

コバス TaqMan MAIにて *Mycobacterium intracellulare* と誤同定された *Mycobacterium lentiflavum* の質量分析法による同定意義

¹小柴 静子 ²新妻 一直 ²斎藤美和子 ²鈴木 朋子

要旨：〔目的〕質量分析計を用いて、コバス TaqMan[®] MAI test (TaqMan法)にて同定された *Mycobacterium intracellulare* 株において *M.lentiflavum* 株と誤同定される頻度を検討した。〔方法〕保存臨床分離非結核性抗酸菌 (NTM) 70株を用い検査をした。〔結果〕臨床分離 NTM株の中で、*M.intracellulare* は、Amplicor[®]法で5株、TaqMan法で20株同定された。質量分析計で同定された *M.lentiflavum* は TaqMan法で誤同定された2株であった。その他の株は全て質量分析計で同様に同定されたが、Amplicor[®]法で2株が1.7未満の Score Value を示した。〔結論〕*M.lentiflavum* の分離頻度は、TaqMan法で測定した51株中2株で3.9% (全70株で2.9%) であった。治療の必要性の高い *M.intracellulare* 分離頻度には地域差がみられるとされるが、分離頻度の低い *M.lentiflavum* を含めた非結核性抗酸菌の確定には、質量分析計による同定が重要であると思われる。

キーワード：質量分析計, COBAS TaqMan MAI test, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium lentiflavum*

はじめに

抗酸菌感染症の診断は、日本結核病学会から示された肺非結核性抗酸菌症診断基準¹⁾を満したうえで、検体中の抗酸菌の有無を迅速に確認し、同定することである。特に結核菌群と非結核性抗酸菌の迅速な鑑別は、排菌患者の管理と施設での感染対策上非常に大切である。また、非結核性抗酸菌の菌種同定は、感染症としての病原性の判断や薬剤選択から迅速性が要求されている。

目的

抗酸菌迅速検査法の中で、特に COBAS TaqMan[®] MAI test (Roche Diagnostics社, TaqMan法)にて *Mycobacterium intracellulare* と同定された株には、臨床分離非結核性抗酸菌株の2.2%を占める *Mycobacterium lentiflavum* が含まれているとされる²⁾。

正確な抗酸菌の菌種同定は、塩基配列による遺伝子学的診断での解析が必要とされる。それと同等の判定評価

が可能とされる³⁾質量分析計〔MALDI Biotyper 3.1 (Mycobacteria Library 2.1), Bruker Daltonics社〕を用いて測定し、臨床分離非結核性抗酸菌における *M.lentiflavum* の分離頻度を検討した。

対象

2001年から2017年1月まで会津医療センターにて保存された非結核性抗酸菌 (NTM) 70株を液体培地〔*Mycobacterium* Growth Indicator Tube: MGIT (Becton Dickinson社)〕に増殖させて用いた。一部は固形培地〔3%小川培地 (極東製薬工業)〕を用いた。各々の臨床分離株の菌種同定には、従来法〔結核迅速診断法である Polymerase chain reactionとして COBAS Amplicor[®]法 (Amplicor法, Roche Diagnostics社), TaqMan法, DNA-DNA hybridization法による抗酸菌菌種同定キット (DDHマイコバクテリア, 極東製薬工業), 16S ribosomal RNA Sequence法 (16S-rRNA法)〕を用いて全株を同定した。会津医療センターにおいては2001年から2009年までは Amplicor法、

¹福島県立南会津病院検査科, ²福島県立医科大学会津医療センター感染症・呼吸器内科

連絡先：小柴静子, 福島県立南会津病院検査科, 〒967-0006 福島県南会津郡南会津町永田字風下14-1

(E-mail: koshiba1024@gray.plala.or.jp)

(Received 27 Dec. 2017/Accepted 27 Jan. 2018)

2010年から2017年1月はTaqMan法を用いて同定した。全70株のうち、2001年から2009年までは19株でAmplicor株とし、2010年から2017年1月までの51株をTaqMan株とした。

