

原 著

PCR 法による *Mycobacterium intracellulare* の検出

山崎利雄・中村玲子

国立予防衛生研究所細菌部

受付 平成5年6月14日

DETECTION OF *MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE* BY PCR

Toshio YAMAZAKI* and Reiko M. NAKAMURA

(Received for publication June 14, 1993)

PCR products amplified with the primers YNP-1 and YNP-2 and template DNA from various mycobacterial species showed differences in molecular sizes. By sequencing the PCR products, we found that the DNA fragment from *M. tuberculosis* and that of *M. intracellulare* have different DNA sequences. The former was 164 bp, composed of 27 A, 54 C, 57 G, and 26 T, while the latter was 109 bp, composed of 22 A, 37 C, 34 G, and 16 T. We compared these sequences and selected a nucleotide sequence unique to *M. intracellulare* and used as primer YNP-7. Antisense primer, YNP-8, was constructed from the complementary sequence of YNP-2 which is located about 270 b downstream of YNP-7. Results of PCR using the primers YNP-7 and YNP-8 and template DNA of various mycobacteria showed that positive results were only with the template DNA from *M. intracellulare*. Bacterial DNA from those other than mycobacteria but appear in sputum were tested in PCR with the primers YNP-7 and YNP-8. None of them showed positive results. Specificity of the PCR products was determined with a specific probe MIP which was constructed using a sequence between YNP-7 and YNP-8 to confirm the specificity of PCR by Southern hybridization. Only the products from *M. intracellulare* hybridized with the probe MIP, indicating the specificity of YNP-7 and YNP-8 to *M. intracellulare*. The PCR product amplified with YNP-7 and YNP-8 was sequenced and it was found that this product is 271 bp in size, composed of 58 A, 87 C, 86 G, and 40 T. This study shows a possibility of species identification in mycobacteria by PCR.

Key words : PCR, Rapid diagnosis, Mycobacteria, *M. intracellulare*

キーワードズ : PCR, 迅速診断, 抗酸菌, *M. intracellulare*

* From the Department of Bacteriology, National Institute of Health, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162 Japan.

緒 言

抗酸菌症の確定診断には、病因菌の分離と同定が必要である。しかし、抗酸菌の発育は遅く現行の分離培養法^{1)~3)}では確定診断に4~8週間を必要とするので、患者を早期に発見し治療するために迅速な菌の検出、鑑別同定法の開発が望まれている⁴⁾。Polymerase chain reaction (PCR) 法⁵⁾はこの目的として有望な方法の1つである。われわれはすでに培養菌や喀痰よりPCR法を用いて、広く抗酸菌を検出できることを報告⁶⁾したが、さらにPCRにより菌種の同定も行うことを目的として研究を行っている。PCR法では、使用プライマーの菌種特異性が重要である⁷⁾。広く抗酸菌を、または結核菌群のみを検出するプライマーは、すでにかなりの数の報告^{8)~12)}があるが、非定型抗酸菌を検出するプライマーの報告は少ない^{13)~14)}。われわれは、新しいプライマーを作成することにより、PCRを用いて *M. intracellulare* を特異的に検出する方法を開発したので報告する。

材料と方法

使用菌：当研究室保存菌でレファレンス株である抗酸菌21菌種24株と、DNA-DNAハイブリダイゼーション^{15)~16)}法同定キット(極東製薬)により同定した臨床分離株を用い、*M. intracellulare*の一部は結核予防会結核研究所阿部千代治博士より恵与された株を用いた。1%小川培地に継代し、それぞれの菌の至適温度で、発育菌は3~5日間、遅発育菌は、2~3週間培養菌を用いてDNAを抽出した。*E. coli*, *Pseudomonas* は、L-ブローンスにて一晩培養後DNAを抽出した。*Bacillus*, *Mycoplasma*, *Staphylococcus* のDNAは、当研究所生物製剤管理部佐々木裕子技官より恵与された。

抗酸菌のDNA抽出法：培養菌または喀痰材料からのDNA抽出方法は、われわれがすでに報告した方法⁶⁾に従った。

プライマー：Paoらにより報告⁸⁾された Shinnickら¹⁷⁾の *M. tuberculosis* Erdman 株の65 kDa 抗原遺伝子の塩基配列91-254を増幅するプライマーは、広く抗酸菌を検出する。われわれは先に報告⁶⁾したように、

