

## リアルタイムPCRの臨床微生物学領域での応用

小島, 夫美子

九州大学医学部保健学科検査技術科学専攻 | 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻

岩谷, 良則

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻

藤本, 秀士

九州大学医学部保健学科検査技術科学専攻

<https://doi.org/10.15017/55>

---

出版情報 : 九州大学医学部保健学科紀要. 2, pp.103-108, 2003-09. 九州大学医学部保健学科  
バージョン :  
権利関係 :

# リアルタイムPCRの臨床微生物学領域での応用

小島夫美子<sup>1,2</sup>、岩谷良則<sup>2</sup>、藤本秀士<sup>1</sup>

1. 九州大学医学部保健学科検査技術科学専攻
2. 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻

## Real-time PCR in Clinical Microbiology

Fumiko Kojima, Yoshinori Iwatani, Shuji Fujimoto

Key words: PCR, real-time PCR, clinical microbiology

### 1. はじめに

polymerase chain reaction (PCR) は非常に有効な遺伝子増幅法で、その開発により、様々な分野において微量のDNAが増幅・解析できるようになった。医学の領域でも、PCRを用いた遺伝子診断が各疾患の診断に応用されている。しかし、これまでのPCRでは、DNAやRNAの定量に関して、信頼性のあるデータを得るには手技的に困難であり、また煩雑でもあった。近年、バイオテクノロジーの発展に伴い、これまでのPCRに様々な工夫や改良が加えられ、迅速性と定量性に優れたリアルタイムPCRが開発された。リアルタイムPCRは、増幅産物の解析にゲル電気泳動を必要とせず、増幅していく過程をリアルタイムでモニタリングすることができ、また、スタンダードカーブを描くことによって、正確な定量分析を行うことが可能である<sup>1)</sup>。リアルタイムPCRの臨床医学における利用は、特にDNAやRNAの定量を行うことが重要とされる研究・診断において大きな進展をもたらしている。本稿では、リアルタイムPCRの臨床微生物学領域での応用について解説する。

### 2. 臨床微生物における応用

迅速な病原体の検出・同定が必要な感染症の診断において、遺伝子診断はそのいくつかが国内ですでに保険適用とされ、日常的に利用されるようになってきた(表1参照)。PCRは、標的とする遺伝子領域を短時間で数億倍以上に増幅することができるので、人体および検体中の微量のウイルスや細菌などの微生物を高感度に検出することが可能であり、その有用性は高い。またその応用により、病原因子に関する情報を得ることもできる。

感染症において、感染量(どの程度、病原微生物に感染しているか)は、その病態に影響を与える場合が多く、定量を正確に行うことは、診断および治療を行う上で重要である。しかし、定量分析を行うのに、これまでのPCRでは、増幅効率の違いやプラトー効果などにより、DNA量を正確に表すことは困難であった。これらの問題点を解決すべく、定量的PCRとして、内部標準物質を用いる方法および競合PCRなどが考えられてきたが、迅速性、簡便性の点から、現在、リアルタイ

μPCRが最も優れていると考えられている。ここでは、微生物ごとに、リアルタイムPCRの臨床応用を目的とした研究を紹介する。

### A. ウイルスにおける応用

#### 1) hepatitis B virus: HBV<sup>2)</sup>

HBVは、ヘパドナウイルスに属し、小さなエンベロープを持つ、不完全な2本鎖の環状DNAウイルスである。B型肝炎は、非経口感染で、血液や体液を介して感染し、母子間の垂直感染や性交渉による水平感染によって伝播する感染症である。現在多くの検査室で行われている診断は、HBs抗原、HBe抗原、HBc抗原および関連抗体に対する免疫学的方法が主流である。しかし、抗原変異を起こしたウイルスは、免疫学的方法では検出することができず、この方法でHBs抗原陰性であっても、PCRでは陽性の患者の存在が指摘されている。血清サンプル中のHBV DNAについて、その検出と定量性についての比較検討では、リアルタイムPCRは、従来のPCRと比較して、ウイルスDNA量が1/10量で検出でき、抗ウイルス治療の効果判定の指標としても優れていた。例えば、慢性肝炎の回復期患者と回復期でない患者との間では、血清中のHBV DNAレベルに違いが見られ、回復期の患者では明らかに低いことが示された。このことは、これまでのように抗原性を調べるだけではわからなかった炎症活動の状態を予測することができるようになることを示している。また、今日、慢性B型肝炎に対する最も良いと考えられている治療は、lamivudineとIFN-αの併用であるが、この治療の20%においてlamivudine耐性のHBVが出現するとされている。従ってHBV DNAの定量を行うことは、薬剤治療効果の判定でも重要である。さらに、これまでの方法では検出できなかった種々のHBV 変異株を検出できる可能性がある。

