

第 67 回総会シンポジウム

I. 抗酸菌感染症の迅速診断法

座長 青柳 昭雄 (国療東埼玉病)

受付 平成4年8月14日

The 67th Annual Meeting Symposium

I. RAPID DIAGNOSTIC METHODS FOR MYCOBACTERIOSIS

Chairman : Teruo AOYAGI *

Symposists :

1. Diagnostic Role of Fiberoptic Bronchoscopy for Mycobacterial Diseases : Atsuyuki KURASHIMA (National Tokyo Chest Hospital)
2. Serological Diagnosis : Ryoji MAEKURA (Toneyama National Hospital)
3. Comparison of MB-check, BACTEC, and egg-based Media for Recovery of Mycobacteria : Chiyoji ABE (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)
4. Polymerase Chain Reaction for Identification of Mycobacterium in Sputa : Toshihiko ARAI (Department of Microbiology, Meiji College of Pharmacy)
5. DNA Probe and Polymerase Chain Reaction for Detection and Identification of Mycobacteria : Hironobu KOGA (Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine)
6. Rapid Genetic Identification System of Mycobacteria : Takayuki Ezaki (Department of Microbiology, Gifu University)

(Received for publication August 14, 1992)

The diagnosis for mycobacteriosis is decided by the detection and identification of mycobacteria in specimens. However it takes about two months to know the data at present and so more rapidly diagnostic method has been desired for long time.

On the other hand, it needs to get good samples including mycobacteria and good sample could not be got in some cases with active tuberculosis disease.

In regard to these points, above described subjects were selected in this symposium.

Dr. KURASHIMA reported that the frequency of cases which could be diagnosed by fiberoptic bronchoscopy (FBS) only and more rapidly diagnosed by FBS were 9.4 % and 6.7 % respectively, and the Japanese popularization of FBS might influence a part of Japanese epidemic stastical analysis of mycobacteriosis.

Dr. MAEKURA reported that the detection of IgG antibodies against cord factor (trehalose 6, 6'-dimycolate prepared from H37Rv) was useful for the differential diagnosis

* From the National Sanatorium Higashisaitama Hospital, 4147, Kurohama, Hasudashi, Saitamaken 349-01 Japan.

between active and inactive pulmonary tuberculosis patients.

Dr. ABE reported that biophasic (MB-check) and radiometric (BACTEC) liquid-based culture system were higher on recovery rate and shorter on detection time compared with those of 3% ogawa and ogawa K medium.

Dr. ARAI reported that the primer system by Eisenach et al. on PCR was most sensitive and the sensitivity was as same as culture results on ogawa's medium for the detection of mycobacterium tuberculosis in sputa compared with other four primer systems.

Dr. KOGA reported that the nested PCR for detection of gene coding protein antigen b of mycobacterium tuberculosis complex showed excellent specificity and sensitivity, and ten percent of cases with negative results by smear and culture were diagnosed by only nested PCR, and results of identification by DNA probe agreed well with those of the biochemical method.

Dr. EZAKI reported that quantitative DNA-DNA hybridization method in microdilution plate was newly developed to identify 22 mycobacterial species and ten percent of clinical isolates did not belong to any of the established 22 species, and *M. abscessus* and *M. pregrinum* were independent species, and the combination of PCR and DNA probe might be efficaciously used in detection and identification of mycobacterium from clinical samples.

Key words : Bronchoscopy, Cord factor, PCR, BACTEC, Microplate hibridization method

キーワード : 気管支鏡, コードファクター, ポリメラーゼ連鎖反応, バクテック, マイクロプレートハイブリダイゼーション法

シンポジスト

1. 臨床的診断法
倉島 篤行 (国療東京症)
2. 血清診断法
前倉 亮治 (国療刀根山病)
3. 液体培地による抗酸菌の迅速診断
阿部千代治 (結核予防会結研)
4. PCR 法
新井 俊彦 (明治薬大微生物)
5. 抗酸菌症に対する DNA probe 法と PCR 法
古賀 宏延 (長崎大医 2 内)
6. DNA を使った抗酸菌の迅速同定
江崎 孝行 (岐阜大医微生物)

抗酸菌感染症は、検体中より抗酸菌を証明し同定することにより診断が確定する。現在、抗酸菌の同定判明までに約2カ月を要し、より迅速に判明する方法が望まれてきた。

一方、すぐれた検査法が確立したとしても抗酸菌を含んだ検体を採取することが必要であり、また活動性の結核に罹患していても結核菌を含む検体が得られぬ場合もある。したがって、抗酸菌感染症の迅速診断には、検査法の迅速化の確立に加えて総合的臨床診断が必要となる。これらの点を考慮して、本シンポジウムにおいては上記

課題が選ばれ、それぞれの第一人者により報告された。

倉島は、気管支鏡 (FBS) のみによって確定診断が可能であった例は9.4%、診断が早まったと考えられる例は6.7%であることを示し、FBS下抗酸菌検索は全抗酸菌陽性例の約16%に有用であり、わが国の新登録患者のうち1982年から塗抹陽性患者が増加していることの要因として、FBSの普及が影響していることを推測した。

前倉は、精製された cord factor (trehalose-6.6'-dimycolate) に対する IgG 抗体を活動性肺結核症、

不活動性肺結核、非結核性患者、健康成人にて、ELISA法にて測定し、活動性肺結核では他群に比して有意に高値を示し、感度85%、特異性96%であり、cord factor に対するIgG抗体の測定は活動性結核の診断に有用であることを示した。

阿部は卵培地である3%小川培地と基礎培地が液体培地である二相性のMB-checkとradiometric法であるBACTECとの3種の培地を比較検討し、結核菌群の陽性判明までの期間は、BACTEC 13.4日、MB-check 19.1日、3%小川培地21.7%であり、陽性率もそれぞれ93%、94.2%、75.6%でBACTEC、MB-checkは抗酸菌の検出率も高く、より迅速に判定示ることを示した。

新井はPolymerase Chain Reaction (PCR)法による抗酸菌の検出法を検討し、既に報告された5種類のprimerのうちEisenachらによって報告されたPrimer系が喀痰中の結核菌の検出率が高く、通常の培養成績と同程度であることを示した。

古賀は結核菌群の38 KDA 蛋白 (Pab) をコードする遺伝子の塩基配列を特異的に増幅する primer を作

成し nested PCR 法により臨床検体からの結核菌の検出を行い、感度98%、特異性90% (従来法で陰性であった172検体のうち17検体がPCRで陽性)であり、また、抗酸菌の同定法として、DNA-probe法が従来の生化学的同定法と比較され、結核菌群同定用DNA-Probeは感度、特異性ともに100%、MAC同定用Probeは特異性100%、感度94% (従来法でMACと判定された101株のうち6株が陰性)であることを示した。

江崎はフォトビオチンをDNAの標識に利用し、定量的DNA-DNAハイブリダイゼーションをELISA用のマイクロプレートで実施することにより、22の抗酸菌種を一遍に同定する方法を確立し、3時間以内に臨床分離株の90%を同定し得、また、*M. abscessus*、*M. pregrinum*は独立した菌種であることを認めた。また、抗酸菌属のすべての菌種のDNAを検出するprimerを使用して喀痰中の抗酸菌のDNAを増幅し、増幅されたDNAを種特異性DNA-probeにより同定する系について報告された。

第 67 回総会シンポジウム

I. 抗酸菌感染症の迅速診断法

1. 臨床的診断法

倉島篤行・高野智子

国立療養所東京病院呼吸器科

受付 平成4年8月14日

1. DIAGNOSTIC ROLE OF FIBEROPTIC BRONCHOSCOPY
FOR MYCOBACTERIAL DISEASES

Atsuyuki KURASHIMA* and Tomoko TAKANO

(Received for publication August 14, 1992)

From 1981 to 1991, 5,572 patients underwent bronchoscopic examination, in this series 3,754 patient's samples were sent for determination of mycobacterial isolation. In the 506 samples, mycobacterial bacilli were detected with smear or culture.

In the low tuberculous incidence area like northern part of America, many reporters supported the opinion that routine bronchial aspirate detection for tuberculosis was not cost-effective.

Inversely, in the high tuberculous incidence area like Hong Kong, M. Ip et al. claimed the usefulness of routine bronchial aspirate examination for mycobacterial bacilli. Japan was regarded as moderate tuberculous incidence area.

We review a ten-year experience with fiberoptic bronchoscopy for mycobacterial isolation. Our results suggest that in an area with a moderate prevalence of tuberculosis, bronchoscopic examination for mycobacterial disease is useful in the selected hospitals for the selected cases. In Japan, the smear positive prevalence has been on the increase from 1982. We estimate that the Japanese popularization of fiberoptic bronchoscopy may influence a part of the Japanese epidemic statistical analysis of mycobacteriosis.

Key words : Bronchoscopy, Mycobacteriosis, Tuberculosis, Prevalence

キーワードズ : 気管支鏡, 抗酸菌症, 結核, 罹患率

肺結核の診断は、一般に喀痰中の抗酸菌の有無を指標に行われる。

これは組織内の抗酸菌存在が喀痰に反映されるという前提で行われるが、近年気管支鏡の発達により、喀痰で

はなく直接組織内の抗酸菌にアプローチできるようになった。

この気管支鏡を用いた抗酸菌検索が、実際の結核診断にどの程度貢献したのかについて明らかにするため下記

*From the Department of Respiratory Diseases, National Tokyo Chest Hospital, Takeoka 3-1-1, Kiyose city, Tokyo 204 Japan.

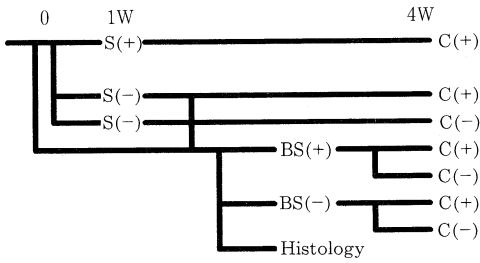


図1 肺結核における初診から気管支鏡診断にいたる過程

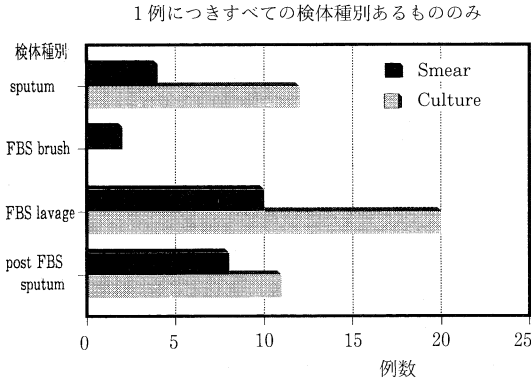


図2 検体種別による抗酸菌最高度陽性頻度

の検討を行った。

対象は1981年から90年まで10年間の国立療養所東京病院新規入院の抗酸菌陽性例2,330例とし、さらに詳しい検討を88年からの最近3年間の新規入院抗酸菌陽性例618例につき行った。

気管支鏡を用いた抗酸菌検索は、図1に示すような過程で行われる。

すなわち、初診時、喀痰塗抹陽性例は一般には気管支鏡検索にはまわらず、そのまま抗酸菌症として化学療法が開始される。

初診時喀痰塗抹陰性例が培養結果を待つことなく早期診断あるいは確定診断目的で気管支鏡検索を受けることになる。

これらの中で気管支鏡下塗抹陽性は、抗酸菌症として診断が確定するが、これらの時間的な経過としてはおよそ2週間以内が一般的である。さらに喀痰で培養4週間が陰性であっても気管支鏡下検体4週間が陽性ならば診断が早まったといえる。

図2は抗酸菌検索で気管支鏡摂取も含め、どの検体が最も有効か検討したものである。

まず検体種別を気管支鏡前の喀痰、気管支鏡時のブラシ塗抹、気管支洗浄液の塗抹、培養、気管支鏡後の喀痰と5つに分けた。同一例でそれら5種類の検体すべてが

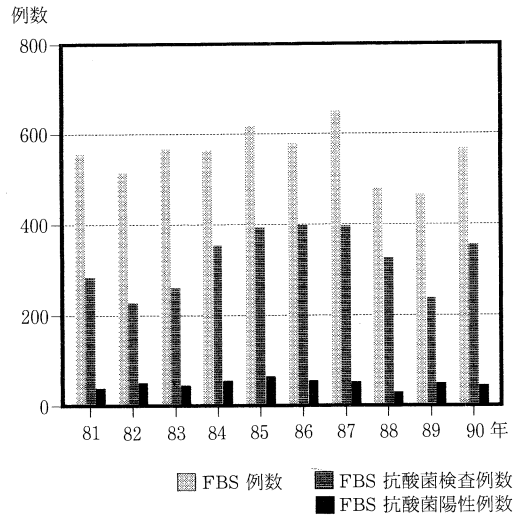


図3 気管支鏡下の抗酸菌検出推移

そろった1988年以降の抗酸菌陽性43例につき、検討を行った。

塗抹、培養別に同一人で5種類の検体の中で最高菌量を示した検体種別に1ポイントを与え同様に43例につき算定し、グラフとした。すなわち、ある例で、気管支洗浄液の培養が他の喀痰等より最も多くの菌量を示した時、検体種別としての気管支洗浄液が一点を示す。

塗抹でみると気管支洗浄液が最も有効であり41.7%で最高菌量を示している。

培養でみても気管支洗浄液が46.5%を占め、気管支鏡検索は抗酸菌診断において明らかに最も有効な手法であることを示している。

ブラシ塗抹が必ずしも優れていないのは、気管支鏡検索が行われる例が、通常喀痰では診断しがたい小病巣例が多く、ブラシの中が困難であることを反映していると考えられる。これに反し、気管支洗浄液は、より広範囲の病巣を反映するとともに、洗浄がすべての操作の最後に行われるという有利さを持っているためと考えられる。

また予測されることではあるが、気管支鏡後の喀痰は、特に塗抹検査で通常喀痰に優る有効な検体であることも示している。

図3は1981年より10年間の気管支鏡検査総数とその内訳を示している。

年度により多少の変動はあるが総数5,572例、年間平均557例に気管支鏡検査が行われ、そのうち3,754例(67.4%)に抗酸菌検索が行われ、さらにそのうち506例、気管支鏡検査総数に対して9.1%に陽性結果が得られている。

図4は新入院抗酸菌陽性例数に対する気管支鏡下の抗

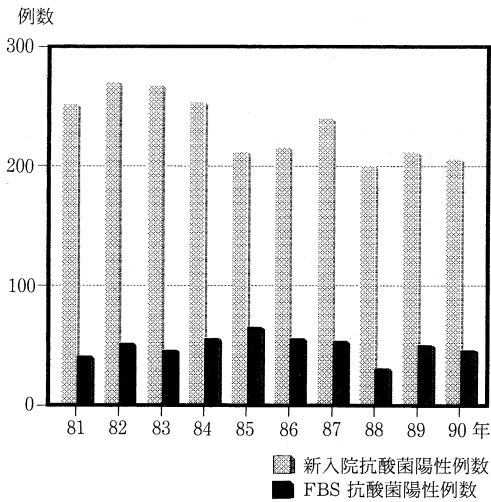


図4 新入院抗酸菌陽性例数に対する気管支鏡下の抗酸菌検出推移

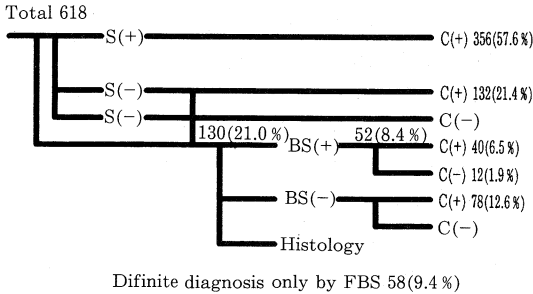


図5 3年間の肺結核気管支鏡診断の内容 (新入院抗酸菌陽性に対して)

酸菌陽性を示している。

10年間の傾向をみると新規入院陽性例は漸減傾向にあるが、年間平均233例でありTotal 2,330例、これに対し気管支鏡下陽性例は年間平均50.6例 Total 506例であり特に減少傾向はみられていない。

