胸水からの *Mycobacterium tuberculosis* DNA の検出

¹⁾日本ロシュ株式会社 PCR 部, ²⁾国立名古屋病院臨床検査科, ³⁾国立療養所中部病院呼吸器科

玉造 滋¹⁾ 多和田 行男²⁾ 矢守 貞昭³⁾ 飯沼 由嗣³⁾

(平成7年8月7日受付)

(平成7年10月3日受理)

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, pleural fluid

結核菌を始めとする抗酸菌が感染する臓器はきわめて多岐にわたる。そのため、臨床検査に供される検体も喀痰・気管支洗浄液 (BAL) のみならず、胸水、髄液、血液、尿、糞便、膿汁、組織片にまで及ぶ。中でも胸水検体からの抗酸菌の検出は、結核性胸膜炎と癌性胸膜炎の鑑別には重要な情報となる。

今回我々は、胸水からの *M. tuberculosis* DNA の検出をこころみたので報告する。

材料と方法

胸水: 国立療養所中部病院にて喀痰から *M. tuberculosis* などの抗酸菌が分離されたり、臨床的に結核症と診断された患者から得られた胸水を用いた。胸水の一部 (約2ml) を2,000rpm で15分間遠心分離し、沈渣を塗抹検査および小川培地での培養に供した。残りの胸水からは下記の要領でDNA抽出を行い、それぞれPCRに供した。

DNA 抽出法

抽出法(1): 1.5ml 容量の微量遠心管で胸水100 μ l とNALC液 (0.1M Na₃Citrate 50ml + 4% NaOH 50ml に使用直前に N-Acetyl-L-Cysteine (NALC) 0.5g を加えたもの) 100 μ l を混和した。室温で15分間インキュベートしたのちに、洗浄バッファー (アンプリコア®洗浄液25ml にオリゴテックス dT30¹⁾ を20 μ l 加えたもの、塩などの可溶性の物質を除去する) 500 μ l を加え混和した。15,000rpm, 15分間遠心し上清を除去した。沈渣に

アンプリコア®溶解液 (アルカリ溶菌を行う) 100 μ l を加え、沈渣を懸濁させて60°C, 45分間インキュベートしたのち、アンプリコア®中和液 (アルカリを中和する) 100 μ l を加え、混和して抽出DNA液とした。なお、洗浄液に加えたオリゴテックス dT30 (ラテックス粒子) は、沈渣が少ないときにもこれを視認しやすくするために共沈剤として加えたものである。

抽出法(2): 15ml 容量のスπιツ管に胸水100 μ l とNALC液100 μ l を加え混和した。室温で15分間インキュベートしたのち、生理食塩水 (日局) を15ml の目盛まで加え、転倒混和した。3,000rpm, 20分間遠心し上清を約100 μ l 残して除去した。残渣に洗浄バッファー500 μ l を加え、混和したのち全量を微量遠心管に移し、15,000rpm, 15分間遠心し上清を除去した。溶解液100 μ l を加え、沈渣を懸濁させて60°C, 45分間インキュベートしたのち、中和液100 μ l を加え、よく混和して抽出DNA液とした。

抽出法(3): 抽出方法(2)において、胸水とNALC液の量をそれぞれ1ml に増量した。他は全く同じ操作で抽出DNA液を得た。

PCR および検出

増幅は「アンプリコア®マイコバクテリウム²⁾ (日本ロシュ)」の増幅キットで行った。増幅領域は「16S rRNA 遺伝子」から選択された584塩基対のDNAである。1検体当たり2本のPCR反応を行った。一方はマスターミックス50 μ l にDNA液50 μ l を加え、他方はマスターミックス50 μ l にDNA液45 μ l および *M. tuberculosis* 陽性コント

別刷請求先: (〒247) 神奈川県鎌倉市梶原200

日本ロシュ株式会社 試薬本部 PCR 部

玉造 滋

平成8年1月20日

ロール原液5 μ l (DNA10コピーに相当)を加えた。PCRの条件は添付文書記載の方法に従った。検出はそれぞれのPCR産物を用い、「アンプリコア®マイコバクテリウム」の検出キットで行った。すなわち、ビオチン化プライマーで増幅したDNA産物を、マイクロプレートのDNAプローブで菌特異的に選択し、発色反応で検出した。

判 定

カットオフ値を[0.350 OD₄₅₀]とし、2本の増幅反応ともに陽性の場合、検体中に *M. tubercu-*

losis DNA が検出された。つまり「陽性」と判定した。検体DNA液のみを加えたほうが陰性で、かつDNA液と陽性コントロールを加えたほうが陽性であれば検体中に *M. tuberculosis* DNA が検出されなかった、つまり「陰性」と判定した。2本ともに陰性の場合、本反応系が何らかの阻害物質の影響を受けた、つまり「阻害 (Inh.)」と判定した。ただし、いかなる阻害物質がどの反応を阻害したかまでは同定していない。

Fig. 1 Results of the detection of *M. tuberculosis* DNA. Samples from the same patient at different times are indicated with shadow. Results of the extraction-2 indicate the result with 'Tb-probe/Genus-probe'.

