

## *Mycobacterium fortuitum*を対象としたZiehl-Neelsen染色法と蛍光染色法における抗酸性の比較検討

<sup>1</sup>吉田志緒美   <sup>1</sup>露口 一成   <sup>2</sup>鈴木 克洋   <sup>3</sup>富田 元久  
<sup>1</sup>岡田 全司   <sup>2</sup>林 清二   <sup>4</sup>有川健太郎   <sup>4</sup>岩本 朋忠

**要旨：**〔目的〕 *Mycobacterium fortuitum* を被験対象とした場合の Ziehl-Neelsen 染色法 (ZN 法) と蛍光染色法 (蛍光法) の染色性の比較検討。〔方法〕 2007 年 1 月～2012 年 3 月の期間中, NHO 近畿中央胸部疾患センターにて MGIT 培養で陽性となり, DDH にて *M. fortuitum* と同定された菌液 42 株と標準菌株を対象に, 蛍光法である auramine-rhodamine 染色法 (AR 法) 並びに acridine-orange 染色法 (AO 法) と ZN 法の染色所見を比較した。さらに各菌株に対し 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) 領域における遺伝子と 16S rRNA 遺伝子の部分配列シーケンスを実施し, 相同性検索を行った。〔結果〕 ZN 法にてすべての株は良好な染色性を確認できた。AR 法は 16 株 (38.1%) に良好な染色性を認めていたのに対し, 残り 26 株 (61.9%) と標準菌株では蛍光法でほとんど染まっていないか, まだら模様の染色像であり, AO 法もやや劣るが AR 法と同程度の結果であった。ITS シーケンス解析では 35 株 (83.3%) が *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* の遺伝子と 100% 一致したが, 7 株は同定不能であった。しかし 16S rRNA 遺伝子シーケンスにて *M. fortuitum* 近縁の迅速発育菌と同定できた。遺伝子型と蛍光法の染色性との間における相関性は乏しかった。〔考察〕 DDH で *M. fortuitum* と同定された菌体に対して蛍光法を用いた場合, 検出が困難となるケースが半数以上存在する結果となり, 同菌の分離頻度が過小評価される可能性が考えられた。特に, 培養菌液からの菌体確認には蛍光法よりも ZN 法を用いることと, 培養性状による同定 (発育速度, 温度, コロニー形状) の徹底を提唱したい。  
**キーワード：** *Mycobacterium fortuitum*, チール・ネールゼン染色法, 蛍光染色法, 16S-23S ITS シーケンス

抗酸菌検査は他の微生物検査同様, 自動化されている部分は少なく大半はマニュアルで実施するため, 個々人の熟練度や検査する施設の機器によって結果が左右されやすい。しかしその中でも, 塗抹検査は比較的方法が確立されており簡便かつ迅速性に優れた抗酸性染色が普及している。マイコバクテリウム属やノカルジアの一部の菌のエンベロープには多量の脂肪酸が存在するため, グラム染色などの通常の染色では難染性を示す。これらの菌を対象とした染色には加温や媒染剤 (フェノール) といった強力なステップが必要となり, こうして染色された菌体は, 無機酸やアルコールといった脱色作用をもつ溶液にも抵抗性を発揮するようになる。このような性質

を抗酸性 (acid-fastness) と呼び, この性質を利用した抗酸菌染色法のひとつが石炭酸フクシンにより加温染色を行うチール・ネールゼン染色法 (Ziehl-Neelsen stain: ZN 法) である。一方, 加温せずに媒染剤を加えた蛍光色素を用いる蛍光染色法 (蛍光法) は, 蛍光顕微鏡が必要であるが 200 倍拡大 (乾燥系) の観察が可能であるため, 1000 倍拡大 (油浸系) で観察しなければならない ZN 法に比べ感度, 迅速性において有利であり, 推奨されている<sup>1)</sup>。これらの染色原理の違いから, 同じ標本を用いて蛍光法の後に ZN 法が実施できるのが抗酸菌染色の特徴である。蛍光法では糸くずなど抗酸菌以外の物質が染まり光って見えることがあるため, 標本内に存在する菌数が

<sup>1</sup>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, <sup>2</sup>同内科, <sup>3</sup>同研究検査科, <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 22 Nov. 2012/Accepted 15 Feb. 2013)

