

原 著

Hybridization protection assay (HPA 法) を用いた  
結核菌の迅速薬剤感受性検査

宮 本 潤 子 ・ 古 賀 宏 延 ・ 河 野 茂  
大 野 秀 明 ・ 福 田 美 穂 ・ 小 川 和 彦  
朝 野 和 典 ・ 賀 来 満 夫 ・ 原 耕 平

長崎大学医学部第2内科

橋 本 敦 郎

大分医科大学第2内科

受付 平成7年2月1日

受理 平成7年3月24日

A RAPID SUSCEPTIBILITY TEST OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
USING HYBRIDIZATION PROTECTION ASSAY

Junko MIYAMOTO\*, Hironobu KOGA, Shigeru KOHNO, Hideaki OHNO,  
Miho FUKUDA, Kazuhiko OGAWA, Kazunori TOMONO,  
Mitsuo KAKU, Kohei HARA and  
Atsuro HASHIMOTO

(Received 1 February 1995/Accepted 24 March 1995)

The conventional drug susceptibility tests of *Mycobacterium tuberculosis* are time-consuming and usually require 2 to 4 weeks to obtain final results. In this study, we attempted to develop a novel method for rapid detection of drug-resistant *M. tuberculosis* using hybridization protection assay (HPA).

Clinically isolated strains of *M. tuberculosis* including seven isoniazid (INH) susceptible strains and six resistant strains were used. The organisms grown on Ogawa egg medium were inoculated into Middlebrook 7H9 broth and cultured at 37°C for one week. Then, the inoculum of each strain was prepared as a tenfold dilution of bacterial suspension at McFarland No. 0.5. The inocula were mixed with INH solutions to yield final concentrations of 0.1 and 1.0 µg/ml, and the resulting bacterial suspensions with or without test drug were cultured on the swaying plate at 37°C for up to 5 days. At intervals, 50 µl of each sample was withdrawn and subjected to the protocol of the HPA using acridinium-ester (AE) labeled DNA probe, and then the relative light unit (RLU) was read in a luminometer. In the case of the susceptible strains, a significant difference in the mode of increase in RLU

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

ratio (% of RLU on day x/RLU on day 0) was observed between the INH-treated and drug-free control sets within three days of cultivation, while no such differences were seen in the case of the resistant strains.

Since this method was not only rapid, safe and simple, but gives the results well correlated to those by the conventional methods, it is expected that the method will be used widely in many laboratories.

**Key words :** *Mycobacterium tuberculosis*, drug susceptibility, isoniazid, hybridization protection assay (HPA)

**キーワード :** 結核菌, 薬剤感受性, イソニアジド, HPA 法

## はじめに

近年、結核菌に対する分子生物学的技法を応用した検出法の進歩は著しく、すでに臨床の検査室レベルにおいても各種 PCR 法<sup>1)~4)</sup>、MTD<sup>5)~8)</sup>、アンプリコア<sup>9)</sup>などの DNA 診断法が施行可能となった。一方、薬剤感受性検査に関しても遺伝子レベルでの解析が進み、すでに2~3の薬剤に対する耐性遺伝子の存在が確認されている<sup>10)11)</sup>。しかし、遺伝子変異の有無と薬剤耐性の相関性はいまだ十分なものではなく<sup>12)</sup>、また種々の薬剤に対する耐性遺伝子を個別に解明するにはさらに多くの時間と労力が必要であると思われる。

従来の薬剤感受性検査には分離培養された結核菌が必要であり、さらに結核菌を薬剤含有小川培地あるいは液体培地にて培養した場合、その検査結果を得るまでには通常2~4週を要する。今回私たちは結核菌の薬剤感受性検査をより迅速に行う目的で、本来は結核菌の同定のために使用するアクリジニウムエステル (acridinum ester) 標識 DNA プローブ (AE-DNA プローブ, ACCUPROBE, Gen-Probe Inc., San Diego, Calif.) を用いた hybridization protection assay (HPA 法) を感受性検査に応用し、従来法との相関性や迅速性について比較検討したので報告する。