図5では資料のそろっている1988年から90年までの3年間の内訳をより詳細に検討していた。

この3年間の新規入院抗酸菌陽性例は618例であり、そのうち気管支鏡検査を受けることなく化療に入った喀痰塗抹陽性培養陽性は356例(57.6%)であった。

また喀痰塗抹陰性培養陽性は132例(21.4%)であった。この喀痰塗抹陰性はさらに130例(21.0%)が気管支鏡検査にまわっており、このうち52例(8.4%)は気管支鏡下で塗抹陽性となっている。

この52例のうち40例(6.5%)は培養陽性であり、ブラシ塗抹のみ陽性は12例(1.9%)のみであった。

さらに気管支鏡検査で塗抹陰性培養陽性は78例(12.6%)であった。

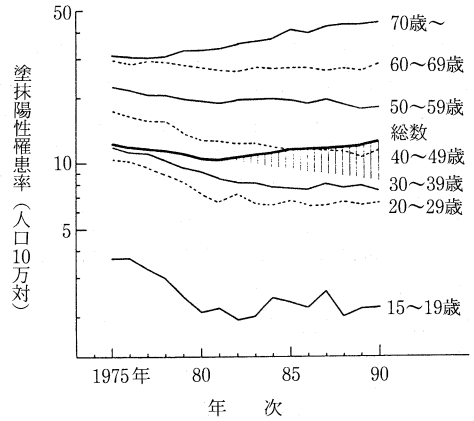


図6 塗抹陽性罹患率の推移

この全体を通して気管支鏡でのみ確定診断された例は58例(9.4%)であった。また気管支鏡検索により診断過程が、喀痰と比較し1ステップあるいは2ステップ向上した、すなわち診断が早まった例は42例(6.7%)であった。

考 察

気管支鏡による抗酸菌検索の有用性は広く知られており、すでに多くの報告がされている。これら内外の報告のいずれもが、各種検体の内で気管支洗浄液が最も高率に抗酸菌を検出するという点で一致しており、本検討でも同様であった。

しかし本邦報告の多くは、粟粒結核のような診断困難例や、喀痰塗抹陰性例に対する早期診断の観点からが多く、全抗酸菌陽性例に対して、実際に、気管支鏡検索がどの程度有用なのかは、意外に明らかにされていない。

この点について、北米のように結核低蔓延国では、Jettらは気管支鏡施行6,879例の気管支洗浄液の60%で抗酸菌検索を行い34例(0.49%)に陽性であったとし¹⁾、Russelらは1,399例中25例(1.8%)に陽性で、全体としては極めて低く、費用対効果の点から、ルーチン検査としては否定的な見解を示している²⁾。これに対して、Hong Kongのような高等度蔓延国(1987年の結核罹患率は人口10万対129.5で同じ年度の日本の罹患率は約45)のM. Ipらは1,784例の気管支鏡施行に対して全例に抗酸菌検索を行い144例(8.1%)の陽性所見を得、ルーチン検索の有用性を強調している³⁾。

本邦は中等度蔓延国であるが、われわれの検討では、施設の特異性や、対象症例を限定している点があるが、5,572例中506例(9.1%)に陽性であり、気管支鏡での抗酸菌検索は目的意識的に行われれば、十分に有用と考えられた。近年開発されたDNA診断を気管支洗浄液の検索に有効に用いればさらに感度と迅速性において

期待できると考えられる。

近年、結核疫学統計で1982年から次第に塗抹陽性患者が増加していることが指摘されている(図6)。本検討では、通常喀痰で陰性であっても、気管支鏡下検索を行うことにより8.4%多く陽性所見がその時点で得られている。

本邦では、フレキシブル気管支鏡が1970年代後半から導入され1980年代を通じて非常に広範囲に普及して来たことを考えれば、塗抹陽性患者の増加において気管支鏡検査による疫学的な要因は無視できないと考えられる。

結 語

1. 抗酸菌検索において気管支鏡は塗抹培養とも通常喀痰より優れた陽性頻度を示した。
2. 1981年から1990年までの10年間で新入院抗酸菌陽性例総数は2,330例であり、このうち気管支鏡による検索陽性例は506例(21.7%)であった。同じ10年間で気管支鏡検査総例数は5,572例でそのうち抗酸菌検索が行われたのは3,754例であり、さらにこの中で抗酸菌陽性例は506例で気管支鏡下抗酸菌検索3,754例に対しては13.5%であった。
3. 1988年以降の3年間では新入院抗酸菌陽性例総数618例に対して気管支鏡下抗酸菌陽性例は130例で21.0%であった。

このうち気管支鏡のみによって確定診断可能であった例は58例(9.4%)であり、さらに気管支鏡によって診断が早まったと考えられる例は42例(6.8%)であった。喀痰塗抹陰性で気管支鏡により塗抹陽性は52例(8.4%)であった。

4. 気管支鏡下抗酸菌検索は全抗酸菌陽性例の約16%に有用であったが、すでに広く行われている検査手技であることを考えると、結核疫学統計に影響を及ぼし得ると考えられた。

文 献

- 1) Jett JR, Cortese DA, Dines DE. The value of bronchoscopy in the diagnosis of mycobacterial disease—a five year experience. *Chest* 1981; 80: 575–578.
- 2) Russel MD, Torrington KG, Tenholder MF. A ten-year experience with fiberoptic bronchoscopy for mycobacterial isolation—impact of the Bactec system. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133: 1069–1071.
- 3) M. Ip, PY Chau, SY So, WK Lam. The value of routine bronchial aspirate culture at fiberoptic bronchoscopy for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle.* 1989; 70: 281–285.

第 67 回総会シンポジウム

I. 抗酸菌感染症の迅速診断法

2. 血清診断法

前 倉 亮 治

国立療養所刀根山病院

受付 平成 4 年 8 月 14 日

2. SEROLOGICAL DIAGNOSIS

Ryoji MAEKURA *

(Received for publication August 14, 1992)

Detection of IgG antibodies against purified cord factor (trehalose-6, 6'-dimycolate) prepared from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv was carried out by the method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its diagnostic usefulness was also evaluated in this study. Sera from 65 patients with active pulmonary tuberculosis, 58 patients with inactive pulmonary tuberculosis, 36 patients with diseases other than tuberculosis and 66 healthy adults were examined. Patients with active pulmonary tuberculosis showed significantly higher titers of IgG antibodies against cord factor than other groups ($p < 0.001$). Patients with inactive pulmonary tuberculosis also showed significantly higher titers of IgG antibodies against cord factor than patients with diseases other than tuberculosis and healthy adults ($p < 0.001$). An antibody titers of greater than 0.29 were established as a positive ELISA test. For patients with active pulmonary tuberculosis, the ELISA had a sensitivity of 85% and a specificity of 96%. From these results, it is concluded that the detection of IgG antibodies against cord factor is useful for the serodiagnosis of active or inactive pulmonary tuberculosis.

Key words : Serodiagnosis, Pulmonary tuberculosis, Cord factor, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

キーワード : 血清診断, 肺結核, コードファクター, 酵素免疫測定法 (エライサ法)

緒 言

肺結核症の診断には、喀痰中の抗酸菌を塗抹標本にて証明するか、または分離培養により菌を証明することが必要である。しかし、塗抹標本では検出率が低く、分離

培養には長時間必要であることなど欠点も多く、結核症の迅速診断法（血清診断法）の開発が強く求められている。結核の血清診断法としては、Middlebrook-Dubos, Boyden, 高橋らの方法があるが、現在使用されることは少ない¹⁾⁻⁶⁾。

*From the Toneyama National Hospital, 5-1-1, Toneyama, Toyonaka-shi, Osaka 560 Japan.

しかし、最近 ELISA による血中抗体測定法が開発され、PPD や結核菌体蛋白を抗原として結核患者の血清抗体価を測定し、結核の診断と病状の判定に有用であることが報告されている⁷⁾⁻¹¹⁾。

最近われわれは、結核菌およびその類縁菌の細胞壁に特異的に含まれる Cord factor (CF: trehalose dimycolate) に対する抗体が、肺結核患者血清中に存在することを発見し、この Cord factor 抗体が結核の血清診断に有用であることを明らかにした¹²⁾。本シンポジウムでは、抗 CF 抗体価上昇と臨床的背景の関連について報告する。

対象および方法

1. 対象血清

活動性肺結核例として結核菌排菌陽性化療前肺結核患者 53 名および 6 カ月以上持続排菌肺結核患者 12 名、非活動性肺結核例として排菌陰性後 1 年以上経た肺結核患者 36 名、結核の明らかな既往を持つ陳旧性肺結核例 22 名、および非結核例 102 名の血清を対象とした。

非結核例の中には、結核以外の呼吸器疾患患者 17 名と呼吸器疾患以外の患者 19 名、2 次検診および家族検診者 14 名、健康成人 52 名が含まれる。

2. 方法

Cord factor の調整は、人型結核菌 H37Rv 株の加熱死菌をクロロフォルム-メタノールにより抽出し、silica-gel G 薄層クロマトグラフィーにより精製した。ELISA 法は、抗原として Cord factor 2.5 μ g/well を用い、被検血清 160 倍希釈 50 μ l/well と室温で 1 時間反応後洗浄を行い、50 μ l の peroxidase 標識山羊抗ヒト IgG 抗体を加え室温で 1 時間反応後洗浄を行い、50 μ l の O-Phenylenediamine を添加し室温で 10 分反応後、50 μ l 6N \cdot HC1 で反応を停止し、microplate reader で OD (429-630 nm) を測定した。

表 1 に、各群の年齢、男女比および学会分類病型を示した。

結 果

1. 非結核群の抗 CF 抗体価が 0.09 ± 0.10 であるのに対して、結核患者各群ともに化療前群 1.19 ± 0.93 、持続排菌群 1.80 ± 0.98 、排菌陰性化療群 0.39 ± 0.43 、および陳旧性群 0.26 ± 0.20 と有意 ($p < 0.001$) に高値を示した。持続排菌群が最も高い抗 CF 抗体価を示し、化療前群も排菌陰性群および陳旧性群に比して有意 ($p < 0.001$) に高値を示した (表 2, 図 1)。

表 1 対象と学会分類

群	人数 男/女	年齢	学会分類		
			I	II	III & IV
排菌陽性肺結核患者	65				
化学療法前初診例	53(38/15)	55.5 \pm 18.4	12	31	10
持続排菌例	12(9/3)	57.9 \pm 12.2	3	7	2
排菌陰性肺結核患者	58				
化学療法後	36(28/8)	58.6 \pm 12.6	11	13	12
陳旧性肺結核例	22(15/7)	62.3 \pm 13.7	0	0	22
非結核例	102(70/32)	39.9 \pm 13.7			

表 2 肺結核例と非結核例の抗 CF 抗体価とその比較

群	抗体価 Mean \pm SD (n)	p value	
		化学療法前初診例	非結核例
排菌陽性肺結核患者			
化学療法前初診例	1.19 \pm 0.93 (53)	-	p<0.001
持続排菌例	1.80 \pm 0.98 (12)	p<0.05	p<0.001
排菌陰性肺結核患者			
化学療法後	0.39 \pm 0.43 (36)	p<0.001	p<0.001
陳旧性肺結核例	0.26 \pm 0.20 (22)	p<0.001	p<0.001
非結核例	0.09 \pm 0.10(102)	p<0.001	-
健康成人	0.06 \pm 0.10 (66)	p<0.001	-

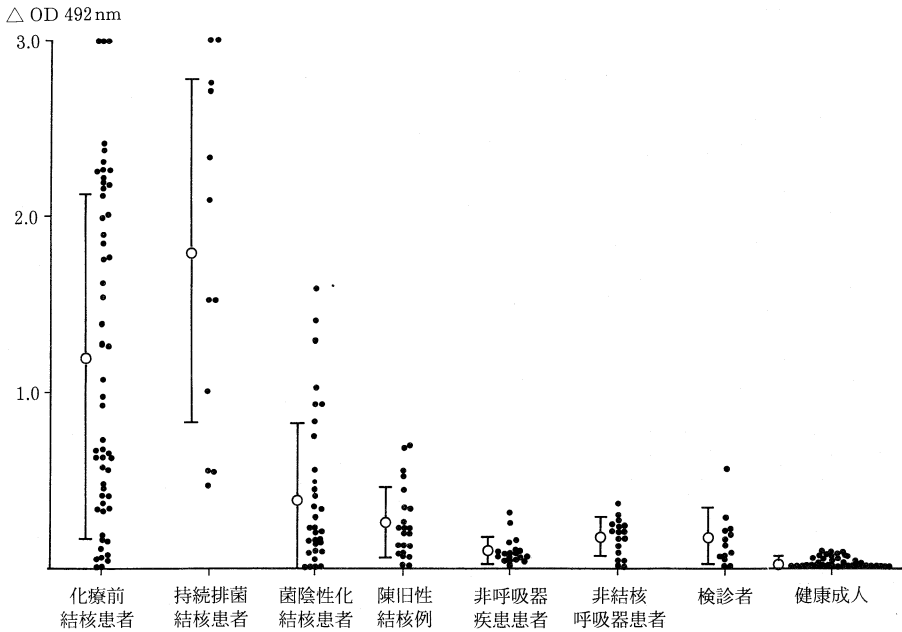


図1 結核患者と非結核例各群との抗 CF 抗体価の比較

しかし、治療前群の中でも低値を示す例が数多くあり、これらについて、次に検討を行った。

2. 治療前群の中で、発症から採血時までの期間について抗 CF 抗体価を比較すると、1カ月未満が 0.75 ± 0.74 と 2～3カ月 1.88 ± 0.81 、3カ月以上が 1.69 ± 0.88 と有意 ($p < 0.01$) に低値を示し、1～2カ月も 0.98 ± 0.95 と 2カ月以上の群と比較し有意 ($p < 0.05$) に低値を示した (図2)。次に学会分類の病型により抗 CF 抗体価を比較すると、Ⅲ型で 0.68 ± 0.76 とⅠ型 1.48 ± 0.94 より有意 ($p < 0.05$) に低値を示し、Ⅱ型 1.25 ± 0.94 より低値を示す傾向がみられた (図3)。

3. 結核患者菌陰性化後の抗 CF 抗体価の変動は、1～2年で 0.79 ± 0.49 、2～3年で 0.37 ± 0.33 となり、3年以上で 0.11 ± 0.10 とほぼ非結核例の抗 CF 抗体価と同レベルにまで低下した (図4)。

4. 非結核例各群の抗 CF 抗体価は、非呼吸器疾患患者 0.10 ± 0.08 、非結核呼吸器患者 0.18 ± 0.11 、検診者 0.18 ± 0.16 、および健康成人 0.03 ± 0.03 と各群とも治療前結核患者に比して有意 ($p < 0.001$) に低値を示した (図1)。

5. 非結核例の平均抗 CF 抗体価 0.09 に 2SD をくわえた 0.29 を Cut off 値として、抗 CF 抗体価による肺結核症の診断率をみると Sensitivity 85 %、Specificity 96 %であった (表3)。

