

抗酸菌核酸抽出試薬 EXTRAGEN MBの開発

バイオサイエンス事業部技術部遺伝子グループ

土屋 滋夫
平本 雅晴

1. はじめに

我々は、2006年3月にTRC法¹⁾を原理とする結核菌群 rRNA検出試薬 TRCRapid M.TB²⁾を商品化し、さらに、非結核性抗酸菌検査の2製品（マイコバクテリウム アビウムコンプレックスrRNA検出試薬、マイコバクテリウム カンサッシーrRNA検出試薬）を開発中である。これら抗酸菌検査パネルの最大の特長は迅速性（測定時間30分）にあるが、本特長を活かすためには迅速な核酸抽出試薬をあわせて提供することが必須であった。しかし、結核菌検査の臨床検体を核酸抽出する場合、1) 標的であるRNAが不安定、2) 臨床検体

はTRC反応の阻害物質を含む、3) 抗酸菌は非常に硬い細胞壁を有するため核酸抽出が困難、などの問題点が想定された。これらの問題点を克服するため、検体中のTRC反応阻害物質の洗浄工程および酸化金属粒子による溶菌工程を組み合わせた核酸抽出試薬「EXTRAGEN MB」を開発した。

2. 抗酸菌核酸抽出試薬「EXTRAGEN MB」の概要

2.1 キットの原理、特長、主要成分

図1に本キットのプロトコルを示した。本キットは界面活性剤を主成分とする洗浄試薬と酸化ジル

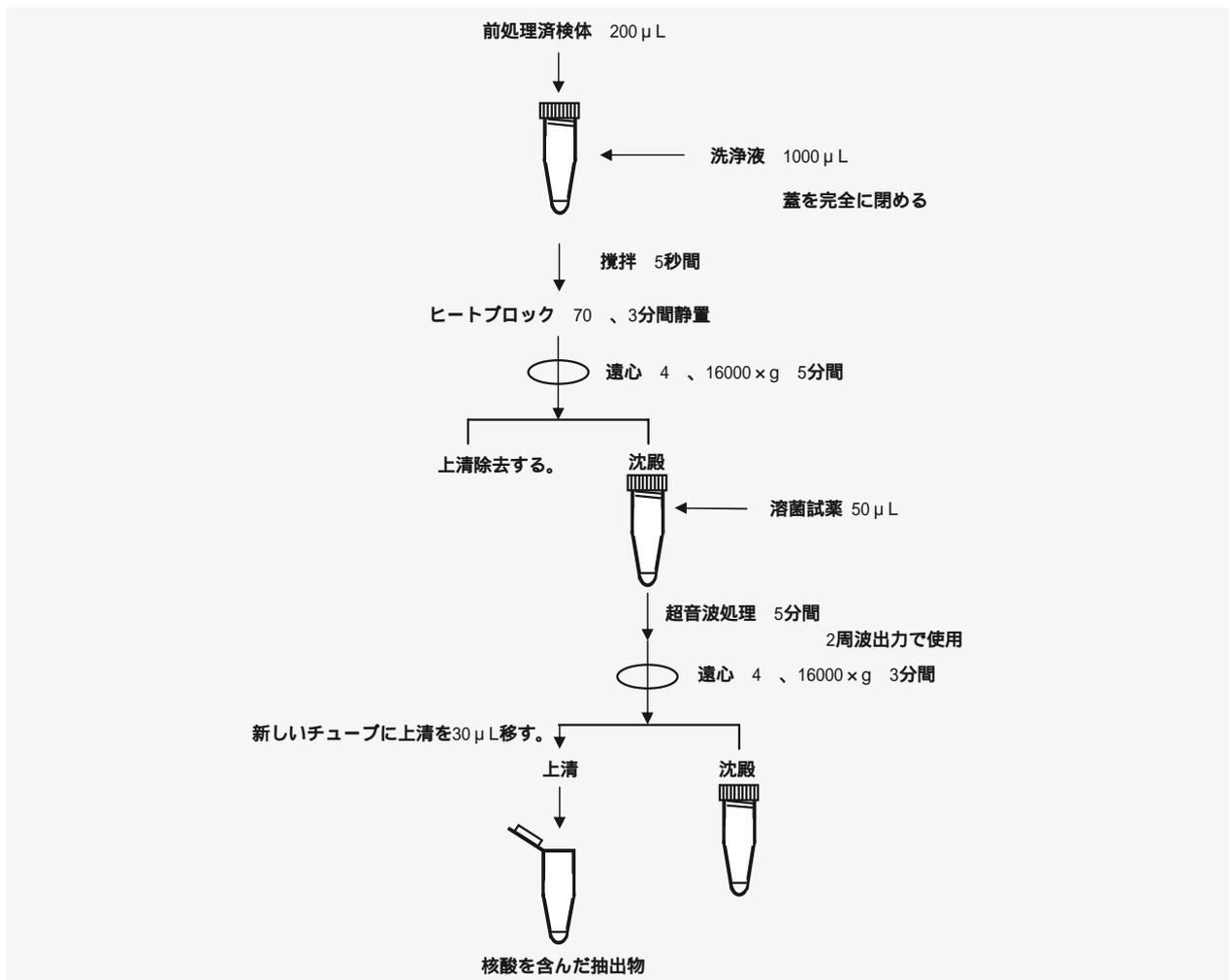


図1 核酸抽出プロトコル

コニウム微粒子を主成分とする溶菌試薬の2種類で構成される。(1)洗浄工程では、洗浄試薬存在下70の加温操作により、検体中のTRC反応阻害物質を可溶化して除去する。(2)溶菌工程においては、溶菌試薬存在下で超音波処理を行うことにより、菌体を破碎して核酸を溶液中に遊離させる。さらに、遠心処理により破碎残渣を沈降させることで、上清中に核酸を抽出することができる。なお、本キットの主要成分は表1のとおりである。

