

結核菌群用同定キットで陽性を示した非結核性抗酸菌について

¹青野 昭男 ¹鹿住 祐子 ¹前田 伸司 ²東 由桂
⁵土屋 滋夫 ⁶岩本 朋忠 ⁷中永 和枝 ⁴早川 啓史
³齋藤 肇

要旨：〔背景〕 齋藤らが発表した12名の肺疾患患者喀痰から分離された未だ記載をみない抗酸菌は結核菌とは明らかに異なる性状を示すが、16S rRNA 遺伝子塩基配列では、結核菌と高い相同性を有していた。最近、われわれも抗酸菌同定依頼菌株中に上記の諸性状を示す4菌株を認めた。〔目的〕 これら4株の供試菌について生化学的・遺伝子学的性状を結核菌と比較した。〔結果〕 供試菌はいずれもコロニーはS型、発育所要日数は37℃3週間、キャピリアTB陰性、全供試菌株間の16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性は100%で、次に高い相同性を示したのは結核菌 ATCC27294 (97.8%)であった。*rpoB* 遺伝子塩基配列の結核菌との相同性は低値 (90.2%)を示した。TRCとMTDで結核菌群陽性、DDHでは判定不能、他の遺伝子検査 (コバスアンプリコア, コバス TaqMan, アクユプローブ) で結核菌群陰性であった。〔考察〕 供試菌と結核菌は16S rRNA 遺伝子塩基配列が高い相同性を示したことから、市販の結核菌群同定用キットで結核菌群と誤って判定されるものがあり、菌の同定には、固形培地上のコロニーを含めた総合的な判断が必要である。

キーワード：TRC, TRC Rapid M.TB, MTD, DDH

はじめに

齋藤ら^{1)~3)}は12名の肺疾患患者喀痰より培養学的・生化学的・免疫学的諸性状において互いに近似し、明らかに結核菌群とは異なる非光発色性抗酸菌を分離し、分子生物学的にはいずれもDDHテスト陰性、全菌株間の遺伝子塩基配列の相同性は100%であったが、注目すべきは分離菌と *Mycobacterium tuberculosis* NCTC7416^Tとの相同性が99.1%ときわめて高かった、新種と思われる抗酸菌について報告している。

今回われわれは、同定依頼のため結核予防会結核研究所へ送られてきた抗酸菌の中に上記の齋藤らの報告している新抗酸菌種と思われる4菌株を認めた。これらの菌株は結核菌群とは全く異なるコロニー形態を示したが、16S rRNA 塩基配列の相同性は超可変領域を含む444 bpにおいて97.8%と比較的高かった。そこでこれらの抗酸

菌が今日、臨床の場で結核菌群の同定に広く用いられている市販キットで交差反応がみられる可能性はないかと考え、検討したので以下に報告する。

対象と方法

(1) 供試菌株

4施設から結核予防会結核研究所へ同定を依頼された4菌株 (A, B, CおよびDと仮称)。各菌株が分離されたのはA株が1999年、B株が2004年、C株とD株が2008年であった。

(2) 遺伝子検査

16S rRNA法はRIDOMデータベースにより超可変領域の444 bpの相同性を検索し、供試菌が98%以上の最も高い相同性スコアを有する既知承認菌種とした。*rpoB* 遺伝子法は結核研究所 *rpoB* 遺伝子データベースにより306 bpの相同性を検索し、99%以上をもって判定した⁴⁾⁵⁾。

¹財結核予防会結核研究所, ²結核予防会複十字病院臨床検査部, ³財広島県環境保健協会, ⁴独立行政法人国立病院機構天竜病院, ⁵東ソー株式会社バイオサイエンス事業部マーケティング部, ⁶神戸市環境保健研究所微生物部, ⁷国立感染症研究所ハensen病研究センター感染制御部

連絡先：青野昭男, (財結核予防会結核研究所, 〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: aono@jata.or.jp)

(Received 28 Dec. 2009/Accepted 2 Feb. 2010)

さらに MTB 群 rRNA 検出試薬 TRC Rapid M.TB (東ソ一), コバスアンプリコア™マイコバクテリウム ツベルクローシス (ロシュ・ダイアグノスティクス), コバス TaqMan MTB (ロシュ・ダイアグノスティクス), DNA プローブ「FR」-MTD (富士レビオ), DDH マイコバクテリア '極東' (極東製薬工業), アクユプローブ結核菌群同定 (極東製薬工業) を各キット添付文書に従って行った。

