

[原 著]

TRC 法を用いた結核菌検出方法 (TRCRapid M. TB 東ソー) の有用性に関する検討

田村 卓・富永健司・坂本和美・鶴川治美・前田沙織・若林真理子
佐々木十能・石川智子・阿部郁朗・海渡 健
東京慈恵会医科大学附属病院中央検査部

(平成 19 年 8 月 29 日受付, 平成 20 年 1 月 17 日受理)

転写-逆転写協奏反応 (transcription-reverse transcription concerted reaction: TRC 反応) は標的 RNA を一定温度で増幅させる新しい反応で, RNA の切断, 増幅, 増幅 RNA の検出を 1 本のチューブ内で連続的に反応させ, 迅速かつ簡便に検査できる新規遺伝子増幅法である。今回筆者らは 16SrRNA 遺伝子を標的とし, 発光プローブと TRC 反応を組み合わせることにより検出可能な RNA 増幅法である TRC 法による結核菌検出方法 (TRCRapid M. TB 東ソー) について, 84 検体を対象に日常検査で行っている PCR 法や液体培養法との比較検討を行った。その結果, TRC 法と PCR 法の一致率は 97.6%, TRC 法と培養法の一致率は 96.4% であった。一部検体に認められた測定結果の乖離は, 検体を凍結処理することで消失したため, 凍結処理により影響が消失する阻害物質が TRC 反応系に影響していたものと考えられた。この乖離惹起物質の同定は困難であったが, 反応時間に注意することでデータ解析上の問題点は回避された。以上より, 簡便かつ短時間で結果の得られる TRC 法は結核菌の迅速検出に有用であると考えられた。

Key words: TRC 法, PCR 法, 液体培養法, 結核菌

序 文

近年, 結核症に対する関心が高まってきているが, 特に発症あるいは排菌の有無を確認することは院内感染予防あるいはリスク管理の面からも非常に重要である^{1), 2)}。通常は塗抹染色, 培養, あるいは polymerase chain reaction 法 (以下 PCR 法) による遺伝子増幅法が行われ, 最近では感染の有無を検査する新たな方法として結核菌特異インターフェロン検出 (Quantiferon-TB 2 G) なども導入されている。その中でも優れた感度あるいは特異性から PCR 法の有用性は極めて高く, 代表的核酸増幅法として結核菌診断上非常に重要な位置を占め, 一定の評価が得られている。PCR 法には遺伝子を増幅し反応結果が出るまでの時間的問題や簡便性などの問題点が残されていることも事実である。PCR 法以外にも transcription-mediated amplification (TMA) や nucleic acid se-

quence base amplification (NASBA) 法などさまざまな遺伝子増幅法があるが, 近年 Ishiguro らは PCR 法とは異なり一定温度下で反応し, 非常に短時間で定量的結果が出る優れた遺伝子増幅法である transcription-reverse transcription concerted reaction (TRC 反応) を開発した³⁾。さらに, この方法に, 目標遺伝子と結合することで蛍光強度が増強する intercalation-activating fluorescence (INAF) プローブを組み合わせた TRC 法を用いることで, 遺伝子増幅, 検出の新たなアプローチが可能となった⁴⁾。また, Takakura らはこの方法を利用した結核菌の自動検出システムを考案し, 気道分泌物を対象とした優れた有効性を報告している⁵⁾。その後, この TRC 法を用いた結核菌検出試薬は市販の体外診断用医薬品として使用可能な状況となっている (TRCRapid M. TB 東ソー)。

今回筆者らは TRC 法による結核菌検査の有用性を検証するため, 当細菌検査室に提出されたさまざまな結核菌検査材料を対象に日常検査で行っている PCR 法や培養法との比較検討を行ったので報告する。

著者連絡先: (〒105-8471) 東京都港区西新橋 3-19-18
東京慈恵会医科大学附属病院中央検査部
田村 卓
TEL: 03-3433-1111
E-mail: t_tamura@jikei.ac.jp

材料と方法

対象検体は当院中央検査部に結核菌 PCR 検査依頼があった *N*-アセチル-L-システイン (NALC) 処理直後の 84 検体で、内訳は喀痰 67 件、胃液 8 件、気管支洗浄液 3 件、胸水 3 件、皮膚 2 件、腫瘍組織 1 件であった。NALC 処理後の再懸濁量はリン酸バッファー (PBS) で 1,000 μ l、PCR 法の検体使用量は 100 μ l、TRC 法の検体使用量は 200 μ l であり、喀痰以外の検体処理については、胃液、気管支洗浄液、胸水は沈渣にしたものを喀痰と同様に NALC 処理し、PBS で洗浄を 2~3 回行い、組織検体についてはホモジネイトしたものを NALC 処理し PBS で洗浄し、PBS 1,000 μ l で再懸濁し使用した。これらを対象として、PCR 法と TRC 法による結核菌遺伝子の検出、MGIT 法による液体培養による結核菌の検出を行い、各測定方法間の検出率の相違を検討した。TRC 法は TRCRapid M. TB を使用し TRC モニター TRCRapid-160 (東ソー) で測定し、PCR 法は COBAS AMPLICOR *M. tuberculosis* を COBAS AMPLICOR (ロシュダイアグノスティックス) を使用して測定した。また液体培養は BACTEC MGIT システム (ベクトンディッキンソン) にて行った。