2.2 検体の取扱い

(1) 検体の種類

抗酸菌検査で対象となる検体は喀痰が約90%を占めるが、その他にも、胸水、気管支洗浄液、尿、胃液、腹水、髄液、肺胞洗浄液、膿、培養液などが検体とされる場合もある。

(2) 検体の前処理

通常、患者から得られた喀痰などの検体は粘性が高く菌が不均一に偏在しており、さらに多くの雑菌を含むことから、そのままでは抗酸菌検査に適さない。そのため、検体の均一化処理と雑菌処理を目的としたN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム法(NALC・NaOH法)³⁾が一般に使用される。

表1 「EXTRAGEN MB」の主要成分

試薬名	構成成分	組成	成分の目的
洗浄試薬	コール酸	10mmol/L	洗浄剤
	Glycine-NaOH	30mmol/L	緩衝液
溶菌試薬	酸化ジルコニウム	0.5g/mL	溶菌

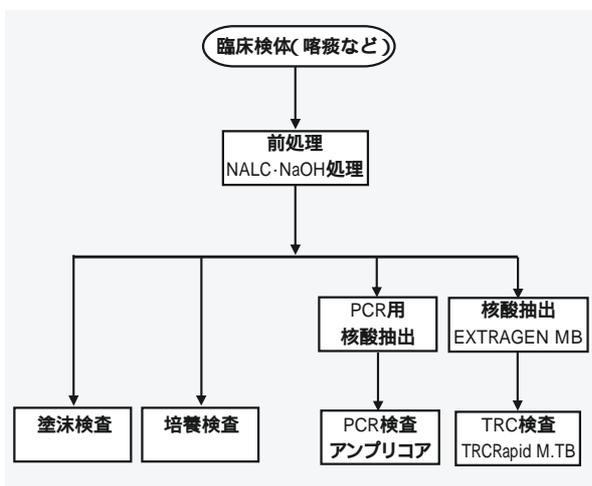


図2 抗酸菌検査の流れ

(3) 検体の取扱い

RNAを標的とするTRC法では検体自体の取扱いにも注意が必要である。菌体中のRNA量は菌の活性を反映し、例えば菌が死滅すると標的RNAは速やかに減少していく。従って、検体の前処理(NALC・NaOH処理)後は直ちに核酸抽出およびTRC測定を実施するか、保存が必要な場合には市販のRNA保護剤(RNAsafer、Omega Bio-tek社)を添加して凍結保存することを推奨することとした。

