

原 著

非放射性 PCR-SSCP 法によるリファンピシン
耐性結核菌検出の試み

山 崎 利 雄 ・ 芳 賀 伸 治

国立予防衛生研究所細菌部

中 村 玲 子

日本 BCG 研究所

大久保 華 子 ・ 岡 沢 豊 ・ 丹 野 和 信

極東製薬工業株式会社

林 公 子 ・ 田 村 俊 秀

兵庫医科大学細菌学

藤 野 忠 彦

国立療養所南横浜病院

受付 平成 8 年 3 月 14 日

受理 平成 8 年 5 月 30 日

DETECTION OF RIFAMPICIN-RESISTANT STRAINS OF *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS BY A NON-RADIOACTIVE PCR-SSCP METHOD

Toshio YAMAZAKI*, Shinji HAGA, Reiko M. NAKAMURA, Hanako OOKUBO, Yutaka
OKAZAWA, Kazunobu TANNO, Tomoko HAYASHI, Toshihide TAMURA,
and Tadahiko FUJINO

(Received 14 March 1996/Accepted 30 May 1996)

PCR-SSCP method to detect genetic mutations in *rpoB* gene as a marker of rifampicin-resistance was developed by Telenti et al., and we have modified it applying non-radioactive PhastSystem for more practical use in the detection of rifampicin-resistance of *Mycobacterium tuberculosis*.

PCR products amplified with the primers specific to *rpoB* gene using extracted DNA from 89 strains of *M. tuberculosis* were sequenced and the amino acid sequences were

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

morphism was determined by the PhastSystem. The bands were stained by silver staining.

Among 89 strains of *M. tuberculosis*, 43 were confirmed as rifampicin-resistant (RFP^r) and 46 were rifampicin-sensitive (RFP^s) by the culture on the drug-containing media. All of the 43 RFP^r strains had one or more mutations in the DNA sequence of *rpoB* gene, while none of the RFP^s strains had such mutations. However, by PCR-SSCP, only 20 out of 43 RFP^r strains showed clear differences in the band pattern of electrophoresis from that of RFP^s strains. Other 23 RFP^r strains had only slight differences in the band pattern of the PCR-SSCP from that of RFP^s strains. But it was noticed that the main bands of RFP^r strains were distinguishable from the main bands of RFP^s strains even their patterns were similar. Thus, it is possible to apply a non-radioactive PCR-SSCP for the detection of rifampicin resistance of *M. tuberculosis* with further improvement of the condition of gel electrophoresis or staining techniques.

Key words: PCR-SSCP, Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, RNA polymerase subunit β gene (*rpoB*), PhastSystem, rapid screening method

キーワード: PCR-SSCP, リファンピシン耐性結核菌, *rpoB*, ファストシステム, 迅速検出法

緒言

結核菌は分裂速度がきわめて遅く、現行の分離培養法¹⁾では菌を得るのに4～8週間を要し、分離菌の同定、ひいては治療方針決定が遅れ、患者の治療、予防医療にも極めて不利益である。結核菌の分離・同定は、卵培地にかわる液体培地を用いた BACTEC 法²⁾、DNA プローブ法³⁾⁴⁾、DDH 法⁵⁾⁶⁾などにより迅速化が進められてきた。最近、MTD (中外製薬)、Amplicor (日本ロッシュ) のキット化により核酸増幅法をもちいて臨床検査室においても患者の検体より直接結核菌を証明することが可能となった⁷⁾⁸⁾。しかし、核酸増幅法により結核菌の存在が証明されても、治療に必要な薬剤感受性は不明であるため分離培養は現段階では不可欠である。薬剤感受性試験は、菌分離後さらに2～3週間を要し、治療方針決定に関する状況は核酸増幅検査法開発前と少しも変わっていない。

結核菌の薬剤耐性に関与している遺伝子を PCR によって検出しようとする試みは、リファンピシン (RFP) の *rpoB*^{9)~14)}、イソニアジド (INH) の *katG*¹⁵⁾、ストレプトマイシン (SM) の *rpsL*、*rrs*¹⁶⁾などの遺伝子を標的とした研究の報告がある。

これらの報告では PCR 産物のシーケンス、RFLP、放射能標識による PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP)¹⁷⁾を用いて耐性遺伝子変異の有無の検出を行うが、いずれも、一般の臨床検査室において簡単にできる方法ではない。

