二段階 PCR 法による咽頭スワブからの

Mycoplasma pneumoniae 検出

神奈川県衛生研究所細菌病理部

岡 崎 則 男 山 井 志 朗

国立感染症研究所安全性研究部

佐々木 裕 子 佐々木 次 雄

(平成10年 1 月21日受付)

(平成10年 4 月14日受理)

Key words: two-step PCR, *Mycoplasma pneumoniae*,
throat swab

要 旨

Mycoplasma pneumoniae の16S rRNA 遺伝子領域から設定した2組のプライマーを使用し、二段階 PCR 法による *M. pneumoniae* 検出を検討した。本 PCR 法では1.5fg の *M. pneumoniae* 遺伝子が検出可能で、*M. pneumoniae* 以外のヒト系マイコプラズマ11種および口腔内細菌4種の遺伝子は検出されなかった。*M. pneumoniae* 感染を疑われた急性呼吸器疾患患者322例の咽頭スワブにこの二段階 PCR 法を応用した結果、陽性率は23.6%で、一段階 PCR (20.8%) および分離培養法 (20.2%) の陽性率より高かった。また、培養あるいは血清抗体検査で *M. pneumoniae* 感染が証明されたにもかかわらず、一段階 PCR 法で陰性と判定された13例中7例が二段階 PCR 法では陽性となった。更に一段階 PCR では増幅が不十分で、判定に困惑した5例が二段階 PCR において明瞭な陽性を示した。以上の成績から、二段階 PCR 法は操作が煩雑ではあるものの、臨床材料からの *M. pneumoniae* 検出に有用な手段と考えられた。

はじめに

最近、感染症の迅速診断法として PCR 法が注目されており、*Mycoplasma pneumoniae* 感染症の診断においてもこの方法が応用され始めている^{1)~6)}。著者ら⁴⁾は前報において、一段階 PCR 法による *M. pneumoniae* 検出を検討し、その有用性を認める一方で、臨床試料に应用すると感度がやや低下することを指摘した。感度を高めるために、Nested PCR 等の二段階 PCR 法が既に試みられているが¹⁾³⁾、いずれも PCR 操作だけでなく、試料調製も煩雑で、実用的ではないように思われる。本報では、患者咽頭スワブから簡便な方法で調製

した試料に二段階 PCR 法を適用し、良い成績が得られたので報告する。

材料と方法

1. 供試菌株

東京大学医科学研究所微生物保存室より分与された *Mycoplasma* 属9菌株、*Acholeplasma* 属および *Ureaplasma* 属各1菌株ならびに神奈川県衛生研究所細菌病理部で分離同定された細菌4菌株の計15株を供試した。その内訳は以下の通りである。

Mycoplasma pneumoniae-Mac, *Mycoplasma buccale*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma primateum*, *Mycoplasma salivarium*, *Acholeplasma laidlawii*, *Ureaplasma urealyticum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*,

別刷請求先：(〒241-0815)神奈川県横浜市旭区中尾1

— 1 — 1

神奈川県衛生研究所細菌病理部

岡崎 則男

Staphylococcus aureus

これらの菌株を Sasaki ら⁷⁾の記載に従って培養し、実験に供した。

2. 咽頭スワブ

1992年～1995年に、神奈川県結核・感染症サーベイランスにおいて *M. pneumoniae* 感染を疑われた322名およびインフルエンザウイルス感染を疑われた96名の急性呼吸器疾患患者ならびに健常者50名より採取された咽頭スワブを使用した。また、*M. pneumoniae* 感染の集団発生事例(1995年)において採取された咽頭スワブで、当所への搬入過程におけるトラブルにより凍結(−20℃)融解を3回繰り返した57例も併せて使用した。

3. プライマー

M. pneumoniae の16S rRNA 遺伝子領域の一部をプライマーとした。一次および二次 PCR に用いたプライマーの塩基配列は下記の通りであるが、二次 PCR の下流プライマーは一次 PCR と同じものを使用した。尚、二次 PCR に用いたプライマーは、*M. pneumoniae* 遺伝子をも特異的に増幅することが Sasaki ら⁷⁾により確認されている。

一次 PCR; 5'GCAAGTCGATCGAAAGTAGT 3'

5'ATTTGCTCACTTTTACATGCTGGCG 3'

