

近未来の結核菌検査

結核研究所

抗酸菌部長 御手洗 聡

はじめに

結核菌検査は結核の確定診断上必須であるが、細菌学的に結核菌が証明されるのは全症例の80%程度にすぎない。これは、塗抹検査、核酸増幅法検査、培養検査全てを合わせてその程度である。最も感度が高いのが培養検査（液体培養）であるが、結核菌の性質上陽性化までに長期間かかることが難点であり、さらに陰性確認にも一般に6～8週間を要するのが問題である。塗抹検査は迅速であるが感度が低く、核酸増幅法は高感度・高特異度で迅速であるが、そもそも喀痰という検体の質的安定性が担保できない検体を使用している点に問題がある。近未来の結核菌検査はこれらの難点を解決する方法へ進むと考えられ、いくつか有望な候補技術が出てきている。ここではごく近未来の結核菌検査について概説したい。

喀痰以外の検体による結核菌検査

喀痰は肺内情報のメッセンジャーとして重要な検体であるが、小児や高齢者、HIV感染者などで結核診断用検体としての価値が低下することが知られている。また努力性に質が変化する点も問題である。そこで最近では喀痰以外の検体による結核診断が進められている。

まず挙げられるのは血液である。血液による結核診断というInterferon-gamma release assay (IGRA) を考えがちであるが、これは血液中から結核菌抗原を直接検出するものであり、IGRAのように宿主の免疫反応を評価するものではない。Liu Cらは活動性の結核菌が分泌しているESAT-6やCFP-10などの特異蛋白を、特異抗体を結合したNanodiskで捕集・濃縮して質量分析装置(MALDI-TOF MS)で検出する方法を2017年に報告した(Liu C, et al. PNAS 2017)。Nanodiskとは、この場合porous discoidal silicon nanoparticlesを指しており、ナノベクターとして使用されるシリコン多孔体である。この論文ではESAT-6とCFP-10それぞれの検出限界は200pM及び50pMとされている。実際の患

者(HIV陰性)で試験したところ、感度92.6%、特異度100%(健常成人)とされている。Liu Cらは引き続き376名の臨床評価で感度88.3%、特異度95.8%と報告している(Liu C et al. Clin Chem 2018)。

次に最近注目されているのが尿検体である。侵襲無しに均質な検体が採取できる利点がある。結核菌の構成成分であるリポアラビノマンナン抗原を検出するキットが発売されており、世界保健機関(World Health Organization: WHO)が2015年にAlere Determine TB LAM Ag test (Abbot)を承認したが、CD4陽性細胞が100/ μ L以下の結核患者で感度56%、特異度90%であり、基本的にCD4陽性細胞数 \leq 200/ μ Lの患者に推奨されている(WHO consolidated guidelines 2020)。最近では鍍銀技術で高感度化したSILVAMP TB LAM (FujiFilm)が開発され、Alereのキットよりもおよそ30%高感度化されている(Broger T et al. Pros Med 2020)。HIV陰性の結核患者群でも感度53.2%、特異度98.2%と報告されており、HIV陽性・陰性にかかわらず診断に利用できる可能性が示されている(Broger T, et al. J Clin Invest 2020)。

さらに臨床上の有用性が示唆されているのが便検体である。WHOは先のconsolidated guidelinesでも便検体の使用を小児に於いて推奨している。基本的にはXpert MTB/RIFあるいはUltra (Cepheid, Sunnyvale, CA)を使用することが前提である。いくつかの前処理法が提唱されているが、確定したものはない(Kokuto H et al. Open Forum Infect Dis 2015, Banada PP et al. Pros One 2016)。國東らの報告では、成人での感度85.7%、特異度100%とされている。WHOのメタアナリシスデータでは小児での感度61%、特異度98%となっている(WHO consolidated guidelines 2020)。