われわれは、突然変異の検出系として開発された PC

R-SSCP 法をラジオアイソトープを使用しない Phast SystemTM (Pharmacia Biotech 社) による迅速な検出方法¹⁸⁾に適用して RFP 耐性結核菌検出を試みた。これは、薬剤感受性試験法の迅速化のために、一般臨床検査室でも実施可能な迅速、簡単、かつ正確な方法の開発を目的として検討したものである。また、結核菌の RNA polymerase subunit β (*rpoB*) の一部のシーケンスを行い、Telenti らの報告と比較したのであわせて報告する。

材料と方法

1. 供試菌

結核菌と同定されている当研究室保存菌株および国立療養所南横浜病院にて分離された臨床分離菌の計89株を用いた。供試菌株の薬剤感受性は、すべて薬剤感受性試験用スペクトル培地 (極東製薬) を用い、指示にしたがって2週間で判定した。

RFP 感受性菌は1%小川培地2～3週培養菌を、RFP 耐性菌は、RFP 50 μ g/ml 含有1%小川培地3週培養菌を用いた。

2. DNA の抽出

標準株 DNA は、小川培地上の菌塊1白金耳を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、沈渣をプロティナーゼ K (1mg/ml) を含む10mM Tris · HCl - 1mM EDTA 緩衝液 (pH 8.0) 400 μ l に懸濁し37℃1時間反応させた。これに

SDSを終末濃度1%に添加, 60℃2時間反応させた後, フェノール/クロロホルム処理, エタノール沈殿, 乾燥後, 滅菌精製水50 μ lに溶解した。およそ50ngのDNAをPCRに用いた¹⁹⁾。臨床分離菌は, 1白金耳の菌塊を10mM Tris·HCl-1mM EDTA-1% TritonX 100緩衝液(pH8.0) 100 μ lに懸濁100℃30分間加熱, 冷却後, 12,000回転10秒間遠心分離した上清3 μ lをPCRに用いた^{20) 21)}。

3. PCR

PCRはサーマルサイクラー(日本ジェネティックス)を用いて行った。プロメガ社の耐熱性ポリメラーゼを用い, 反応液組成は同社指示に従ったが, 反応系は, 総量50 μ lを用いた。供試DNAは, Telentiらが報告⁹⁾したプライマーTR-8(5'-TGACGTCGCGGACCTCCA-3'), TR-9(5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT-3')を用い, 熱変性94℃1分間, アニーリング55℃2分間, DNAの合成72℃1分間の条件で30サイクルの増幅を行わせ, 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って157bpのバンドを確認後, PCR-SSCPを行った。Williamsらが報告¹²⁾したプライマーRif-1(5'-CAGACGTTGATCAACATCCG-3'), Rif-2(5'-TACGGCGTTTCGATGAAC-3')を用い, 熱変性94℃1分間, アニーリング60℃2分間, DNAの合成72℃1分間の条件で30サイクルの増幅を行わせ, 2%アガロース電気泳動, エチジウムブロマイド染色によって305bpのバンドを確認後, シークエンスをした。また, *M. tuberculosis* H37Rvの*rpoB*の塩基配列より sense プライマー YR-1(5'-AGTTCTTCGGCACCAGCCA-3'), antisense プライマー YR-2(5'-CTCACGTGACAGACCGCC-3'), YR-3(5'-GGCACGCTCACGTGACAGA-3')を設計し PCR-SSCP を実施した。ちなみに PCR 増幅 DNA は, プライマー YR-1, YR-2 を用いた時には112bp がプライマー YR-1, YR-3 を用いると119bpのサイズが増幅された。

4. PCR-SSCP

プライマー TR-8, TR-9 を用いて増幅した PCR 産物 1 μ l に等量の変性液 (95%ホルムアミド, 20mM EDTA, 0.05%プロモフェノールブルー, 0.05%キシレンシアノール) を加え, 混合し95℃で5分間加熱後直ちに氷冷し1本鎖のDNAとした。

PhastGel homogeneous 12.5およびPhastGel native buffer stripsを用いたPhastSystemの電気泳動により, 1本鎖PCR産物(0.3 μ l~0.5 μ l)を分離した。試料を添加する前にPhastGelの前泳動を行い,

その後30分間の本泳動を実施した。バンドの検出はPhastGel Silver Stain Kitを用い, PhastSystem Development Techniqueに従って銀染色を行った。PhastSystemの機材は, いずれもPharmacia Biotech社製を用いた。

