

リアルタイムPCRを用いた髄膜炎菌の検出感度に関する検討

有吉 司^a, 久保田 寛顕^a, 内谷 友美^a, 奥野 ルミ^a, 千葉 隆司^b, 横山 敬子^a, 貞升 健志^b

髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) は *Neisseria* 属のグラム陰性双球菌であり、ヒトの上咽頭や鼻腔に存在し、髄膜炎を含む様々な感染症の原因菌として報告されている。国内での髄膜炎菌による「侵襲性髄膜炎菌感染症」は、2013年以降年間40例程度であるが、集団事例の発生も知られている。一方海外では、髄膜炎菌による感染症発生が非常に多い地域もあり、輸入感染症としても注意が必要である。東京都では、2019年ラグビーワールドカップ、2020年東京オリンピック・パラリンピックを控えており、これらの大規模なマスコガザリングにおける疾病対策の一環として、当センターが保有する髄膜炎菌 (A, B, Y群) を用い、アメリカ疾病管理予防センター (CDC) が公開しているリアルタイムPCR検出系の検出感度の検討を行った。

その結果、ゲノムに対する検出限界が31.8~44.3 genomes/ μ L、CFUに対する検出限界が898~6,374 CFU/mLと高感度なリアルタイムPCR検出系であることが確認され、髄膜炎菌の迅速検査に本法が使用可能であることが示された。

キーワード：髄膜炎菌、リアルタイムPCR、検出感度

はじめに

髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) は *Neisseria* 属のグラム陰性双球菌であり、ヒトの上咽頭や鼻腔に存在し、肺炎や尿道炎などの非侵襲性感染症、敗血症や髄膜炎などの侵襲性感染症の原因菌として報告されている。また本菌は、莢膜多糖体の多様性から血清群別が可能で今日までに13種の血清群が知られているが、侵襲性疾患のほとんどはA, B, C, Y, W群の5つの血清型によるものである¹⁾。

髄膜炎菌に関連する疾患としては、日本では戦前より伝染病予防法に基づく「流行性脳脊髄膜炎」の患者届出が行われ、1945年前後には年間4,000例を超える患者が報告された。その後患者報告数は激減し、1969年以降年間100例未満、1978年以降は30例未満となった²⁾。1999年4月施行の感染症法において、「髄膜炎菌性髄膜炎」が全数把握の4類感染症となり (2003年11月に5類感染症に変更)、1999年以降2013年3月まで、毎年7~21例の報告があった。2011年5月に宮崎県の高校で集団発生が起こった際、髄膜炎症例に加え、敗血症など非髄膜炎症例の多発が指摘されたことを受け、2013年4月に、髄膜炎菌による髄膜炎に敗血症を加えた「侵襲性髄膜炎菌感染症」として全数把握の5類感染症の届出に変更となった。2013年以降、我が国では年間40例ほど、東京都においても年間3~11例が報告されている^{2, 3)}。

一方海外では、年間30万人以上の患者が発生する「髄膜炎菌ベルト」と呼ばれるアフリカの赤道直下地域だけでなく、米国や英国などのワクチンの導入が進んでいる国においても、年間1,000例以上の発生が認められており、本菌の海外からの持ち込みに注意が必要である⁴⁾。

国内においては学生寮での事例に加え、国際ボーイスカウトジャンボリーにおいて髄膜炎菌感染症事例も報告されている⁵⁾。このようなイベント等によって限定された地域に同一目的で一定期間集合した多人数の集団は「マスコガザリング」と呼ばれ、疾病対策等の健康危機管理が必要とされている⁶⁾。2001年にはメッカでのイスラム教徒の巡礼 (Haj: ハッジ) において、ヨーロッパからの巡礼者が、帰国後に髄膜炎菌による感染症を発症し問題となった事例もある⁷⁾。

東京都健康安全研究センター (以下、当センター) における髄膜炎菌の検査は、同定キットおよびコンベンショナルPCRを実施しており、集団発生が起きた場合、迅速性及び処理能力が課題である。東京都では、2019年ラグビーワールドカップ、2020年東京オリンピック・パラリンピックを控えており、これらの大規模なマスコガザリングにおける疾病対策として病原体の迅速診断検査を構築することにより、検査機関の対応能力を高めることが必要である。

以上のことを踏まえ本研究では、当センターで保有する髄膜炎菌を用い、リアルタイムPCRによる検出感度に関する検討を行った。

実験方法

1. 検出系の検討

髄膜炎菌が特異的に保有する *Superoxide dismutase* 遺伝子 (*sodC*) 領域を対象とし、TaqManプローブによる蛍光検出を用いたリアルタイムPCR検出系を検討した。

リアルタイムPCR検出系は、アメリカ疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) が公

^a 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

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

表1. リアルタイムPCR検出系におけるプライマーとプローブの配列

sodC	Forward primer	5'- GCACACTTAGGTGATTACCTGCAT -3'
	Reverse primer	5'- CCACCCGTGTGGATCATAATAGA -3'
	TaqMan probe	FAM - CATGATGGCACAGCAACAAATCCTGTTT -BHQ1

開している検出系を使用した (表1) ⁸⁾ .