2.3 本キットの評価に用いた材料および試薬

本キットの以下の評価では、結核菌の代替としてBCG菌を使用し、下記の材料に添加して評価材料とした。

- (1) 結核検査陰性確認済みの喀痰のNALC・NaOH処理物(以下、陰性喀痰前処理物)
- (2) 4.2%ムチン、2.1mg/mLペプトン溶液(模擬前処理物)

このうち、(2)の模擬前処理物は、陰性喀痰前処理物の模擬材料として調製したものであり、陰性喀痰前処理物をTRC結核試薬で測定したときに認められる反応阻害の大きさが再現されるよう成分調製した。

なお、本キットの核酸抽出効率、結核菌群rRNA検出試薬 TRCRapid M.TB(以下、TRC結核試薬)の検出時間を指標とした。TRC結核試薬は定性試薬であるが、リアルタイム検出を原理とすることから、検出時間を用いた定量的評価が可能である。

2.4 検体由来の反応阻害物の除去能

抗酸菌検査の検体は多くのTRC反応阻害物質を含む。阻害のメカニズムは不明だが、喀痰の場合には特に粘性糖たんぱく質(ムチン)が反応阻害の要因となる。本キットでは界面活性剤を含む洗浄試薬を用いて、70で3分間の加熱処理を行うことによりTRC反応阻害物質を可溶化・除去している。本キットのTRC反応阻害物質の除去能を評価した。

(1) 評価方法

陰性喀痰前処理物を本キット又は洗浄試薬をPBSに変更した本キットで抽出処理した。核酸抽出処理後の溶液に結核菌16SrRNAの領域を含む標準RNAを添加し、TRC結核試薬の検出時間(蛍光強度が反応開始時から1.2倍に到達する時間)を求めた。また、TRC反応阻害がない陰性コントロールとしてTEバッファーに同量の標準RNAを添加した材料を使用し、同様にTRC結核試薬の検出時間を求め、これを基準とした検

出時間の遅れをTRC反応阻害の大きさの指標とした。

(2) 評価結果

各測定試料に対するTRC試薬の検出時間を図3に示した。TRC反応阻害物質の洗浄除去が進むほど、TRC反応の検出時間は陰性コントロールの検出時間に近づくはずである。本キットの洗浄試薬では、PBSを洗浄液として用いた場合よりも高度にTRC反応阻害物質が洗浄されていることがわかる。

(3) 検体使用量

図4は、模擬前処理物にBCG菌を20 cfu/100 μLまたは200 cfu/100 μLの濃度で添加して検体とし、本キットで核酸抽出後、TRC結核試薬で測定した結果である。検体中のRNA濃度とTRC反応阻害物質濃度の関係は検体使用量に因らないはずだが、本キットで核酸抽出に供する検体使用量を増やした場合、TRC試薬の検出時間が遅延し、TRC反応阻害物質の相対的影響が増加する。この結果から、本キットに供する検体量については200 μLを標準とした。ただし、実際の検体では個体差が大きく、本キットによる標準プロトコールではTRC反応阻害物質が十分に除去できないケースも想定され、その場合には、同じ洗浄工程を繰り返すことが必要である。

