

原 著

*Mycobacterium avium* Complex 並びに  
*Mycobacterium tuberculosis* Complex  
 のDNAプローブテストにおける実験条件の検討

富岡 治明・佐藤 勝昌・斎藤 肇

島根医科大学微生物・免疫学教室

田坂 博信

広島大学医学部細菌学教室

井上 圭太郎

国立療養所広島病院

受付 平成2年7月30日

STUDY OF DETAILED CONDITIONS IN DNA PROBE TEST BY USE OF  
 GEN-PROBE RAPID DIAGNOSTIC SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF  
 MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX AND MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS  
 COMPLEX

Haruaki TOMIOKA\*, Katsumasa SATO, Hajime SAITO  
 Hiromichi TAsAKA and Keitarou INOUE

(Received for publication July 30, 1990)

In order to improve feasibility of technical procedures in Gen Probe<sup>®</sup> Rapid Diagnostic System (Gen Probe Inc., San Diego, CA, U.S.A.) for identification of *Mycobacterium avium* complex (MAC) and *M. tuberculosis* complex (MTC), we studied several test conditions in the DNA probe testing, such as stability of test bacterial suspension, optimal duration of bacterial cultivation, the number of organisms in test bacterial suspension required for accurate determination, and so on. With respect to concentration of organisms (MAC and MTC) in test bacterial suspension (0.1ml), we found that 5-fold dilution as well as 5-fold condensation of the standard bacterial suspension (McFarland No.1) gave substantially the same result as in the case where bacterial suspension at the standard concentration was used. This indicates that the test bacterial suspensions (0.1ml) containing either  $1.5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$  of MAC or  $3 \times 10^5 \sim 8 \times 10^6$  of MTC are available for the DNA probe testing. Test bacterial suspension at McFarland No.1 prepared from fresh cultures (3~4 week-old) could be stored either at -80, -20 or 4°C at least for 17 weeks without significant loss of reactivity to *M. avium*, *M. intracellulare* and MTC DNA probes. In this case, stability of DNA probe-reactivity was preserved in the following order: MTC, *M. avium* and *M. intracellulare*. Concerning the age of bacterial cultures, at least 16-week-old cultures of MAC and MTC after initial

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

appearance of cell growth on 1% Ogawa's egg media were sufficiently reactive to either MAC or MTC DNA probe. In this case, MTC showed most stable reactivity during the course of long-term cultivation. DNA probe-reactivity of MAC was not affected in the presence of *M. tuberculosis* even at 20% contamination ratio. Similarly, no reduction was found in the DNA probe-reactivity of *M. tuberculosis* samples which were contaminated with either *M. avium* or *M. intracellulare* even at the same contamination ratio.

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

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

## はじめに

最近, *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) 並びに *M. avium* complex (MAC) の各々よりの ribosomal RNA に相補的な特異<sup>125</sup>I-標識 DNA プローブを利用したこれら抗酸菌の迅速同定キット (Gen Probe<sup>®</sup> Rapid Diagnostic System) が米国の Gen Probe 社より市販され, わが国でも近く入手可能となるようである。最近の米国における研究では, 本法は MAC あるいは MTC の同定上極めて有用, かつ簡便な方法であることが報告されている<sup>1)2)</sup>。われわれも, いち早く MAC Gen Probe キットを研究用に入手する機会を得, それによる MAC 血清型菌の同定<sup>3)4)</sup>, 本邦分離の MAC 菌株の疫学<sup>4)</sup>, ならびに MAC の血清型あるいは若干の生物学的・生化学的活性と DNA プローブによる同定成績との関連性<sup>4)~7)</sup> などについて報告してきた。今回は, 本キットを用いた MTC および MAC 同定にあたっての使用条件について若干の検討を加えたので以下報告する。

## 材料と方法

### (1) 供試菌株

教室保存の *M. avium* 6194 株 (血清型 2), *M. intracellulare* Yandle 株 (血清型 16), *M. tuberculosis* H<sub>3</sub>Rv 株, 同目次株, *M. bovis* D-4 株, *M. africanum* TC 3 株並びに国立療養所広島病院での患者由来の MAC (8 株) および *M. tuberculosis* (28 株) の新鮮分離株を供試した。

### (2) DNA プローブテスト

MAC 並びに MTC 各特異 Gen Probe 迅速同定キットに添付の標準マニュアルに記載された方法に準じて行った。すなわち, 各供試菌株の 1% 小川培地上 37°C, 通常 3~4 週間培養菌を 3 mm 径のガラスビーズを用いて蒸留水に分散させ, 特記せぬ限り McFarland No. 1 の濃度の菌液を調製し, その 0.1 ml を “Bacterial Lysing Reagent” (ガラスビーズと lysing agent よりなる)

