

短 報

DNA プローブを用いた *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* および *Mycobacterium tuberculosis* Complex の同定

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10月12日

IDENTIFICATION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM*, *MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE*, AND *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX BY GEN-PROBE[®] RAPID DIAGNOSTIC SYSTEMHaruaki TOMIOKA, Katsumasa SATO, Hajime SAITO *
and Hiromichi TASAKA

(Received for publication October 12, 1990)

DNA probe testing for *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) was performed using Gen-Probe[®] Rapid Diagnostic System (Gen-Probe Inc., San Diego, Calif., U.S.A.). By DNA probe test carried out blindfold for 48 mycobacterial strains with code numbers obtained from Kyoto University (Prof. F. Kuze), 13, 7, and 5 strains were identified as to be *M. avium*, *M. intracellulare*, and MTC, respectively. The diagnostic specificity and sensitivity of this testing were 100%. In this experiment, % hybridization of *M. avium* complex (MAC) and MTC were 25~55% and 45~52%, respectively.

DNA probe test for 54 MTC strains including *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microti* revealed that 53 strains, except for one strain donated as a niacin-negative *M. tuberculosis*, reacted with MTC probe but not with MAC-probes. The one exceptional strain reacted with both the MTC- and *M. avium*-probes. However, when ten colonies randomly isolated from this strain on 7H11 agar plate were subjected to the DNA probe test again, all of these colonies reacted with *M. avium* probe, but not with MTC probe. Moreover, one representative colony was found to have α -antigen specific for the MAC.

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

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

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

ヒトの抗酸菌感染症の主要な起因菌は、今日でも、*Mycobacterium tuberculosis* であることには変わりはないが、他方、従来ほとんど重要視されていなかった非結核性（“非定型”）抗酸菌による感染症が多少とも増加の傾向にある¹⁾ことは、注目に値する。ところで、抗酸菌は一般に発育が遅く、その同定には熟練を要することもあって、簡便かつ迅速に行いうる同定法が望まれてきた。最近、遺伝子工学の発達に伴って抗酸菌検査の分野にも DNA hybridization を利用した遺伝学的同定法が開発されつつあり²⁾、米国では Gen-Probe 社より 16S rRNA に特異的な DNA プローブを用いた抗酸菌の迅速同定キット (Gen-Probe[®] Rapid Diagnostic System)^{3)~6)} が市販されており、本邦での市販も間近のものようである。

ところで、本キットは *M. tuberculosis* complex (MTC) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* および *M. microti*) に特異的な DNA プローブを利用するもの⁶⁾、および *M. avium* 並びに *M. intracellulare* にそれぞれ特異的な DNA プローブを利用したものがある³⁾。われわれはいち早く本同定キットを入手し、特に *M. avium*, *M. intracellulare* 同定キットを用いての *M. avium* complex (MAC) 血清型との関係⁷⁾⁸⁾、*M. avium* 並びに *M. intracellulare* の薬剤感受性⁹⁾、本邦における地域的分布¹⁰⁾、アリルスルファターゼ活性¹¹⁾、さらには本同定キットの実際の使用に当たったの使用条件¹²⁾ などについてはすでに報告するところがあった。

今回は、従来の培養・生化学的方法によって同定された MAC 並びに MTC を含む諸種抗酸菌について、その一部はコード番号のみを付して分与を受けた菌株を DNA プローブテストに供して、本テストの感度ならびに精度を盲検により検討したので以下報告する。

供試菌株は久世文幸教授（京都大学）よりコード番号のみを付けて分与を受けた MAC、MTC を含む諸種抗酸菌の計 48 株と、高橋宏博士（国立予防衛生研究所）より MTC として分与を受けた抗酸菌 12 株並びに教室保存の MTC 42 株の計 54 株を用いた。久世教授より分与を受けた菌株については DNA プローブテストの成績を送付し、既分類との一致率の回答をえた。

DNA プローブテストは Gen-Probe[®] Rapid Diagnostic System (Gen Probe 社, USA) に添付の標準法に従って行った (Gen-Probe Inc., Gen-Pro-

be, *Mycobacterium avium* Complex, *Mycobacterium* TB Complex, Rapid Diagnostic System, Package Insert)。すなわち、各供試菌株の 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 の濃度に調整した菌液の 0.1 ml 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、*M. avium*, *M. intracellulare* または MTC の “DNA Probe Solution” の 1 ml を加え、72°C、60 分間静置して hybridization を行った。次いで、“Separation Suspension” (0.02% NaN₃ 含有緩衝液中 hydroxyapatite 浮遊液) の 4 ml を添加、攪拌し、72°C、5 分間保温後、再び攪拌後遠心 (3,000 rpm, 3 分) した。そしてその沈渣に 4 ml の “Wash Solution” (0.02% NaN₃ 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%) は次式より算出した。

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

その結果、久世教授により培養・生化学的性状により同定され、コード番号を付して分与を受けた抗酸菌計 48 株の DNA プローブによる盲検では、13 株が *M. avium*、7 株が *M. intracellulare*、したがって MAC は計 20 株 (% hybridization 値は 25~55%)、5 株が MTC (同値は 45~52%) と同定され、従来法と DNA プローブ法との間の一致率は 100% であり、また、いずれの DNA プローブに対しても陰性の 23 株は上記以外の菌種であった (Table 1)。

