

原 著

MycoDot テストを用いての実験的結核菌および *Mycobacterium avium* complex 感染マウスでの抗 Lipoarabinomannan 抗体の検出

佐藤 勝昌・清水 利朗  
赤木 竜也・富岡 治明

鳥根医科大学微生物・免疫学教室

USEFULNESS OF MYCODOT TEST FOR THE DETECTION OF ANTI-MYCOBACTERIAL ANTIBODIES AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF EXPERIMENTAL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AND *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX INFECTIONS IN MICE

Katsumasa SATO, Toshiaki SHIMIZU,  
Tatsuya AKAKI, Haruaki TOMIOKA\*

The MycoDot™ is a new diagnostic kit for tuberculosis which was devised by DynaGen Inc., USA. The MycoDot test is based on the detection of anti-mycobacterial antibodies in the serum samples of patients by employing plastic combs coated with lipoarabinomannan (LAM) antigen which is a highly immunogenic lipopolysaccharide presenting in the cell wall of all species of mycobacteria. It has been reported that healthy infected and BCG-vaccinated individuals do not react to the MycoDot test, while a positive reaction occurs in patients with active tuberculosis or atypical mycobacteriosis with good sensitivity and specificity. In this study, we evaluated the efficacy of MycoDot test for the detection of anti-LAM antibodies in sera of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* or *M. avium* complex (MAC). By using the MycoDot test, anti-LAM antibodies were positive in 2 out of 4 mice infected with *M. tuberculosis* 2 weeks before, while all of *M. intracellulare*-infected mice were negative at the same phase of infection. On the other hand, anti-mycobacterial (MB) antibodies were detected in the serum samples of mice infected with *M. intracellulare* as well as *M. tuberculosis* by home-made ELISA testing using whole cells of test mycobacteria as antigen. In the next experiment, mice were infected with *M. avium*. All the serum samples of mice obtained at 13 weeks after infection were negative for anti-LAM antibodies in MycoDot test, whereas they reacted positively to anti-MB antibodies in ELISA test. These results indicate that the MycoDot test is capable of detecting *M. tuberculosis* infection but not MAC infection induced in mice.

**Key words** : Serological diagnosis, MycoDot, *M. tuberculosis*, *M. avium* complex

**キーワード** : 血清診断, MycoDot, 結核菌, *M. avium* complex

別刷り請求先：  
富岡 治明  
鳥根医科大学微生物・免疫学教室  
〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

\* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo, Simane 693-8501 Japan.  
(Received 23 Jun. 1997 / Accepted 18 Nov. 1997)

## はじめに

近年、結核症あるいは *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症の迅速診断法として各種の遺伝子診断法が導入されているが、これらは特殊な機器を必要とし、操作も複雑であること、検査費用が高価であることなどから、いまだ一般臨床検査室に普及しているとは言い難い現状である。最近、米国の DynaGen 社によって結核および非結核性抗酸菌感染患者血清中の抗マイコバクテリア抗体の有無を、抗酸菌の lipoarabinoxymannan (LAM) を抗原として判定する迅速診断キット、MycoDot テストが開発され<sup>1)</sup>、本邦でもラムコジヤパン社を介しての導入が図られつつある。

本キットの手技は極めて簡便であり、検査時間は約20分と短いこと、熟練した技術や特殊な機器・器具を必要としないこと、血清を検体とすることから汚染あるいは感染などの危険が少なく、かつ検体を容易に採取でき、肺外抗酸菌症の診断も可能であること、などの利点がある。本キットでは、原法の血清20倍希釈法では約70%の感度で<sup>1)</sup>、また改良法の5倍希釈法では約80%の感度<sup>2) 3)</sup>で結核症の診断が可能であり、開発途上国では塗抹法に代わる簡便法として使用されつつあるとのことである。

今回、われわれはこのキットを入手する機会があり、実験的結核菌あるいは MAC 感染マウスよりの血清中の抗 LAM 抗体の検出を本キットを用いて試みたところ、前者では検出可能なものの、後者では抗 LAM 抗体を検出することができないことが分かったので報告する。