方 法

臨床分離全非結核性抗酸菌株を検体の前処理したのち質量分析計で同定し、従来法との一致率をみた。前処理工程は抗酸菌検査ガイド2016⁴⁾に基づき実施した。非結核性抗酸菌の薬剤感受性試験はTaqMan株の中の*M. intracellulare* 18株と*M. lentiflavum* 2株をMML[®] (ミロクメディカルラボラトリー) に依頼し、プロスミックスNTM[®] (極東製薬工業) で測定した。

なお、*M. intracellulare* と *M. lentiflavum* のマススペクトルピークパターンの相違や類似性は、各々のピークの質量電荷比 (m/z) の数値の比較によって判断した。

結 果

臨床分離抗酸菌全70株の識別同定確率 (Table) の検討において、同定一致は、属レベル (Score Value (SV) ≥ 1.7) で66株, 94.3%, 菌種レベル (SV ≥ 2.0) で61株, 87.1%であった。Amplicor株の2株がSV < 1.7 と同定できず、TaqMan株の*M. intracellulare* の2株が、異なる菌種 *M. lentiflavum* と同定された。

図 (Fig.) は、*M. intracellulare* の基準菌株 (JATA52-01) と塩基配列による遺伝子学的検査でも、*M. lentiflavum* と同定された2株のマススペクトルピークパターンである。*M. lentiflavum* のSVは、2.252と2.135であった。下の2株のピークパターンは類似しているが、上の*M. intracellu-*

lare とは明らかにピークパターンが違うことがわかる。

M. lentiflavum 2株と*M. intracellulare* 18株に施行した薬剤感受性試験のMIC値は、ethambutol (EB) で各々16 $\mu\text{g/mL}$, 1~32 $\mu\text{g/mL}$ (MIC50: 8 $\mu\text{g/mL}$, MIC80: 32 $\mu\text{g/mL}$), 同様に rifampicin (RFP) が0.5と2 $\mu\text{g/mL}$, 0.06~4 $\mu\text{g/mL}$ (MIC50: 0.06 $\mu\text{g/mL}$, MIC80: 0.25 $\mu\text{g/mL}$), clarithromycin (CAM) が0.12~0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.06~2 $\mu\text{g/mL}$ (MIC50: 0.12 $\mu\text{g/mL}$, MIC80: 0.25 $\mu\text{g/mL}$) である。

考 察

臨床分離全NTM 70株の質量分析計の結果は、*M. avium* 31株と*M. intracellulare* 23株で、非結核性抗酸菌の77.1%を占めている。また、非結核性抗酸菌の同定一致率は、属レベルで94.3%, 菌種レベルで87.1%であり、鈴木らの報告⁵⁾とほぼ同様の結果である。TaqMan株としたなかで*M. intracellulare* 20株のうち2株が誤同定され、質量分析計で*M. lentiflavum* と同定された。この2株に関しては、結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌科に依頼し、塩基配列による遺伝子学的解析にて*M. lentiflavum* であることを確認している。

なお、Amplicor株とした非結核性抗酸菌19株の中で2株が1.7未満のSVを示している。未投稿ではあるが、検体前処理用チューブ容積に対して菌量に比しての液量の多さ、加熱後のアルコール処理の問題 (量の多さ) など前処理法の改良工夫によりほとんど同定でき、菌種レベル以上のSVが期待できるのを確認できた。

当施設にて、臨床分離非結核性抗酸菌の2.2%を占める²⁾とされる*M. lentiflavum* が、TaqMan法で*M. intracellulare* と誤同定される可能性は3.9%程度になりうる。Amplicor

Table Clinically isolated nontuberculous mycobacteria (2001–2017.1)