## 材料と方法

### 1. 供試菌株

結核菌標準株 H37Rv (京都大学胸部疾患研究所の久世文幸教授より分与) と、当科および関連施設において臨床検体から分離された結核菌のうち、isoniazid (INH) 感受性菌7株 (U106, U107, U111, U112, U115, U118, U125) と耐性菌6株 (T103, T104, U113, U122, N129, N136) を使用した。

### 2. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

#### 1) 菌液の調製

Tween 80 を含有した Middlebrook 7H9 broth (Middlebrook ADC enrichment を含有, Difco Laboratories, USA) を用いて、結核菌を 37°C で約1週間培養した後、同培地で希釈し、濁度が McFarland No.0.5 になるように調整した。

#### 2) 薬剤濃度

INH (第一製薬) を滅菌蒸留水に溶解し、0.125 µg/ml~1024 µg/ml までの14段階にわたる2倍階段希釈系列を作製し、multiple well plates (round bottom, Corning™2580, Iwaki Glass) に各 50 µl ずつ分注した後、上記1)の菌液を 50 µl 加えて 37°C で培養した。なお、薬剤の最終濃度は 0.063 µg/ml~512 µg/ml の14段階となった。

#### 3) MIC の判定

培養開始後7日目と10日目にプレートを観察し、薬剤非添加の培地に十分な菌の発育を認めた時点で MIC を判定した。判定はそれぞれの well における菌の発育状況をコントロールの well と比較するとともに、硝酸塩還元試験を行って確認した。

### 3. HPA 法による耐性菌の判定

#### 1) 至適接種菌濃度の検討

30 ml の滅菌スクリーコップ (栄研) に Middlebrook 7H9 broth を 10 ml 分注し、その中に小川培地上に発育した H37Rv の数コロニーをエーゼで採取して接種した。菌液を 37°C で2~3日振盪培養した後、数分間静置して、菌塊を含まないように上層から約 1 ml を採取し 10 ml の同 broth を分注した別の滅菌スクリーコップに接種して、さらに 37°C で4~5日振盪培養した。得られた菌液を同 broth を用いて McFarland No.1 に濁度を調整し、さらに 1~10<sup>3</sup> 倍までの10倍階段希釈系列を各 10 ml 作製した。その後、各菌液を 37°C で振盪培養し、培養開始時、3日目、5日目および7日目に各菌液を採取し、後述のプロトコールに従って relative light unit (RLU) と生菌数を測定

した。

2) INH と結核菌の培養

滅菌スクリーコップに Middlebrook 7H9 broth を 10 ml 分注し、小川培地上に発育した各種臨床分離結核菌 13 株を接種した。前述と同じ方法で McFarland No.0.5 に合わせ、さらに 10 倍希釈して接種菌液を調製した。INH は 1,000 μg/ml とするよう滅菌蒸留水に溶解し、さらに Middlebrook 7H9 broth で 1 μg/ml および 10 μg/ml の濃度に希釈した。上記の接種菌液を 9 ml と INH 溶液を 1 ml 混合することにより、INH の最終濃度を 0.1 μg/ml および 1.0 μg/ml とし、薬剤を含まない対照の菌液とともに 37°C で振盪培養した。培養開始時、3 日目および 5 日目に各菌液を 50 μl 採取して、下記の方法で RLU を測定した。また、INH 感受性菌および耐性菌の各 1 株については、後述の方法にて経時的に生菌数を測定した。

3) RLU の測定

HPA 法のプロトコールに従い、以下の要領で菌液を処理した。なお測定はすべて duplicate で行い、その平均値を測定結果とした。まずビーズが入った溶菌チューブに菌液を 50 μl、溶菌試薬 1 および 2 を各 100 μl ずつ混入し、20 分間の超音波処理 (Bransonic ultrasonic cleaner, model B2200, ヤマト科学) にて溶菌操作を行った。次に 95°C で 10 分間煮沸して菌を不活化した後、DNA プローブがコーティングされているプローブチューブに 100 μl を移し、60 ± 1°C で 15 分間のハイブリダイゼーションを行った。次いで、試薬 3 (加水分解試薬を含有) を 300 μl 加え、60 ± 1°C で 5 分間保温して未反応の AE-DNA プローブを失活させ、室温で 5 分間放冷後、検出試薬 (0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/0.001 N HNO<sub>3</sub>, 1N NaOH) を加え、化学発光測定装置 (luminometer, Leader™50, Gen-Probe Inc., San Diego,