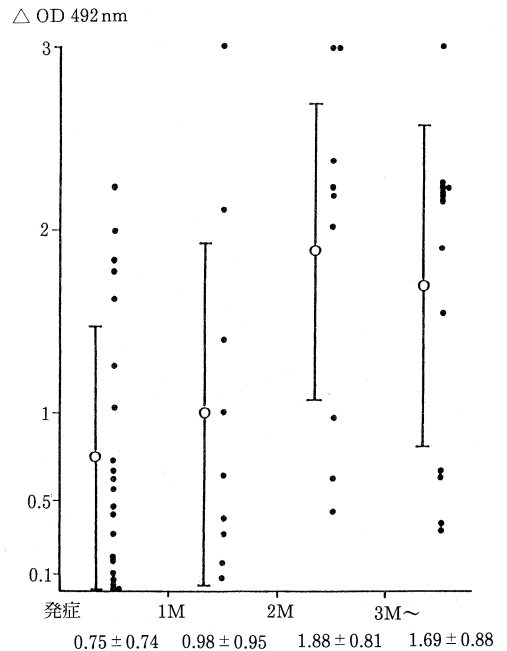


図2 治療前群における発症から採血までの期間による抗 CF 抗体価の比較

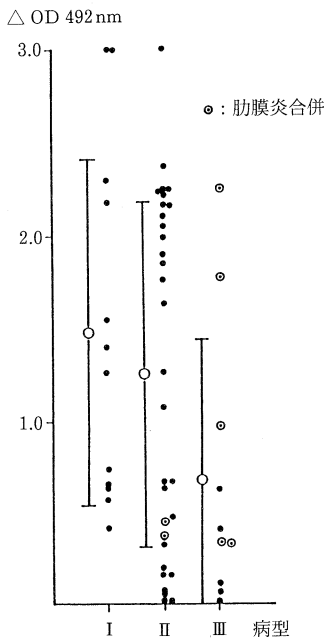


図3 化療前群における各病型別抗 CF 抗体価の比較

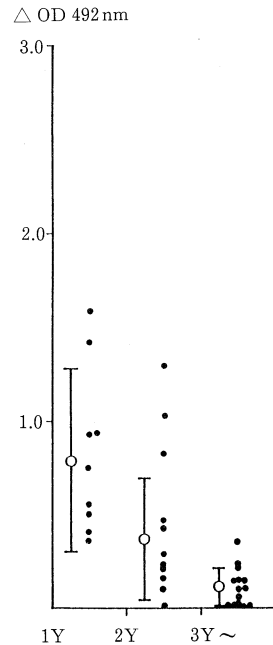


図4 菌陰性化後の抗 CF 抗体価の変動

表3 抗 CF 抗体による肺結核症の診断率

	Cut off=0.29	
	排菌陽性 肺結核	非結核例
Positive	43	4
Negative	10	98
Total	53	102
Sensitivity (%)	81	-
Specificity (%)	-	96

考 察

Cord-factor に対する抗体産生は、加藤らによりマウスで報告されている¹³⁾¹⁴⁾。Cord factor は、結核菌の細胞壁表面に存在しており、肺結核患者において異物抗原物質として働き、宿主の免疫担当細胞を刺激したものと考えている。

肺結核患者の抗 Cord factor 抗体価は、非結核例に比較し有意に高値を示し、結核の血清診断に有用であると考えた。ただし、発症より採血までが2カ月未満の症例31例中10例で低値を示し、このうち8例は経過中に抗体価は上昇した。故に、抗 Cord factor 抗体による血清診断には、経過をみて検査をする必要がある。特に胸部X線撮影上、空洞病変を伴わないⅢ型の患者の診断は慎重に行うべきである。

抗体価は、菌陰性化後低下傾向を示し、3年以上ではほぼ非結核例のレベルに低下する。また、病変がⅠ～Ⅳへ改善するに従い抗体価は低下し、抗 Coad factor 抗体価は病状をよく反映する可能性も、示唆された。

しかし、陳旧性結核例の中にも高値を示す症例があり、もっとも高い2例は、肺結核の診断で入院し、排菌陰性で肺癌と診断された。また、家族検診者の中に高値を示す例があり、今後結核菌感染のスクリーニングや補助診断としての有用性も検討する必要がある。

文 献

- 1) Lind A and Ridell M. (1984) Immunologically based diagnostic tests, Humoral antibody methods, in the Mycobacteria (Kubica GP and Wayne LG, Eds), 248, Marcel Dekker, New York, U. S. A. 1984 : 221-248.
- 2) Daniel TM and DeBanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. Am Rev Respir Dis. 1987 : 135, 1137-1151.
- 3) Daniel TM. Antibody and antigen detection for the immunodiagnosis of tuberculosis : Why not? What more is needed? Where do we stand today? J Infect Dis. 1988 : 158,

- 679-680.
- 4) Middlebrook G and Dubos RJ. Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J Exp Med.* 1948 : 88, 521-528.
 - 5) Takahasi Y. Specific serum agglutination of kaolin particles sensitized with tubercule phosphatide and its clinical evaluation as a serodiagnostic test for tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1962 : 85, 708-719.
 - 6) Tanaka A, Hirota N and Sugiyama K. Antigenicity of wax D, a peptidoglycolipid of *M. tuberculosis*. Preliminary report on the evaluation of wax D agglutination as a sero diagnostic test for pulmonary tuberculosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1967 : 32, 349-352.
 - 7) Benjamin RG and Daniel TM. Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis.* 1982 : 126, 1013.
 - 8) Zeiss CR, Kalish SB, Erlich KS. IgG antibody to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1984 : 130, 845-848.
 - 9) Pan X, Yang P, Weng X. Determination of anti-PPD antibody by ELISA. *Chin J Tuberc Respir Dis.* 1983 : 6, 68-70.
 - 10) Balestrino EA, Daniel TM, de Latini MDS, et al. Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull WHO.* 62, 755-761.
 - 11) Kusano N. Evaluation of serodiagnosis detecting IgG antibodies against purified protein derivative and alpha antigen in patients with active pulmonary tuberculosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Kekkaku.* 1987 : 62, 211.
 - 12) Hau H, Oka S, Yamamura Y, et al. Rapid serodiagnosis of human mycobacteriosis by ELISA using cord factor (trehalose-6, 6'-dimycolate) purified from *Mycobacterium tuberculosis* as antigen. *F. E. M. S.* 1991 : 76, 201-204.
 - 13) Kato M. Immunochemical properties of anti-cord factor antibody. Effect of anti-cord factor antibody on experimental tuberculosis in mice. *Infect Immun.* 1973 : 7, 9-12.
 - 14) Kato M. Antibody formation to trehalose-6, 6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immuno.* 1972 : 5, 203-212.

第 67 回総会シンポジウム

I. 抗酸菌感染症の迅速診断法

3. 液体培地による抗酸菌の迅速診断

阿部 千代治・細島 澄子

結核予防会結核研究所

受付 平成4年8月14日

3. COMPARISON OF MB-CHECK, BACTEC, AND EGG-BASED MEDIA FOR RECOVERY OF MYCOBACTERIA

Chiyoji ABE* and Sumiko HOSUJIMA

(Received for publication August 14, 1992)

The rate of recovery and time to the detection of mycobacteria from clinical specimens were measured for biphasic and radiometric liquid-based culture systems and egg-based media (3% Ogawa and Ogawa K). From the 245 sputum specimens processed, a total of 86 (35.1%) mycobacterial isolates were detected. Of these, 81 (94.2%) and 80 (93.0%) isolates were detected with the MB-Check and BACTEC systems, respectively, and 65 (75.6%) isolates were detected with the 3% Ogawa egg method. The difference in the percentages of positive cultures between the two systems based on liquid media and the 3% Ogawa egg method was significant ($P < 0.01$). This difference was even greater among smear-negative specimens. The detection time was shorter with the liquid-based systems. The mean times to the detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex were 19.1 days with the MB-Check system, 13.4 days with the BACTEC system, and 21.7 days with the 3% Ogawa egg method. These results indicate that both the MB-Check and the BACTEC systems, based on liquid media, are efficient for the recovery of mycobacteria.

Key words : Mycobacteria, BACTEC, MB-Check

キーワード : 抗酸菌, ラジオメトリック法, 二相性培養システム

小川培地や Loewenstein-Jensen 培地に代表される卵培地が, ミコバクテリアの培養に長い間使われてきた。1958年に Middlebrook と Cohn¹⁾ は, 生きたミコバクテリアをより早く検出するために寒天培地を開発した。しかし, 依然として臨床材料からミコバクテリアを検出するのにまだ平均3週間を要した。

1969年に DeLand と Wagner²⁾ は細菌か培地中の¹⁴C 標識基質を脱カルボキシル化する際に遊離する¹⁴CO₂ を測定して, 細菌の代謝を自動的に検出する技術を開発した。Cummings ら³⁾ は 1975年に同じ原理が結核菌の増殖の測定にも利用できることを示した。Middlebrook はこの技術をさらに改良し, ミコバクテ

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan

リアの増殖を促す¹⁴C標識基質を含む7H12液体培地(BACTEC)を発表した⁴⁾。この培地の患者材料からの勝れたミコバクテリアの分離能については著者らもすでに確認している⁵⁾。さらに近年液体培地による増殖促進と寒天培地によるコロニーの検出の両者を兼ね備えた二相性培養システム(MBチェック)が開発された。

今回液体培地を基礎としラジオアイソトープ標識基質を用いたBACTEC法および液体培地と寒天培地の二相からなるMBチェックと、従来からの卵培地を用いる小川法で患者材料からのミコバクテリアの分離率および検出までに要する時間を測定し、それらシステムの間で比較した⁶⁾。

材料および方法

患者材料と処理法

結核予防会複十字病院(東京都清瀬市)を訪れた外来患者および入院患者から得られた喀痰材料245を実験に用いた。それらのうち65は塗抹陽性、180は塗抹陰性であった。すべての材料はNaOH法で前処理された。すなわち喀痰材料に2倍量の4% NaOHを加え、短時間チューブミキサーで混和後室温で15分間処理した(Fig.)。アルカリ処理材料の0.1mlは中和せずにそのまま3%小川培地に接種された。残りの処理材料には約10倍量の10mM 磷酸緩衝液が加えられ、3,000×gで4°C、20分間遠心濃縮された。上清は注意深く捨てられ、沈渣は1mlの緩衝液に懸濁され、3種の培地に接種された。

培地と培養法

新しく開発されたMBチェックは、液体と寒天からなる二相性培養システムである。液相部はMiddlebrook 7H9(20ml)を基礎培地とし、他にオレイン酸、

アルブミン、グルコース、カタラーゼ、グリセロール、塩酸ピリドキシンおよびポリオキシエチレン-40-ステアレート、と選択剤として次の5種の薬剤、ポリミキシンB、アンフォテリシンB、ナリジキシン酸、トリメンプリム、アズロシリン(頭文字を取ってPANTAと略)を含んでいる。固型部は3パドルからなり、それらにはMiddlebrook 7H11寒天培地、結核菌と非結核性抗酸菌の間を分別するNAP(*p*-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropiofenone)試薬⁷⁾を含むMiddlebrook 7H11寒天培地とチョコレート寒天培地⁸⁾が分注されている。

BACTEC 12BはMiddlebrook 7H9液体培地(4ml)を基礎培地とし、他にカゼイン水解物、ウシ血清アルブミン、カタラーゼ、¹⁴C標識基質(パルミチン酸)、ポリオキシエチレン-40-ステアレートとPANTAからなっている。

二相性MBチェックは日本ロシュから、BACTEC 12Bは日本ベクトン・ディッキンソンから分与された。3%小川培地と小川K培地は極東製薬より購入した。

すべての材料は4% NaOH(終濃度、2.6%)で処理され、その0.1mlは直接3%小川培地に接種された。アルカリ処理後希釈濃縮された材料のうち0.1mlは小川K培地に、MBチェックとBACTEC ボトルには0.4mlずつ接種された。すべての培地は37°Cで培養され、週2回観察された。MBチェックの場合はスライド上にコロニーが観察されるまで観察毎に培地を転倒し、液体と寒天を接触させ、コロニーが観察された時点で培養陽性と判定した。BACTEC法ではGI(growth index)値が20に達した時点で培養陽性とした。

NAPテスト

NAPはクロラムフェニコールの合成の中間化合物で

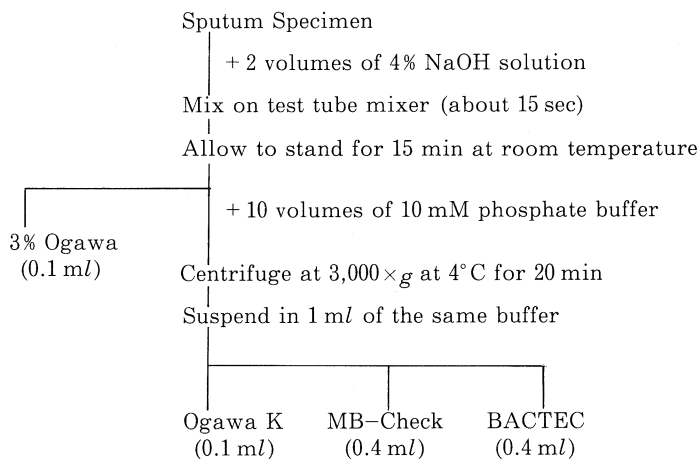


Fig. Pretreatment of Specimens

結核菌群に属する抗酸菌の増殖をほとんど完全に抑制し、他の抗酸菌はほとんどまたは全く抑制しない。BACTEC 12B バイアルの GI 値が 50 を越え 100 以内の場合は薄めずに培養液の 1 ml を 5 μ g の NAP を浸透させたディスクを含むバイアルに注入し、37°C に培養した。残りの培養液は対照として使用するためにそのまま培養した。次の日より毎日 GI 値を測定し、前日との GI 値の差をもとめ 2 つのボトルの間で比較した。

分離ミコバクテリアの鑑別同定

すべての分離株はチール・ネルゼン染色で確認し、続いて *M. tuberculosis* complex と *M. avium* および *M. intracellulare* 鑑別同定用 DNA プローブキット (中外製薬より分与) と従来からの培養法・生化学的方法で鑑別同定した。

結 果

アルカリで前処理された材料は卵を基礎とした 3% 小川および小川 K 培地と液体培地を基礎とした MB チェックおよび BACTEC ボトルに接種され、37°C で培養された。

喀痰材料 245 例を 4 システムで培養し、合計 86 株 (35.1%) のミコバクテリアが分離された (Table 1)。これらのうち 3% 小川法陽性は 65 (75.6%)、MB チェック法陽性は 81 (94.2%)、BACTEC 法陽性は 80 (93.0%) であり、液体培地を基礎とした 2 システムの分離率が 3% 小川法と比べ有意に高かった ($P < 0.01$)。液体には生えずに 3% 小川法のみ陽性例が 2 例あった。86 分離株のうち 49 株は *M. tuberculosis* complex、31 株は *M. avium* complex であり、これらで総分離株の 93.0% を占めていた。MB チェックと BACTEC システムは *M. tuberculosis* complex 総分離株の 95.9% を検出したが、3% 小川法ではこれらの 79.6% を検出

したにすぎなかった。各システムで得られた *M. avium* complex の検出割合は *M. tuberculosis* complex で得られたそれと類似していた。

MB チェックは 65 塗抹陽性材料から分離された 37 *M. tuberculosis* complex 分離株の 100% を、180 塗抹陰性材料からの 12 分離株の 83.3% を検出した (Table 2)。一方 3% 小川法の検出割合は 89.2% と 50.0% であった。なお、BACTEC の分離率は MB チェックのそれと類似していた。塗抹陽性材料からの非結核性抗酸菌 (MOTT) 18 株の 100%、陰性材料からの 19 分離株の 84.2% は MB チェックで陽性であったが、小川法の陽性率は 94.4% と 47.4% であった。すなわち塗抹陽性と陰性材料の両者からのミコバクテリアの分離率は液体を基礎とした 2 システムが従来からの卵を基礎とした培地より勝れており、この差は塗抹陰性例でより顕著であった ($P < 0.01$)。

塗抹陽性材料と陰性材料からの *M. tuberculosis* complex の検出までに要する平均日数は BACTEC で 12.6 日と 16.0 日であった (Table 3)。これに対し 3% 小川法では 20.9 日と 26.3 日であった。MB チェックシステムでの検出までに要する日数は 3% 小川法より 3~4 日短かったが BACTEC よりは劣っていた。また MOTT の検出に要する平均日数は BACTEC 5.1 日、MB チェック 12.2 日、3% 小川法 18.6 日であった。

培地の汚染は 3% 小川法で 5.3% にみられたが、MB チェック、BACTEC、小川 K では 1% 以下であった。

対照として用いた小川 K 培地は、ミコバクテリアの分離率と検出日数において 3% 小川培地のそれと差はみられなかった。

BACTEC で陽性を示したボトルについて、GI 値が 50 を越えた時点ですべてが NAP テストに供された。テストの判定は全例 5 日以内にできた。NAP テストで *M. tuberculosis* complex (NAP 5 μ g/ml 感受性)