わずかな場合(数視野に1個程度)は、同一標本にてZN法で確認する必要がある。

当センターのルーチン塗抹検査で、第一に選択される染色法は蛍光法である。上記のように陽性が疑わしい検体の場合に加えて、過去に抗酸菌感染症の既往歴がない患者から供された塗抹標本についても、厳密に診断を行う方針からZN法による確認を行っている。さらに、日常的に多数の検体の培養を行う当センターでは、MGIT培養で陽性となった菌液の原因菌が抗酸菌の発育によるものなのか、他の雑菌汚染によるものなのかを迅速に判定する場合においてZN法ではなく蛍光法を採用している。そうした中この度、われわれは蛍光法でほとんど染まらず、ZN法で菌体を確認できた迅速発育菌を分離した。この株は核酸増幅法で陰性、同定キットにて*M. fortuitum*と同定され、16S rRNA geneと16S-23S ITS領域のシーケンス解析の結果から*M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*と同定された。今回、この菌の染色性が偶発的に分離された稀なケースによるものであったのか、もしくは*M. fortuitum*に特徴的な抗酸性の性質によるものなのかを検証するために、解析対象を増やして抗酸性の確認と分離頻度、遺伝子学的解析をレトロスペクティブに比較検討した。

## 材料と方法

### 対象

2007年1月～2012年3月の期間中に当センターを受診した患者からの喀痰を検体として、BACTEC MGIT 960システム(日本ベクトン・ディッキンソン)と小川KY培地(セロテック)を用いた培養検査でいずれも陽性となった菌株42株と*M. fortuitum*標準菌株(ATCC6841)を対象とした。これらはタックマン・マイコバクテリウムツベルクローシス並びにアビウム、イントラセルラーレ(すべてロシュ・ダイアグノスティックス)による同定検査でいずれも陰性であった。加えて、マイコバクテリウム抗原キットであるBDミジットTBcID(日本ベクトン・ディッキンソン)で結核菌群陰性となり、DDH Mycobacteria(極東製薬工業)で*M. fortuitum*と同定された。また、PNBA(*p*-nitrobenzoic acid 加7H11 agar)上の発育と小川培地上のコロニー性状から複数菌種の混在は否定された。抗酸性の比較対照として、臨床分離された遅発育抗酸菌(結核菌群、*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*)と、*M. fortuitum*以外の迅速発育抗酸菌(*M. abscessus*)を用いた。すべての標本は複数枚作成し、2種類の蛍光法を実施したのちZN法を行い、抗酸菌の検出、観察を試みた。

### 蛍光法(auramine-rhodamine染色法:AR法)

“KBM”オーラミン・ローダミン染色キット(コージ

ンバイオ)を用いた。再培養したMGIT陽性菌液を固定した塗抹標本に石炭酸オーラミン・ローダミン液を満載し、室温で15分間染色後、流水で水洗した。次に0.5%塩酸アルコールで60秒間脱色を行い、流水水洗のちメチレンブルー液で30秒間染色した(後染色液中のメチレンブルーは、染色された標本の背景の蛍光を低下させるために添加)。流水水洗後冷風ドライヤーにて乾燥し、蛍光顕微鏡を用いて200倍拡大(乾燥系)の視野で観察した。

### 蛍光法(acridine-orange染色法:AO法)

AR法同様、固定した標本にアクリスティンAO液(極東製薬工業)を満載し、室温で15分間染色した。その後流水で水洗し、アクリスティンMB液(濃塩酸、メチレンブルー含有)を満載し、30秒～1分間染色し、流水水洗後に冷風ドライヤーで乾燥、観察した(200倍拡大、乾燥系)。

### Ziehl-Neelsen染色法(ZN法)

蛍光法で鏡検後の同じ標本を用いて行った。5%石炭酸フクシン液を満載にし、標本の下面からわずかに湯気が生じる程度にガスバーナーで加温し、室温で10分間放置後に染色液を捨て、流水で水洗した。3%塩酸アルコールで脱色し、流水水洗後にメチレンブルーで10～20秒間後染色を行った。流水水洗後、冷風ドライヤーにて乾燥し、光学顕微鏡を用いて1000倍拡大(油浸系)で観察した。

### 16S-23S ITS領域並びに16S rRNA遺伝子のシーケンス解析

16S-23S ITS領域の塩基配列の決定には、Rothらの方法に準じた<sup>2)</sup>。プライマーセットは16S-1420F(5'-TGGGCTTTGAGACAACAGG)と23S-23r(5'-TCGCCAAGGCA TCCACC)を用いた。ITSシーケンス解析にて同定できなかった株については16S rRNA遺伝子の部分配列(428 bp)の解析をTelentiらの方法に準じて行った<sup>3)</sup>。増幅されたPCR産物はGenetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いて解析し、得られたデータはBlast解析によりデータベースと比較検討した。