	Best Matched Pattern Score Value			1.70~	1.80~	1.90~	2.00~	2.10~	2.20~	2.30~	2.40~	2.50~
	Iden. ^{a)}	Mis. ^{b)}	not ^{c)}									
Amplicor's strains												
<i>M. avium</i>	9	8	1			1	4	2	1			
<i>M. intracellulare</i>	5	5					2	2	1			
<i>M. kansasii</i>	1	1								1		
<i>M. gordonae</i>	2	1	1		1							
<i>M. chelonae</i>	1	1					1					
<i>M. heckeshornense</i>	1	1				1						
TaqMan's strains												
<i>M. avium</i>	23	23					9	6	7	1		
<i>M. intracellulare</i>	20	18	2				5	7	4	1	1	
<i>M. gordonae</i>	3	3			1				1	1		
<i>M. abscessus</i>	1	1										
<i>M. peregrinum</i>	1	1						1				
<i>M. fortuitum</i>	1	1								1		
<i>M. kansasii</i>	2	2								1		1
Total	70	66	2	2								

Amplicor's strains: NTM strains separated and identified in 2001–2009. TaqMan's strains: 2010–2017.1.

^{a)}Iden.: Identification, ^{b)}Mis.: Mismatch, ^{c)}not: not reliable identification, *M.*: *Mycobacterium*

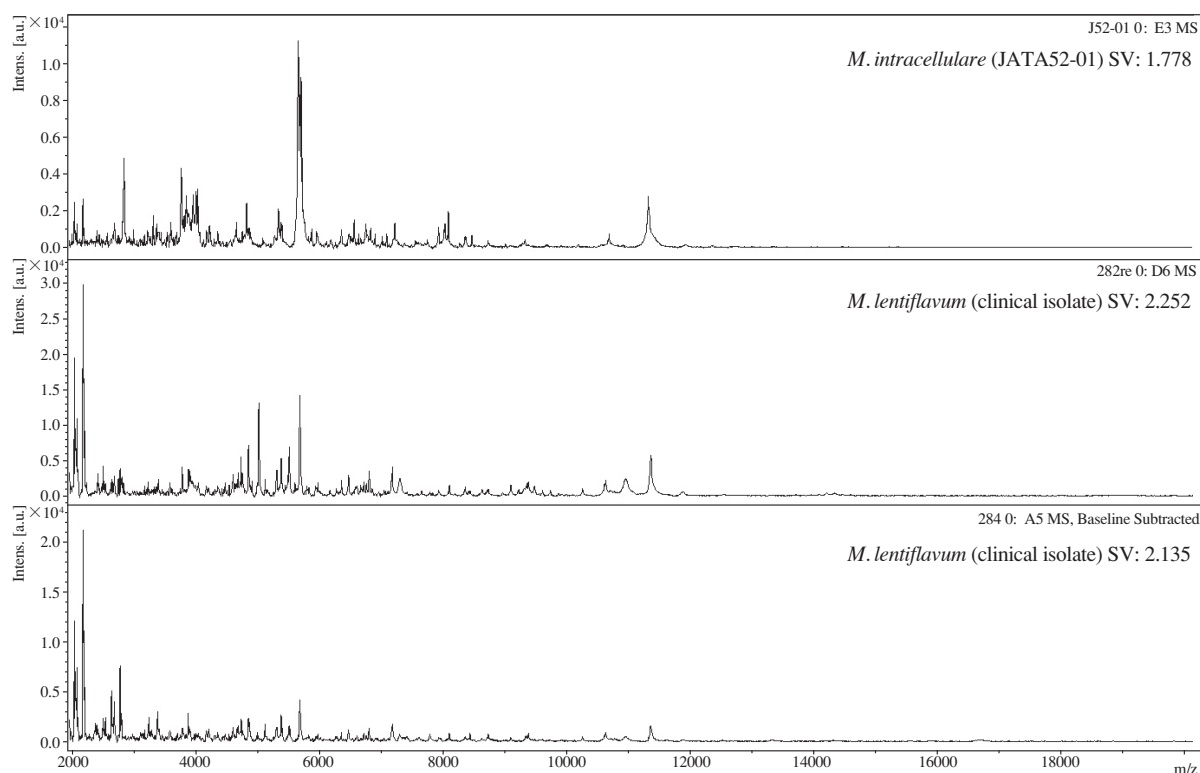


Fig. Difference of the mass spectral peak pattern between the standard strain of *Mycobacterium intracellulare* (JATA52-01) and the *Mycobacterium lentiflavum* 2 strains

