

リアルタイムPCRを用いた髄膜炎菌迅速検査のうがい液検体への応用

有吉 司^a, 内谷 友美^a, 奥野 ルミ^a, 吉田 勲^a, 鈴木 淳^a, 貞升 健志^b

(外部機関査読者: 高橋 英之^c)

侵襲性髄膜炎菌感染症は、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) による侵襲性感染症であり、一部は重篤な転帰をとることがある。さらに、本症は急速に症状が進行する場合や、集団事例の発生例も報告されていることから、迅速な検査対応が求められる。本研究では、純培養した3種の髄膜炎菌株を $10^2 \sim 10^8$ CFU/mL オーダーで調製したうがい液を混合した疑似検体を用いて、WHOの検査マニュアルに従ったリアルタイムPCR (WHO法) での髄膜炎菌の検出感度を測定し、実際の患者を想定した迅速検査に応用できるかを検証した。その結果、疑似検体中に髄膜炎菌が 98,425~118,523 CFU/mL 程度存在すれば、リアルタイムPCRで検出可能であることが明らかとなった。一方で、セアーマーチン寒天培地を用いた培養法と比較すると検出感度は約500倍劣っていた。しかし、DNAの抽出やPCRの条件変更など検出感度を高めるための検討の余地は十分にあり、培養法との併用を行うことでWHO法のリアルタイムPCR検出系は髄膜炎菌感染症の迅速検査に応用できることが示唆された。

キーワード: 髄膜炎菌, リアルタイムPCR, うがい液, 検出感度

はじめに

侵襲性髄膜炎菌感染症は、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) による侵襲性感染症として、本菌が髄液又は血液などの無菌部位から検出される感染症である。潜伏期間は2~10日 (平均4日) で、髄膜炎症例では、頭痛、発熱、髄膜刺激症状の他、痙攣、意識障害、乳児では大泉門膨隆等を示し、敗血症例では発熱、悪寒、虚脱を呈し、重症化を来すと紫斑の出現、ショック並びにDIC (Waterhouse-Friedrichsen症候群) に進展することがある¹⁾。髄膜炎菌は環境中では生存できず、ヒトの鼻腔や咽頭に定着し、飛沫感染により伝播する²⁾。これまでの疫学調査から学生寮に入る10歳代が最も感染リスクが高いとされ、特に共同生活をしている場合には集団感染への注意が必要である¹⁾。

筆者らは、ラグビーワールドカップ、東京オリンピックなどの大規模なマスコギャザリングにおける侵襲性髄膜炎菌感染症のアウトブレイクを想定した大規模検査に対応するために、WHOの検査マニュアル³⁾に基づいたリアルタイムPCR検出系 (WHO法) の検出感度について報告した⁴⁾。しかし既報では、純培養した髄膜炎菌検体に対する検出感度の測定のみを行っており、夾雑物を多く含んだ検体 (喀痰や咽頭ぬぐい、うがい液など) に対する検出感度の測定は行っていない。実際に侵襲性髄膜炎菌感染症のアウトブレイクが起きた場合、接触者を対象とした大規模検査を行うことが想定される。

本研究では、大規模検査時に採取が簡便で、先行研究⁵⁾でも使用されているうがい液を生体試料とし、WHO法によ

るリアルタイムPCR検出系での検出感度を測定し、迅速検査に応用できるかを検証したのでその結果を報告する。

実験方法

1. 疑似検体の作製

滅菌生理食塩水 20 mL を用いて筆者ら3名からうがい液を採取した後に全量混合し、1800 μ L ずつ滅菌チューブに分注した。次に、あらかじめチョコレート寒天培地で純培養したB群髄膜炎菌 (NmB)、Y群髄膜炎菌 (NmY)、莢膜型別不能髄膜炎菌 (NTNm) をそれぞれ2 mL の滅菌生理食塩水に懸濁させた。各懸濁液をMcFarland Standard (シスメックス・バイオメリュー社) で濁度4に合わせた調整製液 200 μ L を滅菌チューブに分注したうがい液に添加したものを疑似検体とした。3菌種それぞれの疑似検体を10倍から 10^7 倍に系列希釈し、菌数が多い順にそれぞれ、Nm-B1 から Nm-B7、Nm-Y1 から Nm-Y7、Nm-NT1 から Nm-NT7 とした (図1A)。

また、浮遊させたそれぞれの髄膜炎菌調整液を希釈しチョコレート寒天培地に塗布、36°C、24時間培養し、発育したコロニー数を測定し各うがい液に添加した各髄膜炎菌の菌数を概算した。

