

結核菌測定試薬の開発

益	田	昇	佳
土	屋	滋	夫
伊	澤	祐	一
徳	永		巧
近	藤	雅	英
堀	江	隆	一
保	川		清
石	黒	敬	彦

Development of a Test Reagent for Nucleic Acid Based Infectious Disease. Detection of *Mycobacterium Tuberculosis*

Noriyoshi MASUDA
 Shigeo TSUCHIYA
 Yuichi ISAWA
 Takumi TOKUNAGA
 Masahide KONDO
 Ryuichi HORIE
 Kiyoshi YASUKAWA
 Takahiko ISHIGURO

We have recently developed the TRC method that is based on a homogeneous detection system involving an INAF (intercalation-activating fluorescence) DNA probe and an isothermal RNA amplification through the TRC (transcription-reverse transcription concerted) reaction. In this paper, we report an effective test reagent for nucleic acid based infectious disease, i.e., a specific reagent to detect *Mycobacterium tuberculosis*. The target RNA of the reagent is mRNA of *Pab* DNA encoding the protein antigen b specific to *Mycobacterium tuberculosis*. Time course measurement of the fluorescence intensity at 520 nm of the reaction mixture was carried out using our trial product for real-time monitoring. Since the intensity of fluorescence was proportional to the initial amount of *Pab* standard RNA (10^2 - 10^8 copies/test), the amount of *Pab* mRNA was readily determinable from the detection time. Fluorescence enhancement was specific to the nucleic acids extracted from the sputum of the patients infected with pulmonary tuberculosis, but not so to those from the ones infected with *Mycobacterium avium* complex (MAC). The BCG cells were cultured in the presence of anti-tuberculosis drugs and after 24 h the decrease in amount of *Pab* mRNA was confirmed by the TRC method using this reagent. This results demonstrate that the TRC method is useful for detecting the viable cells and can be applied to the monitoring of the patients infected with pulmonary tuberculosis and also to the drug susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis*.

1. 緒 言

結核はこれまで減少傾向が続いてきたが、最近になって高齢者の罹患率が上がり、さらには結核感染を経験していない若年層で、集団感染を引き起こす例が増えている。1999年7月に厚生省が「結核非常事態宣言」を発表したことに象徴されるように、結核は深刻な問題となっている。

結核菌の検査法としては、培養検査が基本であるが、結核菌の発育は遅く、結果を得るのに4週間以上を必要とするケースもある。そこで結核菌群を検出する遺伝子増幅キットが開発された。現在市販されているキットは、PCR法で16S rRNAをコードするゲノムDNAを増幅し、特異DNAプローブをハイブリダイズして検出するもの（アンプリコア マイコバクテリウムツベルクローシス、ロシュ）や、同じく16S rRNAをtranscription mediated amplification (TMA)法によって増幅した後、増幅したRNAに相補的な標識DNAをハイブリダイズさせて検出するもの（DNAプローブ「中外」-MTD、中外）、結核菌群特異的の蛋白質であるprotein antigen b（以下Pabとする）をコードするPab遺伝子をligase chain reaction(LCR法)で増幅し、EIAによって検出するものなどが知られている（LCXプローブシステムM、ツベルクローシス・ダイナジーン、ダイナポット）。これらのキットは培養法に比べれば迅速ではあるが、増幅後の検出工程を必要とするため、所要時間は2時間~2日程度である。さらに、生菌、死菌の区別がつかないために、培養検査の代替としては使用されていない。また、結核菌の薬剤感受性の判定や、患者に対する治療効果を観察するには不適切であることが報告されている^{1),2)}。