5. *rpoB*の部分シークエンス

DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit (P/N 401150, Applied Biosystems Japan) 使用によるサンガーのダイデオキシ法を用いてシークエンスを行った。すなわち, プライマー Rif-1, Rif-2 を用いた PCR 増幅産物を QIAquick spin PCR Purification Kit (ファナコシ株式会社) を用いて精製したものをテンプレートDNAとし, プライマー Rif-1 あるいは Rif-2 を用いてキットの指示に従い反応液を調製した。GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer CetusCo.) を用い, 96℃15秒, 50℃1秒, 60℃4分間を1サイクルとし25サイクル行い, 反応停止側である ddNTP に4色の蛍光色素標識をした。シークエンス反応終了後フェノール/クロロホルム抽出, エタノール沈殿により未反応の蛍光色素を除去精製した。沈殿をローディングバッファー(50mM EDTAと脱イオン化ホルムアミド1:5混合液)に再溶解し, 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems Japan) にて電気泳動, データの解析を行った。

結 果

1. PCR-SSCP による RFP 耐性菌の電気泳動パターン

PhastSystem による電気泳動後, PhastSystem Development Technique に従って銀染色し1本鎖DNAの検出を行ったものを図1に示す。第1レーンは, サイズマーカーであるが, 通電を止める目安とした。最先端のバンドは, dsDNAで157bpのバンドである。603の矢印付近に3本のバンドが見られた。2本は157塩基のssDNAで, 1本は分離したssDNAの一部が再結合したバンドである。RFP感受性菌である *M. tuberculosis* H37Rv は, 第2レーン, *M. bovis* BCG-Tokyo は, 第8レーンである。RFP耐性菌は, 第3レーンから第7レーンまでであるが感受性菌のパターンと違いがみられた。

2. PCR-SSCP による RFP 耐性結核菌の検出

当研究室保存結核菌株および臨床分離株の計89株について前述したようにPCR-SSCPを行いRFP耐性菌の検出を試みた。その結果を表に示す。PCR-SSCPによる判定が, 薬剤感受性試験の結果と一致したものは, 66株であった。RFP感受性菌は46株で, 対照とした *M.*

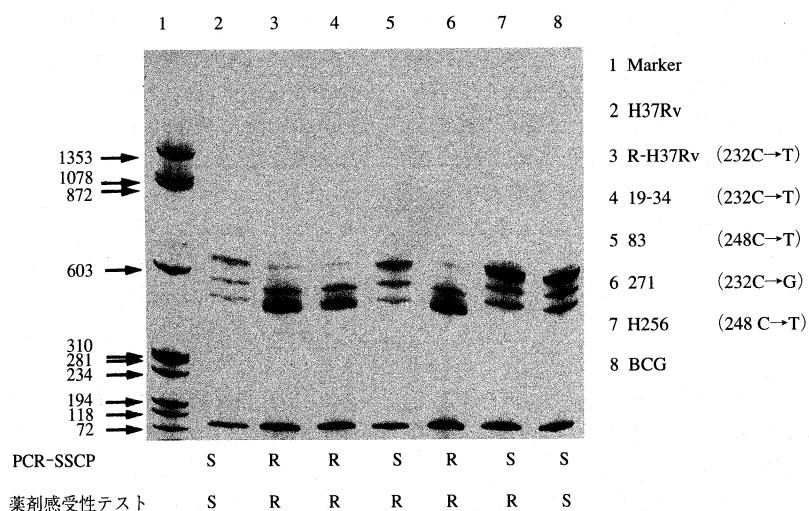


図1 PhastSystem によるプライマーTR-8, TR-9を用いた結核菌のPCR-SSCPの電気泳動パターン

レーン1: マーカー, 2: 感受性標準株, 3~7: RFR耐性菌, 8: BCG-Tokyo。
() は *rpoB* の突然変異位置を示す。SはRFP感受性, Rは耐性を示す。

