

原 著

臨床分離非定型抗酸菌株の DNA 同定と
生物型別

首藤 栄治・新井 俊彦

明治薬科大学微生物学教室

豊田 丈夫・青柳 昭雄

国立療養所東埼玉病院内科

受付 平成 6 年 3 月 23 日

受理 平成 6 年 5 月 30 日

IDENTIFICATIONS OF ATYPICAL MYCOBACTERIA BY
DNA-DNA HYBRIDIZATION AND THEIR
BIOTYPINGS WITH CHROMOGENIC
SUBSTRATESEiji SHUTOH*, Toshihiko ARAI, Takeo TOYODA
and Teruo AOYAGI

(Received 23 March 1994/Accepted 30 May 1994)

We developed a new biotyping system for mycobacterial strains. Various chromogenic substrates were incubated with mycobacterial cell suspensions for four hours at 37°C, and strains were typed by their patterns of hydrolysis of these substrates.

Commercially available microtiter plate DNA-DNA hybridization system and our biotyping system with chromogenic substrates were applied for the identification of clinically isolated atypical mycobacterial strains, and the results were compared with those obtained by the usual biological methods. Both new methods were proved to be satisfactorily quick and reproducible. The DNA probe method could distinguish *M. avium* from *M. intracellulare* and *M. nonchromogenicum*. Differentiation of these species has been very difficult by other methods. Our new biotyping system also could not differentiate these three species, but could classify some mycobacterial species into several subtypes.

The DNA probe method is quick and accurate but expensive. On the contrary, our new biotyping system was found to have the same level of accuracy as the usual methods, but much quicker than the usual methods and less expensive than DNA probe method. We recommend our new biotyping system to the clinical laboratories which hesitate to accept DNA probe method because of its high expences despite of its high accuracy.

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

Key words : DNA-DNA hybridization, Biotyping by chromogenic substrates, Identification, Atypical mycobacteria

キーワード : DNA-DNA ハイブリダイゼーション, 発色性基質による生物型別, 同定, 非定型抗酸菌

緒言

結核症の減少に伴って非定型抗酸菌症は相対的に増加しており、臨床上的重要性が理解されて独立の疾患として扱われるようになってきている¹⁾。結核症を含めて抗酸菌症の診断には、病変が起因菌に特異的とは言えないため、直接原因菌を検出することが求められる。したがって、同定が重要である。現在、抗酸菌の同定は、小川培地で発育した菌について、発育温度域、発育時間、集落の形態、着色を基に、ナイアシン試験、硝酸還元、耐熱カタラーゼ、ウレアーゼなどを参考に行われているが、同定に長期間を要するのが欠点である²⁾。

最近、DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる同定法が確立され³⁾⁴⁾、また、結核菌を含むいくつかの抗酸菌では、喀痰から直接 PCR 法で検出する方法も開発され⁵⁾⁶⁾、迅速な確定診断も可能になりつつある。これとは別に、多くの酵素定量のために発色性基質が開発された結果、菌株の生化学的性状の即日検査が可能になっており、これを抗酸菌の検査に応用する事も可能になってきている⁷⁾。

われわれは、臨床検体から分離されたナイアシン試験陰性の抗酸菌を従来の生物学的方法で同定しているが、これらの株を最近市販された DNA-DNA ハイブリダイゼーション法を利用した同定キットを用いて再同定し、同時に、発色性基質を用いた生物型別を試みた。

材料と方法

菌株：国立療養所東埼玉病院の臨床分離株と明治薬科大学微生物学教室の保存株を用いた（表1）。

DNA 同定法：極東製薬株式会社から提供を受けた DDH マイコバクテリア「極東」を用いた。実際の操作法は添付のマニュアルに従った。すなわち、菌株は小川培地で1-4週間37°Cの暗所で培養し、適切な発育のものをかきとって菌体とした。菌体を破碎し、フェノール処理によってDNAを抽出し、エタノール沈殿によってDNAを得た。これをフォトビオチンで標識し、一本化して、プローブDNAが固定されているマイクロタイタープレートに分注して、60°C、2時間ハイブリダイゼーションさせた。プレートを洗浄後、HRP-ストレプトアビジン液を加え、ビオチンDNAと結合させた。洗浄後、テトラメチルベンチジンと過酸化水素液