われわれは、核酸のホモジニアスな検出法として、標的核酸と相補結合を形成することによって顕著な蛍光増感を与える発蛍光プローブ（INAF プローブ：intercalation activating fluorescence Probe）を開発した³⁾⁻⁷⁾。さらにわれわれは、逆転写酵素およびRNAポリメラーゼの協奏的作用によって、一定温度で標的RNAを極めて効率的に複製する転写・逆転写協奏増幅法（TRC反応：transcription-reverse transcription concerted reaction）を開発してきた⁸⁾。この2つの技術を組み合わせることにより、一定温度下にて増幅反応工程と検出工程を一段階で実施するTRC蛍光リアルモニタリング法（TRC法）を構築した^{8),9)}。

今回、このTRC法を用いて、結核菌群特異的の蛋白質Pab遺伝子に由来する、mRNAを特異的に増幅、検出

する試薬の開発を行った。さらに、これまでの結核菌群を検出する遺伝子増幅キットが成し得なかった迅速な増幅検出を実証すると共に、薬剤感受性試験への応用について検討した。

2. 材料および方法

〔1〕プライマー、プローブ

結核菌群特異的の蛋白質protein antigen b (Pab) の mRNAを増幅の標的とした。

Pab mRNAの増幅及び検出に使用したプライマーの配列とプローブの配列は以下の通りである。

- ・プロモータープライマー（DNA）

5' : AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCA
ATAGCTCTGGCAATTTCTT-3'

- ・アンチセンスプライマー（DNA）

5' : CTTTTGCCGTTGTTGACGAT-3'

- ・切断プローブ（DNA）

5' : TATTGCCTAGTTGGGCCTCGCCGA-3'

- ・発蛍光プローブ（INAFプローブ、DNA）

5' : TCGTAGTTGA*TGATCGGGTA-3'

上記のうち、プロモータープライマーの下線部はT7プロモーター配列であり、発蛍光プローブの*はインターカレーター性蛍光色素オキサゾールイエロー(YO)の修飾位置を示している。なお、切断プローブの3'末端はアミノ基で、発蛍光プローブの3'末端はグリコール酸で修飾し、それぞれからの伸長反応を防止した。これらのプライマーとプローブの配列は、特別な変性処理のない条件でもアニールできるよう、41の反応液中で標的RNAが分子内結合フリーとなる領域に設定した。さらに、Pab RNAキャリアレーターとして、鋳型DNAからの*in vitro*転写により、E. B. Hansen¹⁰⁾らが同定した塩基番号111~1436を含む1326merのRNAを調製した。

〔2〕Pab領域の標準RNAの作製

ソートン培地にて培養したBCG菌からISOPLANT（ニッポンジーン）を用いて、ゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAをテンプレートとして、PCR法によりPab遺伝子（領域：111~1436）を増幅させた。PCR増幅産物はフェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿により精製した。このDNA 10 μgを鋳型としてT7 RNAポリメラーゼにて*in vitro*転写を行った。得られたRNAをDNase処理し、フェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿、Chromaspin - 100（CLONTECH）により精製した。

PCR用プライマー配列

・フォワードプライマー

5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGA
GACCCAAGCGCGGAAATTGAAG-3'

下線部はT7プロモーター配列

・リバースプライマー

5' AGCACCAAGACCAGCGCAAG-3'

〔3〕TRC蛍光モニタリング

TRC法による測定は41の一定温度下においてFig. 1に示した操作手順に従って実施した。まず、サンプルに対してReagent mixを添加し、41に保温した後Enzyme mixを添加して反応を開始し、直ちに密閉栓を閉じてTRC蛍光モニターにセットした。TRC蛍光モニターの励起波長は470nm、蛍光検出波長は520nmである。

〔4〕臨床検体からの核酸抽出

結核菌の塗抹陽性、培養陽性喀痰15検体、*Mycobacterium avium* complex (MAC)の塗抹陽性、培養陽性喀痰9検体および塗抹陰性、培養陰性の喀痰3検体を用いた。

喀痰をNALC処理 (MycoPrep, BBL) した後に微細なガラスビーズ (150 - 212 μm, SIGMA) を用いて激しく振とうし、溶菌処理を行った。続いて、「EXTRAGEN」(東ソー) を用いて核酸を抽出した。

