

技 術

PCR 法による Pneumocystis jirovecii の検出

高橋 一人* 富樫 信* 伊藤 実*
 齋藤 泰智* 工藤 和洋** 下山 則彦**
 石舘 卓三***

Detection of Pneumocystis jirovecii by Polymerase Chain Reaction Method

Kazuto TAKAHASHI, Makoto TOGASHI, Minoru ITO
 Yasutomo SAITO, Kazuhiro KUDOH, Norihiko SHIMOYAMA
 Takuzo ISHIDATE

Key words : Polymerase Chain Reaction Pneumocystis jirovecii

はじめに

これまで Pneumocystis carinii はカリニ肺炎 (Pneumocystis carinii pneumonia) の原因菌とされていたが、分子生物学的性状に基づいて、ヒトに寄生するものは Pneumocystis jirovecii (以下 P. jirovecii)、ヒト以外に寄生するものは Pneumocystis carinii と命名され、Pneumocystis carinii pneumonia は Pneumocystis pneumonia (以下 PCP) と呼ばれるようになった。

P. jirovecii は、日和見感染病原菌の1つであり、健康人に対しては不顕性であるが、免疫力が低下した状態の患者に感染すると、重篤な肺炎 PCP を引き起こし、死に至ることもある。AIDS、骨髄移植や化学療法を実施している患者にとって、PCP の早期診断はきわめて重要であり、迅速で確実な診断法が必要とされている。

P. jirovecii は分子生物学的性状から真菌の一種と考えられているが、培養方法は確立されてなく、検出法は検査材料をスライドガラスに塗抹し、菌体を顕微鏡的に確認するのが一般的である。菌体の観察を容易にするため、ギムザ染色、トルイジンブルー O 染色、グロコット染色や P. jirovecii に特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫染色などが利用されるが、形態的な検出には経験が必要であり、感度の面でも限界があった。今回我々はこれら問題の解決策として、PCR 法を用いた P. jirovecii の検出について検討したので報告する。

原理・方法

P. jirovecii の5S rRNA をコードする DNA 領域にプライマーを設定し¹⁾、PCR 反応による増幅産物の有無を確認した (図1)。

1) DNA 抽出

喀痰、気管支洗浄液、BAL 等の呼吸器材料全般を対象に、QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA の抽出を行った。本キットは本来血液等、液状検体用であるが、前処理のタンパク分解酵素処理時間を規定の10分から60分に延長し、検体の粘性を除去することで、その後の行程を液状検体と同様に取り扱った。抽出した DNA は吸光度を測定し、濃度および純度の確認を行った。

2) PCR 反応

反応液 50μl 中に最終濃度が dNTP 200μM、各 Primer 0.5μM、Taq 25mU/μl となるように調整し、検体 DNA を 100ng 添加した。反応条件はホットスタート 95 10分、熱変性 94 30秒、アニーリング 55 30秒、伸張反応 72 30秒を 40 サイクル、最後に付加伸張反応 72 7分を行った。また同時に、内部標準物質として β -globin の検出も行った。

3) 電気泳動

エチジウムブロマイドを添加した 6% アガロースゲルによる電気泳動を行い、トランスイルミネーターにて 120bp の増幅産物を確認した。

4) クローニング

標準物質作成のため、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を用い、本 PCR 増幅産物のクローニン

