

# Polymerase Chain Reaction (PCR) 法 の感染症診断への応用

——結核性髄膜炎の迅速診断について——

新潟大学脳研究所神経内科学教室（主任：辻 省次教授）

金子清俊

Application of Polymerase Chain Reaction (PCR)  
for the Diagnosis of Infectious  
Diseases—Rapid diagnosis of Tuberculous Meningitis—

Kiyotoshi KANEKO

*Department of Neurology, Brain Research  
Institute, Niigata University  
(Director: Prof. Shoji TSUJI)*

We have developed a rapid and highly sensitive method for the diagnosis of tuberculous meningitis utilizing polymerase chain reaction (PCR).

A crucially important point with this method is how to prevent contaminations without decreasing the sensitivity of PCR. We could successfully avoid DNA contaminations, keeping the high sensitivity as confirmed with the result that we could detect as few as 3 copies of microbial genome DNA.

Using this method, we detected the *Mycobacterium tuberculosis* genome in CSF of 5 of 6 patients with clinically diagnosed tuberculous meningitis. We further applied the method for the analysis of CSF from patients with meningitis of undetermined agents, and detected the *Mycobacterium tuberculosis* genome in CSF of 2 of 29 patients with clinically suspected tuberculous meningitis.

Thus, the method is highly sensitive and rapid to detect the *Mycobacterium tuberculosis* genome in CSF, and furthermore should be applied for the diagnosis of meningitis caused by various agents.

---

Key words: tuberculous meningitis, rapid diagnosis, polymerase chain reaction (PCR)  
結核性髄膜炎, 迅速診断, PCR 法

---

Reprint requests to: Kiyotoshi KANEKO,  
Department of Neurology, Brain Research  
Institute, Niigata University,  
Asahimachi-dori 1, Niigata, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学脳研究所神経内科学教室  
金子清俊

## はじめに

結核性髄膜炎は早期より適切な治療が行われない場合、重篤な障害を惹起したり時に致死的となり得るため早期診断が極めて重要な疾患であるが、臨床症状、adenosine deaminase (ADA) 値を含めた髄液所見、及び画像所見などによる鑑別診断は必ずしも容易でない場合が多い。さらに確定診断の根拠となる結核菌培養による髄液からの結核菌検出には最低4～8週を要する上、偽陰性も少なからず認められるなど結核性髄膜炎の早期診断はその重要性にもかかわらず困難な状況にあった<sup>1)2)</sup>。

近年、polymerase chain reaction 法 (以下 PCR 法)<sup>3)</sup> が実用化されるにいたり、細菌、ウイルスなどの病原体ゲノム DNA の同定が鋭敏かつ迅速に可能となり、感染症の臨床診断における有用性が注目されつつある<sup>4)5)</sup>。中でも結核菌感染症に関しては喀痰、胃液、リンパ節生検組織、膿瘍からの結核菌ゲノム DNA 同定が試みられていたが<sup>6)7)</sup>、脳脊髄液からの結核菌ゲノム DNA 同定に関しては検出率が低く従来法に比較して有用とは言えない状況にあった<sup>8)</sup>。

他方、特に微量の核酸を PCR 法、サザン解析により増幅し特異的に検出しようとする場合には以下の点について十分な配慮が要求される。すなわち PCR 法による検出感度、サザン解析に用いるプローブの特異性、及び陽性試料からの汚染などに起因する偽陽性の問題についての検討が必要である。

これらの点につき検討した上で、我々は結核性髄膜炎の迅速診断に応用可能と考えられる方法を開発し、実際に臨床応用を試みたところ有用との結果が得られたため報告する。

## 対象および方法

PCR 法は以前報告した方法と同様に行った<sup>8)</sup> (図 1)。500  $\mu$ l の対象患者髄液に20  $\mu$ l の10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 及び6  $\mu$ l の proteinase K (20 mg/ml) を加え65℃で1時間加温、さらに37℃に5時間以上加温した後、フェノール/クロロホルム抽出を行った。その後、*Mycobacterium tuberculosis* (以下 *M. tuberculosis*) 特異蛋白である MPB64 蛋白遺伝子<sup>9)</sup> に対応するプライマー (5'-TCCGCTGCCAGTCGTCTTCC 及び 5'-GTCCTCGCGAGTCTAGGCCA) 25 pmol ずつ及び50  $\mu$ l の 3M NaOAc を加え-20℃で一晩エタノール沈澱を行った。PCR は50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 各々 200  $\mu$ M ずつの dATP, dCTP,