に加え, sonicator bath 中 55~59°C, 15 分間, 超音波処理して ribosomal RNA を抽出した。これに *M. avium*, *M. intracellulare* または MTC 各特異 “DNA Probe Solution” の 1 ml を加え, 72°C, 60 分間静置しプローブ DNA と ribosomal RNA との hybridization を行った。これに “Separation Suspension” (0.02% NaN<sub>3</sub> 並びに hydroxyapatite 含有緩衝液) 4 ml を添加, 攪拌し, さらに 72°C, 5 分間保温後再び攪拌し, 3,000rpm, 3 分間遠心した。そして, 得られた沈渣に “Wash Solution” (0.02% NaN<sub>3</sub> 含有緩衝液) の 4 ml を加え攪拌, 懸濁後, 再度遠心し, 得られた沈渣中の放射活性を Gamma counter で計測し, % hybridization 値 (陽性値; ≥10%) を下記の方法で算出した。

$$\% \text{ Hybridization} = \left[ \frac{\text{Sample counts/min} - \text{Background counts/min}}{\text{Total counts/min} - \text{Background counts/min}} \right] \times 100.$$

## 結果

### (1) 供試菌液濃度の検討

Gen Probe 迅速同定キットのマニュアルでは, 供試菌液濃度は McFarland No. 1 (OD<sub>540nm</sub> ≒ 0.5, すなわち MAC では 9 × 10<sup>8</sup> CFU/ml, MTC では 1.5 × 10<sup>7</sup> /ml に相当) と定められているが, 今回のわれわれの検討では Table 1 に示したように, MAC あるいは MTC のいずれにおいても, McFarland No. 1 の 1/5 ~ 5 倍の濃度範囲内 (MAC, 1.5 × 10<sup>8</sup> ~ 5 × 10<sup>9</sup> /ml, MTC, 3 × 10<sup>6</sup> ~ 8 × 10<sup>7</sup> /ml) において, 標準菌液濃度におけるのと大差のない % hybridization 値が得られることが分かった。

### (2) 供試菌液の保存条件

供試菌液の保存条件を知る目的で, MAC あるいは MTC の標準濃度の菌液を -80°, -20° および 4°C に 17 週間にわたって保存し, その間, 各 DNA プローブとの反応性の推移を追跡した (Table 2)。その結果, いずれの温度下での保存でも 8 週目以降では明らかに %

Table 1. Effect of Concentration of Test Bacterial Suspension on % Hybridization Value

Strain	Concentration of bacterial suspension (OD <sub>540nm</sub> ) <sup>a)</sup>	% Hybridization		
		<i>M. avium</i>	Probe <i>M. intracellulare</i>	MTC
<i>M. avium</i> 6194	0.1	30.5	1.8	— <sup>b)</sup>
	0.25	25.1	2.5	—
	0.5	33.3	1.4	—
	1.0	26.2	1.2	—
	2.5	50.2	1.2	—
<i>M. intracellulare</i> Yandle	0.1	2.2	25.6	—
	0.25	1.2	20.2	—
	0.5	1.0	17.4	—
	1.0	0.8	34.8	—
	2.5	1.0	39.7	—
<i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv	0.1	—	—	32.2
	0.25	—	—	35.0
	0.5	—	—	35.2
	1.0	—	—	32.2
	2.5	—	—	35.7
<i>M. bovis</i> D-4	0.1	—	—	35.0
	0.25	—	—	37.5
	0.5	—	—	38.8
	1.0	—	—	33.6
	2.5	—	—	38.2

a) OD<sub>540nm</sub> = 0.5 corresponds to McFarland No. 1 (MAC,  $9 \times 10^8$  CFU/ml; MTC,  $1.5 \times 10^7$  CFU/ml).

b) Not tested.

hybridization 値の低下がみられたが、MAC および MTC の供試菌株はいずれの保存温度においても17週間は少なくとも18%以上の % hybridization 値 (陽性値) を示した。また、MTC (*M. tuberculosis*, *M. bovis* および *M. africanum*) は保存期間中極めて安定した反応性を保持しうること、他方、MAC では MTC に比べるとやや保存性が劣り、特に *M. intracellulare* ではその傾向がより強いことが明らかになった。なお保存温度については、-80℃が-20℃および4℃におけるよりも多少保存性が勝っているものようであった。