を加えて発色させ、630 nmの吸光度を測定した。発色の見られたプローブによって菌種を同定した。

発色性基質を用いた生物型別：すでに報告した方法⁷⁾を用いた。小川培地で培養した新鮮培養菌を5 mg/mlに滅菌蒸留水に浮遊し、これを菌液とした。発色性基質は20 mg/mlのDMSO液で保存し、使用時に、酵素反応をpH 7.4あるいは6.0で行う試薬はそれぞれのpH 1/15 M. Sørensen's phosphate buffer (pH 6.0/7.4)で、またpH 8.5で行う試薬は1/20 M Tris-HCl buffer (pH 8.5)でそれぞれ1:10に希釈した。マイクロタイタープレートの各スロットに菌液、基質液をそれぞれ25 µlずつ入れ、フィルムでシールして、37°C 4-6時間反応させた。判定に用いた生物性状、使用した発色性基質、反応を調べたpH、結果のコード表示法を表2に示した。

結果

従来の生物性状による同定結果とDDH マイコバクテリアによる同定の結果、発色性基質による生物型コードを表3にまとめた。従来法で *M. avium* とされていた23株中2株が *M. triviale* および *M. nonchromogenicum* であることが分かった。*M. intracellulare* とされていた4株中1株が TB complex であることが分かった。*M. kansasii* とされていた1株は *M. marinum* と判定された。また、*M. szulgai*, *M. chelonae* および *M. fortuitum* とされていた株は DDH 法では同定できなかった。DDH 法で同定可能なすべての標準株は正しく同定された。

DDH 法によって同定された菌種の発色性基質による生物型コードを表4にまとめた。発色性基質による生物型別では *M. avium* と *M. intracellulare* は識別できず、*M. nonchromogenicum* もこれらと識別できなかった。ただ、*M. triviale* と TB complex はこれらと明らかに区別された。*M. avium* は5つの型に区別された。*M. gordonae* と *M. marinum* では2つの生物型が見いだされた。これ以外の菌種の株では数がないために一つのコードしかなかった。それぞれのコードはそれぞれ異なっており、上記の菌種以外は、現在調べた菌種では、コードによって型別のみならず菌種も相互に識別できた。

表1 使用菌株とその由来

No.	従来法による菌種名	菌株番号	由来
1	} <i>M. avium</i>	174/9	} 患者, 国立療養所東埼玉病院
2		182/9	
3		244/9	
4		309/4	
5		443/9	
6		492/9	
7		518/9	
8		529/9	
9		47/10	
10		79/10	
11		96/10	
12		100/10	
13		101/10	
14		117/10	
15		122/10	
16		168/10	
17		197/10	
18		198/10	
19		272/10	
20		354/10	
21		388/10	
22		432/10	
23		150/11	
24	} <i>M. intracellulare</i>	150/9	}
25		320/9	
26		265/10	
27		269/10	
28	<i>M. szulgai</i>	275/9	} 保存株 明治薬科大学微生物学教室
29	<i>M. gordonae</i>	521/9	
30	<i>M. kansasii</i>	401/10	
31	<i>M. chelonae</i>	461/10	
32	<i>M. marinum</i>	479/10	
33	<i>M. fortuitum</i>	489/10	
34	<i>M. scrofulaceum</i>	NIHJ1626	
35	<i>M. gordonae</i>	NIHJ1617	
36	<i>M. bovis</i>	B30	
37	<i>M. terrae</i>	NIHJ1630	
38	<i>M. kansasii</i>	NIHJ1619	
39	<i>M. phlei</i>	NIHJ1624	
40	<i>M. smegmatis</i>	NIHJ1628	
41	<i>M. bovis</i>	BCG	