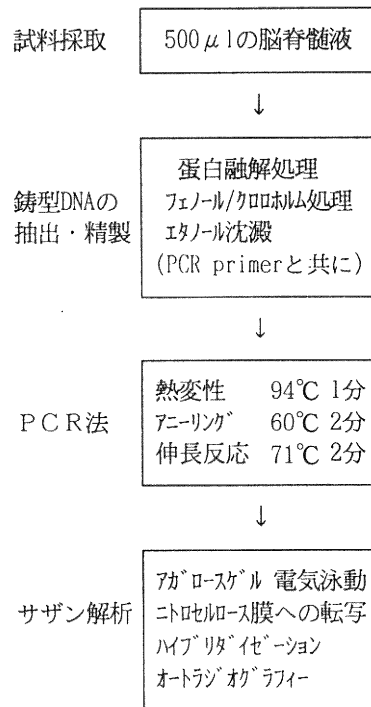


図 1 髄液中結核菌ゲノム DNA 検出法の図解

dGTP, TTP, 及び 2.5 unit *Taq* polymerase を含む 50  $\mu$ l の反応系にて、熱変性94℃1分、アニーリング60℃2分、伸長反応71℃2分を40回繰り返して DNA 増幅を行った。PCR 産物は1%アガロースゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写しサザン解析を行った。サザン解析のプローブとして、増幅された MPB64 遺伝子 DNA 配列の中央部に対応する17 mer のオリゴヌクレオチド (5'-CTTCAACCCGGGGGAGT) 5'末満を <sup>32</sup>P 標識し用いた。ハイブリダイゼーションは 6xSSC, 0.05%ピロリン酸ナトリウム存在下で42℃18時間行い、最終的に同組成の溶液中で50℃30分間の洗浄を行った後オートラジオグラフィにて解析した。

本法検出感度に関する検討は、Human Lymphotropic Virus Type-1 (HTLV-1) 感染細胞である MT-2 cell line を用いて行った。MT-2 cell line のハプロイドゲノムあたり1コピーの HTLV-1 proviral DNA の組込みがあると仮定し、30,000コピー、3,000コピー、300コピー、30コピー、3コピー、及び0コピーの HTLV-1 proviral DNA 希釈列を作成、正常対照ヒトゲノム DNA 1  $\mu$ g と共に PCR 法にて増幅後、サザン解析により HTLV-1 proviral DNA の検出限界につき検定を

行った<sup>10)</sup>。サザン解析に用いたプローブの特異性については、probeの塩基配列から計算されるTm(56℃)を中心に50℃から3℃ずつ62℃まで洗浄の温度を変化させた場合のシグナルの減衰率から推定した。汚染などに起因する疑陽性の対処として、DNA抽出からPCR法に至る全ての段階における陽性対象の完全隔離、対象の2倍以上の陰性対象の同時検計、繰り返し実験による結果の確認、可能な限りディスポーザブルな製品の使用などの対策を講じた。

次に本法の有用性を検討するため、当科において結核性髄膜炎と診断された6例、非結核性髄膜炎10例、正常対照10例の脳脊髄液を用いPCR法による*M. tuberculosis*ゲノムDNA検出を行った。さらにその後当科及び関連の施設より結核性髄膜炎の可能性ありとして検索を依頼された18例、同様に他施設より検索を依頼された11例の計29例の脳脊髄液より*M. tuberculosis*ゲノムDNAを試みた。陽性対照には肺結核患者の喀痰培養コロニーより抽出した*M. tuberculosis*ゲノムDNAを、陰性対照には正常者の末梢白血球由来のゲノムDNAを用いた。

## 結 果

本法の検出感度に関する検討の結果、MT-2 cell lineのハプロイドゲノムあたり3コピーのHTLV-Iが存在すれば再現性よく検出可能であり、臨床試料からの微量核酸の検出に応用するに当たり十分な感度が得られることが示された(図2)。サザン解析に用いたプローブの特異性については、その塩基配列から計算されるTm(56℃)を境に洗浄の温度の上昇に伴い、急激なシグナルの減衰が認められた点からその特異性に問題はないものと考えた。また汚染などに起因する疑陽性の問題に関しては、方法の項目で述べた種々の対策を実行することにより十分に防止可能であった。