TRC 反応は標的 RNA を一定温度で増幅させる方法で、RNA の切断、増幅、増幅、検出という三つの工程が 1 本のチューブ内において同一温度下で行われる。切断工程では、シザープローブが標的 RNA の特定部位を切断し、切断された RNA に 2 種類のプライマー (アンチセンスプライマーとプロモータープライマー) と逆転写酵素が働き、RNA が合成され増幅サイクルに入る。検出工程では、標的核酸存在下で蛍光が増強する INAF プローブによる蛍光を TRC モニターにて 470 nm の励起光を反応溶液に集光し、520 nm と 610 nm の 2 波長で測定する。TRC 法結核菌検出試薬は、結核菌 16S rRNA を増幅検出するためのプライマーセットおよびオキサゾールイエローが結合した INAF プローブ (蛍光波長 520 nm) と、内部標準核酸を増幅検出するためのプライマーセットおよびエチジウムブロマイドが結合した INAF プローブ (蛍光波長 610 nm) から構成され、試料中に結核菌 16S rRNA が含まれない場合は内部標準核酸のみに反応した 610 nm の蛍光だけが増強し、16S rRNA が存在する場合は 520 nm と 610 nm の蛍光がともに増強する。

表 1 TRC 法, PCR 法, MGIT 法の相関

		PCR法	
		陽性	陰性
TRC法	陽性	8	0
	陰性	2	74

一致率:97.6%

		MGIT法	
		陽性	陰性
TRC法	陽性	8	0
	陰性	3	73

一致率:96.4%

結 果

1. 測定方法による検出率の相関

NALC 処理直後に測定した 84 検体では、PCR 法と TRC 法がともに陰性となった検体は 74 件、ともに陽性であったものが 8 件であり、一致率は 97.6% であった。PCR 法陽性であるにもかかわらず TRC 法が陰性であったものが 2 件、PCR 法陰性かつ TRC 法陽性の検体はなかった。PCR 法と TRC 法が不一致だった検体は膿性喀痰と胃液検体であった。TRC 法と培養法がともに陰性であった検体は 73 件、ともに陽性であったものが 8 件であり、一致率 96.4% であった。TRC 法陰性で培養法陽性が 3 件 (胃液 2 件、喀痰 1 件) 見られたが、TRC 法陽性培養法陰性はなかった。PCR 法と培養法がともに陽性であった検体は 10 件、ともに陰性であったものが 73 件であり、一致率は 98.8% と高かった (表 1)。培養陽性であるにもかかわらず PCR 法陰性が 1 件 (胃液) 見られた。この検体は PCR 法と TRC 法ともに陰性で培養陽性であった検体であった。これらを検体別にまとめ表 2 に示した。培養法との一致率を比較すると、喀痰では TRC 法 93.9%、PCR 法 95.5%、胃液では TRC 法 77.8%、PCR 法 88.9% であり、PCR 法と培養法の一致率が若干上回る結果となった。

2. 乖離例の検討

TRC 法と PCR 法の結果が乖離した 2 検体はいずれも PCR 法、培養法では陽性であったため、TRC 法に何らかの乖離要因があると考えられた。そこでこの乖離理由を検索するため、検体の TRC 法反応曲線の解析を行った。その結果、非乖離検体では内部標準核酸に対する陽性反応を示す第 2 波長の陽性検知時間が平均 770 秒であったのに対して、これら乖離検体では 1,007 秒と 1,277 秒と明らかに延長していた

表2 検査材料別一致率

喀痰	PCR法		喀痰	培養法		喀痰	培養法	
	陽性	陰性		陽性	陰性		陽性	陰性
陽性	8	0	8	0	9	0	0	
陰性	1	57	4	54	3	54	54	
一致率: 98.5%			一致率: 93.9%			一致率: 95.5%		

胃液	PCR法		胃液	培養法		胃液	培養法	
	陽性	陰性		陽性	陰性		陽性	陰性
陽性	0	0	0	0	1	0	0	
陰性	1	8	2	7	1	7	7	
一致率: 88.9%			一致率: 77.8%			一致率: 88.9%		

