

PCR 法による臨床検査材料からの肺炎球菌の短時間検出について

五十嵐厚美¹⁾・村木 智子¹⁾・生方 公子¹⁾・中野 浩美²⁾
山根 明男²⁾・斎藤 洪太³⁾・紺野 昌俊¹⁾

¹⁾ 帝京大学医学部臨床病理*

²⁾ 湧永製薬(株)バイオ研究所

³⁾ さいとう小児科

(平成 7 年 8 月 3 日受付・平成 7 年 9 月 5 日受理)

PCR 法を応用して、検査材料中に存在する肺炎球菌を直接的に検出する方法を検討した。対象とした検査材料は、小児の急性気道感染症からの咽頭拭い液 288 検体である。PCR には、肺炎球菌に特有の自己融解酵素遺伝子 (*lytA*) の 694 bp から 966 bp 領域を増幅することのできるプライマーを設計した。本方法の検出感度は 1.2×10^3 CFU/ml、結果が得られるまでの所要時間は検査材料の処理も含めて約 2.5 時間であった。PCR の実行と同時に菌の培養も行い、両方法における検出率の比較を行った。培養による肺炎球菌の検出率は 288 例中 59 例 (20.5%) であったのに対し、PCR では 118 例 (41.0%) が陽性と判定された。これらのうち、 10^3 CFU/ml 以上の肺炎球菌が検出された検体では、PCR でもすべて陽性であった。培養で菌が証明できなかった検体でも、PCR で明らかな DNA 断片が認められたものもあった。これらのことから、肺炎球菌の検出には、PCR によって検体から直接菌の有無が確認できる本方法は臨床的に有用であろうと考えられた。

Key words: PCR 法, 直接検出, *S. pneumoniae*, autolysin 遺伝子 (*lytA*)

近年本邦においてもペニシリン耐性肺炎球菌の分離頻度が上昇¹⁾し、臨床的にも本菌による重篤な感染症が問題となってきた²⁻⁴⁾。しかしながら、臨床検査材料からの肺炎球菌の検出は検体採取後から処理までの時間、あるいは検体の保存状況、さらには CO₂ 培養施行の有無等によって左右されることも多い。このため本邦では本菌の検出率は施設によって必ずしも一定しないという問題も生じている。

このようなことから、肺炎球菌固有の遺伝子 *lytA* を利用して、検査材料中に存在する肺炎球菌の有無を、検査材料を直接用いた PCR 法によって検出し、同時に同検体を培養し、その培養成績と比較したので報告する。

I. 材料と方法

1) 検査材料

実験に供した 288 検体の咽頭ぬぐい液は、1994 年 10 月から 1995 年 3 月の期間に、小児科専門の診療所に来院した小児由来のものである。検体は輸送培地付きのシードスワブ[®] 1 号 (栄研化学(株)) で採取し、常温のまま当研究室あてに郵送されてきた。したがって、菌の培養ならびに PCR は検体採取日の翌日に行われたものである。

2) 菌の培養

被検体は 2 ml の Mueller-Hinton broth (Difco) 中に混釈した。その混釈液の各 10 μ l を①トリソイ血液寒天培地 No. 2 (極東製薬工業(株))、②チョコレート寒天培地 (極東製薬工業(株))、③マンニット食塩培地 (栄研

化学(株))、④ドリガルスキー改良培地 (栄研化学(株)) のそれぞれに塗布し、①と②については CO₂ 培養、③と④については好気培養を行った。培養条件は 35°C、24 時間培養としたが、血液寒天培地については 48 時間後にも肺炎球菌の発育の有無を確かめた。なお、血液寒天培地上に発育してきた肺炎球菌の菌数は、培地 1 枚あたり 100 colony (1×10^4 CFU/ml となる) 以上の発育が認められた場合を (+++), 10~99 colony (1×10^3 ~ $< 1 \times 10^4$ CFU/ml) である場合を (++)、10 colony 以下 ($< 1 \times 10^3$ CFU/ml) である場合を (+)、肺炎球菌様の発育が認められない場合を (-) と表現した。