2 μ LのDNAサンプルに12.5 μ Lの2x QuantiTect Probe PCR Master Mix (キアゲン), 2 μ Lのフォワードプライマー (3.75 μ M, ファスマック社に合成依頼), 2 μ Lのリバースプライマー (7.5 μ M, ファスマック社に合成依頼), 2 μ LのTaqmanプローブ (1.25 μ M, ファスマック社に合成依頼), 及び4.5 μ Lの滅菌蒸留水を加え全25 μ Lの反応液とした後, QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (サーモフィッシャー) により検出を行った. 使用したプライマー等の塩基配列を表1に示した. またPCRサイクルは, 50°C2分, 95°C15分を1回, 続いて95°C15秒, 60°C1分を50回に設定した. 増幅後, 同システムの自動解析により, Ct (Threshold cycle)値を定め, 定量を行った. Ct値が35サイクル以下のものを髄膜炎菌陽性, 40サイクルより大きいものを陰性とし, 36から40サイクルのものを判定保留とした.

2. PCR反応における検出感度の測定

1) スタンダードDNAの作成

検討した検出系の検出感度を評価するために, スタンダードDNAを作成した. スタンダードDNAは, 海外で流行傾向のあるA群髄膜炎菌 (NmA), 国内で流行傾向のあるB群髄膜炎菌 (NmB) とY群髄膜炎菌 (NmY) のゲノムDNAとした.

各菌株をチョコレート寒天培地に接種し, 5%CO₂, 37°Cで24時間培養後, QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) を用いて, スタンダードDNAを抽出した. 得られたスタンダードDNAからリアルタイムPCR反応における検量線を作成するために, それぞれのスタンダードDNA溶液に含まれるゲノム数をあらかじめ算出した. 初めに, 髄膜炎菌の全ゲノム塩基対 (2.3 \times 10⁶塩基対) に660 Da/塩基対を乗じて得られた値を各スタンダードの分子量とし, この分子量の値をアボガドロ数6.023 \times 10²³ genomes/molに対して除することにより単位グラムあたりのゲノム数を算出した. 続いて, 3種の髄膜炎菌スタンダードDNAをそれぞれTE buffer (pH 8.0) を用いて10倍から10⁷倍に系列希釈し, 10⁷倍に希釈したスタンダードDNAの濃度 (μ g/mL) を Quantus Fluorometer (プロメガ) を用いて測定した. 最後に, 算出した単位グラムあたりのゲノム数に測定したDNAの濃度を乗じることにより単位容量あたりのゲノム数 (genomes/ μ L) を算出した.

2) 検出感度の測定

10倍から10⁷倍に系列希釈した3種の髄膜炎菌スタンダードDNAをそれぞれを計測サンプルとした. 各計測サンプルを, 96wellプレート (ライフテクノロジー ジャパン)

にそれぞれ3wellずつ調製し, 上記のリアルタイムPCRを実施した. また, 各wellは平均化せずそれぞれ1プロットとして直線近似を行い, Ct値が陽性判定の上限である35サイクルになるゲノム数を検出限界として算出した.

3. DNA抽出操作を加味した検出感度の測定

1) 供試検体中の菌量の計測

NmA, NmB, NmYの菌株をそれぞれチョコレート寒天培地に接種し, 5%CO₂, 37°C, 24時間で培養後, 分離されたコロニーを釣菌し, 2 mLの滅菌生理食塩水に懸濁し McFarland Standard 4 (シスメックス・ビオメリュー) に濁度を合わせた調整液を作成した. 0.5 mLの調整液を, 4.5 mLの滅菌生理食塩水に加えよく懸濁し, 10倍希釈液を作成した. 同様の操作を繰り返し, 10¹から10⁷倍の希釈系列を作成し, 10⁴から10⁷倍希釈液を計測サンプルとした.