〔5〕BCG菌株の薬剤感受性試験

「日本結核病学会：新結核菌検査指針」(結核予防会、2000)の薬剤感受性試験に準拠した方法を用いた。ただし、試験用培地として小川培地のかわりにミドルブルック7H9液体培地 (BBL) を用いた。培養したBCG菌由来株を吸光度 (OD₆₀₀) 0.1となるよう7H9培地で希釈し、さらに100倍希釈した。これに抗結核薬を一種類加えた。(抗結核薬の培養液中の濃度はethambutolが2.5 μg/mL, isonicotinic acidが1 μg/mL, streptomycinが10 μg/mL, rifampicinが40 μg/mL, kanamycinが20 μg/mLである) 培養開始0, 6, 24, 48, 72, 144時間後に培養液を1mLずつ分取し、遠心して集菌した。続いて、4Mチオシアン酸グアニジン溶液150 μLに懸濁し、上記〔4〕の方法により核酸を抽出し、TRC蛍光モニタリングを行った。

3. 結果および考察

〔1〕TRC蛍光モニタリングによるPab m RNAの検出

Fig. 2はTRC蛍光モニターを使用し、Pab RNAキャリアプレーターをサンプルとして測定したTRC蛍光モニタリングの結果である。横軸の時間原点はTRC増幅反応の開始時間であり、Enzyme mixの添加時点に相当する。また、縦軸の蛍光強度比は反応時間原点の蛍光強度 (バックグラウンド蛍光) に対する各時間の蛍光強度の比を表している。

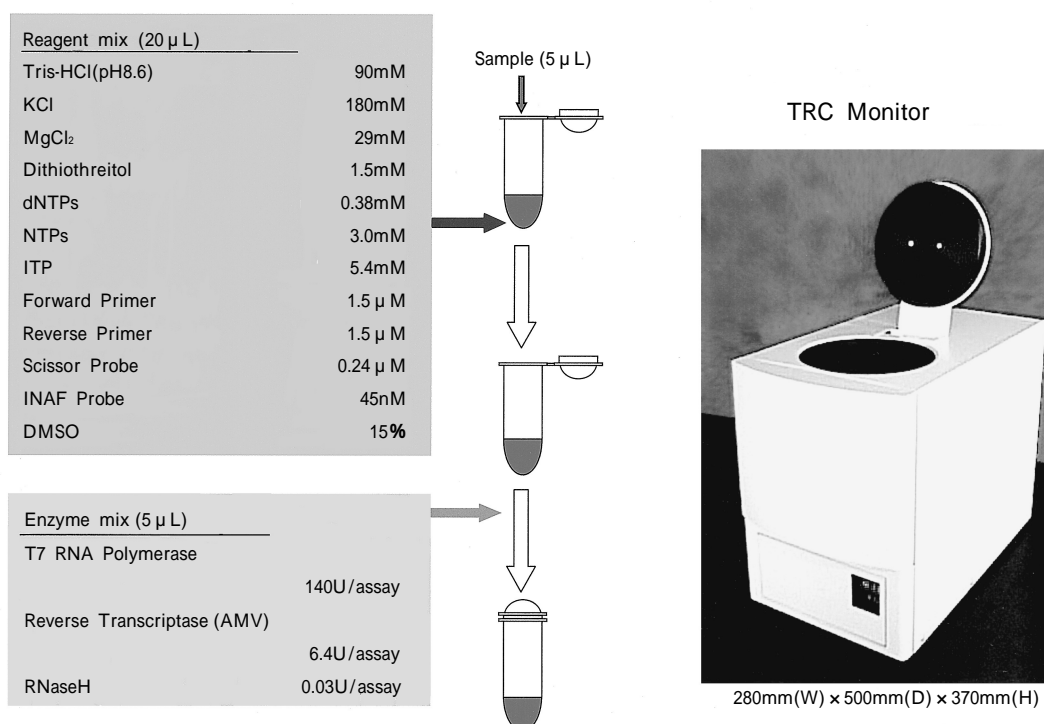


Fig. 1 TRC protocol. Fluorescence intensity of the reaction mixture is measured using an instrument named TRC monitor. The reagent and enzyme mixtures were added to a sample in this order.

