

微生物の簡易検出法の応用 ～PCR-ICAを用いた迅速結核菌検査システムの検討～

バイオ応用室 鈴木 健
食品化学部 田中 正男
(株)三菱化学ヤトロン 阪口 勝亮

New Rapid Detection Test with Combination of PCR and Immunochromatography Assay for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Takeshi SUZUKI, Yoshiaki SAKAGUCHI and Masao TANAKA

Mycobacterium tuberculosis を原因菌とする結核は、感染早期の診断がきわめて重要であり、迅速な検査判定方法が強く求められている。我々は、PCR-イムノクロマトグラフィ法 (PCR-ICA) を応用した結核菌の迅速検出法を確立した。PCR-ICA法の最大の利点は、結果判定までの迅速性にある。そこで、短時間で菌ゲノムを抽出する方法を検討した。

また、短時間でPCRを完了できるキャピラリーPCRの応用を試みた。その結果、QIAamp DNA kitによるゲノム抽出方法とキャピラリーPCR及びPCR-ICAを用いた検出方法を組み合わせることにより、菌の検出処理を60分以内に完了できる迅速結核菌検査システムを構築した。

1. 緒言

病害微生物の検出・診断技術は、医学的な臨床診断はもとより食品製造現場や公衆衛生環境の安全管理に恒常的に用いられている。現在、診断に用いられている手法は顕微鏡による観察や細菌培養による方法が主である。ことに、公定法の大部分は培養法が用いられている。

しかし、これらの方法は、①操作が煩雑②熟練した技術が必要③結果が得られるまでにある程度の期間が必要等の問題点があった。これらの問題は、特に難培養性の菌種については顕著である。そこで、簡便かつ迅速な診断方法の開発が求められている。これらの問題点を克服するために、ゲノム解析等の研究を背景に、遺伝子工学的手法による微生物診断法が開発され、徐々に実用化されつつある。特に、病原菌遺伝子を人為的に数十万倍に増幅して検出するPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法を用いた方法は、様々な分野で利用されている。

一方、*Mycobacterium tuberculosis* を原因菌とする結核は、放置すれば重篤な症状を起こして高い頻度で死に至る感染症である。このため、感染早期の診断がきわめて重要であり、迅速な検査判定方法が強く求められている。現在、最も精度の高い検査方法は検体の塗末培養による

判定であるが、結果が判明するまでに4～6週間程度必要である。そのため、最近では遺伝子増幅法 (PCR法) を利用したアンプリコアマイコバクテリウムkit (日本ロッシュ社製、以下アンプリコアと略す) 等による検査が利用され始めている^{1) 2)}。

我々は、PCR法をベースに、より簡便・迅速に病害微生物を検出する方法として、PCR-イムノクロマトグラフィ法 (PCR-ICA) の開発を行ってきた³⁾。その結果、難培養微生物であり、簡便な臨床診断技術が求められている結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の迅速検出法を確立したので報告する。

2. PCR-ICAの原理

本方法のベースとなっているPCR法とは、病原菌から取り出した特異的な遺伝子を何十万倍にも増幅する技術である。増幅された遺伝子は電気泳動等の処理で可視化して検出する。しかしながら、電気泳動による処理には、電気泳動装置等が必要であり、通常1時間程度の処理時間が必要である。そこで、抗原抗体反応を応用したイムノクロマトグラフィを用いて増幅された遺伝子を検出する方法を考案した (図1)。

この方法では、遺伝子増幅に使用する2種類

のプライマーの一方にFITC（蛍光色素の一種）を、もう一方にビオチンをラベルしたものを使用し、PCRを行う。その結果、増幅された遺伝子はFITCとビオチンが結合した複合物となる。

一方、検出用の試験紙（テストストリップ）には、アビジン-金コロイド結合物と抗FITC抗体が塗布されており、増幅された遺伝子は、抗FITC抗体上でトラップされ、金コロイドの凝集が起こる。これにより、試験紙上に可視バンドが出現し、遺伝子の有無が確認できる。この反応は1～5分で完了し、また特別な装置も必要としないので、非常に迅速かつ簡便に判定が可能である。

