

## 短 報

Gen-Probe<sup>®</sup> による *Mycobacterium avium*-  
*intracellulare* Complex の鑑別・同定

斎 藤 肇・富岡治明・佐藤勝昌

島根医科大学微生物・免疫学教室

浅野健治・楠 伸治

小林製薬(株)中央研究所開発室研究部

受付 昭和62年10月12日

USEFULNESS OF GEN-PROBE<sup>®</sup> FOR IDENTIFICATION AND  
CLASSIFICATION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEXHajime SAITO\*, Haruaki TOMIOKA, Katsumasa SATO,  
Kenji ASANO and Shinji KUSUNOKI

(Received for publication October 12, 1987)

A newly developed DNA probe for *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* (Gen-Probe<sup>®</sup>; Gen-Probe Corp., San Diego, Calif. U. S. A.) was evaluated for its applicability for identification and classification of *M. avium* complex (MAC), using reference strains of serovars 1 to 28. The DNA probe for *M. avium* was found to hybridize to ribosomal RNA of MAC belonging to serovars 1~6, 8~11, and 21, showing the % hybridization values of 33.7 to 43.3%. On the other hand, the DNA probe for *M. intracellulare* hybridized to the MAC belonging to serovars 7, 12~20, and 25 at the level of 30.3 to 35.9%. The organisms of MAC belonging to serovars 22~24 and 26~28 failed to bind any of the two DNA probes at the % hybridization rate greater than 10%, which is a borderline for positivity of specific hybridization. Therefore, on the basis of the extent of specific hybridization with the Gen-Probe<sup>®</sup>, MAC is thought to be divided into three groups; the organisms belonging to *M. avium* (serovars, 1~6, 8~11 and 21), those belonging to *M. intracellulare* (serovars, 7, 12~20 and 25), and those differentiated from the above two species. The Gen-Probe Diagnostic System for MAC using the DNA probes was confirmed to be very useful from the viewpoints of accuracy and reproducibility of the data and easiness and rapidness of the assay procedures.

**Key words** : *M. avium* complex, *M. avium*,  
*M. intracellulare*, DNA probe

**キーワード** : *M. avium* complex, *M. avium*,  
*M. intracellulare*, DNA プローブ

\* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo, Shimane 693 Japan.

*Mycobacterium avium* と *M. intracellulare* とは極めて近似した諸性状を示し、明確に鑑別することは一般的に困難とされ、一括して *M. avium* (*M. avium*–*M. intracellulare*) complex (MAC) とよばれているが、一方、トリ、ウサギに対する virulence や 45°C での発育、アリルスルファターゼ (14 日法)、亜硝酸還元能などの生物学的性状、交差ツベルクリン皮内反応や抗原構造 (血清型) のような免疫血清学的性状により、ある程度の鑑別が可能であるといわれている<sup>1)–5)</sup>。これらのうち、血清型については *M. avium* は 3 型 (1–3)、*M. intracellulare* は 25 型 (4–28) に型別されている<sup>6)7)</sup> が、最近 Baess<sup>8)</sup> は DNA : DNA hybridization 試験成績より *M. intracellulare* 血清型 4, 5, 6 及び 8 の菌株は実は *M. avium* であり、血清型 9 の菌株はいずれの菌種に所属するか明らかでないとい述べ、また Magnusson は sensitin 試験<sup>9)</sup> でこれとよく一致した成績を得たという。

最近、米国において *M. avium* 並びに *M. intracellulare* の各々よりの ribosomal RNA に特異的な <sup>125</sup>I- 標識単鎖 DNA probe を利用した MAC 迅速同定キット (Gen Probe<sup>®</sup>, Gen Probe 社, San Diego, USA)<sup>10)</sup> が市販されるようになった。本法は MAC の同定上極めて有用かつ簡便な方法とされており<sup>10)11)</sup>、我々もこれを入手し、若干の検討を行う機会を得たので以下紹介したい。