二次 PCR; 5'GAATGACTTTAGCAGTAATGGCTA 3'

5'ATTTGCTCACTTTTACATGCTGGCG 3'

また、比較のため実施した一段階 PCR 法には Sasaki ら⁷⁾および van Kuppeveld ら⁸⁾の報告したプライマーを使用した。

4. PCR 法

咽頭スワブからの PCR 試料の調製は次のように行った。咽頭スワブをマイコプラズマ保存培地⁹⁾中で充分絞り出し、その絞り液1mlを15,000 rpm 30分遠心して沈渣を1% Triton-X 加 STE 緩衝液¹⁰⁾0.1mlに再浮遊させた。これを100℃10分加熱後、急冷して PCR 試料とした。また、上記各マイコプラズマおよび細菌から所定の方法¹¹⁾で DNA を調製し、PCR の特異性あるいは感度を調

べるために使用した。

一次 PCR 反応液は50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 0.1% TritonX-100, 2mM MgCl₂, 0.2mM d-NTP, 31.25nM プライマーおよび耐熱性 DNA ポリメラーゼ1U より成り、二次 PCR 反応液にはプライマー濃度を50nM としたものを使用した。一次 PCR は反応液40μl に試料10μl, 二次 PCR は反応液45μl に一次 PCR 産物の5μl を試料とし、各々全量を50μl とした。増幅反応は一次および二次共に“94℃ 1分, 59℃ 1.5分および72℃ 2分を30サイクル”の条件で実施した。PCR 産物の解析は1.5%アガロースゲルを使用した電気泳動とエチジウムブロマイド染色により行った。比較のために実施した一段階 PCR 法は既報⁴⁾⁸⁾に従った。

5. 分離培養

M. pneumoniae 分離培養の試料には咽頭スワブ絞り液を使用し、分離培養は二層培地と寒天平板培地⁹⁾、同定は抗血清による発育阻止試験で行った¹²⁾。

結 果

1. 特異性と感度

Fig. 1 に示すように、二段階 PCR で807bp の

Fig. 1 Specificity of two-step PCR method for *M. pneumoniae*.

Lane 1, pHY marker; 2, *M. pneumoniae*-Mac; 3, *M. buccale*; 4, *M. fermentans*; 5, *M. genitalium*; 6, *M. hominis*; 7, *M. orale*; 8, *M. penetrans*; 9, *M. primatum*; 10, *M. salivarium*; 11, *Acholeplasma laidlawii*; 12, *Ureaplasma urealyticum*; 13, *Bacillus subtilis*; 14, *Escherichia coli*; 15, *Enterococcus faecalis*; 16, *Staphylococcus aureus*; 17, no template.

M. pneumoniae 遺伝子断片が増幅され、今回供試した *M. pneumoniae* 以外のヒト系マイコプラズマ11種および細菌4種の遺伝子は増幅されなかった。本PCRの遺伝子検出感度は、Fig. 2に示すように1.5fgであった。尚、比較のため実施した一段階PCRの感度は15fgであった。

2. 分離培養法との比較

Table 1に、患者咽頭スワブからの *M. pneumoniae* 検出における二段階PCR法と分離培養法による成績を示した。322例中、PCR法による検出率は23.6%そして培養法のそれは20.2%であった。雑菌増殖により培養検査では結果が判明しなかった29例中にPCR陽性が10例(34.5%)存在した。インフルエンザを疑われた患者由来96例および健康者由来50例の咽頭スワブの中にPCR陽性あるいは培養陽性例はなかった。

3. 一段階PCR法との比較

Fig. 2 Sensitivity of two-step PCR method for *M. pneumoniae*.

Lane 1, pHY marker; 2, 1,500fg/assay; 3, 150fg; 4, 15fg; 5, 1.5fg; 6, 0.15fg; 7, 0.015fg; 8, negative control.

Table 1 Evaluation of two-step PCR method in comparison with culture method for the detection of *M. pneumoniae* from throat swabs

PCR result	Culture result			Total (%)
	+	-	Contami*	
+	63	3	10	76 (23.6)
-	2	225	19	246
Total (%)	65 (20.2)	228	29	322

*Culture result was not reliable due to contamination with other bacteria.

