

Table 1 Comparison of MDR-TB and S-TB by RFLP and Spoligotyping

		Cluster	Others	Total	Cluster %
RFLP	MDR-TB	47	62	109	43.1
	S-TB	99	127	226	43.8
	Total	146	189	335	43.6
		Beijing family*	Others	Total	Beijing %
Spoligotyping	MDR-TB	84	25	109	77.1
	S-TB	191	35	226	84.5
	Total	275	60	335	82.1
		Class**	Unique	Total	
Non-Beijing family	MDR-TB	13	12	25	
	S-TB	24	12	35	
	Total	37	24	60	

*ancient Beijing strains and Beijing-like spoligoprofiles

**major classes of *M. tuberculosis* in SpoDB3

Table 2 DNA fingerprinting results for MDR-TB and S-TB isolates by RFLP and Spoligotyping

MDR-TB				S-TB			
Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster
1010016	a*	2011505	f*	3070599	a*	3080908	e ^{T1}
1011097	a*	1100583	f*	3030861	a*	3070182	e ^{T1}
1051148	a*	3040439	f*	3110253	a*	3070919	e ^{T1}
1020193	a*	2050419	g*	3020215	a*	3080723	e ^{T1}
2070344	a*	3060933	g*	3010525	a*	3010626	e ^{T1}
2010894	a*	1012035	g*	3010925	a*	3010007	e ^{T1}
3070308	a*	1040969	h*	3071163	b*	3030100	e ^{T1}
2100456	a*	2020438	h*	3080532	b*	3030834	e ^{T1}
1010518	a*	1070653	i*	3070045	c*	3020017	e ^{T1}
1060866	a*	3060032	i*	3070400	c*	2120831	f*
2071004	a*	2100509	j ^{T2}	3070543	c*	2060904	f*
2101128	b**	3071249	j ^{T2}	3080792	c*	3071093	f*
3020418	b**	2011515	j ^{T2}	3022013	c*	3090992	f*
2060497	b**	1011111	k ^{T1}	3022069	c*	3070512	f*
3030886	b**	2020473	k ^{T1}	3030607	c*	3070215	f*
3020454	b**	2011505	l*	3071172	c*	3080936	f*
3010929	b**	2060287	l*	3070737	c*	3030206	f*
2011514	b**			3031018	c*	3040093	f*
3050944	c*			3030796	c*	3040033	f*
3020288	c*			3020810	c*	3030165	f*
2091054	c*			3031022	c*	3020391	f*
1070018	d*			3030837	c*	3010178	f*
1080214	d*			3030316	d*	3020757	f*
2060548	e*			3070021	d*	3010746	f*
2060510	e*					4011101	f*
2060423	e*					3090365	l*
3060080	e*					3030634	l*
3060868	e*					3070977	l*
3060247	e*					3081099	l*
1030685	e*					3030156	l*
						3020920	l*

*Beijing family

**LAMI family

^{T1}T1 family^{T2}T2 familySuperscript letters: classes of *Mycobacterium tuberculosis* excerpted from SpoDB3

The a pattern in MDR-TB was similar of the a pattern in S-TB by RFLP.

The i pattern in MDR-TB was also similar of the i pattern in S-TB by RFLP.

していた沖縄県での報告¹⁶⁾や、大島らの1~17本の分布で10と12本にピークが見られた岡山県の報告¹⁷⁾と同様の分布状況であった。したがって当センター周辺地域と他の地域での結核菌感染伝播に大きな違いは見られなると考えられた。

