

原 著

ポリメラーゼ・チェイン・リアクション  
(PCR) 法による抗酸菌の検出

山崎 利雄 ・ 中村 玲子

国立予防衛生研究所細胞免疫部

受付 平成3年10月21日

## DETECTION OF MYCOBACTERIA BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Toshio YAMAZAKI\* and Reiko M. NAKAMURA

(Received for publication October 21, 1991)

The polymerase chain reaction (PCR) was used to detect mycobacterial DNA sequences in the cultured or the clinical specimens. Four oligonucleotide primers derived from the sequence of a gene coding 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* amplified DNA samples of all the 11 species of mycobacteria tested.

Serial dilution of *M. bovis* BCG showed that DNA extracted from only 12 bacilli was enough for the detection by PCR method. However, mycobacteria in sputum were detected by PCR when more than  $10^3$  bacilli were present. The PCR method may become a useful tool for the rapid diagnosis of mycobacterial infections.

**Key words** : Polymerase chain reaction (PCR), Sputum, Rapid detection of mycobacterial infection

**キーワードズ** : ポリメラーゼ鎖反応 (PCR). 喀痰, 抗酸菌の迅速検出

## 1. 緒 言

抗酸菌感染症の原因である結核菌は、分裂速度がきわめて遅く、鑑別同定には長期間を要しているのが現状である。そのため迅速な鑑別、同定法の開発が望まれている。1987年 Saiki らによって DNA ポリメラーゼ反応により、ある特定の DNA 領域だけを増幅し検出する Polymerase Chain Reaction (PCR) 法が発表され<sup>1)</sup>、この PCR 法を使って細菌の新しい迅速検出法が報告されるようになってきた<sup>2)-9)</sup>。臨床検体より抗酸菌の分離培養をせずに抗酸菌の DNA を抽出し、PCR

法によって抗酸菌の存在を証明し鑑別同定することができれば1~2日で診断が可能になる。しかし、抗酸菌は、細胞壁が強固であり、微量の抗酸菌を含む検体から効率よく DNA を抽出する方法を検討しなければならない。

そこでわれわれは、喀痰から直接 PCR 法によって抗酸菌、特に結核菌を検出することを目的として、まず、培養菌を用いて DNA の抽出方法を検討し、その後、喀痰材料から結核菌の検出を試みたので報告する。

## 2. 材料と方法

抗酸菌 : 当研究室保存菌をもちいた。*M. tuber-*

\*From the Department of Cellular Immunology, National Institute of Health, 10-35, Kamiosaki, 2-Chome, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