Table 1 Isolation of Mycobacteria from 245 Sputum Specimens with Different Media

Species (no. of isolates)	No. (%) of isolates detected by the following method :			
	3% Ogawa egg	Ogawa K egg	MB-Check	BACTEC
<i>M. tuberculosis</i> complex (49)	39 (79.6)	37 (76.5)	47 (95.9)	47 (95.9)
<i>M. avium</i> com- plex (31)	24 (77.4)	26 (83.9)	28 (90.3)	30 (96.8)
Other myco- bacteria (6)	2 (33.3)	3 (50.0)	6 (100)	3 (50.0)
Total (86)	65 (75.6)	66 (76.7)	81 (94.2)	80 (93.0)

Table 2 Recovery of Mycobacteria from 245 Smear-positive and Smear-negative Specimens with Different Media

Isolates (n)	No. (%) of isolates detected by the following method :			
	3% Ogawa egg	Ogawa K egg	MB-Check	BACTEC
Smear-positive <i>M. tuberculosis</i> (37)	33 (89.2)	32 (86.5)	37 (100)	36 (97.3)
Smear-negative <i>M. tuberculosis</i> (12)	6 (50.0)	5 (41.7)	10 (83.3)	11 (91.7)
Smear-positive MOTT (18)	17 (94.4)	17 (94.4)	18 (100)	18 (100)
Smear-negative MOTT (19)	9 (47.4)	12 (63.2)	16 (84.2)	15 (78.9)

Table 3 Average Number of Days to Positive Cultures

Isolates (n)	Avg no. of days to positive cultures with the following method :			
	3% Ogawa egg	Ogawa K egg	MB-Check	BACTEC
Smear-positive <i>M. tuberculosis</i> (37)	20.9	22.3	18.0	12.6
Smear-negative <i>M. tuberculosis</i> (12)	26.3	27.0	23.3	16.0
Total <i>M. tuberculosis</i> (49)	21.7	22.9	19.1	13.4
Total MOTT (37)	18.6	20.5	12.2	5.1

と鑑別された株はすべて DNA プローブキットおよび従来からの生化学的方法でも同様に鑑別された。また NAP 5 μ g/ml に耐性の株はすべて MOTT と鑑別され、NAP テストと DNA プローブキットおよび生化学的方法による結果は完全に一致した。

考 察

ミコバクテリア症の確定診断には原因菌の分離が要求される。日本では臨床材料からのミコバクテリアの分離にこれまで長い間小川卵培地のみを使用してきた。この研究の目的は、液体を基礎とした二相性 (MB チェック) およびラジオメトリック (BACTEC) 培養システムと、従来からの卵を基礎とした培地を比較することであった。

この研究で液体培地を基礎とした 2 システムが臨床材料からのミコバクテリアの回収において卵培地より勝れていることが明らかになった。これら培養システムによる *M. tuberculosis* complex の分離率の差は統計学的に有意であった。この結果は Isenberg ら⁹⁾ および

Giger & Burkardt¹⁰⁾ の結果と一致している。しかし Anarogyros ら¹¹⁾ は BACTEC または MB チェックシステムと卵培地を用いる従来法との間に *M. tuberculosis* complex の分離率に有意の差を認めていない。この研究でみられた 2 つの培地、液体と卵の間のミコバクテリアの分離率の差は塗抹陰性材料でより顕著であった ($P < 0.01$)。

液体を基礎とした培地の高い分離率の説明の一つとして接種量の多さがあげられる¹⁰⁾⁻¹²⁾。すなわち MB チェックボトルは 20ml の培地を含んでいることから 1ml あるいはそれ以上の材料の接種が可能である。BACTEC でも 0.5ml まで接種可能であるが、従来法では 0.1ml が限度である。それ以上に液体培地を基礎としたシステムと 3% 小川法によるミコバクテリアの分離率の間の顕著な差は次のことにありと考えられる。(i) 液体培地はミコバクテリアの増殖を高める。(ii) 液体培地を基礎としたシステムではアルカリで処理後に希釈濃縮された。そのために前処理の間にミコバクテリアに与えるダメージが軽減された。

塗抹陽性と塗抹陰性材料からの BACTEC による *M. tuberculosis* complex の検出に要する日数が3%小川法よりそれぞれ8.3日と10.3日短縮できた。Morganら¹³⁾, Robertsら¹⁴⁾, Anargyrosら¹¹⁾も同様の結果を報告している。MOTT株の検出においてはさらに大きな差がみられ、13.5日早く検出可能であった。MBチェックシステムによる検出までに要する日数は3%小川法のそれより短かった。液体を基礎としたシステムでは接種量を多くすることができたことが、これらの差の一部を説明していると考えられる。

3%小川法を用いて培養した時の汚染率は5.3%であった。一方 BACTEC での汚染率は0.8%, MBチェックのそれは0.4%であった。3%小川法でみられた汚染率は Isenbergら⁹⁾, Giger & Burkardt¹⁰⁾ が卵培地を用いた方法で得られた結果とほぼ類似している。BACTEC および MB チェックシステムと小川K培地で得られた汚染率の低さは過剰な汚染除去操作によるというよりはむしろ希釈後の遠心により洗い去られたものと考えられる。

このように BACTEC システムは臨床材料からのミコバクテリアの分離において勝れたシステムである。しかし培地中に放射性物質を含むために、その使用はRI利用のための設備を完備した施設に限られる。その上使用済みボトルの廃棄のこともあり、日本で臨床検査に取り入れるのは困難と考えられる。このシステムを用いることにより迅速に結果が得られることから基礎研究の分野では有効であろう。特に抗結核薬のスクリーニングには最適と考えられる。

MB チェックも BACTEC と同様勝れたシステムである。このシステムは非ラジオメトリックという利点のみならず炭酸ガス培養が要求されないという利点も併せ持っている。日本でも多くの病院や検査センターで少しずつ取り入れられてきており、将来は普及するものと考えられる。

分子生物学の進歩に伴い、ミコバクテリアの分野でもDNAレベルで研究が進められ、多くのことが解明されてきている。しかし結核菌の抗結核薬に対する耐性についてはDNAレベルではまだ何の情報も得られていない。患者を効果的に治療するためには分離されたミコバクテリアの薬剤感受性についての情報は重要である。PCRなど遺伝子操作技術により、患者材料から直接ミコバクテリアを検出する試みがなされているが、耐性がDNAレベルで明らかになっていない現在、ミコバクテリアの分離培養は避けて通れない。

また結核菌は伝染性があるので、他のミコバクテリアと分別することは非常に重要である。液体培地を基礎とした培養システムは、結核菌の検出感度と培養速度の点で従来からの卵培地と比べ数段勝っており、その使用は

その後のDNAハイブリダイゼーション、菌種特異モノクローナル抗体、HPLCによる菌種の同定を一段と迅速化し、早期の診断および治療に寄与することが期待される。また、臨床細菌検査の分野で問題にされていた培地の品質管理と検査の精度管理の面に、大いに貢献するものと考えられる。

文 献

- 1) Middlebrook G and Cohn ML. Bacteriology of tuberculosis ; Laboratory methods. Am J Publ Health. 1958 ; 48 : 844-853.
- 2) DeLand FH and Wagner HN. Early detection of bacterial growth with carbon-14 labeled glucose. Radiology. 1969 ; 92 : 154-155.
- 3) Cummings DM, Ristroph D, Camargo EE, et al. Radiometric detection of the metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. J Nucl Med. 1975 ; 16 : 1189-1191.
- 4) Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigertt WD, et al. Automatable radiometric detection of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. Am J Respir Dis. 115 : 1066-1069.
- 5) 阿部千代治, 細島澄子 : 7H12液体培地による患者材料からの結核菌の分離, 結核. 1990 ; 65 : 663-666.
- 6) Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al. Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 878-881.
- 7) Siddiqi SH, Hwangbo CC, Silcox V, et al. Rapid radiometric methods to detect and differentiate *Mycobacterium tuberculosis*/*M. bovis* from other mycobacterial species. Am Rev Respir Dis. 1984 ; 130 : 634-640.
- 8) Rastogi N, Goh KS and David HL. Selective inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by *p*-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropionophenone (NAP) and *p*-nitrobenzoic acid (PNB) used in 7H11 agar medium. Institut Pasteur Res Microbiol. 1989 ; 140 : 419-423.
- 9) Isenberg HD, D'Amato RF, Heifets L, et al. Collaborative feasibility study of a biphasic system (Roche Septi-Check AFB) for rapid detection and isolation of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1991 ; 29 : 1719-1722.

- 10) Giger T and Burkardt HJ. Evaluation of a new biphasic culture system for the recovery of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990 ; 9 : 428-431.
- 11) Anargyros P, Astill DSJ and Lim ISL. Comparison of improved BACTEC and Loewenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1990 ; 28 : 1288-1291.
- 12) Ellner PD, Kiehn TE, Cammarata R, et al. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol.* 1988 ; 26 : 1349-1352.
- 13) Morgan MA, Horstmeier CD, DeYoung DR, et al. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J Clin Microbiol.* 1983 ; 18 : 384-388.
- 14) Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. *J Clin Microbiol.* 1983 ; 18 : 689-696.

第 67 回総会シンポジウム

I. 抗酸菌感染症の迅速診断法

4. PCR 法

新井俊彦・首藤栄治
青柳昭雄・豊田丈夫

明治薬科大学微生物学教室
国立療養所東埼玉病院内科
受付 平成4年8月14日

4. POLYMERASE CHAIN REACTION FOR IDENTIFICATION OF *MYCOBACTERIUM* IN SPUTA

Toshihiko ARAI*, Eizi SHUDO, Teruo AOYAGI
and Takeo TOYODA

(Received for publication August 14, 1992)

Polymerase chain reaction was applied to the diagnosis of mycobacterial infections. This reaction could detect bacteria in clinical specimens within a few hours. Sensitivities of the five primer systems reported in 1990 were compared. It was proved that the primer system reported by Eisenach et al. was as sensitive as culture on Ogawa's medium for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputa. Other systems were found to be less sensitive than this system, and the nested PCR should be applied to make these systems highly sensitive.

For the practical application of PCR method, we should improve the detection system to fit for the practice in clinical laboratory. High cost of PCR system could be another barrier for the practical application.

Key words : *Mycobacterium*, Polymerase chain reaction, DNA, Identification

キーワードズ : 抗酸菌, PCR, DNA, 同定

はじめに

肺結核症は、現在年間5万人の新患者が発生する疾患である。その診断は、喀痰などの臨床材料からの結核菌の証明によって行われている。結核菌の培養には4～6週間が必要であり、同定のため性状検査にも2週を要す

る。しかし、感染症には早期治療が良く、そのためには、早期診断が必要である事は論を待たない。

PCR法はごく少数の細菌のDNAを増幅、同定できる方法であり、短時間で検出を可能にする¹⁾。すでに1990年には、抗酸菌検出のために5つの独立な検出系の報告があり、それぞれ異なった特徴を持っている^{2)~6)}。

*From the Department of Microbiology, Meiji College of Pharmacy, 1-35-23 Nozawa, Setagaya-ku, Tokyo 154 Japan.

そこで、これらを比較して、簡便、迅速、高感度、正確で実用的な方法を確立することを試みることにした。

Eisenach らの方法²⁾は、結核菌の染色体が持つ繰り返し DNA 配列⁷⁾を検出する方法で、1つの細胞当たり数十個の配列が含まれるので感度の良い方法として紹介された。これは *M. tuberculosis* と *M. bovis* のみに特異的であると報告されている。Pao らの方法³⁾は、染色体上に1つしかない配列を調べるので感度は悪いが、すべての抗酸菌が検出できるものとして報告されている。Patel らの方法⁴⁾および Hermans らの方法⁵⁾は、それぞれ特異な抗酸菌種を検出するものである。Bödding-

haus らの方法⁶⁾は ribosome RNA の DNA を検出する方法で、DNA の検出は感度が悪いが、RNA を検出するシステムを用いれば高感度な方法となる。また、この方法では、増幅後にハイブリダイゼーションを行うことによって、全抗酸菌種を同定できることが強みである。

材料と方法

1) 検体：抗酸菌種の標準菌株は表2に示したものを使用した。患者喀痰は東埼玉病院の臨床材料で、培養検査のために処理した材料を -20°C に保存しておいたも

図1 DNA 精製法

100 ml Middlebrook 7H9 培地+0.05% Tween 80 [500 ml フラスコ]
 ↓
 37°C 振盪培養
 ↓
 ↓
 後期対数増殖期+D-cycloserine (最終濃度 1 mg/ml) 37°C 48 時間
 ↓
 STE [10 mM Tris (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA] で洗浄
 ↓
 6,000 rpm 10' 遠沈, 4°C
 ↓
 2 ml lysis buffer [15% sucrose, 50 mM Tris (pH 8.5), 50 mM EDTA] で溶解
 ↓
 + lysozyme (最終濃度 1 mg/ml) 37°C 30'
 ↓
 + proteinase K (最終濃度 0.1 mg/ml) 25°C 10'
 ↓
 + SDS (最終濃度 1%) 混和, + 5 ml 蒸留水, 37°C 2 hr
 ↓
 + 2 容 phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1)
 ↓
 9,000 rpm 10' 遠沈, 4°C
 ↓
 aqueous phase + chloroform-isoamylalcohol (24:1)
 ↓
 9,000 rpm 10' 遠沈, 4°C
 ↓
 aqueous phase + RNase A (最終濃度 1 mg/ml) 25°C 1 時間
 ↓
 TE buffer [10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA] に対して透析
 ↓
 + 2 容 冷エタノール, -20°C 1 夜
 ↓
 9,000 rpm 30' 遠沈, 4°C
 ↓
 70% エタノールで洗浄
 ↓
 乾燥
 ↓
 1 ml TE に溶解 → [DNA 溶液]

図2 DNA 抽出法

小川培地培養菌/[患者喀痰]
 1 ml 蒸留水に溶かす (1.5 ml Eppendorf tube).
 ↓
 + 0.2 ml 4N NaOH を加え, Vortex 混和する。
 ↓
 15,000 rpm 2', 1 ml 蒸留水に溶かす。Vortex 混和する。
 ↓
 15,000 rpm 2', 1 ml 蒸留水に溶かす。Vortex 混和する。
 ↓
 [10 μl 1M TrisHCl (pH 7.5) + 2 μl DNaseI (10 mg/ml in 0.15 M NaCl)]
 ↓
 37°C, 30'
 ↓
 15,000 rpm 2', 1 ml アセトンに溶かす。Vortex 混和する。
 ↓
 15,000 rpm 2', 1 ml アセトンに溶かす。Vortex 混和する。
 ↓
 15,000 rpm 2', 1 ml 沈渣を乾燥する。
 ↓
 0.2 ml の TE buffer に溶かす。Vortex 混和する。
 ↓
 + 0.05 ml proteinase K (final 1 mg/ml) を加え, 37°C 60' 処理。
 ↓
 + 0.25 ml の 2% SDS を加え, 60°C 超音波洗浄槽 30' 処理。
 ↓
 + 0.5 ml phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) を加え, 混和。
 ↓
 15,000 rpm 5'
 ↓
 水層を新しい tube に取り, 0.5 ml の chloroform を加えて, 混和。
 ↓
 15,000 rpm 5'
 ↓
 水層を新しい tube に取り, 2 容の冷エタノールを加え, -80°C 60' 処理。
 ↓
 15,000 rpm 5', 70% エタノールで洗浄後, 乾燥。
 ↓
 50 μl の TE buffer に溶かす。→ [DNA 溶液]