株とした19株には、*M. lentiflavum*の分離はなかったが全70株の2.9%を占める割合である。抗酸菌同定の段階で、Runyon分類で暗発色菌群（Ⅱ群）に入る*M. lentiflavum*は固形培地上培養を続けるとコロニーが黄色の色調に呈色し、可視でもコロニーが灰白色になる非光発色菌群（Ⅲ群）の*M. intracellulare*とは鑑別がつくとされる。しかし、TapMan法を用いている市中の各施設の検査室では、コスト、手技の簡素化や非結核性抗酸菌の早期検出⁶⁾を考慮して、液体培地で増殖させ同定しているのが現状である。菌種同定されない非結核性抗酸菌の場合は、感染症としての病原性判断や標準化されていないが薬剤選択から、その菌種名について迅速性を要求されることが多く、質量分析計での測定に意義がでてくる。

*M. lentiflavum*の分離頻度が、当施設にて3.9%（全70株中2.9%）みられたが、治療の必要性の高い*M. intracellulare*分離頻度には地域差がみられるとされることから、その頻度がTaqMan法による誤同定により地域的に増減の可能性がでてくる。今後、疫学的な検討も必要である。

*M. lentiflavum*の病原性に関しては、戸田ら⁷⁾のPseudo-Outbreakにみられたように水道試料などの環境から検体へ非結核性抗酸菌の混入による検出報告がみられてきているが、その病原性は*M. intracellulare*より強いものではなかった⁸⁾とされる。レトロスペクティブな検討で、臨床材料からの本菌の検出例のうち臨床的な意義が確認さ

れたのは約10%程度であった⁹⁾とされ、ほとんどが環境由来で、海外では飲料水供給施設からの分離であった。わが国での感染症報告例^{10) 11)}も荒蕪肺を基礎に肺局所の免疫能の低下による発症で、治療に抵抗性を示し緩徐に進行したとされる症例であった。

薬剤感受性に関して、*Mycobacterium avium complex*の標準治療薬であるEB, CAM, RFPの*M. intracellulare* 18株に対する感受性は、河田らの報告¹²⁾とほぼ同様である。*M. lentiflavum* 2株のEB, CAM感受性は*M. intracellulare*株のMIC値範囲内にあるが、RFPでは*M. intracellulare*のMIC80値よりも高いMIC値を示している。Tortoliら⁹⁾は、isoniazidとRFPのMIC値は非常に高値であり、比較的低いのはCAM, levofloxacinであったと報告している。われわれの2株のMIC値も同様の傾向であり、*in vitro*におけるRFPのMIC値の高さのみでは治療に難渋するかどうかは不透明¹¹⁾で、薬剤の選択や治療期間を含めて、今後さらなる症例の蓄積や検討が必要である。

最後に、臨床的に*M. lentiflavum*などの稀な非結核性抗酸菌の確定には、質量分析計による同定が重要であると思われる。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特になし。