(3) イムノクロマトグラフィー

キャピリア TB (BD) を添付文書に従って行った。

(4) 培養学的・生化学的性状試験

従来法による性状試験は結核検査指針2007⁶⁾に従い、発育温度、発育速度、コロニー形態およびナイアシン蓄積試験を行った。

結 果

今回われわれが供試した全4菌株間の16S rRNAおよび *rpoB* 遺伝子塩基配列の相同性はともに100%、次に最も高い相同性を示したのは *M. tuberculosis* ATCC27294 (97.8%) および *M. shinshuense* ATCC33728 (92.2%) で、*M. tuberculosis* ATCC27294 の *rpoB* 遺伝子塩基配列の相同性は90.2%と低かった。さらに、齋藤らが報告した新抗酸菌種と思われる12株とも100%一致しており同一菌種に所属するものと思われた。

上述のように供試4菌株の16S rRNA 遺伝子塩基配列が結核菌と最も高い相同性 (97.8%) を示したことから、本研究の主要目的である結核菌群用の各種同定キットとの反応性を検討したところ、Table 1に一括表示したよ

うに、TRCとMTDでは供試4株がすべて陽性を示し結核菌群と誤って判定されたが、アンプリコア、TaqMan、アクユプローブ、キャピリア TBでは全株が陰性で結核菌群と判定されなかった。さらにDDHでは供試4株のすべてにおいて最も強く発色したウエルの吸光度と2番目に高い吸光度の相対類似度が70%よりも高い値を示し、結核菌群を含む18菌種のいずれにも該当する菌はなく、同定不能であった。

供試全菌株は小川培地上37℃、3週間培養で発育は微弱であったが、クリーム色で非光発色性のS型コロニーを形成し、25および42℃での発育、cord形成性、ナイアシン蓄積のいずれも陰性で、これらの若干の諸性状からも結核菌群以外の抗酸菌であることが示唆された。

考 察

近年、抗酸菌検査は多くの場合、液体培地による分離培養・薬剤感受性試験、分子遺伝学的方法などによる同定試験という流れにのって行われ、固形培地でのコロニー性状の観察すらなされることなく検査が終了するケースが多いようである。しかし、臨床検査の場において広く一般に用いられている結核菌群同定キットの中にはTable 2に示すように、他の菌との間の交差反応がみられ、正しく同定されない場合が報告されている。例えば、*M. marinum*, *M. celatum* はMPB 64菌体外分泌タンパクを産生しないが、キャピリア TBでは疑陽性ないし陽性を示す場合があり⁷⁾、TRCでも *M. marinum* との交差反応がみられ (添付文書)、またMTDで *M. celatum*, *M. terrae-like organisms* と結核菌群との間に交差反応がみられると

Table 1 Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by using commercial kits

Kits	Strains			
	A	B	C	D
TRC	+	+	+	+
AMPLICOR	—	—	—	—
TaqMan	—	—	—	—
MTD	+	+	+	+
DDH (identity)	unknown (97.2%)*	unknown (91.1%)*	unknown (80.3%)*	unknown (93.1%)*
Accu-Probe	—	—	—	—
CapiliaTB	—	—	—	—

*: identity should be less than 70%

Table 2 Cross-reaction in tests for identification of mycobacteria

Methods	Species	Misidentification	Reference
TRC	<i>M. marinum</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex	10)
MTD	<i>M. celatum</i> & <i>M. terrae-like organisms</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex	11)
DDH	<i>M. heckeshornense</i>	<i>M. xenopi</i>	5)
CapiliaTB	<i>M. marinum</i> & <i>M. ulcerans</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex	7)

いう (MTD 添付文書 English 版)。DDH は代表的抗酸菌 18 菌種の同定が 1 回の検査でできるという利点があるが、それ以外の抗酸菌では同定不能、あるいは近縁菌では誤同定される場合がある。例えば、*M.heckeshornense* が *M.xenopi*, *M.shinshuense* が *M.marinum*, *M.massiliense* が *M.abscessus* と誤って判定される可能性がある。このように遺伝子学的方法・免疫クロマトグラフィーなどを用いても 100% 正しい結果が得られるものではなく、より精度の高い結果を得るためには、菌の培養学的・生化学的性状をも加味して菌の同定を行うことが望まれる。