### (3) 供試菌の培養期間

1%小川培地上に30個以下の集落形成がみられるように MAC あるいは MTC を画線培養し、肉眼的集落初発 (培養後2~3週) 後16週間にわたって培養を続け、その間、経時的に集落をかき取って菌液を調製し、各特異 DNA プローブに対する反応性を検討した (Table 3)。その結果、MAC 並びに MTC のいずれにおいても培養時間が長くなるにつれて、% hybridization 値がやや低下する傾向があるようにみうけられたが、同定成績に

誤りを来すほどのものではなかった。しかし、*M. intracellulare* Yandle 株並びに *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 株では集落初発後12~16週菌では、やや顕著な % hybridization 値の低下がみられた。このことからすれば、実際の同定試験には集落初発後8週以内の培養菌を用いることが望ましいものように思われる。

次に、国立療養所広島病院の臨床検査室で実際の同定試験に用いた3~8週培養の MAC 並びに MTC 菌株の DNA プローブテストによる同定成績を Table 4 に示した。これから分かるように本法による同定は、生物学的・生化学的性状によるものとの100%の specificity と sensitivity をもって正確に行うことが分かった。なお、この検討に用いた MAC 並びに MTC 菌株の各特異 DNA プローブに対する % hybridization 値は、各々 31.7~47.2% 並びに 25.7~37.8% であった。

(4) MAC・MTC 混合菌液の各特異 DNA プローブに対する反応性

MAC 並びに MTC の McFarland No. 1 の菌液の各々に MTC あるいは MAC が少量混在する菌液の各特異

Table 2. Change in Reactivity of MAC and MTC to DNA Probes during Long-term Storage

Strain	Temperature	DNA probe	% Hybridization <sup>a)</sup>					
			Weeks of storage					
			0	1	2	4	8	17
<i>M. avium</i> 6194	4	<i>M. avium</i>	41.7	59.8	55.6	48.4	32.7	25.0
	-20	<i>M. avium</i>		55.4	49.3	38.8	33.4	39.8
	-80	<i>M. avium</i>		31.8	28.1	48.7	33.4	35.1
<i>M. intracellulare</i> Yandle	4	<i>M. intra</i> <sup>b)</sup>	39.1	45.3	24.5	21.9	20.2	18.9
	-20	<i>M. intra</i>		29.8	30.2	27.0	24.5	29.6
	-80	<i>M. intra</i>		43.1	33.0	30.0	18.0	26.0
<i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> RV	4	MTC	46.1	44.2	40.1	40.3	31.7	38.3
	-20	MTC		44.0	37.5	40.2	33.3	41.4
	-80	MTC		43.9	40.1	44.3	34.4	43.6
<i>M. tuberculosis</i> Metsugi	4	MTC	47.1	42.0	37.6	40.1	31.5	34.7
	-20	MTC		44.4	41.8	40.3	31.9	38.2
	-80	MTC		42.1	38.4	40.6	36.5	46.1
<i>M. bovis</i> D-4	4	MTC	48.2	43.5	39.5	42.7	35.9	30.1
	-20	MTC		44.5	40.4	41.3	35.0	38.7
	-80	MTC		44.7	41.5	43.1	35.6	43.0
<i>M. africanum</i> TC 3	4	MTC	39.9	38.6	30.2	33.7	22.1	28.8
	-20	MTC		35.1	31.9	34.9	26.1	37.3
	-80	MTC		34.4	32.3	34.9	32.4	33.1

a) % Hybridization of *M. avium* 6194 to *M. intracellulare* probe and that of *M. intracellulare* Yandle to *M. avium* probe was lower than 3.8% throughout the experiment.

b) *M. intracellulare*.

DNA プローブに対する反応性をみた。その結果は Table 5 に示すように、MAC 並びに MTC のいずれの菌株の各特異 DNA プローブに対する反応性とも、1/10,000~1/5 量の MTC あるいは MAC の混在によっては何ら見るべき影響は受けないことが分かった。なお、混合菌液中の混在菌の特異 DNA プローブに対する反応性をみたところ、*M. avium*、*M. intracellulare* 並びに *M. tuberculosis* の各  $2 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7$  および  $2 \times 10^6$  の菌が混在した場合に陽性として検出された。

#### (5) Hybridization の温度

本同定キットのマニュアルでは hybridization の温度は 72°C とされているが、68°C ではなかならず *M. intracellulare* の DNA プローブとの反応性が高まるといわれている (阿部千代治; 私信) が、今回のわれわれの検討では、Table 6 に示すように *M. avium* 6194 株、*M. intracellulare* Yandle 株とも各特異 DNA プローブとの反応性は 72°C と 68°C とは大きく異ならなかった。また、別途検討した生物学的・生化学的性状並びに  $\alpha$  抗原性より MAC と同定されたにもかかわらず *M. avium*、