文 献

- 1) 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.
- 2) 戸田宏文, 山口逸弘, 鹿住祐子, 他: 環境由来 *Mycobacterium lentiflavum* に対するコバス TaqMan MAI 偽陽性反応の検討. 感染症学雑誌. 2013; 87: 215–217.
- 3) 新妻一直, 斎藤美和子, 小柴静子, 他: マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) による抗酸菌の同定—臨床分離抗酸菌株と基準菌株を用いて. 結核. 2014; 89: 555–563.
- 4) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 「抗酸菌検査ガイド2016」. 財団法人結核予防会, 東京, 2016.
- 5) 鈴木弘倫, 吉田 敦, 樽川友美, 他: 比較的稀な非結核性抗酸菌臨床株を対象とし MALDI-TOF MS による同定性能の評価. 日本臨床微生物学雑誌. 2016; 26: 105–111.
- 6) 米丸 亮, 加藤康子, 豊田 丈, 他: 臨床検査への MGIT 法導入による抗酸菌培養陽性率および培養陽性者数の増加. 日呼吸会誌. 2002; 40: 350–354.
- 7) 戸田宏文, 山口逸弘, 鹿住祐子, 他: 採痰ブース内水道水を介した *Mycobacterium lentiflavum* による Pseudo-Outbreak の分子疫学的解析. 環境感染誌. 2013; 28: 319–324.
- 8) 斎藤 肇, 村上和保, 矢島幹久, 他: 新たに記載された遅発育抗酸菌種のマウスに対する毒力. 結核. 2000; 75: 65–69.
- 9) Tortoli E, Bartoloni A, Erba ML, et al.: Human infections due to *Mycobacterium lentiflavum*. J Clin Microbiol. 2002; 40: 728–729.
- 10) Iwamoto T, Sonobe S, Hayashi K, et al.: A chronic pulmonary disease caused by *Mycobacterium lentiflavum* in a patient with a history of pulmonary tuberculosis. Clin Microbiol Newsl. 2003; 25: 79.
- 11) 開 陽子, 大河内康実, 徳田 均: 検体の遺伝子学的解析で診断しえた *Mycobacterium lentiflavum* 肺感染症の 1 例. 結核. 2012; 87: 713–718.
- 12) 河田典子, 河原 伸, 多田敦彦, 他: BrothMIC NTM を用いた非結核性抗酸菌の薬剤感受性についての検討. 結核. 2006; 81: 329–335.

Short Report

IDENTIFICATION SIGNIFICANCE USING MASS SPECTROMETRY OF
MYCOBACTERIUM LENTIFLAVUM ERRONEOUSLY IDENTIFIED AS
MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE BY THE COBAS TaqMan MAI TEST

¹Shizuko KOSHIBA, ²Katsunao NIITSUMA, ²Miwako SAITO, and ²Tomoko SUZUKI

Abstract [Objective] The frequency of misidentification as *Mycobacterium lentiflavum* strain in *M.intracellulare* strain identified by TaqMan test was examined by using mass spectrometry.

[Method] 70 clinically isolated nontuberculous mycobacteria preserved from 2001 were used. Measurement was carried out by mass spectrometry by the pretreatment method based on the mycobacteria test guide 2016.

[Results] Among clinically isolated nontuberculous mycobacteria strains, the COBAS AmpliCor® method (AmpliCor method) identified 5 strains and TaqMan test identified 20 strains of *M.intracellulare*. Two strains of *M.lentiflavum* identified by mass spectrometry were the ones misidentified by TaqMan test. All other strains were equally identified by mass spectrometry although the AmpliCor method showed a Score Value of less than 1.7 for 2 strains.

[Conclusion] The frequency of isolation of *M.lentiflavum* was 3.9% (2.9% for all 70 strains) for 2 out of 51 strains measured by the TaqMan method. Although there may be a

regional difference in the isolated frequency of *M.intracellulare*, there is a regional difference in the frequency of *M.intracellulare* isolation with a high necessity of treatment, but for the determination of nontuberculous mycobacteria including *M.lentiflavum* with low separation frequency, it is thought that identification by mass spectrometry is important.

Key words: Mass spectrometry, COBAS TaqMan MAI test, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium lentiflavum*

¹Inspection Department, Fukushima Prefectural Minami Aizu Hospital, ²Department of Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Fukushima Prefectural Medical University Aizu Medical Center

Correspondence to: Shizuko Koshiba, Inspection Department, Fukushima Prefectural Minami Aizu Hospital, 14-1, Kazashimo, Nagata, Minamiaizu-machi, Fukushima 967-0006 Japan. (E-mail: koshiba1024@gray.plala.or.jp)