

[原 著]

コバスアンプリコアの PCR 増幅産物をテンプレートとした
Second Step PCR 法による *Mycobacterium kansasii* の検出法赤松紀彦¹⁾・柳原克紀¹⁾・松田淳一¹⁾・木谷貴嘉¹⁾・山田舞子¹⁾森 沙耶香¹⁾・山田恭暉^{1,3)}・河野 茂²⁾・上平 憲^{1,3)}¹⁾ 長崎大学病院検査部²⁾ 同第二内科³⁾ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 病態解析・診断部門

(平成 21 年 10 月 15 日受付, 平成 22 年 4 月 6 日受理)

現在, 臨床検査として実用化されている抗酸菌の核酸増幅同定検査は *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Mycobacterium avium* (*M. avium*) および *Mycobacterium intracellulare* (*M. intracellulare*) の 3 菌種に限られており, それ以外の菌種を同定するには DDH マイコバクテリア (極東製薬工業) や抗酸菌鑑別セット (極東製薬工業) を用いた方法を行わなければならない。しかし, これらの方法は培養を必要とするため, 同定までに時間がかかる。

そこで本研究では, 現状の検査室レベルで容易に導入できる簡便な方法, すなわち, 全自動 PCR 測定装置コバスアンプリコア (ロシュ・ダイアグノスティックス) の PCR 増幅産物をテンプレートとした Second step PCR 法 (本法) で *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*) の迅速検出を試みた。既存の臨床分離抗酸菌株 8 株において, 本法では *M. kansasii* の 2/2 株, その他 0/6 が陽性となった。また, 抗酸菌塗抹・培養陽性の喀出痰 35 検体において, DDH マイコバクテリアにて同定済みの *M. kansasii* 培養陽性の 7/7 検体, その他の菌種培養陽性の 0/28 検体が陽性となった。

以上のことから, 本法は塗抹陽性・コバスアンプリコア PCR 陰性検体における培養を必要としない *M. kansasii* の迅速検出法として有用であることが明らかとなった。

Key words: 非結核性抗酸菌, *Mycobacterium kansasii*, PCR

序 文

M. kansasii は非結核性抗酸菌 (Nontuberculosis mycobacteria; NTM) 症の原因菌のうち, *Mycobacterium avium* complex (MAC) について 2 番目に多く, 主としてヒトの肺結核類似症を引き起こすが, エイズ患者ではまれに播種性感染を引き起こすことが報告されている¹⁾。

臨床における *M. kansasii* の同定は生化学的性状や核酸ハイブリダイゼーションを原理とする方法で行われる。しかし, これらの方法は培養を必要とし, 一般

細菌に比べて発育速度の遅い抗酸菌では, 同定までに 1 カ月かかることも珍しくない。*M. avium* や *M. intracellulare* に関してはすでに臨床検体から直接かつ迅速に検出できる核酸増幅法が確立されているのに対して, *M. kansasii* では純培養株からの検出に関する報告^{2,3)} はあるものの, 臨床検体から直接検出する方法はほとんど報告されていない。*M. kansasii* の迅速検出は早期に患者の治療方針を決定できることから, 臨床においてたいへん有用であると考えられる。

そこで本研究では全自動 PCR 測定装置コバスアンプリコア (ロシュ・ダイアグノスティックス) の PCR 増幅産物を利用することで, 迅速かつ簡便に臨床検体から直接 *M. kansasii* を検出する方法を検討した。

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

対象と方法

1. 対象

重複患者を含まない既存の臨床分離抗酸菌株 8 株 (*M. kansasii* 2 株, *M. tuberculosis* 2 株, *M. avium* 2 株, *M. intracellulare* 2 株) および 2003 年から 2008 年に長崎大学病院検査部に提出されたもののうち, DDH マイコバクテリアにて同定済みの抗酸菌塗抹・培養陽性の *N*-Acetyl-L-Cystein-NaOH (NALC-NaOH) 処理済み喀出痰 35 検体 (*M. kansasii* 7 検体, *M. tuberculosis* 7 検体, *M. avium* 7 検体, *M. intracellulare* 7 検体, *M. chelonae* 2 検体, *M. abscessus* 2 検体, *M. goodii* 2 検体, *M. fortuitum* 1 検体) を用いた。