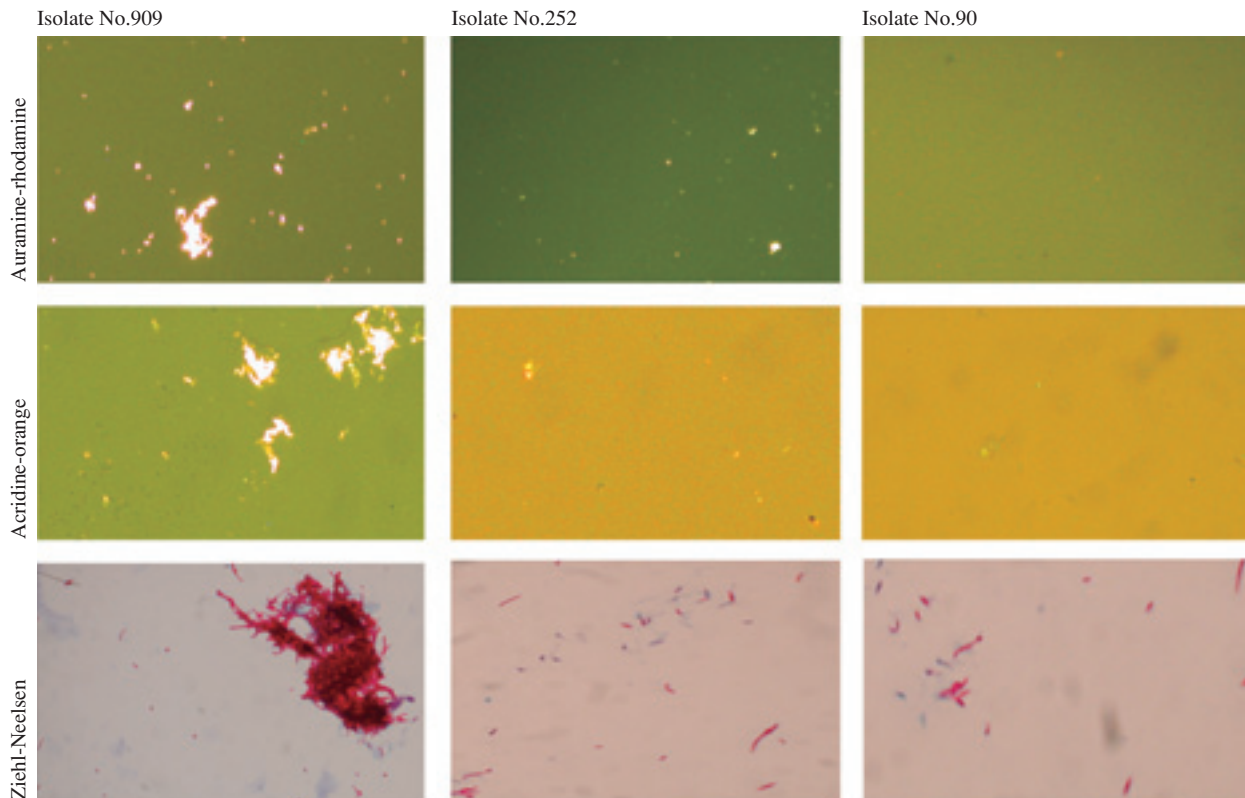
## 結果

### 蛍光法(AR法, AO法)並びにZN法における抗酸性の比較

すべての菌株がZN法で良好に染まっていたため、各株のZN法の染色像を基準として蛍光法の抗酸性の評価を行った。まず、ZN法と比べて、全視野において均一な染色性を保持している場合を陽性(+)とした。他方、全視野において菌体輪郭もしくは陰影が薄く見えているが色が抜けており、菌体自体が染色されていない場合を陰性(-)とした。さらに、良好な染色を示す菌体と脱色され

ている菌体が混在して全体的にまだら模様になっている場合を判定保留(±)とした (Fig. 1)。AR法の場合、43株中16株 (37.2%) が両法ともに良好な抗酸性を保有していたのに対し、AR法にほとんど染まっていない20株と、まだら模様の染色像をもつ6株が存在するという結果となった (Table)。AO法もAR法とほぼ同程度の結果となり、蛍光法間に抗酸性の差は見られなかった (Table)。*M.*