2. リアルタイムPCR反応を用いた検出感度の測定

1) 疑似検体からのDNA抽出

各濃度の疑似検体および陰性対照としてのうがい液 1 mL から、QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン社) を用いてDNAを抽出した (図1B)。

^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

^c 国立感染症研究所

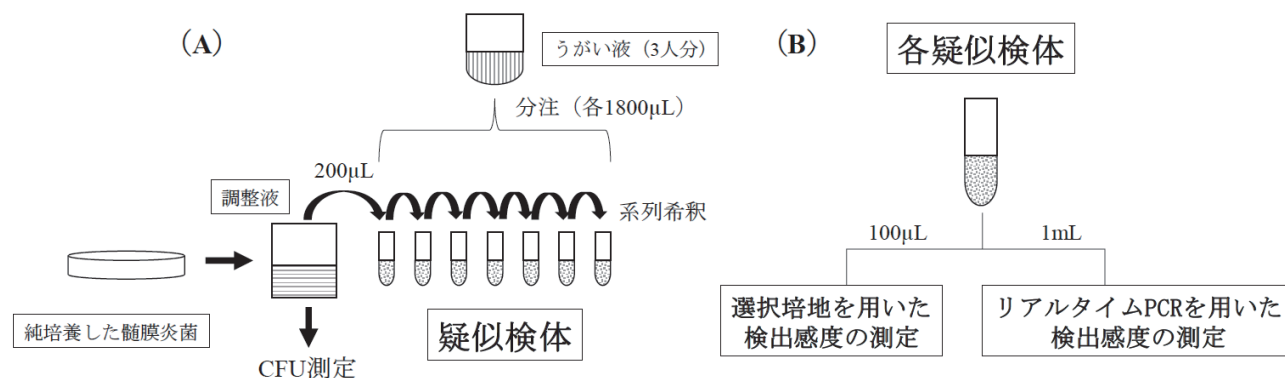


図 1. 疑似検体の作製 (A) と検出感度の測定の流れ (B)

2) リアルタイム PCR での検出感度の測定

抽出した DNA 2 μL を用いて *Superoxide dismutase* 遺伝子 (*sodC*) 領域をターゲットとしたリアルタイム PCR を実施した。プライマーや PCR 条件に関しては、WHO 法³⁾に従い、使用機器および試薬については既報⁴⁾と同様で、増幅後に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。10 倍から 10⁷ 倍に系列希釈した 3 種の髄膜炎菌の疑似検体をそれぞれ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・ジャパン社) にそれぞれ 3 well ずつ調製し、リアルタイム PCR を実施した。また、各 well の Ct 値は平均化せずにそれぞれ 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数を検出限界として算出した。

3. 選択培地を用いた検出感度の測定

作成した各疑似検体および陰性対照としてのうがい液 100 μL を髄膜炎菌選択培地であるセアマーチン寒天培地 (BD 社) に塗布し、36°C、24 時間培養し、発育したコロニーのうち灰白色、半透明、光沢、やや隆起した正円形の集落を髄膜炎菌としてカウントした (図 1B)。コロニー数の評価は、10~29 個を+, 30~100 個を++, 101 個以上を+++とした。髄膜炎菌としてカウントしたコロニーを各培地から 3 コロニーずつランダムに選択し、MALDI Biotyper (Bruker 社) で菌種同定を行った。また髄膜炎菌様コロニー以外のコロニーも MALDI Biotyper で菌種同定を行った。

結 果

1. 疑似検体に含まれる髄膜炎菌数

浮遊させたそれぞれの髄膜炎菌調整液に含まれる髄膜炎菌数 (コロニー形成単位, 以下 CFU と略す) は, NmB, NmY, NTNm が, それぞれ 3.9×10^9 , 2.9×10^9 および 4.1×10^9 CFU/mL であった。

2. リアルタイム PCR を用いた検出感度

各疑似検体に対し、概算した添加髄膜炎菌数 (CFU/mL) 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 0.9945 から 0.997 となり、概ね線形性は取れていた。また、対数直線を用いて Ct 値が 35 となる CFU/mL を検出限界として求めたところ、それぞれ 118,503 CFU/mL (NmB), 98,425 CFU/mL (NmY), 118,523 CFU/mL (NTNm) となった。また、陰性対照としてのうがい液検体の Ct 値は測定されなかった。

