

## 遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 の有用性の検討

<sup>1</sup>吉田志緒美   <sup>1</sup>鈴木 克洋   <sup>1</sup>露口 一成   <sup>4</sup>岩本 朋忠  
<sup>2</sup>富田 元久   <sup>1</sup>岡田 全司   <sup>3</sup>坂谷 光則

**要旨:**〔目的〕 遺伝子を用いた抗酸菌鑑別用同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA 法) のわが国における有用性の検討。〔対象〕 NHO 近畿中央胸部疾患センターにおいて新規に分離された抗酸菌 122 株。〔方法〕 INNO-LiPA 法と 3 種類の同定キット (コバス アンプリコア マイコバクテリウム法, アキュプロープ法と DDH 法) との結果を比較検討した。同定不能もしくはデータ間で違う結果を示した株についてはシークエンス解析を行った。〔結果〕 122 株のうち 112 株が 3 種類の同定キットのいずれかと INNO-LiPA 法の結果が一致した (91.8%)。相違を認めた 10 株のうち 6 株は INNO-LiPA 法とシークエンス解析の結果が一致した。しかし 2 株のうち 1 株は DDH 法の結果と一致し *M. fortuitum*, もう 1 株はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法とアキュプロープ MAC 法の結果と一致し *M. intracellulare* と判定された。INNO-LiPA 法と 3 種類の同定キットの結果がともにシークエンス解析結果と異なる株は 2 株認められた (*M. paraffinicum*, *M. mucogenicum* 近縁種)。〔考察〕 INNO-LiPA 法は正確性, 迅速性に優れており有益性が証明された。培養および生化学的性状試験と併行して実施することにより総合的な抗酸菌同定が可能であると考えられた。

**キーワード:** 抗酸菌, INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2, 同定検査, 16S rRNA 遺伝子, ITS シークエンス解析

### はじめに

抗酸菌同定検査において生化学的同定検査を実施するには多大な労力と菌量が必要である。また培養にかかる期間も結核菌だと小川培地で 3~8 週間は必要であり, 治療方針を決定するうえでも迅速な同定検査は必須である。近年, 遺伝子検査の手法を応用した抗酸菌の迅速同定検査が日常的に用いられるようになり, さまざまな測定原理から開発された菌同定用キットが市販されている。抗酸菌を正確かつ迅速に同定する性能を兼ね備えたこれらのキットは, 先人により高い評価と共に各種問題点も報告されている<sup>1)~7)</sup>。

コバス アンプリコア マイコバクテリウム法は polymerase chain reaction (PCR) を用いて DNA を増幅後, ハイブリダイゼーションすることで臨床検体や菌株を対象

として *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare* の 3 菌種が同定できる<sup>1)~3)</sup>。前倉らによると肺結核患者における塗抹陽性検体の 94.4% はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法で陽性であったが, 塗抹陰性検体の場合は 70.8% が陽性となった<sup>4)</sup>。

アキュプロープ法は検体の 16S rRNA をターゲットとして, 菌種特異的 DNA プローブとハイブリダイゼーションさせてから, 専用の検出器を用いて化学発光を検出するキットである<sup>5)</sup>。結核菌群と *M. avium* complex (MAC), *M. kansasii*, *M. gordonae* の 4 種類のキットがあり, アキュプロープ陽性となる感度は結核菌群と *M. gordonae* で 100%, MAC 95.2%, *M. kansasii* 44.0% という報告<sup>5)</sup>や, 結核菌群 87.2%, MAC 78.6%, *M. kansasii* 91.7%, *M. gordonae* 85.9% とする報告<sup>6)</sup>などがある。

DDH 法は核酸の相同性を利用し, ハイブリダイズし

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター<sup>1</sup>臨床研究センター, <sup>2</sup>研究検査科, <sup>3</sup>内科, <sup>4</sup>神戸市環境保健研究所

連絡先: 吉田志緒美, 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター, 〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町 1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)

