

原 著

諸種抗酸菌の *Mycobacterium tuberculosis* Complex,
Mycobacterium avium および *Mycobacterium intracellulare*
 各特異 DNA プローブ (Gen-Probe® Rapid
 Diagnostic System) に対する反応性

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

受付 平成2年8月30日

REACTIVITIES OF VARIOUS MYCOBACTERIA SPECIES AGAINST DNA
 PROBES (GEN-PROBE® RAPID DIAGNOSTIC SYSTEM) SPECIFIC TO
 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX, MYCOBACTERIUM
 AVIUM AND MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE

Haruaki TOMIOKA*, Katsumasa SATO, Hajime SAITO and Hiromichi TASAKA

(Received for publication August 30, 1990)

Various mycobacterial species (22 species, 178 strains) were studied for their reactivity to DNA probe specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), *M. avium* or *M. intracellulare*, using Gen-Probe® Rapid Diagnostic System (Gen-Probe Inc., San Diego, Calif., U.S.A.). All the MTC strains, including *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* and *M. microti* reacted with MTC-DNA probe at the % hybridization value of 42.8~51.9% (values higher than 10% are regarded as positive), but their reactivity to MAC-DNA probes (0.8~2.5%) was under the cut off value (10%). The test strains (28 strains) of *M. avium* complex (MAC) segregated into two groups on the basis of reactivity to DNA probes specific for *M. avium* and *M. intracellulare*, that is, one group (16 strains) positively reacted with *M. avium*-probe but not with *M. intracellulare*-probe, and the other group (12 strains) showed the converse reactivity. The two groups did not show a reactivity with MTC-probe higher than the cut off value. Nontuberculous mycobacteria other than MAC, including *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. asiaticum*, *M. scrofulaceum*, *M. goodii*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. gastri*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. fortuitum*, and *M. chelonae* (subsp. *abscessus* and *chelonae*) reacted with neither MTC- nor MAC-probe and values for % hybridization (0.6~3.6%) were lower than the cut off value. These findings indicate extremely superior specificity of the DNA probes

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

(Gen-Probe) for MTC, *M. avium* and *M. intracellulare*, thereby indicating the usefulness of Gen-Probe Rapid Diagnostic System for the MTC and MAC in clinical use.

Key words : *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis* complex, DNA probe, Gen-Probe[®] rapid diagnostic system

キーワード : *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis* complex, DNA プローブ, Gen-Probe[®] rapid diagnostic system

はじめに

ヒトの抗酸菌感染症の主要起因菌が *Mycobacterium tuberculosis* であることに変わりはないが、他方、近年、非結核性抗酸菌、なかでも *M. avium* complex (MAC) が注目されており、これらをより迅速かつ正確に同定し、もって治療方針を決定することが極めて重要である。現行の主として生物学的並びに生化学的性状検査による抗酸菌同定法は、多大の労力と熟練、さらにその診断までに長期間を要する。また、従来の性状検査法では *M. avium* と *M. intracellulare* の鑑別はまず不可能であり、したがって、これら両菌種を一括して MAC と同定せざるをえなかった。

最近、*M. avium*, *M. intracellulare* および *M. tuberculosis* complex (MTC) の各特異 DNA プローブが Gen-Probe 社 (San Diego, Calif., U.S.A.) より市販され、これを用いて極めて迅速かつ特異的に菌種の同定ができるとして、その有用性が高く評価されている¹⁾²⁾。われわれもいち早く本同定キットを入手する機会を得、なかんずく *M. avium* 並びに *M. intracellulare* の各 DNA プローブを用いて、その菌種同定上の有用性³⁾⁴⁾、MAC 血清型と MAC 菌種別との相関^{3)~5)}、MAC 菌種の分布相の疫学的研究手段としての有用性⁵⁾、さらには *M. avium* と *M. intracellulare* 両菌種の性状の違い⁶⁾⁷⁾ について報告してきた。今回は、諸種抗酸菌がこれら DNA プローブとの間にどの程度の反応性を示すかについて調べ、これら DNA プローブの菌種特異反応性について若干の検討を行ったので以下報告する。