表 結核菌の薬剤感受性試験とPCR-SSCP判定結果との比較および *rpoB* の変異と株数

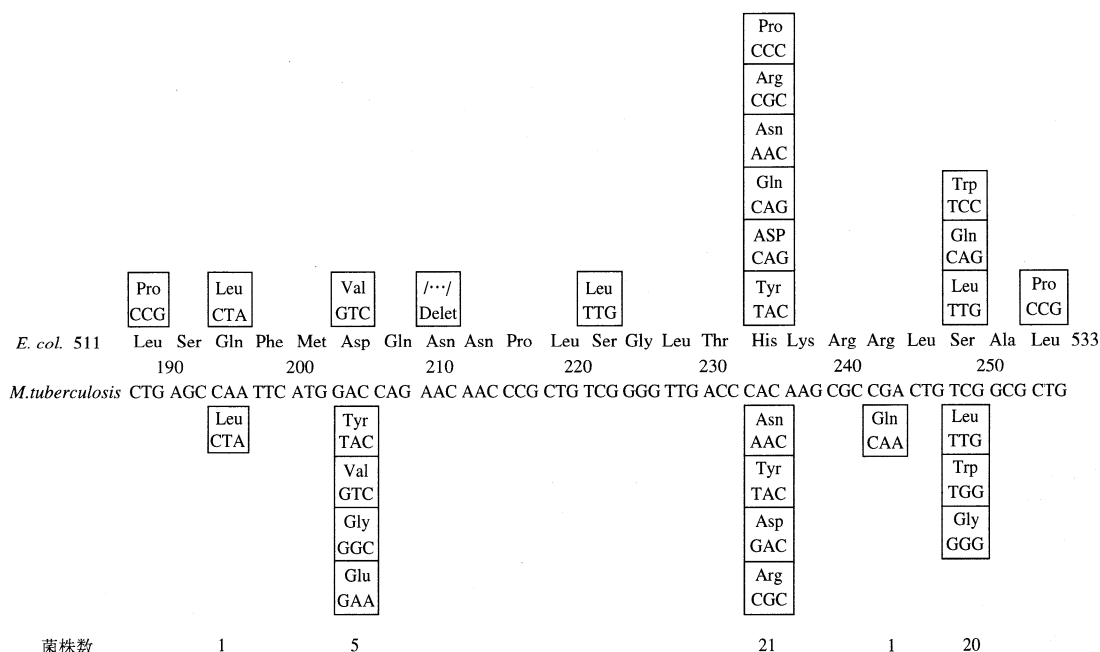
薬剤感受性 試験判定	PCR-SSCP 判 定	株数	結核菌の <i>rpoB</i> 変異位置	<i>E. coli</i> 511-533 に相当 する <i>rpoB</i> のアミノ酸 変異位置	株数
感受性	感受性	46			46
耐性	耐性	20	203A→G 232C→A, 233A→G 232C→T 232C→G 242G→A 248C→G	Asp516→Gly His526→Ser His526→Tyr His526→Asp Arg529→Gln Ser531→Trp	2 1 8 7 1 1
耐性	感受性	23	194A→T 202G→T 203A→T 232C→A 233A→G 248C→T 248C→T, 376T→C 341A→C, 347C→T 355C→A	Gln513→Leu Asp516→Tyr Asp516→Val His526→Asn His526→Arg Ser531→Leu Ser531→Leu	1 1 1 1 1 15 1 1 1

tuberculosis H37Rvの電気泳動パターンと一致した。薬剤含有培地上で発育を確認したRFP耐性菌は43株あったが、PCR-SSCPで薬剤耐性菌であると判定できた

ものは20株、判定できなかったものが23株あった。

3. RFP耐性菌 *rpoB* の塩基配列変異位置

供試菌DNAをプライマーTR-8, TR-9より広い

図2 Telenti らの報告 (上段) と著者ら (下段) 結核菌 *rpoB* の変異位置の比較

領域を増幅するプライマー Rif-1, Rif-2 を用いて増幅した PCR 産物のシーケンスを行い, Telenti らが報告した結核菌 *rpoB* の塩基配列187-255 (大腸菌アミノ酸残基番号511-533の領域に相当) と比較した結果を図2に示す。供試 RFP 耐性結核菌43株のうち, この領域に変異があったものは41株あり, 1カ所変異を起こしていたものが37株, 2カ所変異を起こしていたものが3株あった。また, この領域の変異は1カ所 (248 C → T; Ser → Leu) であるが下流にさらに1カ所 (376 T → C; Ser → Pro) 計2カ所の変異を起こしていたものが1株あった。他に, 2株はこの領域に変異がなく, 下流に1カ所 (355 C → A; Pro → Thr) 変異を起こしていたものが1株, 2カ所 (341 A → C; Glu → Ala, 347 C → T; Pro → Leu) 変異を起こしていたものが1株あった。