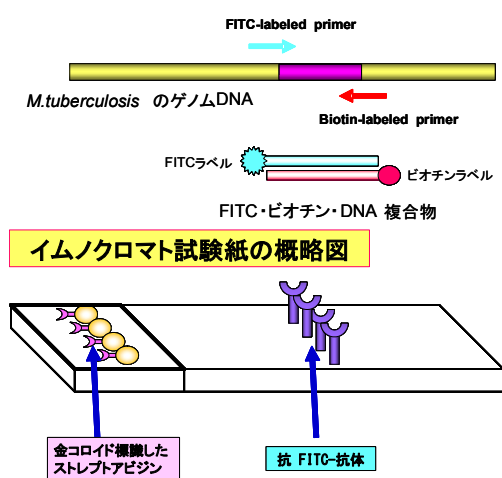


図1 PCR-ICAの概念図

3. 実験方法

3.1 PCR-ICAによる *M. tuberculosis* 検出条件の検討（試験Ⅰ）

PCR-ICA を用いて *M. tuberculosis* を特異的に検出する方法を確立し、他の検査方法の結果と比較して、その実用性を評価した。

3.1.1 供試材料

試験に用いた結核菌検体は、医療機関でアンプリコアによる遺伝子診断用にDNA抽出されたものを用いた。これらの試料については、医療機関において喀痰塗抹検査（チール・ニールセン染色）、塗抹培養検査、アンプリコアによる遺伝子診断検査が行われた。喀痰塗抹検査結果はガフキー号数で表示され、菌数の確認できない試料をガフキー 0号、菌数が多くなるに従ってガフキー10号までに判定されている。

塗抹培養検査結果は、選択培地上にコロニーが出現するまでの期間で判定され、これを材料に菌の同定が行われている。アンプリコア診断結果は、反応試薬の吸光度を測定し、-～++++の4段階で評価されている。

3.1.2 検出用プライマー

M. tuberculosis 検出プライマーには、*M. tuberculosis* DNAJ遺伝子配列を用いたものが報告されている⁴⁾。

そこで、*M. tuberculosis* のDNAJ遺伝子配列と *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium intracellulare* の配列とを比較し *M. tuberculosis* に特異的な配列部分を含むTR-C21及びTR-C2プライマーを作製した³⁾。これらのプライマーによって増幅されるPCR産物は83bpである。また、TR-C21の5'末端にはFITCをラベルし、TR-C2の5'末端にはビオチンをラベルしたものを使用した。

3.1.3 PCR条件

PCRは、0.2mlチューブを用い、95℃（30秒）の変性、55℃（30秒）のアニーリング及び72℃（30秒）の伸長反応を1サイクルとし、30サイクル行った。TaqポリメラーゼはGeneTaq（ニッポンジーン社製）を使用し、反応系は20μlで行った。なお、PCR装置はMJ Research社製PTC-200を使用した。

PCR産物の検出は、12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びイムノクロマトテストストリップにより検出した。

3.1.4 イムノテストストリップによる検出

イムノテストストリップは三菱化学ヤトロンより提供されたものを使用した。このテストストリップは、アビジン-金コロイドコンプレックスが塗布され、抗FITC抗体が固相化されている。PCR産物は、専用の希釈バッファーを用い10倍に希釈してテストストリップに滴下し、5分後に検出バンドの有無を観察した。

3.2 PCR-ICAによる検査システムに適した菌ゲノム抽出方法の検討（試験Ⅱ）

PCR-ICAを用いた結核菌方法の最大の利点は、結果判定までの迅速性にある。

そこで、PCR-ICAに用いるためのゲノム抽出方法について、各種の市販DNA抽出キットを比較し、処理時間の長さを中心に評価した。

3.2.1 供試材料

M.tuberculosis は、病原性があるため、病原性のないモデル細菌として、同じグラム陽性菌である *Bacillus subtilis* を使用した。モデル細菌は、血球計算板を用いて細菌数をカウントして、 1×10^5 個/mlに調整し供試した。

3.2.2 使用キット

ISOPLANT (ニッポンジーン社製), MagExtractor (TOYOBO社製), InstaGene (Bio Rad社製), QIAamp DNA kit (QIAGEN社製), 対照としてリゾチーム-プロテアーゼK-SDS-フェノール抽出法⁵⁾を使用した。

3.2.3 PCR条件

PCR は、16S rRNA 遺伝子増幅ユニバーサルプライマーを用い、95°C (30秒) の変性、55°C (30秒) のアニーリング及び72°C (30秒) の伸長反応を1サイクルとして30サイクル行った。Taqポリメラーゼは、Gene Taqを使用し、反応系は20 μ l で行った。PCR装置は3.1.3と同じものを使用し、PCR産物の検出は、アガロースゲル電気泳動により行った。