3) プライマー

肺炎球菌検出のためのプライマーとしては、本菌に特有の遺伝子である自己融解酵素 (autolysin) 遺伝子 (*lytA*) の塩基配列にもとづき、Fig. 1 に示す一対のプライマーを設計した⁵⁾。sense 側は 694 bp からの 20 mer のオリゴヌクレオチド、antisense 側は 945 bp からの 22 mer のオリゴヌクレオチドであり、このプライマーによって増幅される DNA 断片は 273 bp である。

4) PCR

菌培養を実施した残りの混釈液 1.5 ml をエッペン ドルフチューブに移し、4°C、7,000 rpm、5 分間遠心し集菌した。上清をほぼ完全に捨て去った後、10 μ l の滅菌蒸留水を加えて、ミキサーでよく攪拌し、この沈渣の 2 μ l を 20 μ l の溶菌液入り PCR 用チューブに加え

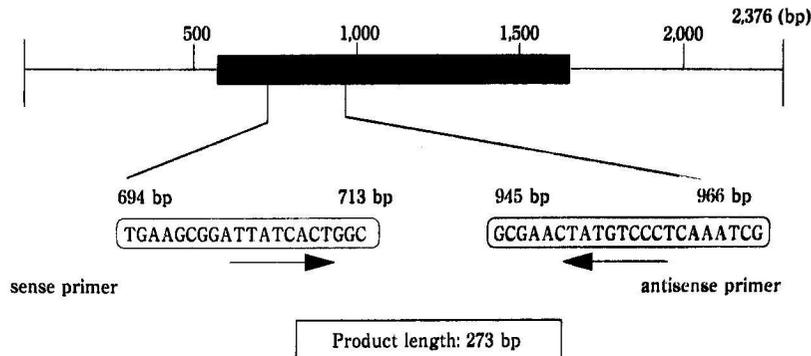


Fig. 1. Sequences of oligonucleotide primers and their positions in the *lytA* gene of *Streptococcus pneumoniae* used in this study. The nucleotide sequences are numbered on the basis of data reported by Garcia P et al, Gene 43: 265~272, 1986.

た。溶菌液の組成は、100 mM Tris-HCl (pH 8.9), 1.5 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 500 μg bovine serum Alb/ml, 0.1% sodium cholate, 0.1% triton X-100, 200 μg proteinase K/ml, 0.45% tween 20, 0.45% nonidet P-40である⁶⁾。

PCR用チューブは thermal cycler (Gene Amp 9600 R: Perkin-Elmer Cetus) にセットし、60°Cで20分、94°Cで10分の溶菌操作を行った。次に、チューブを取り出して、プライマー混合液を各5 μlずつ加えた後、再び thermal cycler にセットして、94°Cが30秒、55°Cが30秒、72°Cが1分の条件下で30サイクルのDNA増幅を行った。

このようにして得られたサンプルは3%アガロースゲルにて電気泳動を行い、ethidium bromide 染色によってDNAのバンドを観察した。サイズマーカーとしては、pUC 19を *MspI* で切断したものを用いた。

5) PCRの感度

PCRの感度測定には化膿性髄膜炎から分離された血清型19型の肺炎球菌を用いた。10 mlのTodd Hewitt broth (TH broth: Difco) に被検菌を接種し、CO₂培養下にて18時間前培養した。翌日、この1 mlを新鮮な10 mlのTH brothに植えつぎ、さらに2時間培養した菌液を原液とした。菌液の希釈方法は、TH brothを用いて10倍希釈で2管行い、それ以降は2倍希釈を10段階行った。