2. DNA の抽出

臨床分離抗酸菌株は, 0.067 M (pH 6.8) の滅菌リン酸緩衝液 1 ml に 1/2 白金耳量の菌を溶解後, 一方, 喀出痰は NALC-NaOH 処理⁴⁾後, コバスアンプリコマイコバクテリアム検体前処理試薬セット (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。

3. DNA の増幅および増幅バンドの確認

抽出した DNA 50 μ l を調製済みアンプリミックス (ロシュ・ダイアグノスティックス) 50 μ l に加え, 全自動 PCR 測定装置コバスアンプリコア (ロシュ・ダイアグノスティックス) でプロトコールに従い測定した。次に測定後の PCR 増幅産物を 1N 塩酸で中和したのち, その 100 倍希釈したものをテンプレートとして 2 μ l, 300 nM のプライマー²⁾ Mka (5'-AAT ACC

GGA TAG GAC CAC TT-3'), MkaR (5'-TCA ATC CGA GAG AAC CCG GA-3'), 1.75 mM の MgCl₂, 200 μ M の dNTPs, 1.5 U の AmpliTaq Gold, 1 \times GoldBuffer および滅菌蒸留水を加え全量を 50 μ l に調製し, PCR を行った。PCR は 94°C 4 分間反応後, 94°C \rightarrow 70°C \rightarrow 72°C を各 1 分間, 45 サイクル行い, 最後に 72°C 5 分間反応させた。PCR 終了後, 増幅産物 10 μ l を用いて 2% アガロースゲルで電気泳動を行い, エチジウムブロマイド染色をした。染色後, 307 bp の増幅バンドが確認できるものを *M. kansasii* 陽性と判定した。

4. DNA シークエンス解析

2% アガロースゲル電気泳動後の 307 bp の増幅バンドを切り出したのち, QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて DNA を精製した。DNA 精製後, Mka および MkaR をシークエンス用プライマーとして, Dye Terminator 法でサイクルシーケンスを行い, Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。この塩基配列をもとに, データベース上で各種抗酸菌の塩基配列との相同性解析を Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて検索し, 99% 以上の相同性を示すものをその菌種と決定した。

結 果

1. 臨床分離抗酸菌株 8 株の結果

M. kansasii に特異的なプライマーで PCR を行う前に, テンプレートとして用いる抗酸菌 DNA がコバ

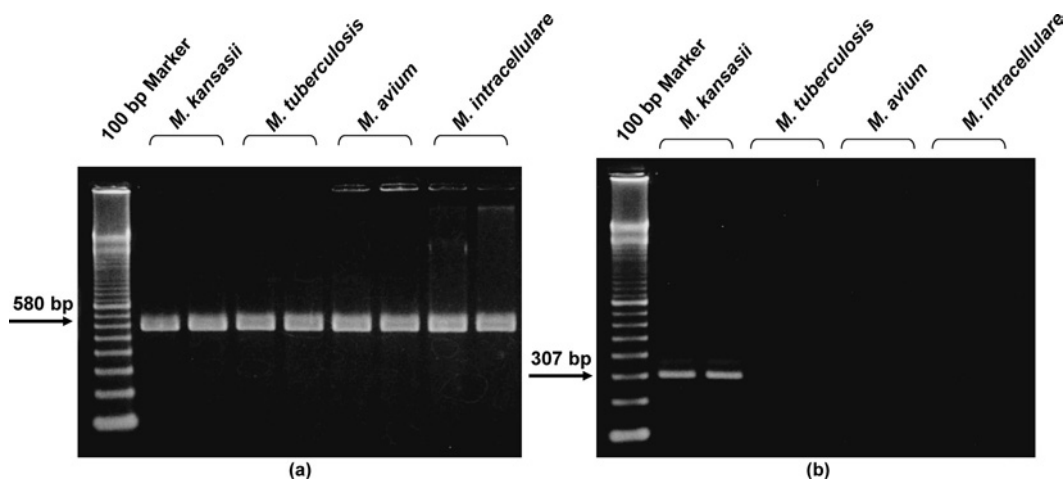


図 1. (a) 臨床分離抗酸菌株 8 株におけるコバスアンプリコア PCR 増幅産物の電気泳動結果. (b) 臨床分離抗酸菌株 8 株における *M. kansasii* の検出結果.