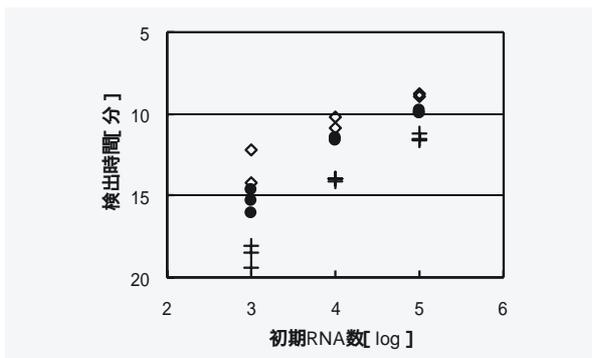


図3 TRC反応阻害物の除去能
+PBS 洗浄試薬 抽出物無添加

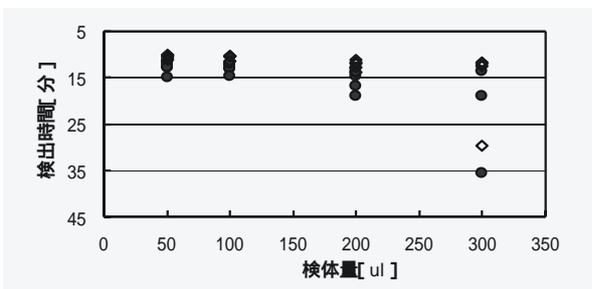


図4 検体使用量の変化に伴うTRC検出時間
20 cfu/100μL 200 cfu/100μL

2.5 菌体破碎

(1) 菌体破碎物質

結核菌などの抗酸菌はミコール酸など疎水性の脂質を成分とする硬く厚い細胞壁に覆われている。そのため、変性剤による化学的な方法や酵素を用いる生物学的方法など、通常使用される溶菌法では細胞壁を十分に破壊できない。市販の結核菌検査用PCRキットではアルカリ溶液中で加熱する方法が採用されているが、この方法はRNAを加水分解してしまうため不適である。そこで、酸化金属微粒子存在下で超音波破碎を行う方法を選択した。検討の結果、鋭いエッジを有する粒径20 μm以下の無定形であって比重が大きいほど破碎効率が高いことがわかった。最終的に、平均粒径6 μm、比重5.8の酸化ジルコニウム微粒子(図5)を選択した。

(2) 超音波洗浄器

図6と図7は、BCG菌を200 cfu/100 μLの濃度となるよう添加した陰性喀痰前処理物200 μLを本キットで核酸抽出し、TRC結核試薬で測定したときの検出時間(N.Dは30分以内に未検出)を示している。図6では、単周波数発振の卓上型超音波洗浄器(本多電子、W-170ST、45 kHz、70W)の洗浄槽を縦4分割、横8分割してできる計32区画(上面図)で本キットによる菌体破碎を実施した場合の結果である。洗浄槽の壁面近傍では未検出の場合が目立ち、核酸抽出効率が不均一となっていることがわかる。これは、単周波数発振では定在波が発生することが原因と考えられ、結果的に偽陰性につながることから注意が必要である。一方、図7は、2周波数(本多電子、W-113 MkII、28 kHzと31kHz、110W)交互発振の別の超音波洗浄器を用い、66区画のうち16区画を用いて同様の試験を実施した結

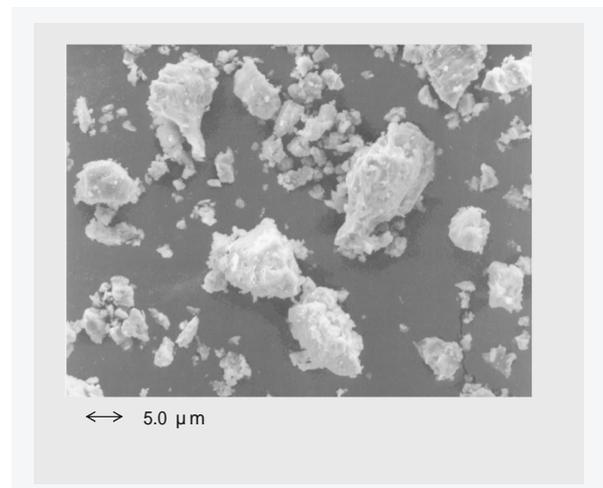


図5 溶菌試薬中の酸化ジルコニウム粉末SEM像(×5000)

果である。どの区画でも検出時間がほぼ一定で、破碎効率に差がないことがわかる。これらの結果から、発振周波数が2周波交互で出力が100W以上の超音波洗浄器を使用することにした。

2.6 核酸抽出物の安定性

一般の核酸抽出で使用する塩酸グアニジンやチオシアン酸グアニジンなどのタンパク質変性剤はRNaseによるRNA損失を防止する効果も併せ持つ。しかし、これらのタンパク質変性剤を用いた場合、TRC反応阻害防止のために洗浄の追加工程が必要となることから、本キットでは使用していない。

表2~4は、BCG菌を各種濃度で添加した陰性喀痰前処理物200 μ Lを本キットで核酸抽出し、その後の放置/保存時間の影響をTRC結核試薬の検出率で検討した結果である。表2からわかるように、核酸抽出物をRNase阻害剤未添加でそのまま4 保存した場合、時間の経過とともに検出率が低下する。表3は、本キットの 溶菌試薬に市販のRNase阻害剤