*fortuitum* 標準菌株はAR法で染色性が見られず陰性と判定されたが、AO法では黄緑色の菌体像となり、従来のオレンジ色の桿菌像を呈さなかった (Fig. 2)。比較対象の抗酸菌種はすべてZN法で良好な染色性を示した。AO法は*M. avium* 株で黄緑色の非特異反応を含む染色像を呈したが、他の抗酸菌ではオレンジ色を呈した。一方、AR法はこれらの他の抗酸菌株に対して良好な染色性を示

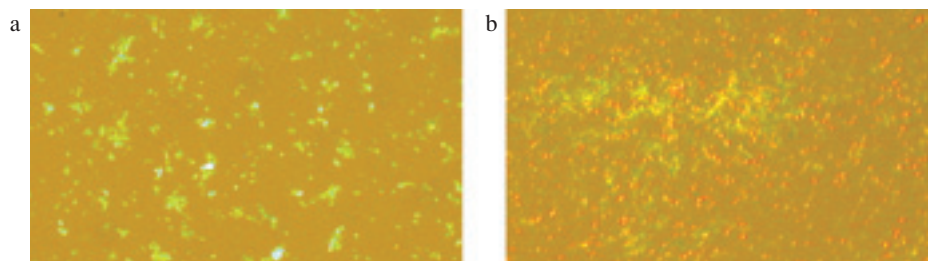


**Fig. 1** Acid-fast staining was performed on the fixed smears by using the fluorescent and Ziehl-Neelsen staining. Light microscopy of *M. fortuitum* cultures grow static in MGIT at 37°C for 7 days. Strain No.90 had lost the ability to retain the primary stain after washing with the acid-alcohol decolorizer, strain No.252 had patchy pattern, and strain No.909 had retained the stain by auramine-rhodamine staining and acridine-orange staining.

(Upper) Microscopy images of clinical *M. fortuitum* strains stained with auramine-rhodamine and then treated with acid-alcohol decolorizer (Magnification, ×400)

(Middle) Fluorescent images of the same fields using acridine-orange (Magnification, ×400)

(Lower) Images of Ziehl-Neelsen staining (Magnification, ×1000)



**Fig. 2** Patterns of non-specific acid-fast staining using acridine-orange

a: *M. fortuitum* type strain ATCC6841 (light-green coloring pattern)

b: Clinical *M. avium* isolate (mixed patterns with light-green and orange color)

**Table** Performance of acid-fastness compared with fluorescence staining and Ziehl-Neelsen staining for 42 *M. fortuitum* isolates

Fluorescent staining methods	No. of strains with the Ziehl-Neelsen staining results			Sequence results by ITS region and 16S rRNA gene
	Positive	Plus/minus	Negative	
<b>Auramine-rhodamine*</b>				
Positive	16	0	0	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> (15), <i>M. porcinum</i> (1)****
Plus/minus***	6	0	0	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> (6)
Negative	20	0	0	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> (14), <i>M. septicum</i> or <i>M. peregrinum</i> (2)****, <i>M. mageritense</i> (2)****, <i>M. mucogenicum</i> (1)****, <i>M. farcinogenes</i> (1)****
<b>Acridine-orange**</b>				
Positive	15	0	0	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> (14), <i>M. porcinum</i> (1)****
Plus/minus***	7	0	0	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> (7)
Negative	20	0	0	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> (14), <i>M. septicum</i> or <i>M. peregrinum</i> (2)****, <i>M. mageritense</i> (2)****, <i>M. mucogenicum</i> (1)****, <i>M. farcinogenes</i> (1)****

\*Acid-fastness of other clinical mycobacterial strains with the auramine-rhodamine staining was the similar to that with Ziehl-Neelsen staining.

\*\*Clinical *M. avium* isolate had patterns of non-specific acid-fast staining using acridine-orange although there has been no difference in the acid-fastness of acridine-orange and those of Ziehl-Neelsen staining for other clinical strains. For evidence quality, see Fig. 2.