表 供試菌株に対する INH の MIC

	菌株	MIC (μg/ml)
感受性菌	U106	≤0.063
	U107	≤0.063
	U111	0.125
	U112	0.125
	U115	0.125
	U118	0.063
	U125	0.125
	耐性菌	T103
T104		512
U113		64
U122		16
N129		512
N136		128

Calif.) で RLU を測定した。

4) 菌数定量

各培養液より 500 μl 採取し、Middlebrook 7H9 broth で希釈して、10~10<sup>6</sup> 倍までの 10 倍階段希釈系列を作製した。各々 100 μl を NaOH で中和した 2 本の 3% 小川培地 (栄研) に接種して、3~4 週後に発育した結核菌のコロニー数を数え、原液中の菌数 (cfu/ml) を算出した。

結 果

1) 供試菌株に対する INH の MIC

各菌株に対する INH の MIC を表に示した。なお、INH の耐性基準は 1 μg/ml とし、それ未満を感受性菌、以上を耐性菌と判定した。

2) 至適接種菌量

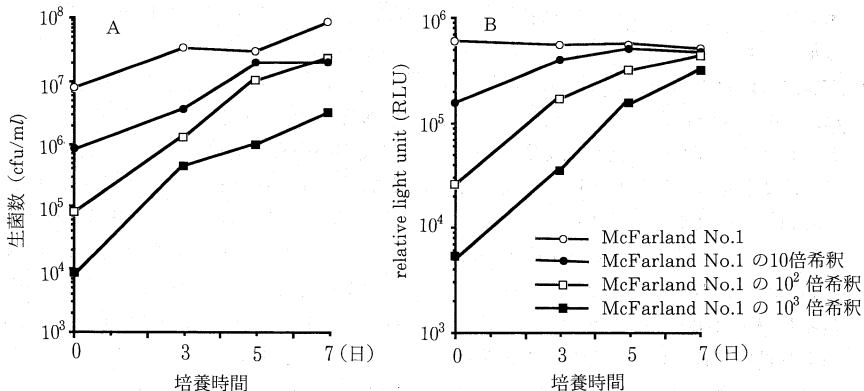


図1 種々の接種菌量における H37Rv の生菌数 (A) と RLU 値 (B) の経時変化

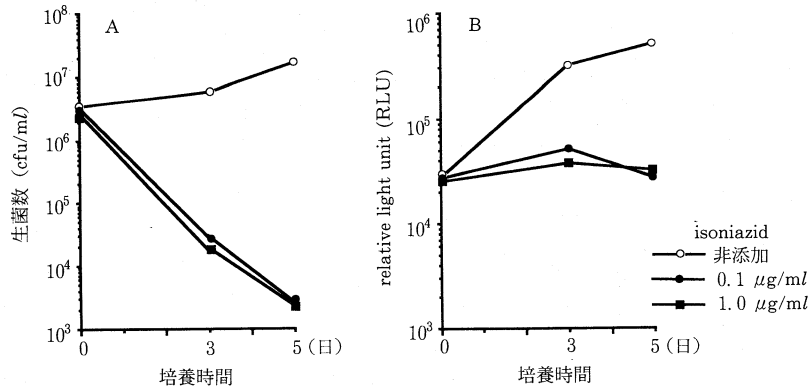


図2 INH添加時と非添加時におけるINH感受性菌(U106)の生菌数(A)とRLU値(B)の経時的変化

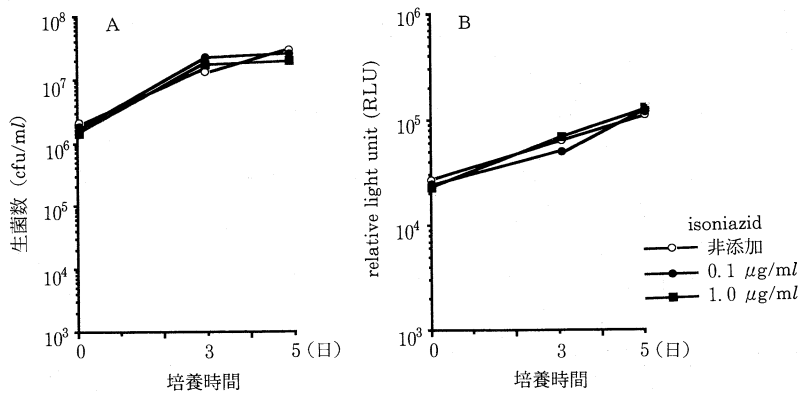


図3 INH添加時と非添加時におけるINH耐性菌(T104)の生菌数(A)とRLU値(B)の経時的変化