次に、Table 2 に示すように、MTC として分与あるいは保存された供試 54 菌株中 53 株は MTC の DNA プローブとのみ陽性値 (% hybridization 値は 42~52%) を示し、*M. avium* および *M. intracellulare* のプローブとの反応は陰性であった。また、残りの 1 株は 3 回の繰り返し実験で MTC のみならず *M. avium* のプローブとも陽性に反応することが分かった (% hybridization 値は 30~46%)。この株は患者から分離されたナイアシン陰性の *M. tuberculosis* として分与を受けたものであるが、7 H11 寒天平板上で画線培養 (5% CO₂ 下, 37°C, 2 週間) したところ、いずれも Smooth T の集落の発育がみられた。そのうち 10 集落を任意に鈎菌し培養して DNA プローブテストを行ってみた

Table 1. Identification of MTC and MAC by DNA Probe Test Using 48 Mycobacterial Strains with Blindfold Code Number

Strains	Number of strains		
	Positive to		Negative to
	DNA Probes		MAC-DNA
	<i>M. avium</i>	<i>M. intra.</i>	probes
Positive to MTC-DNA probe	0	0	5
Negative to MTC-DNA probe	13	7	23

Table 2. Identification of MTC by DNA Probe Test Using 54 Strains Donated or Stocked as MTC

Strains	Number of strains		
	Positive to		Negative to
	DNA Probes		MAC-DNA
	<i>M. avium</i>	<i>M. intra.</i>	probes
Positive to MTC-DNA probe	1 ^{a)}	0	53 ^{b)}
Negative to MTC-DNA probe	0	0	0

a) This strain was donated as a niacin-negative *M. tuberculosis* strain.

b) Contains *M. tuberculosis* (31 strains), *M. bovis* (15 strains), *M. africanum* (6 strains) and *M. microti* (1 strain).

ころ、全例とも *M. avium* と同定された。さらに、そのうちの1集落菌については α 抗原分析¹³⁾を行いMACと同定された。

今回の盲検による実験において、*M. avium*, *M. intracellulare* および MTC 各プローブはこれらの対応菌種とのみ特異的に100%の一致率で反応し、他種抗酸菌とは全く反応せず、正確に同定できることが分かった。この成績は先のわれわれの成績¹⁴⁾を追認しえたものであり、同様なことは後藤ら¹⁵⁾によっても報告されている。ナイアシン陰性の *M. tuberculosis* として分与を受けた1菌株は3回の繰り返し行った試験によって MTC 並びに *M. avium* の両プローブと反応するところから、Musial ら⁶⁾が報告していると同様の MAC の DNA プローブにも反応性の *M. tuberculosis* とも考えられたが、7 H11 培地上での画線培養より任意に釣菌した10集落とも *M. avium* プローブとのみ反応し MTC プローブとの反応はいずれも陰性であったことか

ら、この菌株は元来は *M. avium* であり、これに少量の MTC が混入したもののように思われる。先に報告したように¹²⁾、MAC 供試菌への1/10以下の割合で混入した MTC でも本 DNA プローブテストでは十分に検出可能である。また本菌株は分与当初からナイアシン陰性とされており、この点もこの結論とよく合致している。

わが国の抗酸菌感染症の主要な起因菌が、*M. tuberculosis*、ついで MAC であり、本 DNA プローブを用いたテストによって、これらの菌を極めて高い精度で同定しうることから、近い将来本法は主要抗酸菌同定上の主要な検査法の一つになるであろうことが期待される。

謝 辞

DNA プローブを御分与頂いた中外製薬株式会社に深謝します。

文 献

- 1) 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.
- 2) Enns, R.K.: DNA probes : An overview and comparison with current methods, Lab Med, 19 : 259-300, 1988.
- 3) Enns, R.K.: Clinical studies summary report : The Gen-Probe[®] Rapid Diagnostic System for the MAC : In Text by Gen Probe Inc, 1987.
- 4) Drakes, T.A., Hindler, J.A., Berlin, O.G. W. et al.: Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome, J Clin Microbiol, 25 : 1442-1445, 1987.
- 5) 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.
- 6) Musial, C.E., Tice, L.S., and Stockman, L.: Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex, J Clin Microbiol, 26 : 2120-2123, 1988.
- 7) 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 : 261~264, 1988.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Tomioka, H., Saito, H., Sato, K. et al.: Arylsulfatase activity for differentiating *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*, J Clin Microbiol, 28 : 2104-2106, 1990.
- 12) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇他 : *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, 結核, 66 : 381~387, 1991.
- 13) Tasaka, H., T. Nomura, and Y. Matsuno.: Specificity and distribution of alpha antigens of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and related species of mycobacteria, Am Rev Respir Dis, 132 : 173-174, 1983.
- 14) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇他 : 諸種抗酸菌の *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* および *Mycobacterium intracellulare* の各特異 DNA プローブ (Gen-Probe[®] Rapid Diagnostic System) に対する反応性, 結核, 66 : 405~411, 1991.
- 15) 後藤美江子, 奥住捷子, 後藤 元他 : DNA プローブを用いた *M. avium* complex の同定と東京大学附属病院における非定型抗酸菌の菌種別分離率の検討, 感染症学雑誌, 64 : 269~273, 1990.