*M. intracellulare* のいずれの DNA プローブとの反応性も低かった菌株 (患者分離株 2 株、自然界分離株 4 株) の % hybridization 値は、72°C あるいは 68°C の反応温度でも 3.1~16.8% (陰性ないし低度陽性) の範囲内にあることが分かった (Table 省略)。

#### 考 察

本論文は、臨床検査室での Gen Probe の迅速同定キットの実際の利用を念頭に置いての使用条件の詳細な検討を試みたものである。如上の成績からすれば、供試菌の培養日数、供試菌液の濃度、保存温度と保存期間あるいは hybridization の反応温度などの点で、本同定キットのマニュアルに記載されているよりもかなり幅広い条件下での使用が可能であるもののように思われる。例えば、本同定キットのマニュアルでは、供試菌液濃度は McFarland No. 1 (菌数にして MAC、 $1 \times 10^7$  CFU; MTC、 $1.5 \times 10^6$  CFU) と定められているが、実際にはこの 1/5 から 5 倍量というかなり幅広い範囲内での使用が可能であること、また供試菌液は 2~8°C、3 日

**Table 3.** Change in Reactivity of MAC and MTC to DNA Probes during the Course of Long-term Cultivation

Strain	Weeks after appearance of colonies on Ogawa's egg medium	% Hybridization		
		MTC	probe <i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. avium</i> 6194	0	— a)	27.2	1.1
	1	—	40.4	1.0
	2	—	32.6	1.9
	4	—	29.6	1.6
	8	—	40.0	1.4
	12	—	34.4	1.7
	16	—	38.0	1.4
<i>M. intracellulare</i> Yandle	0	—	1.3	23.7
	1	—	1.6	26.6
	2	—	1.1	21.3
	4	—	1.0	23.2
	8	—	1.0	22.8
	12	—	1.0	21.2
	16	—	1.1	11.1
<i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv	0	34.3	—	—
	1	41.2	—	—
	2	29.9	—	—
	4	24.4	—	—
	8	28.5	—	—
	12	15.3	—	—
	16	20.1	—	—
<i>M. tuberculosis</i> Metsugi	0	39.0	—	—
	1	38.3	—	—
	2	31.0	—	—
	4	31.9	—	—
	8	27.5	—	—
	12	27.0	—	—
	16	30.9	—	—

a) Not tested.

**Table 4.** Identification of MTC and MAC by DNA Probe Test Using 3 to 8 Weeks-old Cultures of Clinical Isolates a)

	Positive to MAC DNA probes		Negative to MAC DNA probes
	Probe <i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	
Positive to MTC DNA probe	0 b)	0	28
Negative to MTC DNA probe	3	5	0

a) Two or three cultures, each of which was isolated from the same patient (7 MTC and 2 MAC patients), gave the same result in the DNA probe test.

b) Number of strain which showed indicated results in the hybridization tests.

**Table 5.** Reactivity of MTC-MAC Mixtures to MTC and MAC DNA Probes

Test strain	Mixed suspension		% Hybridization		
			MTC	Probe	
	Organism	Ratio <sup>a)</sup>		<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. tuberculosis</i> Metsugi	<i>M. avium</i> 6194	0	26.0	0.9	— <sup>b)</sup>
		10 <sup>-4</sup>	30.4	0.7	—
		10 <sup>-3</sup>	31.3	1.0	—
		10 <sup>-2</sup>	26.5	1.6	—
		10 <sup>-1</sup>	30.0	7.6	—
		2 × 10 <sup>-1</sup>	28.9	17.0	—
<i>M. tuberculosis</i> Metsugi	<i>M. intracellulare</i> Yandle	0	23.7	—	1.2
		10 <sup>-4</sup>	29.7	—	1.1
		10 <sup>-3</sup>	30.2	—	1.5
		10 <sup>-2</sup>	29.3	—	2.9
		10 <sup>-1</sup>	24.1	—	16.9
		2 × 10 <sup>-1</sup>	28.4	—	12.0
<i>M. avium</i> 6194	<i>M. tuberculosis</i> Metsugi	0	1.1	39.2	—
		10 <sup>-4</sup>	1.7	41.7	—
		10 <sup>-3</sup>	1.9	35.6	—
		10 <sup>-2</sup>	11.3	39.9	—
		10 <sup>-1</sup>	21.4	37.2	—
		2 × 10 <sup>-1</sup>	21.1	37.2	—
<i>M. intracellulare</i> Yandle	<i>M. tuberculosis</i> Metsugi	0	1.6	—	22.4
		10 <sup>-4</sup>	1.0	—	14.1
		10 <sup>-3</sup>	1.4	—	26.0
		10 <sup>-2</sup>	4.5	—	12.4
		10 <sup>-1</sup>	20.3	—	24.5
		2 × 10 <sup>-1</sup>	22.9	—	19.6