## 材料と方法

## (1) 供試菌

結核菌 Kurono 株、*M. avium* N-444 株 (SmT) および *M. intracellulare* N-260 株 (SmT) (いずれも臨床分離株) を用いた。これらはいずれも、7H9 broth (Difco 社) 中で培養した菌を遠心洗浄し、0.1% BSA-PBS に再浮遊させた後に -80°C に保存し、用時溶解して実験に供した。

## (2) マウス

5~8 週齢の BALB/c 系雌マウス (日本クレア) を用いた。

## (3) 感染実験

生食水に浮遊した供試菌液 ( $5 \times 10^7$  CFU/ml) の 0.2 ml を尾静脈内へ接種したマウスを所定日にネブタールで麻酔し、心臓採血を行った後に肺並びに脾を摘出した。採取した血液より遠心分離で血清を分離し -80°C に保存した。また、臓器は蒸留水 5ml でホモジナイズした後に 2% NaOH の 0.5ml を加えて約 20 秒間処理後、直

ちに 0.5N HCl で中和して、その 0.1ml を 7H11 寒天平板に接種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 2 週間培養後に CFU を算定した。

## (4) MycoDot テスト

MycoDot™ の操作手順に従って行った<sup>1)</sup>。すなわち、96 well plate に 1 検体につき検体希釈液 (160 μl) と呈色液をそれぞれ別途の well に分注し、血清の 40 μl (最終 5 倍希釈) を各検体希釈液の well に加えた。「テストコーム」(96 well plate の 8 well 分に入るように歯状のものが一体成形されたもの: well 内に入る部分をコームと呼び、ここに固相化抗原として LAM 抗原がスポット状に吸着させてある) を希釈血清中に浸し、6 分間の反応後にコームを取り出して洗浄液にて洗浄した。次いで、コームを赤色で着色された金コロイドで標識した protein A を含有する呈色液中で 10 分間反応させることにより、コームの LAM スポット上に形成された抗原 (LAM)-抗体 (抗 LAM 抗体) 複合体の Fc 部分に赤色金コロイド-protein A を結合させた。このコームを再度洗浄し、乾燥後に発色の有無を添付の判定色調表に準じて判定した。

## (5) ELISA による抗マイコバクテリア抗体 (抗 MB 抗体) の検出

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浮遊させた *M. intracellulare* N-260 株 (SmT) ( $2 \times 10^8$  /ml) の 0.1ml を 96-well microtest assay plate (Falcon 3912: Becton Dickinson 社) に加え 750 × g, 1 時間の遠心後にさらに 1% グルタルアルデヒドの 0.1ml を添加した。10 分間のインキュベーション後に、0.05% Tween 20-PBS (Tween-PBS) で well を洗浄し、1% BSA-PBS の 0.2ml を加えさらに 2 時間のインキュベーションを行った後に再度 Tween-PBS で洗浄した。次いで、PBS で希釈した被検血清 ( $10^{-1} \sim 10^{-4}$  の 10 段階希釈) の 50 μl を加え、37°C で 1 時間インキュベート後に Tween-PBS で洗浄した。その後、アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (Zymed 社) の 50 μl を加え、37°C、1 時間のインキュベート後に 1% BSA-PBS で再度洗浄し、p-ニトロフェニールフォスフェートを基質としての呈色反応を行った。発色の有無は肉眼的に判断したが、対照 well [抗原 (-) あるいは一次抗体 (-)] では発色は認められなかった。

## 結 果

## (1) 結核菌あるいは MAC 感染マウス血清中の抗 LAM 抗体の MycoDot キットでの検出

Fig. 1 には今回供試の結核菌 Kurono 株並びに *M. intracellulare* N-260 株のマウス臓器内での増殖の様相を示したが、いずれの菌株ともマウス体内で旺盛な

増殖を示した。Table 1にはFig. 1の宿主マウスの感染2週後における血清中の抗 LAM 抗体と抗 MB 抗体の有無を、それぞれ MycoDot 法と ELISA 法で検討した成績を示した。MycoDot テストでは、結核菌感染マウスで4例中2例のマウスに抗 LAM 抗体が検出されたが、MAC 感染マウスではいずれのマウスにも抗 LAM 抗体は認められなかった。