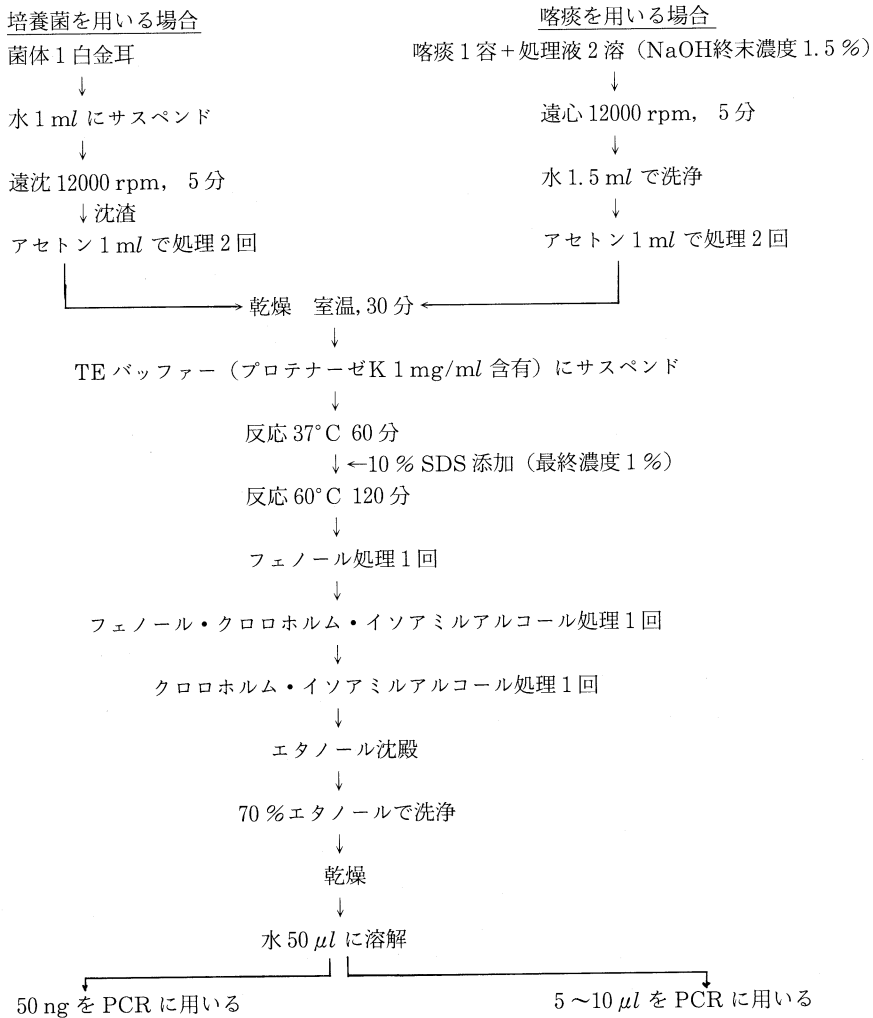


図1 DNA抽出法

*cloisis* H37Ra NIHJ1634 (ATCC25177), *M. tuberculosis* H37Rv NIHJ1633 (ATCC27294), *M. bovis* BCG-Japan NIHJ1608, *M. bovis* Ravenel NIHJ1607, *M. kansasii* NIHJ1619 (ATCC25414), *M. avium* NIHJ1605 (ATCC25291), *M. intracellulare* NIHJ1618 (ATCC15984), *M. scrofulaceum* NIHJ1626 (ATCC19981), *M. gordonae* NIHJ1617 (ATCC14470), *M. nonchromogenicum* NIHJ1622 (ATCC19530), *M. szulgai* NCTC10831, *M. xenopi* NIHJ1638 (ATCC19250), *M. fortuitum* NIHJ1615 (ATCC19542) の11菌種13株である。遅発育抗酸菌は、1%小川培地、37°C、2~3週培養菌を、速発育抗酸菌は、1%小川培地、3日培養菌を用いた。

喀痰材料：国立療養所東京病院、結核予防会複十字病院より提供された喀痰を用いた。喀痰を2倍量のアルカ

リ処理液 (NaOH 2.25%, クエン酸ナトリウム 1.45%, N-アセチル-L-システイン 0.5%) で処理し 37°C 30分間放置後、Tween 80 加変法培地 (NGTP 培地) と、3%小川培地にそれぞれ 0.1ml 接種し、その残り 1.5ml をエッペンドルフチューブにとり、12,000回転、5分間遠心分離し、沈渣を DNA 抽出用の材料とした。

DNA 抽出条件：DNA 抽出方法を図1に示した。培養菌を用いる場合は、1%小川培地上の菌塊を1白金耳とり、エッペンドルフチューブ内で滅菌精製水 1ml に懸濁し 12,000回転 5分間遠心分離、この沈渣にアセトンを加え脱脂を3回繰り返した後、沈渣をプロテナーゼ K (1mg/ml) を含む TE バッファー 300µl にサスペンドし 37°C 1時間反応させた。これに SDS を終末濃度 1% に添加、60°C 2時間反応させた後、エタノール沈殿、乾燥後、滅菌精製水 50µl に溶解した。およそ 50