増幅されたDNAの表記については、マーカーサイズとして用いたpUC 19の *MspI* 切断のDNAフラグメントの1番目(501 bp)と2番目(488 bp)の断片の濃さに匹敵する濃度を(+++), 3番目(404 bp)と4番目(331 bp)の濃さに匹敵するものを(++), 7番目(147 bp)と8番目(111 bp)の濃さに匹敵するものを(+)とした(Fig. 2参照)。

なお、ここには示していないが、ブドウ球菌、*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*,

Streptococcus mitis, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* などから抽出したDNAを用いたプライマーでの特異性に関する検討では、いずれも非特異的DNAフラグメントは認められなかった。

II. 結 果

1) PCRによる検出感度

今回のPCRに使用した溶菌方法と反応組成液での肺炎球菌の検出感度をFig. 2に示す。

写真からも明らかなように、カラム1~2の 1×10^3 CFU/ml以上のものでは(+++)の明瞭なDNAフラグメントが観察され、カラム3~4の $2.3 \times 10^2 \sim 5.7 \times 10^2$ CFU/mlのものでは(++)としたDNAフラグメントが観察され、カラム5~6の接種菌量 $1.4 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^2$ CFU/mlのものでは、EB染色を忠実に行えばDNAフラ

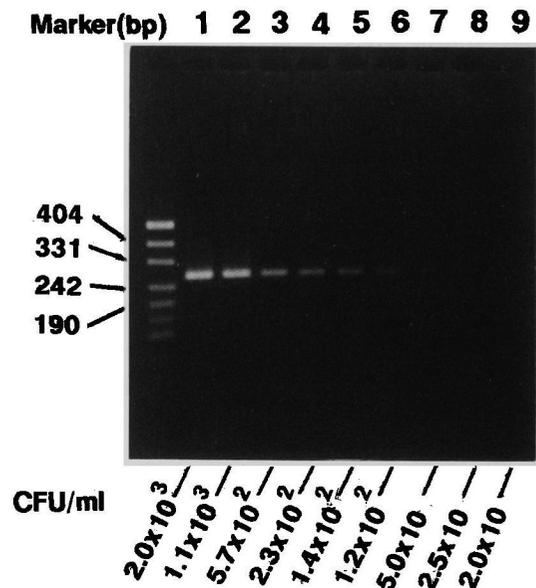


Fig. 2. Sensitivity of PCR in detecting the *lytA* gene of *Streptococcus pneumoniae*.

グメントは (+) で観察可能であった。

つまり、本法による肺炎球菌の検出感度は、 1.2×10^2 CFU/ml 前後以上となった。

2) 培養と PCR の成績

Fig. 3 に実際に送付されてきた検体の 14 検体について実施された PCR 後の成績を示す。図の下方に培養成績と増幅された DNA フラグメントの判定を記した。

Fig. 4 にこのようにして観察した 288 検体についての PCR の成績と、同時に実施した培養成績の関係を示す。縦軸は PCR 後の DNA 量にもとづく (-) ~ (+++) の区分で表し、各区分については培養で肺炎球菌が検出されたものを positive, 培養で肺炎球菌が認められず陰性と判定したものを negative として表してある。PCR (+++) のものは 288 例中 57 例 (19.8%) に認められたが、培養で positive と判定されたものはそのうちの 38 例 (66.7%) であった。PCR

(++) は 23 例 (8.0%) において認められたが、これらの症例においても培養 positive と判定されたものは 6 例 (26.1%) に過ぎなかった。PCR (+) であったものは 38 例 (13.2%) で、培養 positive の例はそのうちの 15 例であった。PCR (-) 例では培養でもすべて negative であった。

これらを合計すると、PCR 陽性例は 288 例中 118 例 (41.0%) となったのに対し、培養での菌陽性例は 288 例中 59 例 (20.5%) であった。