* 市立函館病院 中央検査部臨床病理科 遺伝子細胞生物検査センター

** 市立函館病院 病理研究検査センター

*** 国立病院機構函館病院 病理

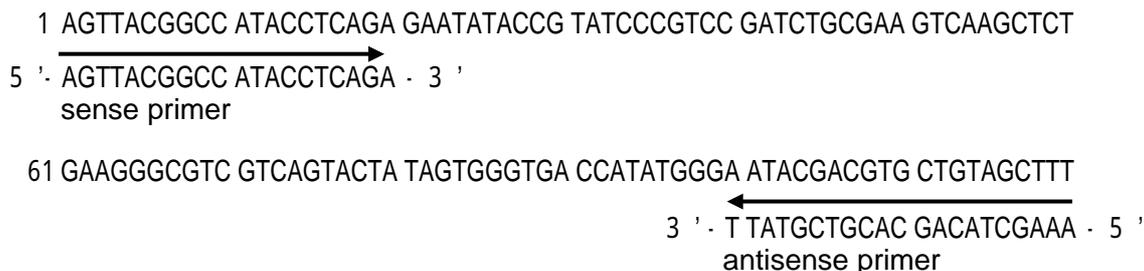


図1 P. jirovecii 5S rRNA 配列と PCR に用いたプライマー (GenBank Acc. No. S78185)

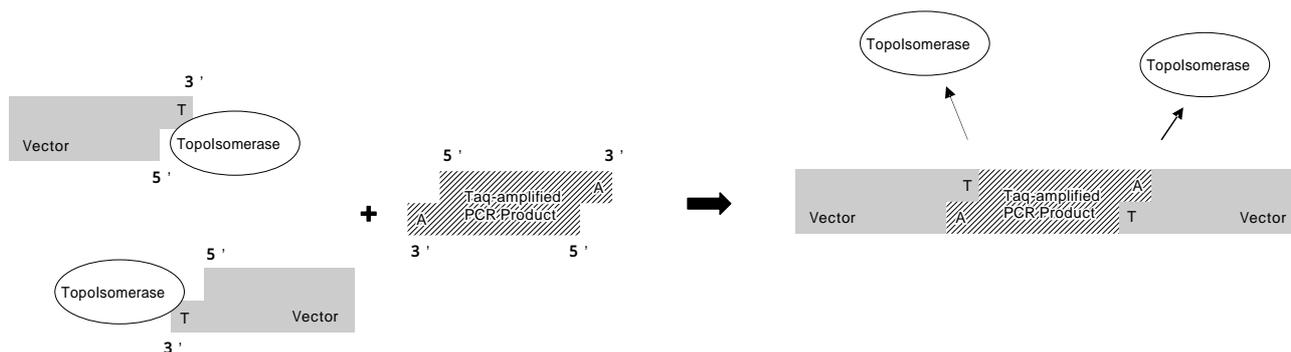


図2 TOPO TA Cloning の原理

グを行った(図2)。P. jirovecii の PCR 増幅産物の精製後, pCR 2.1-TOPO ベクターにライゲーションし, 大腸菌 DH5 の形質転換を行った。次いで大腸菌を X-gal を塗布したアンピシリン加 LB 寒天培地に播種し, 37 °C で一晩培養した。翌日, 白色もしくは薄い青色のコロニーを数個, LB 液体培地に浮遊させ, 37 °C で一晩培養したのち, Miniprep DNA Purification Kit (TaKaRa) にてプラスミドの抽出を行った。得られたプラスミドの DNA 濃度を測定し, 次式によりコピー数を算出した²⁾。

$$\text{Copies of plasmid (copy/ml)} = [6.02 \times 10^{23} (\text{copy/mol})] \times \text{amount (g/ml)} / [\text{length (bp)} \times 660 (\text{g/mol/bp})]$$

5) リアルタイム PCR

LightCycler DX400 (ロッシュ) で作成した標準物質の希釈系列を測定し, SYBR Green による反応系で定量性の検証を行った。反応液は全量 20 μl あたり, 検体 DNA を 10 μl 使用し, その他の成分は最終濃度で 1 × FastStart DNA Master Mix, プライマー 0.5 μM, MgCl₂ 3 mM となるように調整した。反応条件はホットスタート 95 °C 10 分, 熱変性 95 °C 10 秒, アニール 62 °C 10 秒, 伸張反応 72 °C 16 秒を 35 サイクル行った。

結 果

PCR と形態学的検査を比較した 39 例では, PCR で 13 例, 形態学的検査で 2 例から P. jirovecii を検出した。PCR にて P. jirovecii を検出した症例は, いずれも臨床