材料と方法

(1) 供試菌

主として教室保存の業室株、*M. tuberculosis* 計 31 株、*M. africanum* 計 5 株、*M. bovis* 計 6 株、並びに MAC、*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. asiaticum*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. gastri*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*

subsp. *abscessus* および *M. chelonae* subsp. *abscessus* および *M. chelonae* subsp. *chelonae* 各 2 株。並びに *M. szulgai* および *M. malmoense* 各 1 株の総計 74 株と全国の国立療養所等より分与を受けた MAC 計 97 株並びに高橋宏博士 (国立予研) より分与を受けた *M. bovis* 計 5 株、*M. microti* および *M. africanum* 各 1 株をも供試した。

(2) DNA プローブテスト

Mycobacterium の迅速同定キット (Gen-Probe 社, San Diego, U.S.A.) に添付の手引きに記載された標準法に準じて行い、その概略は以下のようである。すなわち、各供試菌の 1% 小川培地上 37°C、3~4 週間培養菌をガラスビーズで分散させ、蒸留水で McFarland No. 1 の濃度に調製した菌液の 0.1ml を “Bacterial Lysing Reagent” (ガラスビーズと lysing agent よりなる) と混じ、55~59°C、15 分間、sonicator bath 中で超音波処理後、MAC または MTC の “DNA Probe Solution” の 1ml を加え、72°C、60 分間静置して hybridization を行った。次いで、“Separation Suspension” (0.02% Na₃N₃ 含有緩衝液中 hydroxyapatite 浮遊液) の 4ml を添加、攪拌し、72°C、5 分間保温後、再び攪拌、遠心 (3,000rpm、3 分) した。その沈渣に 4ml の “Wash Solution” (0.02% Na₃N₃ 含有緩衝液) を加え、攪拌後、遠心し、沈渣中の放射活性を Gamma counter で計測した。% hybridization 値 (陽性値; ≥10%) は次式より算定した。

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

結 果

(1) 結核菌群の MTC、*M. avium* および *M. intracellulare* 各特異 DNA プローブとの反応性

Table 1 に示すように、*M. tuberculosis* (3 株)、*M. africanum* (6 株)、*M. bovis* (11 株) および *M. microti* (1 株) の計 21 株の MTC では、MTC プローブとの間の反応は陽性 (% hybridization 値 42.8~51.5%) であったが、*M. avium* 並びに *M. intracellulare* の各プローブとの反応は全例陰性 (% hybri-

Table 1. Reactivities of MTC with DNA Probe Specific for MTC, *M. avium* or *M. intracellulare*

Species	Strain	% Hybridization		
		MTC	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. tuberculosis</i>	H ₃₇ Rv	51.5	1.2	1.9
	H ₃₇ Ra	49.4	1.3	1.5
	Aoyama B	48.4	1.4	2.2
<i>M. africanum</i>	TC 3	49.6	0.8	1.0
	TC 8	46.5	1.0	1.2
	TC 41	46.8	1.2	1.0
	TC 66	47.6	1.3	1.0
	TC 84	43.8	0.8	0.9
	Af 66	45.1	1.3	1.0
	<i>M. bovis</i>	Ravenel	49.1	1.5
	D-4	45.4	1.3	1.7
	Denken	45.3	1.3	1.5
	BCG	43.8	1.1	1.5
	Ushi 18	42.8	1.1	1.3
	Ushi 21	46.3	1.8	1.7
	Ushi 22	48.2	1.5	1.5
	Miwa	43.0	1.4	1.5
	B-10	46.6	1.2	1.0
	B-18	44.6	1.2	0.9
	B-30	45.2	0.9	0.9
<i>M. microti</i>	M-48	44.7	1.3	1.0

dization 値2.2%以下)であった。また、これらMTC菌株(*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*)のMTCプローブに対する反応性は互いに近似し、菌種間にさしたる差はみられなかった。同様な検討を患者分離の*M. tuberculosis*野生株計28株について行ってみたところ、全例がMTCプローブと反応(% hybridization 値44.2~51.9%)したが、*M. avium*あるいは*M. intracellulare*の各プローブとは反応しなかった(% hybridization 値0.9~2.5%)(Table 2)。

(2) MACのMTC, *M. avium*および*M. intracellulare*各特異DNAプローブとの反応性

Table 3に示すように、今回供試のMAC28菌株は*M. avium*あるいは*M. intracellulare*の各特異DNAプローブとの間に、それぞれ24.9~54.9%(16株)並びに31.7~42.0%(12株)の% hybridization 値を示し、それぞれ*M. avium*および*M. intracellulare*と同定されたが、MTCプローブとの反応性は全株陰性(% hybridization 値0.8~1.9%)であった。Table