表1 プライマーとプローブの塩基配列

名前	塩基配列	用途
YGP-1	5 GAGATCGAGCTGGAGGATCC 3	プライマー
YGP-2	5 AGCTGCAGCCCAAAGGTGTT 3	プライマー
383P/T	5 CGAAATCGCTGCGGTGGCCG 3	プローブ/ <i>M. tuberculosis</i>
YNP-1	5 CTAGGTCGGGACGGTGAGGCCAGG 3	プライマー
YNP-2	5 CATTGCGAAGTGATTCCTCCGGAT 3	プライマー
165P/T	5 AGCGTAAGTAGCGGGGTTGC CGTCACCCGGTGACCCCGT 3	プローブ/ <i>M. tuberculosis</i>

ng の DNA を PCR に用いた。喀痰を材料とする場合には、アルカリ処理した喀痰の約1.5ml を遠心し沈渣をアセトン処理して培養菌と同じ操作で DNA を抽出した。最後に滅菌精製水 50 $\mu$ l で再溶解させ、その5~10 $\mu$ l を PCR に用いた。

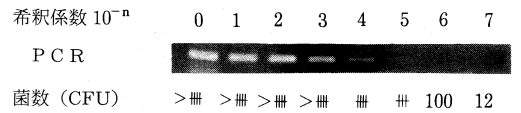
プライマー、プローブの合成：プライマー、プローブのシーケンスを表1に示す。いずれも Shinnick ら<sup>10)</sup> の結核菌の 65kDa 抗原をコードする遺伝子の塩基配列に基づき、Hance ら<sup>2)</sup> が作成した 383bp を増幅するプライマー (YGP-1, YGP-2 と命名) とそのプローブ (383 P/T と命名) を用いた。また、Pao ら<sup>3)</sup> の 165bp を増幅するプライマー (YNP-1, YNP-2 と命名)、そのプローブ (165 P/T と命名) を用いた。プライマー、プローブの合成は、株式会社種橋器械店 (東京) に依頼した。

PCR の条件：試薬類は、DNA Amplification Reagent Kit (PERKIN ELMER CETUS 社；宝酒造) のものを用いた。PCR 反応は、総量 50 $\mu$ l の系で行った。PCR 反応の条件は、初めに 94 $^{\circ}$ C, 5 分間加熱後、DNA 変性 94 $^{\circ}$ C 1 分, アニール 55 $^{\circ}$ C 1 分, DNA の合成 72 $^{\circ}$ C 1 分, 最後は、72 $^{\circ}$ C 10 分間で DNA の合成を行った。増幅回数は、培養菌では 30 回、喀痰材料では 40 回である。機械は、DNA サーマルシークエンサー (岩城硝子社 TSR-300 型) を使い、増幅反応物は、10 $\mu$ l を 1.5% アガロース電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により検出した。

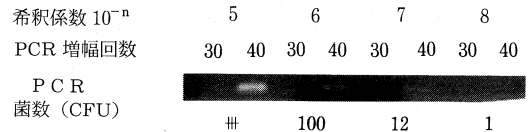
サザンハイブリダイゼーション：PCR 反応で増幅した DNA を電気泳動し、ナイロンメンブランにトランスファーした後、<sup>32</sup>P でラベルしたプローブ (表1に示す) とサザンハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィーにて検出した。

### 3. 結果

PCR の検出感度：1% 小川培地 3 週間培養の *M. bovis* BCG (日本株) を白金耳でかきとり、ホモジナイザーにてホモジナイズ後、滅菌精製水を加えて懸濁液とし日立分光光度計 (EPO-B 型, 540nm フィルター)