4. *rpoB* の変異と PCR-SSCP による RFP 耐性菌検出

PCR-SSCP による判定結果と *rpoB* の変異を比較すると, 変異位置が同じであっても変異の仕方により, 例えば232 C → T と248 C → T のように耐性菌であっても PCR-SSCP では感受性菌と判定される場合があった。

考 察

Telenti らは, 結核菌の *rpoB* のシーケンスを行い, ³²P を用いたPCR-SSCP 法によるオートラジオグラフィによって検出できたと報告している⁹⁾。しかし,

rpoB のシーケンスを行ったり, 放射ラベルしたプライマーを使う方法は, 一般の臨床検査室で簡単に応用できる方法ではない。そこで彼らもラジオアイソトープを使わない5' 側を蛍光色素でラベルしたプライマーを用いたPCR-SSCP 法を報告している¹⁰⁾。

われわれは, 銀染色法によって DNA を検出する PhastSystem を用いた。この方法は, PCR 後約2時間で結果を得ることができ, 試料の添加, 電気泳動, 銀染色の各行程が自動化されていて非常に簡便である。また, SSCP 法にとって最も重要である温度管理にも優れ, 再現性も非常によい。しかし, 薬剤耐性検査用スペクトル培地を用いた薬剤感受性試験によりRFP耐性菌と判定された株であっても, PCR-SSCP の PhastSystem による電気泳動パターンは, 感受性菌に似たパターンをとる株が43株中23株みられた。これはだれが見ても一目で違いがわかるパターンを選定したため, Telenti らのように, 耐性菌と感受性菌を交互に並べて電気泳動し, 泳動距離を拡大して比較すればもっと検出率は上がるかもしれない。しかし, 分離菌の薬剤感受性は最初からわからないのであえて厳しく判定した。

図2に示した領域の両末端に近い部分に変異をもつ株や, 表1に示したように, 変異位置が同じであっても変異の仕方により, 耐性菌であってもPCR-SSCP では, 感受性菌類似の電気泳動のパターンをとること, 特に, 248 C が T に変わっている場合は感受性類似のパターンをとることがわかった。さらに, YR-1, YR-2 およ

び YR-1, YR-3 の 2 組のプライマーを用いて PCR-SSCP を実施したが TR-8, TR-9 にて区別のつかなかった株は同様に区別がつかなかった (データ示さず)。

突然変異の検出系として開発された PCR-SSCP 法の泳動パターンは、対象とする DNA フラグメントの塩基配列に依存し、ssDNA のとり得る 3 次構造は泳動条件によって変化する¹⁸⁾。さらに詳細な泳動条件の検討により判定を容易にすべく現在検討中である。

Telenti らは、結核菌の *rpoB* のシーケンスを行い、すべての変異は、大腸菌のアミノ酸残基番号 511-533 に相当する領域に存在し、RFP 耐性菌 66 株中 64 株がこの領域の内に 1 カ所の変異を起こしていたと報告している⁹⁾¹⁰⁾。また Williams は RFP 耐性菌の 94% がこの領域に変異をもち Universal Heteroduplex Generator (UHG) 法により検出できると言っている (Personal communication)。

われわれの結果を大腸菌に相当するアミノ酸残基番号で表すと、RFP 耐性結核菌 43 株のうち、アミノ酸残基番号 511-533 の領域に変異があった株は 41 株であり、2 株はこの領域の下流に変異を起こしていた。また、1 カ所変異を起こしていたものは 37 株、2 カ所変異を起こしていたものは 3 株であった。他に、この領域の変異は 1 カ所 (Ser₅₃₁ → Leu) であるが、下流にさらに 1 カ所 (Ser₅₇₄ → Pro) 計 2 カ所の変異を起こしていたものが 1 株、この領域に変異はなかったが、下流に変異 1 カ所 (Pro₅₆₇ → Thr) 起こしていたものが 1 株、2 カ所 (Glu₅₆₂ → Ala, Pro₅₆₄ → Leu) 変異を起こしていたものが 1 株あった。