3.3 PCR-ICAによる検査システムにおけるキャピラリーPCR装置の利用検討(試験Ⅲ)

キャピラリーPCRは、キャピラリーガラス中に反応液を封入し、PCRを行う方法である。この方法では、PCRに要する時間が短縮される⁶⁾。

3.3.1 供試材料

試料はガフキー0号、ガフキー4号、ガフキー6号及びガフキー8号のDNA溶液を使用した。

3.3.2 PCR条件

キャピラリーPCR装置は、Idaho Technology社製Rapid Cyclorを使用した。

PCRプログラムAは、95°C (5秒) の変性、55°C (5秒) のアニーリング及び72°C (15秒) の伸長反応を1サイクルとし、PCRプログラムBは、95°C (0秒) の変性、55°C (0秒) のアニーリング及び72°C (10秒) の伸長反応を1サイクルとしてそれぞれ30サイクル行った。TaqポリメラーゼはGene Taqを使用し、反応系は20 μ l で行った。対照としては、3.1.3と同じ条件でPCRを行った。

プライマーはラベルしたTR-21及びTR-2を使用した。PCR産物の検出は12% PAGE 及びPCR-ICAを用いて行った。

4. 結果及び考察

4.1 試験 I

4.1.1 結核菌検出プライマーの特異性

TR-C21及びTR-C2プライマーを用いて *M.tuberculosis* のほか *M.avium*, *M.gordonae*, *M.kan*, *M.scrofulaceum*, *M.intracellulare* のサンプルについてPCRを行い、12% PAGEで電気泳動したところ、*M.tuberculosis* のみに特異的PCR産物が認め

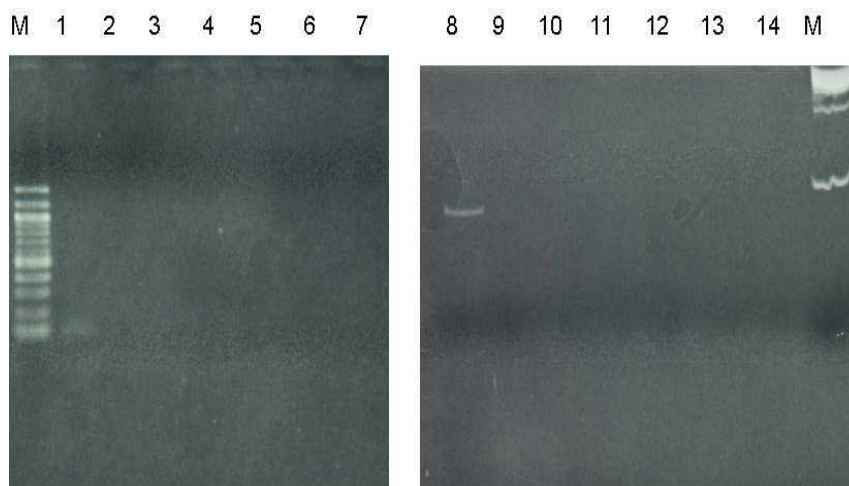


図 2 TR-C21 & C2による*M.tuberculosis*及び抗酸菌の反応

M:100bp梯子 1:*M.tuberculosis* 2:*M.avium* 3:*M.gordonae* 4:*M.kan* 5:*M.scrofulaceum* 6:*M.intracellulare*
7:蒸留水 8:*M.tuberculosis* 9:*M.avium* 10:*M.gordonae* 11:*M.kan* 12:*M.scrofulaceum* 13:*M.intracellulare*
14:蒸留水

1~7は1.5%アガロースゲル、8~14は12%PAGEによる検出

られた (図 2)。

このPCR産物を、イムノクロマトグラフィによって検出した結果、*M.tuberculosis* には極めて強い反応が見られた。また、*M.gordonae* と *M.intracellulare* に微弱な反応が認められた。

PCRのアニーリング温度条件を変更することで、イムノクロマトグラフィによる *M.tuberculosis* 及び抗酸菌の検出に与える影響を調査したところ、アニーリング温度が40℃では、*M.tuberculosis* 以外の抗酸菌からも陽性反応が認められた。これに対し、60℃では *M.tuberculosis* 以外の抗酸菌からは反応が確認できなかった (図 3)。