他方、並行して行った ELISA 法による抗 MB 抗体の検出試験では、結核菌感染および MAC 感染の、どちらの感染マウスにおいても高力価の抗体が検出された。この場合、結核菌感染マウスの抗体価は MAC 感染マウスのそれに比べ約10倍高かった。

(2) 長期にわたる MAC 感染での抗 LAM 抗体および抗 MB 抗体の消長

上述の成績では、実験的マウス結核症の場合、感染2週目のマウスについても MycoDot 法によりその50%は結核菌感染陽性と判定され得たが、MAC 感染マウスでは少なくともそのような感染早期には MAC 感染陽性という結果は得られないことが分かった。MAC 感染マウスでは、感染後2週という phase では未だ十分量の抗体が産生されていない可能性も考えられるので、MAC 感染マウスについてさらに長期間の検討を行った。

Table 2には *M. avium* N-444株感染マウスの感染8週後の血清中の抗 LAM 抗体および抗 MB 抗体の出現の有無を、それぞれ MycoDot テストおよび ELISA テストによって測定した成績を示した。感染2週後の場合 (Table 1) と同様に、ELISA 法による抗 MB 抗体の検出は可能であったが、MycoDot 法での抗 LAM 抗体の検出はやはり不可能であった。

感染8週後においてもなお MycoDot テストでの抗 LAM 抗体の検出は不可能であったので、さらに観察期

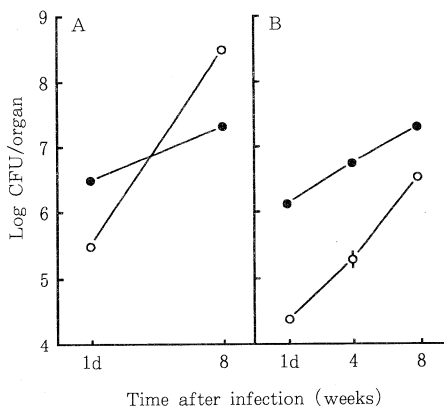


Fig. 1 Changes in the number of CFU in the lungs (○) and spleen (●) of mice infected with *M. tuberculosis* Kurono (A) or *M. intracellulare* N-260 (B). Each symbol indicates the mean  $\pm$  SEM (n=4).

間を感染後13週間に延ばして抗 LAM 抗体の検出を試みた。Fig. 2には、この場合の *M. avium* N-444株のマウス臓器内での増殖の様相を示したが、本菌株においても Fig. 1におけるような旺盛な増殖を認めることができた。

Table 3には感染後1日、5、9および13週目に採取した被検血清について MycoDot テストと ELISA テストによる抗 LAM 抗体、抗 MB 抗体の検出結果を示した。ELISA 法では抗 MB 抗体が感染5週後より13週後にわたる全期間に認められているにもかかわらず、MycoDot 法での抗 LAM 抗体の検出はいずれの時期に

Table 1 Detection of anti-mycobacterial antibodies by the MycoDot test and ELISA testing in the serum samples of mice infected with *M. tuberculosis* or *M. intracellulare*<sup>1)</sup>

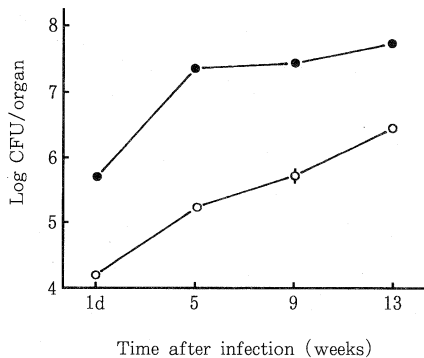
Infection (week 2)	No. of mice	No. of mice with bacterial burden in the visceral organs	Number of mice giving positive results				
			MycoDot	ELISA			
				Dilution of serum sample			
				10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Normal	5	0	0	0	0	0	0
<i>M. tuberculosis</i> Kurono	4	4	2	4	4	4	0
<i>M. intracellulare</i> N-260	4	4	0	4	2	0	0

1) Mice were infected intravenously with 10<sup>7</sup> CFU of the indicated organisms. MycoDot and ELISA tests for the serum of infected mice were performed 2 weeks after infection.