A. 増幅回数 30 回

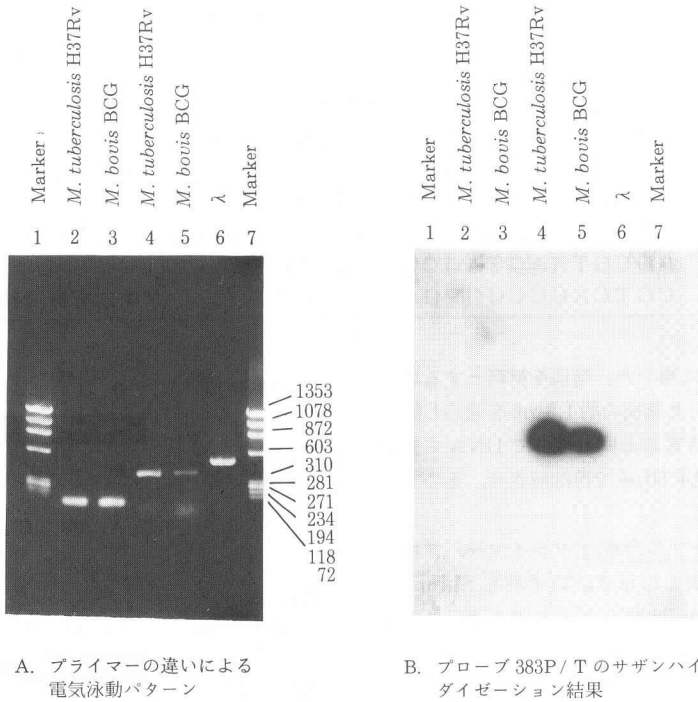


B. 増幅回数 30 回と 40 回の比較

図2 BCG の連続希釈による PCR 検出感度

にて O. D. 1.0 (菌数 1 × 10<sup>8</sup> cfu/ml) に調整した。この菌液を滅菌精製水で 10 倍段階希釈をし、各希釈段階より 1 ml をエペンドルフチューブにとり、図1に示した方法によって DNA を抽出した。各希釈段階の DNA を 50 $\mu$ l の滅菌精製水に溶解しその 5 $\mu$ l の DNA 溶液と、プライマー YGP-1, YGP-2 を用いて先に述べた条件で PCR を行い、検出感度を調べた。図2のAにみられるように増幅回数 30 回では、10<sup>-5</sup> 希釈液 (菌数は 10<sup>3</sup> cfu, 集落表示は #) まで、また図2のBにみられるように増幅回数 40 回では 10<sup>-7</sup> 希釈液 (菌数 12 cfu) まで、増幅された DNA のバンドが確認された。

プライマーによる増幅部の確認：*M. tuberculosis* H37Rv と、*M. bovis* BCG よりそれぞれ DNA を抽出し、プライマー YGP-1, YGP-2 および YNP-1, YNP-2 の 2 組のプライマーを用いて PCR を行った。対照として  $\lambda$ DNA (宝酒造キット) とプライマー #1, #2 (宝酒造キット) による PCR を行った。増幅された DNA の大きさは、図3のAに示すように *M. tuberculosis* H37Rv と、*M. bovis* BCG に関してはプライマー YNP-1, YNP-2 を用いた系では



A. プライマーの違いによる電気泳動パターン

B. プロープ 383P/T のサザンハイブリダイゼーション結果

図3 PCR 増幅産物の確認

165bp のバンドが、またプライマー YGP-1, YGP-2 を用いた系では 383bp のバンドが検出された。 $\lambda$ DNA とプライマー #1, #2 を用いた系では 500bp の大きさのバンドが検出された。

図3のAの写真撮影後の同じゲルより、増幅されたDNAをナイロンメンブランにトランスファーし、 $^{32}$ Pでラベルした結核菌プロープ 383 P/T<sup>3)</sup> を使ったサザンハイブリダイゼーションの結果を図3のBに示す。このプロープは YGP-1, YGP-2 には含まれた DNA シークエンスを検出する。プライマー YGP-1, YGP-2 を用いた 383bp のバンドはプロープ 383 P/T とハイブリダイズした。したがって、このバンドが結核菌の 65kDa 抗原遺伝子の一部であることが確認された。