このプライマーを YNP-1, YNP-2として用いた。その塩基配列は、YNP-1が、5' CTAGGTCGG GACGGTGAGGCCAGG 3', YNP-2が、5' CATTGCGAAGTGATTCCTCCGGAT 3'である。*M. intracellulare*を検出するプライマーについては本文中に記載した。それぞれのプライマーの合成は、株式会社種橋器械店(東京)に依頼した。

PCR：PCRは、培養菌より抽出したDNA 50 ngを鋳型とし、総量50 μ lの系で行った。DNAサーマルシークエンサー(岩城硝子社, TSR-300型)を用い、初めに94°C 1分間加熱後、DNA変性94°C 1分間、アニーリング60°C 1分間、DNAの合成72°C 1.5分間を30サイクル行った後に、72°C 10分間DNAの合成を行った。PCR反応終了後10 μ lを2%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。

増幅DNA断片のシークエンス法：Sequenase Ver. 2.0 U.S. Biochemical社キット(TOYOBO)使用による、ジデオキシ法¹⁸⁾でPCR増幅に用いたプライマーにて直接シークエンスを行った。シークエンスの方法の詳細はすでに報告した¹⁹⁾。

サザンプロットハイブリダイゼーション：ECL 3'-オリゴラベリング・検出システム(アマシャム・ジャパン株式会社)(ECLキットと略す)を用いた。ECLキットを用いて標識したプローブMIP(本文中に記載)と、PCR増幅DNAとのハイブリダイゼーション温度は63°Cでおこない、洗浄はECLキットの指示に従ったが、温度は63°Cにてストリンジェンシーをコントロールした。

結 果

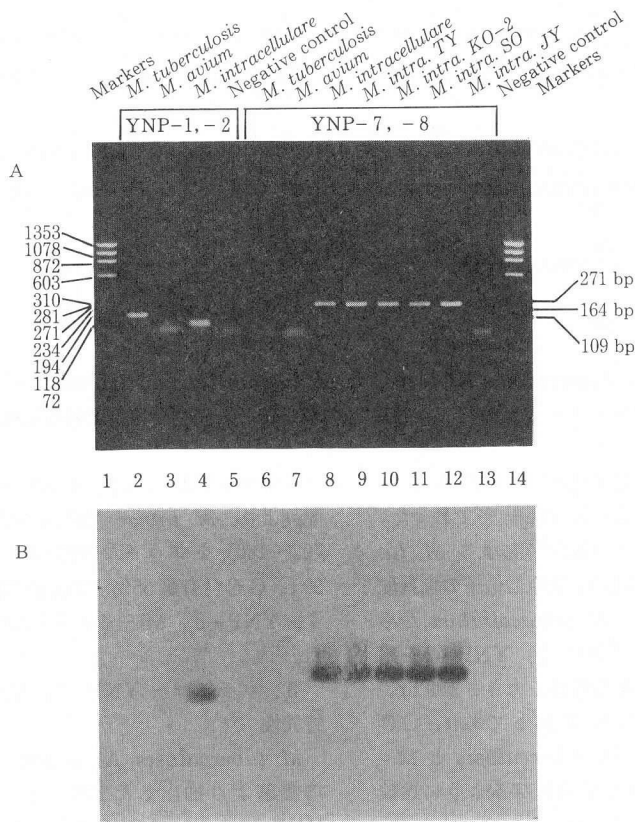
1. プライマー YNP-1, YNP-2により合成されるDNA断片の直接法による塩基配列の決定

M. tuberculosis NIHJ1633株と *M. intracellulare* NIHJ1618株の1%小川培地培養菌より抽出したDNA 50 ngを鋳型としてプライマー YNP-1, YNP-2によってPCRを行い、その増幅されたDNA断片の塩基配列を調べた。センス側(YNP-1), またはアンチセンス側(YNP-2)から塩基配列を読み、比較して確認し、その結果を表1に示した。*M. tuber-*