その他	PCR法		その他	培養法		その他	培養法	
	陽性	陰性		陽性	陰性		陽性	陰性
陽性	0	0	0	0	0	0	0	
陰性	0	9	0	9	0	9	9	
一致率: 100%			一致率: 100%			一致率: 100%		

表3 内部標準核酸の陽性検知時間が1,000秒以上の検体

検体種	PCR法	TRC法	内部標準核酸検知時間(秒)	液体培養法
胃液	-	-	1087	+
喀痰	+	-	1007	+
胃液	+	-	1277	+

惹起物質の同定は困難であった。

考 案

院内感染対策のリスク回避という観点から結核菌の検出はいかに早く、正確に結果を報告するか、ということが極めて重要になる。米国のCDCでは結核菌の分離・同定結果を21日以内に報告するよう勧告しているが、従来から日本で主流となっている培養法(小川法)は長期時間を必要としこの条件を満たすことができないことから、現在はPCR法が最もこの条件に近い検索方法であると考えられている。しかしPCR法といっても、DNAの抽出に1時間30分~2時間、増幅から検出に4~5時間、総工程6~7時間程度の測定時間が必要となるため、より簡便かつ迅速性に優れ、しかも性能の劣らない検査方法が望まれていた。TRC法はRNAの抽出に1時間30分~2時間、増幅から検出までは30~40分程度、総工程2~3時間とPCR法と比較して極めて短時間で測定結果を報告することができる優れた方法であり、*Vibrio parahaemolyticus*⁶⁾、やCEA産生悪性腫瘍の微小転移⁷⁾、CEA産生多発性骨髄腫の証明⁸⁾、ノロウイルスの迅速診断などに有用な方法であると報告されている。また、益田らはTRC法を利用した結核菌検出試薬を開発し、迅速な遺伝子増幅方法としての検証ならびに結核菌に対する薬剤感受性試験への応用に関して報告している⁹⁾。Takakuraらは薬剤感受性試験をTRC法により行い各種培養法との一致率を検討し、rifampin耐性診断の一致率はMGIT法とは86.7%、小川法とは100%、isoniazidの場合はそれぞれ93.3%と100%と優れた一致率を認め、短時間で結果が判明する優れた迅速性も勘案すると、新たな薬剤感受性試験方法の候補になると報告している¹⁰⁾。筆者の施設でも結核の早期診断の重要性が唱えられており、TRCの導入に向けて、基準となるPCR法や培養法との相関につき検討した。その結果は満足できるものであったが、PCR法とは2件、培養法とは3件の乖離例が認められた。今回測定した検体では、内部標準の陽性検知

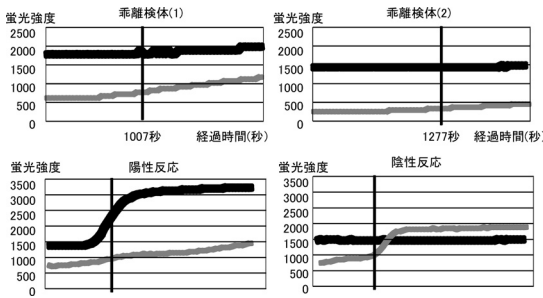


図1 乖離検体の反応曲線と標準的陽性、陰性反応
黒線は検体検出を表す第一波長を、灰色線は内部標準核酸の検出を表す第二波長を示している。通常の陽性あるいは陰性反応では第二波長は比較的早期に上昇するが、乖離検体においてはその上昇がなだらかで、開始時期も遅延している。

(図1)。そこで全検体の中からこのように反応時間の延長を認め、培養結果との乖離を認めた検体を抽出すると3件認められ、そのうち2例が培養陽性、PCR法陽性でTRC法陰性であった検体、残り1検体はPCR法とTRC法がいずれも陰性で培養法と乖離した検体であった(表3)。培養陽性でほか2法が陰性であった検体は菌量が少なかったことが原因と考えられたが、TRC法のみ陰性の検体では検体由来の何らかの物質が反応系に影響を及ぼしたことが考えられたため、この影響を否定するためNALC処理後の検体をいったん凍結し、反応阻害物質の影響が消えるか検討した。その結果、第2波長の陽性検知時間はそれぞれ746秒と672秒に短縮し、両検体とも陽性と判断された。そのため、凍結処理により影響が消失する何らかの阻害物質が影響していたものと考えられたが、この乖離

