

スワブ検体からの *Trichomonas vaginalis* 遺伝子検出のための 試料調整法及びPCR法の検討

村田 理恵*, 鈴木 淳*, 小林 正規**, 柳川 義勢*

Investigation of Elution Methods, DNA Extraction Procedures and PCR Methods for Detection of *Trichomonas vaginalis* DNA from Swab Samples

Rie MURATA*, Jun SUZUKI*, Seiki KOBAYASHI** and Yoshitoki YANAGAWA*

In the detection of *Trichomonas vaginalis* DNA by PCR from swabs stored at 4°C, elution by vortexing and DNA extraction by SepaGene (SankoJunyaku Co.,Ltd.) or NaOH extraction were more effective procedures. PCR described by Kengne *et al.* was more sensitive at 100-fold than that by Madico *et al.* In addition, it was suggested that the procedure confirmed in this study can detect *T. vaginalis* DNA from swabs after storage for 9 days at 4°C.

Keywords : 膣トリコモナス *Trichomonas vaginalis* , ポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction(PCR), スワブ swab

緒 言

膣トリコモナス症は *Trichomonas vaginalis* (以下 *T. vaginalis* とする) の感染により膣炎や尿道炎を起こす性感染症の一つである。東京都では感染症発生動向調査事業により、性感染症については41医療機関を定点とし、6疾患を対象に調査を行っているが、2001年から2005年までの5年間に膣トリコモナス症患者は1定点当たり5~10人程度報告¹⁾され、そのほとんどが女性である。近年、膣トリコモナス症の報告数は減少傾向にあるが、卵管炎などの骨盤内炎症性疾患との関係やHIVなど他の性感染症との重複感染が問題視されており^{2, 3)}, *T. vaginalis* も軽視することができない性感染症病原体の一つである。

医療機関の検査室等における *T. vaginalis* の検査は膣擦過物・分泌物や尿沈渣の顕微鏡検査や培養法が一般的である。しかし、感染症発生動向調査事業のような場合は、定点医療機関からのスワブ検体は検体採取から検査までに最短でも半日以上を要する場合がほとんどである。そのため、*T. vaginalis* の運動の低下や死滅により一般的な検査を行うことは困難なことが多い。

そこで今回、検体採取から時間が経過することにより *T. vaginalis* が死滅し、顕微鏡検査等の検査法が困難となるスワブからの高感度な検査法としてPCR法による *T. vaginalis* 遺伝子検出法について検討したので報告する。

材料及び方法

1. 使用原虫

T. vaginalis 患者由来株をバイオセートペプトンを用いたTYI-S-33培地⁴⁾ に接種し、35.5°Cの条件下で培養したもの

をPCR法及び綿棒からの回収実験に用いた。

2. PCR法

PCR法は以下に示すKengneら⁵⁾のTVK3/TVK7プライマーとMadicoら⁶⁾のBTUB9/BTUB2プライマーの2つのプライマーセットを用いた。検出感度を比較するために用いたDNAは培養した *T. vaginalis* をセパジーン(三光純薬)で処理することにより得た。PCR反応後は3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅産物を確認した。なお、TVK3/TVK7プライマーセットによるPCR法は *T. vaginalis* の反復DNA中の262塩基対を標的とし、TVK3(5'-ATTGTCGAACATTGGTCTTACCCTC-3')とTVK7(5'-TCTGTGCCGTCTTCAAGTATGC-3')のプライマーを用い、95°C5分間の後、90°C1分間、60°C30秒間、72°C2分間を35サイクル繰り返し、その後72°C7分間加熱の反応条件で実施した。また、BTUB9/BTUB2プライマーセットは *T. vaginalis* のβ-tubulin遺伝子中の112塩基対を標的としたPCR法で、BTUB9(5'-CATTGATAACGAAGCTCTTTACGAT-3')とBTUB2(5'-GCATGTTGTGCCGACATAACCAT-3')のプライマーにより、95°C2分間の後、95°C45秒間、62~52°C45秒間(4サイクル毎に1°Cずつ下げて52°Cにする)、72°C1分間を60サイクル繰り返す反応条件を用いた。

3. 綿棒からの *T. vaginalis* の回収実験法

培養した *T. vaginalis* を100μL当たり約1,000個と約100個の浮遊液に調整後、各々の100μLをカルポーター(栄研器材)の採取用綿棒に添加し、4°Cで3時間、3日間、9日間保存した。

* 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学

次いで、生理食塩水400 μ Lを入れた15 mL遠沈管中に*T. vaginalis*添加綿棒を入れ、以下に示す3つの方法により*T. vaginalis*の回収を試みた。1) 懸濁法 子宮頸管擦過物検体からのクラミジア、淋菌の核酸検査の検体調整法に準拠し、遠沈管内で綿棒を10~15秒間懸濁後、綿棒を除去する方法、2) 超音波法 3分間超音波処理後、綿棒を除去、3) 攪拌法 試験管ミキサーにより1分間攪拌した後、綿棒を除去する方法である。

