

[原 著]

結核菌群遺伝子増幅検査におけるコバス TaqMan MTB の有用性

赤松紀彦¹⁾・柳原克紀¹⁾・松田淳一¹⁾・木谷貴嘉¹⁾・菅原和行¹⁾
 元島舞子¹⁾・中村麻衣子¹⁾・海野 壮²⁾
 山田恭暉³⁾・上平 憲³⁾

¹⁾ 長崎大学医学部歯学部附属病院検査部

²⁾ ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

³⁾ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

(平成 20 年 7 月 4 日, 平成 21 年 1 月 28 日)

コバス TaqMan MTB (以下, TaqMan と略す) は結核菌群遺伝子増幅検査用キットとして新規に開発された。本法は TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法を原理とし, 既存のコバスアンプリコア マイコバクテリウム (以下, アンプリコアと略す) に比べて検出率の向上および PCR 阻害の軽減が期待される。そこで今回は本キットの有用性を評価するためにアンプリコアと相関性, 検出率および PCR 阻害について比較検討した。アンプリコアおよび TaqMan の全体一致率は 91.7% (100/109) であり, PCR 阻害による判定無効例を除く全体一致率は 95.2% (99/104) であった。また, 不一致であった 9 例のうち, アンプリコア陰性の 4 例は TaqMan ではすべて陽性であった。残り 5 例中の 4 例はアンプリコアでは PCR 阻害のため判定無効となったが, TaqMan では PCR 阻害は認められず, 判定は有効であった。しかし, 残り 1 例は, アンプリコアが陽性で TaqMan が陰性であった。次に, アンプリコアで結核菌群陰性と判定された検体のうち, 測定値の吸光度が 0.050 以上 0.350 未満の検体をグレーゾーン検体と定義し, その検体を用いて TaqMan で測定したところ, 5 例中 3 例 (60.0%) が陽性となった。さらに, アンプリコアで PCR 阻害のため判定無効となった 9 例について TaqMan で測定したところ, 6 例 (66.7%) で PCR 阻害が回避された。

以上のことから, コバス TaqMan MTB は既存のコバス アンプリコア マイコバクテリウムに比べて結核菌群の検出だけでなく, PCR 阻害においても優れていることが明らかとなった。今後臨床において有用性が高まるものと思われる。

Key words: 結核菌群, TaqMan, リアルタイム PCR 法

序 文

結核は依然として高齢者を中心に発病が多く, 重篤な感染症の一つとなっている。そのため, 結核症に対しては早期の診断と対策が重要であり, 検査結果の迅速性が求められている。結核菌群の同定法には従来からの培養法に加えて感度および迅速性に優れた PCR (polymerase chain reaction) 法¹⁾などの核酸増幅法を測定原理とする検査手法が用いられている。

著者連絡先: (〒852-8501) 長崎市坂本 1 丁目 7 番 1 号
 長崎大学医学部歯学部附属病院検査部
 赤松紀彦
 TEL & FAX: 095-819-7413
 E-mail: akmatsu@net2.nagasaki-u.ac.jp

これまで, 長崎大学医学部歯学部附属病院 検査部では全自動 PCR 測定装置コバス アンプリコア^{2~5)} (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて結核菌群の同定を行ってきた。コバス アンプリコアの測定原理は PCR 法と核酸ハイブリダイゼーション法を組み合わせたもので, 測定時間は約 6 時間である。一方, 新規に開発されたコバス TaqMan 48 (ロシュ・ダイアグノスティックス) の測定原理は TaqMan プローブ⁶⁾ を用いたリアルタイム PCR 法で, 測定時間はコバス アンプリコアより短く, 約 2.5 時間である⁷⁾。このように TaqMan 48 はコバス アンプリコアより迅速性に優れているが, 検出率や PCR 阻害に関して比較検討した報告は少ない。また, コバス アン

リコアの問題点として検体中のさまざまな物質により PCR の増幅阻害が生じ、その結果、判定無効となる場合が少なくないことが挙げられる^{3,5,8,9)}。

そこで、今回、我々はコバス TaqMan MTB の有用性を評価するために既存のコバス アンプリコア マイコバクテリウムと相関性、検出率および PCR 阻害について比較検討した。