供試菌株は MAC 1–28 の血清型別標準菌株 28 株 (A. Y. Tsang, National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine, USA より受領) の他に *M. tuberculosis* H<sub>37</sub> Rv 株, *M. nonchromogenicum* ATCC 19530 株, *M. triviale* ATCC 23292 株, *M. terrae* ATCC 15755 株及び *M. fortuitum* ATCC 6841 株の 1% 小川培地上 37°C, 3–4 週間培養菌を用いた。DNA probe 試験は MAC 迅速同定用 Gen-Probe<sup>®</sup> を用いて概略次のようにして行った。即ち, Mc Farland 硫酸バリウム標準液 No.1 の濃度に調整した蒸留水菌浮液 100 μl を “Bacterial lysing reagent” (ガラス玉と lysing agent よりなる) に添加 → 70°C, 15 分間超音波処理 → <sup>125</sup>I- 標識 *M. avium* あるいは *M. intracellulare* “DNA probe solution” 1 ml を添加・混和 → 72°C, 60 分静置 → “Separation Suspension” (0.02% NaN<sub>3</sub> 含有緩衝液浮遊 hydroxy apatite) 4 ml 添加・攪拌 → 恒温槽中 72°C, 5 分静置 → 再度攪拌 → 1,500 × g, 2 分遠心分離 → 沈渣を “Wash solution” (0.02% NaN<sub>3</sub> 含有緩衝液) 4 ml に浮遊 → Voltex mixer で 20 秒振盪・攪拌 → 1,500 × g, 2 分遠心分離 → 沈渣中の放射活性を Gamma counter で 1 分間計測 → % hybridization を算出。

## % Hybridization

$$= \frac{\text{Sample cpm} - \text{Background cpm}}{\text{Total cpm} - \text{Background cpm}} \times 100$$

Sample cpm : 上述の沈渣の cpm

Total cpm : DNA probe 液 100 μl 1 分間の cpm × 10  
(≥ 10,000 cpm の DNA probe 液を用いる)

Background cpm : gamma tube の cpm

Table は MAC 28 株並びに対照菌 5 株について得られた成績を一括示したものである。これから分かるように、*M. avium*–DNA probe を用いた場合には、*M. avium* 血清型 1–3 並びに *M. intracellulare* 血清型 4–6, 8–11, 21 の菌株では 33.7–43.3% の陽性判定値 (10%) 以上の hybridization がみられたのに対して、血清型 22–24, 28 の菌株では 5.2–7.2% の低い値が、また血清型 7, 12–20, 26–27 の菌株では 0.5–2.8% のより低い値が得られた。他方、*M. intracellulare*–DNA probe を用いた場合には、*M. intracellulare* 血清型 7, 12–20 及び 25 の菌株では 30.3–35.8% の hybridization がみられたのに対して、血清型 1–6, 8–11, 21–24, 26–28 の菌株では 0.7–1.8% の著しく低い hybridization がみられたに過ぎなかった。なお対照として供試した MAC 以外の nonphotochromogenic な抗酸菌菌株では、*M. avium* 並びに *M. intracellulare* のいずれの DNA probe との間の hybridization も陰性値 (0.6–1.1%) を示した。

以上の成績から、DNA probe との hybridization を指標とした場合には、*M. avium* 血清型 1–3 並びに *M. intracellulare* 血清型 4–6, 8–11 及び 21 の菌株は *M. avium* に、また *M. intracellulare* 血清型 7, 12–20 及び 25 の菌株は *M. intracellulare* と判定された。ところで 22–24 及び 28 血清型別標準菌株では *M. intracellulare*–DNA probe とは殆ど hybridization がみられなかったのに対して、*M. avium*–DNA probe との間では陽性判定値以下であったが、通常の陰性値に比べるとやや高い hybridization (5.2–7.2%) がみられた。従って、これらの菌株では ribosomal RNA 上に *M. avium*–DNA probe との間に不完全ながらも若干の相同性を有する塩基配列が存在するものように思われる。これに対して、血清型 26 及び 27 の両菌株では *M. avium* 及び *M. intracellulare* のいずれの DNA probe との間の hybridization 値も極めて低く (0.5–0.9%), かつこれら菌株は明らかな scotochromogenic な集落色調を有し、果たして MAC であるか否かは再度検討を要するものと思われる。従って MAC の凝集反応による血清型別成績 (1–3 型は *M. avium*, 4–28 型は *M. intracellulare*)<sup>6)7)</sup> と、上述した DNA probe を用いて得られた同定成績 (血清型 1–6, 8–11, 21 は

Table Percent Hybridization of <sup>125</sup>I-labelled DNA Probes to Various Organisms of *M. avium* Complex

