

原 著

Nested PCR 法と DNA プローブ法を
併用した抗酸菌の迅速同定

橋本 敦郎・古賀 宏延・河野 茂
宮崎 義継・大野 秀明・小川 和彦
東山 康仁・朝野 和典
賀来 満夫・原 耕平

長崎大学医学部第2内科

受付 平成6年6月27日

受理 平成6年8月31日

RAPID IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA BY COMBINED METHOD OF
POLYMERASE CHAIN REACTION AND THE GEN-PROBE
DNA HYBRIDIZATION SYSTEM

Atsuro HASHIMOTO*, Hironobu KOGA, Shigeru KOHNO, Yoshitsugu MIYAZAKI,
Hideaki OHNO, Kazuhiko OGAWA, Yasuhito HIGASHIYAMA,
Kazunori TOMONO, Mitsuo KAKU
and Kohei HARA

(Received 27 June 1994/Accepted 31 August 1994)

We developed the rapid detection and identification method of mycobacteria, involving amplification of mycobacterial 16S rRNA gene by nested PCR and identification of *M. tuberculosis* complex or *M. avium-intracellulare* complex (MAC) by hybridization protection assay (HPA) using the acridinium-ester (AE) labeled DNA probe. The specificity of the nested PCR combined with DNA probe test was excellent in terms of detection of mycobacterial organisms and identification of *M. tuberculosis* or MAC. The detection limits of the present method were 10 fg DNA for *M. tuberculosis*, and 100 fg DNA for MAC, respectively. We further investigated on the optimum temperature for hybridization in HPA with AE labeled DNA probe because there was the difference in the mode of DNA-RNA hybridization from that of DNA-DNA hybridization. In our method, the optimum temperature of hybridization was estimated as $55 \pm 1^\circ\text{C}$. In preliminary experiments on two clinical cases, we practically detected and identified *M. tuberculosis* and MAC in clinical specimens, such as sputa, by using this newly devised method. We concluded that this method is useful for rapid detection and identification of *M. tuberculosis* and MAC in clinical specimens.

*From the Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1, Sakamoto, Nagasaki 852 Japan.

Key words : DNA probe, Hybridization protection assay, AccuProbe, Acridinium-ester, Nested PCR

キーワード : DNAプローブ, Hybridization protection assay, AccuProbe, Acridinium-ester, nested PCR

はじめに

近年、本邦では結核症の減少傾向が鈍化するともに、非定型抗酸菌症も漸次増加の傾向にある。さらに今後は免疫不全患者の増加によって、抗酸菌症の臨床に占める重要性は大きくなるものと考えられる¹⁾。また、非定型抗酸菌の中でも、各種抗結核薬に耐性を示す *M. avium* complex の分離頻度が増加の傾向にあるため²⁾ 結核菌と非定型抗酸菌とを区別することは極めて重要な問題になる。両菌種の鑑別には通常ナイアシントテストが用いられるが、結果が得られるまでには4~8週を要するため、より迅速な同定法の開発が強く望まれてきた。

近年の分子生物学の進歩に伴い、DNAプローブ法³⁾ やPCR法⁴⁾ がこの目的の達成のために積極的に応用されはじめた。しかし、前者の欠点は結核菌の菌数が 10^5 CFU/100 μ l以上必要であることから、臨床検体からの直接の菌検出は困難である。また、後者では高感度に菌の検出は可能であるが、同定にはそれぞれの菌種別のプライマーを使用しなければならず、さらに Southern blot hybridization による確認に時間を要するなどの問題点がある。そこでわれわれは、これまでに当教室で報告してきた nested PCR 法⁵⁾ とアクリジニウムエステル(以下、AEと略す)標識DNAプローブ法⁶⁾ を併用することにより、簡便かつ迅速な抗酸菌の検出および同定を試みたので報告する。

材料と方法

1. 使用菌株

1) 各種抗酸菌

各種抗酸菌のうち、以下の11菌種を用いた。*M. tuberculosis* (KMC T101, H37Rv), *M. bovis* (TMC 404), *M. avium* (臨床分離株), *M. intracellulare* (臨床分離株), *M. chelonae* (ATCC 19977), *M. scrofulaceum* (TMC 1316), *M. fortuitum* (ATCC 19709), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. gordonae* (臨床分離株), *M. simiae* (臨床分離株), *M. non-chromogenicum* (臨床分離株)。

遅発育抗酸菌は、1%小川培地上で37°C、2~3週間培養した菌を、迅速発育抗酸菌は、1%小川培地上で3日培養した菌を用いた。なお、臨床分離株についてはDDHマイコバクテリア極東によって同定したものを