(Received 28 Aug. 2008 / Accepted 30 Oct. 2008)

たDNAの比率をビオチン-アビジン反応を用いてそれぞれの基準DNA株と被検菌DNAのDNA塩基配列の相同性を測定するキットで18菌種の同定を一度に行うことが可能である<sup>7)</sup>。同法は「全染色体DNAの類似度(similarity)が70%以上であれば、同じ菌種としてよい」という細菌分類学の菌種同定基準を利用している。そのため相対類似度で算出された数値から供試菌がどの菌種の基準株に最も近いかという結果は得られるが、同定不能となる菌種が多い傾向がある<sup>8)9)</sup>。また「肉眼的に明らかな発色が確認された場合には吸光度を測定せずにウェルの菌種と同定してもよい」としていることも誤判定を生じやすい原因である。

INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA法)は16S-23S internal transcribed spacer (ITS) 領域をターゲットとしPCR法で増幅されたDNAを対象に、ラインプローブアッセイを用いて検出する。一度に15菌種の同定と*Mycobacterium*属に共通の*Mycobacterium* genusのプロープがあることから抗酸菌の確定が可能である<sup>10)</sup>。

INNO-LiPA法の検討はこれまでにいくつか報告はあるが<sup>10)~13)</sup>、現時点でわが国における検討報告はなされていない。今回われわれはINNO-LiPA法の迅速性ならびに正確性について上記の先に市販されている同定キットの結果と比較しその有用性を検討した。

## 方 法

### 対象

独立行政法人近畿中央胸部疾患センターにおいて新規に分離培養される菌株のうち大半を占める抗酸菌は結核菌群であるが、多くの菌種が存在し、日常検査で判定に苦慮する割合が高いのは非結核性抗酸菌 (NTM) である。今回NTMに対する同定結果の比較に重点をおき、結核菌群の菌株数を絞って検討を試みた。したがって2006年2月1日から6月30日までの期間に分離された結核菌群7株、NTM 115株の合計122株を対象とした。すべての菌株同定は同定検査結果とあわせて小川培地上でのコロニー性状の観察をもって最終判定とした。

検体内に複数の菌が混在する場合に同時に鑑別が可能かどうかを検討するため、臨床検体から複数の菌種が認められた3つの混合培養も検討に加えた。これらはあらかじめ固形培地上で異なるコロニー性状をもつと判定され、おのおの純培養を行って3種類の同定キットにて同定検査を実施、複数菌混在であることを確認した。

### 同定キット

NHO近畿中央胸部疾患センターにおいて日常検査に使用している遺伝子を用いた同定キットを使用した。

結核菌群の同定には結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット (極東製薬工業) と結核菌群同定試薬

キャピリアTB (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いた。*M. avium*と*M. intracellulare*の同定にはコバス アンプリコア マイコバクテリウム アビウムとコバス アンプリコア マイコバクテリウム イントラセルラー (コバス アンプリコア マイコバクテリウム法: ロシュ・ダイアグノスティクス), MACの同定にはアキュプローブ マイコバクテリウム アビウム コンプレックス (アキュプローブ MAC法: 極東製薬工業) を用いた。*M. kansasii*および*M. goodii*の同定には、研究用試薬であるアキュプローブ マイコバクテリウム カンサシとアキュプローブ マイコバクテリウム ゴルドネ (共に極東製薬工業) を用いた。上記以外の菌種の同定にはDDH マイコバクテリア '極東' (DDH法: 極東製薬工業) を用いた。すべての方法は添付の仕様説明書に準拠して行った。DDH法はDNAの精製が不十分な場合に同定不能の結果が得られることもあるため同定不能の結果が得られた場合には再検査を行った。