培養検査の代用としての結核菌検査

抗酸菌検査の問題点は、迅速発育性抗酸菌を除いて、発育に時間がかかることである。WHOは多剤耐性結核患者の治療経過観察に培養検査を推奨しているが、日

本と異なり、発展途上国では全ての患者が培養検査にアクセスすることは難しい。また、培養陰性を確認するのに6～8週間を要するため、日本では退院の遅れの原因となる場合がある。この問題を解決するため、細菌学的バイオマーカーの開発が進んでいる。一つは先に示したリポアラビノマンナン抗原であり、治療効果に伴って喀痰中のリポアラビノマンナン抗原が急速に減少することを川崎らが報告している (Kawasaki M et al. Pros Med 2019)。また、阪下らは結核菌特異抗原であるMPT64を喀痰中から超高感度ELISA法で定量的に検出し、治療に伴って経時的に喀痰中のMPT64抗原が減少していくことを証明している (Sakashita et al. Int J Infect Dis 2020)。阪下らは細菌学的に証明された活動性肺結核53症例と肺結核以外で喀痰排出のある30症例を用いて、Proof of conceptスタディを実施している。診断時の感度・特異度はカットオフ値を0.007とした場合、83.0%と100%とされている。治療開始後は活動性肺結核患者の喀痰培養結果との比較になり、治療14日目では陽性尤度比を最大化するカットオフ値を、治療28日目では陰性尤度比を最小化するカットオフ値を設定している。各々の時点での感度・特異度は14日目で54.8%と89.5%、28日目で81.0%と72.4%であった。この方法をうまく利用すれば培養結果を迅速に予測することが可能であり、1日以内に結果を得ることができると報告されている。

薬剤感受性試験の代用としてのゲノム解析

結核菌の薬剤感受性試験は絶対濃度法、耐性比

法、比率法、最小発育阻止濃度測定法 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) などほぼ確立されている。これらは表現型感受性試験と呼ばれるもので、結核菌を薬剤含有培地中で培養し、発育の有無を評価することが基本である。最大の問題点は、結核菌の発育(一分裂あたり約18時間)が遅いため、時間がかかることである。標準的な小川培地による比率法感受性試験は最終判定までに4週間を要する。また、純粋な結核菌の培養産物を得る必要があるため、時に非結核性抗酸菌との分離ができず感受性試験自体が実施できないこともある。さらにこれらの検査は結核菌の培養が実施できることを前提としているため、発展途上国などでは一部の実施すら困難である。これらの問題を効率的に解決することを目的として、ゲノム情報の利用が進められている。実際にGlobal Laboratory Initiative (GLI) が2018年に示した耐性結核診断アルゴリズムの最初の試験はXpert MTB/RIFであり (GLI, GLI model TB diagnostic algorithms 2018), 続く検査はやはりPCRを基礎とするLine Probe Assay (LPA) 試験であり、フルオロキノロン耐性と注射剤耐性が遺伝子的に判定される。

WHOは本年2月に超多剤耐性結核 (Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: XDR-TB) の定義を変更し、1月から適用すると発表した (WHO 2021)。それによると従来イソニコチン酸ヒドラジド (Isoniazid: INH) 及びリファンピシン (Rifampicin: RFP) の両方に耐性を有するMultidrug-resistant *M.*

表1 世界保健機関が示す薬剤のグループ分類 (2019)

分類	薬剤
Group A	Levofloxacin or Moxifloxacin Bedaquiline Linezolid
Group B	Clofazimine Cycloserine or Terizidone
Group C	Ethambutol Delamanid Pyrazinamide Imipenem-cilastatin or Meropenem Amikacin (or Streptomycin) Ethionamide (or Prothionamide) p-Aminosalicylic acid

tuberculosis (MDR-TB)に加えて、少なくとも一つのフルオロキノロン薬及び少なくとも一つの二次注射薬 (Amikacin: AMK, Kanamycin: KM及びCapreomycin: CPM) に耐性を有していることとされていたXDR-TBの定義を、従来のMDR-TBに加えて、少なくとも一つのフルオロキノロン薬及びもう一つのグループA薬剤に耐性を有すること、と変更している。WHOによる薬剤のグループ分類は表1に示す通りである。つまりベダキリン, リネゾリド, モキシフロキサシンについても表現型感受性試験が要求されることになる。感受性試験自体がキット化されていないことから、発展途上国のみならず先進国でも対応に苦慮する事態である。

ゲノム解析を利用すれば、現在知られている耐性遺伝子変異を一度の解析で網羅的に抽出することが可能である。ただし現時点ではゲノム解析に比較的多量の遺伝子を必要とするため、培養株を使用せざるを得ない。これを解決するため、マルチプレックスPCRを基礎として複数の耐性標的遺伝子を同時に増幅し、これを次世代シーケンサーでディープシーケンスする方法が開発されている。FeuerriegelらはDeeplex-MycTB (Genoscreen, France) を使用して14種の薬剤を同時解析している (Feuerriegel S et al. Eur Respir J 2021)。被験検体数が少ないので正確な判断は困難であるが、日本国内でも一部の患者で研究的に使用し、迅速な耐性結核診断を新薬を含めて実現している (内部データ)。

