

## 細菌性呼吸器感染症 PCR スクリーニング法の検討

山口 仁孝・原 健志

## A study of the PCR screening for bacterial respiratory infection

Yoshitaka YAMAGUCHI, Kenshi HARA

Key words : PCR, SARS =Sever acute respiratory syndrome, Bacterial respiratory infection

キーワード:ポリメラーゼ連鎖反応, 重症急性呼吸器症候群, 細菌性呼吸器感染症

## はじめに

昨年末より中国で発生した重症急性呼吸器症候群 (Sever acute respiratory syndrome=SARS) は、新型コロナウイルス (SARS ウイルス) がその原因として確定された。また、複数の SARS ウイルス株 genome の解明により、今後新しい診断法や新薬の開発が加速するものと期待される。

一方、現時点では SARS の臨床症状は細菌性の市中肺炎やインフルエンザ等による他のウイルス性肺炎との鑑別が容易ではなく、SARS ウイルスの分離・同定・確定診断には時間がかかることや流行抑制のために迅速な防疫対策が必要であることなどの理由により、SARS 検査にあたっては、同時に他の細菌性およびウイルス性呼吸器感染症との鑑別検査結果についても重要な所見となっている。

しかしながら、今回国の通達では SARS 以外の病原体一次スクリーニング検査の対象として、一般細菌、レジオネラ、クラミジア、マイコプラズマ等が挙げられているものの、具体的な検査方法については示されていない。加えて、地研等の限られた人員・時間のなかで行われる一次スクリーニングでは、検査対象の範囲や個々の検査法の選択は深慮する必要があるものと思われる。

そこで、今回われわれは類症鑑別における一次スクリーニングでは迅速性が最も重要であると考え、感染研より先に示された病原体検査・診断マニュアル等を参考に、PCR による細菌性呼吸器感染症病原体の一次スクリーニングについて検討したので報告する。

## 材料および方法

## 1. Template の作成

*Legionellae*:宮崎県衛生環境研究所より分与を受けた菌株について、常法に従い熱抽出 Template を作製した。*Chlamydiae*:長崎大学医学部より *C. trachomatis* 検出 DNA Template の分与を受けた。*Mycoplasmae*:沖縄県衛生環境研究所より *M.pneumoniae* DNA Template の分与を受けた。各 Template DNA は感度試験用に 5 倍段階希釈を行った。また、Negative template mix として、*Shigella dysenteriae, flexneri, boydii, sonnei* (計 7 株), *E.coli* (3 株), *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (各 1 株) の熱抽出 DNA Template mix を作成した (表 1)。

## 2. Primer の設計

Primer 設計ソフト Genetyx<sup>®</sup> を用いて、NCBI GenBank に登録されている各細菌の Target genome (16SrRNA および *mip gene*) について Alignment を行い Primer 設計用 Standard sequence を選択し、各菌種間の Alignment を行った後、特異性の高い領域について primer を設計した (図 1, 表 2)。

## 3. PCR

既知 Primer については各文献<sup>1) 2)</sup>の Protocol に従い、新しく設計した Primer については 95 5min. 熱変性後、95 45sec., 58 45sec., 72 45sec. 35cycle, 72 5min. に Thermalcycler の温度・時間・サイクル数を設定し、EX taq Hot Start version を (Takara) を用いて 50 $\mu$ l 系にて PCR を実施した (図 2)。

## 4. Multiplex PCR

設計した Primer (Leg, Ch, Mpn) について、First および Nested 用 Primer を mix して Multiplex PCR を検討した。

## 5. 電気泳動および撮影

Amplicon を 1.5%アガロースゲル (EtBr 0.5µg/ml) に泳動 (100V, 30min) 後、トランスイルミネーターにより観察してポラロイド写真を撮影し、バンドを確認した。

表 1: Control template

Genus	Species	Serotype	Sample No.
<i>Legionella</i>	<i>pneumophila</i>	SG1	L1
		SG1b	L2
		SG3	L3
		SG4	L4
	<i>dumoffii</i>		L5
	<i>erythra</i>		L6
	<i>micdadei</i>		L7
<i>Chlamydia</i>	<i>trachomatis</i>		C
<i>Mycoplasma</i>	<i>pneumoniae</i>		M

\* Negative template mix : *Shigella* (7), *E.coli* (3), *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*