クラスター形成率は最近の感染からの発病を反映しているという定義が分子疫学を応用した感染対策の原則である。オランダ(1995年)、デンマーク(1998年)でのクラスター形成率は46.0%(結核罹患率:人口10万対10.4)、50.0%(10万対9.6)と報告されており¹⁸⁾、結核の高蔓延地域(10万対10未満)では比較的高いクラスター形成率を形成するものと考えられている。一方ニューヨークにおける1989年の結核罹患率は10万対36(全米平均は10万対9.2)となっているにもかかわらず、Allandら¹⁹⁾の1989~1991年での報告によるとクラスター形成率は37.5%であった。わが国では、阿野ら²⁰⁾の2001年の報告で大阪中南部地域のクラスター形成率は32.0%で中蔓延地域であるとしている。財団法人結核予防会から出版されている「結核の統計2002」²¹⁾によると2001年の大阪府における結核罹患率51.9は、全国平均の27.9より高値であった。したがって、大都市では地方に比べると結核罹患率が高いという地域間格差が見られ、また高いクラスター形成率が都市部における最近の感染状況を示唆していると考えられている。

今回の検討によるクラスター形成率は43.6%であった。そこで当センター周辺地域の結核罹患率を推定するために、まず西成区および浪速区に居住する患者由来菌株22株の対象菌株に占める割合は低い値を示していたこと(9.7%)から、大阪府の罹患率を今回の当センター周辺地域の罹患率と仮定した。結核罹患率は年度ごとに変動があるため、長期にわたって集められたMDR-TB群のサンプリング期間の中央値であり、S-TB群のサンプリング期間である2003年のデータを用いた。「結核の統計2004」²²⁾によると大阪府の2003年の結核罹患率は人口10万対44.0であり、全国平均(10万対24.8)よりも高かった。したがって当センター周辺地域は世界の高蔓延地域に比べると低い中蔓延地域ではあるが、ニューヨーク¹⁹⁾や大阪中南部²⁰⁾で示されたのと同様に、都市における比較的最近の感染発病を反映していると考えられた。

高島毛ら²³⁾は1996年から2000年までに結核高蔓延地域(西成区および浪速区)を含む大阪市内在住患者によるRFLP法を実施した結果、高蔓延地域と他の地域とでクラスター形成率は差が見られなかったとしている。そこで彼らはクラスター形成率と地域の罹患率水準の間には相関がなく、高結核罹患率は最近の感染伝播によるものではなく古い感染の内因性再燃発病による可能性が高

いと述べている。今回の検討から比較的高いクラスター形成率と高蔓延地域とはいわがたい結核罹患率が示され、クラスター形成率と結核罹患率との間に関連性が見られないという高島毛らの考えが支持できた。

しかし、結核においては「クラスター形成率=最近の感染の反映」とは必ずしもいえないという報告がBradenら²⁴⁾による米国アーカンソー州での地域結核分子疫学的研究で示されている。それによると33%の患者がクラスターを形成していたが、疫学的関連が確認されたのはそのうちの42%にすぎなかったとしている。高橋ら¹⁰⁾も沖縄県における地域流行株の存在を示唆している。今回、疫学的関連性が認められた事例は家族内感染の4事例(S-TB群)と集団感染と思われる事例の3事例(MDR-TB群)のみであり、疫学的につながりがないと思われる感染がほとんどであった。同様にクラスターの大きさ(構成員数)はMDR-TB群とS-TB群とで同程度に認められ、両群ともに構成員の大きいクラスターグループが存在していたが、多くの患者間での相互接触関係が証明されなかった。構成員数が大きいグループの中で疫学的関連が低い場合には幾世代か前の流行を反映する地域特異な株と推定されることから¹⁶⁾、過去に起きた流行株による内因性再燃発病によるものと考えられている。しかし最近に起こった患者間の偶発的な伝播による感染発病もありうることから、このような場合、患者に対して綿密な接触調査を実施することが必要となってくる。当センターのような広範囲な地域から結核症患者を受け入れる医療機関においては、患者情報を管轄する保健所が多岐にわたってしまい、個人のプライバシーの保護のうえからも患者情報の詳細な把握は非常に困難である。したがって現時点での解析結果からは、感染伝播力の強い結核菌による最近の感染発病と、地域的に流行している菌による内因性再燃発病の両方が混在して、クラスターを形成している可能性が考えられた。