表1 使用プライマー

プライマー	塩基配列	検出菌	文献
1	5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCCG-3' 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> (<i>M. simiae</i>)	2
2	5'-CTAGGTCGGGACGGTGAGGCCAGG-3' 5'-CATTGCGAAGTGATTCCCTCCGGAT-3'	Most of <i>Mycobacterium</i>	3
3	a : 5'-GGGTCGGTACTCCGGGCGCT-3' 5'-CGGTGGGAACGGGGGCGCT-3' b : 5'-TACGGATTCGTCACCGTCAT-3' 5'-CACCGCGGAACACT-3'	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. avium</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. scrofulaceum</i>	4
4	a : 5'-GGTCCTGACGTAATGGGGT-3' 5'-CGCCCATCCACATCCCGCCC-3' b : 5'-CTCAAGGAGCGCAAGCACCG-3' 5'-TTGAAGCGATCTGCTT-3'	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. microti</i> <i>M. africanum</i> <i>M. leprae</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i>	5
5	primer : a sequence of small subunit rRNA common and specific for all <i>Mycobacterium</i> species. probes : specific sequences for each species on the above sequence.		6

のを、2回に分けて調べた。全部で127検体を調べた。

2) DNAの抽出・精製: 感度測定用の精製DNAはEisenachらの方法²⁷⁾に従ってMiddlebrook 7H9培地で培養した菌体から調製した(図1)。生菌数計算による感度の測定には、小川培地で培養した菌を蒸留水に浮遊し、NaOH処理によって均一に懸濁した菌液から図2に示した方法によってDNAを抽出した。これらのDNAは、各検出系の陽性域を調べるのにも用いた。喀痰からのDNAの抽出もこの方法によった。この場合、懸濁菌液をDNase I処理して混入する組織細胞のDNAを除いた。

3) PCR試験: 代表的抗酸菌の精製DNAでの検出感度の試験には表1に示す5種のプライマーを用いたが、1はEisenachら、2はPaoら、3はPatelら、4はHermansら、5はBöddinghausらのプライマーである。検出域の検討および患者喀痰での検索にはEisenachらおよびPaoらのプライマーのみを用いた。

反応は、0.5mlのチューブに、5 μ lの被験DNA液、5 μ lの5X Reaction Mix (335mM Tris-HCl (pH 8.8), 1mM dNTP, 83mM (NH₄)₂ SO₄, 1mg/ml gelatin, 2.25% Triton X-100), 2 μ l 25mM MgCl₂, 各1 μ Mのプライマーおよび2単位のTaq polymeraseを加えて水で25 μ lとし、良く混合後、それに25 μ lのparaffin oilを重層して、Zymoreactor (アトールKK, 東京)で行った。変性は94°C, 2分、プラ

イマー結合は60~68°C, 2分、複製は72°C, 2分とし、これを25回行った。最終産物は2%アガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロミドで染色後、長波長紫外線で生成されたDNAのバンドを観察した。分子量マーカーには ϕ X174 RF DNAのHaeIII断片およびHinf

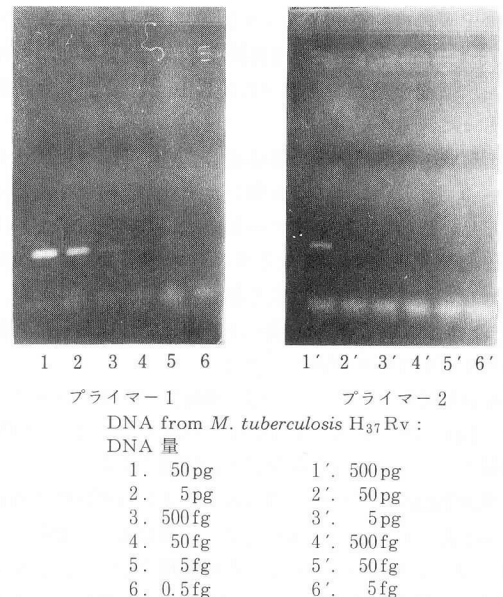


図3 精製DNAでの結核菌検出感度



プライマー 1 使用：
 マーカー： ϕ X174 RF DNA/HaeIII ; 72, 118, 194, 234,
 281, 271, 310, 603, 872, 1078, 1353 bps
 DNA from *M. tuberculosis* H₃₇Rv
 DNA 量(生菌数)
 1. ++
 2. +
 3. 150
 4. 20
 5. <10
 6.
 7. 精製 DNA
 8. マーカー

図 4 小川培地菌の DNA での結核菌検出感度

I 断片を用いた。

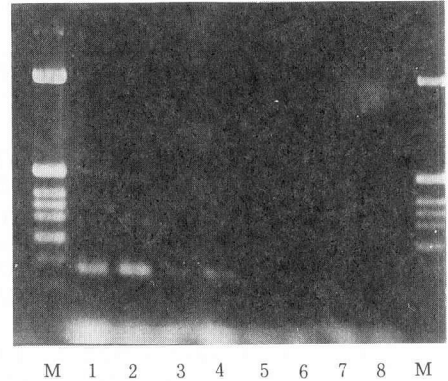
結 果

検出感度：Middlebrook 7H9 培地で培養した菌体から調製した DNA で調べたプライマー 1 および 2 による検出限界は、それぞれ 100fg および 10pg であった(図 3)。また、小川培地培養菌液を出発材料にしたものでも、菌液の培養でそれぞれ集落 10 個および 1,000 個であった(図 4)。

菌種域：標準菌株の小川培地培養菌体で調べたプライマー 1 (図 5) および 2 を用いた PCR の結果を表 2 に示した。しかし、プライマー 1 では、再結合温度を下げると他菌種株でも、異なるサイズの増幅 DNA が検出された。プライマー 2 は広く各菌種で陽性であったが、BCG 株は陰性であり、幾つかの菌種では目的とは異なるサイズの DNA が増幅された。

その他のプライマー：一部の菌株についてプライマー 3, 4 および 5 を用いた PCR を試みた。これらも感度は低く、プライマー 5 を除いて菌種域も狭かった。

患者喀痰からの検出：表 3 および 4 に喀痰材料の成績を示した。材料は Gaffky 号数、培養によって分け、プライマー 1 および 2 での PCR の成績を調べた。また、最後に、同定の結果によって整理した。培養陰性のものは同定できないが、以前の培養で *M. tuberculosis* が



プライマー 1 使用
 マーカー： ϕ X174 hinf I ; 75, 154, 220, 298, 344, 396,
 507, 517, 1632 bps
 菌種：1. *M. tuberculosis* H₃₇Rv
 2. *M. tuberculosis* 青山 B
 3. *M. bovis* BCG
 4. *M. bovis* NIHJ 1921
 5. *M. kansasii* NIHJ 1619
 6. *M. intracellulare* NIHJ 1618
 7. *M. avium* NIHJ 1605
 8. *M. goodii* NIHJ 1617

図 5 PCR 法による抗酸菌検出

検出されているものは *M. tuberculosis* の成績に加えた。これらの成績をまとめたのが表 5 である。

考 察

精製結核菌 DNA を用いた検出限界は、プライマー 1 および 2 では 100fg および 10pg であった。これはそれぞれ細胞 10 個および 1,000 個に相当する。また、小川培地培養菌液を出発材料にしたものでも、菌液の培養でそれぞれ集落 10 個および 1,000 個で、DNA で調べた結果と同じであった。したがって、1 回の PCR で得られる検出感度は生菌ではこの程度であると結論できる。

プライマー 1 の菌種域は Eisenach らの報告通り *M. tuberculosis* および *M. bovis* に特異的であった。しかし、再結合温度を下げると、他の菌種株でも異なるサイズの増幅 DNA が検出され、68°C と高い温度で行う必要があった。プライマー 2 は広く各菌種で陽性であったが、BCG 株で陰性であり、幾つかの菌種では目的とは異なるサイズの DNA が増幅された。その他のプライマーでも、感度はプライマー 2 と同程度であり、検出菌種域もそれぞれの報告通り狭かった。プライマー 2 およびこれらのプライマーを第 1 選択で使用する必要がある時には、1 回の PCR では十分な増幅が得られないので、2 回以上の操作を繰り返す nested PCR が必要で

表2 PCRによる検出

Runyon 分類	菌種	株番号	PCR		
			プライマー1	プライマー2	
結核菌群	<i>M. tuberculosis</i>	H ₃₇ Rv	+	+	
		青山B	+	+	
	<i>M. bovis</i>	BCG	+	-	
		ATCC1921	+	+	
I	<i>M. kansasii</i>	NIHJ1619	-	+	
		<i>M. marium</i>	S-5	-	(+)
		<i>M. simiae</i>	NIHJ1627	-	-
II	<i>M. scrofulaceum</i>	NIHJ1626	-	+	
		<i>M. szulgai</i>	649	-	(+)
		<i>M. gordonae</i>	NIHJ1617	-	+
III	<i>M. avium</i>	NIHJ1605	-	+	
		S-9	-	+	
		NIHJ1618	-	+	
	<i>M. xenopi</i>	NIHJ1638	-	+	
	<i>M. gastri</i>	NIHJ1616	-	?	
	<i>M. nonchromogenicum</i>	NIHJ1622	-	(+)	
	<i>M. terrae</i>	NIHJ1630	-	(+)	
	<i>M. triviale</i>	NIHJ1632	-	+	
	IV	<i>M. fortuitum</i>	NIHJ1615	-	+
			NIHJ1609	-	(+)
<i>M. chelonae</i>		NIHJ1628	-	+	
<i>M. phlei</i>		NIHJ1624	-	+	
<i>M. flavescens</i>		NIHJ1614	-	+	

ある。

患者喀痰のPCR検出では、培養による検出とプライマー1によるPCR検出の一致率を調べた。Gaffky号数が5以上では培養が陰性でもPCRは陽性であるが、それ以下では培養が陰性であるとPCRも陰性になった。一方、培養陽性のもはGaffky号数が0であってもPCR陽性であった。これは生菌と死菌ではPCRの検出限界が異なり、生菌では少数の菌でも検出できるが、死菌では多数の菌体が存在しないとPCRは陽性にならないことを示している。プライマー2の成績が良くないのは感度が低いことによるもので、2回以上の操作を繰り返すnested PCRが必要なのであろう。

現在では、さらに多くのMycobacterium検出用のプライマーが報告されているが、まだ単純なPCR操作では、Eisenachらより感度の高いプライマーはなく、いずれも感度を上げるためにnested PCRによっており、Böddinghausらの方法⁶⁾では、逆転写操作を必要としている。しかし、この操作を行えば、この方法が現在報告されている方法中では最も高感度であると考えられる。

良いプライマーを選べば、抗酸菌検出にPCR法が迅速、高感度、正確であることは示すことができた。しかし、検出方法が現在の検査室の一般的な方法とは異なるので、検出方法を検査室向けに改良する必要がある。また、

PCR法がパテントによって縛られているので経費を安くできないことも問題であろう。

まとめ

表1に示したEisenachらのプライマー(1)とPaoらのプライマー(2)を用いてPCR法で簡単迅速に結核菌と他の抗酸菌の識別検出が可能であることが示された。また、PCRによる迅速検査が、実用上は培養に匹敵する感度があることが患者喀痰でも証明された。他にPatelらおよびHermansらのプライマー(3および4)があるが、検出域が結核菌とその他の抗酸菌の識別に適当でなかった。また、Böddinghausら(5)はrRNAを材料にして、菌種レベルの同定系を開発している。感度は良好であるが、検出にPCR系に加えて逆転写系を用いるので、経費が高くなりすぎ、実用的でないと考えられた。PCR法の実用上の弱点は、経費がかさむことである。また、検査室に導入するには検出方法にも改良が必要であろう。

文 献

- 1) Innis HA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ, eds. : PCR Protocols, A guide to methods and application, Academic Press, Inc, USA, 1990.

表3 患者喀痰からの検出(1)

検体番号	患者名	検査日	検鏡検出 (Gaffky 号数)	培養検出	PCR 検出		菌種
					プライマー-1	プライマー-2	
1		6-15	9	+++	+	?	T
2		6-8	9	+++	+	+	T
3		6-7	9	+++	+	+	T
4		6-7	9	+++	+	+	T
5		6-24	8	+++	+	+	T
7		4-11	8	+++	+	+	T
8		4-8	8	+++	+	+	T
9'		6-18	8	+++	+	?	T
9		6-5	8	+	+	+	T
10		6-4	8	?	-	+	T
11		6-17	7	++	+	?	T
12		6-15	7	++	+	?	T
13		6-13	7	+++	+	?	T
16		4-8	7	+	+	+	T
17		4-8	6	++	+	?	T
18		6-5	6	+	+	?	T
19		6-12	5	+++	+	+	T
13'		6-19	5	+++	+	+	T
4'		4-2	5	+++	+	?	T
1'		6-4	5	+++	+	?	T
22		4-24	5	++	+	-	T
23		6-3	4	+++	+	-	T
25		4-6	4	-	±	?	?
26			4	-	±	?	?
15'		6-19	4	-	-	-	?
28		4-12	3	+++	+	?	T
29		6-19	3	++	+	?	T
30			3	+	+	?	T
6'		4-2	3	-	-	?	?
31		4-22	2	+++	±	?	T
5'		3-6	2	+++	+	?	T
34			2	+	±	?	T
35		4-12	2	-	±	?	?
3'		4-2	2	-	-	?	?
8'		4-2	2	-	-	?	?
36			2	-	-	?	?
37		6-14	0	+++	+	+	T
38		4-22	0	+++	+	-	T
39		4-5	0	+++	+	+	T
40		4-18	0	++	+	-	T
19'		4-10	0	++	-	-	T
43		4-24	0	+	+	-	T
14'		4-10	0	+	+	+	T
44		4-11	0	+	+	+	T
45		4-6	0	+	+	+	T
12'			0	+	-	-	T
46		6-22	0	-	-	-	?
11'		4-11	0	-	-	-	?
47		5-8	0	-	±	-	?
17'		4-8	0	-	-	-	?
49		5-1	0	-	-	-	T?
18'		4-11	0	-	-	-	?
50		4-18	0	-	±	-	T?
52		4-8	0	-	-	-	T?
53		4-8	0	-	-	+	T
48		5-7	0	-	-	+	T
54		4-2	0	-	-	-	T?
6		6-4	8	+++	-	?	A
14		4-18	7	++	-	-	A
20		6-6	5	+++	-	-	A
21		4-20	5	+++	-	?	A
2'			5	+	-	?	A
27		4-19	3	+++	-	-	A
32		4-10	2	++	-	-	A
7'		6-13	2	+	-	?	A
42		4-4	0	++	-	+	A
15		4-7	7	++	-	-	I
24		4-5	4	++	+	?	I
33		4-18	2	+	+	?	I
41		4-18	0	++	-	+	I
51		4-10	0	-	+	+	I

表4 患者喀痰からの検出(2)

検体 番号	患者名	検査日	検鏡検出 (Gaffky 号数)	培養検出	PCR 検出		菌種
					プライマー-1	プライマー-2	
7		7-6	9	+++	+	+	T
12		6-26	9	+++	+	?	T
32		7-6	9	+++	+	+	T
44		10-25	9	+++	+	?	T
20		7-18	9	++	+	?	T
28		7-11	9	++	+	+	T
30		7-11	9	++	±	-	T
41		10-23	9	+++	+	?	T
1		8-2	8	+++	+	+	T
31		7-24	8	+++	+	-	T
33		7-23	8	+++	+	+	T
46		10-28	8	+++	+	?	T
3		7-30	8	++	+	+	T
25		7-16	7	+++	±	-	T
27		7-24	7	+++	+	-	T
10		7-29	7	++	+	+	T
13		7-11	7	+	-	?	T
34		10-9	7	-	±	-	T?
52		9-9	7	-	+	?	T?
24		6-25	6	+++	+	-	T
29		7-12	6	+++	+	-	T
53		9-19	6	+++	-	?	T
42		10-23	6	++	+	?	T
37		10-8	6	+	+	-	T
11		7-13	5	+++	+	+	T
6		7-18	5	+	-	?	T
22			5	-	±	-	T?
40		10-10	5	-	+	±	T?
17		7-9	4	+	-	?	T?
2		7-18	4	-	-	?	T?
23		7-10	4	-	-	-	T?
14		7-9	3	+++	+	?	T
16		7-2	3	+++	+	?	T
9		7-23	3	++	+	?	T
43		10-7	3	+++	-	?	T
45		10-24	2	-	-	?	T
35		4-10	0	+	+	-	T
36		4-11	0	-	-	-	T?
38		4-11	0	-	-	-	T?
8			7	+++	-	?	A
51		10-24	6	+	-	?	A
47		10-24	6	+++	-	?	A
4		7-18	5	++	-	?	A
50		10-21	5	+	-	?	A
19		7-6	3	++	-	?	A
18		7-8	3	+	-	?	A
49		10-19	2	++	-	?	A
15		7-8	1	+	-	?	A
26		7-18	7	+	+	-	I
5		7-18	3	+	-	?	I
48		10-25	3	+	-	?	I
21		7-6	4	++	-	-	K
39		11-6	0	-	-	-	?

