

短 報

非放射性 DNA プローブによる *Mycobacterium tuberculosis*
Complex ならびに *Mycobacterium avium*-
intracellulare Complex の同定

菊 地 宏 明 ・ 庄 司 聡
渡 辺 彰 ・ 本 宮 雅 吉

東北大学抗酸菌病研究所内科学研究部門

受付 平成 4 年 10 月 15 日

IDENTIFICATION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX AND
MYCOBACTERIUM AVIUM-*INTRACELLULARE* COMPLEX BY
USING NONISOTOPIC DNA PROBES

Hiroaki KIKUCHI*, Satoru SHOJI, Akira WATANABE
and Masakichi MOTOMIYA

(Received for publication October 15, 1992)

A total of 31 clinical isolates of mycobacteria consisting of 21 strains of *M. avium*-*intracellulare* complex (ten strains each of *M. avium* and *M. intracellulare* identified by specific ¹²⁵I-labeled DNA probes and one strain of *M. avium*-*intracellulare* complex identified by conventional biochemical tests) and 10 strains of *M. tuberculosis* (identified by a specific ¹²⁵I-labeled DNA probe) were subjected to identification by hybridization protection assay (HPA) with an acridinium-ester (AE) labeled DNA probe. The results thus obtained were in complete agreement with those obtained by ¹²⁵I-labeled DNA probes (30 strains) or by conventional biochemical tests (one strain). HPA by the AE-labeled DNA probe is safe, simple and rapid, and can be done with ease in any clinical laboratory.

Key words : DNA probe, Hybridization protection assay, Acridinium-ester, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis*

キ ー ワ ー ズ : DNA プローブ, Hybridization protection assay, Acridinium-ester, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis*

近年, immunocompromised host の増加に伴い, 重要な日和見感染症の一つとして非定型抗酸菌症を含む抗酸菌症が再び注目を集めている。特に本邦では, 抗酸菌症のうち結核症は減少しているが, 非定型抗酸菌症は

増加しており¹⁾, その迅速診断の重要性が高まりつつある。

これらの菌種の同定には生化学的検査を組み合わせる方法が用いられてきたが, DNA プローブ法の進歩によ

* From the Department of Internal Medicine, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University, 4-1 Seiryō-machi Aoba-ku, Sendai 980 Japan.

り抗酸菌の同定が高感度、迅速に行えるようになった^{2)~4)}。

しかし、一般の臨床検査室における放射性 DNA プローブの利用には一定の制限がある。最近、非放射性的の化学発光物質 Acridinium-Ester (以下, AE) 標識 DNA プローブを利用した Hybridization Protection Assay (以下, HPA) が開発された。われわれは今回, HPA の有用性について検討を行ったので、その結果を報告する。

HPA は Accu Probe™ Culture Confirmation Reagent Kit (Gen Probe 社, USA) を用い⁵⁾⁶⁾、キット添付の標準マニュアルに従い、次のようにして行った。すなわち、添付の溶菌用チューブに McFarland No. 1 濃度に調整した検体 0.1 ml, および緩衝液を加え攪拌し、60~70°C, 15 分間の超音波処理を行いリボソーム RNA を抽出、煮沸処理を行う。この抽出液を *M. avium* complex, または *M. tuberculosis* complex のそれぞれに特異的な AE 標識単鎖 DNA プローブをコートした反応用チューブに分取し、各特異 DNA プローブと相補的なリボソーム RNA との間で AE-DNA・RNA ハイブリッドを形成させるため、60±1°C で 15 分間インキュベートした。

次に未反応のプローブに基づく化学発光を除くため加水分解試薬を加えた (ハイブリッドを形成している場合はインターカレーションにより AE が加水分解反応から保護される)。ハイブリッド中の AE の化学発光は検出試薬を加え、ルミノメータ (リーダー I, 中外製薬) を用いて測定し、この化学発光値 (Relative Light Units ; RLU) 30,000 以上を陽性と判定した。

対象とした菌株は 1988 年から 1991 年に臨床分離され、生化学的検査および ¹²⁵I 標識 DNA プローブによって同定された *M. avium* 10 株, *M. intracellulare* 10 株, *M. tuberculosis* 10 株, そして生化学的検査では *M. avium* complex と同定されたが、再検を行っても 3 種の ¹²⁵I 標識 DNA プローブ (*M. avium*, *M. intracellulare* および *M. tuberculosis* complex) のいずれとも反応しなかった 1 株の計 31 株である。また、標準菌株として *M. avium* ATCC 25291 株, *M. intracellulare* ATCC 15985 株, および *M. tuberculosis* H₃₇Rv 株を使用した。

実験成績を Table に示した。

使用した HPA 用非放射性 DNA プローブは上記の 2 種類 (*M. avium* complex 同定用, および *M. tuberculosis* complex 同定用) であり、結果を菌株毎に表示した。実験成績は ¹²⁵I 標識 DNA プローブによる同定の結果と一致し、特異性はきわめて良好であった。また、生化学的検査で *M. avium* complex と同定されたが、¹²⁵I 標識 DNA プローブではすべてのプローブに