図 1: Primer の設計

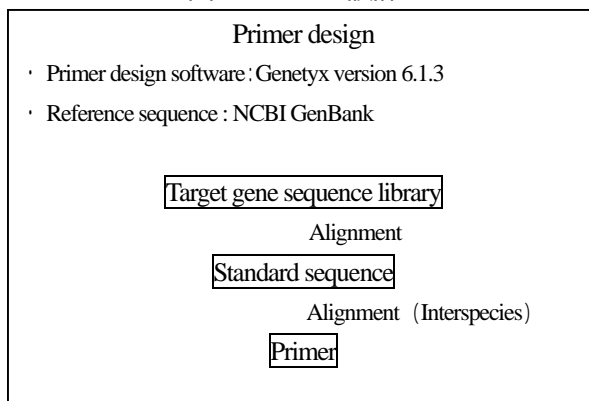


表 2: 各 Target 遺伝子および Primer

Target		Primer			
Species	Gene	NIID		This study	
		First	Nested	First	Nested
<i>Legionella spp.</i>	16S rRNA	LEG448A-854B		Leg-m1	Leg-m2
<i>Legionella pneumophilla</i>	<i>mip</i>	LmipL920-R1548	LmipL997-R1466	Lmip-m1	Lmip-m2
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	16S rRNA	MPN/1F, 1R	MPN/2F, 2R	Mpn-m1	Mpn-m2
<i>Chlamydia spp.</i>	16S rRNA	(Ch) *		Ch-m1	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	16S rRNA		(Chp) *		Chp-m2

\*Trudy et al ; JCM,AUG,1997,p.2043-2046

図 2: PCR 条件

New primer PCR condition		
95	5min	} 35cycle
95	45sec.	
58	45sec.	
72	45sec.	
72	7min	

## 結 果

### 1. 特異性試験

#### (1) *Legionellae*

4種の *pneumophila* 血清群を含む 4種の *Legionella* 属についての特異性は、16SrRNA 検出用 Primer (Leg) で既知 Primer と同様に検出できた

(図 3 上)。また、*mip* gene 検出用の Nested 既知 Primer (Lmip L997-R1466) においては、*L. erythra* とごく弱い交差反応が認められた (図 3 下)。

#### (2) Negative control template との交差反応試験

Chp-m2 において 600bp 付近にバンドが認められた (図 4) が、他に非特異 band は認められなかった。

### 2. 感度試験

#### (1) *Legionellae*

新 Primer (Leg-m1, Lmip-m1) は LEG448A-854B および LmipL920-R1548 と比較して、より感度が高かった (図 5)。

#### (2) *Chlamydia*

Trudyらの Primer ではまったく検出不能であった。一方、新 Primer (Chp-m2) では 800bp 付近に非特異バンドが若干観察された (図 6 矢印)。

(3) *Mycoplasma*

MPN/1F、1R においては、Template 量に比例せず不安定な増幅を示した。新 Primer (Mpn-m1,m2) はより感度が高く良好な増幅が確認された(図 7)。

3. Multiplex PCR

各細菌ごとに DNA 濃度が異なる 2 種の Template を用いた Multiplex では、First,Nested とともに良好の結果が得られた(図 8)。

図 3 Specificity (*Legionellae*)