3) 菌量と PCR の成績との関係

PCR で陽性と判定された 118 例について、検出された肺炎球菌の菌量と PCR によって得られた成績との関係を Fig. 5 に示す。検出菌量が 10^4 CFU/ml 以上、すなわち、10 μ l の検体培養で培地上に 100 colony 以上のコロニーの発育がみられ、(+++) とした 13 検体は、PCR でも全例 (+++) と判定されていた。次いで培地上に 10 colony 以上 ~ 100 colony 以下の肺炎球菌が検出され ($1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), 培養で (++) とした 10 検体では、1 例が PCR (++) であったが、

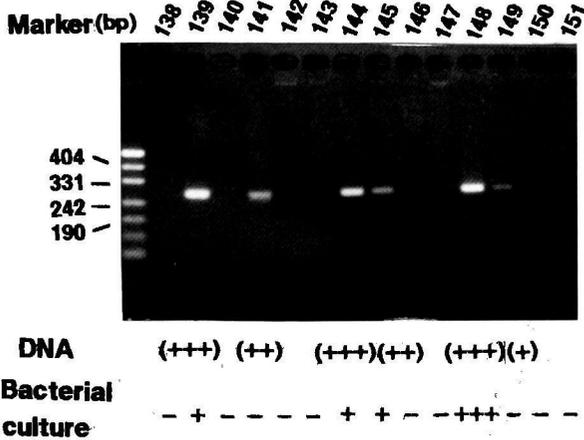


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of an amplified 273-bp DNA fragment of the *lytA* gene from throat specimens by PCR.

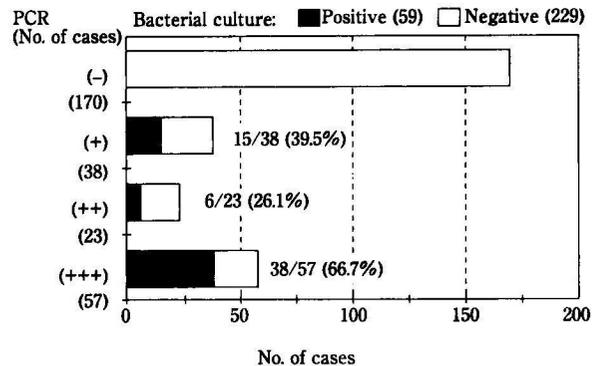


Fig. 4. Correlation between the presence of the *lytA* gene by PCR and the results of bacterial cultures.

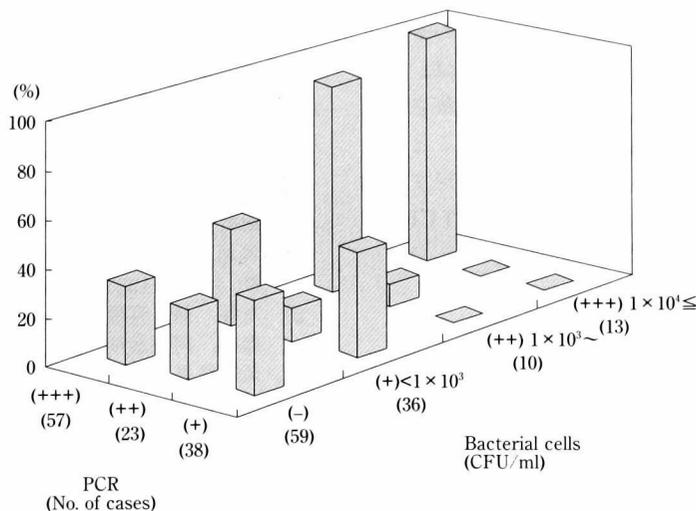


Fig. 5. Correlation between the presence of the *lytA* gene by PCR and bacterial cell counts.