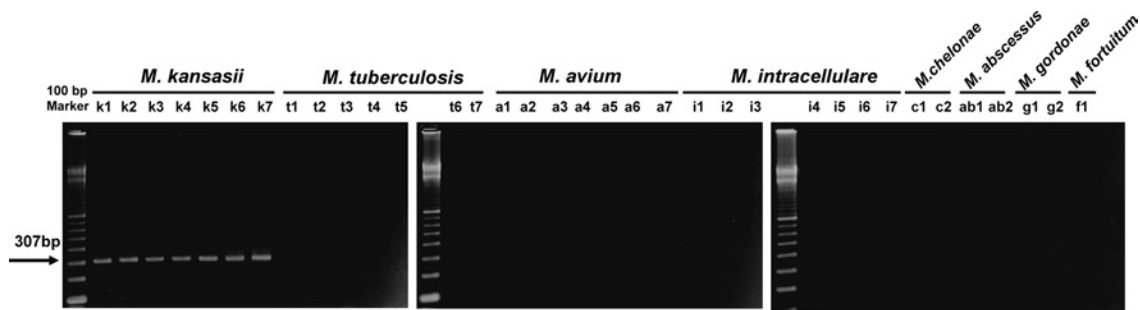


図2. 抗酸菌塗抹・培養陽性の喀出痰 35 検体における *M. kansasii* の検出結果

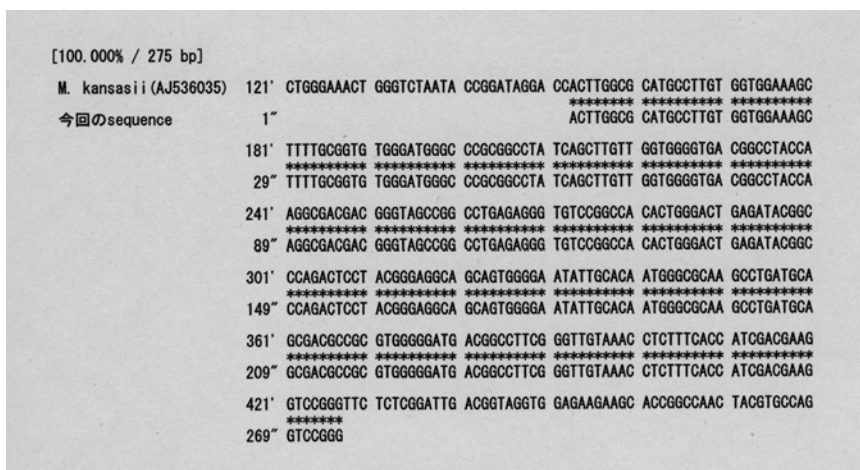


図3. *M. kansasii* 16S rRNA (Accession no. AJ536035) との相同性解析

スアンプリコアで十分に増幅されているかを確認するため、コバスアンプリコアのPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動を行った。その結果、*M. kansasii*, *M. tuberculosis*, *M. avium* および *M. intracellulare* のいずれにおいても 580 bp の増幅バンドが認められた (図1(a))。次にこの増幅産物をテンプレートにして、*M. kansasii* に特異的なプライマーである Mka および MkaR を用いて PCR 後、電気泳動を行ったところ、図1(b)に示すように *M. kansasii* のみ 307 bp の増幅バンドが認められた。

2. 抗酸菌塗抹・培養陽性の喀出痰 35 検体の結果

DDH マイコバクテリアで同定済み *M. kansasii* 陽性の 7 検体はすべて 307 bp の特異的増幅バンドが認められた。一方、*M. kansasii* 以外の NTM 陽性検体 28 検体では増幅バンドは認められなかった (図2)。