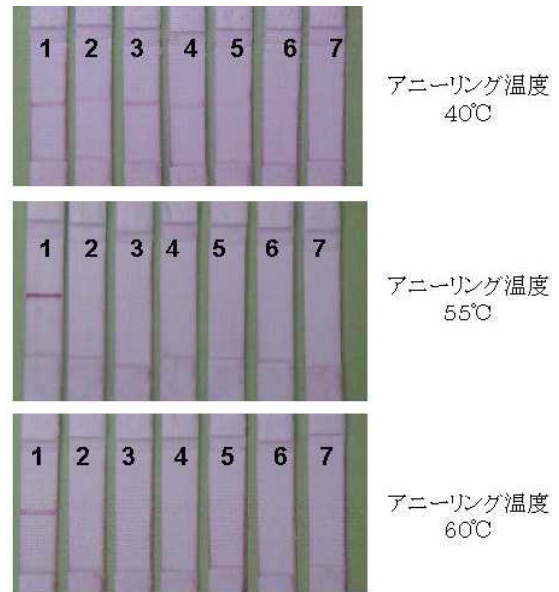


図3 アニーリング温度がPCR-ICAによる *M.tuberculosis* 及び抗酸菌の検出に及ぼす影響

1:*M.tuberculosis* 2: *M.avium* 3: *M.gordonae* 4: *M.kan*
5: *M.scrofulaceum* 6: *M.intracellulare* 7: 蒸留水

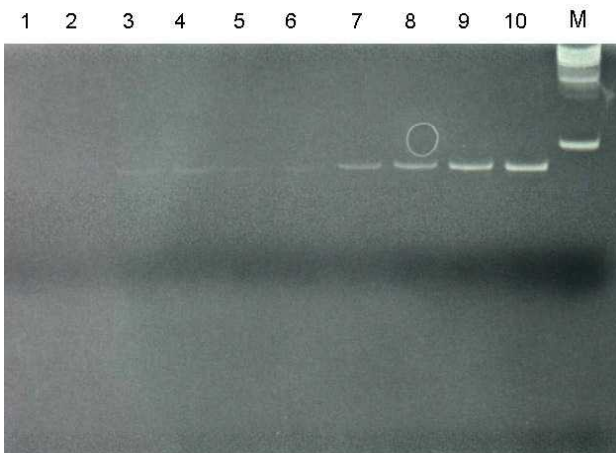


図4 TR-C21&C2プライマーによる *M.tuberculosis* の検出

1:ガフキー-0号 2:ガフキー-1号 3:ガフキー-2号 4:ガフキー-3号 5:ガフキー-4号 6:ガフキー-6号
7:ガフキー-7号 8:ガフキー-8号 9:ガフキー-9号 10:ガフキー-10号 M:100bpラダー
12%PAGE による検出

4.1.2 PCR-ICAによる結核菌検出感度の検討

TR-C21及びTR-C2を用いて、ガフキー0号～10号の *M.tuberculosis* サンプルについてPCRを行ったところ、12 % PAGEではガフキー3号以上のサンプルから特異的なPCR産物の存在が確認できた。このPCR産物を、イムノクロマトグラフィに

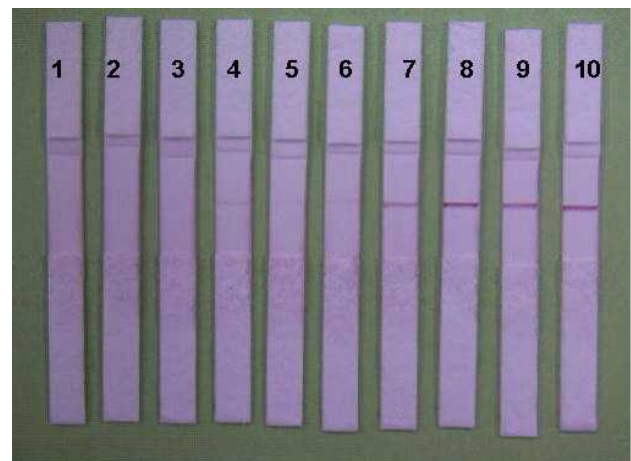


図5 PCR-ICAによる *M.tuberculosis* の検出

1:ガフキー-0号 2:ガフキー-1号 3:ガフキー-2号 4:ガフキー-3号 5:ガフキー-4号 6:ガフキー-6号
7:ガフキー-7号 8:ガフキー-8号 9:ガフキー-9号 10:ガフキー-10号