以上の検討を行った上で、陽性対照として肺結核患者の喀痰培養由来結核菌コロニーより抽出したDNAを用いて検出を試みた結果、予測されたサイズに*M. tuberculosis*ゲノムDNA由来のバンドが再現性よく検出された(図3)。さらに過去当科において結核性髄膜炎と診断された6例の脳脊髄液を同様に検索したところ、5例(83%)において陽性対照と同じサイズに*M. tuberculosis*ゲノムDNA由来のバンドが検出された(図4)、非結核性髄膜炎10例及び正常対照10例の脳脊髄液からは全例検出されなかった。また髄液結核菌培養陽性2症例においてPCR法により陽性結果が得ら

れたことは、本法陽性例が細菌学的にも結核性髄膜炎である事を証明するものと考えられた(表1)。

さらに結核性髄膜炎の可能性があるため検索を依頼された29例の髄液につき同様に検討した結果、2例の髄液

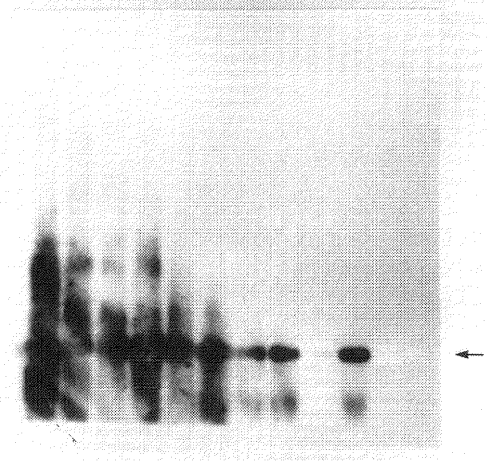
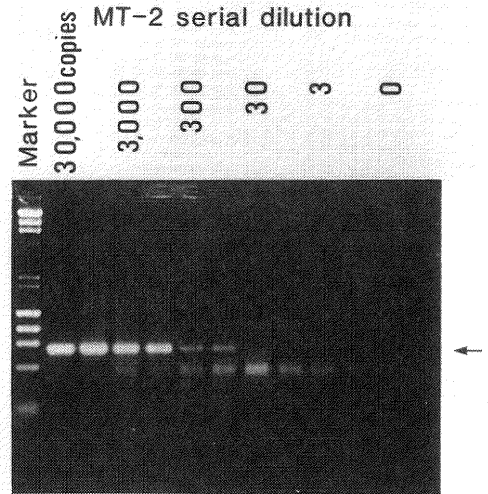


図2 HTLV-I proviral DNA希釈列を用いたPCR法による微量核酸の検出限界の検討

MT-2 cell lineのhaploid genomeあたり1コピーのHTLV-I proviral DNAの粗込みがあると仮定した。lanes 1~2: 30,000コピー, lanes 3~4: 3,000コピー, lanes 5~6: 300コピー, lanes 7~8: 30コピー, lanes 9~10: 3コピー, lanes 11~12: 0コピー, のHTLV-I proviral DNAを正常対照ヒトゲノムDNA 1µgに混入しPCR法にて増幅した結果を示す。

より *M. tuberculosis* ゲノム DNA 由来と考えられるバンドが再現性良く検出され、結核性髄膜炎の可能性が強く示唆された (図 3)。

### 考 察

PCR 法は精製 DNA を鋳型として用いた場合には理論的には 1 コピーの DNA 検出が可能ほどの極めて鋭敏な方法である。実際我々の検討においても、3 コピー

までの微量核酸の検出が可能であり、その感度に関しては臨床応用に当たって問題はないものと考えられた。ただ臨床材料を DNA の抽出、精製段階を経ずに直接用いた場合は感度低下を来す場合があることが知られている<sup>11)</sup>が、この点に関しても本法は DNA の抽出、精製をおこなっているため問題ないと考えられる。しかし PCR 法はその鋭敏さゆえ極めて微量の試料汚染によっても偽陽性が生じ得ること、さらに本法では DNA 抽出の操作が加わることもあまって、偽陽性が深刻な問題となり得る。我々は髄液採取、DNA 抽出、PCR 及び Southern 解析の全工程における陽性対象試料の完全隔離、試料数の 2 倍の陰性対照の検索、繰り返し実験による結果の確認、可能な限りディスポーザブルな製品を使用するなどの対策<sup>12)13)</sup>によりこの問題に対処した。