T: *M. tuberculosis*, A: *M. avium*, I: *M. intracellulare*, K: *M. kansasii*

表5 患者喀痰からの検出率(合計)

[<i>M. tuberculosis</i>]			PCR		培養との
鏡検			陽性数	検出率	一致率(%)
Gaffky 号数	培養	検体数			
9	+	12	12	100	100
8	+	11	10	90	90
7	+	8	7	84	84
7	-	2	2	100	0
6	+	10	9	90	90
5	+	7	6	84	84
5	-	2	2	100	0
4	+	2	1	50	50
4	-	5	2	40	60
3	+	7	6	84	84
3	-	1	0	0	100
2	+	3	3	100	100
2	-	5	1	20	80
0	+	11	9	81	81
0	-	13	2	17	83
合計	+	71	63	89	89
	-	28	9	32	68
[<i>M. avium</i>]					
8~0	+	18	0		
[<i>M. intracellulare</i>]					
7~0	+	7	3		
	-	1	1		
[<i>M. kansasii</i>]					
4	+	1	0		
[不明]					
0	-	1	0		
総計		127			

- 2) Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Dis. 1990 ; 161 : 977-981.
- 3) Pao CC, Yen TSB, You J-B, et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J Clin Microbiol. 1990 ; 28 : 1877-1880.
- 4) Patel RJ, Fries JWU, Piessens WF, et al. Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1990 ; 28 : 513-518.
- 5) Hermans PWM, Schuitema ARJ, Soolingen DV, et al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1990 ; 28 : 1204-1213.
- 6) Böttchinghaus B, Rogall T, Flohr T, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol. 1990 ; 28 : 1751-1759.
- 7) Eisenach KD, Crawford JT and Bates JH. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1988 ; 26 : 2240-2245.

第 67 回総会シンポジウム

I. 抗酸菌感染症の迅速診断法

5. 抗酸菌症に対する DNA probe 法と PCR 法

古賀宏延・宮崎義継・河野茂
前崎繁文・賀来満夫・原耕平

長崎大学第2内科

受付 平成4年8月14日

5. DNA PROBE AND POLYMERASE CHAIN REACTION FOR
DETECTION AND IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA

Hironobu KOGA^{*}, Yoshitsugu MIYAZAKI, Shigeru KOHNO,
Shigefumi MAESAKI, Mitsuo KAKU and Kohei HARA

(Received for publication August 14, 1992)

The DNA probe and polymerase chain reaction (PCR) technique for detection and identification of mycobacteria were compared with the conventional smear and culture method.

The results of identification by DNA probe agreed well with those of the biochemical method. Moreover, six percent of *Mycobacterium avium* complex (MAC) were revealed to be mycobacteria other than MAC by DNA probe.

The nested PCR for detection of gene coding protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* complex showed excellent specificity and sensitivity. Then we applied this technique to rapid detection of *M. tuberculosis* in 222 clinical samples. The agreement between nested PCR and the biochemical method was excellent, and 17 cases were diagnosed by only nested PCR in spite of negative results by smear and culture. These cases were unlikely to have yielded false positive results since their clinical features were compatible to tuberculosis.

From these data, it was considered that the DNA probe and PCR technique were extremely useful strategies and would contribute to rapid diagnosis of mycobacterial infectious diseases.

Key words : Mycobacteria, DNA probe,
PCR, Rapid diagnosis

キーワード : 抗酸菌, DNAプローブ, PCR, 迅速診断

* From the Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1, Sakamoto, Nagasaki 852 Japan.

はじめに

1950年代には300万人、1960年代には160万人と猛威をふるったわが国の結核症も、1989年には約24万人に減少し、一見順調に低下しているかにみえた。ところが1985年から5年間の年間患者発生数をみても、いずれも5万人台を推移し、ほとんど横ばいか、わずかながら増加しており、とくに若年者での減少速度の鈍化が目立つ。また全世界的にみても、未だに年間1,000万人の結核患者が発病し、とくに開発途上国においてその傾向が著明である。さらに今後は患者の老齢化や compromised host の増加、AIDS患者での発症¹⁾など、結核症あるいは非定型抗酸菌症の病態がさらに複雑化することが予想され、その早期診断法と有効な治療法の確立が強く望まれるところである。

結核症の診断は、臨床症状、ツベルクリン反応、X線検査、結核菌検査などによりなされるが、これらの技術は100年も前に開発されたもので、その後目新しい診断法の進歩はみられていない。確定診断には検体中の結核菌の証明が重要であり、その最も迅速な方法が塗抹検鏡である。しかし抗酸菌がみえても結核菌か非定型抗酸菌かをすぐには同定出来ないことや、ガフキー陰性例も多いことから、いずれにせよ培養検査も同時に施行しなければならない。ところが小川培地にコロニーが確認できるようになるまでには最低でも1~2カ月を要し、その後ナイアシントテストや同定検査が可能となるなど、一連の検査が終了するまでには長期間を要する欠点がある。

一方、1970年代に入りウイルス学や腫瘍学の分野において、分子生物学の技術が急速に進歩し、しだいに他の分野でも応用されるようになってきた。感染症の分野でも微生物の各種遺伝子の解明が進む一方で、このような技術を臨床診断にも応用することが考えられるようになり、まずはじめに DNA probe 法、次いで polymerase chain reaction (PCR) 法が開発された。目的とする微生物に特異的な核酸の塩基配列を検出しようとする試みは、理論的にも、また実際の臨床検体に対してもその優れた有用性が示されており、われわれも今回さらに高感度の PCR 法について若干の検討を試みたのでその結果を報告する。

材料および方法

I. DNA probe 法

1) 供試菌株

長崎大学第2内科およびその関連施設にて臨床材料から分離され、生化学的に同定された抗酸菌240株 (*M. tuberculosis* 109株, *M. avium* complex 101株, *M. gordonae* 7株, *M. fortuitum* 6株, *M. scro-*

fulaceum 6株, *M. nonchromogenicum* 5株, *M. kansasii* 3株, *M. chelonae* 1株, *M. xenopi* 1株, *M. szulgai* 1株) を使用した。

2) DNA probe

Gen-Probe社で開発された抗酸菌同定用の DNA probe (Rapid diagnostic system)²⁾³⁾ を用い、付属のマニュアルに準じ、以下のような手順で検査を施行した。1%の小川培地上に分離培養された抗酸菌を2mlの滅菌蒸留水に浮遊させ、菌量を McFarland No. 1 に調整した。100 μ l の菌浮遊液を15分間超音波処理後、¹²⁵I でラベルした DNA probe 溶液1mlを加え、72°Cで1時間培養した。その後4mlの分離液を加え、同じ条件下に5分間反応させた後、3,000gで2分間遠心し、上清を捨て、もう一度洗浄後に沈渣の放射活性を γ カウンターにて1分間測定した。この計測値と全放射活性の比から%ハイブリダイゼーション値を算出し、この値が10%以上を陽性とした。

II. Nested PCR 法

1) 供試菌株

使用した抗酸菌は、当教室の保存株および京都大学胸部疾患研究所の久世文幸教授から分与された以下の9菌種を用いた。*M. tuberculosis* (KMC T101, H37Rv), *M. bovis* (KMC T210, BCG), *M. scrofulaceum* (ATCC19981), *M. gordonae* (ATCC1470), *M. avium* (KMC3101), *M. intracellulare* (ATCC 13950), *M. xenopi* (ATCC19156), *M. malmoense* (ATCC22619), *M. haemophilum* (ATCC27501)。一般細菌は標準菌株および臨床分離株の下記8菌種を用いた。*S. epidermidis* (ATCC12228), *S. aureus* (ATCC25923), *E. coli* (ATCC25922), *E. cloacae* (ATCC23355), *S. marcescens* (ATCC8100), *P. aeruginosa* (ATCC27853), *A. calcoaceticus* (臨床分離株), *P. mirabilis* (臨床分離株)。抗酸菌は Middlebrook 7H9 broth (Difco Laboratories) で、一般細菌は LB medium⁴⁾ にて培養、増菌させた。*M. tuberculosis* の一部は菌数定量を行い、10倍希釈系列を作成後、10⁴ CFU から 10⁻⁴ CFU までの範囲でそれぞれ後述する PCR を施行し、菌数による検出限界を検討した。

2) 菌体からの DNA 抽出および臨床検体の処理

Table 1 に示したように、培養菌からの DNA 抽出は基本的に Maniatis ら⁴⁾ の方法に準じて行った。*M. tuberculosis* から抽出した DNA の一部は、Fluorometer (Model 450, Sequoia-Turner corporation) にて DNA 量を測定し、10倍希釈系列を作成後、1ng から 1fg までの範囲でそれぞれ PCR を施行し、DNA 量による検出限界を検討した。

各種臨床検体の内訳は喀痰 70 検体、胸水 48 検体、胃

Table 1 Preparation of DNA from Bacteria and Clinical Samples

-
- 1) Isolation of DNA from cultured bacteria
- Mycobacteria was grown in Middlebrook 7H9 broth
 - The other bacteria was grown in LB medium
 - centrifuge and resuspend in Tri-Glu-EDTA solution
 - add lysozyme for Gram-negative bacteria, or lysostaphin for Gram-positive bacteria and incubate 5 min. at room temperature
 - add 0.2 N NaOH/1% SDS and incubate 5 min. on ice
 - add 3M KOAc and incubate 10 min. on ice
 - centrifuge and remove supernatant to another tube
 - add isopropanol and incubate 10 min. at room temperature
 - centrifuge and resuspend in TE buffer
 - extract DNA with phenol and chloroform, and recover by ethanol precipitation
- 2) Preparation of clinical samples
- add dithiothreitol (1mg/ml) and incubate 20 min. at room temperature when the sample is sputum, whereas the other samples were not treated
 - centrifuge and resuspend in TE buffer
 - add lysozyme and incubate 90 min. at 37°C
 - add proteinase K and 3% SDS, then incubate 30 min. at 60°C
 - extract DNA with phenol and chloroform, and recover by ethanol precipitation
-

液 31 検体, 肺胞洗浄液 25 検体, 髄液 16 検体, 腹水 4 検体, 血液 6 検体, 尿 8 検体, 骨髄 4 検体, 生検組織 6 検体, 膿 4 検体の計 222 検体で, 各々について塗抹, 培養および Nested PCR を施行し比較検討した。なお, 同一症例から複数回提出された同一種類の検体で検査結果が異なる場合は, 陽性所見が得られた時の検体を代表して 1 検体とみなした。すべての検体は lysozyme, proteinase K 処理を施行し, phenol, chloroform にて全 DNA を抽出後, ethanol 沈殿にて回収した。なお, 検体が喀痰の場合のみ上記処理の前に Dithiothreitol と反応させた。

3) プライマーの作成および PCR の条件

Table 2 に示したように, Bengard Andersen ら⁵⁾ が報告した, *M. tuberculosis* の 38KDa 蛋白 (protein antigen b, Pab) をコードする遺伝子の塩基配列を特異的に増幅するプライマーを作成した。第 1 段階 PCR 用には Sjöbring ら⁶⁾ が報告したプライマーの塩基配列と同じものを, 第 2 段階 PCR 用にはその内側の塩基配列を参考にして 18 塩基のプライマーを考案し, それぞれ DNA synthesizer (Model 380B, Applied Biosystems) にて合成した。

PCR の反応液および条件は Table 2 に示したものを

用い, DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus) にて増幅した。第 1 段階 PCR が終了後に, その増幅産物を含んだ反応液を 10 μ l 採取し, 新しい 90 μ l の反応液と混合し, 1 回目と同じ条件下に第 2 段階 PCR を施行した。終了後の増幅産物の検出には, 3% アガロースゲル内電気泳動を施行し, ethidium bromide 染色にてバンドを確認した。検出されたバンドが目的とする遺伝子に特異的なものかどうかを判定するためには, *M. tuberculosis* (H37Rv) から得られた第 2 段階 PCR 産物を probe として用い, 検体の第 1 段階 PCR 産物を ECL gene detection system (RPN2101, Amersham International plc) を用いた Southern blot hybridization を施行し, バンドの有無で特異性を確認した。

結 果

I. DNA probe 法

生化学的同定結果と DNA probe 法による同定結果とを対比して Table 3 に示した。結核菌群同定用 DNA probe は生化学法の結果とよく一致し, 感度および特異性ともに 100% であった。

また *M. avium* complex (MAC) 同定用 DNA probe は, 生化学的に MAC と同定された 101 株に対

Table 2 Synthetic Oligonucleotides and PCR Condition

1) Primers used
• First set primers
5'-ACC ACC GAG CGG TTC GCC TGA-3'
5'-GAT CTG CGG GTC GTC CCA GGT-3'
• Second set primers
5'-TGA CGT TGG CGG GAG CGG-3'
5'-ATG GTG CCC TGG TAC ATG-3'
2) PCR mixture (total 100 μ l)
• 90 μ l of a reaction mixture :
50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl ₂ ,
100 μ g gelatin/ml, each deoxynucleotides
20 pmol of a pair of primer
• 10 μ l of a target DNA
3) PCR condition
• put 100 μ l of light mineral oil on PCR mixture,
and denature at 98°C for 10 min.
• add AmpliTaq enzyme (2.5U), followed by thermocycling profile.
Denaturation 92°C 2 min.
Annealing 58°C 1 min.
Extension 72°C 2 min.
Cycles 35 (First and second PCR each)
4) Analysis of PCR product
• run on 3% agarose gels (NuSieve GTG agarose) in TBE buffer,
and stain with ethidium bromide

Table 3 Comparative Result of Biochemical Identification and DNA probe

		DNA probe for <i>M. tuberculosis</i> complex		DNA probe for <i>M. avium</i> complex	
		+	-	+	-
Biochemical identification	+	109	0	95	6
	-	0	127	0	43
Sensitivity (%)		100		94	
Specificity (%)		100		100	

し、95 株には陽性を示したが、残りの 6 株には陰性で、感度は 94 %、特異性は 100 %であった。

II. Nested PCR 法

1) PCR の特異性

各種抗酸菌に対する特異性を検討した結果、Fig. 1 に示したように、419bp の第 1 段階 PCR 産物は、結核菌群 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) のみに検出され、その他 7 菌種の抗酸菌には認められなかった。*M. xenopi* のレーンに分子量が異なるバンドがみられたが、Southern blot hybridization の結果、目的とする遺

伝子断片ではないことが確認された。また一般細菌の 8 菌種に対する特異性を Fig. 2 に示した。*E. coli* や *E. cloacae* などに対して分子量が異なる数本のバンドが検出されたものの、Fig. 3 に示した Southern blot hybridization の結果これらのバンドは消失し、非特異的なものであることが確認された。