対象と方法

1. 対象

2006年11月～12月に長崎大学医学部歯学部附属病院 検査部に提出された臨床検体109例（喀出痰：40，気管支鏡下採痰：24，臓器・組織：12，胸水：11，胃液：9，その他呼吸器：5，腹水：3，関節液：3，血液・穿刺液：2）および凍結保存検体14例（喀出痰：9，胃液：2，気管支鏡下採痰：1，その他呼吸器：1，静脈血：1）を含む123例を対象とした。そのうち、相関性試験には109例を用いた。また、凍結保存検体のうち、アンプリコアで結核菌群陰性であるが、吸光度が0.050以上0.350未満の5例をグレーゾーン検体と定義し、検討に用いた。さらに、アンプリコアで内部コントロールの吸光度がカットオフ値の0.350未満のため、判定無効となった9例をPCR阻害検体として用いた。

2. *N*-Acetyl-L-cystein・NaOH (NALC-NaOH) 処理

50 ml の遠沈管 (Nalgene) に検体を移したのち、喀痰などの粘液性の検体は喀痰溶解剤 (プレソルブ、日水製薬(株)) を検体量に対して5倍量加え、Vortex ミキサーで攪拌したのち、室温で10分間静置した。静置後、0.067 M (pH 6.8) の滅菌リン酸緩衝液 (以下、リン酸緩衝液と略す) をトップリングまで加え、4°C で10,000 rpm・10分間遠心した。血液を含まない検体はリン酸緩衝液で、血液を含む検体は滅菌水を加え同様に遠心した。遠心分離後、上清を捨て、滅菌水を4 ml およびNALC-NaOH 溶液 (セントラップ MB A 試薬、日水製薬(株)) を8 ml 加えた後、ボルテックスにてよく攪拌した。15分間室温で静置したのち、リン酸緩衝液をトップリングまで加え、4°C で10,000 rpm・10分間遠心した。上清除去後、リン酸緩衝液を1 ml 加えて、検体を調製した。

3. 塗抹および培養

NALC-NaOH 処理済み検体 50 μ l を用いて塗抹標本作製したのち、蛍光法 (オーラミン O) で染色し、陽性であったものはさらに Ziehl-Neelsen 染色を行い確認した。また、判定は Gaffky 号数で行った。培養

はNALC-NaOH 処理済み検体 500 μ l を用いてMGIT (mycobacteria growth indicator tube, 日本ベクトン・ディッキンソン) 法で行い、BACTEC MGIT 960 (日本ベクトン・ディッキンソン) で6週間培養した。MGIT 陽性検体は、塗抹標本作製し、蛍光染色および Ziehl-Neelsen 染色で確認したのち、キャピリア TB (日本ベクトン・ディッキンソン) およびコバス アンプリコアで結核菌群を同定した。

4. DNA の抽出および PCR 法による結核菌群の検出

結核菌群 DNA の抽出はNALC-NaOH 処理済み検体 100 μ l からアンプリコア マイコバクテリウム検体前処理試薬セット II (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いてプロトコールに従いDNAを抽出した。PCR 法による結核菌群の検出は全自動PCR測定装置コバス アンプリコアの専用試薬であるコバスアンプリコア マイコバクテリウムおよびコバス TaqMan 48の専用試薬であるコバス TaqMan MTB を用いて各々プロトコールに従い測定した。

結 果

1. 相関性試験に用いた109例の塗抹および培養結果

相関性試験に用いた109例のうち、2例が塗抹陽性(1.8%)で、ガフキー1号および2号であった。残り107例は塗抹陰性(ガフキー0号)であった。一方、培養法では109例のうち、10例が陽性(9.2%)で残り99例は陰性であった。

2. アンプリコアと TaqMan の相関性

アンプリコアおよびTaqManの相関性を検討したところ、表1に示すようにアンプリコアを比較対照とした陽性一致率は83.3% (5/6)、陰性一致率は95.9% (94/98)、判定無効一致率は20.0% (1/5)で、全体一致率は91.7% (100/109)であった。また、PCR阻害による判定無効例を除いた全体一致率は95.2% (99/104)であった。アンプリコアの陽性検出率は5.5% (6/109)であったのに対し、TaqManでは9.2% (10/109)であった。一方、陰性検出率はアンプリコアおよびTaqManで共に89.9% (98/109)であった。さらに、PCR阻害のため判定無効となった割合はアンプリコアで4.6% (5/109)、TaqManでは0.9% (1/109)であった。