### DNAの抽出

小川培地発育菌から白金耳で径2~3mmのコロニー2個分の菌量を採取し、1.5 mlマイクロチューブに分注したインスタジーンDNA精製マトリックス (BIO-RAD) 200  $\mu$ lに懸濁した。56°C, 15~30分処理後10秒間 vortexし、正確に100°C, 8分間処理した後直ちに氷水中で急冷した。10秒間 vortexし、12000 rpm, 3分遠心した上清をINNO-LiPA法ならびにシークエンス解析法に用いた。

### INNO-LiPA法

INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA法: INNOGENETICS) は、発色確認用コントロールと抗酸菌特異的プロープ (MYC genus) および菌種鑑別のための22本のITS遺伝子プロープが固相化されたストリップ状のキットである。プロープは12菌種のプロープに加えて、3種類の subtypeが鑑別可能な*M. kansasii*プロープ、4種類のMAIS complexプロープ、*M. abscessus*を含んだ3種類の*M. chelonae* complexプロープが配置されている。同キットの使用説明書に準拠して16S-23S ITS領域の遺伝子のPCR増幅を行い、得られたPCR増幅産物をLiPA検体として使用した。LiPA検体をハイブリダイズさせ、得られた発色パターンによって抗酸菌の同定を行った (Table 1)。

INNO-LiPA法においてはPCRの後、すべてのPCR産物を電気泳動し得られたバンドから増幅の確認を行った。またDDH法と同様にMYC genusにしか発色が見られない場合、再検査を行った。

### 16S rRNA遺伝子、ITS領域のシークエンス解析

3種類の同定キットとINNO-LiPA法により同定不能であった株、ならびに結果の乖離が認められた株に対し

**Table 1** Interpretation of *Mycobacterium* species by using the INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2

Line	Probe	Taxa reacting with the probe
1	Conjugate Control	
2	MYC genus	Presence of <i>Mycobacterium</i> in the test sample
3	MTB	<i>M. tuberculosis</i> complex: <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. africanum</i>
4	MKA-1	<i>M. kansasii</i> (group I)*
5	MKA-2	<i>M. kansasii</i> (group II)*
6	MKA-3	<i>M. kansasii</i> (group III, V, VI)*, <i>M. gastri</i>
7	MXE	<i>M. xenopi</i>
8	MGO	<i>M. gordonae</i>
9	MGV	<i>M. genavense</i>
10	MSI	<i>M. simiae</i>
11	MMU	<i>M. marinum</i> + <i>M. ulcerans</i>
12	MCE	<i>M. celatum</i>
13	MAIS	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , MAC, <i>M. malmoense</i>
14	MAV	<i>M. avium</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>M. silvaticum</i>
15	MIN-1	<i>M. intracellulare</i> (sqv. Min-A, -B, -C, and-D)
16	MIN-2	<i>M. intracellulare</i> (sqv. Mac-A)
17	MSC	<i>M. scrofulaceum</i>
18	MML	<i>M. malmoense</i>
19	MHP	<i>M. haemophilum</i>
20	MCH-1	<i>M. chelonae</i> complex (group I, II, III, IV, <i>M. abscessus</i> )*
21	MCH-2	<i>M. chelonae</i> complex (group III, <i>M. abscessus</i> )*
22	MCH-3	<i>M. chelonae</i> complex (group I)*
23	MFO	<i>M. fortuitum</i> - <i>M. peregrinum</i> complex
24	MSM	<i>M. smegmatis</i>

\*group is based on sequevar derived from 16S-23S nucleotide sequences. sqv., sequevar

て、データベースが豊富な 16S rRNA 遺伝子のシーケンスを、さらに 16S rRNA 遺伝子の相同性解析で同定が困難な菌株に対しては ITS シークエンス解析を追加し菌種を決定した。PCR 反応は岩本らの方法<sup>14)</sup>に準じ、Takara Ex Taq (タカラバイオ)を用いて、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 1分を 35 サイクル行った。16S rRNA 遺伝子の超可変部 A と B を含む領域をプライマー 285F [5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'] と 264R [5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3'] を用いて PCR 増幅産物を得た。ITS 領域全長の増幅には ITS1 [5'-GAT TGG GAC GAA GTC GTA AC-3'] と ITS2 [5'-AGC CTC CCA CGT CCT TCA TC-3'] を用いた。PCR 産物を精製した後 BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan) を用いて 16S rRNA 遺伝子の部分配列と ITS 全長の塩基配列を得た。得られた塩基配列は、Ribosomal Differentiation of Microorganisms: RIDOM を用いて相同性検索を行い、99% 以上の塩基配列一致をもって同一菌種と決定した。