よって検出したところ、ガフキー2号以上のサンプルで反応が認められた (図 4, 図 5)。

4.1.3 PCR-ICAによる検体試料からの *M.tuberculosis* 検出

結核病患者から採取した検体試料の中で、検体番号No. 71～No. 90についてTR-C21及びTR-C2を用いてPCRを行ったところ、12 % PAGEでは、

No. 73, 77, 80, 83, 86, 87, 88の7検体が陽性であると判定された。イムノクロマトグラフィでは、No. 71, 73, 77, 80, 83, 86, 87, 88の8検体が陽性であると判定された(図6)。これらの結果は、塗抹判定, アンプリコアによる判定及び菌培養による結果とおおむね一致していた(表1)。

以上の結果から, PCR-ICA による *M.tuberculosis* の検出方法は特異性が高く, 現在準公定

法として使用されている遺伝子検査方法であるアンプリコアと同等の結果が得られることがわかった。

PCR-ICA は従来の電気泳動法に比べて極めて短時間で検査結果が得られることから, 迅速な結核菌検査システムを構築する上で有効に活用できると考えられる。

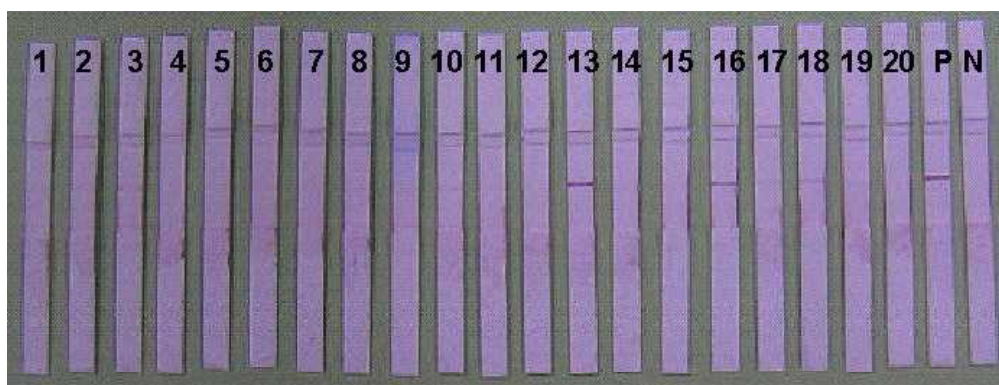


図6 PCR-ICAによる検体試料からの*M.tuberculosis* 検出

1~20:検体番号71~90 P:*M.tuberculosis* ガフキ-9号 N:蒸留水

表1 PCR, PCR-ICA, 塗抹判定, アンプリコア, 培養判定による *M.tuberculosis* 検出結果

検体番号	PAGE検出	PCR-ICA	塗抹判定 ガフキ号数	アンプリコア	培養結果
71	—	+	G0	—	—
72	—	—	G0	—	—
73	+++	++	G3	++	2W
74	—	—	G0	—	—
75	—	—	G0	—	—
76	—	—	G0	—	—
77	+	+	G0	—	—
78	—	+-	G0	—	—
79	—	—	G0	—	1W(Avi)*
80	+	+	G1	—	3W
81	—	—	G0	++	—
82	—	—	G0	—	3W
83	+++	+++	G10	++	1W
84	—	—	G0	—	—
85	—	—	G0	—	—
86	+++	+++	G8	++	1W
87	++	+	G4	++	1W
88	++	++	G6	++	1W
89	—	—	G0	—	—
90	—	—	G0	—	—

※ Avi は, 培養の結果 *M.avium* であったことを示す。

4.2 試験II

表2に菌ゲノム抽出の比較結果を示した。抽出したゲノムをPCRにより増幅したところ, Mag

Extractor及びQIAamp DNA kitは対照と同等のPCR増幅が認められた。しかし, ISOPLANTはやや増幅が劣り, InstaGeneでは検出できなかった。

抽出に必要な時間は、QIAamp DNA kitがもっとも短時間で抽出が可能であった。

供試材料を段階希釈し、MagExtractor、QIAamp DNA kit及び対照の抽出方法による検出限界を調査した（表3）。

その結果、いずれも 1×10^4 個/mlまではPCRによる検出が可能であった。

モデル細菌の高濃度試料（ 8.3×10^6 個/ml）をQIAamp DNA kit及び対照で抽出し、分光光度計によりゲノム濃度及び純度を計測した。その結果、QIAamp DNA kitは対照に比べ26%程度の

収量であったが、純度を示すA260/A280 RatioはQIAamp DNA kitが高い値を示した（表4）。

以上の結果から、QIAamp DNA kitによるグラム陽性菌からのゲノム抽出方法は、有効であることが示された。この抽出方法を用いることで、短時間で細菌ゲノムの抽出が可能になると思われる。またMagExtractorは、磁気ビーズを用いた回収キットであるが、この方法も問題なくゲノムの抽出が可能であり、結核菌DNA抽出の自動化に応用が可能と考えられる。