二段階PCR法と前報⁴⁾で報告した一段階PCR法の比較をTable 2に示した。前者の陽性率23.6%に対し、後者のそれは20.8%であった。一段階PCRでは陰性を示した255例中、二段階PCRで陽性となった9例(3.5%)が認められた。また、培養あるいは血清抗体検査で *M. pneumoniae* 感染が証明されたにもかかわらず、一段階PCR法では陰性を示した13例中7例が二段階PCR法で陽性を示した。更に、一段階PCR法では遺伝子増幅が不十分で、判定に戸惑った5例が二段階PCR法では明瞭な陽性となった。

M. pneumoniae 感染の集団発生事例で採取された咽頭スワブで、凍結融解を3回繰り返した後の咽頭スワブより調整した試料57例については、培養検査での陽性例は認められず、一段階PCR法で11例(19.3%)および二段階PCR法では29例(50.9%)が陽性を示した。

考 察

二段階PCR法は、一回目のPCRで増幅した遺伝子断片の塩基配列の内側に設定したプライマーを使用し、再度PCRによる増幅をするため、感度および特異性共に一段階PCR法よりも優れているとされる。今回著者らが検討した *M. pneumoniae* 検出のための二段階PCR法は1.5fgのDNAを検出できたが、これは試料中に存在する1~2個の *M. pneumoniae* を検出可能であることを示しており、十分に満足し得る感度と言える。二段階PCR法の感度についてはNaritaら³⁾が5~50fgとし、石田ら¹⁾は1CFUと報告している。CFUで表すPCR感度は正確性に欠けると考えられることから、Naritaらの報告と比較すると本報のPCRはより高い感度を持つと言える。一方

Table 2 Evaluation of two-step PCR method in comparison with single-step PCR method for the detection of *M. pneumoniae* from throat swabs

Two-step	Single-step		Total (%)
	+	-	
+	67	9	76 (23.6)
-	0	246	246
Total (%)	67 (20.8)	255	322

で、van Kuppeveld ら⁸⁾は一段階 PCR 法で1fg の感度が得られたことを報告しているので、著者らも彼らと同じプライマーにより検討した。使用した耐熱性DNAポリメラーゼおよびPCRインキュベーターのメーカーが異なるので、直接的に比較するには問題があるが、15fg の感度であり、著者らの二段階 PCR 法より高い感度は示さなかった。

二段階 PCR を臨床試料(咽頭スワブ)に適用した場合、一段階 PCR 法で陰性を示した臨床試料9例および遺伝子増幅が不十分で判定に戸惑った5例が二段階 PCR では明瞭な陽性となり、陽性率が上昇した。著者ら⁴⁾は前報で、咽頭スワブから調製した試料に一段階 PCR 法を応用すると感度の低下を招くことを指摘した。これは何らかのPCR阻害作用によるものと考えられるが、二段階 PCR 法ではこのような阻害作用もある程度解消されるものと推察される。また、*M. pneumoniae* 感染の集団発生事例において採取され、検査以前に凍結融解を3回繰り返した57例の咽頭スワブより調製した試料につき PCR を実施したところ、二段階 PCR 法での陽性率が50.9%であったのに対し、一段階 PCR 法のそれは19.3%であった。これら咽頭スワブの培養成績は全て陰性であったことから、試料中の *M. pneumoniae* は死滅していたものと考えられ、更に、一段階 PCR 法での陽性率が著しく低かったことは、試料中の PCR 阻害因子の存在あるいは増幅可能な鋳型遺伝子の量が極めて少なかったことを示すものと思われる。二段階 PCR 法はこのような試料に対しても強力な武器となり得ることが示された。

PCR 法では検出目的とする病原体が生菌である必要はなく、増幅可能な遺伝子さえ存在すれば検出できるが、このことは PCR 法が病原体と疾患との因果関係を直接的に証明するものではないことを示しており、検出感度が高いほどこの問題は大きくなる。このような観点から、50例の健常者およびインフルエンザが疑われた96例の患者より採取した咽頭スワブにつき著者らの二段階 PCR 法を応用したところ、全て陰性であった。この件に関しては今後更に多くの例について確認す