Organisms			% Hybridization of probe	
Species	Strain	Serovar*	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. avium</i> complex	11907-300	1	43.3	1.0
	6194	2 A	42.2	1.1
	128 Germany	3	39.2	0.9
	13528-1079	4 A	35.5	0.7
	4443-1237	5 B	35.8	0.8
	34540 Wales	6 B	33.7	0.7
	Manten 157	7 A	1.1	35.8
	SJB #2	8 B	40.9	0.8
	17584-286	9 A	42.2	1.1
	16020-1965	10 B	36.0	0.8
	14186-1424	11 B	41.7	1.1
	P 42	12 B	2.8	35.6
	Chance	13 A	1.0	33.5
	P 39	14 B	1.8	35.9
	Dent	15 A	1.1	31.1
	ATCC 15987	16 B	1.5	34.0
	P 54	17 A	0.9	30.3
	4990 O' Connor	18	1.2	32.5
	WS 52	19 B	1.7	34.9
	TMC 1419	20	1.0	32.5
	2993	21 A	36.6	1.0
	5154	22 A	5.3	1.6
	23393	23 B	6.9	1.6
	12645	24 A	5.2	1.8
	CDC 1195	25 B	0.7	32.8
	Mackenzie 2233	26 B	0.5	0.9
	Harrison	27 A	0.5	0.9
	9055 Matthews	28 B	7.2	1.2
<i>M. tuberculosis</i>	H <sub>37</sub> Rv		0.7	0.8
<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC 19530		0.6	0.9
<i>M. terrae</i>	ATCC 15755		1.0	0.9
<i>M. triviale</i>	ATCC 23292		0.6	1.1
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 6841		1.1	1.0

\* Refer to reference 7.

*M. avium*, 血清型 7, 12~20, 25 は *M. intracellulare* 血清型 22~24, 26~28 は同定不能) とは必ずしも一致しないことになる。今回得られた我々の成績は Baess<sup>8)</sup> の DNA : DNA hybridization によって得られた——未だ部分的成績ではあるが——血清型 4~6 及び 8 の菌株は *M. intracellulare* ではなく *M. avium* とする所見と軌を一にするものである。また最近の G. P. Kubica 博士 (Centers for Disease Control, USA) の私信によれば, MAC は gene probe 試験, DNA :

DNA hybridization, glycolipid の高速液体クロマトグラフィーでの流出パターンの分析成績より血清型 1~6, 8~11 の菌株は *M. avium*, 7, 12~19 の菌株は *M. intracellulare*, 血清型 22~28 の菌株はそれらのいずれの菌種か未だ明らかではないが, 血清型 20 及び, あるいは 21 は gene probe 試験成績より *M. avium* のように思われるという。

Drakes ら<sup>10)</sup> 及び Kiehr, Edwards<sup>11)</sup> は Gen-Probe<sup>®</sup> を用いた MAC 迅速同定法はその特異性が高

い上に操作も極めて簡便・迅速であり、菌液の調製から放射活性の測定まで2時間で完了すると述べ、我々の僅かな経験からしてもその感を深めることができた。また本同定法は再現性にも優れているといわれ、我々の検討でも実験日を異にしての測定での S. E. M. は 0.8~2% と極めて低いことが確認された。従って、本同定法は MAC 感染症の迅速な細菌学的診断を行う上に極めて有用な方法となるであろうと思われる。今後 gene probe により同定された *M. avium* と *M. intracellulare* 間の生物学的・生化学的諸性状や実験動物に対する virulence の比較など興味ある検討を要する多くの問題点が残されており、これらについて現在検討中である。

### 文 献

- 1) Wayne, L. G. and Kubica, G. P. : The mycobacteria, In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt et al. (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (vol. 2), Williams and Wilkins, p.1448, 1986.
- 2) Wayne, L. G. : Mycobacterial speciation, In G. P. Kubica and L. G. Wayne (ed.), *The Mycobacteria* (Part A), Marcel Dekker, p.25, 1984.
- 3) Runyon, E. H. : *Mycobacterium intracellulare*, *Am Rev Respir Dis*, 95 : 861, 1967.
- 4) 斎藤 肇 : いわゆる非定型抗酸菌をめぐる諸問題について, *広島医学*, 20 : 335, 1967.
- 5) 斎藤 肇 : 抗酸菌の分類, *日本結核病学会 50 周年記念号*, 41, 1975.
- 6) Schaefer, W. B. : Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination, *Am Rev Respir Dis*, 92 (Suppl.), 85, 1965.
- 7) Good, R. C. and Beam, R. E. : Seroagglutination, In G. P. Kubica and L. G. Wayne (ed.), *The Mycobacteria* (Part A), Marcel Dekker, p.105, 1984.
- 8) Baess, I. : Deoxyribonucleic acid relationship between different serovars of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*, *Acta Pathol Microbiol Scand, Sect B*, 91 : 201, 1983.
- 9) Magnusson, M. : Mycobacterial sensitins—Where are we now ? *Rev Infect Dis*, 3 : 944, 1981.
- 10) Drakes, T. A., Hindler, J. A., Berlin, O. G. W. and Bruckner, D. A. : Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in cultures using DNA probes, *J Clin Microbiol*, 25 : 1442, 1987.
- 11) Kiehr, T. E. and Edwards, F. F. : Rapid identification using a specific DNA probe of *Mycobacterium avium* complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome, *J Clin Microbiol*, 25 : 1551, 1987.