各回収液100 μ LからのDNA抽出は以下に示す3つの方法により行った。

1) 煮沸法 回収液を12,000rpmで5分間遠心後、上清95 μ Lをマイクロピペットで除去、TE緩衝液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 30 μ Lを加え、100°C10分間煮沸した。次いで、-80°C10分間または-20°C一晩以上放置し凍結した。検査時室温にて解凍後、12,000 rpmで5分間遠心した上清を用いた。

2) アルカリ煮沸法 煮沸法と同様に処理した遠心沈渣に50 mM NaOHを10 μ L加え、100°C10分間煮沸した。次いで、80 mM Tris-HCl (pH 7.5) を20 μ L加え、12,000 rpmで5分間遠心して、DNA抽出液を作成した。

3) DNA抽出キット セバジーン(三光純薬)の操作法に従ってDNA抽出後、アルコール沈澱では試料が微量なことから20 mg/mLのグリコーゲン液1 μ L(ロシュ・ダイアグノスティックス)を加え、核酸ペレットをTE緩衝液35 μ Lで溶解した。

結果及び考察

1. PCR法の比較

T. vaginalis DNAを5 ng, 0.5 ng, 50 pg, 5 pg, 0.5 pgに調整したDNA試料を用いて、TVK3/TVK7プライマーとBTUB9/BTUB2プライマーの2つのプライマーセットによるPCR法の検出感度について比較した。TVK3/TVK7プライマーによるPCR法では、DNA量0.5 pgまで増幅産物を確認できた(Fig. 1)。一方、BTUB9/BTUB2プライマーによるPCR法では、増幅産物はDNA量50 pgまでしか確認できなかった(Fig. 2)。

したがって、TVK3/TVK7プライマーを用いたPCR法がBTUB9/BTUB2プライマーを用いたPCR法に比べ約100倍検出感度が高いことが明らかとなった。

2. 綿棒からの*T. vaginalis*回収法、DNA抽出法及び保存日数の比較

綿棒からの*T. vaginalis*回収法、DNA抽出法及び保存日数の影響について検討した。

検出感度の高いTVK3/TVK7プライマーを用いたPCR法では、テンプレートは2 μ Lで、約100個の*T. vaginalis*添加綿棒からすべて回収された場合、約1個に相当するDNA量となる。添加量が約100個の場合でも、4°Cに9日間保存した試料の超音波処理したうちの1つが増幅産物を確認できなかった以外、すべての披検材料から約260 bpの増幅産

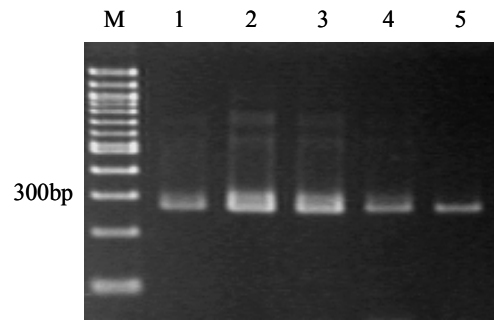


Fig. 1. Analytical Sensitivity Testing of *T. vaginalis* PCR with TVK3/TVK7 Primer Set

T. vaginalis DNA : 1 ; 5ng, 2 ; 0.5ng, 3 ; 50pg, 4 ; 5pg, 5 ; 0.5pg, M : size marker (100bp ladder)

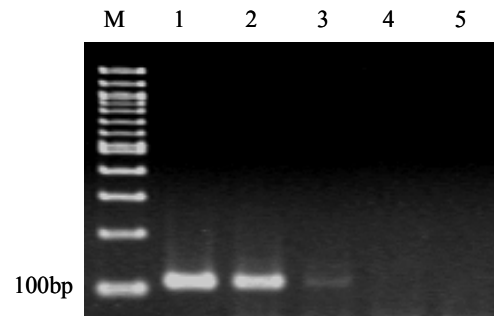


Fig. 2. Analytical Sensitivity Testing of *T. vaginalis* PCR with BTUB9/BTUB2 Primer Set