3. 選択培地を用いた検出感度

各疑似検体を選択培地上で培養し、髄膜炎菌様コロニーをカウントしたところ、3 種の髄膜炎菌いずれも、10⁵ 倍希釈液まで+++, 10⁶ 倍希釈液が++, 10⁷ 倍希釈液が+であった (表 1)。このことから疑似検体内に $2.8 \times 10^2 \sim 4.1 \times 10^2$ CFU/mL の髄膜炎菌が存在すれば、選択培地で検出可能であることが明らかとなった。また、3 種の髄膜炎菌で発育コロニーの外見や数に大きな差は見られなかった。検出培地には複数の形状のコロニーが発育したが、ランダムに選んだ髄膜炎菌様コロニーすべてが、MALDI Biotyper で *Neisseria meningitidis* と同定された。それ以外のコロニーは、*Ligilactobacillus salivarius*, *Limosilactobacillus fermentum* と同定され、これらは常在菌であった (図 3)。また、陰性対照としてのうがい液検体は、選択培地に髄膜炎菌様コロニーは発育しなかった。

考 察

うがい液に髄膜炎菌を添加したものを疑似検体とし、リアルタイム PCR および選択培地での培養法を用いた検出感度を測定した結果、検出限度は 98,425~118,523 CFU/mL であった。一方で、選択培地での培養法を用いた検出限界は、 $2.8 \times 10^2 \sim 4.1 \times 10^2$ CFU/mL であり、本研究のリアルタイム PCR 検出系は、培養法と比べ検出感度が 500 倍前後劣る結果となった。しかし、本研究の検出系は純培養した髄