表1 プライマー YNP-1, YNP-2によるPCR産物のシークエンス

菌名	NIHJ No.	サイズ (bp)	A	C	G	T	G C含有 (%)	MTTCWPA91-254*との比較 (%)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1633	164	27	54	57	26	68	100
<i>M. intracellulare</i> E-1	1618	109	22	37	34	16	65	64

*文献 17)



A 2%アガロース電気泳動による検出
B プローブ MIP のサザンハイブリダイゼーション結果

図2 プライマー YNP-1, YNP-2 およびプライマー YNP-7, YNP-8 による PCR 産物の確認

により *M. intracellulare* と同定した臨床分離菌 12 株より DNA を抽出し、プライマー YNP-7, YNP-8 を用いて PCR を行ったところ、12 株すべてに約 270 bp のバンドが増幅された。これらのバンドは、プローブ MIP によるサザンハイブリダイゼーションにより確認した。

4. 各種抗酸菌 DNA を鋳型とした PCR におけるプライマー YNP-7, YNP-8 の特異性の確認

抗酸菌 21 菌種 24 株の 1% 小川培地培養菌より抽出した DNA 50 ng を用いて PCR を行い、プライマー YNP-7, YNP-8 の特異性を調べた。その結果は、表 3 に示すように、*M. intracellulare* のみに YNP-7, YNP-8 により増幅されたバンドが検出された。しかし、その他のテストしたすべての抗酸菌では、

YNP-7, YNP-8 によって増幅されたバンドは検出されなかった。また、*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma salivarium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* の DNA を用いた場合もプライマー YNP-7, YNP-8 によって増幅されたバンドは見られなかった。

5. *M. intracellulare* の DNA と YNP-7, YNP-8 を用いた PCR 産物の塩基配列

M. intracellulare NIHJ1618 DNA とプライマー YNP-7, YNP-8 を用いた PCR 産物の塩基配列を前述の直接シーケンス法により調べた。その全塩基配列を図 3 に示す。DNA 断片の大きさは 271 bp、塩基組成は A 58 b, C 87 b, G 86 b, T 40 b であった。

表3 YNP-1, YNP-2 および YNP-7, YNP-8 による PCR の菌種特異性

菌名	株名	株No.	PCR 増幅バンドの検出	
			YNP-1, YNP-2	YNP-7, YNP-8
<i>M. tuberculosis</i>	H37Ra	NIHJ1634	+	-
<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	NIHJ1633	+	-
<i>M. africanum</i>	TC-20	NIHJ1601	+	-
<i>M. bovis</i>	BCG	NIHJ1608	+	-
<i>M. bovis</i>	Ravenel	NIHJ1607	+	-
<i>M. bovis</i>	TC-30	NIHJ1606	+	-
<i>M. microti</i>	TC-28	NIHJ1621	+	-
<i>M. kansasii</i>	P-16	NIHJ1619	+	-
<i>M. marinum</i>	JM-1	NIHJ1620	-	-
<i>M. szulgai</i>	NCTC10831	NCTC10831	+	-
<i>M. scrofulaceum</i>	C-1	NIHJ1626	+	-
<i>M. gordonae</i>	D-1	NIHJ1617	+	-
<i>M. avium</i>	Kirchberg	NIHJ1605	-	-
<i>M. intracellulare</i>	E-1	NIHJ1618	+	+
<i>M. nonchromogenicum</i>	F-1	NIHJ1622	+	-
<i>M. triviale</i>	G-3	NIHJ1632	+	-
<i>M. terrae</i>	H-1	NIHJ1630	+	-
<i>M. gastri</i>	J-1	NIHJ1616	+	-
<i>M. xenopi</i>	K-1	NIHJ1638	+	-
<i>M. paratuberculosis</i>	クレスト		-	-
<i>M. parafortuitum</i>	T-1	NIHJ1623	+	-
<i>M. fortuitum</i>	Mf-1	NIHJ1615	+	-
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	S-1	NIHJ1611	+	-
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	R-1	NIHJ1609	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC6633	-	-
<i>Escherichia coli</i>			-	-
<i>Mycoplasma orale</i>	CH19299		-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FH		-	-
<i>Mycoplasma salivarium</i>	PG20		-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>			-	-

```

          10          20          30          40          50          60
5' TCCAACGACA GCCCGTCTG CCGTCGCGG CACTGCACC GGCCAGAAC TGTCATCCC
    70          80          90         100         110         120
AATCCGAGG AATCACTTC CAATGGCCA GACAATTGCG TATGACGAAG AGGCCCGCC
    130         140         150         160         170         180
TGGCCTCGAG CGGGGGCTCA ACGCCCTCG CGACGCGTA AAGGTGACGT TGGGCCCAA
    190         200         210         220         230         240
GGGTGCAAC GTCGTCTGG AAGAAGTGG GTGCCCCAC GATCACCAAC GATGGTGTG
    250         260         270
CCATCGCAA GGAGATCGAG CTGGAGGAT C 3
    
```