いた。

2) 一般細菌

一般細菌の中から以下の10菌種を用いた。*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae* (臨床分離株), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Haemophilus influenzae* (ATCC 35056), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Acinetobacter calcoaceticus* (臨床分離株), *Proteus mirabilis* (臨床分離株), *Serratia marcescens* (ATCC 8100)。

2. DNA抽出

DNA抽出方法はSambrookらの方法に準じた⁷⁾。抗酸菌の場合は、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蒸留水1mlに懸濁し、ガラスビーズ(0.2 μ m)を100mg混入した後、10分間超音波処理した。その後、20mg/mlプロテナーゼK溶液20 μ lと10%SDS溶液40 μ lを加えて、60°Cで30分間溶解した。さらに、フェノール/クロロフォルム処理にて除蛋白をおこなった後、エタノールにてDNAを抽出した。DNAは乾燥後に滅菌蒸留水50 μ lに再溶解させ、その中の20 μ lをPCRに用いた。一方、一般細菌の場合はTE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)に溶解後、5分間煮沸し、グラム陽性菌に対してはlysostaphin(最終濃度5U/ml)を、グラム陰性菌にはlysozyme(最終濃度1mg/ml)を加えて溶解し、その後抗酸菌と同様の処理をおこなった。

3. プライマリーおよびPCRの反応条件

Mycobacterium 属菌を広く検出するために、16S rRNAをコードする遺伝子の一部を特異的に増幅する nested PCR を設定した。1st PCR、およびその内側のフラグメントを増幅する nested PCR のプライマーは、以下のような塩基配列のものをDNAシンセサイザー(380B DNA synthesizer, Foster City, Calif.)で合成した。

1st PCR :

5'-CAT GCA AGT CGA ACG GAA AG-3'
(17~36)

5'-CGG TGC TTC TTC TCC ACC TA-3'
(437~456)

2nd PCR :

5'-TAC TCG AGT GGC GAA CGG GT-3'
(50~69)

5'-CGG ACC TTC GTC GAT GGT GA-3'
(398~417)

PCRの反応液は付属のマニュアルに従い50 mM KCl, 10 mM Tris HCl, 1.5 mM MgCl₂, ゲラチン, 200 μM dNTP, Taq ポリメラーゼ, プライマー, および 20 μl の template DNA を混合して総量 100 μl とした。PCRの反応条件は, 初めに 94°C で 10 分間加熱した後, annealing は 63°C で 1 分 30 秒, extension は 72°C で 1 分, denature は 94°C で 1 分とし, 以上を 34 サイクル繰り返した。

4. AE 標識 DNA プローブ法

本法は Gen-Probe 社の Accuprobe MTB (AE-DNA-MTB, 結核菌同定用), AccuProbe MAC (AE-DNA-MAC, *M. avium* complex 同定用) の 2 種類の DNA プローブを用いて施行した。

Nested PCR 法にて増幅した PCR 産物を 5 分間煮沸し, すぐに水冷して一本鎖 DNA とした後, AE 標識 DNA プローブがコートされている反応チューブに移し, 50°C から 60°C までの 5 段階で 15 分間ハイブリダイゼーション反応を行った。その後, 未反応の AE 標識 DNA プローブを加水分解試薬 (テトラホウ酸ナトリウム緩衝液) で失活させて, AE 標識 DNA-DNA ハイブリッドを選択的に残した。ハイブリッド中の AE の化学発光は, 検出試薬 (0.1% H₂O₂/0.001 N HNO₃, 1N NaOH) を加え, ルミノメーターにて測定し, 化学発光値 (Relative Light Units ; RLU) が 30,000 以上を陽性と判定した。

5. PCR および DNA プローブの感度測定

M. tuberculosis, *M. avium*, *M. intracellulare* のそれぞれの菌株より抽出した DNA の 10 倍希釈系列を作り, それらを template DNA として nested PCR

を行った。さらにその PCR 産物を用いて, AE 標識 DNA プローブと反応させ RLU を測定した。

6. 臨床症例の検討

本法による抗酸菌の検出および同定が, 臨床検体に対しても有用か否かを, 以下の 2 症例を対象として検討した。なお, 臨床材料よりの template DNA の調製法は宮崎らの方法⁵⁾ に準じた。