\*\*\*Patchy pattern

\*\*\*\*Identification results by 16S rRNA gene sequencing

し、ZN法との間に抗酸性の乖離は認められなかった。

#### ITS領域並びに16S rRNA遺伝子の塩基配列の決定

*M. fortuitum* 42株中35株はITSシークエンス解析にて塩基配列が確認でき、*M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* DSM44220と100%一致した。残りの7株は相同性が低かったため、16S rRNA遺伝子のシークエンス解析により同定を行ったが、5種類の菌種 (*M. porcinum*, *M. farcinogenes*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. septicum* もしくは *M. peregrinum*) と98.8~100%の相同性が確認できた (Table)。対象株はすべてDDHにて*M. fortuitum* と同定されていたが、シークエンス解析で標準菌株 *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC6841と100%一致した株はなかった。

#### 考 察

*Mycobacterium fortuitum* は迅速発育抗酸菌の1菌種であり、概ね培養開始後1週間以内に発育する *M. fortuitum* complex に属する。多くは皮膚、骨、軟部組織に感染症を引き起こし、ネイルサロンで使用されたフットバスを介して感染が広がった事例<sup>4)</sup>や、病院内に設置されたice machineが汚染されて疑似アウトブレイクが発生した事例<sup>5)</sup>が報告されている。主に環境からの感染が考えられるが、ヒトへの肺感染症も深刻なケースがあり問題視されている。わが国における同菌によるNTM感染症の発症頻度はMAC, *M. kansasii*, *M. abscessus* について第4位<sup>6)</sup>であるが、インドでは第1位である<sup>7)</sup>。

同菌の抗酸性の減弱について、欧米では経験則的に注意喚起がなされてきた<sup>8)</sup>。Woodsらは、ZN法よりも蛍光法の抗酸性は劣ると指摘し<sup>9)</sup>、Lessingらはauramine法で染まらずZN法で菌体を確認できた同菌による重篤な感

染症例を報告している<sup>10)</sup>。ATSガイドライン (2007) はNTMの塗抹検査に推奨する染色法として蛍光法を挙げているが、迅速発育菌は蛍光法で染まりにくい場合があることを特記している<sup>11)</sup>。

今回、約3分の2の *M. fortuitum* とその近縁種において、蛍光染色法に対する抗酸性が不安定だった。この抗酸性の減弱にかかわる因子として菌体の細胞壁の構造と各種染色液の組成の違いが考えられた。まず、抗酸菌の細胞壁の特徴は、多量のワックス様高分子脂質を含み、菌表面の疎水性や抗酸性に寄与している性質を有することである。蛍光法はこの細胞壁に存在する天然の長鎖脂肪酸であるミコール酸に蛍光色素を吸着させて発色する。従来からミコール酸中に含まれる $\alpha$ ミコール酸の構造と抗酸性の関連性について菌種別に比較されており、ミコール酸は菌種特異的に炭素鎖長、構成分子種 ( $\alpha$ , メトキシ, ケト, ジカルボキシ, エポキシ等), 不飽和度 (二重結合, シクロプロパン環) が異なる。 $\alpha$ ミコール酸炭素鎖数は結核菌でC88, *M. avium* および *M. intracellulare* でC80あるのに比べて、*M. fortuitum* の炭素鎖数はC76とC78が中心である (亜種である *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* の $\alpha$ ミコール酸はC78がメインであるがC76にも同程度のピークを有しており、*M. fortuitum* との間に大きな差はない<sup>12)</sup>)。また、病原性抗酸菌の細胞壁の主要な構成成分であるシクロプロパン化された $\alpha$ ミコール酸は肉芽腫炎症病変の形成や抗酸性に関係しており、シクロプロパン環の含量が低い抗酸菌ほど抗酸性や病原性の低下、抗酸菌特有の紐状発育 (cord forming) が減弱化するという<sup>13)</sup>。結核菌や *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* の $\alpha$ ミコール酸本体はシクロプロパン環

を有するが、*M. fortuitum*はシクロプロパン環合成の中間体である二重結合を有したミコール酸を産生する点<sup>12)</sup>に違いがある。

さらに、ミコール酸の存在様式も菌種別に違いが見られるという。ミコール酸の90%以上は細胞壁成分にエステル結合している mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan (mAGP: ペプチドグリカンとアラビノガラクトタンとの複合体)として存在し、遊離脂質としてトレハロースに結合しているコードファクター (cord factor: trehalose dimycolate, TDM) や trehalose monomycolate (TMM), 他にも glucose-6-monomycolate (GMM), ワックスD成分などの構成成分としても存在している。これらはいずれも抗酸菌の抗酸性に重要な役割を果たし、炭素鎖が長いほど抗酸性や病原性は強いとされてきた。最近になって、ミコール酸構造のわずかな違いや密度の変化から抗酸性を消失させたという報告<sup>14)</sup>や、糖脂質ミコール酸のシクロプロパン環が多い菌種ほど肉芽腫形成能や毒性が強まるという報告がなされている<sup>13)</sup>。したがって、シクロプロパン環をもたない*M. fortuitum*はミコール酸およびTDM, TMMで構成される細胞壁構造が異なる可能性が高く、それにより抗酸性の減弱が生じたのかもしれない。