3. アンプリコアと TaqMan の測定結果不一致例の解析

アンプリコアとTaqManで測定結果が不一致であった9例について解析したところ、表2に示すよう

表 1. コバス アンプリコアとコバス TaqMan MTB の相関性

		コバス アンプリコア			
		陽性	陰性	判定無効*	計
コバス TaqMan MTB	陽性	5	4	1	10 (9.2)
	陰性	1	94	3	98 (89.9)
	判定無効*	0	0	1	1 (0.9)
	計	6 (5.5)	98 (89.9)	5 (4.6)	109 (100)
一致率		100/109 (91.7)			

*PCR 阻害により判定無効

括弧内は % 表記

表 2. コバス アンプリコアとコバス TaqMan MTB の測定結果不一致例

材料	コバス アンプリコア			コバス TaqMan MTB	培養
	判定結果	測定結果*1	内部コントロール*1	判定結果	
胃液	判定無効*2	0.027	0.126	+	+
胃液	-	0.004	3.994	+	-
胃液	-	0.003	0.754	+	-
胃液	-	0.307	3.697	+	+
血液・穿刺液	判定無効	0.004	0.003	-	-
喀出痰	-	0.051	1.840	+	+
気管支鏡下採痰	判定無効	0.004	0.031	-	-
気管支鏡下採痰	判定無効	0.004	0.091	-	-
臓器・組織	+	3.151	3.694	-	+

*1 0.350 (吸光度) 以上を陽性

*2 内部コントロールの吸光度が 0.350 未満

表 3. コバスアンプリコアの陰性 (グレーゾーン) 検体におけるコバス TaqMan MTB の測定結果

材料	コバス アンプリコア			コバス TaqMan MTB	培養
	判定結果	測定結果*1	内部コントロール*1	判定結果	
喀出痰	-	0.202	3.698	-	-
喀出痰	-	0.069	0.914	+	+
喀出痰	-	0.309	1.520	+	+
喀出痰	-	0.174	3.694	-	-
胃液	-	0.132	>4.000	+	-

*1吸光度

にアンプリコアで陰性であった 4 例は TaqMan ではすべて陽性であった。また、残り 5 例中の 4 例はアンプリコアでは PCR 阻害のため判定無効となったが、TaqMan では PCR 阻害による判定無効例は認められず、そのうち 3 例は陰性であったが、1 例は陽性であった。しかし、残り 1 例は、アンプリコアが陽性で TaqMan が陰性であった。培養法との比較では、培養陽性 4 例のうち、アンプリコアでは 1 例が陽性であ

たのに対し、TaqMan では 3 例が陽性であった。さらに、アンプリコアおよび培養法が陰性で TaqMan が陽性の例が 2 例認められた。

4. アンプリコア陰性のグレーゾーン検体における TaqMan の測定結果

アンプリコアで結核菌群陰性であるが、測定値の吸光度がグレーゾーン域 ($0.050 \leq \text{吸光度} < 0.350$ と定義した) にある 5 例について TaqMan で測定したと

ころ、表3に示すように5例中3例(60.0%)が陽性となった。一方、培養法では5例中2例(40.0%)が陽性であった。また、培養陽性の2例はTaqManでも陽性であった。しかし、TaqMan陽性の3例のうち、1例は培養法が陰性であった。

5. アンプリコアの判定無効(PCR阻害)検体におけるTaqManの測定結果

アンプリコアでPCR阻害のため判定無効となった9例についてTaqManで測定したところ、表4に示すように9例中6例(66.7%)でPCR阻害が回避されたが、残りの3例はPCR阻害が回避されなかった。