#### 2) hepatitis C virus: HCV<sup>3)</sup>

HCVは、1本鎖RNAウイルスで、フラビウイルス科に属する。感染は、主に血液を介して起こる。輸血による感染および血液付着物によっ

て経皮感染する。従って、医療従事者の感染リスクが高いと言われている。HCVは、培養ができないため、抗ウイルス抗体をELISAで検出する方法が主に行われている。しかし、ELISAではHCV感染初期の抗体を検出することは困難である。また感染が進行中なのか過去の感染なのかの鑑別ができない。一方、HCV慢性感染患者の中で、骨髄移植を受けたり、血液透析を行っている、抗体産生が欠乏することもある。従ってHCV感染の診断には、ウイルスRNAの直接検出や定量が重要となる。最近、HCV RNAは、nested RT-PCR、branched DNA signal amplification assayあるいはAmplicor monitorによる定量が行われている。nested RT-PCRは、感度は高いが、定量性と再現性が不十分である。branched DNA signal amplification assayとAmplicor monitorは、感度があまりよくない。一方、リアルタイムPCRでは、一つの反応でcDNAの合成とPCRおよびその解析まで行うことが可能で、短時間（3時間以内）に定量を行うことができ、さらに、微量のHCVゲノムを検出できている。C型肝炎患者でのインターフェロン治療の効果判定モニターにおいてもその有用性が期待されている。

#### 3) smallpox virus<sup>4)</sup>

天然痘は、最も致死率が高い感染症の一つとして知られているが、1980年、WHOがその根絶を宣言し、small pox virusは、地球上から根絶された。しかし、今日ではテロリストの生物兵器として使用される可能性があるために、あらたに脅威が持たれている。テロリストによる攻撃で発生するかもしれない天然痘の伝播に備え、予防接種の再開や早期の迅速な診断検査が重要である。最近、リアルタイムPCRを利用した本ウイルスの迅速検出システムが報告されている。このシステムでは、ごく微量のウイルスでも検出可能で、同ウイルスと類似のウイルス（牛痘ウイルス、サル痘ウイルス、ワクシニアウイルス）との鑑別もできる。また、増幅・検出が一体化されているので感染の危険を最小限にとどめることが出来る。

4) herpes simplex virus: HSV<sup>5)</sup>

ヘルペス科のウイルスは、エンベロープを持つ大きな2本鎖DNAウイルスで、 $\alpha$ ヘルペスウイルス、 $\beta$ ヘルペスウイルス、 $\gamma$ ヘルペスウイルスに分類される。その中で単純ヘルペスウイルス1型および2型(HSV)と水痘-帯状疱疹ウイルスは、 $\alpha$ ヘルペスウイルスに属する。HSVは、細胞内での増殖が速く、細胞溶解性を示し、主として神経節に潜伏感染する。HSV-1は、飛沫および接触により、主に口腔粘膜に感染する。初感染の多くは不顕性感染であるが、一部は顕性感染によって口内炎などを起こす。初感染後、ウイルスは三叉神経節に潜伏感染する。このウイルスは、外からの刺激(紫外線、過労など)により再活性化し、同一部位に再感染を起こす。HSVは、病院で検出される最も一般的なウイルスである。しかし、これまでのHSVの細胞培養による検出法では、24~48時間を必要とし、ELISAあるいはラテックス凝集法などの免疫学的検出法では、検体中のウイルス量が低いと検出できない<sup>6,7)</sup>。一方、リアルタイムPCRでは、低レベルのHSVでも検体提出から2時間以内に特異的にウイルス検出が可能であることから、本法による診断法の早期確立が期待される。

## B. 細菌における応用

細菌による感染症の診断では、病原体の分離、培養が基本であり、培養で得られたコロニーから細菌学的手法で菌種の同定を行う。また、薬剤感受性を行うために、菌を分離する必要性は高い。しかし、培養に長い時間が必要な菌や、培養が難しい菌では、PCRによる遺伝子診断は、迅速な処置を行うために临床上の有用性が高い。