1) 症例 1: 80 歳, 男性

主訴: 喀痰

現病歴: 出血性脳梗塞の診断で近医に入院中に, 喀痰より Gaffky 2 号が検出されて当科に紹介入院となった。

職業歴: 30~50 歳まで炭坑夫。

現症: 体温 35.9°C で, 呼吸音清明。心雑音なく, 表在リンパ節は触知しなかった。

検査所見: 血沈 25 mm/1 時間値, 白血球 4200/mm³ (好中球 44%, 好酸球 2%, 好塩基球 2%, リンパ球 40%, 単球 12%), CRP 0.29 mg/ml, ツ反 35×25/48×45 (mm)。

2) 症例 2: 44 歳, 女性

主訴: 咳嗽

現病歴: 狭心症で外来通院中に咳嗽や労作性呼吸困難が出現し, 胸部 X 線上異常陰影を認め, 気管内採痰で Gaffky 2 号が検出されたために, 治療目的にて入院となった。

現症: 体温 36.2°C, 右下肺野で fine crackle を聴取し, チアノーゼはなかった。

検査所見: 血沈 51 mm/1 時間値, 白血球 2800/mm³ (好中球 37%, 好塩基球 1%, 好酸球 2%, リンパ球 55%, 単球 5%), CRP 0.27 mg/ml, ツ反 0×0/10×5 (mm)

結 果

1. 検出感度

Table 1 に示したように, AE-DNA-MTB プロ-

Table 1 Detection Limit of AE-DNA Probe for Mycobacteria

DNA quantity	RLU of AE-DNA probe		
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
1 ng	409,313 (+)	918,177 (+)	191,315 (+)
100 } 10 } 1 } pg	441,578 (+) 414,075 (+) 426,311 (+)	952,281 (+) 942,117 (+) 913,508 (+)	210,951 (+) 214,426 (+) 194,296 (+)
100 } 10 } 1 } fg	435,846 (+) 410,911 (+) 589 (-)	899,090 (+) 1,863 (-) 2,016 (-)	196,785 (+) 2,179 (-) 1,947 (-)

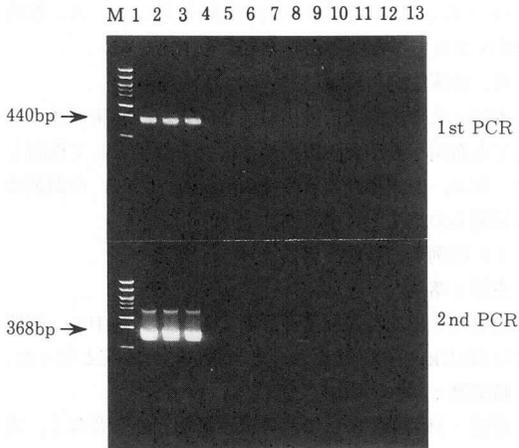


Fig. 1 Specificity of the Nested PCR for Common Bacteria

M ; molecular size markers, 1 ; *M. tuberculosis*, 2 ; *M. avium*, 3 ; *M. intracellulare*, 4 ; *S. aureus*, 5 ; *S. pneumoniae*, 6 ; *S. epidermidis*, 7 ; *H. influenzae*, 8 ; *K. pneumoniae*, 9 ; *P. aeruginosa*, 10 ; *E. coli*, 11 ; *A. calcoaceticus*, 12 ; *P. mirabilis*, 13 ; *S. marcescens*

ブにおける *M. tuberculosis* の検出感度は、DNA 量が 10fg 以上ならばすべて RLU は 30,000 以上の陽性を示した。また、AE-DNA-MAC プローブにおける *M. avium* と *M. intracellulare* の検出感度は、いずれも DNA 量が 100fg 以上で陽性を示した。

2. 特異性

一般細菌 10 株と抗酸菌 11 株より抽出した DNA のそれぞれ 1ng を用いて nested PCR を行った。一般細菌 10 株に対してはすべて増幅されずに陰性であった (Fig. 1)。一方、抗酸菌 11 株に対しては、Fig. 2 に示したように *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum* において 368 bp のバンドを認められたが、*M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. simiae* ではバンドは認められなかった。

さらにこの PCR 産物を用いて AE-DNA-MTB および AE-DNA-MAC の反応性を検討した。AE-DNA-MTB の示す RLU は *M. tuberculosis* complex に対してのみ 30,000 以上の陽性値を示し、AE-DNA-MAC の示す RLU は *M. avium* と *M. intracellulare* に対してのみ陽性値を示した (Table 2)。

3. ハイブリダイゼーション温度

AccuProbe の添付プロトコルでは、 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ をハイブリダイゼーションの適正温度と設定しているが、本法ではその温度条件では MAC 同定用プローブにおい