MDR-TB群とS-TB群との間のクラスター形成率に有意差は認められなかった。従来薬剤耐性結核菌の感染伝播力は弱いとされてきたが⁹⁾²⁵⁾、近年、阿野ら²⁰⁾は大阪中南部地域を対象としたRFLP法の結果、薬剤感受性患者群とINH、RFP、EB、SMいずれかの薬剤に耐性の患者群とのクラスター形成率に有意差はなかったと報告している。われわれもMDR-TBの感染伝播力が必ずしも弱いとはいえないことを示すMDR-TBによる集団感染事例¹⁰⁾を報告している。したがって結核菌の感染伝播力は薬剤感受性に関係しないとの考えを今回支持できたことは意義があると考えられた。

MDR-TB群とS-TB群で共通のパターンを示すクラスターが2組認められた。すなわち感染伝播力の強い感受性菌が感染伝播力を保ちながら多剤耐性化し流行した可

能性と、全剤感受性の流行株が不適切な治療で多剤耐性化（獲得耐性）してクラスターを形成した可能性が、両群における共通パターンの存在から示唆された。

Spoligotyping法

今回の検討ではMDR-TB群、S-TB群ともにBeijing familyが約75%以上を占め、両群に有意差は認められなかった。またRFLP法でクラスターを形成したグループは大部分がBeijing familyに属していた（Table 2）。Beijing familyは感染伝播力が強く、薬剤耐性を獲得しやすいとされており²⁶⁾、今回両群が同じ割合でBeijing familyに属していたことは、薬剤感受性の違いによる結核菌の感染伝播力に差はない可能性をさらに支持する結果と考えられる。

RFLP法とSpoligotyping法のクラスターから推定した最近の結核感染発病率は、今回全対象結核菌336株において、大角ら¹⁵⁾が報告している30.0%とはほぼ同程度の34.0%を示し、MDR-TB群においては32.1%、S-TB群においては35.0%であった。したがって最近における感染発病率も薬剤感受性に左右されない可能性が支持された。

まとめ

薬剤感受性の違いによる結核菌の感染伝播力の違いについて、遺伝子学的手法を用いた分子疫学的解析を行った結果、RFLP法ではMDR-TBとS-TB群の間のクラスター形成率に有意差はなく（ χ^2 検定 $p=0.51>0.05$ ）、Spoligotyping法でも両群間のBeijing familyの占める割合に有意差がないことを証明できた（ χ^2 検定 $p=0.09>0.05$ ）。今回のデータは当センター周辺地域における結核対策の活動に役立つ基礎的データとして有用であると考えられた。

文 献

- 1) van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, et al.: Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 2578-2586.
- 2) van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al.: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 406-409.
- 3) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 907-914.
- 4) Cowan LS, Crawford JT.: Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1294-1302.
- 5) Toungoussova OS, Mariandyshev A, Bjune G, et al.: Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the archangel prison in Russia: predominance of the W-Beijing clone family. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: 665-672.
- 6) Diaz R, Kremer K, de Haas PEW, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of Spoligotyping versus IS 6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 743-750.
- 7) Kubica T, Rüscher-Gerdes S, Niemann S.: The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8: 1107-1113.
- 8) Krüüner A, Hoffner SE, Sillastu H, et al.: Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3339-3345.
- 9) van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PEW, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis.* 1999; 180: 726-736.
- 10) 露口一成: 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例について. 複十字. 2003; 293: 8-11.
- 11) WHO: Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendation for prevention and control. *Wkly Epidemiol Rec.* 2006; 45: 430-432.
- 12) Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, et al.: Analysis of the allelic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2438-2444.
- 13) Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al.: Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1347-1349.
- 14) Goguet de la Salmonière YO, Li HM, Torrea G, et al.: Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2210-2214.
- 15) 大角晃弘, 高橋光良, 内村和広, 他: 結核菌 DNA 指紋法を用いた結核対策改善事業成績 (1996年4月~2004年5月の概略). 資料と展望. 2004; 51: 77-83.
- 16) 高橋光良: 結核分子疫学の成果と展望. 結核. 2002; 77: 741-752.
- 17) 大島律子, 多田敦彦: 岡山県内で分離された結核菌 DNA の IS 6110-RFLP パターン分析. 結核. 2002; 77: 629-637.
- 18) Bauer J, Yang Z, Poulsen S, et al.: Results from 5 years of nationwide DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in a country with a low incidence of *M. tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 305-308.
- 19) Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al.: Transmission of tuberculosis in New York City—An analysis by DNA

- fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1710-1716.
- 20) 阿野裕美, 森山和郎, 松本智成, 他: RFLP分析に基づく, 結核感染状況の疫学的検討—当院医療圏である大阪中南部地域の場合—. *結核.* 2002; 77: 783-788.
- 21) 厚生労働省健康局結核感染症課監修: 「結核の統計2002」. 結核予防会, 東京, 2002, 4.
- 22) 厚生労働省健康局結核感染症課監修: 「結核の統計2004」. 結核予防会, 東京, 2004, 4.
- 23) 高島毛敏雄: 社会経済弱者における結核対策の強化に関する研究. 厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「再興感染症としての結核対策確立のための研究」平成14年度分担研究報告. 2003; 49-213.
- 24) Braden CR, Templeton GL, Cave MD, et al.: Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis.* 1997; 175: 1446-1452.
- 25) Middlebrook G: Diagnosis and biological problems of isoniazid-resistant tubercle bacilli. *Bull IUATLD.* 1956; 26: 179-205.
- 26) Niemann S, Rüsck-Gerdes S, Richter E: IS 6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 3015-3020.

Original Article

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
— Comparison between Multidrug-Resistant Strains and Susceptible Strains —

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ¹Masaji OKADA,
and ²Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] Comparing multidrug-resistant *M. tuberculosis* strains with susceptible strains by molecular epidemiological methods.

[Methods] We examined 109 multidrug-resistant strains (MDR-TB) and 226 susceptible strains (S-TB) derived from National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center by restriction fragment length polymorphism (RFLP) with IS 6110, and Spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping).

[Results] In the case of MDR-TB, 47 strains (43.1%) belonged to 12 descriptions of clusters and the number of IS 6110 copies per isolate ranged from 9 to 25. Similarly, 99 strains (43.8%) belonged to 20 descriptions of clusters in S-TB and the distribution of IS 6110 copies were from 1 to 20. On the other hand, 84 strains of MDR-TB (77.1%) and 191 strains of S-TB (84.5%) belonged to Beijing family by Spoligotyping.

[Conclusion] MDR and susceptible *M. tuberculosis* strains were characterized similarities in ratio of clusters by RFLP patterns and high proportion of Beijing family by Spoligotyping. These finding supported the possibility that infectiousness of MDR-TB might be similar to that of S-TB.

Key words: *M. tuberculosis*, IS 6110-RFLP, Spoligotyping, Multidrug-resistant, Susceptible

¹Clinical Research Center, ²Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

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)

薬剤感受性検査で RFP 感受性, line probe assay で RFP 耐性となる結核菌の検討

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ²富田 元久
¹岡田 全司 ³坂谷 光則

要旨:〔目的〕薬剤感受性検査で RFP 感受性, line probe assay で RFP 耐性となる結核菌の検討。〔対象〕国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにおいて分離され, 薬剤感受性検査で RFP 感受性と判定されたにもかかわらず, 臨床的に同薬剤に対する治療効果が乏しい肺結核症患者由来の 6 株と, 判定結果が薬剤感受性検査間で一致しない 9 株の合計 15 株。〔方法〕3 種類の薬剤感受性検査を実施し, 遺伝子診断としてジェノスカラー・Rif TB を使用した。同時にシークエンス解析による *rpoB* 遺伝子変異領域部位の特定を行った。〔結果〕薬剤感受性検査の結果, 15 株すべてはいずれかの方法で RFP 感受性もしくは判定保留を示した。プロスミック MTB-1 法を用いた最小発育阻止濃度 (MIC) は 0.25~4 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であった。一方ジェノスカラー・Rif TB においてすべての株は変異型を示し, シークエンス解析でも *rpoB* 遺伝子領域に変異が確認され RFP 耐性と判定された。〔結論〕今回われわれは通常の薬剤感受性検査で耐性と判定されない低レベルの RFP 耐性結核菌に対して薬剤耐性遺伝子検査を行うことにより正しい感受性結果を得ることができた。