3. DNA シークエンス解析の結果

本法陽性検体の 307 bp の増幅バンドのうち、シー

クエンスができた 275 bp の塩基配列について BLAST を用いて相同性解析を行ったところ、*M. kansasii* と 100% 一致した (図3)。

考 察

コバスアンプリコアに用いられているプライマーは基本的には抗酸菌属の 16S rRNA を検出するもの⁵⁾であるため、図1(a)に示すように臨床分離抗酸菌 8 株のすべての菌種に 580 bp の増幅バンドが認められた。しかしながら厳密には抗酸菌以外にも *Corynebacterium* 属、*Nocardia* 属および *Rhodococcus* 属の一部の菌種で増幅されることが報告されている⁵⁾。したがって、コバスアンプリコアの増幅産物の電気泳動で増幅バンドが認められても、抗酸菌でない場合もある。当院においては抗酸菌塗抹陽性かつコバスアンプリコア PCR 陰性検体に限ってのみ、電気泳動で 580 bp の増幅バンドを確認したうえで、検査を行って

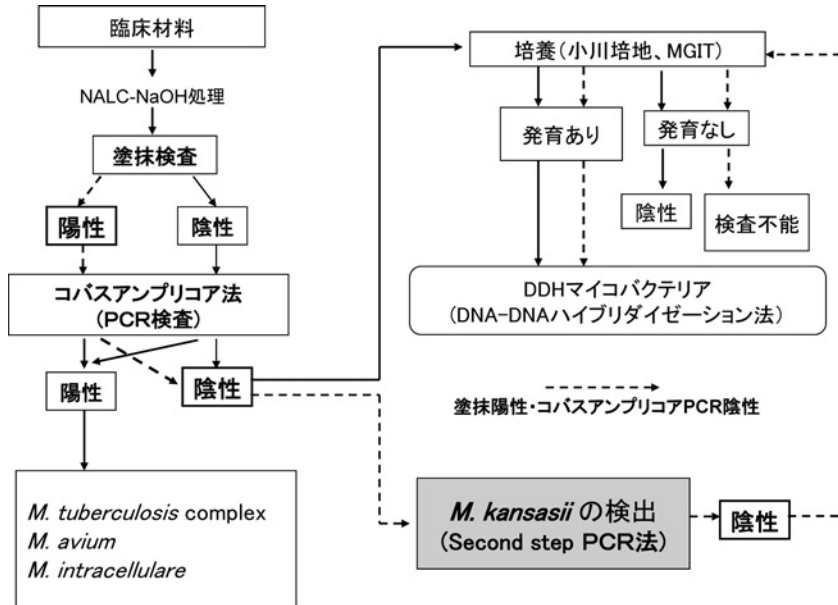


図4. 本法導入後の当院における抗酸菌同定検査の流れ

る。

結果には示さなかったが、テンプレートに用いるコバスアンプリコアのPCR増幅産物の最適濃度を検討したところ、原液および10倍希釈ではPCRの増幅反応阻害が生じたため、100倍希釈濃度を採用した。また、PCRのサイクル数においても、楠らの報告²⁾の条件では20サイクルであるが、非特異的な増幅バンドが認められなかったため、われわれはより検出感度を高めるために45サイクルで行っている。しかしながら20サイクルで増幅が認められず、45サイクルで増幅バンドが認められる場合があるかどうか確認はできていない。

本法陽性検体の307bpの増幅バンドのうち、シーケンスができた275bpの塩基配列についてBLASTを用いて相同性解析を行ったところ、*M. kansasii*以外にも*M. gastri*と100%一致した。*M. kansasii*と*M. gastri*は16S rRNAの塩基配列が全く同じであるため、本法の16S rRNAを標的とした方法⁶⁾では鑑別できない。結核菌検査指針2007⁷⁾によると*M. gastri*は今までに3例の報告にすぎず、国内では確かな分離例はないとされている。したがって臨床において本法で陽性となった場合、ほぼ*M. kansasii*と考えられるが、培養後のコロニーの光発色性(色調)の確認が必要と思われる。