る必要があると思われるが、健常者および *M. pneumoniae* 感染症以外の疾患から *M. pneumoniae* 遺伝子が検出されることは希であるように思われることから、本 PCR 法で陽性であれば *M. pneumoniae* 感染症と判断してほぼ間違いはないと考えられる。

遺伝子増幅反応が PCR 法では最も重要な部分であるが、試料の調製も大切な要素となる。殊に、二段階 PCR 法においては2回のPCR操作だけでも相当に煩雑であるのに、その上に試料の調製に数時間あるいは一昼夜を費やすことは実用性の面から問題である。今回検討した試料調製法は既報¹³⁾より操作が簡単で、30分程度で済み、この点も長所と思われる。

以上のことから、今回検討した二段階 PCR 法は *M. pneumoniae* 感染症の診断法として有用と判断される。一方、高感度である二段階 PCR 法は操作中における *M. pneumoniae* 遺伝子の混入による疑陽性結果をもたらすことがあり、これを回避するための慎重な操作が必要である。

文 献

- 1) 石田一雄, 賀来満夫: PCR を用いた病原微生物の検出, *Mycoplasma pneumoniae*. 臨床検査 1993; 37: 139-143.
- 2) Kai M, Kamiya S, Yabe H, Takakura I, Shiozawa K, Ozawa A: Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by polymerase chain reaction. J Med Microbiol 1993; 38: 166-170.
- 3) Narita M, Matsuzono Y, Togashi T, Kajii N: DNA diagnosis of central nervous system infection by *Mycoplasma pneumoniae*. Pediatrics 1992; 90: 250-253.
- 4) 岡崎則男, 山井志朗, 小島幸司, 矢野靖子, 佐々木裕子, 佐々木次雄: PCR 法による咽頭スワブからの *Mycoplasma pneumoniae* の検出. 感染症誌 1995; 69: 723-728.
- 5) Skakni L, Sardet A, Just J *et al.*: Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 2638-2643.
- 6) Tjhi JHT, van Kuppeveld FJM, Roosendaal R *et al.*: Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. J Clin Microbiol 1994; 32: 11-16.

- 7) Sasaki Y, Shintani M, Shimada T, Watanabe H, Sasaki T: Detection and discrimination of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* by in vitro DNA amplification. Microbiol Immunol 1992; 36: 21-27.
- 8) van Kuppeveld FJM, van der Logt JTM, Angulo AJ *et al.*: Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 2606-2615.
- 9) 岡崎則男, 明間鯉一郎, 滝沢金次郎: 分離検査による *Mycoplasma pneumoniae* 肺炎流行の追跡. 感染症誌 1987; 61: 547-554.
- 10) Jensen JS, Sndergaard-Andersen J, Uldum SA, Lind K: Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical samples by polymerase chain reaction. APMIS 1989; 1046-1048.
- 11) Wilson K: Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM *et al.*, ed. Current protocols in molecular biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1990; 1: 2.4.1-2.4.2.
- 12) 奥水 馨, 小谷 均: 動物マイコプラズマの分離と同定. 日本細菌学会教育委員会編, 細菌学技術叢書 2, ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定, 菜根出版, 東京, 1982: 42-86.

Mycoplasma pneumoniae Detection from Throat Swab by Two-Step Polymerase Chain Reaction

Norio OKAZAKI & Shiro YAMAI

Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories, Department of Bacteriology and Pathology

Yuko SASAKI & Tsuguo SASAKI

National Institute of Infectious Disease, Department of Safety Research on Biologics

Two-step polymerase chain reaction (PCR) with primers designated against 16S rRNA gene of *Mycoplasma pneumoniae* for diagnosis of infection was evaluated in comparison with the conventional single-step PCR and culture methods. The two-step PCR method showed specific amplification of *M. pneumoniae* DNA and higher sensitivity (1.5 fg/assay) than the single-step PCR method. With the two-step PCR method, 76 of 322 throat swabs (23.6%) from patients with acute respiratory complaints gave positive results whereas 20.2% were positive in the culture method. Seven of 13 samples which were negative in the single-step PCR method but positive in either serological or the culture method showed positive results by the two-step PCR method. In addition, 5 samples which were weakly positive in the single-step PCR method showed distinctly positive results in the two-step PCR. These results indicate that the two-step PCR method is a useful tool for detection of *M. pneumoniae* in clinical specimens, although it requires a relatively sophisticated technique.