## 結 果

供試菌 122 株のうち 112 株において INNO-LiPA 法と 3 種類の同定キットの結果が一致した。対象菌株のうち結核菌群の 7 株はすべて、結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット、キャピリア TB と INNO-LiPA 法の結果が一致した。NTM 115 株のうちアキュプローブ

MAC 法で MAC と同定され、コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により *M. avium* と同定された 24 株は INNO-LiPA 法では MAIS と MAV プローブのバンドを認めた。一方アキュプローブ MAC 法で MAC、コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により *M. intracellulare* と同定された 7 株が MAIS と MIN-1 プローブに反応していたが、菌株 23 のみ MIN-1 に反応を示さず結果に乖離が見られた。DDH 法を実施した 83 株のうち再検査を実施しても同定不能となった株は 6 株認められた。これら 6 株のうち 3 株は INNO-LiPA 法でも MYC genus にしか反応が見られなかった。一方 DDH 法で菌種同定ができたが INNO-LiPA 法との間に結果の食い違いが見られた株は 3 株認められた。したがって 3 種類の同定キットのいずれかと INNO-LiPA 法との間で同定不能や結果が異なった 10 株に対してシーケンス解析を行った。

6 株 (菌株 2, 19, 14, 22, 7, 6) はシーケンス解析結果と INNO-LiPA 法の結果が一致した。菌株 2 と 19 は INNO-LiPA 法で MKA-3 の反応を認め *M. kansasii* 3 と判定され、シーケンス解析からそれぞれアキュプローブ カンサシで陰性となる *M. kansasii* sqv. III と VI と判定された。菌株 14 は INNO-LiPA 法、シーケンス解析ともに *M. gordonae* と判定された。一方、菌株 5 と 23 の 2 株は同定キットの結果とシーケンス解析結果が一致した。菌株 5 は、INNO-LiPA 法で MYC genus に反応が認

Table 2 Discrepant and unidentified results in identification of *Mycobacterium* species, including 9 isolates of *M. lentiflavum*.

Isolate No.	Cobas AmpliCor system	AccuProbe	DDH	INNO-LiPA	16S rRNA gene		Identity (%)	ITS	Identity (%)
					16S rRNA gene	ITS			
9 isolates	Negative	Negative	Unidentified**	MYC genus	<i>M. lentiflavum</i> DSM44418T	429/429 (100)		429/429 (100)	
2	Negative	Negative	Unidentified**	<i>M. kansasii</i> 3	<i>M. kansasii</i> Borste 8875/99, sqv. VI-3	441/441 (100)	<i>M. kansasii</i> , MkaF	277/277 (100)	
19	Negative	Negative	Unidentified**	<i>M. kansasii</i> 3	<i>M. kansasii</i> Borste 539/99, sqv. III	440/440 (100)	<i>M. kansasii</i> , MkaC	279/279 (100)	
14	Negative	NT	Unidentified**	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> Borste 11340/99, sqv. III	440/440 (100)	<i>M. gordonae</i> , MgoC	270/270 (100)	
22	Negative	NT	Unidentified**	MYC genus	<i>M. interjectum</i> ATCC51457T	430/430 (100)			
7	Negative	NT	Unidentified**	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> or <i>M. chelonae</i> ( <i>M. abscessus</i> by ITS)	428/428 (100)	<i>M. abscessus</i> DSM44196	294/294 (100)	
6	Negative	NT	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i> or <i>M. chelonae</i> ( <i>M. chelonae</i> by ITS)	428/428 (100)	<i>M. chelonae</i> Mche B	293/294 (99.7)	
5	Negative	NT	<i>M. fortuitum</i>	MYC genus	<i>M. fortuitum</i> DSM46621T	428/428 (100)			
23	<i>M. intracellulare</i> MAC*	MAC*	NT	MAIS	<i>M. intracellulare</i> ATCC35770 sqv. III	442/442 (100)			
13	Negative	NT	Unidentified***	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mucogenicum</i> ATCC49650T	423/428 (98.8)			
18	Negative	NT	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. intracellulare</i> 2	<i>M. paraffinicum</i> DSM44181T	439/439 (100)			