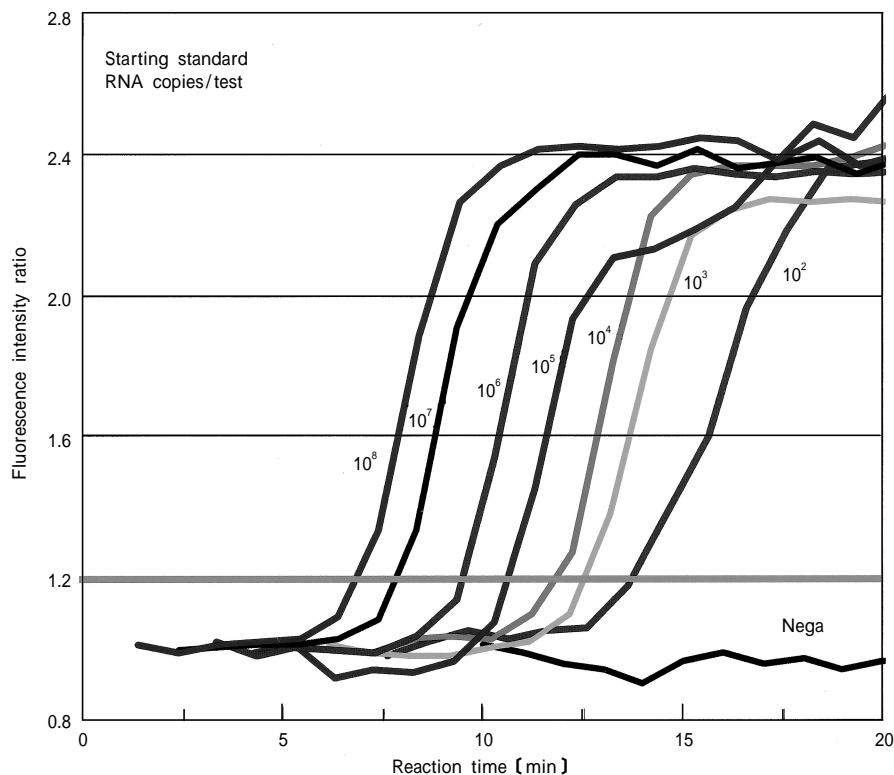


Fig. 2 Profile of fluorescence enhancement of starting copies of *Pab* standard RNA. A broad line shows the cut-off value corresponding to a fluorescence intensity ratio of 1.2.

Fig. 2 に示すように、反応液中に標的RNAが存在しない場合、蛍光信号は一定値(バックグラウンド蛍光)で推移した。これに対し、反応開始前の*Pab* RNA量が 10^2 コピーの場合、約14分で蛍光強度比の立ち上がりが認められた。今回構築した検出系によって極めて短時間に高感度分析が可能であることが示された。また、蛍光信号の立ち上がり時間と標的RNAの初期コピー数の間には相関が認められ、立ち上がり時間と初期コピー数から検量線を作成することにより定量的な分析も可能と考えられた。Fig. 3 に*Pab* mRNAキャリブレーターをサンプルとして測定した際に得られた蛍光プロファイル (Fig. 2) から、初期コピー数と蛍光信号の立ち上がり時間の関係を示した。蛍光信号の立ち上がり時間は蛍光プロファイルにおいて蛍光強度比がカットオフ値1.2に設定して算出した。Fig. 3 から分かるように定量分析の可能性を示された。

(2) 臨床材料からの検出

患者の喀痰から核酸を抽出し、本測定試薬を用いてTRCモニタリングを行った。Fig. 4 に示したように、結核患者の喀痰はTRC蛍光モニタリングで14検体が陽性、1検体のみ陰性であった。結核陽性サンプルの立ち上がり時間のばらつきは喀痰中に含まれる結核菌数を反映しているものと思われる。ただし、喀痰からの