1) *Helicobacter pylori*: *H. pylori*<sup>8)</sup>

*H. pylori*は、グラム陰性のらせん菌で、感染すると急性の胃炎、慢性活動性胃炎を惹起する。この菌は、ウレアーゼ活性を持ち、ウレアーゼによって尿素を分解し、アンモニアを産生するために菌周囲のpHを上昇させ、強酸の胃の中でも生存することができる。*H. pylori*感染が、どのよう

な機序で疾患を引き起こすのかは未だよくわかっていないが、菌の病原性と宿主の免疫応答が、病態に大きく関与していると考えられている。胃粘膜に感染している*H. pylori*の菌量は、感染者間で一様ではなく、その感染量が臨床的病態に影響を与えている可能性がある。*H. pylori*は、厳密な微好気性状態での培養を必要とし、なおかつ発育速度が遅いため、分離培養が容易でない。そこで、胃生検組織中の*H. pylori*菌量のリアルタイムPCRによる評価が検討されている。

2) *Listeria monocytogenes*: *L. monocytogenes*<sup>9)</sup>

*L. monocytogenes*は、グラム陰性短桿菌で、自然界に広く分布し、土壌、植物、乳製品、食肉にも見いだされる。また、ヒトや動物の、主に糞便から分離される。本菌は、人畜共通感染症であるリステリア症の原因菌である。リステリア症は、大きく2つの病型があり、垂直感染による小児の感染と、免疫力の低下した成人に起こる髄膜炎や敗血症がある。*L. monocytogenes*は、1~45℃の温度内で生育し、長期間食物内で生存が可能である。そのため、諸外国では、食物内に許容される*L. monocytogenes*の菌数を法的に規制しているところもある。しかし、実際にこれらを正確に定量することは困難であり、その上、一般に食品の汚染を調べるには、長期間低温で増菌培養を行い、分離する必要がある。そこで、本菌の持つ病原因子リステリオリシンの遺伝子を標的に、リアルタイムPCRを用いて、水、スキムミルク、低温殺菌していない生乳中などでの菌の定量的検出が試みられている。この方法は、*L. monocytogenes*のみを、最小で6 colony forming unit (CFU) から、3時間以内で検出可能であり、食物の消費期限のコントロールや食中毒時の感染量の決定に有用である。

3) *Legionella pneumophila*: *L. pneumophila*<sup>10)</sup>

*L. pneumophila*は、グラム陰性桿菌で、自然環境や空調の冷却水、溜まり水、池および土壌などに分布する。培養は難しく、特殊な培地で5~7日間を要する。本菌は、エアロゾルとなって吸

入されると、ヒトに肺炎（在郷軍人病）を起こす。一般に高齢者、小児が多いが、健康人でも発症しうる。日本では、1980年に初めての症例が報告された。昨年（2002年）、宮崎温泉センターでの集団感染が社会問題になったことは記憶に新しい。本菌に感染すると、2～10日間の潜伏期後、全身倦怠、頭痛、筋肉痛の初期症状を呈し、さらに急激な発熱、悪寒、肺炎症状が出現する。抗生物質による適切な治療を受けないと致命率が高い。診断検査には、蛍光抗体法を用いた試料中の菌の検出や患者血中抗体価の測定が行われるが、いずれも時間がかかる。一方、リアルタイムPCRでは、1リットル中1000 CFUの本菌を、90分以内で特異的に検出でき、短時間で多くのサンプルをスクリーニングするのに大変有用になると期待される。

#### 4) 口腔内細菌<sup>11)</sup>

歯科感染症でも、リアルタイムPCRを用いての口腔内細菌の検出と定量が行われている。歯肉炎は、歯垢や歯肉溝の細菌による感染症で、口腔内の常在細菌を構成する細菌の量的増加によって発症すると考えられている。一方、歯周炎は、歯肉溝中の常在細菌とは質的に異なる菌種が、歯周ポケットに存在し、その中の限られた菌種が病態に深く関与しているとされている。よって、これらの疾患の正確な診断や予防、病原性の理解には、口腔内細菌の早期検出と定量が重要である。唾液と歯垢中の*A. actinomycetemcomitans*、*B. forsythus*、*P. gingivalis*、*T. denticola*、*T. socranskii*の5種類の口腔内細菌を対象とした菌の検出・定量実験でリアルタイムPCRの有用性が示されており、今後、これらの方法を利用した患者の口腔細菌叢の解析によって、口腔内細菌と口腔疾患との関係、健康な人の歯垢中の細菌数と歯根膜炎になる危険性との関係、さらにまだ培養されたことのない微生物と口腔内疾患との関係が明らかになると期待されている。