抗酸菌のエンベロープは上述における脂質2層構造の細胞壁以外にも、外膜様構造、莢膜様構造と一体となって構成される<sup>15)</sup>ため、*M. fortuitum*の抗酸性の減弱化の原因がミコール酸本体やその構造の違いだけをもって生じているとは断定しがたい。ミコール酸以外の結核菌エンベロープ構造の主要な成分である、親水性糖脂質の liparabinomannan (LAM), 脂質である phthiocerol dimycoserolate (PDIM) などの違いも考慮しなければならないだろう。特に、病原性の強い結核菌や*M. kansasii*, BCGのLAMの先端にマンノース残基が付加 (mannose-capping) している Man-LAMは、*M. chelonae*に特徴的な cap 構造をもたないLAM (Ara-LAM)とは構造的に異なるという<sup>16)</sup>。このMan-LAMはTLR2分子を介した結核菌マクロファージの活性化を誘導せず、これが結核菌の病原性の重要なメカニズムであると考えられている<sup>16)</sup>。一方、*M. fortuitum*, *M. smegmatis*に特徴的な phospho-myo-inositol-lipoarabinomannan (PI-LAM)はcaspase-3に依存したアポトーシスを誘導するとされている<sup>17)</sup>。これらの性質と抗酸性との関連性についてはいまだ解明されておらず、今後の研究に期待したい。

続いて、各種染色法における抗酸菌への影響についてであるが、われわれは多種に存在する抗酸菌染色法の原理やターゲットとする対象部位が各々異なる点に注目した。抗酸菌は熱に対して抵抗性を有するが、ミコール酸は高温に不安定で容易に熱分解を受けやすく、その性質

を利用したZN法は、加温操作をすることで菌体内への石炭酸フクシンの浸透を容易にしてきた。一方、常温で行う蛍光法には主に細胞壁のミコール酸をターゲットにして蛍光物質を付着させて染色するAR法と、フェノールの作用で抗酸菌の菌体に浸透し、アクリジンオレンジの核酸 (DNA) に対する親和性を利用して、原核生物である細菌DNAとアクリジンオレンジの複合体を蛍光顕微鏡によって観察するAO法とがある。今回、供試*M. fortuitum*株においてAO法でもAR法と同程度の抗酸性が示された (Fig. 1, Table)。同菌の炭素鎖の少なく、シクロプロパン環をもたないミコール酸の構造により細胞壁へのオーラミンの吸着が弱く、抗酸性が減弱したと考えられるAR法と違い、DNAを染色するAO法でも抗酸性が低下したのには菌体構造とは別の理由があると思われる。その理由として、今回使用した染色液キット (アクリステインAO液)のフェノール濃度が挙げられよう。同キットは、アクリジンオレンジの細胞壁への浸透を促進するため、10.7%のフェノールをアクリステインAO液に添加している。一般的に、抗酸菌の蛍光染色に用いるフェノール濃度は、鏡検時の蛍光輝度を上げるため5%以上が好ましく、フェノール濃度の上昇に伴って抗酸菌の輝度が上昇し、輪郭もはっきりする。但し、9%以上であると強固な細胞壁をもつ結核菌であっても菌体へのダメージが大きくハレーション現象が見られ、コントラストが低くなり菌体確認が難しくなる。また、磯崎らは、同じ迅速発育菌である*M. farcinogenes*についてKinyoun染色で抗酸性に染まる菌と染まらない菌の混在が見られたとしている<sup>18)</sup>。加温操作を行わないKinyoun法はZN法と同じフクシンを用いる染色法であるが、5%フェノールを用いるZN法に比べ高濃度 (8%)のフェノールを用いる点が異なる。しかも、フクシン染色に用いるフェノールは、菌体に色素を浸透しやすくすると同時に、菌体へのダメージが持続し脱色時にも影響を及ぼす可能性が指摘されている<sup>19)</sup>。もちろん、生物である以上、遅発育抗酸菌にも非特異的な染色像をもつ菌はある程度混在すると考えられるが (Fig. 2),  $\alpha$ ミコール酸の炭素数密度の少ない*M. fortuitum*にとって他の抗酸菌と同じフェノール処理を施すと、細胞壁や菌体内成分へのダメージがより大きく、抗酸性が脆弱化もしくは非特異的に染色される可能性があると考えられる。