的に PCP として矛盾のない症例であった。形態学的に P. jirovecii を検出した 2 例中 1 例は, 複数回の形態学的検査で菌体の確認が可能であった。PCR に対する形態学的検査の検出感度は 15.4%, 陽性一致率は 100% であった(表 1)。

標準物質の希釈系列を用いた PCR では, 1.0×10^0 copy/μl までの検出が可能であった(図 3)。また, リアルタイム PCR では $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^1$ copy/μl まで良好な直線性が得られた(図 4)。

考 察

PCP は免疫力が低下している状態で, 発熱, 呼吸困難等の臨床症状, 胸部 X 線の両側スリガラス状陰影, 酸素分圧低下がみられた場合に疑われるが, 他の感染症との鑑別は難しく, 診断確定には P. jirovecii の確認が必須である。しかし, 喀痰や気管支洗浄液等から形態学的観察により P. jirovecii が検出できる症例は少ない。検出率の向上を期待し, 複数回の検査を実施することもあるが, 費用対効果の面からも有効な手段とはいえなかった。血清学的検査として -D- グルカンの測定も有用といわれているが, 真菌の細胞壁成分の検出を原理とするため, 真菌感染全般で高値を示し, 結果の解釈には注意が必要である³⁾。

今回我々が検討を行った PCR による P. jirovecii の検出は, 形態学的検査よりも明らかに高い検出率を示した。標準物質を用いた感度の検討でも, 1.0×10^0 copy/μl ま

表1 PCRと形態学的検査の比較 (n=39)

		形態学的検査		合計
		陽性	陰性	
PCR	陽性	2	11	13
	陰性	0	26	26
合計		2	37	39

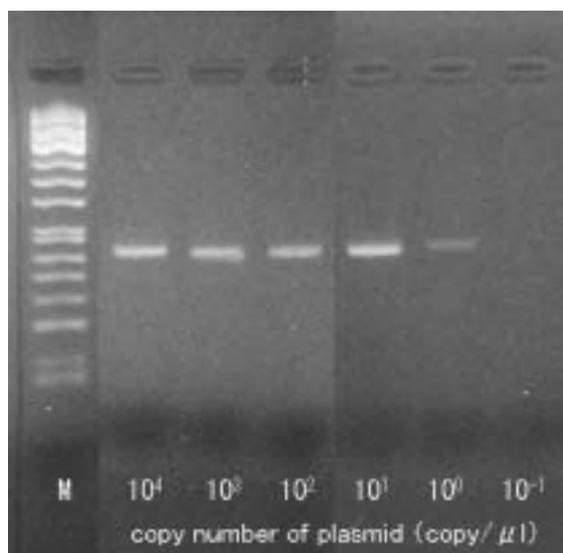


図3 標準物質の希釈系列を用いたPCRの結果

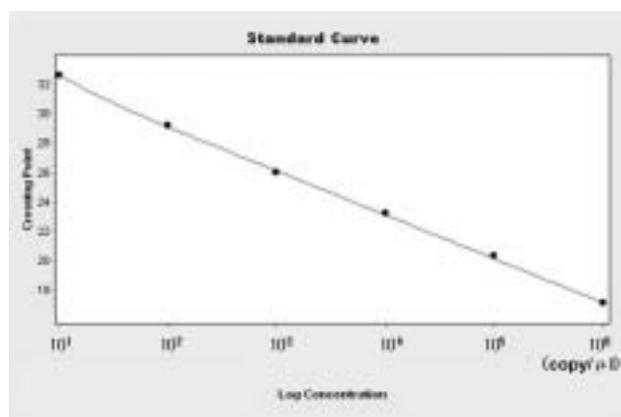


図4 標準物質の希釈系列を用いたRT-PCRの結果

で検出可能であり、本法の高い感度を客観的に証明することができた。P. jiroveciiの5S rRNAをコードするDNA領域を増幅するプライマーは、他の肺疾患を引き起こす真菌や細菌と反応する可能性がきわめて少なく、高い特異性が報告されている¹⁾。呼吸器材料は食物残渣、血液、炎症性細胞、雑菌、粘液成分等、PCR反応を阻害する可能性のある物質の混入も多いが、非特異的反応はみられず、安定した結果を得ることができた。また増幅産物が120bpと比較的短く、鋳型DNA損傷の影響を受けにくいことから、固定後検体やパラフィン包埋組織からの検出も可能と思われた⁴⁾。