**Table 2** Detection of anti-mycobacterial antibodies by the MycoDot test and ELISA testing in the serum samples of mice during the course of *M. avium* N-444 infection<sup>1)</sup>

Time after infection	No. of mice	No. of mice with bacterial burden in the visceral organs	Number of mice giving positive results			
			MycoDot	ELISA		
				Dilution of serum sample		
			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	
1 day	5	5	0	0	0	0
8 weeks	5	5	0	5	5	0

1) Mice were infected intravenously with 10<sup>7</sup> CFU of *M. avium* N-444.



**Fig. 2** Changes in the number of CFU in the lungs (○) and spleen (●) of mice infected with *M. avium* N-444. Each symbol indicates the mean  $\pm$  SEM (n=4).

においても不可能であった。

### 考 察

結核症の血清診断はその簡便性から、特に開発途上国では重要な方法であるが、結核の発症が少ない先進国においても、結核診断の doctor's delay を回避できる利点が考えられる。今回、抗酸菌、特に結核菌の血清診断キット MycoDot を評価する機会を得たので、特に MAC 症についての有用性を含めてマウス感染モデル系を用いて検討した。

MycoDot は抗 LAM IgG 抗体を検出するために、過去に活動性の結核症の既往がある者や非結核性抗酸菌症あるいはハンセン病でも陽性となる可能性があること、他方、免疫不全を伴う結核症の場合には陽性と判定されるほどの抗体量を産生していないこともあり、陰性と誤判定される可能性があることなどが指摘されている<sup>1)</sup>。

**Table 3** Detection of anti-mycobacterial antibodies by the MycoDot test and ELISA testing in the serum samples of mice during the course of *M. avium* N-444 infection<sup>1)</sup>

Time after infection	No. of mice	No. of mice with bacterial burden in the visceral organs	Number of mice giving positive results			
			MycoDot	ELISA		
				Dilution of serum sample		
			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	
1 day	5	5	0	0	0	0
5 weeks	5	5	0	5	5	0
9 weeks	4	4	0	4	4	0
13 weeks	4	4	0	4	4	0

1) Mice were infected intravenously with 10<sup>7</sup> CFU of *M. avium* N-444.

結核患者についての米国での検討では感度70.2%とさほど高くないこと、また HIV 抗体陽性の結核でも75%の陽性率にとどまっていることなどが報告<sup>1)</sup>されている。

山中らの報告<sup>2)3)</sup>によれば、わが国の活動性結核患者での感度は79% (特異度は88%)、さらに活動性非結核性抗酸菌症患者では陽性率63%であるという。したがって、臨床的には MycoDot の使用により結核症ばかりか非結核性抗酸菌症もかなりの陽性率で検出可能であると言える。

ところが、マウス感染モデル系を用いた今回の検討では、結核症の場合、MycoDot テストでの陽性率は50%とヒトでの成績に比べてやや低く、MAC 症では抗 LAM 抗体は検出し得ないことが分かった。他方、ELISA 法を用いた場合、MAC 感染マウスでも抗体価は結核菌感染マウスのその約 1/10 以下と低いものの有意なレベルの抗 MB 抗体が検出されているので (Table 1)、MAC 菌の LAM 抗原に対する抗体もある程度は産生されていたものと考えられる。

この場合、MycoDot テストでは抗 LAM 抗体を検出できなかった理由としては、以下の考察が可能であろう。すなわち、上述の抗 MB 抗体の場合と同様に、MAC 感染マウスでの抗 LAM 抗体の抗体価も結核菌感染マウスのその 1/10 以下と低かった可能性が考えられる。とすれば、マウス MAC 症では MycoDot テストでの診断に必要な量の抗 LAM 抗体が産生されていなかったということになる。これに加えて、MycoDot テストでは診断の精度を上げるためにカットオフ値を高目に設定しているといった事情も相まって、MAC 感染マウスでは抗 LAM 抗体が検出されなかったという今回の成績につながったのではなからうか。