2) Nested PCR の感度

① 菌数による検出限界

Fig. 4 に示したように、第 1 段階 PCR の検出限界は *M. tuberculosis* 10² CFU であったが、続いて第 2 段

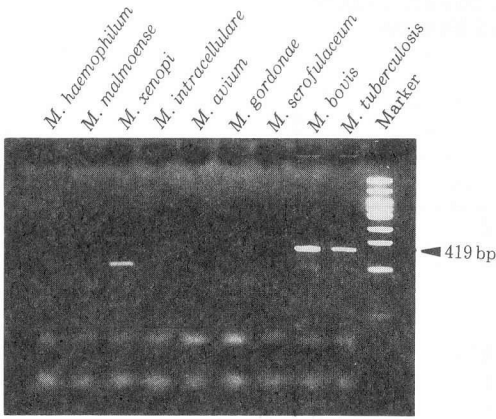


Fig. 1 Specificity of PCR against Mycobacteria

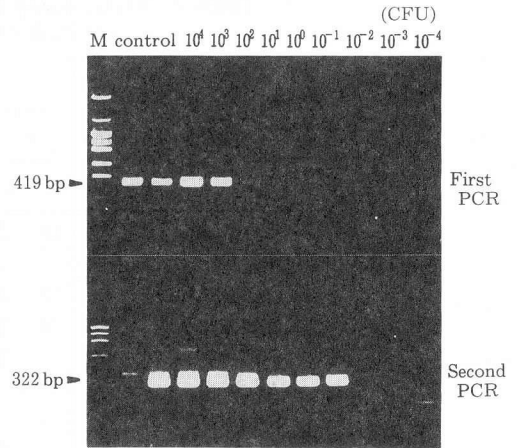


Fig. 4 Sensitivity of First and Second PCR by Serial Dilution of *M. tuberculosis*

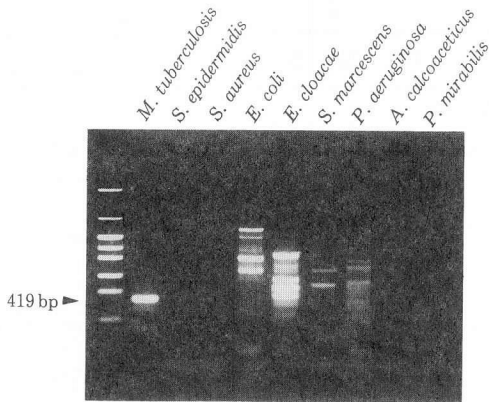


Fig. 2 Specificity of PCR against Gram-Positive and -Negative Bacteria

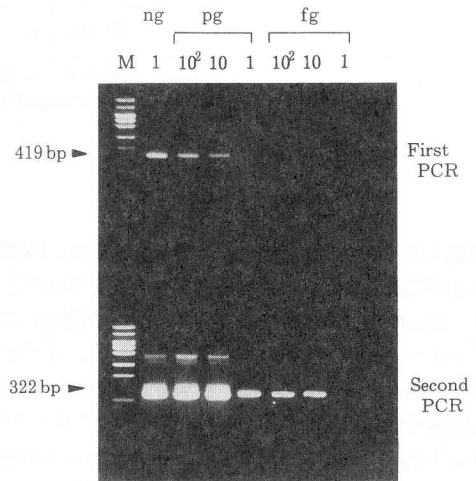


Fig. 5 Sensitivity of First and Second PCR by Serial Dilution of DNA Extracted from *M. tuberculosis*

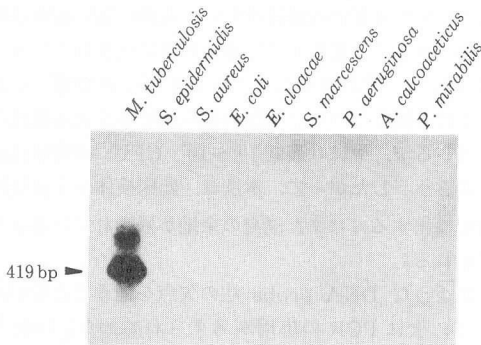


Fig. 3 Southern blot Hybridization of PCR Product Shown in Fig. 2.

階 PCR を行うと 1,000 倍感度が上昇し、 10^{-1} CFU まで検出可能となった。

② DNA 量による検出限界

Fig. 5 に示したように、第 1 段階 PCR の検出限界は 10pg の DNA 量であったが、続いて第 2 段階 PCR を行うとやはり 1,000 倍感度が上昇し、10fg まで検出可能となった。

3) 臨床検体からの結核菌検出

Table 4 には各種臨床検体別の PCR、培養、塗抹検鏡の結果を示し、Table 5 には全検体についての PCR 法と従来法（塗抹、培養）との相関を示した。従来法にて陽性であった検体は、1 例を除いてすべて陽性で、感度は 98% であった。また従来法で陰性であった 172 検体のうち、155 検体は PCR でも陰性であったが、17 検体は陽性を示し、特異性は 90% であった。

Table 4 Relationship between Smear, Culture and PCR of Clinical Samples

PCR	+				-					
	+		-		+		-			
	+	-	+	-	+	-	+	-		
Sputum	18	2	4	2					44	70
Pleural effusion		1		5					42	48
Gastric juice	7	2	5			1			16	31
BALF ¹⁾	4	1							20	25
CSF ²⁾		1		3					12	16
Ascites				1					3	4
Blood				1					5	6
Urine		2		1					5	8
Bone Marrow									4	4
Biopsied specimen	1			3					2	6
Pus	1			1					2	4
Total	31	9	9	17		1			155	222

1) BALF : Bronchoalveolar lavage fluid

2) CSF : Cerebrospinal fluid

考 察

10数年前から急速に発達した分子生物学は、各種疾患の診断技術や治療法の進歩に大きな影響を与えたと言える。遺伝性疾患の診断のみならず、遺伝子組換えによるインターフェロンなどの薬剤開発が行われ、すでに多くの症例が恩恵を被っている。感染症診断の分野においても例外ではなく、細菌、マイコプラズマ、クラミジア、リケッチア、ウイルス、マラリア、ニューモシスチスカリニなどに対する DNA 診断法が盛んに開発されつつある。今回われわれは抗酸菌に対する DNA 診断として、DNA probe 法と PCR 法を検討し、いずれも良好な成績が得られた。

Gen-Probe 社で開発された抗酸菌同定用 DNA probe は、従来の生化学的同定法と良好な相関性が認められ、しかも短時間のうちに結果が得られるという点で優れた検査法であった。また従来は MAC と同定されていた菌株の中にも MAC ではない菌株が約 6% 含まれていたことが判明し、より正確な同定のためには今後も欠かせない方法であると思われた。

しかし本法の問題点として、検出過程に放射性同位元素を用いることや、ある一定量以上の菌量を必要とすることなどが挙げられる。前者の問題点は、近年非放射性物質（化学発光物質、アクリニジウムエステル）を標識した DNA probe⁷⁾⁻⁹⁾ が開発され、従来の RI 法と良好な相関が得られており、ほぼ解決されつつあると思わ

Table 5 Comparative Result of Smear, Culture and PCR

	PCR		
	+	-	
Smear or Culture	+	49	1
	-	17	155
Sensitivity (%)	98		
Specificity (%)	90		

れる。しかし後者の問題は重要で、実際の臨床検体は微量な場合も多く、また十分な菌量が常に含まれているとは限らない。近年 BACTEC システムなどの導入により、これと組み合わせ検出感度を高める工夫も検討されているが、やはり最低 $10^5 \sim 10^6$ CFU の菌量は必要であろう。したがって、本法は、臨床検体から直接抗酸菌を検出するにはまだ開発の余地が残されているように思われる。

このような DNA probe 法の欠点を補うことを目的として、次に PCR の応用が考えられ始めた。1988 年 Saiki¹⁰⁾ らによって報告された PCR は、目的とする遺伝子の一部を試験管内で短時間のうちに希望する量だけ増幅することができるという、極めて画期的に優れた方法であり、当初遺伝性疾患や癌遺伝子の研究に用いられてきた。近年では感染症の分野においても盛んに応用され始め、とくに分離、培養が困難なウイルス感染症

(HIV, HTLV-I, HCV など), カリニ肺炎, あるいは培養に長期間を必要とする抗酸菌などに対して開発が盛んである。

そこでわれわれは, 結核菌に対して本法を試みることを考えた。各種抗酸菌に特異的な抗原蛋白およびそれをコードする遺伝子の研究は盛んで, その塩基配列もしいに明らかになりつつある。現在までに 65kDa, 38kDa, 19kDa, DnaJ などの遺伝子の解明が進み, それらが PCR による菌検出にも利用されている¹¹⁾⁻¹³⁾。われわれは各遺伝子に対する数組のプライマーを作成してその特異性について検討した結果, Sjöbring ら⁹⁾ が報告した, 38kDa の Pab の一部を増幅するプライマーが最も特異性に優れており, 結核菌群に対してのみ反応することを確認し, 以後これを本研究に応用した。

Nested PCR は 2 段階に PCR を行う方法で, 1 段階だけの PCR よりも感度を上げることを目的としたものである。HTLV-I¹⁴⁾ や HBV¹⁵⁾ などを血中から検出する方法としてすでに報告されているが, われわれも同様の方法を用いて結核菌の検出について検討した。その結果, 2 段階 PCR は, 菌量および DNA 量のいずれにおいても 1 段階 PCR より感度が 1,000 倍上昇し, 菌量としては 0.1 CFU まで検出可能であった。しかし菌の培養液内には死菌や破壊された菌の DNA 断片が含まれている可能性があり, 正確な検出限界とは言い難いかもしれない。そこで DNA 量による検出限界を検討した結果, 結核菌の 2 CFU 分に相当する 10fg で測定可能であったことから, 感度の点では結核菌が数個でも存在すれば検出できる程度の満足できる成績であると思われた。

以上の基礎的検討をもとに, 各種臨床検体 222 検体について Nested PCR を施行し, 従来法 (塗抹, 培養法) と比較検討した結果, 感度, 特異性ともに良好な成績が得られた。とくに従来法で陰性, PCR で陽性を示した 17 検体をみても, 胸水, 髄液, 生検標本などが多く, 培養陽性率が低い検体が多い。またこれらの症例は病歴や臨床症状, あるいは他の検査所見などから, いずれも結核症が強く疑われ, 抗結核剤の投与後に臨床的にも改善した症例がほとんどで, PCR が早期診断と早期治療に大いに貢献したものであると思われた。

PCR の感度の良さは長所であると同時に欠点となる場合もある。すなわち, 極めて微量の target molecule が混入しても疑陽性の結果が出る原因となり, 真の陽性か contamination かの判断に苦慮することが多い。したがって, ベッドサイドにおける検体の採取から検査室における処理段階に至るまで, contamination の防止には慎重に対処しなければならない。可能であれば, 検体処理, 試薬の調整, PCR 産物の電気泳動などの各過程はすべて別々の部屋で行ったり, 最近開発された,

contamination の原因である PCR 産物を選択的に分解処理するキットを用いることも必要であろう。

感染症治療の第一歩は起炎菌を早期に決定することに始まる。PCR 法は従来法と比較して優れた感度と迅速性を有し, この目的達成のためには有力な手段となる可能性が高い。とくに結核菌などのように分離, 同定が困難かつ長時間を要し, 一端治療を開始すると長期に投薬が必要な疾患などが良い適応となろう。今後は, 従来法で陰性の症例の中から, より多くの PCR 陽性症例を発見できるように検討を重ねたい。

ま と め

抗酸菌に対する DNA probe 法と PCR 法について検討し, 以下の結果を得た。

1) DNA probe による同定結果は, 従来の生化学法の結果とよく一致した。生化学法で MAC と同定された菌株の中に, 約 6% の頻度で MAC ではない菌株が含まれていた。

2) 結核菌の Pab をコードする遺伝子に対する Nested PCR は, 結核菌群のみに反応し, 他の非定型抗酸菌や一般細菌には反応せず, 特異性に優れていた。また感度に関しても, 結核菌が数個あれば十分検出できる程度の良好な成績であった。

各種臨床検体 222 検体に対し本法を施行した結果, 従来の塗抹, 培養法の結果とよく一致し, しかも従来法で陰性であった 17 症例において結核菌が証明され, 早期診断と早期治療に有用であった。

以上のように, 抗酸菌症に対する DNA 診断は非常に有用なものであることが示唆され, 今後さらなる改良と適応の拡大が期待された。

なお本研究の一部は, 文部省の科学研究費補助金 (03670404) の助成を受けた。

文 献

- 1) Sunderum G, MacDonald RJ, Maniatis T, et al. Tuberculosis as a manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). J Am Med Assoc. 1986; 256: 362-366.
- 2) Gonzalez R, Hanna BA. Evaluation of Gen-Probe DNA hybridization systems for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1987; 8: 69-77.
- 3) Musial CE, Tice LS, Stockman JL, et al. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium* complex

- and *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol. 1988 ; 26 : 2120-2123.
- 4) Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. Molecular cloning : a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., 1989.
 - 5) Bengard Andersen A, Hansen EB. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1989 ; 57 : 2481-2488.
 - 6) Sjöbring U, Mecklenburg M, Bengard Andersen A. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1990 ; 28 : 2200-2204.
 - 7) 阿部千代治, 鹿住祐子, 深沢 豊, 他 : ACCUPR OBE による抗酸菌の同定, 臨床と微生物. 1991 ; 18 : 119-123.
 - 8) 松岡幸雄, 藤原昭雄 : HPA について, Lab Clin Pract. 1991 ; 9 : 35-37.
 - 9) 後藤美江子, 奥住捷子, 岡 慎一, 他 : アクリジニウムエステル標識 DNA プローブ法による抗酸菌同定の有用性について, 感染症誌. 1992 ; 66 : 81-86.
 - 10) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988 ; 239 : 487-491.
 - 11) Hermans PWM, Schuitema ARJ, Soolingen DV, et al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1990 ; 28 : 1204-1213.
 - 12) 永井良三 : 抗酸菌検出への応用 ; PCR とその応用, 実験医学. 1990 ; 8 : 1188-1191.
 - 13) Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet. 1989 ; 2 : 1069-1071.
 - 14) Matsumoto C, Mitsunaga S, Oguchi T, et al. Detection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus in an infected cell line and in peripheral mononuclear cells of blood donors by the nested double polymerase chain reaction method : Comparison with HTLV-I antibody tests. J Virol. 1990 ; 64 : 5290-5294.
 - 15) Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. J Clin Microbiol. 1989 ; 27 : 1930-1933.

第 67 回総会シンポジウム

I. 抗酸菌感染症の迅速診断法

6. DNA を使った抗酸菌の迅速同定

江崎 孝行

岐阜大学医学部微生物学講座

受付 平成4年8月14日

6. RAPID GENETIC IDENTIFICATION SYSTEM OF MYCOBACTERIA

Takayuki Ezaki *

(Received for publication August 14, 1992)

Rapid colorimetric hybridization method was applied for the identification of mycobacteria and phylogenetic detection and identification system of mycobacteria by polymerase chain reaction method was designed.

Quantitative DNA-DNA hybridization in microdilution plate was used to identify 22 mycobacterial species. This method could identify 90% (178 among 194 trials) of clinical isolates within 3 hr. Ten percent of clinical isolates did not belong to any of the established 22 species.

Through this work, we found *Mycobacterium abscessus* is genetically independent from *M. chelonae* and proposed *M. abscessus* as a distinct species. *M. pregrinum* had been classified as *M. fortuitum*, however, it was also found as a independent species. Thus the name *M. peregrinum* was officially revived and aquired the taxonomic position.

Highly sensitive genetic detection system of mycobacteria was designed by using polymerase chain reaction (PCR) method.

Common mycobacterial sequence of 16S ribosomal RNA gene was first amplified by a single paires of PCR primers from staining negative sputum and the amplified DNA was identified by species specific DNA probe because the amplified fragment contained species specific sequence.

Key words : Microdilution plate hybridization method, *M. pregrinum*, PCR

キーワード : マイクロプレートハイブリダイゼーション法, *M. pregrinum*, PCR

これまで結核菌に代表される抗酸菌の感染症の際、菌体が証明されない場合には確定診断に少なくとも1カ月が必要とされてきました。

ところが、DNA 診断法を利用すれば菌の分離培養を行わずに直接検体中の抗酸菌の DNA を検出できます。この DNA の検出診断に要する時間は通常数時間です

* From the Department of Microbiology, Gifu University School of Medicine, 40 Tsukasa-machi, Gifu 500 Japan.