図1 Aに示したように、McFarland No.1に調整したH37Rv菌液の培養開始時の生菌数は $8.0 \times 10^6$  cfu/mlであり、その10倍階段希釈系列の菌数はいずれも時間の経過とともに増加した。しかもその増加速度は菌の濃度が低いほど速かった。一方、図1 Bに示したようにRLUの経時的変化は生菌数の推移とほぼ一致し、McFarland No.1では開始時の値( $6.01 \times 10^5$ )が7日目までほとんど変化せず、 $10^2 \sim 10^3$ 倍希釈液では3~5日目にかけてRLUが急激に上昇した。以上より、菌数とRLUの間には良好な相関関係が認められ、しかも菌数の変化を忠実にRLUに反映するにはMcFarland No.1の $10^2 \sim 10^3$ 倍希釈液が適当であると考えられた。他方、HPA法の結核菌同定時のカットオフ値は $3.0 \times 10^4$ であり、これより低い値は信頼性に乏しいことを考慮すると、最終的に薬剤感受性検査に用いる菌液の濁度はMcFarland No.1の $10^2$ 倍程度の希釈が適当である

と思われた。なお、これ以降の実験に関しては、実験を開始するまでの結核菌の培養期間をできるだけ短縮するために、McFarland No.1の $10^2$ 倍希釈とほぼ同等の菌数を含むと思われるMcFarland No.0.5の10倍希釈液を用いることとした。

### 3) HPA法による耐性菌の判定

INH感受性菌であるU106株を用いて、生菌数とRLUを経時的に測定した結果を図2に示した。INH添加時(0.1 μg/mlおよび1.0 μg/ml)では、生菌数(図2 A)は培養3日目~5日目にかけて急激に低下したのに対して、RLU(図2 B)は培養開始時とほぼ同じ値で推移したが、いずれの場合もINH非添加対照菌液でのこれらの指標との間に大きな差がみられた。他方、耐性菌(T104株)ではINH添加にもかかわらず生菌数およびRLUともに経時的に漸増し、INH非添加対照菌液との間にまったく差は認められなかった(図3)。