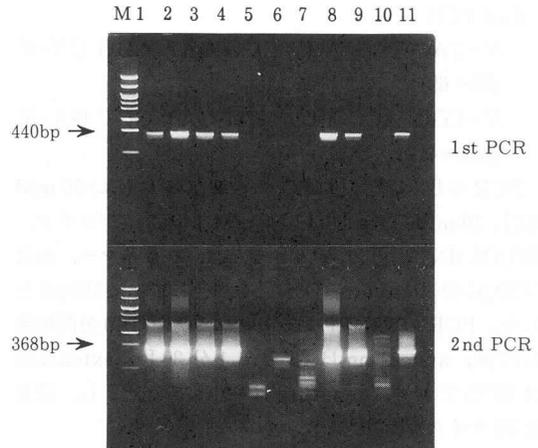


Fig. 2 Specificity of the Nested PCR for Mycobacterial Species

Lanes : M ; molecular size markers, 1 ; *M. tuberculosis*, 2 ; *M. bovis*, 3 ; *M. avium*, 4 ; *M. intracellulare*, 5 ; *M. chelonae*, 6 ; *M. scrofulaceum*, 7 ; *M. fortuitum*, 8 ; *M. kansasii*, 9 ; *M. gordonae*, 10 ; *M. simiae*, 11 ; *M. nonchromogenicum*

て MAC を検出できなかった。そこで、ハイブリダイゼーションの温度を 50°C までの各段階で検討した結果、 $55 \pm 1^\circ\text{C}$ が MAC 同定用プローブにおける適正なハイブリダイゼーション温度と判明し、さらに特異性においても問題ないことが確認された (Fig. 3)。

4. 臨床症例の検討

1) 症例 1

入院後経過 : 当科入院時の喀痰で塗抹陰性であったが、本法により結核菌が検出および同定され、珪肺結核症と診断した。その後、8 週培養にて結核菌が陽性と確認された。

2) 症例 2

入院後経過 : 当科にても気管内採痰で Gaffky 2 号を認め、さらに本法にて MAC と同定された。その後、同時期の喀痰培養で 2 回続いて陽性結果が得られたため、非定型抗酸菌症診断基準から肺非定型抗酸菌症と診断した。のちに培養菌株のナイアシンテストが陰性であったことから、非定型抗酸菌が確認された。

考 察

近年、DNA 診断の進歩が著しく、抗酸菌に対しても非放射性物質を用いた DNA プローブ法や各種プライマーを用いた PCR 法が開発されている。今回、われわれが用いた方法は、高感度に抗酸菌を検出できる PCR 法と、特異的に抗酸菌を同定できる DNA プローブ法

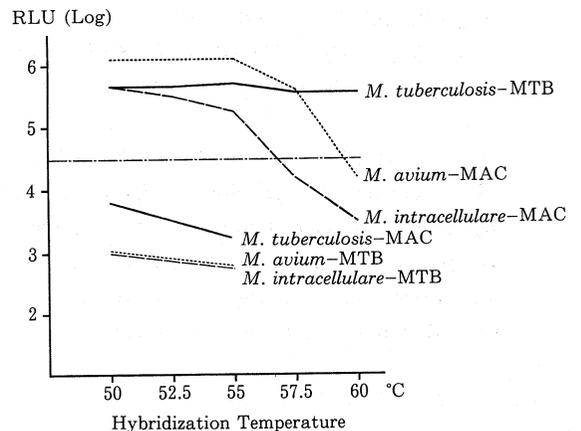
Table 2 Relative Light Units (RLU) of AE-DNA Probes Test for Type Strains of Mycobacteria

Type strain	RLU of AE-DNA probe for	
	<i>M. tuberculosis</i>	MAC
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	412,454 (+)	1,453 (-)
<i>M. bovis</i> (TMC 404)	446,941 (+)	1,594 (-)
<i>M. avium</i> (clinical isolate)	664 (-)	921,597 (+)
<i>M. intracellulare</i> (clinical isolate)	2,000 (-)	189,564 (+)
<i>M. chelonae</i> (ATCC 19977)	646 (-)	1,409 (-)
<i>M. scrofulaceum</i> (TMC 1316)	638 (-)	1,318 (-)
<i>M. fortuitum</i> (ATCC 19709)	1,342 (-)	1,363 (-)
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	4,811 (-)	1,391 (-)
<i>M. gordonae</i> (clinical isolate)	741 (-)	1,277 (-)
<i>M. simiae</i> (clinical isolate)	638 (-)	1,356 (-)
<i>M. nonchromogenicum</i> (clinical isolate)	887 (-)	1,495 (-)