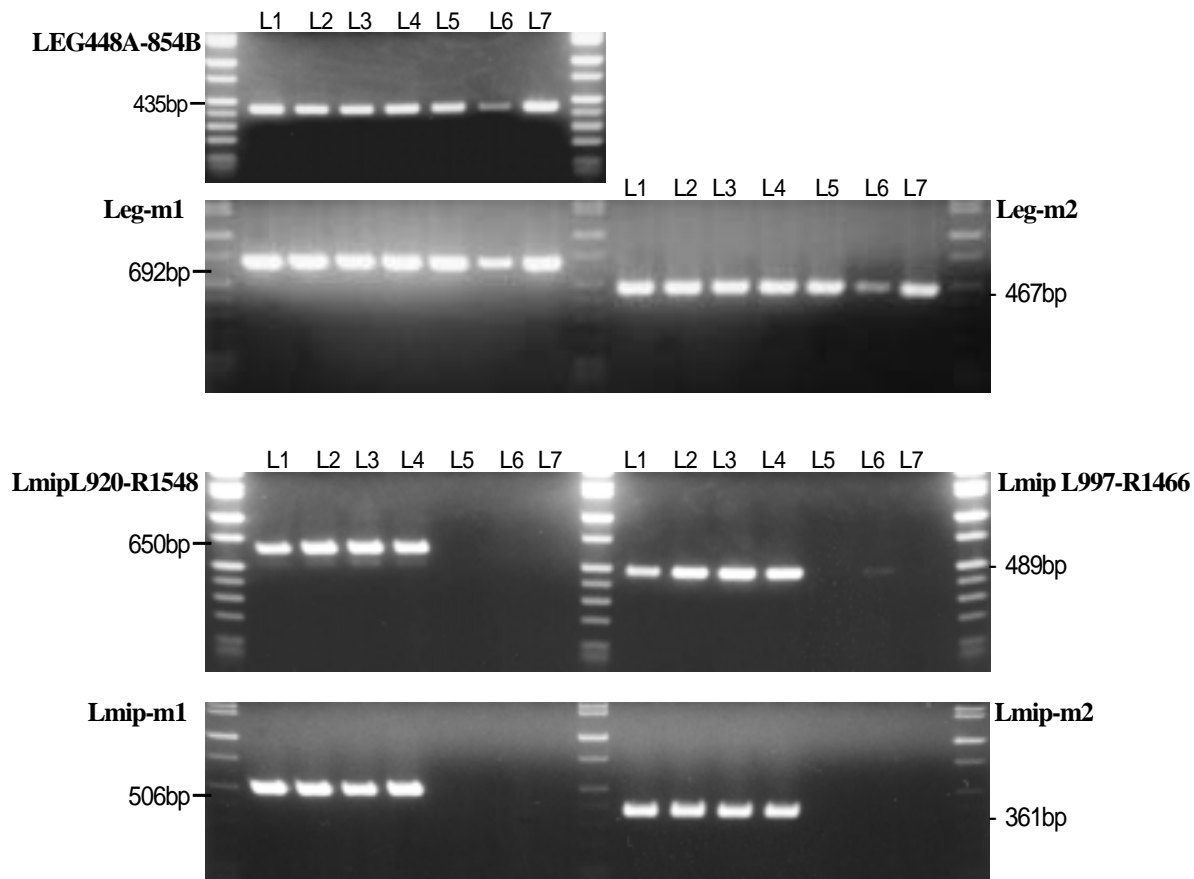
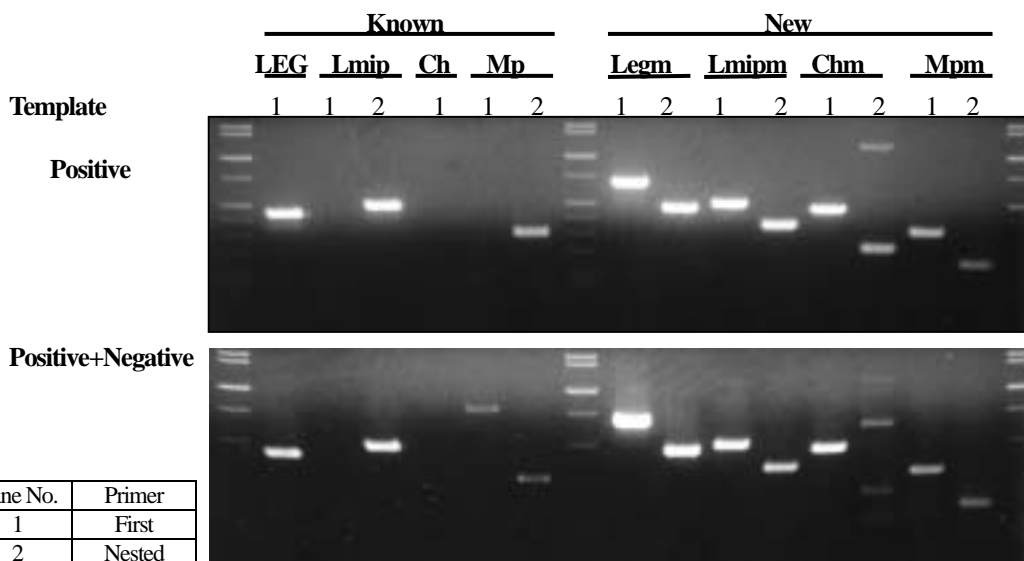