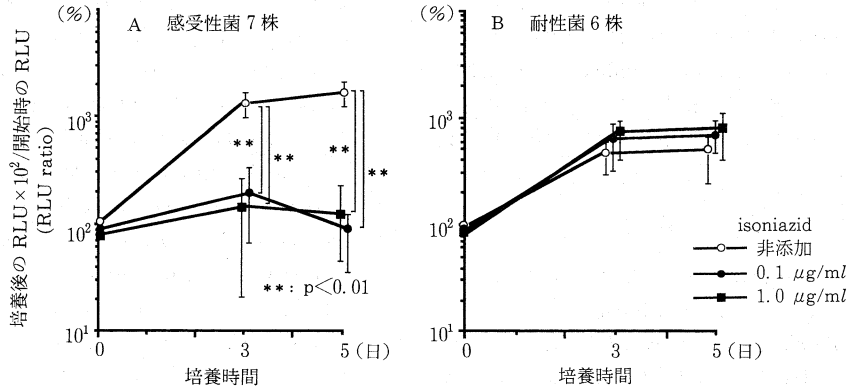


図4 INH 添加時と非添加時における INH 感受性菌 7 株 (A) および INH 耐性菌 6 株 (B) の RLU ratio の経時的変化

次に、同様の傾向が他の菌株においても観察されるか否かを知る目的で、INH 感受性菌 7 株および耐性菌 6 株を用い、INH 添加および非添加時の RLU を経時的に測定した (図 4)。なお、培養開始時の RLU は各菌株によって値が異なったために、開始時の RLU を 100% として各時点での菌液の RLU を百分率で算出し (RLU ratio)、全株の平均値と標準偏差をグラフに示した。INH 感受性の 7 株では、INH 添加時の RLU ratio は 3 日目から 5 日目にかけても培養開始時のレベルと変わるところはなく、急激な増加を示した INH 非添加対照群との間に有意差が認められた。他方、耐性菌 6 株では 5 日目まで対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 考 察

結核菌に対する迅速な薬剤感受性検査の検討は、従来より盛んに行われてきた。蛍光色素を用いた方法<sup>13)</sup>、BACTEC system による <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> を検出する方法<sup>14)~16)</sup>、bioluminescence による抗酸菌の ATP を検出する方法<sup>19)</sup> などがある。また近年では分子生物学的技法を応用した新しい方法として、Gen-Probe DNA hybridization system によるもの<sup>20)</sup> や、luciferase を用いたもの<sup>21)22)</sup>、あるいは rRNA の増幅によるもの<sup>23)</sup> などが報告されている。これらの迅速検査法はいずれも独特な技法を用いた優れた方法ではあるが、BACTEC system や Gen-Probe DNA hybridization system などは、放射性同位元素を用いるためにわが国で使用するのは困難である。また、このような欠点を改良した方法として、蛍光色素を用いた BACTEC system (BACTEC 9000 TB) や *Mycobacterium* growth indicator tube (MGIT) が開発され、

本邦においても試験が開始されつつある。しかしルチン化されるまでにはさらに詳細な検討とキット化に至る技術開発が必要であると考えられる。

そこで今回私たちは、すでにキット化され、広く抗酸菌の迅速同定法として用いられている HPA 法に着目し、それが結核菌の薬剤感受性検査に応用可能かどうかを検討した。その結果、結核菌の菌数と RLU は非常に良好な相関関係を示し、菌数の増加がそのまま RLU の上昇として確認できることが示唆された。しかし RLU の値には上限がみられ、約 10<sup>7</sup> cfu/ml 以上の菌濃度では培養中の RLU の増加はほとんど認められなかった。この原因としては、プローブチューブにコーティングされている AE-DNA プローブの量はほぼ一定であり、生菌数の増加に伴う rRNA-DNA 結合反応の飽和現象がみられたものと推測される。したがって今回の感受性検査の検討にはこの上限値以下での測定が適切であると考えられたので、至適接種菌量の決定を試みた訳である。同様に INH 添加培地中で結核菌を培養した場合にも、生菌数と RLU はよく相関し、菌の生死あるいは活動性と RLU との間に関連性があることが示唆された。つまり、HPA 法による RLU 測定値は、菌体内の rRNA の絶対量をほぼ反映していると考えられ、RLU 値と菌の活動性の状態とが密接な関係にあるものと推測された。

HPA 法の特徴は、非放射性であり安全であることや、手技が簡単で 2 時間以内に測定結果が得られることなどである。しかし本法による薬剤感受性検査は、従来法と比べて経済的負担が大きいために、MIC 測定のような詳細な検討は困難であると思われる。したがって本研究で試みたように、薬剤の耐性基準値を参考にして、2 段階程度の濃度で本法を行うことにより、従来の検査法に先だって耐性菌を迅速に検出することが可能であると考

えられる。さらに本法では分離培養された菌が必要とされるものの、薬剤の選択が自由なことや、結核菌のみでなく *Mycobacterium avium* complex にも応用できることなどから、今後一般の検査室においても迅速かつ簡便な耐性検査法として、利用価値の高い方法であると思われる。