\**M. avium* complex \*\*slow growers \*\*\*rapid growers NT: not tested T, Type strain sqv., sequevar

められたが菌種の特定には至らず、DDH法とシーケンス解析では *M. fortuitum* と同定された。菌株23はコバスマイクロア マイコバクテリア法で *M. intracellulare*, アクユプローブ MAC法で MAC, INNO-LiPA法で MAIS と判定され、シーケンス解析で *M. intracellulare* ATCC 35770 sqv. III (Mac-D) と100%相同と判定された。

シーケンス解析結果といずれかの方法の結果が異なった株 (菌株13, 18) は各々 *M. mucogenicum* 近縁種と *M. paraffinicum* と同定された。

小川培地上で遅発菌と観察され、コバスマイクロア マイコバクテリア法, アクユプローブ法, DDH法でも同定不能となり、INNO-LiPA法で MYC genus にしかバンドの発色が見られなかったがシーケンス解析で *M. lentiflavum* と同定された株が9株認められた (Table 2)。

複数菌種が混在していた3混合培養は INNO-LiPA法でも複数のバンドパターンが認められた (*M. tuberculosis* + *M. gordonae*, *M. avium* + *M. fortuitum*, *M. kansasii* + *M. gordonae*)。

## 考 察

分子遺伝学的に近縁な菌種であり16S rRNA遺伝子に違いが見られない場合、ITS領域のほうが進化速度は速いため、より多様性のある配列結果が得られる。ITS領域をターゲットとした INNO-LiPA法はITS領域で高い多型性が知られているMACに対して4種類の重型プローブを使って重型判定を可能としている。菌株23はアクユプローブMAC法でMAC, コバスマイクロア マイコバクテリア法で *M. intracellulare*, シークエンス解析で *M. intracellulare* ATCC 35770 sqv. III (Mac-D) と判定された。INNO-LiPA法では同タイプに対応する重型プローブは設計されていないためにMAISプローブのみの反応となった。LebrunらもATCC 35770の検討で同じくMAISプローブにのみ発色が認められたと報告している<sup>13)</sup>。したがって、ITS領域において菌種内多型性を示す菌種に対しては、シーケンス解析で相同性を確認することが重要となってくる。

シーケンス解析といずれの方法とも結果が食い違った2株のうち菌株18はアクユプローブMAC法陰性、DDH法で *M. scrofulaceum* となり、INNO-LiPA法でMAISとMIN-2に発色が見られ *M. intracellulare* sqv. Mac-A と判定された。遅発菌である同菌株は16S rRNA解析では100%の相同性で *M. paraffinicum* DSM 44181 と判定され、同じく *M. scrofulaceum* DSM 43992 とは99%の相同性が見られた。Tortoliらも *M. paraffinicum* はMAISとMIN-2に発色が見られたがアクユプローブMAC法は陰性であったと報告している<sup>10)</sup>。一方Lebrunらはアクユロー