Jin らは、大腸菌の RFP 耐性は、*rpoB* のアミノ酸変異位置により cluster I (507-533), cluster II (563と573), cluster III (687) に分けられたと報告している²¹⁾。われわれの成績のアミノ酸残基番号 511-533 領域下流の変異位置は、Jin らの cluster II 部分に相当すると考えられるが、そのアミノ酸残基番号は Jin らの報告とは異なっていた。このように結核菌が RFP 耐性になるためには、*rpoB* に変異を起こし、株によっては 1 カ所ではなく、いくつかの箇所が変異を起こす場合もあることがわかった。大野ら²³⁾は、変異位置と MIC との関係を報告しているが、今回われわれが用いた RFP 耐性菌は、RFP 50 µg/ml 含有 1% 小川培地 3 週間培養菌を用いたので、変異位置と耐性の程度については不明である。

ま と め

非放射性 PCR-SSCP 法により RFP 耐性結核菌の検出を試みた。結核菌 89 株のうち現行の薬剤感受性試験と PCR-SSCP 判定結果が一致したものは 66 株であっ

た。RFP 耐性菌は、43 株中 20 株を検出できた。検出率を上げることができれば分離菌が得られたその日のうちに結果がわかる PCR-SSCP 法は RFP 耐性菌の検出に有効である。

結核菌 *rpoB* の一部のシーケンスを行い、Telenti らの報告と比較した。結核菌の RFP 耐性は、*rpoB* の 511-533 (大腸菌 Na) の 23 アミノ酸残基の領域以外に変異を起こした場合にも RFP 耐性になることがわかった。われわれの方法は、簡便ではあるが検出率に問題がある。電気泳動条件などの検討により検出率を高めることが可能と考えられ、現在検討中である。

本論文の要旨は第 70 回日本結核病学会総会 (1995 年 4 月名古屋市) にて発表した。また、研究費の一部はヒューマン・サイエンス振興財団の支援によるものである。

文 献

- 1) 室橋豊穂, 工藤祐是, 伊藤忠雄, 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. 1979; 21-30.
- 2) Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al.: Comparison of MB-Check, BACTEC, and Egg-Based Media for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1992; 30: 878-881.
- 3) Saito H, Tomioka H, Sato K, et al.: Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1694-1697.
- 4) Goto M, Oka S, Okuzumi K, et al.: Evaluation of Acridinium-Ester-Labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2473-2476.
- 5) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al.: Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. J Clin Bacteriol. 1991; 29: 1596-1603.
- 6) 山崎利雄, 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.
- 7) 青柳昭雄, 豊田丈夫, 大角光彦, 他: 核酸 (rRNA) 増幅を応用した結核菌直接検出法 (Gen-probe; MTD) の臨床的検討. 結核. 1994; 69: 7-14.

- 8) 青木正和, 片山 透, 山岸文雄, 他: PCR 法を利用した抗酸菌 DNA 検出キット (アンプリコア™ マイコバクテリウム) による臨床検体からの抗酸菌迅速検出. 結核. 1994; 69: 593-605.
- 9) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993; 341: 647-50.
- 10) 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.
- 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) Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al.: Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 2380-2386.
- 13) Honore N and Cole ST.: Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 414-418.
- 14) 大野秀明, 古賀宏延, 川野 茂, 他: PCR 法を用いた Rifampicin 耐性結核菌の迅速検出法に関する検討. 結核. 1994; 69: 773-778.
- 15) Heym B, Zhang Y, Poulet S, et al.: Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1993; 175: 4225-4259.
- 16) Honer S., and Cole ST.: Streptomycin resistance in mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 238-242.
- 17) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 1989; 5: 874-879.
- 18) 前川真人, 須藤加代子, Dey DC, 他: Single strand conformation polymorphism (SSCP) パターンに及ぼす泳動条件の影響. Jpn J Electroph. 1994; 38: 39-45.
- 19) 山崎利雄, 中村玲子: 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. 結核. 1992; 67: 441-447.
- 20) Srithararan V, and Barker Jr. RH: A simple method for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. Molecular and Cellular Probes. 1991; 5: 385-395.
- 21) Yamazaki T, and Nakamura RM: Identification of *Mycobacterium intracellulare* by a polymerase chain reaction using species-specific primers. Tubercle and Lung Disease. 1995; 76: 336-343.
- 22) Jin DJ, and Gross Ca.: Mapping and sequencing of mutations on the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. J Mol Biol. 1988; 202: 45-58.
- 23) 大野秀明, 小川和彦, 柳原克紀, 他: 結核菌臨床分離株における RFP 感受性と *rpoB* 遺伝子内の変異との関係. 結核. 1996; 71: 221.