各種抗酸菌 DNA とプライマー YGP-1, YGP-2 および YNP-1, YNP-2 を用いた PCR: 1% 小川培地, 37°C, 2~3 週間培養の各種抗酸菌より図1に示した方法によって DNA を抽出し、おのおの 50 ng の DNA とプライマー YGP-1, YGP-2 および YNP-1, YNP-2 を用いて PCR を行った。YGP-1, YGP-2 を用いるとテストしたすべての抗酸菌で結核菌と同じ 383bp のバンドの位置に検出された(図4-A)。YNP-1, YNP-2 を用いた場合は、結核菌群では、165bp のバンドが検出されたが、非定型抗酸菌では、菌種によっては、やや小さなサイズのバ

ンドが検出された(図4-B)。

喀痰材料より抽出した DNA の PCR と培養結果との比較: 喀痰 79 例から抽出した DNA についてプライマー YGP-1, YGP-2 および YNP-1, YNP-2 を用いて増幅回数 40 回の PCR を行い、反応液の 10  $\mu$ l (1/5 量) を 1.5% アガロースゲルで電気泳動した。PCR 結果と、3% 小川培地培養結果の比較を表2に示した。PCR 陽性は 70 例あり、そのうち培養陽性 61 例、培養陰性 9 例であった。PCR 陰性は 9 例あり、培養陽性 4 例、培養陰性 5 例であった。PCR 陰性で培養陽性であった 4 例の検出されたコロニー数は、それぞれ 1, 5, 10, 60 であった。PCR 陽性の材料は YGP-1, YGP-2 または、YNP-1, YNP-2 のどちらのプライマー・セットを用いた場合にもいずれもバンドが検出された。

塗抹検査結果と PCR 結果の比較: 塗抹検査の結果と PCR の結果を比べたものを表3に示す。YGP-1, YGP-2 および YNP-1, YNP-2 の 2 組のプライマーを用いて抗酸菌特異的バンドを検出した。ガフキー 0 号の喀痰は 15 例あり、PCR 法では 11 例にバンドが検出されたが、4 例は検出されなかった。またこれらの培養法による成績は、培養陽性が 7 例、培養陰性が 8 例であった。ガフキー 1 号の喀痰は、9 例中 5 例が PCR 法で陽性であったが、4 例は陰性であった。この 9 例は、

