the diagnosis of TBM. Moreover, nested PCR assay has been reported as a key method that drastically increases the sensitivity and specificity of DNA amplification compared with conventional single-step PCR. Currently, a novel assay technique, which is internally controlled and combines the high sensitivity of nested PCR with the accurate quantification of real-time PCR, namely, Wide Range Quantitative Nested Real-time PCR (WR-QNRT-PCR) assay, has been developed. This novel assay technique is useful for the rapid diagnosis and the assessment of anti-tuberculosis treatment during clinical course of TBM. Therefore, in actual clinical practice, its wider use for diagnosis of TBM is expected in the future.

(Clin Neurol 2013;53:1187-1190)

Key words: tuberculous meningitis (TBM), cerebrospinal fluid (CSF), polymerase chain reaction (PCR), Nested PCR, Wide Range Quantitative Nested Real-time (WR-QNRT) PCR