#### 5) *Borrelia burgdorferi*:*B. burgdorferi*<sup>12)</sup>

らせん菌と総称される中で、スピロヘータは、

細長いらせん状の形態を示し、活発な回転運動を行う菌群である。この科には、トレポネーマ属、ボレリア属、レプトスピラ属があり、人工培養が困難なものが多い。ボレリアは、回帰熱の原因菌である*B. recurrentis*とライム病の原因菌である*B. burgdorferi*がよく知られている。本属では、培養の問題から、菌種の鑑別にはゲノムが使われる。これまでも、PCR、RAPD、RFLPなどが鑑別に用いられてきたが、新たにリアルタイムPCRでの融解温度曲線解析による鑑別が検討されている。

#### 5) *Leptospira biflexa*: *L. biflexa*<sup>13)</sup>

レプトスピラ属の中で*L. interrogans*は、人畜共通感染症の起因菌で、ワイル病やレプトスピラ症の感染源となる。一方、*L. biflexa*は、病原性がなく、湿地帯など水中に生息している自由生活菌である。これら2種は、形態的に識別することは困難であり、これまでは動物実験での病原性や培養での生育温度の違いによって識別を行ってきた。しかし、動物実験を用いるという倫理上の問題や、培養に数週間もの時間を費やすという点から改良が望まれている。リアルタイムPCRによる*L. biflexa*の同定が試みられ、20分以内に検出・同定でき、しかも、パネル血清で識別できなかった菌株についても十分な結果が得られている。

#### 6) *Chlamydia*<sup>14)</sup>

クラミジアは、細菌に分類されながらもウイルスやリケッチャアと同様に、人工培地では発育できず、生きた細胞内のみで増殖可能な微生物である。クラミジアによる主な感染症には、オウム病、鼠径リンパ肉芽腫症、トラコーマがある。通常、診断は、患者の血液、膿、分泌物などを用いて、菌体の検出あるいは抗体検出によって行う。とくに菌体の検出に関しては、PCRの利用が、国内でも普及しつつある。Huang等は、クラミジアに感染したマウスの肺標本を用いて、細胞培養による方法とリアルタイムPCRを比較検討している。結果、細胞培養法は、煩雑で、しかも技術者による差があるためにエラーが起りやすいが、

表1 臨床微生物学領域での遺伝子診断の応用

適用目的	対象微生物
培養不能もしくは困難な病原体の検出	HIV*、らい菌、ヒトパピローマウイルス、ヒトパルボウイルスB19 ニューモシスチス・カリニ、赤痢アメーバ
分離・同定に時間を要する病原体の検出	結核菌*、抗酸菌*、レジオネラ、肺炎マイコプラズマ レプトスピラ、クラミジア*、リケッチャー、ウイルス
治療方針決定あるいは治療効果判定の モニタリング	C型肝炎ウイルス*、B型肝炎ウイルス*、ヒトパピローマウイルス
致死感染症の検索	HIV*、B型肝炎ウイルス*、C型肝炎ウイルス*、HTLV-1
移植後感染症のモニタリング	サイトメガロウイルス、EBウイルス
病原遺伝子の検出	ペロ毒素遺伝子、コレラ毒素遺伝子、腸炎ピブリオ溶血毒素遺伝子 <i>mecA</i> 遺伝子*
分子疫学的調査研究	ロタウイルス、単純ヘルペスウイルス、緑膿菌 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌
培養に危険を伴う微生物	特殊な輸入感染症
種レベルまでの同定が困難な場合	ボレリア、レプトスピラ