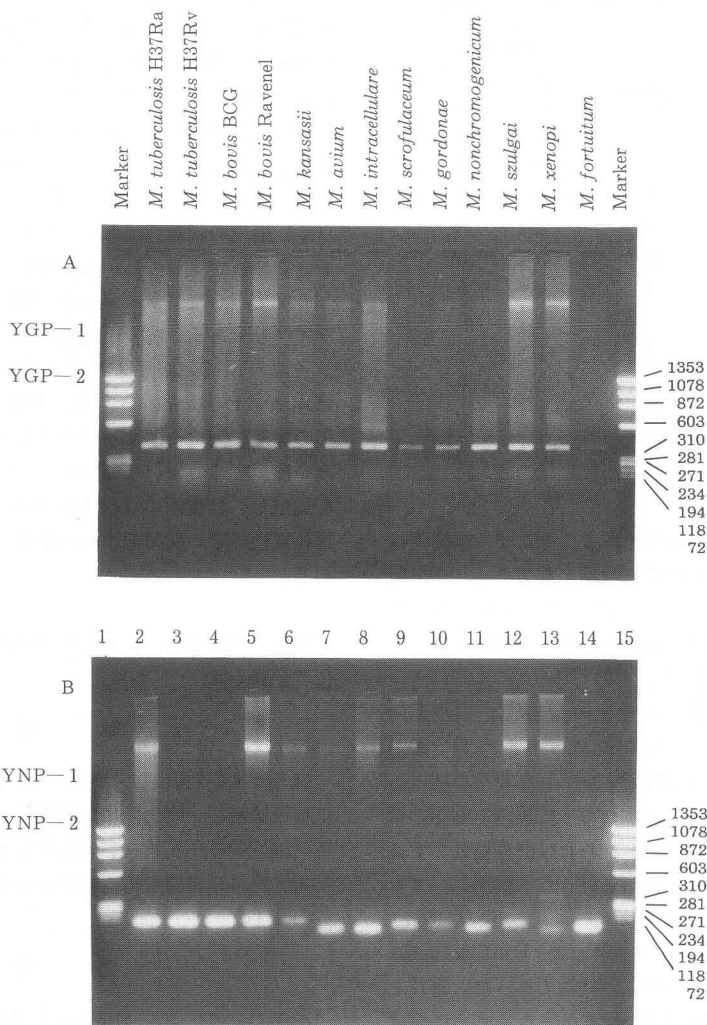


図4 抗酸菌 DNA と結核菌の 65 kDa 抗原遺伝子由来のプライマーを用いた PCR

表2 喀痰材料から抽出した DNA の PCR と培養の比較

	PCR (+)		PCR (-)	
	培養 (+)	培養 (-)	培養 (+)	培養 (-)
喀痰数	61	9	4	5
計	70		9	

培養法ではすべてが陽性であった。ガフキー 2 号の喀痰は 11 例あり、PCR 法で 10 例が陽性、1 例が陰性であった。培養法でも 10 例が陽性で 1 例が陰性であった。ガフキー 3 号以上の喀痰は 44 例テストしたが、PCR 陰性例は 1 例もなかった。

#### 4. 考 察

臨床においては結核菌が検出されて、はじめて結核の診断が確定する。しかし、現在の臨床検査の方法では結核菌の検出には時間がかかるので、結核の疑いのまま治

表3 塗抹検査のガフキー号数と PCR の結果

ガフキー号数	検体数	PCR	
		+	-
0	15	11	4
1	9	5	4
2	11	10	1
3	8	8	0
4	13	13	0
5	8	8	0
6	4	4	0
7	1	1	0
8	3	3	0
9	7	7	0
計	79	70	9

療が開始されているのが現状である。そこで、結核菌特異的 DNA の塩基配列だけを増幅するプライマーを用いて PCR 反応を行わせ、増幅された DNA のバンドが検出されれば、結核菌の検出を待たずに結核という確定診断を下すことができる。

PCR 法を用いた抗酸菌の検出の報告<sup>11)12)</sup> は最近増えてきたが、臨床材料より抽出した DNA を用いたものは少ない。これは、抗酸菌の DNA が非常に抽出しにくいことに一因があると思われる。抗酸菌の細胞壁は脂質成分に富んでいるので、われわれは酵素処理をする前に、アセトンで細胞壁の脱脂を行った。酵素は、プロテナーゼ K (1mg/ml)、リゾチーム (1mg/反応液) あるいはアクロモペプチダーゼ<sup>13)</sup> (250 Unit/反応液) を検討したがプロテナーゼ K が有効であった。また、SDS 処理は 60°C 2 時間が最もよかった。さらに温度を高くすることによってより迅速化が可能になるかを検討中である。

*M. bovis* BCG (日本株) の 10 倍段階希釈液より抽出した DNA の検出感度は、増幅回数 30 回では、菌数  $10^3$  cfu、40 回では、12 cfu までの菌が存在すると、383 bp のバンドを検出することができた。理論上、1 fg (菌 1 個) の DNA が存在すれば増幅された DNA のバンドが検出されるはずである<sup>8)14)15)</sup> が、増幅回数を 40 回以上に上げると、非特異的なバンドも出現してくる可能性も高くなるので、増幅回数は 40 回を限度とした。

喀痰材料では塗抹陽性培養陰性 (SPCN) の 2 例につき、PCR 法で抗酸菌の存在が検出できた。またガフキー 0 の検体 15 例中、11 例が PCR で陽性となった。これらの結果は PCR が診断法として優れていることを示している。ただし SPCN の場合、菌が死菌である可能性も考えられる。PCR では菌が死菌であっても陽性