Patient -sample	Sputum culture	Clinical	Pleural fluid		DNA extraction		
			Smear	Culture	method-1)	method-2)	method-3)
A-1	M.tb	TB	0	4 w (+)	Inh.	Inh./Inh.	Inh.
A-2	M.tb	TB	0	-	+	+ / +	+
A-3	M.tb	TB	2 +	8 w (+)	+	+ / +	+
A-4	M.tb	TB	2 +	8 w (+)	+	+ / +	+
A-5	M.tb	TB	0	-	+	+ / +	+
B	M.tb	TB	0	8 w (+)	-	- / -	-
C-1	M.tb	TB	2 +	4 w (+)	+	+ / +	+
C-2	M.tb	TB	4 +	3 w (+)	+	+ / +	+
D	M.tb	TB	0	4 w (+)	+	+ / +	+
E	M.tb	TB	+	4 w (+)	-	- / -	-
F-1	M.tb	TB	0	8 w (+)	-	- / -	+
F-2	M.tb	TB	0	8 w (+)	-	+ / +	-
G	M.tb	TB	0	-	-	- / -	-
H-1	M.tb	TB	0	-	-	- / -	Inh.
H-2	M.tb	TB	0	-	-	- / -	Inh.
I	M.tb	TB	0	-	-	- / -	-
J	M.tb	TB	0	-	-	- / -	-
K	M.tb	TB	0	-	-	- / -	-
L	M.tb	TB	0	-	-	- / -	-
M	M.terrae	TB	0	-	-	- / -	-
N	M.tb	TB	0	-	-	- / -	-
O-1	M.tb	TB	0	-	-	- / -	Inh.
O-2	M.tb	TB	0	-	Inh.	- / -	-
P	-	TB	0	-	-	- / -	-
Q	-	TB	0	-	-	- / -	-
R	-	TB	0	-	-	- / -	-
S	-	TB	0	-	-	- / -	-
T-1	-	TB	0	-	Inh.	- / -	Inh.
T-2	-	TB	0	-	-	- / -	Inh.
U	-	TB	0	-	-	- / -	Inh.
V-1	-	TB	0	-	-	- / -	Inh.
V-2	-	TB	0	-	-	- / -	Inh.
W	-	TB	0	-	-	- / -	-
Number of positive					7	8	8
Number of inhibition					3	1	9

結 果

十分に解析の行えた33例の成績を Fig. 1 に示す。内訳は、喀痰から抗酸菌が分離、同定された15症例、23検体と臨床的所見から結核症と診断された8症例、10検体であった。胸水の成績は、塗抹陽性が5検体、培養陽性が10検体であった。胸水のPCR成績は、抽出法(1)で7例、抽出法(2)で8例、抽出法(3)で8例が *M. tuberculosis* 陽性となった。抽出法(3) > (1) > (2)の順に「Inh.」と判定される例が多かった。これらの成績から、胸水からのDNA抽出には抽出法(2)が最も適していると結論した。抽出法(2)の検討では、*M. tuberculosis* と反応するプローブと同時に抗酸菌の属特異的に反応するいわゆる Genus プローブとの反応も検討したが、喀痰から *M. terrae* が分離された1例も含めて、Genus のみ陽性となったものは無かった。全ての方法で「Inh.」となった「患者Aの検体1」は、非常に粘稠性の高い灰色膿状の検体であったが、フェノール抽出などでも阻害は除去できなかった (Data not shown)。

考 察

胸水からの抗酸菌DNAの検出をこころみた。複数の抽出方法での成績を比較検討したが、胸水100 μ lをNALC処理し、生理食塩水で希釈後、遠心分離した沈渣を用いる方法(抽出法(2))が最も成績が良かった。これは、胸水検体が生理食塩水で十分に希釈されることで、水難溶性の阻害物質が除去されたものと推察している。特に胸水培養陽性の10検体中、8検体で *M. tuberculosis* DNA

が検出され、培養陰性の2例からも *M. tuberculosis* DNA が検出された。後者の2例は再検査も陽性で、かつ他の遺伝子(Superoxide dismutase gene)のPCR³⁾も陽性であった。さらに経時的に見ても、これらと前後して同一患者から採取された胸水から *M. tuberculosis* が分離、同定されているため、PCRの偽陽性ではないものと結論した。培養陽性にもかかわらず、*M. tuberculosis* DNA が検出されなかった2例は、再検査でも陰性であった。検体中の菌量が極めて少なく、抽出処理段階で失われたと推察する。今回の検討で、胸水からのPCR法による *M. tuberculosis* の検出が、感度の上でも、結果を得るまでの時間の短さからも、従来の塗抹・培養検査に比較して遜色のないものであることが示された。特に結核性胸膜炎と癌性胸膜炎の鑑別のような迅速性を必要とする検査には有用である。

文 献

- 1) Ohta KK, Tamatsukuri S, Hikata M *et al.*: Application of oligo (dT) 30-latex for rapid purification of poly (A)⁺mRNA and for hybrid subtraction with the in situ reverse transcribed cDNA. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1156: 204-212.
- 2) 青木正和, 片山 透, 山岸文雄, 他: PCR法を利用した抗酸菌DNA検出キット(アンプリコア® マイコバクテリウム)による臨床検体からの抗酸菌迅速検出. *結核* 1994; 69: 593-605.
- 3) Zolg JW & Philippi-Schulz S: The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of *Mycobacteria* by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 21: 2801-2812.

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from pleural Fluid

Shigeru TAMATSUKURI¹⁾, Yukio TAWADA²⁾, Sadaaki YAMORI³⁾ & Yoshitsugu IINUMA³⁾

¹⁾Nippon Roche K.K., PCR Department

²⁾National Nagoya Hospital, Clinical Laboratory

³⁾National Chuubu Hospital, Department of Pulmonary Disease