\*は国内で保険適用されている項目

リアルタイムPCRは、少ないDNA量で、確実な検出および定量が可能であることを示し、今後、クラミジアの診断には、リアルタイムPCRが大変有用であると述べている。

### 3. 今後の展望

感染症の診断を行う上で、病原微生物検査は不可欠であり、検査には迅速性、特異性さらに定量性が要求される。ここに紹介した研究でも明らかのように、リアルタイムPCRは、これまでのPCRよりも迅速性、簡便性、定量性において、より優れている。よって、微量な検体でかつ定量を必要とする迅速診断の検査法としては、非常に有用であると考えられる。しかし、国内の微生物検査で保険適用とされている遺伝子検査項目は表1に示すように10項目に満たない。残念ながら、遺伝子検査は、その設備、試薬が高価であるために、一般の病院検査室ではシステムがなかなか確立しにくい。また少数の施設で独自に行っていることが多く、データの標準化あるいは精度管理の面でも問題が多いのが現状である。しかし、時代の趨勢から、これからの臨床検査の中に、診断的意義の高い遺伝子検査が確立、導入され、十分な役割を

果たすであろうことに疑う余地はない。特に、臨床微生物の領域においては、その重要性から考えて、リアルタイムPCRを利用した遺伝子診断は、さらに発展し、検査のシステム化を目指して研究が進むことであろう。

ここで紹介した以外にも多くのリアルタイムPCRを利用した検査の研究・開発が世界各国で行われている。今年（2003年）、世界中に感染症の脅威を思い出させた「新型肺炎」の原因であるSARSウイルスについても、リアルタイムPCRによる診断法が即座に開発され<sup>15)</sup>、WHOwebサイトにはプライマーセットが公開されている。今後、リアルタイムPCRは、微生物のみならず、各分野における臨床遺伝子検査の中心となることは間違いないと思われる。近い将来、リアルタイムPCRが、研究レベルから臨床検査へと導入、確立されることへの期待は大変大きい。

### 参考文献

- 1) 小島夫美子, 岩谷良則, 藤本秀士: リアルタイムPCR その原理と特徴. 九大医学部保健学科紀要2: 95-102, 2003
- 2) Ren WC, Heli P, Mikko S, et al: Real-Time

- PCR for detection and quantitation of Hepatitis B virus DNA. *J. Med Virol.* 65:250-256,2001
- 3) Tomoko T, Asao K, Takeshi T, et al: Real Time detection system for quantification of Hepatitis C virus genome. *Gastroenterology*116: 636-642,1999
- 4) Mark JE, Franklin RC, Richard FM, et al: Detection of Smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.*40 (6) :1985-1988,2002
- 5) Tuckweng K, Lance M, Sonia S: Rapid detection, culture-amplification and typing of herpes simplex viruses by enzyme immunoassay in clinical samples. *Clin. Diagn. Virol.* 10:67-74,1998
- 6) Librado V and Frank JM: Comparison of a direct antigen enzyme immunoassay, herpcheck, with cell culture for detection of herpes simplex virus from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*33 (5) :1378-1379,1995
- 7) Mark JE, James RU, P. Shawn M, et al: Diagnosis of Herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38 (2) :795-799,2000
- 8) 島田忠人、大塚幸夫、遠藤幹也 他: PCR診断法. *日本臨床*59 (2) : 280-285, 2001
- 9) Hege KN, Knut R, Kristine N, Askild H, and Dag L: Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.*66 (10) :4266-4271,2000
- 10) A. L. Ballard, N. K. Fry, L. Chan, et al: Detection of *Legionella pneumophila* using a Real-Time PCR hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.*38 (11) :4215-4218,2000
- 11) Mitsuo S, Yasuo T, Makoto U, Isao I and Yoshimi B: Rapid detection and quantification of five periodontic bacteria by Real-Time PCR. *Microbiol. Immunol.*45 (19) :39-44,2001
- 12) Johanna P, Qiushui HE, Jarmo O, and Matti KV: Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi* sensu strict by Light Cycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the *recA* gene. *J. Clin. Microbiol.* 38 (7) :2756-2759,2000
- 13) T. H .S. Woo, B. K. C. Patel, M. Cinco, et al: Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product. *J. Microbiol. Methods*35:23-30,1999
- 14) J. Huang, F. J. DeGraves, D. Gao, et al: Quantitative detection of *Chlamydia* spp. by fluorescent PCR in the LightCycler. *BioTechniques*30:150-157,2001
- 15) Leo LM, On KW, Winsie L, et al: Rapid diagnosis of a coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome (SARS) . *Clin. Chem.*49 (7) :1-3,2003