PCPの治療では主にスルファメトキサゾールとトリメトプリムの併用療法であるST合剤を2～3週間使用する。ST合剤はP. jiroveciiの葉酸合成阻害と葉酸活性阻害により抗菌作用を示すが、副作用として骨髄抑制、肝障害、腎障害、消化器症状を生じることがある。AIDS患者ではさらに全身発疹や発熱等の過敏症状を伴うことがあり、注意深い全身状態の管理が必要である。治療時にPCRでP. jiroveciiの有無をモニタリングすることによって、治療効果の把握が可能となり、副作用による身体的負担を最小限に抑えることも可能と思われた⁷⁾。

P. jiroveciiは土壌に常在する微生物で、健常人も不顕性感染するため、微量ながら潜在的に保菌している可能性がある。また、AIDS患者ではPCPを発症していないにも関わらず、P. jiroveciiの増殖がみられる場合もある⁵⁾⁶⁾⁷⁾。このような場合、P. jiroveciiの定量を行い、臨床所見と照らし合わせることで、P. jiroveciiの存在を副所見として判断する試みも報告されている⁸⁾。我々が行った標準物質を用いたリアルタイムPCRの検討においても良好な定量性が確認できた。今後は定量値の報告を視野に入れた検討も必要と思われた。

本検査は保険収載されていないことから、院内で実施した場合、費用は病院が負担することになる。しかし、汎用の機器・試薬を用いることで、一般的なPCRと同程度のコストで実施可能であり、迅速にも優れている。本検査の結果により、適切な医療資源の投入が可能となり、診療全体に関わる費用の削減に寄与すると思われた。

ま と め

PCRによるP. jiroveciiの検出は喀痰等、従来の呼吸器材料を用いることができるため、患者にとって低侵襲である。また、複数回の検体採取も容易であり、治療効果のモニタリングにも利用可能である。運用面では解決すべき問題も残されているが、AIDS拠点病院、骨髄移植施設、癌化学療法実施施設などでは有用な検査法と考えられた。

文 献

- 1) KAZUHIRO KITADA et al.: Detection of Pneumocystis carinii Sequences by Polymerase Chain Reaction: Animal Models and Clinical Application to Noninvasive Specimens. J Clin Microbiol, 1991; 29: 1985-1990.
- 2) James Peterson, Gregory J. Philips: New pSC101-derivation cloning vectors with elevated copy numbers. Plasmid, 2008; 59(3): 193-201.
- 3) 茂呂 寛他: 臨床検体を用いた血中(1/3)-D-

- グルカン測定キット4種類の比較検討. 感染症誌, 2003; 77: 227-234.
- 4) 前河裕一他: 長期ホルマリン固定肺組織からのDNA抽出: PCR法によるPneumocystis carinii DNAの検出. 大阪看大医療技短大紀要, 1999; 5: 39-44.
- 5) K. Saito et al.: Detection of Pneumocystis carinii by DNA amplification in patients with connective tissue diseases: re-evaluation of clinical features of P carinii pneumonia in rheumatic diseases. Rheumatology, 2004; 43(4): 479-485.
- 6) Kazuhiro Kitada et al.: Pneumocystis carinii pneumonia monitored by P carinii shedding in sputum by the polymerase chain reaction. Intern Med, 1993; 32(5): 370-373.
- 7) 沼田早苗他: PCRを用いたPneumocystis Carinii検出の有用性. 医学検査, 1999; 48(11): 1619-1623.
- 8) 小柏 均他: リアルタイムPCR法によるpneumocystis jirovecii迅速定量法の確立. 医学検査, 2007; 56(12): 1527-1534.