となるので、菌の生死鑑別のために、培養法との併用が必要である。塗抹検査で菌が多数認められる検体では、最近報告された FDA 染色法<sup>16)</sup> との併用を行えばより迅速な診断が下せるであろう。一方、われわれの成績で PCR (-) 9 例中培養 (+) が 4 例あり、また、微量排菌例 (ガフキー 1, 2 号) 20 検体中 PCR (-) が 5 例あった。この不一致の原因の一つは、抗酸菌からの DNA 抽出の困難性にあると考えられる。DNA 抽出法をさらに検討することが必要である。

今回使用したプライマーは、抗酸菌を広く検出するプライマーである。菌の迅速同定のために菌種特異的なプライマーの開発が望まれる。すでに、永井ら<sup>9)</sup> は、19 kDa を、Sjöbring ら<sup>12)</sup> は、38 kDa をコードする遺伝子の塩基配列の一部よりプライマーを作って結核菌群のみを検出できるという報告をしている。われわれもこれを追試し、培養菌については同じ結果を得た。さらに菌種特異性の高い部分を増幅させるプライマーを検索中である。

本研究の要旨は、第 66 回日本結核病学会総会 (京都) にて発表した。

## 謝 辞

患者の喀痰を提供していただいた国立療養所東京病院、結核予防会複十字病院に感謝致します。国立予防衛生研究所細胞免疫部長竹森利忠先生および同部客員研究員高橋宏先生には貴重な御討論を頂きましたことを厚く感謝致します。

## 文 献

- 1) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. et al. : Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239 : 487-491, 1988.
- 2) Hance, A. J., Grandchamp, B., Levy-Frebault, V. et al. : Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA, *Mol Microbiol*, 3 : 843-849, 1989.
- 3) Pao, c. c., Benedict yen, t. s., Jinn-Bang You. et al. : Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification, *J Clin Microbiol*, 28 : 1877-1880, 1990.
- 4) 永井良三, 竹脇俊一, 和田昭仁 : 抗酸菌検出への応用, *実験医学*, 8 : 214~217, 1990.
- 5) Vary, P. H., Andersen, P. R., Green, E. et al. : Use of highly specific DNA probes and

- the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease, *J Clin Microbiol*, 28 : 933-937, 1990.
- 6) Wit, D. D., Steyn, I., Shoemaker, S. et al. : Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification, *J Clin Microbiol*, 28 : 2439-2441, 1990.
  - 7) Plikaytis, B. B., Gelber, R. H. and Shinnick, T. M. : Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay, *J Clin Microbiol*, 28 : 1913-1917, 1990.
  - 8) Thierry, D., Brisson-Noël, A., Nguyen, S. et al. : Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis, *J Clin Microbiol*, 28 : 2668-2673, 1990.
  - 9) 永井良三, 和田昭仁, 竹脇俊一 : 抗酸菌の迅速同定, ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) の応用, *臨床検査*, 34 : 429~431, 1990.
  - 10) Shinnick, T. M. : The 65-Kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Bacteriol*, 169 : 1080-1088, 1987.
  - 11) Hermans, P. W. M., Schuitema, A. R. J., Soolingen, D. V. et al. : Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol*, 28 : 1204-1213, 1990.
  - 12) Sjöbring, U., Mecklenburg, M., Andersen, A. B. et al. : Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol*, 28 : 2200-2204, 1990.
  - 13) Ezaki, T., Saidi, S. M., Liu, S-L. et al. : Rapid procedure to determine the DNA base composition from small amounts of Gram-positive bacteria, *FEMS Microbiol Lett*, 67 : 127-130, 1990.
  - 14) Eisenach, K. D., Cave, M. D., Bates, J. H. et al. : Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*, *J Infect Dis*, 161 : 977-981, 1990.
  - 15) Patel, R. J., Fries, J. W. U., Piessens, W. F. et al. : Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol*, 28 : 513-518, 1990.
  - 16) 木ノ本雅通・竹川真理子・中村玲子 : FDA/EB 染色法による結核菌の生死判別とコロニー形成能, *結核*, 66 : 485~488, 1991.