ブ MAC 法陰性、INNO-LiPA 法では MAIS のみにバンドに発色があり、シークエンス解析で *M. paraffinicum* と判定されたが同時に *M. scrofulaceum* DSM 43992 と 98.9% の相同性があったと報告している<sup>13)</sup>。今回アキュプローブ MAC 法で MAC, コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により *M. avium* と同定された菌株はすべて INNO-LiPA 法で明確に MAV に発色が見られ、アキュプローブ MAC 法で MAC, コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により *M. intracellulare* と判定された菌株も上記の菌株 23 以外は MIN-1 に発色が見られた。したがって唯一 MIN-2 にバンドを示した菌株 18 は *M. intracellulare* sqv. Mac-A とかなり相同性が高い近縁菌種と考えられた。

菌株 13 は 16S rRNA シークエンス解析で *M. mucogenicum* ATCC 49650T と 5bp の違い (98.8% の相同性) が見られ *M. mucogenicum* の近縁種と推定された。小川培地上で迅速に発育し DDH 法で同定不能、INNO-LiPA 法で *M. fortuitum* と判定されており、結果に乖離が見られた。*M. mucogenicum* は古くは *M. chelonae*-like として知られていたが、16S rRNA 遺伝子では *M. chelonae* よりも *M. fortuitum* に近い系統に位置しており<sup>15)</sup>、現在では *M. chelonae-abscessus* グループと *M. fortuitum* グループに近縁の迅速発育菌として独立したグループと定義されている。Ballard らは同じく ATCC 49650T と 5 bp 違いでなおかつ ATCC 49649 と 1 bp 違いの *M. mucogenicum* N248 を解析しており、新しい subspecies の可能性があるとして報告している<sup>16)</sup>。迅速発育菌は多様性に富んでおり、菌株 13 も *M. mucogenicum* の variant type の可能性が考えられた。

同じく迅速発育菌であった菌株 5 は INNO-LiPA 法では MYC genus のみ発色が見られ、DDH 法で *M. fortuitum*、シークエンス解析で *M. fortuitum* DSM46621 と DSM44220 に 100% の相同性が認められた。Padilla らは INNO-LiPA 法で同じタイプの DSM46621 株は *M. fortuitum* と同定されたと報告している<sup>12)</sup>。われわれの検討では同菌種の DSM44220 株 (*M. fortuitum* subspecies *acetamidolyticum*) は DDH 法と INNO-LiPA 法で *M. fortuitum* と同定できた (データ未掲載)。*M. fortuitum* は ITS シークエンス解析で sqv. I ~ IV が認められており高い多型性を示すため<sup>17)</sup>、迅速発育菌の詳細な亜型解析にはシークエンス解析が重要であると思われた。

遺伝子を用いた同定キットによる判定と併行して従来法やコロニー性状から菌種を鑑別することは非常に重要である。菌株 22 はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法、アキュプローブ法、DDH 法で同定不能となった遅発育菌である。INNO-LiPA 法では MYC genus の反応が見られたが、シークエンス解析では *M. interjectum* と判定された。*M. interjectum* は非光発色性の遅発育菌でかつ 16S rDNA 配列が特異的であり、遺伝子を用いた同

定キットによる菌種同定は困難である<sup>18)</sup>。INNO-LiPA 法においても該当プローブが固相化されていないため同菌種の同定はできず、培養でのコロニー性状の観察や生化学的性状試験が鑑別上重要になってくる。同様に菌株 2 と 19 は、3 種類のプローブで *M. kansasii* の亜型を判別可能である INNO-LiPA 法で MKA-3 に発色した。16S rRNA 遺伝子のシークエンス解析から *M. kansasii* sqv. III と VI とに判定されたが研究用試薬アキュプローブ カンサシで陰性となるため *M. kansasii* と判定されなかった。日常検査では光発色試験に及んでいなかったが、改めて実施した結果 *M. kansasii* と同定できた。