16S rRNA の全領域は約 1500 bp あり、今回、対象としたのはそのうちの 444 bp であり、われわれが経験した被検株はおそらく一部 16S rRNA 領域において結核菌群に近い遺伝子塩基配列が存在するものと思われる。

TRC は結核菌群の 16S rRNA をターゲットとし、1 ステップで増幅・リアルタイム検出する Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction を原理とした遺伝子増幅試薬である。結核菌群 rRNA 切断プローブと逆転写酵素の RNaseH の作用により結核菌群 rRNA の 5' 側が切断される。次にアンチセンスプライマーと逆転写酵素の逆転写活性により結核菌群 rRNA に相補的な cDNA が合成される。また逆転写酵素の RNaseH 活性により結核菌群 rRNA は分解される。次にプロモータープライマーと逆転写酵素の DNA polymerase 活性により二本鎖 DNA が合成され、さらに RNA ポリメラーゼにより RNA が増幅合成される。増幅された RNA にオキサゾールイエロー標識結核菌群 rRNA 検出用プローブが結合し蛍光強度が増加し、この増加した蛍光強度を経時的に計測する。プライマー試薬の塩基配列が添付文書に示されており、このプライマーおよびプローブが結合する部位の結核菌群の塩基配列と被検株の塩基配列を比較すると、結核菌 rRNA 切断用プローブ 24 bp と結核菌 rRNA アンチセンスプライマー 18 bp の結合する領域ではすべて一致しており、結核菌 rRNA プロモータープライマー 23 bp の結合する領域で不一致は 1 bp のみ、オキサゾールイエロー標識結核菌 rRNA 検出用プローブ 18 bp の結合する領域で不一致は 2 bp のみと、対象領域の双方の塩基配列は似ている。こうしたことから TRC は被検株に対しても反応を示し、結核菌群として検出されるものと思われる。また MTD ではプライマー等の塩基配列は明らかになっていないため詳細は不明であるが、TRC 同様にプライマーやプローブの結合する領域の塩基配列が結核菌群と近いものと推測される。

2008 年 2 月～2009 年 4 月の期間に複十字病院細菌検査室において 1,739 臨床検体のうち、TRC で結核菌群陽性反応を示した培養陽性 372 株のキャピリア TB テストは全株が結核菌群と同定された。このような点を勘案す

ると、今回検討した 4 菌株のような未だ記載をみない抗酸菌の分離例はきわめて珍しいものと思われる。TRC は結核菌群 rRNA の増幅と検出が同時に密封チューブ内で行われるため検査室内汚染を防ぐことができ、かつ迅速・比較的低コスト・省スペースで行うことから、病院の細菌検査室において結核菌の診断に用いるきわめて有用な検査法であることに疑いの余地はないと思われる⁴⁾⁸⁾。しかし TRC (または MTD) で結核菌群陽性と出た場合には、結核菌群であると考えて大過ないところではあるが、結核菌群と他の非結核性抗酸菌が混在している、あるいは他の抗酸菌との交差反応などの場合もあることを念頭におき、さらには臨床症状をも参考にして総合的に判断することが重要であろう。

2007 年 6 月に施行された感染症法では特定病原体等の管理規制により、厚生労働省から生物テロに使用される恐れのある特定病原体等の管理の強化が明確に示されている。この中には病原体等の保管の規定があり、特定病原体等と同定された後に追加試験など別の用途を目的として保管する場合、施設の基準に従わなければならない、基準に満たない施設は特定病原体等を検出後 10 日以内に滅菌処理するとなっている⁹⁾。しかし、今回の被検菌のような場合、結核菌群と同定され、菌株が保存されずに処分された場合、さらなる検討が不能となり、結核と誤って診断され、患者は大きな不利益を被る場合が考えられる。このような事態を防ぐために保管だけを目的とする施設は保管庫と保管室に施設するだけで 4 種病原体等 (多剤耐性結核菌はこの他に届け出が必要) を保管することができ、今後、病院・検査センターなどでの菌株の保管の検討が望まれる。