考 察

109例の臨床検体を用いてアンプリコアとTaqManの相関性を検討したところ、全体一致率は91.7%(100/109)であった。また、PCR阻害による判定無効例を除いた全体一致率は95.2%(99/104)であった。渡邊ら¹⁰⁾は結核菌群陽性検体31例および陰性検体31例の計62検体を用いて両測定方法の相関性について検討したところ、全体一致率は100%と完全に一致したと報告している。また、コバスTaqMan MTBの添付文書に示してある検討結果では561例中の全体一致率は98.9%(判定無効例を除く)と報告している。今回の我々の検討結果では表1に示すように全体一致率は91.7%および95.2%(判定無効例を除く)とこれらの報告に比べて低かった。この原因を調べるため、両測定方法で結果が不一致であった9例のうちの判定無効であった4例を除く、アンプリコア陰性の4例について詳細に解析すると、この4例はすべてTaqManで陽性であり、今回我々がグレーゾーン検体と定義した吸光度の範囲内(0.050 ≤ 吸光度 < 0.350)にあるもの、あるいはPCR阻害により判定無効にはならないが、明らかに内部コントロールの吸光度から判断して、阻害が認められる検体も含まれていた(表2)。また、今回の相関性試験の検討に用いた臨床検体109例の中には2例しか塗抹陽性検体が含まれていないことを考慮すると、今回の検討は結果的に菌量が少ない陽性検体およびPCR阻害のある検体を用いての比較となった。そのためにアンプリコアとTaqManの結果に差が認められ、全体一致率が渡邊ら¹⁰⁾や添付文書の中で示されている結果に比べて低くなったと思われる。さらに、アンプリコアとTaqManの不一致例の解析結果では、1例がアンプリコア陽性でTaqMan陰性であった。この検体に関しては数回再検を行ったが、結果は変わらず今回その原因を明らかにすることができなかった。おそらくTaq-

Manプローブの結合部位の塩基変異によるものと考えられるが、今後、塩基配列の解析が必要と思われる。また、表2における胃液検体の2例および表3における胃液検体の1例に示すように培養法が陰性でTaqManが陽性という例が3例認められた。このような例はアンプリコアにおいても報告されている¹¹⁾。青柳ら¹²⁾はこのような結果の解釈として、結核治療中の例でよく見られ、化学療法後の死菌体を検出していると報告している。今回は3例すべてに抗結核薬のイソニアジド、リファンピシンおよびエタンブトールの投与がすでに行われており、治療中の検体であることから、おそらく死菌体を検出したことによるものと考えられた。

アンプリコアで結核菌群陰性であるが、測定値の吸光度がグレーゾーン域(0.050 ≤ 吸光度 < 0.350と定義した)にある5例についてTaqManで測定したところ、3例(60.0%)で陽性となった。一方、アンプリコアではTaqMan陽性の3例のうち、2例において内部コントロールの吸光度から、判定無効にはならないが、明らかなPCR阻害が認められた。このPCR阻害によるDNAポリメラーゼの増幅効率低下のため、アンプリコアでは陰性判定結果になったと思われる。また、表1の臨床検体109例の結果においてアンプリコアの陽性検出率は5.5%(6/109)、一方、TaqManでは9.2%(10/109)であった。これらの結果からTaqManはアンプリコアに比べて結核菌群の陽性検出率が高いことが明らかとなった。

アンプリコアでPCR阻害のため、判定無効となった9例について、TaqManで測定したところ、6例(66.7%)でPCR阻害が回避された(表4)。しかし残

表4. コバス アンプリコアの判定無効(PCR阻害)検体におけるコバス TaqMan MTB の測定結果

材料	判定結果 (内部コントロール)	
	コバス アンプリコア	コバス TaqMan MTB
静脈血	*** ^{*1}	判定有効
気管支鏡下採痰	***	***
喀出痰	***	判定有効
喀出痰	***	判定有効
喀出痰	***	判定有効
喀出痰	***	***
喀出痰	***	判定有効
その他呼吸器	***	判定有効
胃液	***	***

*1 判定無効

りの3例(33.3%)ではPCR阻害の回避は認められなかった(表4)。これらの検体においては今後、阻害物質の除去法やDNAの抽出方法の検討が必要であると考えられた。また、表1の臨床検体109例の結果において、アンプリコアのPCR阻害による判定無効は5例(4.6%)であったのに対して、TaqManは1例(0.9%)であった。アンプリコアにおけるPCR阻害についてThomasら⁴⁾は呼吸器検体1,012例中48例(4.7%)、Udoら⁶⁾は便検体を除く1,149例中23例(2.0%)およびBodoら⁸⁾は便検体を除く1,527例中154例(9.2%)で認められたとの報告がある。今回、我々が検討したアンプリコアのPCR阻害率は4.6%(5/109)で、これらの報告と比べて同等であったのに対し、TaqManでは0.9%(1/109)と低い値であった。これらのことから、TaqManはアンプリコアに比べて検体中に存在するPCR阻害物質の影響を受けにくいことが明らかとなった。TaqManにおけるPCR阻害の軽減は再検率の低下をもたらす、ひいてはコスト削減につながると考えられる。