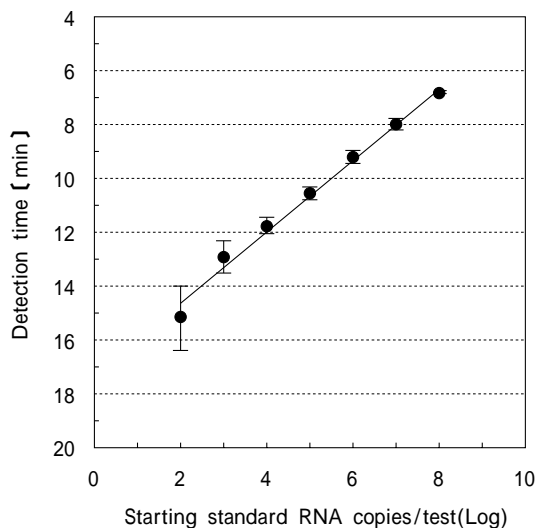


Fig. 3 Calibration curve. Detection time, which corresponds to a time reaching the cut-off value, is plotted against the logarithms of starting copies of *Pab* RNA (10^2 - 10^8 copies). Error bars mean \pm SD.

増幅反応障害物の持ち込みの可能性も考えられ、今後の検討課題である。MAC陽性の9検体は、いずれも陰性であり、本測定試薬は結核菌特異的であることが示された。

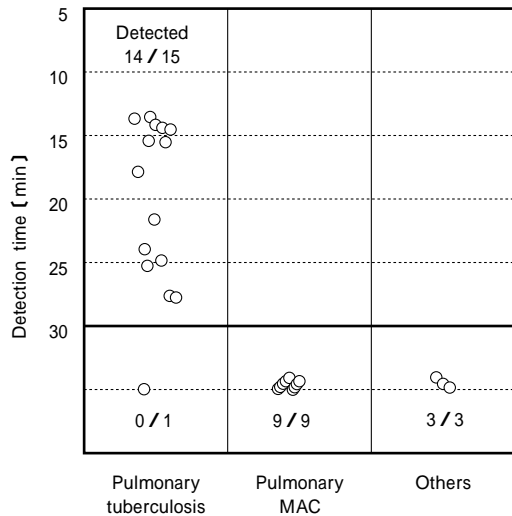


Fig. 4 Detection of *Pab* mRNA in nucleic acids extracted from the sputum of the patients infected with pulmonary tuberculosis, pulmonary *Mycobacterium avium* complex (MAC) and others.

〔3〕薬剤感受性試験への応用

今回、結核菌のモデルとしてBCG菌株を薬剤存在下で培養し、本測定試薬を用いたTRC蛍光モニタリングにより、BCG菌の*Pab* mRNAのコピー数を求め、時間変化を示した (Fig. 5)。グラフの縦軸は抗結核薬未添加の*Pab* mRNAコピー数を1として、各抗結核薬存在下で培養したBCG菌の*Pab* mRNAコピー数の相対値を示した。いずれの抗結核薬を用いたときも*Pab* mRNAのコピー数は24時間程度で激減し、サン

プル採取終了時の144時間まで低い値のまま推移した。なお、Streptomycin, Rifampicin, Kanamycinを添加したものについては6時間後に既に*Pab* mRNAの発現量の低下が見られ、Ethambutol, Isonicotinic acidは24時間後に低下が見られたが、これは抗結核薬の菌体への作用機構の違いを示していると思われる。

Fig. 6は抗結核薬未添加あるいはKanamycinを添加して培養したBCG菌株からの核酸抽出物中の*Pab* DNAをPCR法で増幅し、電気泳動をしたときのパターンである。抗結核薬未添加及びKanamycin添加のBCG菌からの核酸抽出物で同時に*Pab*のDNAが増幅され、薬剤感受性を反映しないことが示された。