陰性であった 1 株は、AE 標識 *M. avium* complex 同定用プローブと陽性の反応を示した。

AE 標識 DNA プローブを利用した HPA はそれぞれの菌種に対して特異性が高い方法であることが最近報告されており^{7)~9)}、われわれもこの結果を確認した。検出限界は 10^{-17} ~ 10^{-18} モルであって、¹²⁵I 標識 DNA プローブとはほぼ同程度の感度とされている⁵⁾⁶⁾ が、実際の測定では陽性株と陰性株の化学発光値に約 100 倍の差が生じるため、¹²⁵I 標識 DNA プローブで判定不能であっても、AE 標識 DNA プローブにより判定可能となる可能性が考えられる。

今回のわれわれの成績でも、このことを示唆する 1 株が存在しており、本法の有用性を支持するものと考えられた。本法の有用性としてはさらに、標識物質が非放射性であることがあげられ、その管理、ならびに操作における制限は著しく軽減されている。

実験操作においても、本法は加水分解試薬により未反応のプローブを失活させるため、形成されたハイブリッドと未反応のプローブの分離操作が不要である。また、固形培地から直接約菌することも可能であり、試験管内ですべての操作を行い得る利点がある。

しかしながら、本法では *M. avium* と *M. intracellulare* の分別同定が不可能であり、この点についての改善が望まれるであろう。

以上より、AE 標識 DNA プローブを利用した HPA は迅速、簡便であり、さらに放射性物質を使用していないため臨床検査室用の DNA プローブ法としてすぐれた同定法と考えられる。

謝 辞

AE-DNA プローブを分与された中外製薬株式会社に深謝する。

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 (国療非定型抗酸菌症共同研究班 1986 年度報告), 結核. 1988 ; 63 : 493-499.
- 2) Drake TA, Hindler JA, Berlin OGW, et al. : Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. J Clin Microbiol. 1987 ; 25 : 1442-1445.
- 3) 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* 各特異 DNA プローブ (Gen-Probe® Rapid Diagnostic System) に対する

Table Relative Light Units (RLU) of AE-DNA Probes
for Different Strains of Mycobacteria

Strains identified by ¹²⁵ I-DNA probes or conven- tional biochemical tests	AE-DNA probes for the identification of	
	<i>M. avium</i> complex	<i>M. tuberculosis</i> complex
<i>M. avium</i> *		
1	349165 (+)	1197 (-)
2	322717 (+)	1800 (-)
3	290949 (+)	1043 (-)
4	272253 (+)	1354 (-)
5	287365 (+)	1257 (-)
6	353253 (+)	2375 (-)
7	277145 (+)	2661 (-)
8	340636 (+)	2106 (-)
9	298039 (+)	1974 (-)
10	307563 (+)	1654 (-)
<i>M. intracellulare</i> *		
1	279271 (+)	2846 (-)
2	276909 (+)	2276 (-)
3	284257 (+)	1190 (-)
4	258683 (+)	4071 (-)
5	286315 (+)	2882 (-)
6	285838 (+)	1576 (-)
7	262610 (+)	1857 (-)
8	264933 (+)	1954 (-)
9	287418 (+)	2227 (-)
10	307080 (+)	1789 (-)
<i>M. tuberculosis</i> *		
1	2762 (-)	101392 (+)
2	1310 (-)	135642 (+)
3	3288 (-)	302734 (+)
4	1189 (-)	309613 (+)
5	5919 (-)	293860 (+)
6	1318 (-)	271725 (+)
7	3359 (-)	264320 (+)
8	2913 (-)	302547 (+)
9	2461 (-)	289409 (+)
10	2228 (-)	78353 (+)
<i>M. avium</i> complex [#]		
1	149465 (+)	3765 (-)
<i>M. avium</i> *		
ATCC 25291	323326 (+)	1842 (-)
<i>M. intracellulare</i> *		
ATCC 15985	289993 (+)	2453 (-)
<i>M. tuberculosis</i> *		
H ₃₇ Rv	3636 (-)	164652 (+)

* Identified by ¹²⁵I-DNA probes.

Identified by biochemical tests as a strain of *M. avium-intracellulare* complex. Reactions with ¹²⁵I-DNA probes were negative.

(+) : Positive reaction. Identified as such.

(-) : Negative reaction. Identity could not be confirmed.

- 反応性, 結核. 1991; 66: 405-411.
- 4) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇, 他: DNA プローブを用いた *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* および *Mycobacterium tuberculosis* complex の同定, 結核. 1991; 66: 499-502.
 - 5) Arnold LJ, Hammond PW, Wiese WA, et al. : Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. Clin Chem. 1989; 35: 1588-1594.
 - 6) 松岡幸雄, 若林清重: non-RI 標識 DNA プローブの検査への応用, 臨床病理 (増刊). 1990; 85: 82-91.
 - 7) 阿部千代治, 鹿住祐子, 深沢 豊, 他: ACCU PROBE[®] による抗酸菌の同定, 臨床と微生物. 1991; 18: 557-561.
 - 8) Goto M, Oka S, Okuzumi K, et al. : Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2473-2476.
 - 9) 長沢光章, 森 真一, 玉井誠一, 他: 化学発光標識 DNA プローブを用いた *Mycobacterium tuberculosis* complex および *Mycobacterium avium* complex 同定法の検討, 臨床検査. 1992; 36: 197-200.