時間の平均は770秒であり、1,000秒を超えるものを明らかに遷延していると考え、乖離検体ではすべて内部標準核酸の陽性検知時間が1,000秒以上に延長しており、検体由来の何らかの物質がTRC反応系を阻害した可能性が考えられた。現在通常業務で行っているPCR法において、いったん凍結することにより阻害の影響が消えることを経験していたため、TRC法においても同様な検討を行った。その結果、このような阻害反応は検体を一度凍結することで認められなくなることから、温度変化により作用が消失する共存物質による阻害反応であることは明らかとなったが、その物質を同定するまでには至らなかった。またこの内部標準核酸に対する反応時間に留意することで、乖離検体の確認の一助になることが示唆された。

以上より、本方法は迅速性、簡便性に優れ、満足した一致率を示したため、問題なく臨床に応用できるものと考えられた。ごくわずかの乖離検体に関しては、内部標準核酸の陽性検知時間に注意を払い、これが延長するような場合は反応阻害物質の存在を疑う必要があるものと考えられた。しかし、今回の検討では実際の陽性検体が少なく、今後検討数をさらに増加し、より詳細な検討を行い、現段階での標準的方法であるPCR法との優位性を検討していくことが必要である。

文 献

- 1) Tenover, F. C., J. T. Crawford, R. E. Huebner, et al. 1993. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J. Clin. Microbiol.* 31: 767-770.
- 2) Jensen, P. A., L. A. Lambert, M. F. Iademarco. 2005. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings, 2005. *MMWR Recomm. Rep.* 54: 1-141.
- 3) Ishiguro, T., J. Saitoh, R. Horie, et al. 2003. Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel. *Anal. Biochem.* 314: 77-86.
- 4) Ishiguro, T., J. Saitoh, H. Yawata, et al. 1996. Fluorescence detection of specific sequence of nucleic acids by oxazole yellow-linked oligonucleotides. Homogeneous quantitative monitoring of *in vitro* transcription. *Nucleic Acids Res.* 24: 4992-4997.
- 5) Takakura, S., S. Tsuchiya, Y. Isawa, et al. 2005. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by transcription-reverse transcription concerted reaction with an automated system. *L. Clin. Microbiol.* 43: 5435-5439.
- 6) Nakaguchi, Y., T. Ishizuka, T. Hayashi, et al. 2004. Rapid and specific detection of *tdh*, *trh1*, and *trh2* mRNA of *Vibrio parahaemolyticus* by transcription-reverse transcription concerted reaction with an automated system. *Clin. Microbiol.* 42: 4284-4292.
- 7) Ishii, T., Y. Fujiwara, S. Ohnaka, et al. 2004. Rapid genetic diagnosis with the transcription-reverse transcription concerted reaction system for cancer micrometastasis. *Ann. Surg. Oncol.* 11: 778-785.
- 8) Kaito, K., H. Otsubo, S. Takahara, et al. 2007. Carcinoembryonic antigen (CEA)-producing multiple myeloma detected by transcription-reverse transcription concerted reaction system. *Int. J. Hematol.* 85: 128-131
- 9) 益田昇佳, 土屋滋夫, 伊澤祐一, 他. 2002. 結核菌測定試薬の開発. *東ソー研究・技術報告* 46: 3-9.
- 10) Takakura, S., S. Tsuchiya, N. Fujihara, et al. 2005. Isothermal RNA sequence amplification method for rapid antituberculosis drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2489-2491.

Transcription–Reverse Transcription Concerted Reaction in Detecting
Mycobacterium tuberculosis (TRCRapid M. TB)

Taku Tamura, Kenji Tominaga, Kazumi Sakamoto, Harumi Tsurukawa,
Saori Maeda, Mariko Wakabayashi, Mitsutaka Sasaki,
Tomoko Ishikawa, Ikuro Abe, Ken Kaito
Central Clinical Laboratory, Jikei University Hospital,
3–19–18 Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105–847, Japan

Transcription–reverse transcription concerted reaction system (TRC system) is a new method for the amplification and the detection of the target RNA, and it is recently introduced to the rapid detection system for *Mycobacterium tuberculosis* as TRCRapid M. TB (TOSOH). We examined the presence of *Mycobacterium tuberculosis* in 84 samples by TRC system, PCR system and liquid culture, and the efficiency of TRCRapid M. TB (TOSOH) was evaluated. As a result, the rate of agreement between TRC system and PCR system was 97.6%, and the rate between TRC system and liquid culture was 96.4%. The discrepancy was observed in a few samples, while it was disappeared by cryo-preservation of the applied samples. In such samples, the detection time of the internal control was also prolonged. Therefore, we could find the false negative phenomenon by paying attention to such prolongation. These results indicated that TRC system for *Mycobacterium tuberculosis* is a very satisfactory system, and could be introduced to the clinical use.