(Ribonuclease Inhibitor プタ肝臓由来、TaKaRa)を0.25U/ μ Lの濃度で添加し、得られた核酸抽出物を4 で冷蔵保存した場合であり、抽出操作から7日後も安定した検出が可能となる。表4は同じRNase阻害剤を0.25U/ μ Lの濃度で添加し-20 で冷凍保存した場合であり、3ヵ月後も安定した検出率が得られている。以上から、得られた核酸抽出物についてはただちに使用することを指示するが、実際の検査では核酸抽出物を数時間置かねばならないことも予想されるため、その場合には 溶菌試薬にRNase阻害剤を添加することを推奨することとした。

表2 4 保存の核酸抽出物の時間経過
(検体200 μ L、TRCRapid M.TB判定)

濃度(CFU/100ul)	抽出直後			抽出 2hr後			抽出 4hr後		
20	+	+	+	+	+	+	-	+	+
10	+	+	+	+	-	-	-	+	-
5	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2.5	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1.25	-	-	+	-	-	-	-	-	-

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	13.1	10.4	11.5	10.8	11.8	12.2	11.4	11.5
	9.9	10.9	11.7	14.6	25.7	36.2	12.2	13.6
	11.4	11.7	N.D.	11.5	11.7	N.D.	11.1	11.1
B	12.8	10.9	12.1	11.2	11.1	11.8	11.8	11.8
	18.3	20.3	12.7	10.2	10.9	10.8	23.9	35.0
	20.8	19.5	11.6	10.9	10.3	14.0	20.9	12.7
C	11.6	11.9	10.2	10.0	9.9	10.0	9.3	11.9
	12.4	9.9	11.9	10.0	10.0	10.8	13.6	14.0
	11.5	13.9	10.5	9.8	10.7	11.3	14.6	12.3
D	18.1	10.7	14.1	10.0	10.7	21.4	11.0	13.7
	12.8	14.4	N.D.	13.3	13.0	N.D.	11.9	24.2
	26.9	12.5	15.0	33.0	N.D.	N.D.	10.1	21.9

図6 超音波洗浄器(W-170ST、単周波数出力45kHz、70W)超音波洗浄器の水面上の各位置でBCG200cfu/100 μ L、200 μ Lを抽出(n=3)し、TRC結核試薬で測定した際の検出時間(分)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	11.7			11.5				11.9			11.3
	11.2			11.1				11.3			11.3
	12.5			12.9				12.7			12.8
B			11.2						11.6		
			11.5						11.1		
			13.2						13.1		
C		11.3					11.6				
		10.7					11.1				
		12.9					13.2				
D				11.2						12.9	
				11.3						11.2	
				13.1						13.2	
E			11.8						11.6		
			11.1						11.1		
			13.4						14.0		
F	11.6			12.3				12.4			12.7
	10.9			11.2				11.8			12.0
	13.6			14.2				14.0			14.4

図7 超音波洗浄器(W-113 MkII、2周波数交互出力28、31kHz、110W)超音波洗浄器の水面上の各位置でBCG200cfu/100 μ L、200 μ Lを抽出(n=3)し、TRC結核試薬で測定した際の検出時間(分)

表3 RNase阻害剤使用時の核酸抽出物4 保存の時間経過 (検体200 μL、TRCRapid M. TB判定)

濃度(CFU/100ul)	抽出直後			抽出 24hr後			抽出 7日後		
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表4 RNase阻害剤使用時の核酸抽出物・20 保存の時間経過 (検体200 μL、TRCRapid M. TB判定)

濃度(CFU/100ul)	抽出直後			抽出 15日後			抽出 3ヶ月後		
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2.7 安全対策

(1) 飛沫の発生

結核菌は微小飛沫核の吸入により空気感染する。本キットの全操作は安全キャビネット内で行わねばならないことは言うまでもないが、さらに、微小飛沫核の発生が危惧される超音波菌体破碎のステップを含め、すべての操作においてねじ蓋付きチューブを使用することにした。