続いて, 100 μ Lの計測サンプルをそれぞれ5%馬血液加トリプトソイ寒天培地に接種し, コンラージ棒で培地全体に塗り広げ, 5%CO₂, 37°C, 24時間培養後, コロニー数を計測した. 計測方法は, コロニー数が30~300個の範囲のサンプルを基準とし, 希釈倍率から残りのサンプルのコロニー数を概算した.

2) 検出感度の測定

3-1) で作成した計測サンプル200 μ LからDNA抽出を行った. DNA抽出には, QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) 及び, QIAamp DNA Micro Kit (キアゲン) を使用した. 抽出したDNAサンプルについて, 2-2) と同様の条件で3回測定した. 各wellは平均化せずそれぞれ1プロットとして直線近似を行い, Ct値が陽性判定の上限である35サイクルになるコロニー形成単位 (以下CFUと略す) を検出限界として算出した.

結 果

1. PCR反応における検出感度

10⁷倍に希釈した各髄膜炎菌スタンダードDNAの単位容量あたりのゲノム数は, 0.794 genomes/ μ L (NmA), 0.913 genomes/ μ L (NmB), 0.595 genomes/ μ L (NmY) となった. これを基に希釈倍率から算出したサンプルDNAの単位容量あたりのゲノム数を横軸にし, リアルタイムPCRシステム附属ソフトウェアの自動解析により測定したCt値を縦軸とする検量線を図1に示した. 図1に示すようにそれぞれ決定係数が0.999 (NmA), 0.996 (NmB), 0.998 (NmY) となり, 概ね線形性は取れているものと考えられた. また, 対数直線用いて検出限界 (Ct値が35となるゲノム数) を求めたところ, 44.3 genomes/ μ L

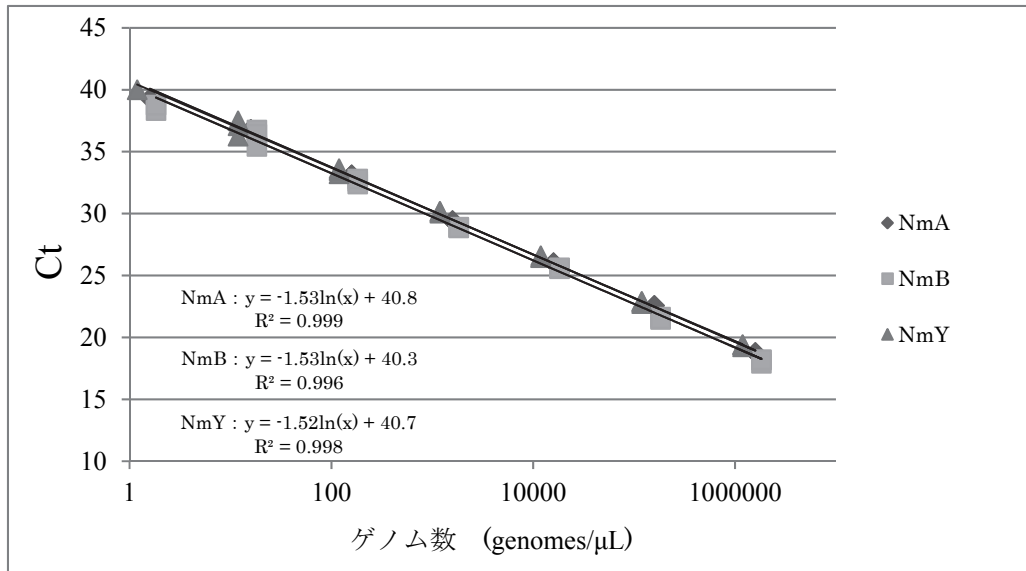
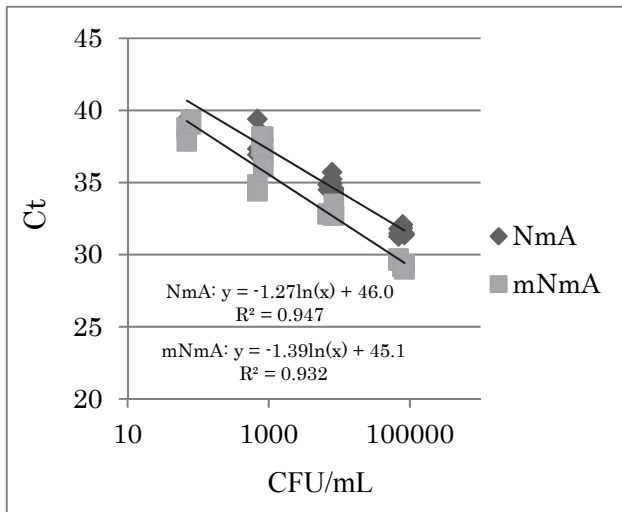
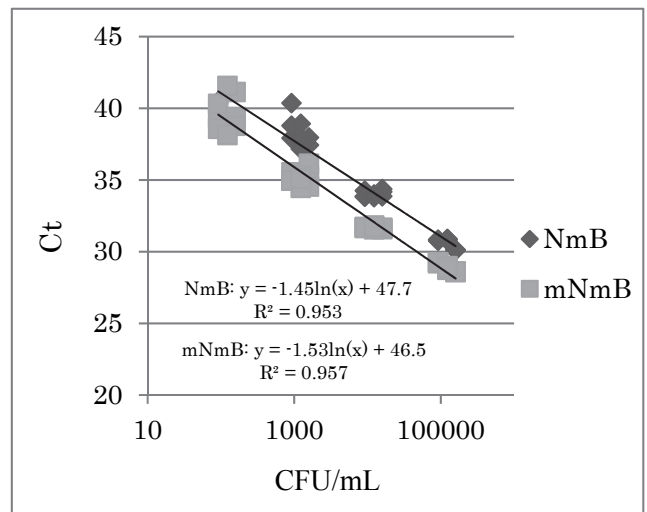


