

原 著

PCR法を用いた Rifampicin 耐性結核菌の
迅速検出法に関する検討

大野 秀明・古賀 宏延・河野 茂
 東山 康仁・宮崎 義継・小川 和彦
 柳原 克紀・山本 善裕・野田 哲寛
 宮本 潤子・橋本 敦郎・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29日

受理 平成6年8月31日

EVALUATION FOR RAPID DETECTION OF RIFAMPICIN-RESISTANT
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY POLYMERASE CHAIN
REACTION-SINGLE STRAND CONFORMATION
POLYMORPHISM

Hideaki OHNO^{*}, Hironobu KOGA, Shigeru KOHNO, Yasuhito HIGASHIYAMA,
 Yoshitsugu MIYAZAKI, Kazuhiko OGAWA, Katsunori YANAGIHARA,
 Yoshihiro YAMAMOTO, Tetsuhiro NODA, Junko MIYAMOTO,
 Atsuro HASHIMOTO, Kazunori TOMONO,
 Mitsuo KAKU and Kohei HARA

(Received 29 June 1994/Accepted 31 August 1994)

We evaluated usefulness of the rapid diagnostic method for detection of rifampicin (RFP)-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, which was based on polymerase chain reaction. The MICs of RFP were measured for 38 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* which were suspected to be RFP-resistant organisms, and 12 strains were found to be resistant to RFP.

The PCR primers used were the same as those reported by Telenti et al, which were targeting the RNA polymerase β subunit gene (*rpoB*). We confirmed that this gene was possessed by all the strains tested. Eight strains out of the 12 strains with RFP-resistant phenotype were demonstrated to have a point mutation or some alteration in the *rpoB* gene on the basis of PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP). Thus, the sensitivity of our method was calculated as 67%. In addition, we could not detect any alterations in *rpoB* gene by all RFP-susceptible strains.

These results indicated that rapid detection of the RFP-resistant *Mycobacterium*

*From the 2nd Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852 Japan.

tuberculosis was possible directly from clinical specimens by using PCR-SSCP technique.

Key words : Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, RNA polymerase β subunit, Point mutation, PCR-single strand conformation polymorphism analysis

キーワード : リファンピシチン耐性結核菌, RNA ポリメラーゼ β サブユニット, 点突然変異, PCR-SSCP 法

緒 言

近年の分子生物学における技術的な進歩は著しく、各種遺伝性疾患をはじめとして、悪性疾患や代謝性疾患などに対する遺伝子レベルでの診断や治療法が開発されつつある。なかでも、Saikiらにより報告された polymerase chain reaction (PCR) 法¹⁾は、人工的な遺伝子の増幅法としては画期的な発見であり、この方法を利用した各種感染症の遺伝子診断が、多くの施設で開発され、臨床の場でも応用されている。とくに結核症においては、PCR法を用いることにより菌検出がわずか1~2日で可能となり、従来の培養法と比較して迅速診断という意味での貢献度は大である。

しかし一方で、結核症の診断が早期に確定しても、病原菌の薬剤感受性検査を施行するためには、菌が培養されていることと、最低でも1~2週間の培養期間が必須条件である。もし菌が培養されていない症例では、薬剤感受性の情報を得ることは全く不可能である。

そこで私たちは、PCRを応用して rifampicin (RFP) 耐性遺伝子の迅速検出を行い、耐性菌の早期判定法として、また培養陰性の場合の補助検査法としての有用性を検討したので報告する。

対象ならびに方法

1. 供試菌株

当科および関連施設において臨床検体から分離された結核菌のうち、RFPに対して耐性が疑われた38株を使用した。また対照(以下コントロール)として結核菌標準株 H37Rvを用いた。

2. 供試薬剤

RFP(第一製薬)を用いた。

3. 薬剤感受性試験

1) 菌液の調整

2倍濃度の tween 80 を含有した Middlebrook 7H9 Broth (Middlebrook ADC Enrichment を含む) (DIFCO LABORATORIES, USA) にて、結核菌を 37°C にて約 1 週間培養した後、混濁度が MacFarland 0.5 (約 10⁶ CFU/ml に相当) になるように菌液を調整

した。

2) 薬剤濃度

RFP を少量の dimethyl sulfoxide に完全に溶解した後、滅菌蒸留水を加えて 0.125 μ g/ml~1024 μ g/ml の 14 段階の 2 倍希釈系列を作製し、Multiple Well Plates (Round Bottom, CORNING 25850) に、各 50 μ l ずつ分注した。また、薬液を分注した後、上記 1) の菌液を 50 μ l 加えて 37°C にて培養した。したがって薬剤の最終濃度は 0.063 μ g/ml~512 μ g/ml の 14 段階となった。