今回対象とした*M. fortuitum*の抗酸性が低下した菌株の割合は高い比率であった (61.9%)。Bergは対象とした*M. fortuitum*の3分の2に抗酸性が認められなかったとし<sup>19)</sup>、Josephらも15株中10株の*M. fortuitum*がAR法で陰性、ZN法で陽性であったと報告している<sup>8)</sup>。今回ITSと16S rRNA遺伝子シーケンス解析にて合計6種類の近縁菌種が認められた*M. fortuitum*株であったが、蛍光法で

弱い抗酸性を示す亜種の特定には至らなかった。つまり遺伝子型と抗酸性の間には関連性は見られず、少なくとも *M. fortuitum* のエンベロープ構造が近縁菌種のレベルで異とする可能性は乏しかった。細菌のエンベロープ構造にはその細菌固有の脂質が存在し、しかも、脂質の組成はDNAの変異によって容易に変えることはできないことから、この結果は明白である。むしろDDHで *M. fortuitum* と一括して同定していた菌株が多様な遺伝子型をもつ迅速発育近縁菌で構成されていたことは興味深く、今後このような菌種が同定された場合に抗酸性を確認する必要があると思われる。最後に、*M. fortuitum* 近縁菌の抗酸性のさらなる検討として、ミコール酸分子の系統解析〔ミコール酸伸長遺伝子 (*kasB*) の欠損の有無など〕<sup>14)</sup> について焦点を当てて検討することで、同じ菌種で異なる抗酸性が生じる要因を明らかにできると期待する。さらに、*M. fortuitum* のアルカリ処理に対する感受性が遅発育抗酸菌より鋭敏であることから、検体の前処理により発育コロニーが減少する性質<sup>20)</sup> が抗酸性と何らかの関連性をもつとも考えられる。

### まとめ

当センターにおいて分離された *M. fortuitum* の61.9%は、蛍光法 (AR法, AO法) における抗酸性が乏しく、ZN法のほうで良好な抗酸性を示した。液体培養陽性の場合、蛍光法で抗酸菌の確認を行うと *M. fortuitum* を見逃すケースが生じ、同菌の分離頻度を過小評価してしまう可能性が考えられた。したがって、菌体確認には蛍光法よりもZN法を用い、併せて固形もしくは寒天培地上でのコロニー性状の観察を行うべきである。