現在行われている薬剤感受性試験では、小川培地などの固体培地を用いた培養法で3週間程度、ミドルブルック7H9培地を用いた液体培養法 (MGIT, BACTEC) などでも検体採取から判定まで2週間から3週間程度を要する。薬剤感受性試験はTRC蛍光モニタリング法の応用として期待されるが、各種薬剤耐性の結核菌を用いた検討が今後の課題である。

4. おわりに

以上のように、結核菌群特異的蛋白質*Pab*のmRNAを特異的に増幅する試薬を開発した。本試薬は初期コピー数 10^2 コピーの*Pab* RNAを約14分で検出可能であった。また、蛍光強度の立ち上がり時間から未知試料中の*Pab* mRNAの初期コピー数を推算することがで

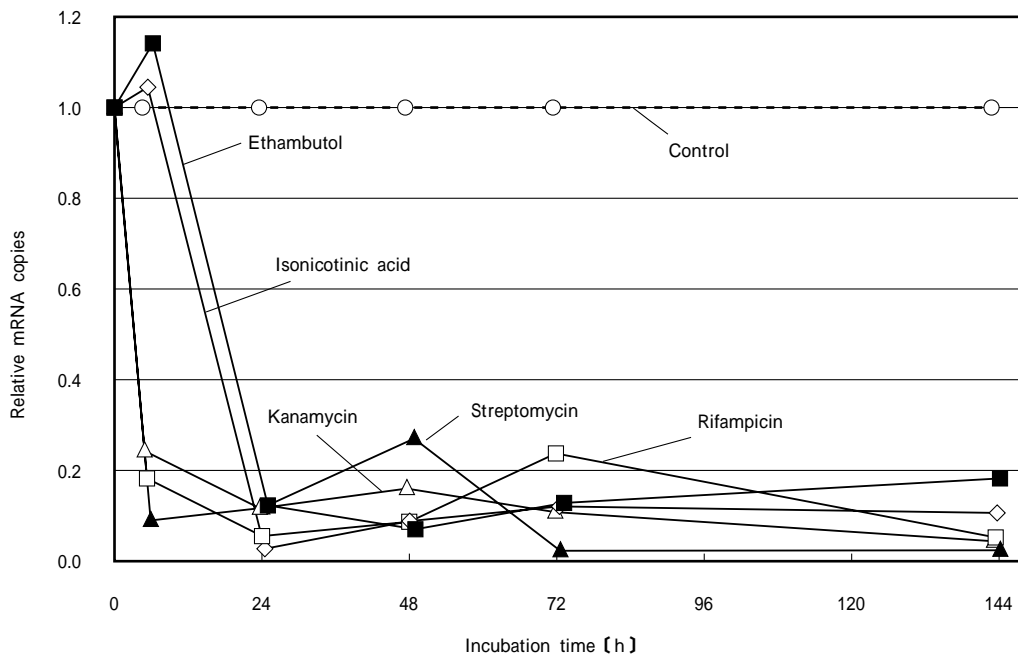


Fig. 5 *Pab* mRNA from BCG cultured in the presence of drugs. The BCG cells were cultured in the presence or absence of an anti-tuberculosis drug. The amount of *Pab* mRNA in 1 mL of the culture liquid is determined by the TRC method and shown as the relative values against those obtained in the absence of drugs.