3) 判定

培養開始後 7 日目と 10 日目にプレートを観察し、薬剤非添加の培地に十分な菌の発育を認めた時点で判定を行い、最小発育阻止濃度 (MIC) を決定した。判定はそれぞれの well における菌の発育状況をコントロールの well と比較すると同時に、硝酸塩還元試験によって行った。

4. DNA 抽出法

小川培地上に発育した結核菌集落より約 1/2 白金耳程度(湿菌量として約 10 mg 程度)の菌を採取し、500 μ l の TE buffer に浮遊させ、煮沸および超音波破砕を行った。次に、lysozyme と proteinase K をいずれも最終濃度が 1 mg/ml となるように加え、それぞれ 37°C および 60°C で、90 分および 30 分間培養した。その後 phenol/chloroform 処理にて DNA を抽出し、ethanol 沈殿を行った後、200 μ l の TE buffer に再浮遊させ、その中の 10 ng を PCR に使用した。

5. PCR 法

1) 結核菌同定のための PCR 法

Sjöbring ら²⁾が報告した、*M. tuberculosis* の 38 kDa 蛋白 (protein antigen b, Pab) をコードする遺伝子の特異的に増幅するプライマーを用い、すでに報告した方法³⁾により PCR を施行した。得られた増幅産物は、2%アガロースゲル (SEAKEM ME agarose, FMC BioProducts) 内電気泳動後、ethidium bromide 染色により 419 bp のバンドとして確認した。

2) RFP 耐性菌同定のための PCR 法

Telenti ら⁵⁾の報告による結核菌の RNA poly-

merase β subunit をコードする遺伝子 (rpoB) をターゲットとし、その中の 157 bp を増幅するプライマー (塩基配列は 5'-TGCACGTCGCGGACCTCC-3', 5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT-3') を DNA synthesizer (Model 380B, Applied Bio systems) にて合成した。PCR の条件は、annealing の温度を 55°C に変更した以外は前記した方法に準じた。増幅産物は 2% アガロースゲル内電気泳動後に、ethidium bromide 染色により 157 bp のバンドを確認した。

さらに増幅された DNA フラグメント内の point mutation を検出するために、村上の方法⁷⁾ に準じて PCR-single strand conformation polymorphysm (SSCP) 法を施行した。前記のプライマーの 5' 末端を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (370 MBq/ml, PB10168, Amersham) にて標識し、総量 5 μl の PCR 反応液 (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gelatin, 400 μM dNTP, 5 μM each RI-labeling primer, 0.13 U Taq polymerase, 1 μl template DNA) で、denaturation 94°C 1分間, annealing 55°C 1分間, extension 72°C 1分間の条件にて thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus) を用い PCR を 40 cycle 施行した。

その後増幅産物を loading buffer (95% deionized formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF, 20 mM EDTA) で 100 倍に希釈した後、30 μl を別のマイクロチューブに移し、94~100°C で 10 分間加熱後に急冷した。その中の 3 μl を 6% ポリアクリルアミドゲル内で電気泳動 (6 W にて約 5 時間) し、その後オートラジオグラフィーにてバンドの位置を確認して、各バンドの移動度をコントロールと比較した。

結 果

1. 薬剤感受性試験

結核菌 38 株に対する RFP の MIC 値を測定し、その結果を Fig. 1 に示した。RFP 耐性の基準は一般的に 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度にて発育が認められる場合とされているため、今回の検討では 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で発育が認められたものを耐性菌と判定した。

耐性菌は 38 株中 12 株であり、512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の高度耐性を示したものは 6 株みられた。

2. Pab および rpoB 遺伝子の検出

今回検討された 38 株の抗酸菌は、すべて Pab 遺伝子を有することを PCR にて確認し、結核菌であることを証明した。また Fig. 2 に示したように、38 株すべてにおいて 157 bp のバンドが確認され、rpoB 遺伝子の欠損株はみられなかった。

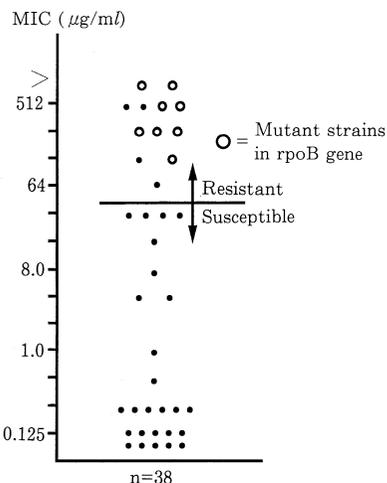


Fig. 1 Relationship between Drug-susceptibility and Genetic Alteration

Point mutation was suspected in 8 strains (8/12=67%) of RFP-resistant *M. tuberculosis*.