謝 辞

供試菌の提供にご協力頂いた都立広尾病院 村上未加子先生、元：独立行政法人札幌南病院 印部俊雄先生、元：独立行政法人西別府病院 金丸和浩先生に深謝します。

文 献

- 1) 齋藤 肇, 岩本朋忠, 中永和枝, 他: 肺疾患患者より分離された珍しい抗酸菌種. 結核. 2005; 80: 319.
- 2) 齋藤 肇, 岩本朋忠, 中永和枝, 他: 肺疾患患者より分離された 1 新抗酸菌種の細菌学的性状. 結核. 2007; 82: 434.
- 3) 齋藤 肇, 岩本朋忠, 中永和枝, 他: 肺疾患患者より分離された新抗酸菌 (続) 新たに分離された 6 菌株の細菌学的性状. 結核. 2008; 83: 303.
- 4) Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al.: Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol. 2001; 39: 3637-3648.

- 5) 鹿住祐子, 前田伸司, 菅原 勇: *rpoB* 遺伝子と16S rRNA 解析による抗酸菌同定の試み. 結核. 2006; 81: 551-558.
- 6) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 「結核検査指針2007」, 結核予防会, 東京. 2007, 68-80.
- 7) 児玉朱実, 齋藤 肇: キャピリア TB の結核菌群同定上の評価—特に培地の種類について—. 日本臨床微生物学会誌. 2007; 17: 109-118.
- 8) Takakura S, Tsuchiya S, Isawa Y: Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by transcription-reverse transcription concerted reaction with an automated system. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5435-5439.
- 9) 厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou/17/03.html>
- 10) 東ソー: 核酸同定・抗酸菌群キット 結核菌群 rRNA 検出試薬 TRCRapid M.TB. 東ソー, 東京, 2006年7月.
- 11) Somoskövi A, Hotaling JE, Fitzgerald E, et al.: False-positive results for *Mycobacterium celatum* with the Accu-Probe *Mycobacterium tuberculosis* complex assay. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2743-2745.

————— Short Report —————

NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIUM STRAINS THAT SHOW POSITIVE TEST FOR IDENTIFICATION KITS OF *M. TUBERCULOSIS* COMPLEX

¹Akio AONO, ¹Yuko KAZUMI, ¹Shinji MAEDA, ²Yuka AZUMA,
⁵Shigeo TSUCHIYA, ⁶Tomotada IWAMOTO, ⁷Kazue NAKANAGA,
⁴Keiji HAYAKAWA, and ³Hajime SAITO

Abstract [Objectives] Saito et al. isolated novel mycobacterium strains from the sputum of 12 patients with pulmonary disease. They reported, that the strains were clearly different from *Mycobacterium tuberculosis* (TB) in cultural, biochemical and immunological properties, despite the high homology (99.1%) of the 16S rRNA gene sequence between the two. Recently, we isolated four strains having similar properties as the above strains among mycobacterial strains that were sent to the Research Institute of Tuberculosis for identification. We examined these isolates using commercial systems for identification of mycobacteria.

[Materials] Four strains of the unidentified mycobacteria were used in this study.

[Methods] Tests used in the study included cultural on solid media, biochemical characteristics, DNA sequence analyses of 16S rRNA and *rpoB* genes, TRC, COBAS AMPLICOR, COBAS TaqMan, MTD, DDH, Accu-Probe, Capilia TB, and a drug susceptibility tests.

[Results] After three weeks of culture, smooth and non-photochromogenic colonies were formed. The niacin accumulation test was negative. The homologies of DNA sequence between the new strains and *M. tuberculosis* for 16S rRNA and

rpoB genes were 97.8% and 90.2%, respectively. The tests with TRC and MTD kits were positive, whereas the tests with AMPLICOR, TaqMan, Accu-Probe and Capilia TB kits were negative. The organism was not identified with the DDH system.

Key words: TRC, TRC Rapid M. TB, MTD, DDH

¹Mycobacterium Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), ²Department of Clinical Laboratory, Fukujiji Hospital, JATA, ³Hiroshima Environment & Health Association, ⁴Department of Internal Medicine, National Hospital Organization Tenryu National Hospital, ⁵Marketing Dept. Bioscience Division, Tosoh Corporation, ⁶Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, ⁷Department of Mycobacteriology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases

Correspondence to: Akio Aono, Mycobacterium Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan.
(E-mail: aono@jata.or.jp)