コロニーの光発色試験での光発色菌、暗発色菌、非光発色菌の鑑別は純培養を用いるため可変的、主観的であり、熟練を要する。*M. szulgai* は 37℃ で暗発色性、25℃ 培養で光発色性になる。*M. simiae* の光発色性の出現は通常 1 時間の光照射のところ 6~24 時間の光照射が必要であり注意を要する。培養時のコロニー性状の観察において、S 型、R 型、その移行型 (SR 型、RS 型) の性状が継代を重ねることで変化してくることがある。また発育速度の観察は、遅発育菌でも大量の菌を接種すれば 7 日ぐらいで発育は見られる場合はあるし、迅速発育菌での分離培養の時にはコロニーの発生までに時間がかかる場合もある。したがって培養条件により変化する菌の性状を十分考慮して、なるべく初代分離菌について詳細に観察することが望ましい。

INNO-LiPA 法の製造元である INNOGENETICS 社の本社がベルギーに位置するため、欧米の AIDS 患者から分離された *M. genavense*<sup>19)</sup> や、イギリス、スコットランド、ウェールズ、スウェーデン、フランスで分離が増えている *M. malmoense*<sup>20)</sup> といった菌種に対する同定が可能となっている。わが国では現時点でのこれらの菌種による感染症の報告は非常にまれであるため、今後これら稀少菌種の同定の際には大きな威力を発揮すると思われる。一方、最近わが国で分離の報告が増加している遅発育菌の *M. lentiflavum*<sup>14)</sup> が今回シークエンス解析により 9 株確認されたが、対応プローブが配置されていない INNO-LiPA 法では MYC genus にしかバンドの発色が見られず同定に至らなかった。臨床での有用性をより高めるために、わが国の抗酸菌分離状況にあわせた INNO-LiPA 法の仕様改良を切望したい。

今回有用性が認められた INNO-LiPA 法は手技面でも PCR 増幅後約 3 時間で判定可能であり、迅速性が証明された。ハイブリダイゼーションから洗浄、発色までを行う自動化ハイブリダイゼーション装置 Auto-LiPA を利用すれば労力の軽減が可能であると思われる。また INNO-LiPA 法はストリップ上に得られるバンドの有無で判定するため、DDH 法のような読み取り時の測定誤差は少

なくなると考えられる。複数菌混合培養における複数菌種同定も可能であることから、単一分離培養に要する時間や手間が省かれ、迅速に同定結果が得られることが明らかとなった。

抗酸菌における遺伝子検査の進歩は特に目覚ましく、今回用いた検査法も含めて多様な検査キットが市販されている。各種キットの特徴を熟知したうえでそれぞれの施設に適した検査法を選択し、各キット間に生じる結果の乖離や同定不能な株が存在する場合を考慮して菌種同定を行うことが望まれる。またこれらキットは定性用検査であり、検体内の菌量を反映できないため、塗抹・培養検査の結果と同定結果とを鑑みて治療方針を決定することが重要である。特にNTMを分離した場合には非結核性抗酸菌症の診断基準<sup>21)22)</sup>と合わせて総合的に判断すべきである。