T. vaginalis DNA : 1 ; 5ng, 2 ; 0.5ng, 3 ; 50pg, 4 ; 5pg, 5 ; 0.5pg, M : size marker (100bp ladder)

物が検出された。

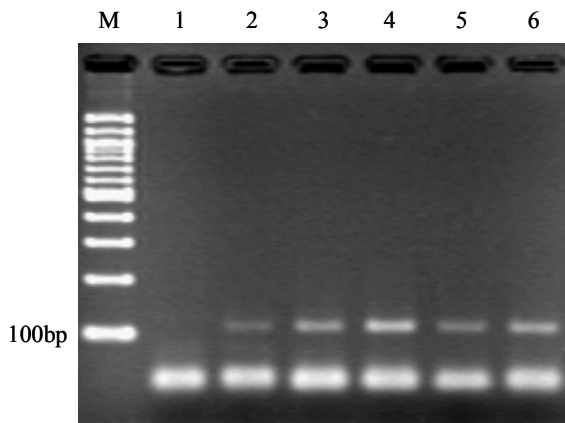
次に、検出感度の高いTVK3/TVK7プライマーを用いたPCR法では、綿棒からの*T. vaginalis*回収法、DNA抽出法及び保存日数の影響について比較することができなかったことから、検出感度が低いBTUB9/BTUB2プライマーを用いたPCR法で比較した。Table 1に示したように、綿棒に添加した*T. vaginalis*が約100個の場合、いずれも増幅産物を確認できなかった。また、添加量が約1,000個では、超音波法による回収の場合、増幅産物を確認できたのは、4°C、3時間保存後の試料のセバジーンによるDNA抽出物の2回のうち1回だけであった。懸濁法と攪拌法による回収の場合、煮沸法によるDNA抽出物は各保存日数においては2回に1回または2回とも増幅産物を確認できなかったが、アルカリ煮沸法及びセバジーンによるDNA抽出物は3日間保存後までは増幅産物を確認でき、9日間保存後では増幅産物を確認できたのは2回のうち1回であった。これらの結果から、綿棒からの*T. vaginalis*回収法は、超音波法に比べ、懸濁法と攪拌法がほぼ同様の結果を示し回収効率が高かった。また、攪拌法は懸濁法に比べて検査者の操作手技による影響が少なく、攪拌法はより安定した結果が得られる方法であると考えられた。一方、DNAの抽出法については、セバジーンによる方法が最も抽出効率が高かったが、アルカリ煮沸法も攪拌法と組み合わせることによって、同程度の増幅産物量を確認できた(Fig. 3)。

Table 1. Comparison with Combination of Elution Methods and DNA Extraction Procedures for Detection from Swabs Contained with *T.vaginalis* by PCR with BTUB9/BTUB2 Primer Set

No. of <i>T.vaginalis</i> / swab	period of storage at 4°C	washing			sonication			vortexing		
		boiling	NaOH	DNA kit ¹⁾	boiling	NaOH	DNA kit	boiling	NaOH	DNA kit
1,000	3hours	1 / 2 ²⁾	2 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	1 / 2	1 / 2	2 / 2	2 / 2
	3days	1 / 2	2 / 2	2 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1 / 2	2 / 2	2 / 2
	9days	0 / 2	1 / 2	1 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1 / 2	1 / 2	1 / 2
100	3hours	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
	3days	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
	9days	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2

1) SepaGene (SankoJunyaku Co.,Ltd.)

2) No. of positive / No. of tested

Fig. 3. Detection of *T.vaginalis* from Swabs by PCR with BTUB9/BTUB2 Primer Set

Swabs contained with about 1,000 *T. vaginalis* organisms and stored for 3 hours at 4°C were recovered by vortexing and were extracted by three methods (boiling : lane 1 and 2, NaOH extraction : lane 3 and 4, SepaGene treatment : lane 5 and 6). M ; size marker (100bp ladder)

以上のことから、攪拌法により綿棒から *T. vaginalis* を回収し、セパジーンまたはアルカリ煮沸法によりDNAを抽出後、TVK3/TVK7プライマーを用いたPCR法を行うことが有効な方法であった。また、これまで病原体定点医療機関から搬入された検体のうち、検体採取から受付までに最長で9日間経過していた検体を経験しているが、このような場合にも、*T. vaginalis* が100個程度綿棒に付着していれば、この方法により本遺伝子が検出可能であることが示唆された。

ま と め

検体採取から時間が経過したスワブから *T. vaginalis* 遺伝子を検出するには、攪拌法により綿棒から *T. vaginalis* を回収し、セパジーンまたはアルカリ煮沸法によりDNAを抽出後、Kengneらにより報告されている *T. vaginalis* の反復DNA中の262塩基対を標的としたTVK3/TVK7プライマーを用いたPCR法を行うことが検出効率の高い安定した方法であった。また、添加回収試験では、4°C、9日間保存後でも *T. vaginalis* 遺伝子の検出が可能であった。

文 献

- 1) 東京都福祉保健局：感染症発生動向調査事業報告書，平成17年（2005年）。
- 2) 松田静治：日性感染症会誌，**15**，Suppl. 26-28，2004。
- 3) 松田静治，安藤三郎，王 欣輝，他：日性感染症会誌，**6**，101-107，1995。
- 4) Clark, C.G. and Diamond, L.S.: *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**(3), 329-341, 2002.
- 5) Kengne, P., Veas, F., Vidal, N., *et al.*: *Cell. Mol. Biol.*, **40**, 819-831, 1994.
- 6) Madico, G., Quinn, T.C., Rompalo, A., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3205-3210, 1998.