図4 Specificity



Lane No.	Primer
1	First
2	Nested

図5 Sensitivity (*Leg, Lmip*)

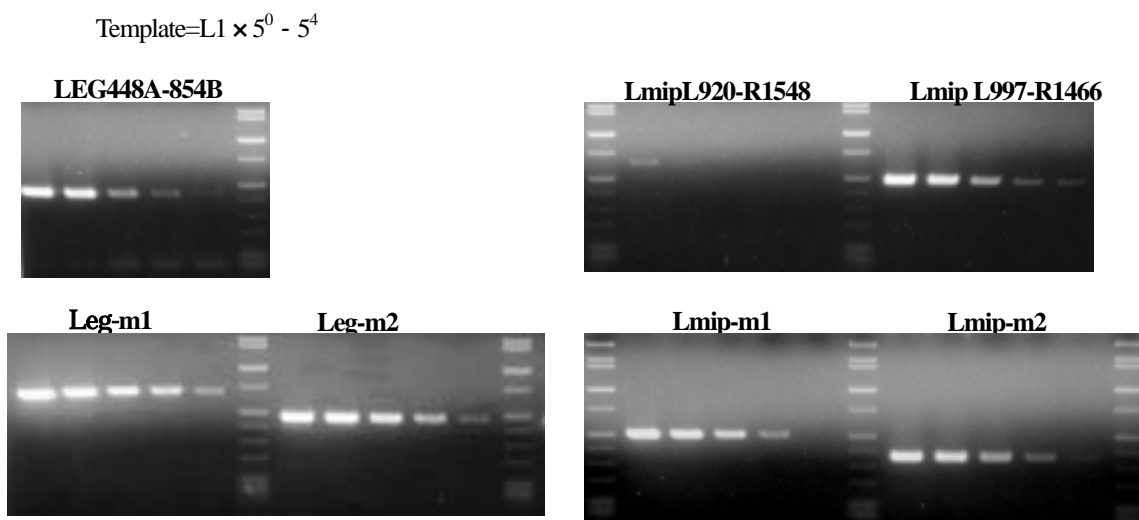


図6 Sensitivity (*Chlamydia*)

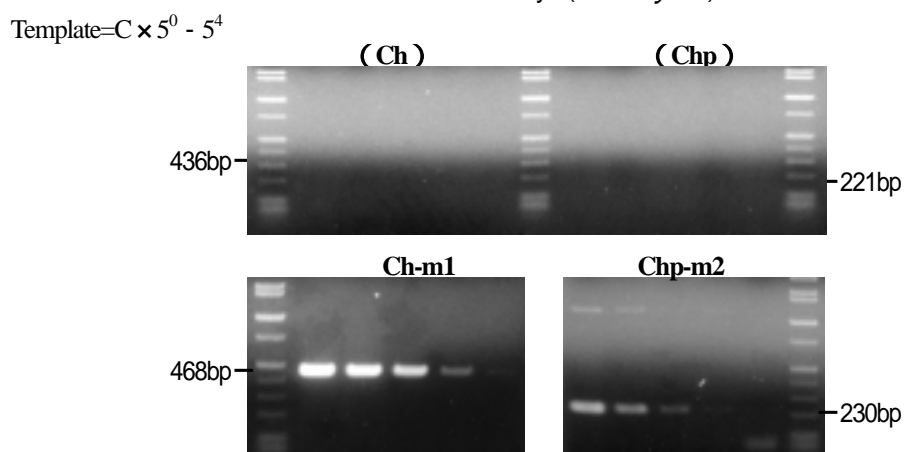


図7 Sensitivity (*Mycoplasma*)