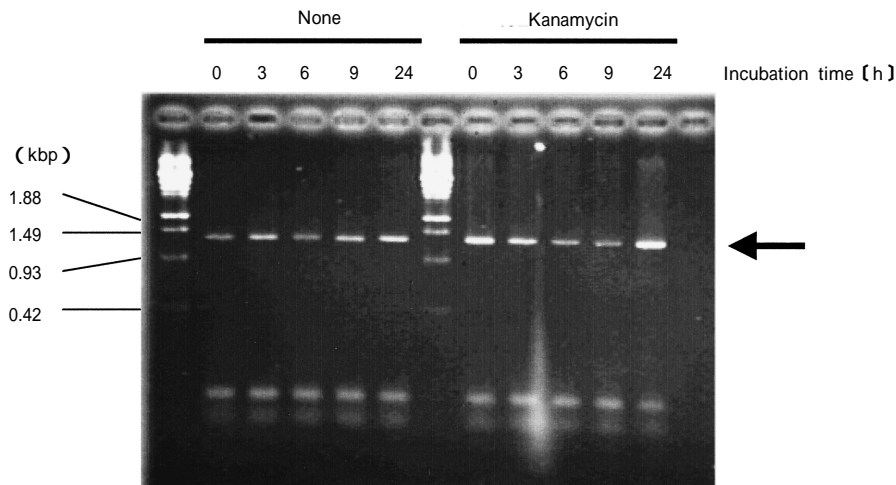


Fig. 6 Electrophoresis of PCR products. *Pab* DNA was amplified by PCR from the nucleic acids extracted from BCG cells, cultured in the presence or absence of kanamycin (20 μ g/mL) for a given hour, and then subjected to 1.5% agarose gel treatment. The arrow indicates the amplified *Pab* DNA.

き、さらに実検体を用いた検討では、本測定試薬は結核菌特異的であることを示した。また、薬剤感受性試験への応用の可能性を示した。

今後、喀痰からの高効率な核酸抽出法の確立および喀痰中の増幅反応阻害物の除去の検討を行い、本測定試薬を結核菌定量試薬として上市することを目指していく。

文 献

- 1) 山根誠久, 医学のあゆみ, 198, 195 (2001)
- 2) 臨床と微生物 増刊号, 26, 565 (1999)
- 3) 斉藤寿一, 石黒敬彦, 東ソー研究報告, 41, 13 (1997)

- 4) T. Ishiguro *et al*, *Nucleic Acids Res.*, 24, 4992 (1996)
- 5) 石黒敬彦, *Jpn. J. Electroph.*, 41, 293 (1997)
- 6) T. Ishiguro *et al*, *Nucleic Acids Symposium Series*, 39, 39 (1998)
- 7) T. Ishiguro *et al*, *Nucleic Acids Symposium Series*, 44, 191 (2000)
- 8) 田谷敏貴, 斉藤寿一, 林 俊典, 石黒敬彦, 東ソー研究報告, 43, 1 (1999)
- 9) 林 俊典ら, 東ソー研究報告, 45, 3 (2001)
- 10) B. Andersen and E. B. Hansen, *Inf. and Immun.*, 57, 2481 (1989)

著者
氏名 益田 昇佳
Noriyoshi MASUDA
入社 平成11年4月1日
所属 科学計測事業部
TRCプロジェクトチーム
開発グループ

著者
氏名 土屋 滋夫
Shigeo TSUCHIYA
入社 平成8年4月1日
所属 科学計測事業部
TRCプロジェクトチーム
開発グループ

著者
氏名 伊澤 祐一
Yuichi ISAWA
入社 昭和63年4月1日
所属 科学計測事業部
TRCプロジェクトチーム
開発グループ

著者
氏名 徳永 巧
Takumi TOKUNAGA
入社 昭和62年4月1日
所属 有限会社東ソー分析センター東京事業部
解析・営業グループ
主任研究員

著者
氏名 近藤 雅英
Masahide KONDO
入社 昭和61年4月1日
所属 科学計測事業部
TRCプロジェクトチーム
開発グループ

著者
氏名 堀江 隆一
Ryuichi HORIE
入社 昭和61年4月1日
所属 科学計測事業部
TRCプロジェクトチーム
開発グループ

著者
氏名 保川 清
Kiyoshi YASUKAWA
入社 昭和59年4月2日
所属 科学計測事業部
TRCプロジェクトチーム
開発グループ

著者
氏名 石黒 敬彦
Takahiko ISHIGURO
入社 昭和58年4月1日
所属 東京研究所
企画管理グループ
主席研究員