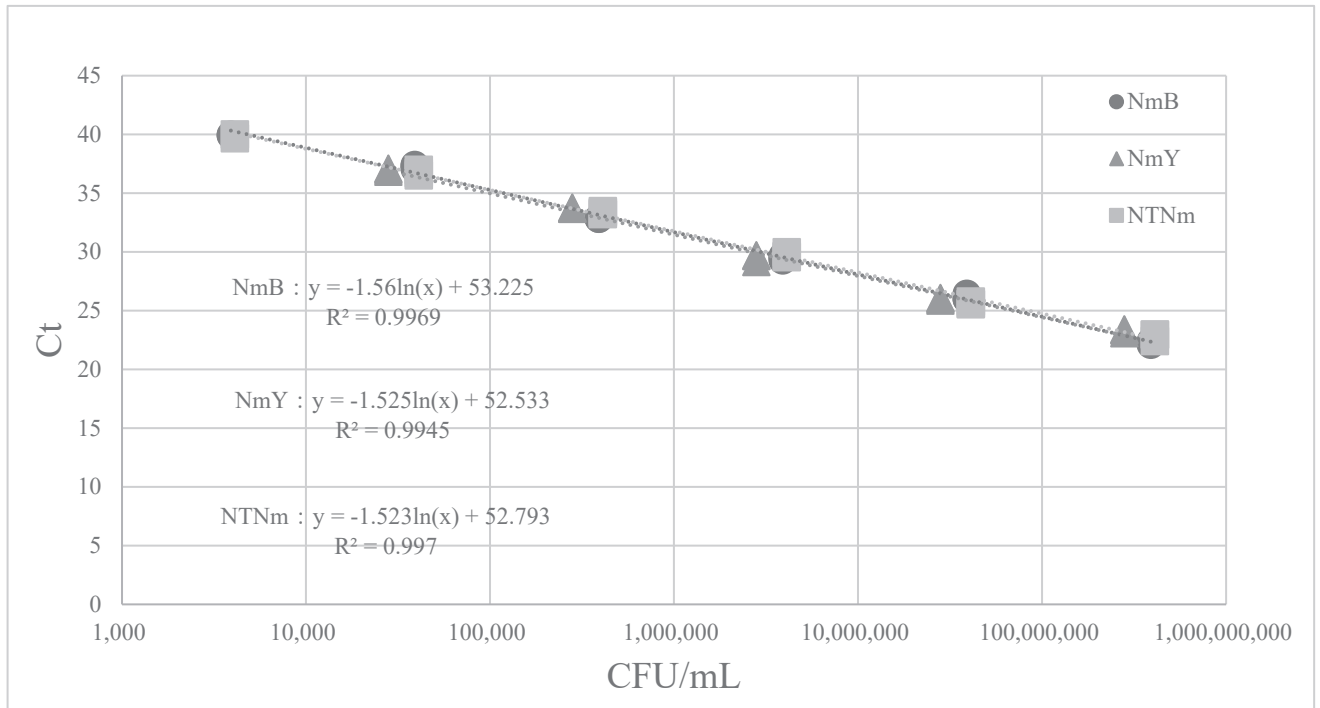


図2. リアルタイム PCR 検出系における添加髄膜炎菌数 (CFU/mL) に対する Ct 値

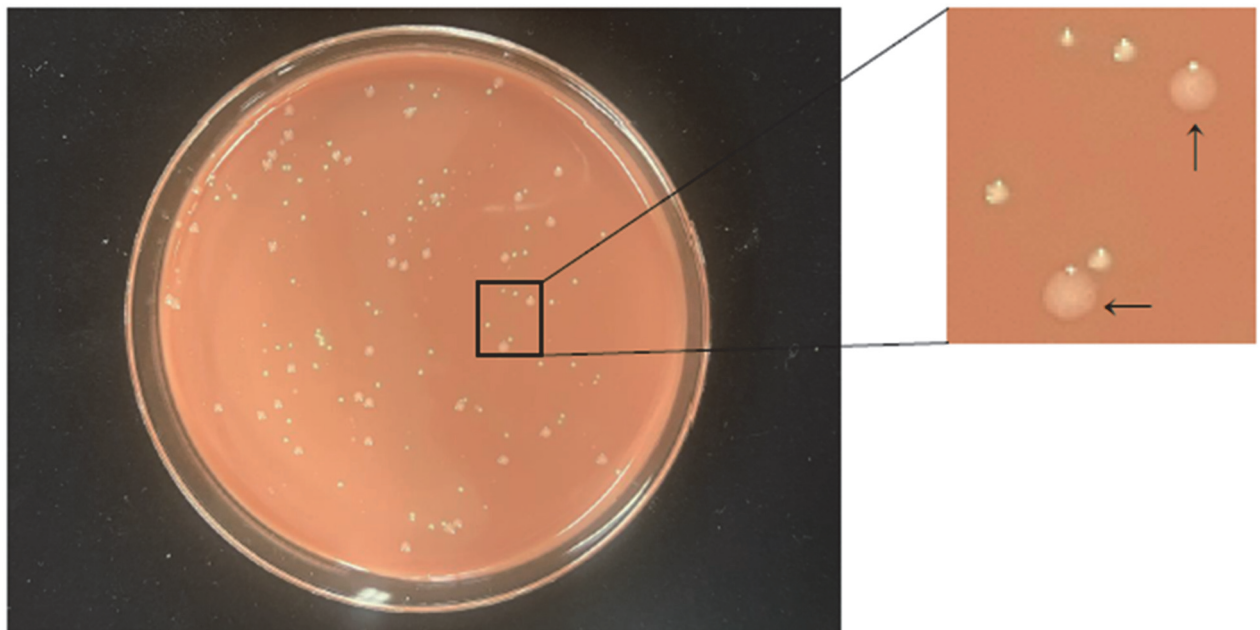


図3. セアーマーチン寒天培地に発育する髄膜炎菌様コロニー (矢印)

膜炎菌浮遊液を供試した既報⁴⁾と同じ条件で行っており、DNA抽出時の条件変更やDNA精製、PCRの条件変更など検出感度を高めるための検討の余地は十分にあると考えられた。また、培養法は判定までに18~24時間程度要するが、リアルタイムPCRでは判定まで4~6時間程度で済み、多くの検体を一度に検査できる。そのため、WHO法によるリアルタイムPCR検出系は、迅速性に優れスクリーニングに適していることから、感染拡大防止の必要性が強く求められる集団感染例や感染者の早急な治療を行う必要のある

事例などでは有用と思われる。また、WHO法によるリアルタイムPCR検出系は髄膜炎菌の血清群型別は困難で、特に接触者検査や感染経路の特定では、血清群型別などの情報も必要になる。そのため、スクリーニング検査と併用して培養法も実施し、培養法で得られた菌株については、随時詳細な検査を実施する運用が望ましいと考えられる。

本研究のLimitationとしてスクリーニング検査の検体として、うがい液が最適であるかの検討を行っていないことが挙げられる。うがい液は、うがいの仕方により検体回