おわりに

これまで結核菌検査上の制約となっていた「時間」や「検体採取」の問題が、新しい技術により次第に解決されつつある。しかしながら、全ては古典的技術の結果を基準とした相対的評価/検査法であり、古典的技術を失って良いことにはならない。むしろ古典的技術の高精度化が求められているのが現状と考えることが重要である。🍵

文献

- 1.Liu, C., Zhao, Z., Fan, J., Lyon, C. J., Wu, H.-J., Nedelkov, D., Zelazny, A. M., Olivier, K. N., Cazares, L. H., Holland, S. M., Graviss, E. A., & Hu, Y. (2017) . Quantification of circulating Mycobacterium tuberculosis antigen peptides allows rapid diagnosis of active disease and treatment monitoring. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114 (15) , 3969 LP – 3974. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621360114>
- 2.Liu, C., Lyon, C. J., Bu, Y., Deng, Z., Walters, E., Li, Y., Zhang, L., Hesselting, A. C., Graviss, E. A., & Hu, Y. (2018) . Clinical Evaluation of a Blood Assay to Diagnose Paucibacillary Tuberculosis via Bacterial Antigens. Clinical Chemistry, 64 (5) , 791–800. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.273698>
- 3.WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 4.Broger T, Nicol MP, Szekely R, Bjerrum S, Sossen B, Schtz C, Opintan JA, Johansen IS, Mitarai S, Chikamatsu K, Kerkhoff AD, Macé A, Ongarello S, Meintjes G, Denkinger CM, Schmacher SG. Diagnostic accuracy of a novel tuberculosis point-of-care urine lipoarabinomannan assay for people living with HIV : a meta-analysis of individual in- and outpatient data. PLoS Med 17 (5) : e1003113.
- 5.Broger T, Nicol M, Sigal G, Gotuzzo E, Zimmer AJ, Surtie S, Nakiche TC, Mantsoki A, Reipold E, Székely R, Tsionsky M, Heerden J, Plisova T, Chikamatsu K, Lowary TL, Pinter A, Mitarai S, Moreau E, Schumacher SG, Denkinger CM. Diagnostic accuracy of three urine lipoarabinomannan tuberculosis assays in HIV-negative outpatients. J Clin Invest 2020 Jul 21;140461. doi: 10.1172/JCI140461.
- 6.Kokuto H, Sasaki Y, Yoshimatsu S, Mizuno K, Yi L, Mitarai S. Detection of Mycobacterium tuberculosis (MTB) in fecal specimens from adults diagnosed with pulmonary tuberculosis using the Xpert MTB/Rifampicin test. Open Forum Infect Dis. 2015; 22; 2 (2) : ofv074.
- 7.Banada PP, Naidoo U, Deshpande S, Karim F, Flynn JL, O'Malley M, Jones M, Nanassy O, Jeena P, Alland D. 2016. A Novel Sample Processing Method for Rapid Detection of Tuberculosis in the Stool of Pediatric Patients Using the Xpert MTB/RIF Assay. PLoS One 11:e0151980.
- 8.Kawasaki M, Echiverri C, Raymond L, Cadena E, Reside E, Gler MT, et al. Lipoarabinomannan in sputum to detect bacterial load and treatment response in patients with pulmonary tuberculosis: Analytic validation and evaluation in two cohorts. PLoS Med 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002780>.
- 9.Sakashita K, Takeuchi R, Takeda K, Takamori M, Ito K, Igarashi Y, Hayashi E, Iguchi M, Ono M, Kashiwama T, Tachibana M, Miyakoshi J, Yano K, Sato Y, Yamamoto M, Murata K, Wada A, Chikamatsu K, Aono A, Takaki A, Nagai H, Ymane A, Kawashima M, Komatsu M, Nakaishi K, Watabe S, Mitarai S. Ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of MPT64 secretory antigen to evaluate Mycobacterium tuberculosis viability in sputum. Int J Infect Dis 2020 Apr 27. pii: S1201-9712 (20) 30275-7. doi: 10.1016/j.ijid.2020.04.059.
- 10.Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27-29 October 2020. Geneva: World Health Organization; 2021. CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 11.Feuerriegel, S., Kohl, T. A., Utpatel, C., Andres, S., Maurer, F. P., Heyckendorf, J., Jouet, A., Badalato, N., Foray, L., Kamara, R. F., Conteh, O. S., Supply, P., & Niemann, S. (2020) . Rapid genomic first- and second-line drug resistance prediction from clinical Mycobacterium tuberculosis specimens using Deeplex®-MycTB. European Respiratory Journal, 2001796. <https://doi.org/10.1183/13993003.01796-2020>