図3 プライマー YNP-7, YNP-8 を用いた *M. intracellulare* DNA の PCR 増幅産物の塩基配列

考 察

結核菌の65 kDa 抗原遺伝子の塩基配列は, Shinnick ら¹⁷⁾により明らかにされたが, Pao らは, この塩基配列 91~254 をコードするプライマーを用いて, 結核菌群では 165 bp, 非定型抗酸菌ではそれより 20~40 bp 小さなバンドが検出されると報告⁸⁾している。われわれは, すでに報告⁶⁾したように Pao らの報告に基づいてプライマー (YNP-1, YNP-2) を合成し, これを用いて PCR を行い, 各菌種の増幅された DNA 断片のシーケンスを行った¹⁹⁾。われわれの結果では, *M. tuberculosis* の PCR 産物は 164 bp で *M. intracellulare* は 109 bp であった (表 1)。さらに両者の塩基配列には図 1 に示すような相異がある。そこで, *M. intracellulare* に特異的な塩基配列をプライマーとすることにより *M. intracellulare* のみを PCR で検出することを試みて, YNP-7, YNP-8 を作製した。このプライマーを用いた PCR の結果は, テストしたすべての抗酸菌の中で YNP-7, YNP-8 で DNA が増幅されるのは *M. intracellulare* のみであることが確認された。また, 喀痰中に出現する可能性のある抗酸菌以外のテストした細菌についても YNP-7, YNP-8 を用いた PCR の結果, 増幅バンドが見られるものはなかった。さらにプローブ MIP によるサザンハイブリダイゼーション結果では, プローブ MIP は, 増幅された *M. intracellulare* DNA とのみハイブリダイズした (図 2B)。以上の結果は, この PCR により *M. intracellulare* を特異的に検出できることを示している。また, われわれは, *M. intracellulare* NIHJ1618 DNA とプライマー YNP-7, YNP-8 を用いた PCR 産物の塩基配列を調べ, DNA 断片の大きさが, 271 bp であることを決定した (図 3)。この塩基配列を Shinnick らの *M. tuberculosis* Erdman 株の 65 kDa 抗原遺伝子の塩基配列 105~442 と比較したところ, 最大一致率は 76% であった。また, 同じ 65 kDa 抗原遺伝子の 540 アミノ酸タンパクからなるオープン・リーディング・フレーム (ORF) の ATG メチオニン開始コドンの塩基配列 252 以降 442 番目までと, 図 3 の 83 以降 271 番目を最も一致率が高くなるようにして比較すると 97% 一致していた (データ未発表)。

結核菌群を特異的に増幅するプライマーは, 永井ら¹¹⁾, Sjöbring らにより報告¹²⁾されているが, MAC を増幅するプライマーの報告は少ない。わずかに北浦ら¹³⁾の, α 抗原遺伝子より *M. intracellulare* 特異的プライマーを, また, Fries らの, *M. avium* に特異的プライマーの報告¹⁴⁾がある程度である。今回われわれは, Pao らが報告⁸⁾した, *M. tuberculosis* の 65 kDa 抗原遺伝子の一部をコードするプライマーによって増幅される部