最後に本法導入後の当院における抗酸菌同定検査の

概略を図4に示した。塗抹陽性・コバスアンプリコアPCR陰性の場合には破線で示すように、まず、*M. kansasii*の検出を行い、*M. kansasii*陰性の場合には小川培地とMGIT(Mycobacteria Growth Indicator Tube)による培養を行う。培養陽性ならDDHマイコバクテリアで同定するが、培養陰性の場合には同定検査不能となり、このような場合にはシーケンス解析による同定が必要となる。当院では最近、塗抹陽性・コバスアンプリコアPCR陰性検体が増加傾向にあることから、本法の確立は臨床への早期還元役に役立つと思われる。

以上のことから、コバスアンプリコアのPCR増幅産物をテンプレートとしたSecond step PCR法を原理とする本法は塗抹陽性・コバスアンプリコアPCR陰性検体における培養を必要としない*M. kansasii*の迅速検出法として有用であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 齊藤 肇. 2007. 第5章 抗酸菌の同定. p.54-55. 結核菌検査指針2007(日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会 編, 初版), 財団法人結核予防会, 東京.
- 2) 楠 伸治, 村田 豊, 南出和喜夫, 他. 1993. 2段階PCR法による喀痰中の*Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*および*M. kansasii*の検出. 感染症学雑誌 68: 42-49.

- 3) Bruce, C. R., J. Kathy, Y. Miao, et al. 1992. Identification of a genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J. Clin. Microbiol. 30: 2930-2933.
- 4) 赤松紀彦, 柳原克紀, 松田淳一, 他. 2009. 結核菌群遺伝子増幅検査におけるコバス TaqMan MTB の有用性. 日本臨床微生物学雑誌 19: 84-89.
- 5) Vincent, J. T., L. H. Peter, D. Allen, et al. 1996. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR amplification with pan-*Mycobacterium* primer and hybridization to an *M. tuberculosis*-specific probe. J. Clin. Microbiol. 34: 918-923.
- 6) Philip, K., S. Burkhard, V. Ulrich, et al. 1993. Genotypic identification of *Mycobacteria* by nucleic acid sequence determination: Report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. 31: 2882-2889.
- 7) 齊藤 肇. 2007. 第 5 章 抗酸菌の同定. p. 59, 結核菌検査指針 2007 (日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会 編, 初版), 財団法人結核予防会, 東京.

Rapid and Accurate Detection of *Mycobacterium kansasii* in Sputum by Second-Step PCR Following COBAS AMPLICOR PCR

Norihiko Akamatsu,¹⁾ Katsunori Yanagihara,¹⁾ Junichi Matsuda,¹⁾ Takayoshi Kiya,¹⁾ Maiko Yamada,¹⁾ Sayaka Mori,¹⁾ Yasuaki Yamada,^{1,3)} Shigeru Kohno,²⁾ Shimeru Kamihira^{1,3)}

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

²⁾ Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University Hospital of Medical and Dentistry

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

We evaluated a rapid and accurate method for detecting *M. kansasii* in sputum. The COBAS AMPLICOR PCR was carried out on 8 strains of *Mycobacterium* (2 each of *M. kansasii*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, and *M. intracellulare*) and a total of 35 *Mycobacterium*-positive sputa (*M. kansasii*, $n=7$; *M. tuberculosis*, $n=7$; *M. avium*, $n=7$; *M. intracellulare*, $n=7$; *M. chelonae*, $n=2$; *M. abscessus*, $n=2$; *M. gordonae*, $n=2$; and *M. fortuitum*, $n=1$). Both isolated *M. kansasii* strains and all *M. kansasii*-positive sputum samples ($n=7$) were detected by second-step PCR. Moreover, there were no cross reactions to other species. Direct sequencing of the second-step PCR products in *M. kansasii*-positive sputa showed complete homology with *M. kansasii* (Accession no. AJ536035) in a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). These findings indicate that this method is rapid, accurate and can be applied to the detection of *M. kansasii* in a clinical setting.