(2) 核酸抽出物中の残存菌

菌体の超音波破碎により菌は死滅するが、検体中に

大量の菌が含まれていた場合は破碎されないまま生菌が残存する可能性も否定できない。そこで、仮に生菌が残存した場合でも遠心により沈降させ、採取する上清中には含まれないように工夫した。表5は、 1×10^4 cfu / 100 μLのBCG菌を含む陰性喀痰前処理物を本キットで処理し、最終工程の遠心加速度を変えて抽出物中の残存BCGをコロニーカウント法で調べた結果である。実際の結核検査検体で 1×10^4 cfu / 100 μLもの高濃度は稀であるが、このような場合には本キットの超音波処理までの操作では生菌が残存する可能性のあることがわかる。この結果から、TRC測定に供する上清中には生菌が残存する可能性の極めて低い条件として、本キットの最終の遠心条件を16000 × g、3分間とした。

3. TRC結核試薬と組み合わせたときの検出限界

模擬前処理物に10 ~ 160 cfu / 200 μLとなるようBCG菌を添加して検体とし、本キットで核酸抽出後、TRC結核試薬で測定したときの検出時間を表6に示した。この結果から、本キットとTRC結核試薬を組合わせた結核検査の検出限界は、10 cfu / 200 μL以下であることがわかる。なお、TRC結核試薬での測定に供する核酸抽出物は5 μLであることから、検体10 cfu / 200 μLは、1 cfu相当のRNAがTRC結核試薬で測定され、平均12.2分で検出されたことを示している。

表5 核酸抽出物中の生菌数

菌体： 10^4 cfu/100 μL 核酸抽出（最終遠心加速度変化、遠心時間3分間） 抽出物上清 固定培地で培養 コロニー数をカウント

最終遠心加速度	プレート番号				
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
20.000 × g	0	0	0	0	0
16.000 × g	0	0	0	0	0
13.000 × g	0	0	0	0	0
10.000 × g	0	0	0	0	0
6.000 × g	0	2	0	0	0

表6 TRC結核試薬と組み合わせたときの感度評価 (n=3)

菌数(CFU/200uL)	菌数(CFU/test)	検出時間(分)			Ave.	内部標準検出時間(分)			Ave.
10	1	13.8	10.6	12.2	12.2	9.9	10.0	9.0	9.6
20	2	10.0	10.2	11.4	10.6	9.3	10.0	9.2	9.5
40	4	12.6	11.0	10.3	11.3	9.9	9.0	9.7	9.5
80	8	9.7	13.4	13.2	12.1	9.8	9.9	9.5	9.8
160	16	9.5	11.7	9.3	10.2	11.1	10.1	9.7	10.3
posi	posi	7.1				10.4			

なお、表6の評価試験における15検体処理の所要時間は、本キットによる核酸抽出処理に30分間、TRC結核試薬測定準備に20分間、TRC結核試薬の測定時間30分間であった。一方、現在汎用されてる結核菌群PCR検査キット「コバスアンプリコア」(ロシュ)は、核酸抽出から測定を含めて6時間を要す。

4.まとめ

TRC抗酸菌検査パネル専用の核酸抽出試薬として核酸抽出試薬「EXTRAGEN MB」を開発した。本キットは、15検体^{注)}を約30分で処理可能である。TRC結核試薬と組み合わせた場合、検体のNALC・NaOH前処理の後、約80分で結核検査の結果を得ることができ、検出限界も前処理物中10 cfu / 200 μ L以下であることから、迅速で正確な検査が求められる結核診療に有用な試薬であると考えられる。

(注) TRC結核試薬の測定に使用する機器TRCRリアルタイムモニターTRCRapid-160は1バッチあたりの16サンプルを処理できるが、結核検査では陽性および陰性コントロールを各1本たてることから、最大処理数は14検体である。

5.参考文献

- 1) T. Ishiguro *et al.*, *Anal. Biochem.*, 314 (1), 77 (2003)
- 2) S. Takakura *et al.*, *J. Clin. Microbiology*, 43 (11), 5435 (2005)
- 3) P. T. Kent *et al.*, *Public health mycobacteriology : A guide for the level III laboratory.* USDHHS, Centers for Disease Control, Atlanta.