9例はPCR(+++)と判定された。つまり、菌量が 10^8 CFU/ml以上含まれている検体では培養とPCRとは高い相関を示した。

一方、肺炎球菌の培養成績が1 colony~10 colony程度であった36例においては、PCR後の成績は(+)から(+++)までかなりのバラつきがみられた。

また、培養で肺炎球菌が検出されなかったが、PCRで陽性と判定された59例ではPCRで(+), (++)、(+++)と判定されたものがほぼ同数ずつみられた。

III. 考 察

血液⁷⁻⁹⁾、喀痰¹⁰⁾、耳漏¹¹⁾等の検査材料を用いて直接PCRを行い、肺炎球菌の有無を検索した成績はすでにいくつか見られている。これらはいずれも肺炎球菌に特徴的な自己融解酵素を支配する遺伝子(*lytA*)⁶⁾の一部を増幅するように設計されている。しかしながらDNAを抽出する方法や、結果が得られるまでの所要時間、あるいはその検出感度にかかなりの相違が見られる。

一方、本菌が髄液や血液あるいは胸水といった、本来無菌であるべき検査材料から検出される際には、起炎菌としての判断は容易であるが、咽頭や喀痰から検出された際には、その判断は必ずしも容易ではなく、検出された肺炎球菌の菌量、あるいは患者の臨床症状やその他の検査結果から判断するのが常道である。そういった意味からは、検出される肺炎球菌の菌量が極めて大切な意味をもっている。つまり、本法において、PCRによる肺炎球菌の検出感度をどの程度に設定すればよいかということが、ことに小児の咽頭粘液の場合には大変重要なこととなる。

本論文は、そのような観点からの検討結果であるが、ここで用いた手法は基本的には我々が開発した黄色ブドウ球菌の*mecA*遺伝子の検出法と変わらない。すなわち、黄色ブドウ球菌の際と同じ菌溶解液を用いているのである⁶⁾。しかし、肺炎球菌について見られた特徴はブドウ球菌と異なって、同じDNAの増幅回数であるにもかかわらず、その検出感度はブドウ球菌のそれより10倍優れていたことであった。この理由には、肺炎球菌は用いた溶菌液によって比較的容易に溶菌されることにあると考えられる。つまり、遠心することにより理論的に菌数は100倍に濃縮されたと仮定すると、当初の検査材料の混釈液1 ml当たり10~20 CFUの生菌か死菌である肺炎球菌が存在すれば、PCRで陽性と判定されることになる。

加えて、検査材料の混釈に用いたMH brothはPCRを阻害することなく、集菌する遠心操作が1回のみでPCRを行うことができることも特記すべきことである。

小児の急性気道感染症、ことに上気道感染症では咽頭ぬぐい液中に肺炎球菌が存在するか否かを判定することがきわめて大切である。しかし、咽頭粘液中には

常に多数の口腔内常在レンサ球菌が混在することに加え、健康小児にあっても肺炎球菌が検出される場合も多い。また、咽頭ぬぐい液を採取するのは綿棒であり、輸送培地付きの綿棒を用いたとしても培養に至るまでの時間の経過によっては死滅することもある。このことは細菌検査室での肺炎球菌の検出率のばらつきの原因となるのみならず、起炎菌としての病原性を判定するうえできわめて難しい問題を提起している。

たとえば、今回の検討においても、培養における肺炎球菌の検出率が288例中59例(20.5%)であったのに対し、PCRで肺炎球菌陽性と判定された例は41.0%と約2倍であった。しかしながら、培養で肺炎球菌が検出されたものはすべてPCRでも陽性であり、PCR陰性で培養で肺炎球菌が検出された症例が1例も見出されなかったことは、本論文中でもっとも重要なことである。しかも、PCRで(++)あるいは(+)と判定された例は、培養での肺炎球菌の菌量はすべて(++)以下と平行していたことも注目される。

このようなことから、PCRで(+++)あるいは(++)と判定されながら、培養では肺炎球菌が検出されなかった例は、検査材料中にかかなりの菌量の肺炎球菌が存在していたにもかかわらず、輸送の段階あるいはすでに使用されていた抗菌薬の影響により死菌と化していたと解釈すべきであろう。