なお、結核菌の強毒株 (Erdman, H37Rv) あるいは弱毒株 (H37Ra), *M. bovis* BCG や *M. leprae* の LAM は arabinose-capped LAM の他にその virulence とは無関係に 40~70% は mannose-capped LAM が含まれていると報告されている<sup>4)~7)</sup>。MAC の LAM についての報告には未だ接し得ないのでその点については不明だが、すくなくとも本キットでは活動性非結核性抗酸菌症患者の63%が陽性<sup>2)3)</sup>と判定されることから考えても、本キットに用いられている結核菌の LAM 抗原でもヒトの MAC 症における抗 LAM 抗体は検出可能であると考えられる。したがって、今回の検討では LAM のエピトープの違いによって MAC 感染マウスの抗 LAM 抗体が検出できなかったという可能性は少ないもののように思われる。

第2に MycoDot テストでは、LAM 抗原と検体中の抗 LAM IgG 抗体との抗原抗体複合体の Fc 部分に、赤色素でラベルされた protein A を結合させること

によって呈色させているが、この protein A の IgG への結合性は動物種によって異なり、ヒトとマウスの IgG を比較した場合の protein A の IgG への結合性は、ヒトにおける方が強いことが知られている<sup>8)</sup>。また、この protein A と IgG の結合性は両者の IgG のサブクラスレベルにおいても異なることが知られている<sup>8)9)</sup>。

本来、MycoDot テストはヒトの IgG と protein A との結合による呈色を観察する試験法であるが、今回のわれわれの実験ではマウスの IgG と protein A との結合をみており、その結合反応は、上述した IgG の結合性の違いに起因して、ヒト IgG の場合ほど良好ではなかったのではないかと考えられる。とすれば、MycoDot テストによって MAC 感染マウスの抗 LAM 抗体を検出し得なかった理由、および結核感染マウスの抗 LAM 抗体の検出率がヒトにおける場合よりも若干劣った理由は、このようなところにあるのかもしれない。

いずれにしても、MAC 感染マウスの抗 LAM 抗体を MycoDot テストで検出できなかったのは、感染宿主が検出し得るほどの抗体量を産生していなかったということに加えて、本テストの検出系がヒト IgG をターゲットにしていることに起因するものと思われる。

## 謝 辞

MycoDot™ を御提供頂きました株式会社ラムコジャパンに深謝致します。

## 文 献

- 1) DynaGen, Inc.: MycoDot™, For the detection of antimycobacterial antibodies as an aid in the diagnosis of active tuberculosis. DynaGen, Inc., Cambridge, MA, USA.
- 2) 山中正彰, 西井一雄, 螺良英郎: 抗酸菌血症血清診断法の新しい試み. 第16回結核・非定型抗酸菌症治療研究会資料 No. 8, 1996年12月.
- 3) マイコドット法テスト共同研究会 (代表世話人: 螺良英郎): 抗酸菌抗体検出法の有用性に関する共同研究. 結核. 1997; 72: 661-615.
- 4) Chatterjee D, Bozic CM, McNeil M, et al.: Structural features of the arabinol component of the lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem. 1991; 266: 9652-9660.
- 5) Chatterjee D, Lowell K, Rivoire B, et al.: Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. J Biol Chem. 1992, 267: 6234-6239.

- 6) Venisse A, Berjeaud J-M, Chaurand P, et al.: Structural features of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Determination of molecular mass by laser desorption mass spectrometry. *J Biol Chem.* 1993 ; 268 : 12401-12411.
- 7) Khoo K-H, Dell A, Morris HR, et al.: Inositol phosphate capping of the nonreducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of *Mycobacterium*. *J Biol Chem.* 1995 ; 270 : 12380-12389.
- 8) Boyle MDP: Introduction to bacterial immunoglobulin-binding proteins. In: *Bacterial Immunoglobulin-binding proteins. Vol. 2. Applications in immunotechnology.* Edited by Boyle MDP, Academic Press Inc., U. S. A., 1990, 1-22.
- 9) Björck L and Kronvall G: Purification and some properties of streptococcal protein G, A novel IgG-binding reagent. *J Immunol.* 1984 ; 133 : 969-974.