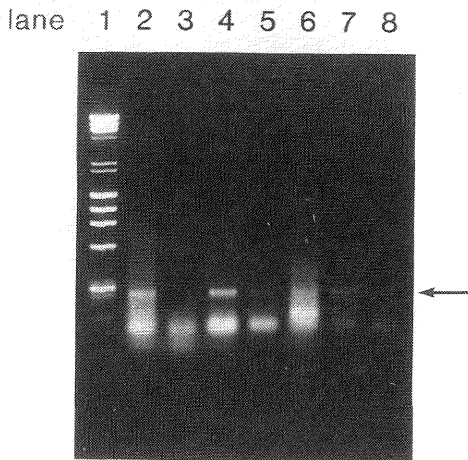


図 3 結核性髄膜炎疑診例の髄液を用いた PCR 法、及びサザン解析の結果

lanes 1~3 は PCR 法による髄液 DNA 増幅産物をアガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色したもの。lanes 4~6 はそのサザン解析のオートラジオグラフィー。lane M: DNA サイズマーカー ( $\lambda$ /HindIII digest +  $\phi$  X174/HaeIII digest), lanes 1, 4 は結核性髄膜炎疑診例 (表 1 の症例 6) 髄液, lanes 2, 5 は正常対照髄液, lanes 3, 6 は陽性対照として結核菌培養コロニーを用いた結果を示す。

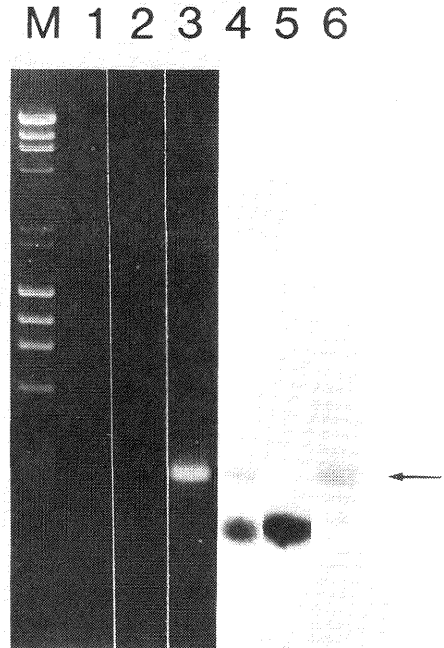


図 4 結核性髄膜炎と診断された症例の髄液を用いた PCR 法、及びサザン解析の結果

lanes 2~7 は抗結核剤による治療前の結核性髄膜炎症例の髄液, lane 8 は 1 ケ月間抗結核療法施行後の髄液を用いた結果を示す。上段は PCR 法による髄液 DNA 増幅産物をアガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色したもの。下段はそのサザン解析後のオートラジオグラフィー。lane M: DNA サイズマーカー ( $\lambda$ /HindIII digest +  $\phi$  X174/HaeIII digest)。

表1 PCR法により結核性髄膜炎と診断された7例の髄液所見

NO	年齢	性	脳脊髄液				
			細胞数 (多核球)	総蛋白 (mg/dl)	ADA (U/l)	培養	診断
1	31	F	333/mm <sup>3</sup> (251)	250		+	確診
2	24	F	88/mm <sup>3</sup> (47)	380		+*	確診
3	36	M	12/mm <sup>3</sup> (1)	107	2.8	+**	確診
4	40	M	1,216/mm <sup>3</sup> (537)	144	13.5	-	確診
5	34	F	77/mm <sup>3</sup> (3)	150	12.0	+	確診
6	62	F	152/mm <sup>3</sup> (106)	138		+***	疑診
7	57	M	328/mm <sup>3</sup> (305)	181	13.7		疑診

\* 尿より結核菌検出(+) \*\* リンパ節生検にて結核菌検出(+)

\*\*\* 気管支洗浄液, 胃液より結核菌検出(+)

確診: 2例は髄液結核菌培養陽性例. 他の3例は臨床症状及び髄液所見に加え, 抗結核剤による治療効果, 他臓器における結核病巣の存在より結核性髄膜炎と診断された症例.

疑診: 臨床症状, 髄液所見より結核性髄膜炎が疑われた症例.