表1. セアーマーチン寒天培地で発育した髄膜炎菌様コロニー数

疑似検体 (NmB)	Nm-B1	Nm-B2	Nm-B3	Nm-B4	Nm-B5	Nm-B6	Nm-B7
添加菌数 (CFU/mL)	3.9×10^8	3.9×10^7	3.9×10^6	3.9×10^5	3.9×10^4	3.9×10^3	3.9×10^2
髄膜炎菌様コロニー数	+++	+++	+++	+++	+++	++	5
疑似検体 (NmY)	Nm-Y1	Nm-Y2	Nm-Y3	Nm-Y4	Nm-Y5	Nm-Y6	Nm-Y7
添加菌数 (CFU/mL)	2.8×10^8	2.8×10^7	2.8×10^6	2.8×10^5	2.8×10^4	2.8×10^3	2.8×10^2
髄膜炎菌様コロニー数	+++	+++	+++	+++	++	+	3
疑似検体 (NTNm)	Nm-NT1	Nm-NT2	Nm-NT3	Nm-NT4	Nm-NT5	Nm-NT6	Nm-NT7
添加菌数 (CFU/mL)	4.1×10^8	4.1×10^7	4.1×10^6	4.1×10^5	4.1×10^4	4.1×10^3	4.1×10^2
髄膜炎菌様コロニー数	+++	+++	+++	+++	+++	++	3
陰性対照	うがい液						
添加菌数 (CFU/mL)							
髄膜炎菌様コロニー数	検出せず						

+: 10~29 個, ++: 30~100 個, +++: 101 個以上

収率が大きく変動することが予想され、陽性者を見逃す可能性がある。加えて、同属菌である淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) では咽頭スワブの方がうがい液よりも検出感度が高いことも報告されている⁶⁾。うがい液をスクリーニング検査の検体として用いるためには、検出系の検討だけでなく、うがい液検体の採取方法および咽頭ぬぐいとの感度の比較を実施する必要がある。一方で、うがい液検体は採取が簡便であり、短時間で大量に採取を行えるなどの利点も多く、保健所職員などの普段医療機関に勤務していない職員でも採取可能であることからスクリーニング検査の検体としてうがい液を利用できるように条件を検討していく。

ま と め

既報で確立したリアルタイムPCRを用いた髄膜炎菌検出系は、うがい液検体に対しても98,425から118,523 CFU/mL程度含まれていれば検出可能であった。しかしながら、検出感度の点で従来からの培養法と比較して約500倍低いことから、検出系と検体採取法の条件検討を行い検出感度の向上と培養法と併用することで髄膜炎菌感染症の迅速検査に応用できることが示唆された。

文 献

- 厚生労働省：侵襲性髄膜炎菌感染症，
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000137555_00002.html (2024 年 7 月 5 日現在. なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)
- 国立保健医療科学院：バイオテロ対応ホームページ，
<https://www.niph.go.jp/h-crisis/bt/other/38detail/> (2024 年 7 月 5 日現在. なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)
- 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> (2024 年 7 月 5 日現在. なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)

- 有吉 司，久保田寛顕，内谷友美，他：東京健安セ年報，**69**, 55–59, 2018.
- Takahashi, H., Haga, M., Sunagawa, T., *et al.*: *J Infect Chemother.*, **22**, 501–504, 2016.
- Papp, J.R., Ahrens, K., Phillips, C., *et al.*: *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **59**, 259–64, 2007.

Application of Real-Time PCR for the detection *Neisseria meningitidis* to gargle lavage specimensTsukasa ARIYOSHI^a, Yumi UCHITANI^a, Rumi OKUNO^a, Isao YOSHIDA^a,Jun SUZUKI^a, and Kenji SADAMASU^a(Reviewed by Hideyuki TAKAHASHI^b)

Invasive meningococcal diseases (IMDs) are infectious diseases caused by *Neisseria meningitidis*, and some cases have serious outcomes. Since this infection has been reported in outbreaks and can rapidly worsen, rapid detection is required. In this study, the detection sensitivity of *N. meningitidis* was measured using Real-Time PCR according to the World Health Organization (WHO) laboratory manual using pseudo-gargle lavage specimens in the concentration of 10^2 – 10^8 CFU/mL prepared with three purely cultured *N. meningitidis* strains, and whether the WHO method could be applied to a rapid detection for real patients was verified.

If pseudo-gargle lavage specimens contain *N. meningitidis* at 98,425 to 118,523 CFU/mL, they could be detected by Real-Time PCR; however, the detection limit was inferior to that of the culture method using the Thayer–Martin medium. However, the method should be developed further to improve the detection limit, such as DNA extraction and modification of PCR conditions, indicating that the WHO Real-Time PCR detection system can be applied for a rapid detection of real patients suffering from IMD when combined with the culture method.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, Real-Time PCR, gargle lavage specimens, detection limit

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

^b National Institute of Infectious Disease