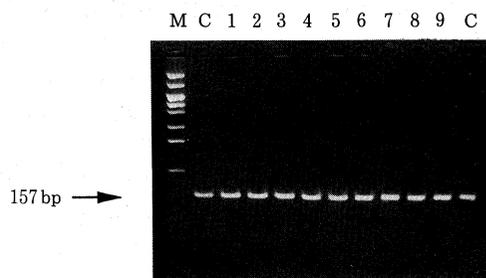


Fig. 2 Detection of RNA Polymerase β Subunit Gene of *M. tuberculosis* by PCR

Agarose gel electrophoresis, and ethidium bromide stain. M: pHY marker. C: control (*M. tuberculosis* H37Rv) Lane 1, 2, 6, 7, 8, 9: RFP-resistant strain. Lane 3, 4, 5: RFP-susceptible strain.

3. PCR-SSCP 法による rpoB 遺伝子内の point mutation の検出

Fig. 3 に PCR-SSCP 法による point mutation の検出例を示した。PCR-SSCP 法の原理を簡単に述べると、遺伝子の塩基配列上に仮に point mutation などの突然変異が生じても、DNA が二本鎖のときはその変異とは関係なく安定化した構造を保っており、アガロースゲル内電気泳動にても変異の有無は判定できない。しかし、DNA を一本鎖に変性させると、その塩基配列に特異的な一本鎖 DNA の高次構造を形成する。したがって変異が存在すれば高次構造にも変化が表れ、ポリアク

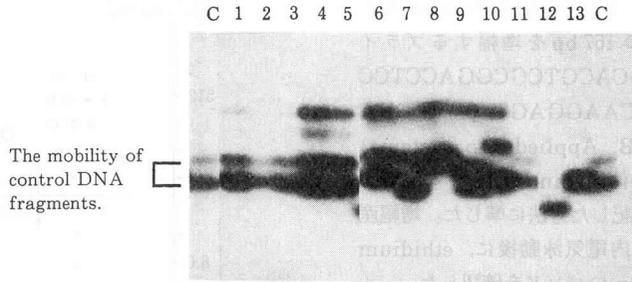


Fig. 3 Detection of RFP resistant *M. tuberculosis* by PCR-SSCP

Lane 1, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 : RFP-resistant strain.

Lane 2, 3, 4, 5, 11 : RFP-susceptible strain.

C : control (*M. tuberculosis* H37Rv)

リリアミドゲルのような分解能の高いゲルで分離すると変異のない DNA 鎖とは明確に区別できるというものである⁷⁾。

泳動時には PCR 産物の DNA は一本鎖に変性されているため、オートラジオグラフィ後に検出されるバンドの数は、extra band の存在がなければ通常 2 本のバンドとして確認される。たとえば Fig. 3 で lane 6, 7, 10 のバンドをみると、lane 6 では 2 つのフラグメントの移動度がわずかながらコントロールと違っており、lane 7 では 2 つのフラグメント間の距離がコントロールのそれに比し開大しているのがわかる。

また lane 10 では明らかにコントロールに比して移動度が異なっているのがわかり、gene 内の point mutation が示唆された。また lane 8, 12, 13 では 1 本のバンドしか認められないが、これは 2 つの一本鎖 DNA の移動度が偶然に同じだったか、あるいは非常に近接したためと考えられた。しかしいずれにしても、コントロールと比較すると移動度に関しては相違が認められた。

これら 6 株はいずれも RFP 耐性株であったが、lane 1 は RFP 耐性株であるにもかかわらず、DNA の移動度はコントロールと同じであった。一方、RFP 感受性株においては、すべての株で DNA の移動度はコントロールと同じであった。

以上の結果から、*rpoB* 遺伝子内の変異が示唆された株は 8 株に認められ、そのすべての株が RFP 耐性株であった (Fig. 1)。したがって耐性株に占める変異株の割合は 67% (8/12) であった。

考 案

PCR 法を用いた結核症の診断に関しては、各施設での研究や開発が盛んで、当教室の MIYAZAKI らも特異的で高感度の方法をすでに報告した⁴⁾。しかし、結核

菌の薬剤感受性検査については、従来のように菌が培養されていることが必要条件で、さらに数週間という長い検査期間を要する。一方、結核菌の薬剤に対する耐性獲得には、耐性遺伝子の存在が従来より示唆されてきた。すでに RFP を含めて isoniazid (INH)⁸⁾⁹⁾ や, streptomycin (SM)¹⁰⁾ などに対する耐性遺伝子の検出法が報告されているが、未だ臨床に応用されるまでには至ってはいない。

今回私たちは、PCR 法を用いた RFP 耐性結核菌の迅速検出に関する検討を行い、臨床的な有用性が期待できるかどうかを検討した。結核菌の RFP に対する耐性化の機序には、*rpoB* 遺伝子内の突然変異による RNA polymerase β subunit 構造の変化が重要で、Telenti らはすでにこの遺伝子の塩基配列を明らかにし、一部の領域での特異的かつ高頻度の point mutation の存在を報告した⁵⁾⁶⁾。