## 文 献

- Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al.: Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and Roche PCR-microwell plate hybridization method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for direct detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1996 ; 34 : 130-133.
- 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.
- Wobeser WL, Krajden M, Conly J, et al.: Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1996 ; 34 : 134-139.
- 前倉亮治, 横田総一郎, 小倉 剛: 抗酸菌感染症診断の進歩. *分子呼吸病.* 1998 ; 2 : 346-352.
- Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, et al.: Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1992 ; 30 : 2476-2478.
- Reisner BS, Gatson AM, Woods GL: Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures. *J Clin Microbiol.* 1994 ; 32 : 2995-2998.
- Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al.: Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol.* 1991 ; 29 : 1596-1603.
- 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.
- 斉藤 宏, 長友雅彦, 中野雅信, 他: DNA-DNA Hybridizationを原理とする「DDHマイコバクテリア「極東」」を用いた抗酸菌同定とその同定精度の検討. *JARMAM.* 1994 ; 6 : 23-28.
- Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G: Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 4418-4420.
- Miller N, Infante S, Cleary T: Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol.* 2000 ; 38 : 1915-1919.
- Padilla E, González V, Manterola JM, et al.: Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and GenoType Mycobacterium assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2004 ; 42 : 3083-3088.
- Lebrun L, Weill FX, Lafendi L, et al.: Use of the INNO-LiPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43 : 2567-2574.
- 岩本朋忠, 中永和枝, 石井則久, 他: *Mycobacterium lentiflavum*の菌種内塩基配列変異に関する研究. *結核.* 2008 ; 83 : 417-422.
- Springer B, Böttger EC, Kirschner P, et al.: Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1995 ; 45 : 262-267.
- Ballard J, Turenne CY, Wolfe JN, et al.: Molecular characterization of nontuberculous mycobacteria isolated from human cases of disseminated disease in the USA, Thailand, Malawi, and Tanzania. *J Gen Appl Microbiol.* 2007 ; 53 : 153-157.
- Richter E, Niemann S, Rüscher-Gerdes S, et al.: Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (Accu Probe) and molecular techniques. *J Clin Microbiol.* 1999 ; 37 : 964-970.
- Tortoli E: Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev.* 2003 ; 16 : 319-354.
- Bogdan C, Kern P, Richter E, et al.: Systemic infection with *Mycobacterium genavense* following immunosuppressive therapy in a patient who was seronegative for human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 1997 ; 24 : 1245-1247.
- The Research Committee of the British Thoracic Society: Pulmonary disease caused by *M. malmoeense* in HIV negative patients: 5-yr follow-up of patients receiving standardised treatment. *Eur Respir J.* 2003 ; 21 : 478-482.
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al., on behalf of the ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee: An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 ; 175 : 367-416.
- 日本結核病学会非結核性抗酸菌症対策委員会, 日本呼吸器学会感染症・結核学術部会: 肺非結核性抗酸菌症診断に関する指針—2008年. *結核.* 2008 ; 83 : 525-526.

## Original Article

EVALUATION OF THE INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2  
FOR MYCOBACTERIAL IDENTIFICATION

<sup>1</sup>Shiomi YOSHIDA, <sup>1</sup>Katsuhiko SUZUKI, <sup>1</sup>Kazunari TSUYUGUCHI, <sup>4</sup>Tomotada IWAMOTO,  
<sup>2</sup>Motohisa TOMITA, <sup>1</sup>Masaji OKADA, and <sup>3</sup>Mitsunori SAKATANI

**Abstract** [Purpose] Evaluation of the INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (the INNO-LiPA assay) for mycobacterial identification.

[Materials and Methods] The laboratory identifications consisting of Cobas Amplicor systems, AccuProbe, and DDH, are commonly used to identify mycobacterial isolates in Japan. We compared the results between the INNO-LiPA assay and the common methods. A total of 122 clinical isolates from NHO Kinki-chuo Chest Medical Center from 1 February to 30 June 2006 were tested.

[Results] There was agreement between the INNO-LiPA assay and the common methods for 112 mycobacterium isolates. The six discordant isolates have showed same results between sequencings and the INNO-LiPA assay. The one *M. fortuitum* isolates was indicated correctness by DDH and the one *M. intracellulare* isolates was recognized by Cobas Amplicor systems and as MAC by AccuProbe MAC. Moreover, discrepant results between sequencings and mycobacterial identifications including the INNO-LiPA assay

were 2 isolates (*M. paraffinicum*, *M. mucogenicum* variant type).

[Conclusion] The INNO-LiPA assay could provide rapid and correct identification results with clear-cut and easy interpretation.

**Key words:** Mycobacteria, INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2, Identification, 16S rRNA gene, ITS sequencing

<sup>1</sup>Clinical Research Center, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, <sup>3</sup>Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization (NHO) Kinki-chuo Chest Medical Center, <sup>4</sup>Kobe Institute of Health

Correspondence to : Shiomi Yoshida : Clinical Research Center, NHO Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan.  
(E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)