〔利益相反〕

本論文の研究内容、結論、意義、あるいは意見について他者との利益相反 (conflict of interest) はありません。

### 文献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：「結核菌検査指針2007」, 結核予防会, 東京, 2007, 21-30.
- 2) Roth A, Fischer M, Hamid ME, et al.: Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 36 : 139-147.
- 3) Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al.: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993 ; 31 : 175-178.
- 4) Winthrop KL, Albridge K, South D, et al.: The clinical management and outcome of nail salon-acquired *Mycobacterium fortuitum* skin infection. *Clin Infect Dis.* 2004 ; 38 : 38-44.
- 5) Gebo KA, Srinivasan A, Perl TM, et al.: Pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* on a Human Immunodeficiency Virus Ward: Transient Respiratory Tract Colonization from a Contaminated Ice Machine. *Clin Infect Dis.* 2002 ; 35 : 32-38.
- 6) 佐藤滋樹：非結核性抗酸菌症の地域差。第85回総会ミニシンポジウム「非結核性抗酸菌症—何がどこまで判明したか」。結核. 2011 ; 86 : 114-116.
- 7) Simons S, van Ingen J, Hsueh P-R, et al.: Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Tract Infections, Eastern Asia. *Emerg Infect Dis.* 2011 ; 17 : 343-349.
- 8) Joseph SW, Vaichulis EMK, Houk VN: Lack of auramine-rhodamine fluorescence of Runyon Group IV mycobacteria. *Am Rev Resp Dis.* 1967 ; 114 : 114-115.
- 9) Woods GL, Washington JA: Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis.* 1987 ; 79 : 275-279.
- 10) Lessing MPA, Walker MM: Fatal pulmonary infection due to *Mycobacterium fortuitum*. *J Clin Pathol.* 1993 ; 46 : 271-272.
- 11) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al.: An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 ; 175 : 367-416.
- 12) Kaneda K, Imaizumi S, Mizuno S, et al.: Structure and Molecular Species Composition of Three Homologous Series of a-Mycolic Acids from *Mycobacterium* spp. 1988 ; 134 : 2213-2229.
- 13) Rao V, Fujiwara N, Porcelli SA, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J Experim Med.* 2005 ; 201 : 535-543.
- 14) Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, et al.: Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *PNAS.* 2007 ; 104 : 5157-5162.
- 15) 松葉隆司, 中島千絵, 鈴木定彦：結核菌のエンベロープ構造と成分。日本細菌学雑誌. 2010 ; 65 : 355-368.
- 16) Means TK, Wang S, Lien E, et al.: Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1999 ; 163 : 3920-3927.
- 17) Bohsali A, Abdalla H, Velmurugan K: The non-pathogenic mycobacteria *M. smegmatis* and *M. fortuitum* induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway. *BMC Microbiol.* 2010 ; 10 : 237-249.
- 18) 磯崎将博, 金子 博, 松下久美子, 他：迅速発育抗酸菌 *Mycobacterium farcinogenes* による骨髄炎による1症例。日本臨床微生物学会雑誌. 2011 ; 21 : 134-137.
- 19) Berg JW: The Dual Nature of Acid-Fastness. *Yale J Biol Med.* 1953 ; 26 : 215-223.
- 20) 阿部千代治：結核菌検査の標準化と精度管理。結核. 2003 ; 78 : 541-551.

## Original Article

COMPARATIVE EVALUATION OF ACID-FAST STAINING FOR THE DETECTION OF *MYCOBACTERIUM FORTUITUM*

— Clinical Performance of Fluorescent and Ziehl-Neelsen Staining —

<sup>1</sup>Shiomi YOSHIDA, <sup>1</sup>Kazunari TSUYUGUCHI, <sup>2</sup>Katsuhiko SUZUKI, <sup>3</sup>Motohisa TOMITA, <sup>1</sup>Masaji OKADA, <sup>2</sup>Seiji HAYASHI, <sup>4</sup>Kentaro ARIKAWA, and <sup>4</sup>Tomotada IWAMOTO

**Abstract** [Objective] Fluorescent staining is of paramount importance, not only for confirming the presence of mycobacteria in a given specimen but also for providing an estimated growth quantification. In this study, for rapidly growing *Mycobacterium fortuitum*, we evaluated the effectiveness of a rapid fluorescent staining method employing auramine-rhodamine (AR) fluorescent stain and acridine-orange (AO) fluorescent stain compared to that of the standard Ziehl-Neelsen (ZN) stain currently in use in our laboratory.

[Method] We evaluated the acid-fast nature of *M. fortuitum* strain ATCC6841 and 42 clinical isolates from each patient diagnosed at NHO Kinki-chuo Chest Medical Center. These isolates were preliminarily identified as *M. fortuitum* using DNA-DNA hybridization (DDH Mycobacteria; Kyokuto Pharmaceutical, Tokyo, Japan). These isolates were further identified by comparative sequence analysis of the ITS regions and the partial 16S rRNA gene.

[Results] A total of 26 *M. fortuitum* strains (61.9%) demonstrated the lack of an acid-fast nature by AR staining, and slightly fewer demonstrated the same by AO staining. Sequence analysis of these 42 clinical isolates led to the identification of 35 *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* isolates (83.3%) and 7 closely *M. fortuitum* isolates.

[Discussion] This work reported the loss of the acid-fast

nature of specific *M. fortuitum* strains. It is likely that both the specific cell envelope of *M. fortuitum* and the staining mechanics could have been responsible for the loss of the acid-fast nature since the 2 different fluorescent stains yielded the same results. *M. fortuitum* is a mycobacterium species that does not stain with the commonly used fluorescence microscopy technique. Therefore, we suggested the use of an identification scheme for these organisms that employs ZN staining and the study of cultural characteristics (growth rate, temperature, and pigment production).

**Key words:** *Mycobacterium fortuitum*, Ziehl-Neelsen staining, Fluorescent staining, 16S–23S ITS sequencing

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

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