キーワード: 結核菌, 薬剤感受性検査, 薬剤耐性遺伝子, *rpoB*, MIC

はじめに

多剤耐性結核菌 (MDR-TB) の出現と蔓延を防止するためには, 有効な薬剤の選択を可能とする迅速かつ正確な結核菌の薬剤感受性検査の実施が欠かせない。一次抗結核薬剤の 1 つであるリファンピシン (RFP) の迅速な感受性判定は多剤併用療法を施行していくうえで非常に重要であるが, 正確な感受性判定には一定の熟練が必要である。また結核菌の発育速度が遅いため判定までに時間がかかるという問題点もある。一方, 近年結核菌の薬剤耐性に関連する遺伝子の解明が進んでおり, 遺伝子変異の有無を検出することによって迅速な薬剤感受性判定を可能とする各種キットが開発されている^{1)~3)}。今回われわれは独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにおいて RFP 感受性と判定されたにもかかわらず, RFP の臨床効果が乏しい肺結核症 6 症例を経験した。そこで, これらの症例由来の臨床分離菌株に対して

最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し, line probe assay を応用した RFP 耐性結核菌検出キット⁴⁾を用いて *rpoB* 遺伝子中の変異の検出を行った。さらにシークエンス解析による *rpoB* 遺伝子変異領域の特定を行い, 薬剤感受性判定の正確性を検討した。また比率法で判定される薬剤感受性検査では判定結果が菌の発育状況に左右されやすく, とくに長期治療中の肺結核症患者からの分離菌株で不安定な場合があることから⁵⁾, RFP 感受性結果が複数回の薬剤感受性検査ごとに異なる症例についても同様の方法で RFP 感受性判定を試みた。

対象と方法

〔対象〕

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにおいて薬剤感受性検査で RFP 感受性と判定されたにもかかわらず, RFP の臨床効果が乏しい肺結核症 6 症例由来の臨床分離菌 6 株をグループ 1 とした。グループ 1 の

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター,²研究検査科,³内科

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 4 Feb. 2008 / Accepted 28 Apr. 2008)

うち5症例は初回治療例であったが、1症例 (No. 6) については前回治療歴があり、その際実施した薬剤感受性検査結果はRFP感受性と判定されていたが、10カ月後、再排菌を起こし再入院するに至った。しかし再治療時におけるRFPの臨床的効果が芳しくなかったため、この症例におけるRFPに対する感受性の変化を検討するために前回入院時の菌株6⁵についても同様に調べた。

RFP感受性結果が薬剤感受性検査ごとに異なるもしくは発育不良で判定不能となった臨床分離結核菌9株 (3症例) はグループ2として、同様にRFPに対する感受性検査を実施した。

耐性結核菌検出キットの精度評価として上記以外に、薬剤感受性検査結果と臨床的効果に相関が認められた肺結核症由来菌15株 (RFP感受性7株、RFP耐性8株) とH37Rv株をコントロール対照として用いた。

[方法]

菌株の同定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ベリアTB (日本ベクトン・ディッキンソン) で行った。

薬剤感受性検査は液体培地を用いるBACTEC MGIT 960 AST結核菌薬剤感受性検査用MGITシリーズ (MGIT-AST法、日本ベクトン・ディッキンソン) と小川比率法に基づくウエルバック培地S (日本ビーシージーサプライ)、Middlebrook 7H9液体培地を用いた微量液体希釈法によるプロスミックMTB-1 (極東製薬工業) を用いた。RFPの耐性基準濃度はMGIT-AST法では1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、ウエルバック培地S法では40 $\mu\text{g/ml}$ 、プロスミックMTB-1法では4.0 $\mu\text{g/ml}$ とし、プロスミックMTB-1法のみ判定保留域として、0.06~2.0 $\mu\text{g/ml}$ の基準を設け、0.03 $\mu\text{g/ml}$ 以下で感受性と判定した。MIC測定にはプロスミックMTB-1法を用いた。