今回私たちの検討では、耐性株中に point mutation が示唆された株の占める割合は 67% であったが、90% 以上の耐性菌がこの方法で検出できたとする報告¹¹⁾ もある。このように頻度の違いが生じた原因は明らかではないが、手技的な問題、あるいは今回われわれが検討した株、すなわち日本における RFP 耐性株においては、RFP 耐性化に関わる *rpoB* 内の point mutation をはじめとする何らかの変異が、今回の PCR の設定部位の外部に存在した可能性も考えられる。

また頻度としては低いながらも、*rpoB* 内に塩基の挿入 (3%) や欠失 (4%) があったとの報告¹¹⁾ もみられるが、われわれが今回使用した primer により増幅された PCR 産物は、すべて 157 bp のところに観察されたため、それらの変異はなかったと考えられる。今後これらの問題については、primer を遺伝子内の他の部分にも設定したり、実際に PCR 産物のシーケンシングにより、point mutation の部位を確認し、アミノ酸レ

ベルでの変化を検討することも重要である。また point mutation 以外の挿入や欠失などの変異の有無、さらに日本とアメリカの株での相違点などを確認し、より適切かつ高頻度に RFP 耐性株を検出できるような primer の設定を検討する予定である。

また、従来法による耐性検査の判定結果は今回の検討に影響を及ぼす重要な因子である。この点に関しては、1回目の薬剤感受性検査にて耐性が疑われた株を収集し、再度感受性検査に供し判定を行ったため、得られた検査結果は信頼できるものとする。

一方、今回応用した PCR-SSCP 法は、Orita ら¹²⁾により開発された、遺伝子の point mutation を検出する画期的な方法であり、すでにフェニルケトン尿症¹³⁾などの遺伝子疾患や、癌抑制遺伝子内の変異の検出¹⁴⁾などに応用されている。今回の私たちの検討でもその有用性が示されたが、この方法を用いてもなお検出できない耐性株が存在する可能性は否定できず、今後の新たな検出法の検討なども必要である。

今回の検討では、予想された変異の頻度よりやや低かったものの、約 70% の確率で RFP 耐性株を検出できたことは、将来的に臨床検体から直接 RFP 耐性菌を迅速に検出することが可能であることが示唆された。今後は臨床検体での検討と、非放射性物質を用いた PCR-SSCP 法についてもあわせて検討していく予定である。

結 語

今回われわれは、PCR 法を用いた RFP 耐性結核菌の迅速検出法について検討した結果、耐性菌 12 株中 8 株で陽性となり、約 70% の株がこの方法で検出できることが判明した。今後さらに感度と簡便化を検討し、臨床検体からの結核菌の検出と薬剤耐性の判定を短時間で同時に施行できる方法を開発する方針である。

謝 辞

本研究にあたって結核菌を分与して頂いた国立療養所長崎病院、国立嬉野病院、長崎県立多良見病院、および極東製薬工業の各施設に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第 69 回日本結核病学会総会(1994年長崎市)にて発表した。

文 献

- 1) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 ; 239 : 487-491.
- 2) Sjöbring U, Mecklenburg M, Andersen AB, et al. : Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1990 ; 28 : 2200-2204.
- 3) 古賀宏延, 宮崎義継, 河野 茂, 他 : 抗酸菌症に対する DNA probe 法と PCR 法. *結核*. 1992 ; 67 : 795-802.
- 4) Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, et al. : Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1993 ; 31 : 2228-2232.
- 5) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. : Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993 ; 341 : 647-650.
- 6) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. : Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 ; 37 : 2054-2058.
- 7) 村上善則 : PCR-SSCP 法 ; DNA 検査と診断, 医学のあゆみ. 1992 ; 162 : 507-511.
- 8) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. : InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1994 ; 263 : 227-230.
- 9) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. : The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 1992 ; 358 : 591-593.
- 10) Meier A, Kirschner P, Bange FC, et al. : Genetic alterations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* : Mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 ; 38 : 228-233.
- 11) Kapur V, Li LL, Iordanescu S, et al. : Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase β subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol*. 1994 ; 32 : 1095-1098.
- 12) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. : Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the

- polymerase chain reaction. *Genomics* ; 5 : 874-879.
- 13) Dworniczak BD, Dworniczak B, Brommelkamp, et al. : Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) : a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria. *Nucleic Acids Res.* 1991 ; 19 : 2500.
- 14) Murakami Y, et al. : Detection of aberrations of the p53 alleles and the gene transcript in human tumor cell lines by single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res.* 1991 ; 51 : 3356-3359.