a) (Volume of mixed suspension)/(volume of test bacterial suspension; McFarland No.1).  
Number of CFU bacterial suspension at McFarland No.1 was as follows; *M. tuberculosis* Metsugi, 1.5 × 10<sup>7</sup>/ml; *M. avium* 6194, 8.9 × 10<sup>8</sup>/ml, *M. intracellulare* Yandle, 8.7 × 10<sup>8</sup>/ml.  
b) Not tested.

**Table 6.** Reactivity of *M. avium* and *M. intracellulare* to DNA Probes at 68 and 72°C

Strain	% Hybridization			
	68°C		72°C	
	Probe <i>M. avium</i>	Probe <i>M. intracellulare</i>	Probe <i>M. avium</i>	Probe <i>M. intracellulare</i>
<i>M. avium</i> 6194	46.2	2.2	41.4	1.3
<i>M. intracellulare</i> Yandle	1.5	35.1	0.8	33.4

以内保存のものを使用するように指示されているが、今回の検討では $-80^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ の温度下17週保存菌を用いることが明らかになった。また、マニュアルでは集落の初発から1カ月以内の菌で、しかも可及的閏齡の若い菌の使用を規定しているが、われわれの検討では、集落の初発より8週間を経たものでも十分に供試しうること、また hybridization 温度についても、マニュアルでは $72+1^{\circ}\text{C}$ と定めているが、 $68^{\circ}\text{C}$ でも大差ない成績が得られることが分かった。

以上、Gen Probe 迅速同定キットは、実際の MAC および MTC の同定試験にあたってはその使用条件はかなり緩やかなものであって、臨床検査室での日常的な使用に適したものであろうと考えられる。しかしながら、微量とはいえ放射性物質が用いられているところに、一般の臨床検査室での利用には一定の制限があるが、すでに非放射性物質で標識された DNA プローブも開発されており、これも近くわが国での使用が可能となるようである。

#### 謝 辞

DNA プローブを分与頂いた中外製薬株式会社に深謝します。

#### 結 語

*Mycobacterium avium* complex (MAC) 並びに *M. tuberculosis* complex (MTC) に対して特異的な DNA プローブを利用した Gen Probe 迅速同定キットの測定条件を検討し、以下の知見を得た。

1) 供試菌液濃度は McFarland No. 1 (標準濃度) の  $1/5 \sim 5$  倍としても各特異 DNA プローブとの反応性には差はみられなかった。

2) 供試菌液を $-80^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ または $4^{\circ}\text{C}$ で保存した場合、少なくとも17週間にわたっては、各特異 DNA プローブに対する反応性に顕著な低下はみられなかった。

3) 小川培地上集落初発後8週以内の培養菌であれば、DNA プローブテストに供試可能であった。

4) MAC 並びに MTC の DNA プローブテストでは各々の供試菌液への MTC あるいは MAC の最大  $1/5$  量の混在では、判定に誤りを来すことはなかった。

5) Hybridization は  $68 \sim 72^{\circ}\text{C}$  の温度で実施可能であった。

#### 文 献

- 1) Drakes, T.A., Hindler, J.A., Berlin, O.G.W. et al. : Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in cultures using DNA probes, J Clin Microbiol, 25 : 1442-1445, 1987.
- 2) Kiehn, 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 : 1551-1552, 1987.
- 3) 斎藤 肇, 富岡治明, 佐藤勝昌他 : Gen Probe<sup>®</sup> による *Mycobacterium avium-intracellulare* complex の鑑別・同定, 結核, 63 : 261-264, 1988.
- 4) Saito, H., Tomioka, H., Sato, K. et al. : Identification and partial characterization of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by using DNA probes, J Clin Microbiol, 27 : 994-997, 1989.
- 5) Tomioka, H., Sato, K., Saito, H. et al. : Susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* to various antibacterial drugs, Microbiol Immunol, 33 : 509-514, 1989.
- 6) Saito, H., Tomioka, H., Sato, K. et al. : Identification of various serovars of *Mycobacterium avium* complex using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*, J Clin Microbiol, 28 : 1964-1967, 1990.
- 7) Tomioka, H., Saito, H., Sato, K., et al. : Arylsulfatase activity for differentiating *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. J Clin Microbiol, 28 : 2104-2106, 1990.