## 文 献

- 1) Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, et al. : Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microb. 1990 ; 28 : 2668-2673.
- 2) 古賀宏延, 宮崎義継, 河野 茂, 他 : 抗酸菌に対する DNA probe 法と PCR 法. 結核. 1992 ; 67 : 795-802.
- 3) Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, et al. : Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microb. 1992 ; 31 : 2228-2232.
- 4) 橋本敦郎, 古賀宏延, 河野 茂, 他 : Nested PCR 法と DNA プローブ法を併用した抗酸菌の迅速同定. 結核. 1994 ; 69 : 767-772.
- 5) Jonas V, Alden MJ, Curry JI, et al. : Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. J Clin Microb. 1993 ; 31 : 2410-2416.
- 6) 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 Microb. 1993 ; 31 : 3270-3274.
- 7) Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, et al. : Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. J Clin Microb. 1994 ; 32 : 918-923.
- 8) 青柳昭雄, 豊田文夫, 大角光彦, 他 : 核酸 (rRNA) 増幅を応用した結核菌直接検出法 (Gen-Probe ; MTD) の臨床的検討. 結核. 1994 ; 69 : 7-14.
- 9) 青木正和, 片山 透, 山岸文雄, 他 : PCR 法を利用した抗酸菌 DNA 検出キット (アンプリコア™ マイコバクテリウム) による臨床検体からの抗酸菌迅速検出. 結核. 1994 ; 69 : 593-605.
- 10) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. : The catalase-oxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature. 1992 ; 358 : 591-593.
- 11) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. : Direct, automated detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. Antimicrob. Agents Chemother. 1993 ; 37 : 2054-2058.
- 12) 大野秀明, 古賀宏延, 河野 茂, 他 : PCR 法を用いた Rifampicin 耐性結核菌の迅速検出法に関する検討. 結核. 1994 ; 69 : 773-778.
- 13) Bercovier H, Resnick M, Kornitzer D, et al. : Rapid method for testing drug-susceptibility of *Mycobacterium* spp. and gram-positive bacteria using rhodamine 123 and fluorescein diacetate. J Microbiol. Methods. 1987 ; 7 : 139-142.
- 14) Snider DE, Good RC, Kilburn JO, et al. : Rapid drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Am Rev Respir Dis. 1981 ; 123 : 402-408.
- 15) Roberts DG, 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 Microb. 1983 ; 18 : 689-696.
- 16) Siddiqi SH, Hawkins JE, Laszlo A : Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radiometric procedure and two conventional methods. J Clin Microb. 1985 ; 22 : 919-923.
- 17) Heifets LB, Iseman MD, Cook JL, et al. : Determination of *in vitro* susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to cephalosporins by radiometric and conventional methods. Antimicrob. Agents Chemother. 1985 ; 27 : 11-15.
- 18) Lee C, Heifets LB : Determination of minimal concentrations of antituberculosis drugs by radiometric and conventional methods. Am Rev Respir Dis. 1987 ; 136 : 349

- 352.
- 19) Nilsson LE, Hoffner SE, Ansehn S : Rapid susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of mycobacterial ATP. Antimicrob. Agents Chemother. 1988 ; 32 : 1208-1212.
  - 20) Kawa DE, Pennell DR, Kubista LN, et al. : Development of a rapid method for determining the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid using the Gen-Probe DNA Hybridization System. Antimicrob. Agents Chemother. 1989 ; 33 : 1000-1005.
  - 21) Jacobs WR Jr, Barletta RG, Udani R, et al. : Rapid assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. Science. 1993 ; 260 : 819-822.
  - 22) Cooksey RC, Crawford JT, Jacobs WR Jr, et al. : A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of *Mycobacterium tuberculosis* expressing firefly luciferase. Antimicrob. Agents Chemother. 1993 ; 37 : 1348-1352.
  - 23) van der Vliet GME, Schepers P, Schukink RAF, et al. : Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. Antimicrob. Agents Chemother. 1994 ; 38 : 1959-1965.