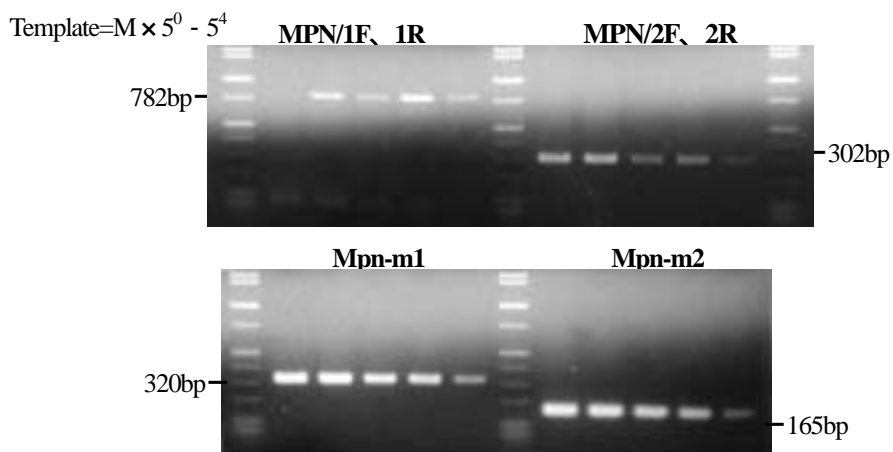


図8 Multiplex PCR

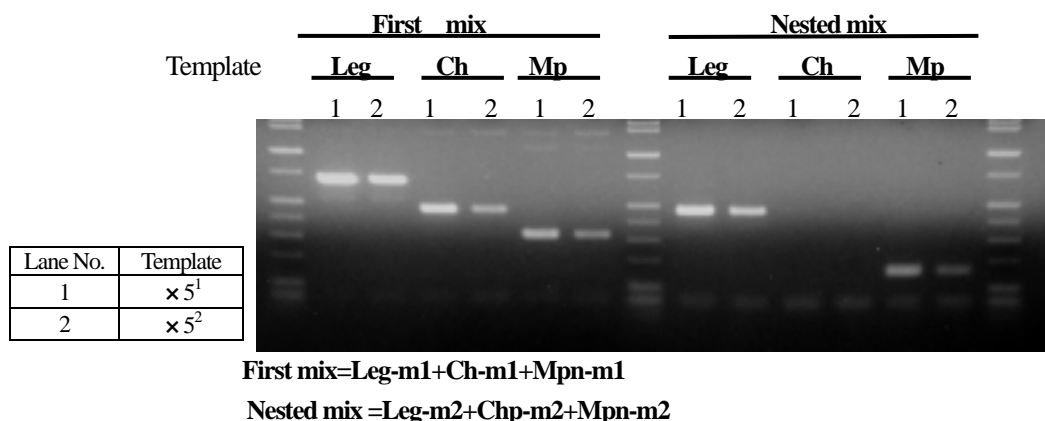


表3 各 Primer の増幅結果

Primer		Specificity	Sensitivity
<i>Legione lla</i> 16S r RNA	Known	1 <sup>st</sup>	
	New	1 <sup>st</sup>	
		2 <sup>nd</sup>	
<i>Legionella</i> <i>mip gene</i>	Known	1 <sup>st</sup>	×
		2 <sup>nd</sup>	×
	New	1 <sup>st</sup>	
		2 <sup>nd</sup>	
<i>Chlamydia</i> 16SrRNA	Known	1 <sup>st</sup>	×
		2 <sup>nd</sup>	×
	New	1 <sup>st</sup>	
		2 <sup>nd</sup>	
<i>Mycoplasma</i> 16SrRNA	Known	1 <sup>st</sup>	×
		2 <sup>nd</sup>	
	New	1 <sup>st</sup>	
		2 <sup>nd</sup>	

**まとめ及び考察**

今回設計した primer は病原体検査・診断マニュアル(感染研)およびTrudyらの文献に示された primer と比較して感度・特異性ともに優れていた(表3)。

Primer の感度・特異性については、設計時の target sequence の正確性や使用する PCR 試薬等によって大きく左右される。今回は GenBank のデータベースを利用して簡便に primer を設計したが、16SrRNA の Sequence では種によっては交差反応を示すものも多くあると考えられるため、*gyrB* など他のマーカー遺伝子や目的細菌固有の病原遺伝子等を

Target にした PCR についての検討も必要と思われる。

今後は他の primer との Multiplex 法なども検討して、呼吸器病原体の PCR スクリーニングに活用したい。

本稿をまとめるにあたり、菌株・DNA Template の提供をしていただいた宮崎県衛生環境研究所 河野貴美子氏、沖縄県衛生環境研究所 久高潤氏、ならびに長崎大学医学部 片峰茂教授に深謝いたします。

### 参 考 文 献

- 1)検査・診断マニュアル:レジオネラ症,肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*):国立感染症研究所
- 2)Trudy O.Messmer,et al:Application of a Nested, Multiplex PCR to Psittacosis Outbreaks,J.Clin.Microbiol.Aug:2043-2046(1997)