を併用したもので、臨床材料から直接、抗酸菌を検出・同定することを目的としたものである。

まず、検体中に抗酸菌が存在するかどうかをPCRで検出するためには、できるだけ多くの抗酸菌と反応するPCRのプライマーを設定する必要がある。さらに、そのPCR産物を用いて結核菌群とMACとを同定する手段としては、すでに市販されているAccuProbeの応用を試みた。したがって、この2つの条件を満足するための増幅対象遺伝子としては、抗酸菌の16S rRNAをコードする遺伝子の一部をターゲットとした。細菌の16S rRNAの塩基配列は系統分類学上の重要な指標であり、抗酸菌に関しても20菌種の16S rRNAのシーケンスが報告され⁸⁾、すでにPCR法での遺伝子増幅の報告も多くみられる⁹⁾。

AccuProbeは1個の抗酸菌の中に数千コピー存在するrRNAをターゲットとして抗酸菌を同定するための方法であり、今回われわれが検討したPCR産物を対象としたものではない。したがって、その反応条件に関しては若干の検討が必要であった。まずDNAプローブとのハイブリダイゼーションの温度条件を検討したとこ

**Fig. 3** Relative Light Units (RLU) of AE-DNA Probe on Different Hybridization Temperature

ろ、通常の温度より5°C低い、55±1°Cが適正であることが分かった。つまり一般的に理解されているようにDNA-DNA二本鎖はRNA-DNA二本鎖よりも約

5°C低い温度で安定であるという知見^{10,11)}に一致したものと考えられた。さらに、感度の面からは、nested PCRを用いたことから結核菌は10fg, MACは100fgまで検出が可能であった。つまり、抗酸菌が数個存在すれば検出することが可能であり、実際の臨床材料においても良好な成績が得られた。

一方、アンプリコアTMマイコバクテリアキットやMTDキットなどが近年開発されて、遺伝子診断が一般の臨床検査施設でも安易に施行できるようになった。しかし、これらのキットは検体中の抗酸菌の有無をスクリーニングした後同定するわれわれの方法とは違い、提出されたすべての検体を最後まで処理せざるをえないために経済的な問題が懸念される。また、MTDキットは結核菌のみに対して反応するもので、非定型抗酸菌に反応するキットの開発が今後期待される。

なお、MACのDNA診断に関しては、喀痰より本菌が検出されても、必ずしも肺非定型抗酸菌症とは診断できない。しかし、臨床検体が血液やリンパ節などの場合は、臨床診断に対しても極めて有用な検査法になり得るものと考えられる。つまり、今後増加が予測される後天性免疫不全症候群患者でのMAC感染症に対して、早期診断のための新しい補助診断法となりうる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班：日本における非定型抗酸菌症の研究（国療非定型抗酸菌症共同研究班1986年度報告）. 結核. 1988 ; 63 : 493-499.
- 2) 青柳昭雄：内科学の展望（第17回）. 感染症の時代的変貌とその対策Ⅲ-3. 日内会誌. 1990 ; 79 : 1-5.
- 3) Musial CE, Tice LS, Stockman L, et al. : Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol. 1988 ; 26 : 2120-2123.
- 4) Sjöbring U, Mecklenburg M, Andersen A, et al. : Polymerase chain reaction for detection of *M. tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1990 ; 28 : 2200-2204.
- 5) Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, et al. : Nested polymerase chain reaction for detection of *M. tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol. 1993 ; 31 : 2228-2232.
- 6) Arnold LJ, Hammond PW, Wiese WA, et al. : Assay formats involving acridium-ester-labelled DNA probes. Clin Chem. 1989 ; 35 : 1588-1594.
- 7) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. : Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989 : 1.21-1.37.
- 8) Rogall T, Wolters J, Folhr T, et al. : Toward a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. Int J Syst Bacteriol. 1990 ; 40 : 323-330.
- 9) Boddinhaus B, Rogall T, Flohr T, et al. : Detection and identification of Mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol. 1990 ; 28 : 1751-1759.
- 10) Casey J and Davidson N ; Rate of formation and thermal stabilities of RNA : RNA and DNA : DNA duplexes at high concentrations of formamide. 1977 ; 4 : 1539-1552.
- 11) Alwine JC, Kemp DJ and Stark GR ; Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyl-oxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977 ; 74 : 5350-5354.