Table 1 Reidentification of 24 Reference Strains by Microdilution Hybridization Method

Immobilized DNA from	Relative color intensity with the following tet organism ;																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 <i>M. tuberculosis</i>	100	95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 <i>M. bovis</i>	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 <i>M. kansasii</i>	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	54	-	-	-	-	32	-	36	-	-	-	-	-	-
4 <i>M. marinum</i>	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 <i>M. simiae</i>	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 <i>M. scrofulaceum</i>	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 <i>M. gordonae 1</i>	-	-	-	-	-	-	100	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 <i>M. gordonae 2</i>	-	-	-	-	-	-	37	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 <i>M. sulgai</i>	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <i>M. avium</i>	30	-	-	-	31	49	-	-	100	53	-	-	-	-	-	-	31	41	-	-	-	-	-	37
11 <i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	38	-	-	44	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 <i>M. gastri</i>	-	-	61	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13 <i>M. xenopi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 <i>M. nonchromogenicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 <i>M. terrae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16 <i>M. triviale</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	30	-	-	-	-	-	-	-	-
17 <i>M. fortuitum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
18 <i>M. peregrinum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49	100	-	-	-	-	-	-	-
19 <i>M. chelonae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
20 <i>M. abscessus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
21 <i>M. chitae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-
22 <i>M. phlei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	30
23 <i>M. flavescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	36
24 <i>M. vaccae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	100

a, color intensity lower than 30%. *M. gordonae 1*, type strain, *M. gordonae 2* is clinical strain (KPM 2205)

ので、診断にかかる時間が大幅に短縮されます。また分離された菌株が遅発育型の非定型抗酸菌の場合には、その株の同定にさらに1カ月以上かかっていた。この分離株の同定にも遺伝子同定法を使えば数時間で同結果が得られるようになりました。DNAを使った菌種の同定と検出が可能になった背景を説明し、各々の方法を紹介します。

材料と方法論

1. 定量的 DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる菌種の分類と同定

細菌の DNA は、ヒトの染色体 DNA と同様 2 本の鎖からなっています。この DNA は、100°C で加熱するか、アルカリ液にひたしておきますと 2 本の鎖が 1 本ずつの鎖に分かれます。ところが DNA の入った液を室温あるいは中性の pH の条件に戻すと、分かれた DNA は、もとの DNA と同じ部分が対になって 2 本の鎖をつくります。

この原理が、現在では菌種の同定や検出に利用されるようになりました。

細菌の DNA は、菌種ごとにその塩基配列が異なります。独立した菌種の DNA を 1 本の鎖にして別の菌の DNA と反応させると、DNA の配列が類似していればいるほど、多くの DNA が 2 本の鎖を作ります。細菌分類学者は、この原理を菌種の同定に利用してきました。1987 年になって国際命名委員会の中の特別委員会は“ある菌株の DNA の 70% 以上が別の菌株の DNA と安定した 2 本鎖をつくれれば両者の株は 1 つの菌種である”とする考え方を示しました。この類似度を測定する方法として定量的 DNA-DNA ハイブリダイゼーションを現在の段階で最も信頼性高い方法であると報告をしています。

この考えに沿って、われわれの研究室では菌種の同定を定量的ハイブリダイゼーションで行う方法論を作成してきました¹⁾。はじめは菌体の溶菌が簡単なグラム陰性菌で方法論を作成し、ついでグラム陽性球菌に應用して、抗酸菌をのぞくすべての細菌の同定に利用できるようになりました。ところが、抗酸菌は通常の方法では溶菌させるのは困難で、DNA の抽出方法を工夫しなければなりません。酵素による方法をやめガラスビーズを使って物理的に抗酸菌を壊す方法を採用し²⁾、抗酸菌の DNA を簡単に抽出する方法を作成しました。

この方法で抽出した微量の DNA を biotin で標識し、すでに精製してある基準株の DNA と反応させる方法をとりました。

未知株の DNA が既存のどれかの菌種と強く反応すれば、その株は少なくとも使用した基準株のなかで、どの菌種に近いかが判定できます。この方法は DNA の

抽出から結果がでるまで 2 時間で終了できるように設定しました²⁾。

この方法のために基準株 22 株と臨床分離株 1 株の合計 23 株の DNA を標準としてプレートに固定し、臨床材料から分離された菌株の再同定を行いました。

2. 検体から抗酸菌のリボソーム RNA の遺伝子を増幅し、その DNA を特異プローブで同定する方法の作成

抗酸菌群のリボソーム RNA の遺伝子配列から抗酸菌群 20 菌種に共通な配列を増幅する primers を作成し、増幅した DNA を、その中に含まれる菌種特異配

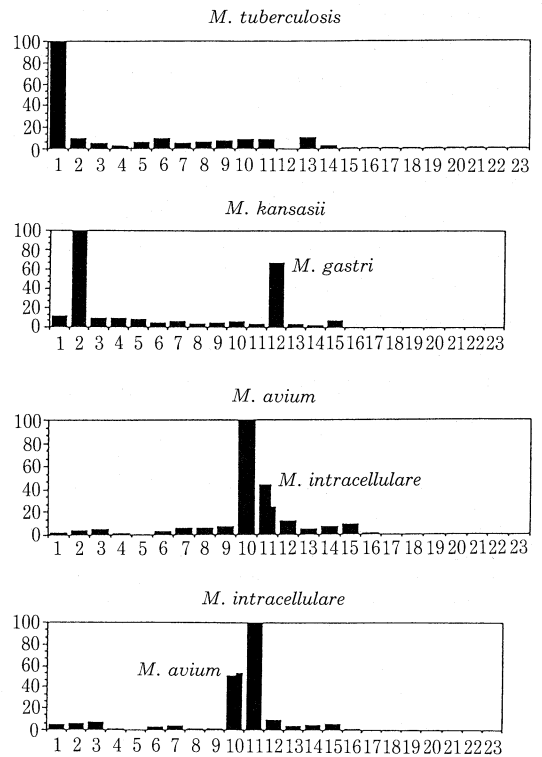


Fig. Identification of mycobacteria by microplate hybridization. No. of horizontal lane indicates the well immobilized reference DNAs of 23 different species. Vertical lane indicates relative homology value. The well which emitted the strongest fluorescence was calculated as 100%. (Top) a strain hybridized to No. 1 well, where the DNA *M. tuberculosis* is fixed. Thus the strain was identified as *M. tuberculosis*. (Second, column from the top) a clinical strain hybridized most strongly to No. 2 well, where the DNA of *M. kansasii* was fixed but also hybridized to No. 12 well, where the DNA of *M. gastri* was fixed.

列で菌種同定する方法を作成し評価しました。

結果と議論

1. DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる同定方法の評価と分類上の問題点

Table 1 に実際に使用した菌種をこの方法で同定した例を示します。

ほとんどの菌種はこの方法で区別することができますが、*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, および *M. microti* の4菌種からなる *M. tuberculosis* complex は90%以上の類似度を示すため、この方法では区別できません。

現在の細菌分類学では70%以上のDNAの類似度を示す菌株は同一種に属するとしていますので、これらの菌種は一つの菌種に再分類されるべき菌群だと考えます。

Fig. には具体的な同定例を示しました。

M. kansasii は Fig. に示したように *M. gastri* と非常に近縁な種であることがこの方法で明らかになりました。この反応は厳しい条件で行ってあります。したがって54~61%の類似度を示すこの2菌種は、最適条件で実験を行えばさらに類似度があがると考えられますので分類学的な評価が必要と考えます。

一方生化学的性状で識別しにくい *M. intracellulare*

と *M. avium* は遺伝学的にも近い菌種ですが、独立した菌種として認められています。

DNA-DNA 類似度が44~53%になり、この方法で区別することができます。

この方法では *M. chelonae* の2つの亜種 *chelonae* と *abscessus* はDNA-DNA 類似度は30%以下しかなく、まったく異なる菌群であることがわかりました。したがって両者は亜種としてではなく、独立した菌種にすべきであると、国際命名委員会に提案し認められ、*M. chelonae* は独立した菌種に昇格しました³⁾。

また *M. peregrinum* はかつて独立した菌種と理解されてきましたが、数値分類学による評価をうけ、*M. fortuitum* と同じであるとされていました。ところがこの方法で *M. fortuitum* とまったく異なる菌種であることが判明し、新しい菌種として正式に提案しました³⁾。

2. 患者由来株の再同定

従来法で同定された菌株をマイクロプレート法で再同定を行ってみました。

Table 2 に示すように *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. xenopi* などは従来法での同定と完全に一致しました。

ところが *M. avium* complex, *M. scrofulaceum*, *M. chelonae*, *M. nonchromogenicum* と従来法で同

Table 2 Identification of 209 Human Clinical Strains by Microplate Hybridization

Tentative Name (Determined by biochemical tests)	Genetic Identification (Determined by hybridization)
<i>M. tuberculosis</i> (30)	<i>M. tuberculosis</i> (30)
<i>M. kansasii</i> (20)	<i>M. kansasii</i> (20)
<i>M. gastri</i> (2)	<i>M. gastri</i> (2)
<i>M. marinum</i> (2)	<i>M. marinum</i> (2)
<i>M. simiae</i> (2)	<i>M. simiae</i> (2)
<i>M. szulgai</i> (2)	<i>M. szulgai</i> (2)
<i>M. xenophi</i> (3)	<i>M. xenophi</i> (3)
<i>M. scrofulaceum</i> (26)	<i>M. scrofulaceum</i> (14), <i>M. avium</i> (3) <i>M. gordonae</i> (6), Unidentified (3)
<i>M. avium</i> complex (30)	<i>M. avium</i> (17), <i>M. intracellulare</i> (10), Unidentified (3)
<i>M. gordonae</i> (15)	<i>M. gordonae</i> 1 (6), <i>M. gordonae</i> 2 (2), <i>M. avium</i> (1)
<i>M. nonchromogenicum</i> complex (20)	<i>M. terrae</i> (8), <i>M. triviale</i> (2) <i>M. nonchromogenicum</i> (4), unidentified (6)
<i>M. fortuitum</i> (30)	<i>M. fortuitum</i> (16), <i>M. peregrinum</i> (8) <i>M. chelonae</i> (3), <i>M. abscessus</i> (1), Unidentified (2)
<i>M. chelonae</i> (10)	<i>M. chelonae</i> (7), <i>M. abscessus</i> (1), Unidentified (2)
<i>M. abscessus</i> (2)	<i>M. abscessus</i> (2)
Unidentified (15)	Unidentified (15)

(), number of strains

M. gordonae 1=ATCC 14470 (type strain)

M. gordonae 2=KPM 2205 (clinical strain, genetically independent from ATCC 14470)

定されていた菌株には間違えて同定されていた株がたくさんあることがわかりました。また使用した基準株と反応しない菌株が209株のうち15株ありました。

生化学的性状で誤同定された株の性状を調べて、その原因を調べてみますと、通常と異なる性状を示す菌株であることがわかりました。例えば遺伝学的には *M. gordonae* ですが、生化学的性状で *S. scrofulaceum* と同定された株は黄色い色素を産生するため *M. scrofulaceum* として同定されたと考えます。

また *M. abscessus* の3株は硝酸塩を還元したために *M. fortuitum* と誤同定されました。抗酸菌の分類には40種類以上の性状が使われていますが、同定の目的には通常は12項目ほどの性状しか使われていません。そのため一つの性状が非特異反応を示せば正確な同定は難しくなる訳です。

新たな問題点は、これまでの方法で同定された菌株が、同定された菌種の基準株とまったく反応しない株が含まれていたという点です。

これらは新しい菌種の可能性が高く、分類学的な検討を行う必要があります。例えば *M. gordonii* と同定される菌株のなかには、この基準株とまったく反応しない株が多数分離されました。このことは、*M. gordonii* と同定される菌種は遺伝学的に単一菌種から構成されていないということになります。

従来法と DNA-DNA ハイブリダイゼーションのいずれでも未同定の株も多数ありました。これらは人に病原性がないとされている菌群の一部なのか、それともこれらも新しい菌群なのかは今後も詳細に追跡する必要があります。

3. 喀痰からの抗酸菌の遺伝子の直接検出と増幅DNAの同定

分離された菌株をこれまで述べた方法を使い数時間以内に同定できるようになりましたが、これだけでは抗酸菌感染症の診断の迅速化は十分ではありません。

定量的 DNA-DNA ハイブリダイゼーション法は、分離された菌株の同定作業を迅速化する方法で、菌株が分離されるのにすでに1カ月を費やしているからです。

診断の迅速化には分離培養を行わず喀痰から直接病原体の遺伝子を検出する方法が必要になります。

結核菌群に特異的な遺伝子を検出するための PCR 用の primers が数多く発表されています。PCR 法は数時間で DNA を100万倍に増幅させる極めて感度の高い方法ですので、これらを使えば、喀痰中の結核菌を半日で検出できます。

PCR 法については本日は新井先生が詳細に報告されますので、私どもが見方をかえた新しい方法を使って実施している検出原理を簡単に説明します。

これまで報告されている PCR 法の primers は、菌

種に特異的な遺伝子を検出する方法が中心になっています。この方法では結核菌群による感染症を疑えばそれらを検出する DNA の primers を使えばよいわけですが、その他の抗酸菌感染症を疑えば、さらに別の菌種の primers を準備し実験を行う必要がでてきます。

私どもは1回の PCR 反応で抗酸菌属のすべての菌種の DNA を検出することができる primers を使用し、増えた DNA を使って菌種を識別する方法をとりました。

これらの方法では PCR 法で増えた DNA を、電気泳動法で確認するだけではなく、菌種に特異的な DNA プローブと反応させます。

実際には *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare* の特異 DNA プローブを準備すれば、9割以上のケースで上記のどれかの菌種として同定できます。そのほかの菌種はとりえず上記の菌群以外の抗酸菌群の DNA が増幅できたとの報告で治療を開始してもらい、後の培養結果をまって菌種名の確認をしてもらおうという考え方です。

この PCR 法では喀痰中に抗酸性染色で菌体が見つからなくとも検出できる感度がありますので、ガフキー0号でも検出ができます。この検出方法が可能になったのには抗酸菌の 16S ribosomal RNA の塩基配列の決定が大きく貢献しています⁴⁾。

細菌の 16S ribosomal RNA の塩基配列の情報は微生物学の分類体系を変えようとしています。現在まで約1,000菌種に及ぶ RNA の配列が決定され、RNA の塩基配列を各微生物で比較することで、生物が地球に誕生して以来、37億年間にどのようにして進化してきたかを議論することができるようになりました。

抗酸菌属でも約20菌種の抗酸菌の ribosomal RNA が決定され、菌種や属に特異的な配列がわかってきました。この配列を使い、抗酸菌属の菌種の DNA を増幅します。その中には菌種に特異的な配列が含まれていますので、特異プローブで増幅させた DNA を検出します。この方法論はすべての生物の検出に応用することができます。

今後蓄積される 16S ribosomal RNA は、微生物の系統分類の再編成のみではなく、微生物の検出と感染症の迅速診断に広く利用されるようになるでしょう。

おわりに

塗抹で抗酸菌が陰性の喀痰から抗酸菌の DNA 検出を数時間で行う PCR 法、分離された菌株を数時間で同定する DNA-DNA ハイブリダイゼーション法の両方は技術的に完成されましたので、近い将来のうちに一般検査室で日常的に利用されるようになるでしょう。

抗酸菌感染症の診断と治療で今後期待されるものには、薬剤感受性と耐性の情報を遺伝子診断法で予測できないかという課題があります。現在の段階では難しい課題ですが、有効薬剤の選択の基準になる方法論の確立は増加しつつある抗酸菌感染症の治療に重要な貢献ができると信じて、次の重要な研究課題の一つとして取り組んでいます。

最後になりましたが、今回の発表の機会を与えてくださいました座長の青柳先生、および会長の斎藤先生に深くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Ezaki T, Y Hashimoto and E Yabuuchi. Fluorometric deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotope are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol.* 1989 ; 39 : 224-229.
- 2) Kusunoki S, T Ezaki, et al. Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol.* 1991 ; 29 : 1596-1603.
- 3) Kusunoki S and T Ezaki. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev. and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status : *Mycobacterium abscessus* comb. nov *Int J Syst Bacteriol.* 1992 ; 42 : 240-245.
- 4) Boddingtonhaus B, T Rogall, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol.* 1990 ; 28 : 1751-1759.