Table 2. Reactivities of 28 Clinical Isolates of *M. tuberculosis* with DNA Probe Specific for MTC, *M. avium* or *M. intracellulare*

Probe	% Hybridization	
	Range	Mean
MTC	44.2-51.9	48.6
<i>M. avium</i>	0.9- 1.6	1.3
<i>M. intracellulare</i>	1.0- 2.5	1.5

4は臨床分離のMAC計71株について、*M. avium*および*M. intracellulare*各特異DNAプローブとの間の反応性をみたものである。供試MAC計71株中30株は*M. avium*に、41株は*M. intracellulare*に同定され、両プローブとの間に交差反応のみられた菌株はなかった。この場合、*M. avium*と*M. intracellulare*の各特異DNAプローブに対する% hybridization 値

Table 3. Reactivities of MAC with DNA Probe Specific for MTC, *M. avium* or *M. intracellulare*

Strain	% Hybridization		
	MTC	Probe <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i>	
HR-14	1.2	47.2	2.2
HR-30	1.1	43.8	1.8
KT- 6	1.0	51.6	1.9
KT- 8	1.0	50.4	3.4
KT-10	1.1	45.7	5.6
KT-13	1.0	47.7	4.2
KT-14	1.4	52.5	0.7
KT-21	1.0	24.9	1.6
KT-23	1.2	49.6	0.8
KT-28	1.1	54.5	0.8
KT-30	1.5	54.9	1.2
KT-37	1.3	51.9	1.0
KT-38	1.4	48.6	1.1
KT-39	1.2	50.5	1.0
KT-46	1.2	46.9	1.2
6194	1.7	41.2	1.0
HR-18	1.3	0.8	33.0
HR-20	1.4	0.8	32.9
HR-25	1.6	0.9	34.5
HR-31	1.9	1.0	36.5
HR-32	1.4	0.8	36.0
HR-35	1.3	0.7	31.7
KT- 9	1.1	1.8	39.5
KT-12	0.9	6.8	42.0
KT-26	0.8	9.6	32.8
KT-48	1.3	2.7	33.7
KT-50	1.3	4.7	37.3
Yandle	1.0	0.8	34.4

は前者では45.7~60.2%, 平均52.9%, 後者では34.6~52.3%, 平均44.1%であり, Enns⁸⁾の報告値(*M. avium*, 17~61%, 平均44%; *M. intracellulare*, 16~63%, 平均41%)と大差のないものであった。また, 今回供試した限りの菌株内には MAC, MTC とも Sherman⁹⁾の指摘したような疑陽性反応(% hybridization 値10~15%)を示したものはなかった。

(3) 諸種抗酸菌の MTC, *M. avium* および *M. intracellulare* 各特異 DNA プローブに対する反応性

Table 5 は代表的遅発育抗酸菌(計13菌種, 24株)の MTC および MAC 各特異 DNA プローブに対する反応性をみたものである。供試いずれの菌株も MTC 並びに MAC 各特異 DNA プローブとの間の% hybridization 値は0.7~3.6%であり, 陽性反応を示したものはみられなかった。他方, Table 6 は代表的病原性迅速発育抗酸菌である *M. fortuitum*, *M. chelonae* subsp. *abscessus* および *M. chelonae* subsp. *chelonae* の各2株の MTC 並びに MAC 各特異 DNA プローブに対する反応性を示したものであるが, 供試いずれの菌株も MTC および MAC の各特異プローブとの% hybridization 値は0.7~2.2%と低く, 陽性反応を示すものはなかった。

考 察

MAC は *M. tuberculosis* 以外の抗酸菌(非結核性抗酸菌)のうち最も臨床分離頻度の高い抗酸菌であり, わが国でも近年, 多少ともその増加傾向がみられている¹⁰⁾。従来の生物学的・生化学的性状検査による同定法では *M. avium* と *M. intracellulare* を正確に鑑別することはまず不可能で, 一般にこれらを一括して MAC と呼ぶ場合が多いが, DNA プローブを用いることによって, 両菌種の鑑別が可能となった¹²⁾。われわれが行った Gen-Probe 同定キットを用いた一連の研究によれば, 本邦では MAC 感染症のヒトから分離された *M. avium* と *M. intracellulare* とは地域的分布を異にし,