最後に今回の検討においてTaqManで陽性検出率が高くなった理由として二つのことが考えられる。一つはTaqManはアンプリコアに比べてPCR阻害の影響を受けにくいこと、PCR阻害の軽減によるDNAポリメラーゼの増幅効率が相対的に高まったこと、もう一つは両検査方法のPCRのサイクル数が異なること、すなわち、塗抹陰性など菌量の少ない検体の場合には、PCRのサイクル数が多いTaqManのほうがアンプリコアより有利ではないかと考えられた。結局、この二つのことが単独あるいは重なることによってTaqManの陽性検出率が高くなったと考えられた。

以上のことから、コバスTaqMan MTBはコバスアンプリコアマイコバクテリウムに比べて結核菌群の検出だけでなく、PCR阻害においても優れていることが明らかとなった。今後臨床において有用性が高まるものと思われる。

文 献

- 1) Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, et al. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- 2) Donald, J., D. Sue, G. B. Kathleen, et al. 1996. Evaluation of automated Cobas Amplicor PCR system for detection of several infectious agents and its impact on laboratory management. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2778-2783.
- 3) Thomas, B., G. Andrea, S. Martina, et al. 1997. Evaluation of Cobas Amplicor Mtb system. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1604-1605.
- 4) Michael, B. S., S. B. John, L. W. Gail, 1997. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC 12B broth culture by the roche amplicor pcr assay. *J. Clin. Microbiol.* 35: 900-902.
- 5) Udo, R., L. Norbert, W. Hans, et al. 1998. Clinical evaluation of the automated Cobas Amplicor Mtb assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2853-2860.
- 6) Pamela, M. H., D. A. Richard, W. Robert, et al. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 7276-7280.
- 7) Desjardin, L. E., Y. Chen, M. D. Perkins, et al. 1998. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1964-1968.
- 8) Bodo, R. E., B. Andrea, S. Arthur, et al. 1998. Comparison of roche cobas amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in-house pcr and culture for detection of *M. tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2023-2029.
- 9) 白土佳子, 高山成伸, 田中洋輔, 他. 2001. COBAS AMPLICOR™法における *Mycobacterium* 属菌検出に関する各種核酸抽出法の検討. *臨床病理* 49: 608-612.
- 10) 渡邊あゆみ, 林 英子, 長田智美, 他. 2007. 結核菌群核酸増幅同定検査試薬コバス TaqMan® MTBの基礎的検討およびアンプリコア®マイコバクテリウムとの比較検討. *医学と薬学* 58: 331-337.
- 11) Abe, C., K. Hirano, M. Wada, et al. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3270-3274.
- 12) 青柳昭雄, 豊田丈夫, 大角光彦, 他. 1997. 新しい抗酸菌検査法の診断における位置づけ. *臨床と微生物* 24: 21-28.

Evaluation of the COBAS TaqMan MTB Assay in Detection of
Mycobacterium tuberculosis Complex

Norihiko Akamatsu,¹⁾ Katsunori Yanagihara,¹⁾ Junichi Matsuda,¹⁾ Takayoshi Kiya,¹⁾
Kazuyuki Sugahara,¹⁾ Maiko Motoshima,¹⁾ Maiko Nakamura,¹⁾ Tsuyosi Unno,²⁾
Yasuaki Yamada,³⁾ Shimeru Kamihira³⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Nagasaki University Hospital of Medical and Dentistry

²⁾ Roche Diagnostics K.K.

³⁾ Department of Laboratory Medicine Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

We evaluated the COBAS TaqMan MTB assay (TaqMan) in comparison with the COBAS AMPLICOR MTB assay (AMPLICOR) for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from clinical specimens. Both assays indicated the same data in 100 from 109 specimens. The four samples were TaqMan-positive and AMPLICOR-negative. In addition, four of the rest five specimens occurred in PCR-inhibition of AMPLICOR, but not in TaqMan. six specimens were escaped from PCR-inhibition in TaqMan in 9 specimens with PCR-inhibition of AMPLICOR. These results indicate TaqMan is better than AMPLICOR is a very useful for clinical diagnosis in future.