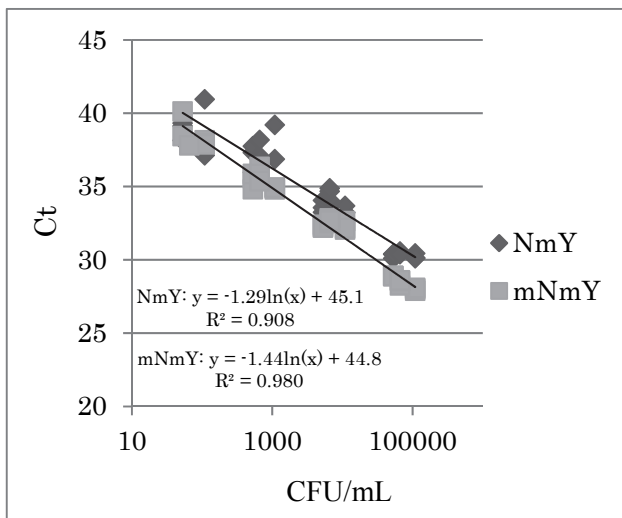
図1. リアルタイムPCR検出系における各群髄膜炎菌のゲノムに対するCt値



A群髄膜炎菌



B群髄膜炎菌



Y群髄膜炎菌

使用したDNA抽出キット

NmA, NmB, NmY : QIAamp DNA Mini Kit

mNmA, mNmB, mNmY : QIAamp DNA Micro Kit

図2. リアルタイムPCR検出系における各群髄膜炎菌のCFUに対するCt値

(NmA), 31.8 genomes/ μ L (NmB), 42.5 genomes/ μ L (NmY) となった。

2. DNA抽出操作を加味した検出感度

各髄膜炎菌株から作成した計測サンプルの概算したCFUを横軸にし、リアルタイムPCRシステム附属ソフトウェアの自動解析により測定したCt値を縦軸とする検量線を図2に示した。図2に示すようにそれぞれ決定係数が0.908から0.980となり、概ね線形性は取れているものと考えられた。また、対数直線を用いて検出限界 (Ct値が35となるCFU/mL) を求めたところ、5,768 CFU/mL (NmA), 6,374 CFU/mL (NmB), 2,515 CFU/mL (NmY) 及び1,437 CFU/mL (mNmA), 1,845 CFU/mL (mNmB), 898 CFU/mL (mNmY) となった。

ここでは、QIAamp DNA Mini Kitを使用したサンプルをNmA,B,Yで、QIAamp DNA Micro Kitを使用したサンプルをmNmA,B,Yと示している。