そのようなことを考えると、ここで述べた方法は採取した検体を比較的短時間のうちに処理することさえ配慮すれば、肺炎球菌の培養結果と相関するものと考えられ、PCRで(+++)であるにもかかわらず培養で肺炎球菌が検出されない際には、すでに使用していた抗菌薬が効を奏しつつあるものと判断できることもあり得る。

もとより髄膜炎や敗血症においては、たとえ1 CFUの菌であっても検出することが必要で、ことに敗血症では不可欠である。そのためには、本法よりさらに鋭敏な方法を考えなければならない。しかしながら、小児の急性気道感染症においては、本方法程度の測定感度の方がかえって有用性が高いものとする。将来的には、ペニシリン耐性肺炎球菌であるか否かの判定も同時に行える方法を確立したいと考えている。

文 献

- 1) 紺野昌俊, 他: ペニシリン耐性肺炎球菌研究会: 全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究. 感染症誌 68: 1338~1351, 1994
- 2) 有益 修, 目黒英典, 白石裕昭, 菅又久美子, 比留間藤昭, 阿部敏明: β -ラクタム剤が無効であった肺炎球菌髄膜炎の1例. 感染症誌 62: 682~683, 1988
- 3) 水見京子, 他: ペニシリン耐性肺炎球菌髄膜炎の1例と小児より分離された肺炎球菌抗菌薬剤感受性の検討. 感染症誌 64: 725~732, 1990
- 4) 重野秀明, 山崎 透, 永井寛之, 後藤陽一郎, 田代隆良, 那須 勝, 野路弓子, 小比木研二: β -ラクタム薬耐性肺炎球菌性肺炎で死亡した1例と分離菌の耐性機

- 序。感染症誌 66: 508~514, 1992
- 5) Garcia P, Garcia K L, Garcia E, Lopez R: Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* 43: 265~272, 1986
 - 6) Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Kawakami S, Sugiura M, Konno M: Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant Staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1728~1733, 1992
 - 7) Zhang Y, Isaacman D J, Wadowsky R M, Rydquist-White J, Post J C, Ehrlich G D: Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 596~601, 1995
 - 8) Rudolph K M, Parkinson A J, Black C M, Mayer L W: Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2661~2666, 1993
 - 9) Hassan-king M, Baldeh I, Secka O, Falade A, Greenwood B: Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood cultures by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1721~1724, 1994
 - 10) Gillespie S H, Ullman C, Smith M D, Emery V: Detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1308~1311, 1994
 - 11) Virolainen A, Salo P, Jero J, Karma P, Eskola J, Leinonen M: Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2667~2670, 1994

Direct and rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* in clinical specimens by PCR

Atsumi Igarashi¹⁾, Tomoko Muraki¹⁾, Kimiko Ubukata¹⁾, Masatoshi Konno¹⁾,
Hiromi Nakano²⁾ and Akio Yamane²⁾

¹⁾ Department of Clinical Pathology, Teikyo University, School of Medicine, Tokyo, Japan

²⁾ Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., Hiroshima

We assessed the direct detection of *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples using the polymerase chain reaction (PCR) method. A total of 288 throat swab specimens were collected from children with acute respiratory infection. A set of primers for the PCR was designed to amplify the region between position 694-bp and 966-bp in the autolysin gene (*lytA*), which is specific for *S. pneumoniae*. The sensitivity of detection was 1.2×10^2 CFU/ml. The PCR procedure, including pretreatment of the sample, took about 2.5 hours. Bacterial cultures were performed from the same specimen in parallel with the PCR to compare the individual detection efficiencies. Cultivation revealed *S. pneumoniae* in only 59 (20.5%) of the 288 specimens, whereas the PCR revealed 188 (41.1%) to be positive. PCR was also positive in all samples containing at least 10^8 CFU/ml of bacteria. An obvious DNA fragment was detected by PCR in some culture-negative samples. These results suggest that PCR is clinically useful for detecting *S. pneumoniae* directly.