分が, 抗酸菌によってその大きさが異なるので, この部分の塩基配列を調べ *M. tuberculosis* と *M. intracellulare* とを比較することにより *M. intracellulare* 特異的な, 新しいプライマーを作製した。非定型抗酸菌症で特に多いものは, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* などの感染である。*M. avium* と *M. intracellulare* は, 生化学的同定検査法では, 生物学的類似性が高いため, *M. avium*-*intracellulare* complex (MAC) と称され, 鑑別が困難であった。近年, Gen-probe 法²⁰⁾や DNA-DNA ハイブリダイゼーション法¹⁵⁾¹⁶⁾等の遺伝子工学的手法により両者の鑑別同定が可能になってきたが, いずれも菌の培養が必要であるため同定までに時間がかかる。これらの菌種をも PCR で同定することができれば, 結核症の迅速診断, 治療にとって有効であることは明らかである。本研究は PCR により *M. intracellulare* を同定する可能性を示すものである。現在喀痰など臨床材料について今回報告した *M. intracellulare* 特異的プライマーによる検出を検討中である。

本研究の要旨は, 第 68 回結核病学会総会 (東京) にて発表した。

謝 辞

DDH [極東] 抗酸菌同定キットは, 極東製薬工業株式会社より提供された。本研究の一部はヒューマンサイエンス (HS) 研究費によるものである。

文 献

- 1) 室橋豊穂, 伊藤忠雄, 小川辰次, 他: 分離培養法。「結核菌検査指針」, 厚生省監修, 日本公衆衛生協会, 東京, 1979; 21-30.
- 2) 工藤祐是, 斎藤 肇, 高橋 宏: 結核菌。「微生物検査必携, 細菌・真菌検査」, 第 3 版, 厚生省監修, 日本公衆衛生協会, 東京, 1987; 90-133.
- 3) 高橋 宏: 抗酸菌の培養同定検査, *Medical Technology*. 1988; 16: 135-142.
- 4) 島尾忠男著: 結核対策。「結核対策」, 結核予防会, 東京, 1989; 1-43.
- 5) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al.: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239: 487-491.
- 6) 山崎利雄, 中村玲子: ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 法による抗酸菌の検出, *結核*. 1992; 67: 441-447.
- 7) Saiki RK: PCR のデザインと至適条件の設定。「PCR テクノロジー—DNA 増幅の原理と応用—」,

- Erlich HA 編, 加藤郁之進監訳, 宝酒造株式会社, 京都. 1990; 11-23.
- 8) Pao CC, Benedict yen TS, Jinn-Bang You, et al. : Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J Clin Microbiol. 1990; 28 : 1877-1880.
 - 9) Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, et al. : Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol Microbiol. 1989; 3 : 843-849.
 - 10) Patel RJ, Fries JWU, Piessens WF, et al. : Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*, J Clin Microbiol. 1990; 28 : 513-518.
 - 11) 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. 1990; 34 : 429-431.
 - 12) Sjöbring U, Mecklenburg M, Andersen AB, et al. : Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*, J Clin Microbiol. 1990; 28 : 2200-2204.
 - 13) 北浦英樹, 大原直也, 山田 毅, 他 : *Mycobacterium* 属の迅速検出法 *Mycobacterium intracellulare* の迅速同定法, 日本細菌学会誌. 1993; 48 : 300.
 - 14) Fries JWU, Patel RJ, Piessens WF, et al. : Genus- and species-specific DNA probes to identify mycobacteria using the polymerase chain reaction. Molecular and Cellular probes. 1990; 4 : 87-105.
 - 15) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al. : Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol. 1991; 29 : 1596-1603.
 - 16) 山崎利雄, 高橋 宏, 中村玲子 : マイクロプレートハイブリダイゼーション法による抗酸菌同定法の検討, 結核. 1993; 68 : 5-11.
 - 17) Shinnick TM. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1987; 169 : 1080-1088.
 - 18) 石川芳明, 奥田晶彦, 加藤宏幸 : DNA シークエンス法. 「ラボマニユアル遺伝子工学」, 村松正實編, 丸善, 東京, 1988; 115-127.
 - 19) 山崎利雄, 中村玲子 : 65 kDa 抗原遺伝子を検出するプライマーによる各種抗酸菌の PCR 産物のシークエンス, 結核. 1993; 68 : 419-425.
 - 20) 斎藤 肇, 富岡治明, 佐藤勝昌, 他 : Gen-probe[®] による *Mycobacterium avium-intracellulare* complex の鑑別・同定, 結核. 1988; 63 : 261-269.