考 察

本研究では、CDCが公開している方法を用い、当センターの試薬及び機器を用いての髄膜炎菌のリアルタイムPCR検出系の検討を行った。

ゲノムに対する検出限界は、31.8~44.3 genomes/ μ Lとなり、既報⁹⁾と同等の検出感度であった。また、CFUに対する検出限界は、DNA抽出にQIAamp DNA Mini Kitを使用した場合、2,515~6,374 CFU/mLとなり、QIAamp DNA Micro Kitの場合、898~1,845 CFU/mLになった。抽出キットの違いによる検出限界の差は、プロトコール上で最終抽出液量が、QIAamp DNA Mini Kitが100 μ Lに対しQIAamp DNA Micro Kitが20 μ Lであり、QIAamp DNA Micro Kitの方が抽出液1 μ Lに対するDNA量が多くなったため、見かけ上検出感度が良くなったと考えられる。しかしながら、どちらのキットを用いても既報¹⁰⁾と概ね同等以上の検出感度が得られた。また、本研究ではA, B, Y群髄膜炎菌を用いて検出系の構築を行ったが、当センター保有のC, W群髄膜炎菌および無莢膜型髄膜炎菌についても検出可能であった。

以上のことから、本研究で検討した髄膜炎菌を対象とするリアルタイムPCR検出系は、幅広いダイナミックレンジで菌量を定量することができ、迅速かつ多検体処理が可能であることから、マシギザリング等における髄膜炎菌による集団感染事例の迅速スクリーニング検査への利用が期待できる。加えて本法は、従来の検査法では測定不能であった菌の定量が可能になったことで、迅速検査への応用だけでなく、発症者と保菌者 (非発症者) において髄膜炎菌量差の測定等の髄膜炎菌感染症の解析に応用できると考えられる。

ま と め

髄膜炎菌の迅速検査を行うためのリアルタイムPCR検出系の検出感度の検討を行った。ゲノムに対する検出限界が

31.8~44.3 genomes/ μ L, CFUに対する検出限界が898~6,374 CFU/mLと高感度なリアルタイムPCR検出系であることが確認され、髄膜炎菌の迅速検査に本法が使用可能であることが示された。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症疫学センター：病原微生物検出情報, **34**, 361-362, 2013.
- 2) 国立感染症研究所感染症疫学センター：病原微生物検出情報, **39**, 1-2, 2018.
- 3) 東京都感染症情報センター：全数報告疾病集計表. <http://survey.tokyo-eiken.go.jp/epidinfo/zensu10bchart.do> (2018年8月9日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 4) 高橋英之, 大西 真, 蜂巢友嗣, 他：病原微生物検出情報, **39**, 3-4, 2018.
- 5) 金井瑞恵, 蜂巢友嗣, 福住宗久, 他：病原微生物検出情報, **36**, 178-179, 2015.
- 6) 和田耕治：国際的なマシギザリング (集団形成) に関するレクチャーシリーズ, 61-83, 2017, 国立国際医療研究センター国際医療協力局
- 7) 国立感染症研究所感染症疫学センター：病原微生物検出情報, **22**, 176, 2001.
- 8) World Health Organization: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, 2nd Edition, 105-156, 2011. <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/full-manual.pdf> (2018年8月9日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 9) Jennifer, D. T., Cynthia, P. H., Dara, A. S., *et al.*: PLoS ONE, **6**, 19361-19368, 2011.
- 10) Jeni V., Jean-Marc C., Melissa J. W., *et al.*: PLOS ONE, **10**, 147765-147771, 2016.

Study of detection limit of *Neisseria meningitidis* based on real-time PCR

Tsukasa ARIYOSHI^a, Hiroaki KUBOTA^a, Yumi UCHITANI^a, Rumi OKUNO^a,
Takashi CHIBA^a, Keiko YOKOYAMA^a, and Kenji SADAMASU^a

Neisseria meningitidis is a gram-negative bacterium that generally resides in the nasopharynx, but occasionally causes meningitis and other forms of meningococcal diseases, such as sepsis. Invasive meningococcal diseases (IMD) are identified in cases, in which *N. meningitidis* is detected from otherwise bacteria-free clinical specimens (e.g., blood or spinal fluid). Although only 40 cases of IMD per year have been reported in Japan since 2013, including outbreaks, the condition is much more frequent in some parts of the world. The Tokyo Metropolitan Government has to take measures against infectious diseases during large-scale mass gatherings, such as the 2019 Rugby World Cup in Tokyo and the 2020 Tokyo Olympic and Paralympic Games; therefore, we examined the detection limit of *N. meningitidis* using a real-time PCR protocol by the Centers for Disease Control and Prevention.

As a result, we confirmed the sensitivity of the real-time PCR detection system with a detection limit of 31.8–44.3 genomes/ μ L and 898–6,374 CFU/mL. Therefore, this detection system may be used for rapid detection of *N. meningitidis*.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, real-time PCR, detection limit

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