考 察

抗酸菌症の確定診断には起因菌の検出・同定が必須である。しかし、これらの菌の検出には数週間以上の期間

を要し、さらに、同定にも、同じ期間が必要である。

最近、微量の DNA を検出できる PCR 法が開発され、細菌の検査にも応用されつつある。この結果、喀痰中の結核菌を直接検出できるようになり、すでに *M.*

表2 使用した基質とコード番号

生物性状	使用基質	反応pH	コード
growth within 3 days	Ogawa's medium		I { 1 2 4
scotochromogenicity	Ogawa's medium		
photochromogenicity	Ogawa's medium		
trypsin	N-benzoyl DL-arginine β -naphthylamide	7.4	II { 1 2 4
proline arylamidase	L-proline p-nitroanilide	7.4	
glycyl-proline arylamidase	glycyl-proline p-nitroanilide	7.4	
glycyl-glycine arylamidase	glycyl-glycine p-nitroanilide	7.4	III { 1 2 4
glycine arylamidase	glycine β -naphthylamide	7.4	
cystine arylamidase	L-cystine di β -naphthylamide	7.4	
pyrrolidone arylamidase	L-pyrrolidonyl β -naphthylamide	6.0	IV { 1 2 4
α -glucosidase	p-nitrophenyl α D-glucopyranoside	6.0	
β -glucosidase	p-nitrophenyl β D-glucopyranoside	6.0	
β -galactosidase	o-nitrophenyl β D-galactopyranoside	6.0	V { 1 2 4
β -glucuronidase	p-nitrophenyl β -glucuronide	6.0	
N-acetyl β -glucosaminidase	p-nitrophenyl N-acetyl β D-glucosaminide	6.0	
phosphodiesterase	thymidine 5'-monophosphate p-nitrophenyl ester	6.0	VI { 1 2 4
phospholipase C	p-nitrophenyl phosphocholine	6.0	
alkaline phosphatase	p-nitrophenyl phosphate	8.5	

表4 DDH法によって同定された菌種の生物型コード

DDH法による菌種	菌株数	生物型コード	従来法による菌種
TB complex	1	040000	<i>M. bovis</i>
TB complex	1	040444	<i>M. intracellulare</i>
TB complex	1	050000	<i>M. bovis</i>
<i>M. terrae</i>	1	040606	<i>M. terrae</i>
<i>M. avium</i>	1	050204	<i>M. avium</i>
<i>M. avium</i>	1	050244	<i>M. avium</i>
<i>M. avium</i>	1	050266	<i>M. avium</i>
<i>M. avium</i>	2	050604	<i>M. avium</i>
<i>M. avium</i>	16	050644	<i>M. avium</i>
<i>M. intracellulare</i>	3	050644	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. nonchromogenicum</i>	1	050644	<i>M. avium</i>
<i>M. triviale</i>	1	050044	<i>M. avium</i>
?	1	140604	<i>M. fortuitum</i>
?	1	150241	<i>M. smegmatis</i>
?	1	150656	<i>M. chelonae</i>
?	1	250004	<i>M. szulgai</i>
<i>M. gordonae</i>	1	250006	<i>M. gordonae</i>
<i>M. gordonae</i>	1	250206	<i>M. gordonae</i>
<i>M. scrofulaceum</i>	1	250210	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. kansasii</i>	1	450604	<i>M. kansasii</i>
<i>M. marinum</i>	1	440004	<i>M. kansasii</i>
<i>M. marinum</i>	1	450404	<i>M. marinum</i>
?	1	550606	<i>M. phlei</i>