結核性髄膜炎症例における髄液中 *M. tuberculosis* ゲノム DNA の検出率は, 以前の他施設報告では20%弱であった<sup>7)</sup>が, 従来法の10倍以上の脳脊髄液を用いさらに DNA を抽出し, 精製する操作を加えた著者らの改良法<sup>8)</sup>により80%を越える検出率が達成され, 脳脊髄液をそのまま用いる従来法に比較して現在最も実用的な方法であると考えられる. そこで本法の臨床応用を試みた結果, 結核性髄膜炎の否定できない29症例中2例の髄液より実際に *M. tuberculosis* ゲノム DNA が検出された, 結核性髄膜炎の早期診断が可能であった. 今回検索をおこなった症例の大部分は結核性髄膜炎が強く疑われた症例ではなく, 遷延性の経過や脳底部髄膜炎である点などから結核性髄膜炎を否定できない為に検索を依頼された症例であったため, 陽性率が低かったものと考えられたが, 2例において結核性髄膜炎の早期診断が実際に可能であったことは本法の有用性を実証するものと考えられた.

近年, 抗癌剤や免疫抑制剤の使用患者など生体の免疫不全状態, Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) などにおける結核性疾患の増加が報告されてきており, 特に AIDS においては肺以外の臓器における結核性疾患の頻度が高いことが知られている<sup>14)</sup>. これらの点からも, 結核性疾患の早期診断の必要性は今後

ともますます高まるものと考えられ, ここに報告した.

稿を終えるにあたり, 終始御指導いただき, 御校閲を賜りました辻 省次教授に心から深謝致します. 御助力いただきました畠中芳美嬢, 諸橋イネ子嬢に感謝します. また, 研究の道を与えて下さいました宮武 正教授に謹んで感謝の意を表します.

検査に御協力いただきました太田熱海病院神経内科 白田明子先生, 茨城県立中央病院神経内科 天貝賢二先生, 吉沢和朗先生, 国立精神神経センター神経内科 小林 治先生, 黒川徹先生, 取手協同病院神経内科 新谷周三先生, 九州大学神経内科 山本和秀先生, 大八木保政先生, 野村拓夫先生, 国立国府台病院神経内科 塩谷奈美先生, 山本剛司先生, 滋賀医科大学第3内科 仲川孝彦先生に深謝致します.

## 参考文献

- 1) Miller, J.R. and Jubert, B.: Infections of the nervous system: bacterial infections. In Merritt's textbook of neurology 8th ed, ed by Rowland, L.P. Lea and Febiger, London, 69~71, 1988.

- 2) Segura, R.M., Pascual, C., Ocana, I., Martinez-Vazquez, J.M., Ribera, E., Ruiz, I. and Pelegri, M.D.: Adenosine deaminase in body fluids: a useful diagnostic tool in tuberculosis. Clin. Biochem., **22**: 141~148, 1989.
- 3) Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, **230**: 1350~1354, 1985.
- 4) Rowley, A.H., Whitley, R.J., Lakeman, F.D. and Wolinsky, S.M.: Rapid detection of herpes-simplexvirus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. Lancet, **i**: 440~441, 1990.
- 5) Wren, B., Clayton, C. and Tabaqchali, S.: Rapid detection of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction. Lancet, **i**: 423, 1990.
- 6) Brisson-Noel, A., Gicquel, B., Lecossier, D., Levy-Frebault, V., Nassif, X. and Hance A.J.: Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet, **ii**: 1069~1071, 1989.
- 7) Shankar, P., Manjunath, N., Lakshmi, R., Aditi, B., Seth, P. and Shrinivas.: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. Lancet, **i**: 423, 1990.
- 8) Kaneko, K., Onodera, O., Miyatake, T. and Tsuji, S.: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction (PCR). Neurology, **40**: 1617~1618, 1990.
- 9) Yamaguchi, R., Matsuo, K., Yamazaki, A., Abe, C., Nagai, S., Terasaka, K. and Yamada, T.: Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun., **57**: 283~288, 1989.
- 10) Kaneko, K., Sato, S., Miyatake, T. and Shoji, T.: Absence of highly homologous sequence to HTLV-1 in Japanese multiple sclerosis. Neurology, **41**: 31~34, 1991.
- 11) 大原義朗, 岩崎祐三: 感染症診断の最近の動向, Annual Review 神経 1992, 中外医学社, 東京, 109~124, 1992.
- 12) Kwok, S. and Higuchi, R.: Avoiding false positives with PCR. Nature, **339**: 237~238, 1989.
- 13) Kitchin, P.A., Szotyori, Z., Fromholz, C. and Almond, N.: Avoidance of false positives. Nature, **344**: 201, 1990.
- 14) Kaiser, S.J. and Condoluci, D.V.: Mycobacterium tuberculosis in the acquired immunodeficiency syndrome. J. Am. Osteopathic. Assoc., **91**: 377~384, 1991.

(平成4年2月17日受付)