表2 抽出方法比較結果

	PCR検出結果	抽出に必要な時間
ISOPLANT	+	3.5 時間
MagExtractor	+++	7 時間
InstaGene	-	1 時間
QIAamp DNA kit	+++	0.5 時間
対 照	+++	3.0 時間

表3 各抽出方法による検出限界

	モデル細菌濃度			
	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2
MagExtractor	+++	+	-	-
QIAamp DNA kit	+++	+	-	-
対 照	+++	+	-	-

表4 各抽出方法によるゲノムDNA収量

	ゲノム濃度	A260/A280 Ratio
QIAamp DNA kit	5.04 $\mu\text{g/ml}$	1.95
対 照	19.48 $\mu\text{g/ml}$	1.65

表5 PCR方法の比較結果

	PAGE検出				PCR-ICA検出			
	G0	G4	G6	G8	G0	G4	G6	G8
プログラムA	-	+	+	++	-	++	+++	+++
プログラムB	-	+	+	++	-	++	+++	+++
対 照	-	++	++	+++	-	++	+++	+++

4.3 試験Ⅲ

キャピラリーPCRを用いた検出では、ラベルプライマーを用いても問題なく増幅した（表5）。

また、キャピラリーPCRは熱源としてハロゲンランプを用いており、FITCラベルに対する影響が懸念されたが、問題なくPCR-ICAによる検出が可能であった。

キャピラリーPCRでは、対照に比べてPAGEでのバンドの濃度が若干薄く、増幅効率がやや劣る傾向があったが、PCR-ICA検出の感度にはほとんど差がなかった。また、PCRプログラムの違いは影響が認められなかった。今後、キャピラリーPCRによる増幅条件の最適化を検討することにより、改善の余地があると考えられる。

キャピラリーPCRは、対照に比べて1/3～1/5の時間で反応が終了した（表6）。

キャピラリーPCRは反応液をセットする方法が煩雑であるが、きわめて短時間でPCRを完了できた。

表6 PCRに必要な時間

PCRに必要な時間	
キャピラリーPCR	
プログラムA	30 min
プログラムB	20 min
対照	100 min

5. 総合考察

以上の結果から、QIAamp DNA kitによるグラム陽性菌からのゲノム抽出方法、キャピラリーPCR及びPCR-ICAを用いた検出方法を組み合わせることにより、菌の検出処理を60分以内に完了することが可能であると考えられる。表7に示すように、従来の抽出方法（SDS-PCI）⁵⁾、PCR及び検出方法の組合せでは、340分を要したのに対して本法の組合せでは55分となり、大幅な短縮となった。

現在、結核の遺伝子検査は、初診や再発時の診断に施行するのが適切であると考えられている⁷⁾。外来患者に対応している臨床現場では、2時間以内に検査・診断を完了できる技術が求められている。供試する検体数に影響されるが、本法を利用することで臨床現場において試料採取から結果判定まで2時間以内に完了させる検査システムを構築できる可能性があると思われる。

表7 結核菌検出処理に要する時間

DNA抽出方法	SDS-PCI	QIAamp DNA kit
	180 min	30 min
DNA増幅	PCR	キャピラリーPCR
	100 min	20 min
検出方法	PAGE	PCR-ICA
	60 min	5 min
total	340 min	55 min

参考文献

- 1) 青木正和, 片山透, 山岸文雄: 結核, **69**, 593-605 (1994)
- 2) 宮地勇人, 増川敦子, 浅井さとみ: Medical Technology, **131**, 755-762 (2003)
- 3) Suzuki T, Tanaka M, Otani S, Matsuura S, Sakaguchi Y, Nishimura T, Ishizaka A, Hasegawa N: Diagn Microbiol Infect Dis., Available online 12 June 2006
- 4) Takewaki S, K Okuzumi, I Manabe, M Tanimura, K Miyamura, K Nakahara, Y Yazaki, A Ohkubo, and R Nagai: Int J Syst Bacteriol., **44**, 159-166 (1994)
- 5) 古賀宏延, 宮崎義継, 河野茂, 他: 結核, **67**, 795-802 (1992)
- 6) 山田浩二郎, 江崎孝行: 血栓止血誌, **10**, 84-91 (1999)
- 7) 日本結核病学会予防委員会: 結核, **74**, 625-652 (1999)