表3 臨床分離非定型抗酸菌株の従来法同定, ハイブリダイゼーション法同定および発色性基質による生物型別

No.	従来法同定	DDH法による同定	生物型コード
1	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050604
2	<i>M. avium</i>	<i>M. triviale</i>	050044
3	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
4	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
5	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050266
6	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
7	<i>M. avium</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	050644
8	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
9	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
10	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
11	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
12	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
13	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
14	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
15	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
16	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
17	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
18	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
19	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
20	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050644
21	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050244
22	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050204
23	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	050604
24	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	050644
25	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	050644
26	<i>M. intracellulare</i>	TB complex (<i>bovis</i>)	040444
27	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	050644
28	<i>M. szulgai</i>	—	250004
29	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	250006
30	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	440004
31	<i>M. chelonae</i>	—	150656
32	<i>M. marinum</i>	<i>M. marinum</i>	450404
33	<i>M. fortuitum</i>	—	140604
34	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	250210
35	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	250206
36	<i>M. bovis</i>	TB complex (<i>bovis</i>)	040000
37	<i>M. terrae</i>	<i>M. terrae</i>	040606
38	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	450604
39	<i>M. phlei</i>	—	550606
40	<i>M. smegmatis</i>	—	150241
41	<i>M. bovis</i> (BCG)	TB complex (<i>bovis</i>)	050000

tuberculosis の迅速診断法は、少なくとも研究のレベルでは確定したように思われる⁸⁾。しかし、非定型抗酸菌については、まだ、再現性の良いPCR法の系はなく、

DNA ハイブリダイゼーションを利用した系しか開発されていないのが現状である。しかし、これでも同定に要する期間は短縮できるので、有用である。現在、*M.*

*avium*のみを検出するキットと16種を同定できるキットが市販されている。そこで、われわれは、臨床分離非定型抗酸菌株に16種同定キットを用いると同時に、判定に要する時間はこのキットとあまり変わらず、しかも、安価であるわれわれの開発した発色性基質を用いた生物型別系も用いて、同定・型別を試みた。これによって、従来の同定法と、これらの方法の得失が判定できるものと期待した。

DNAプローブを用いたハイブリダイゼーション同定系は習熟すればかなり再現性が良いことが分かった。しかも、これまで識別の困難であった *M. avium* と *M. intracellulare* を良く識別できるなど、多くの長所を持っている。しかし、検査キットが高価であり、高い検査料が必要である。一方、DNAプローブ法とは比較にならないほど安価な発色性基質を用いた生物型別法は、やはり *M. avium* と *M. intracellulare* を識別する事ができなかった。しかし、1つの菌種をいくつかのグループに分けることができ、菌種の識別にも、ある程度参考になることは確認できた。

すなわち、この生物型別法は従来の同定法程度には同定としての役割を果たすのみならず、さらに分離株を型別して、それぞれの感染の疫学調査を可能にするものと期待できる。しかも、検査に要する時間はDNA法と同じであって、手間はDNA法よりはるかに容易であるから、多くの検体をこなせる迅速診断法として、特に、一般の検査室でDNA法の利用が難しい施設では十分に参考にできるものと思われた。

文 献

- 1) 山本正彦：非定型抗酸症. 日本臨床. 1992；増刊：414-422.
- 2) 工藤祐是, 斎藤 肇, 高橋 宏：6. 結核菌, 「微生物検査必携」, 第3版, 厚生省監修, 日本公衆衛生協会, 東京, 1987, F90-F133.
- 3) 江崎孝行, Shatha Adnan, 三宅正美：菌種の分類学的類似度を測定する定量的マイクロプレートハイブリダイゼーション法. 日細誌. 1990；45：851-857.
- 4) 山崎利雄, 高橋 宏, 中村玲子：マイクロプレートハイブリダイゼーション法による抗酸菌同定法の検討. 結核. 1993；68：5-11.
- 5) Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al. : Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*, J Infect Dis. 1990；161：977-981.
- 6) 新井俊彦, 首藤栄治, 青柳昭雄, 他. : 抗酸菌感染症の迅速診断法 4. PCR法. 結核. 1992；67：787-794.
- 7) Arai T, Komatsu S, Kusakabe A, et al. : A rapid identification and biotyping system for *Mycobacterium* species, Proceedings of International Congress for Infectious Diseases, 1986；211-215.
- 8) Abe C, Hirano K, Wada M, et al. : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction and Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test, J Clin Microbiol. 1993；31：3270-3274.