Table 4. Reactivities of 71 Clinical Isolates of MAC with DNA probe Specific for *M. avium* or *M. intracellulare*

Probe	No. of strains	% Hybridization			
		<i>M. avium</i>		<i>M. intracellulare</i>	
		Range	Mean	Range	Mean
<i>M. avium</i>	30	45.7-60.2	52.9	0.9- 3.9	2.1
<i>M. intracellulare</i>	41	1.2- 9.8	4.4	34.6-52.3	44.1

Table 5. Reactivities of Various Nontuberculous Mycobacteria Other than MAC (slow growers) with DNA Probe Specific for MTC, *M. avium* or *M. intracellulare*

Strain	% Hybridization		
	MTC	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. kansasii</i> P16	1.4	1.1	1.7
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	1.3	1.1	1.6
<i>M. marinum</i> Shimamoto	1.1	1.3	1.3
<i>M. marinum</i> ATCC 927	1.0	0.9	1.2
<i>M. simiae</i> 25	1.1	0.9	1.7
<i>M. simiae</i> ATCC 25275	1.2	2.0	1.6
<i>M. asiaticum</i> 27	1.0	1.1	1.1
<i>M. asiaticum</i> ATCC 25276	1.4	0.7	1.1
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19073	1.0	1.0	1.7
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981	0.9	1.0	1.2
<i>M. gordonae</i> ATCC 23284	1.1	0.9	1.3
<i>M. gordonae</i> ATCC 14470	0.9	1.6	1.1
<i>M. szulgai</i> NCTC 10831	1.1	1.0	2.6
<i>M. malmoense</i> ATCC 29571	0.8	0.9	1.2
<i>M. xenopi</i> ATCC 19276	1.1	0.8	1.6
<i>M. xenopi</i> ATCC 19970	3.6	0.9	1.3
<i>M. gastri</i> W417	1.3	1.1	1.6
<i>M. gastri</i> W465	1.7	0.9	2.1
<i>M. nonchromogenicum</i> ATCC 19530	0.9	1.1	1.7
<i>M. nonchromogenicum</i> ATCC 19531	1.2	1.3	1.3
<i>M. terrae</i> ATCC 15755	1.8	1.0	1.4
<i>M. terrae</i> W-511	1.1	0.9	1.3
<i>M. triviale</i> T-435-5	1.1	0.9	1.1
<i>M. triviale</i> ATCC 23290	0.8	0.8	1.2

関西以東では *M. avium* が、関西以西では *M. intracellulare* が多いこと⁴⁾、また *M. avium* 血清型1~3, *M. intracellulare* 血清型4~6, 8~11および21各所属菌は *M. avium* であり、*M. intracellulare* 血清型7, 12~20および25各所属菌は *M. intracellulare* であること³⁾⁻⁵⁾ をも明らかにした。また、DNAプローブにより同定された *M. avium* と *M. intracellulare* はリファンピシン、アミノグリコシド系抗生剤やキノロン剤に対する薬剤感受性に有意差がみられること⁷⁾ を見出したが、このことはMAC感染症の治療上極めて重要な知見と思われる。

M. avium, *M. intracellulare* およびMTC (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* および *M. microti*) 各特異DNAプローブの菌種特異的反応性に

ついては、Enns⁸⁾ は American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, U.S.A.) や Centers for Disease Control (Atlanta, Ga., U.S.A.) からのMAC計158株およびMAC以外の抗酸菌28菌種計167株について検討しているが、% hybridization 値についての記載はみあたらない。また、Drakesら¹⁾ のMAC計134株とMAC以外の抗酸菌計66株のMAC DNAプローブとの反応性の報告についてみても% hybridization 値の記載はMAC, *M. tuberculosis*, *M. kansasii* を含む7菌種についての記載がみられるにすぎない。

そこで、今回われわれはこれらプローブの菌種特異性についてMTC, MAC以外の代表的抗酸菌16菌種、計30株を供試して詳細な検討を行ったところ、MTC,

Table 6. Reactivities of Various Nontuberculous Mycobacteria Other than MAC (rapid growers) with DNA Probe Specific for MTC, *M. avium* or *M. intracellulare*

Strain	% Hybridization		
	MTC	Probe <i>M. avium</i>	<i>M. intra- cellulare</i>
<i>M. fortuitum</i> 18356	0.9	0.8	1.2
<i>M. fortuitum</i> 18367	1.0	0.8	1.7
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i> R108	0.9	1.0	2.2
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977	0.7	0.7	1.3
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i> 19062	0.7	0.9	0.9
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i> NCTC 946	0.8	0.6	1.2

M. avium, *M. intracellulare* のプローブはそれぞれに対応する菌種(群)とのみ特異的に反応し、それ以外の菌種との陽性反応はみられないことが分かった。このことは、本 DNA プローブの菌種特異性が極めて高いことを示すものである。

Drakes ら¹⁾ は、MAC 特異プローブと MAC 以外の菌種との % hybridization 値は 1.0~9.7% (平均 2.0%) と報告しているが、これは今回のわれわれの検討で得られた値 (Table 5, 6 参照) とよく一致するものである。また、Enns⁸⁾ は MAC 以外の抗酸菌計 166 株の内に MAC 特異 DNA プローブとの間に反応陽性を示した菌株が 1 株みられたと記載しているが、われわれの検討した限り (MTC を含む 79 株) ではこのような例外的な菌株はみられなかった。

本 DNA プローブテストは極めて高い菌種特異性があることから、今後、ヒトの抗酸菌感染症における起炎菌の第 1 位 (*M. tuberculosis*) 並びに第 2 位 (MAC) の分離菌株を DNA プローブテストによって迅速かつ正確に診断することが可能となるものと思われる、BAC TEC 12B 培地での primary culture を用いた Gen-Probe テストの試み¹¹⁾ も行われている現在、その臨床上の有用性は今後ますます広がるものと思われる。

ま と め

諸種抗酸菌の *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), *M. avium* および *M. intracellulare* 各特異 DNA プローブ (Gen-Probe 社, San Diego,

U.S.A.) に対する反応性について検討した。

(1) MTC (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* および *M. microti*) は MTC プローブとの反応は陽性 (% hybridization 値 42.8~51.9%) であったが、*M. avium* 並びに *M. intracellulare* の各プローブとの反応は陰性値 (0.8~2.5%) であった。

(2) *Mycobacterium avium* complex は *M. avium* あるいは *M. intracellulare* の各特異プローブとの % hybridization 値が *M. avium* では 24.9~54.9%, *M. intracellulare* では 31.7~42.0% で陽性であったが、MTC プローブとの反応は陰性値 (0.8~1.9%) を示した。

(3) MTC および MAC 以外の 16 菌種計 30 株 (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. asiaticum*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. gastri*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*) の MTC あるいは MAC 各特異 DNA プローブとの反応は陰性 (% hybridization 値 0.6~3.6%) であった。

(4) 如上の成績より、MTC, *M. avium* および *M. intracellulare* の各特異 DNA プローブの菌種特異性は極めて高いものと思われる。

文 献

- 1) Drakes, T. A., Hindler, J. A., Berlin, O. G. W. et al. : Rapid identification of *Mycobac-*

- terium avium* complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome, 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® による *Mycobacterium avium-intracellulare* complex の鑑別・同定, 結核, 63 : 261~269, 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) Saito, H., Tomioka, H., Sato, K. et al. : Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*, J Clin Microbiol, 28 : 1694-1697, 1990.
 - 6) Tomioka, H., Saito, H., Sato, K. et al. : Arylsulfatase activity for differentiating *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*, J Clin Microbiol, 28 : 2104-2106, 1990.
 - 7) Tomioka, H., Saito, H., Sato, K. et al. : Susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* to various antibacterial drugs, Microbiol Immunol, 33 : 509-514, 1989.
 - 8) Enns, R. K. : Clinical studies summary report : the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for the *Mycobacterium avium* complex, 1987, Gen-Probe, Inc., San Diego, Calif.
 - 9) Sherman, I., Harrington, N., Rothrock, A. et al. : Use of a cut off range in identifying mycobacteria by the Gen-Probe Rapid Diagnostic System, J Clin Microbiol, 27 : 241-244, 1989.
 - 10) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班 : 日本における非定型抗酸菌感染症の研究, 結核, 63 : 493~499, 1987.
 - 11) Peterson, E. M., Lu, R., Floyd, C. et al. : Direct identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary cultures in BACTEC media using DNA probes, J Clin Microbiol, 27 : 1543-1547, 1989.