RFP耐性結核菌検出として、line probe assayを用いた結核菌 *rpoB* 遺伝子の変異検出用試薬ジェノスカラー・Rif TB (ニプロ) を使用説明書に準拠して用いた。まず臨床分離菌株からインスタジーンDNA精製マトリックス (BIO-RAD) を用いてDNAを抽出、精製し、結核菌群 *rpoB* 遺伝子増幅試薬 (ニプロ) を使用して *rpoB* 遺伝子の polymerase chain reaction (PCR) 増幅を行った。得られたPCR増幅産物をLiPA検体として、ジェノスカラー・Rif TBにて *rpoB* 変異部位の検出を行った。

本試薬は発色確認用コントロール、結核菌群特異的のプローブおよび9種類の *rpoB* 遺伝子プローブが固相化されたストリップに、増幅されたDNAをハイブリダイズさせ、得られた発色パターンによって結核菌の同定ならびに *rpoB* 遺伝子型の判定を行う。 *rpoB* 遺伝子プローブは19~23個の塩基からなる部分的に重複した5種類の野生型プローブ (S1~S5) と、RFP耐性結核菌に見られ

る *rpoB* 遺伝子変異のうち頻度の高い4種類の変異の変異型プローブ (R2, R4a, R4b, R5) から構成されている。プローブS1~S5は野生型の塩基配列に対応し、検体のDNA配列が野生型の場合5本の発色が見られ、RFP感受性と判定する。変異が存在する場合は相当するプローブに発色が見られず、RFP耐性と判定する。またD516V, H526Y, H526D, S531Lの変異が存在する場合はそれぞれのRプローブが対応し、発色する。

すべての菌株に対してPCRによる *rpoB* 遺伝子変異領域 (69 bp) のシーケンス解析を行った。同時に van Embdenら⁶⁾の方法に準拠してIS6110-RFLP法を施行し、菌株の異同を検討した。

結 果

薬剤感受性検査

供試菌15株の薬剤感受性検査の結果は3方法のうちいずれかの方法にて感受性もしくは判定保留と判定された。グループ1の6症例においては、MGIT-AST法とウエルバック培地S法で感受性と判定されたが、プロスミックMTB-1法では判定保留もしくは耐性と判定され、MIC値は0.25~4 $\mu\text{g/ml}$ であった。また症例6の場合、再入院時において排菌された菌株6⁵が判定保留を示していたが、前回治療時の保存菌株6⁵は3方法すべてに感受性と判定され、MIC値は0.03 $\mu\text{g/ml}$ であった (Table 1)。

グループ2の3症例 (1, 2, 3) におけるMIC値は0.25~4 $\mu\text{g/ml}$ であった。そのうち症例1における菌株1のMIC値は0.25 $\mu\text{g/ml}$ を示したが、17カ月後に分離された菌株2では4 $\mu\text{g/ml}$ と上昇していた (Table 2)。

line probe assayならびにシーケンス解析

コントロール対照の15株とH37Rv株はジェノスカラー・Rif TBで薬剤感受性検査と同じ結果を示した。一方、グループ1および2における15菌株すべてはジェノスカラー・Rif TBで耐性と判定され、変異のパターンはS1欠損、S2欠損、S3欠損、S4欠損と多型性を認めた。そのうち薬剤感受性検査結果が不安定なグループ2の症例1, 2, 3においては菌株間でキットごとの判定結果は変わらなかった。グループ1の症例6における前回治療保存菌株6⁵は野生型を示し、感受性と判定された。

シーケンス解析の結果、供試菌15株すべては *rpoB* 遺伝子領域に変異が確認できた。そのうちRFP耐性株の8株はS5領域に変異の認められた株が4株、S3領域においては2株、S1とS4領域に各1株認められた。グループ1における症例1, 2, 3は3症例ともに共通してアミノ酸コドン526部位にヒスチジン (His) からセリン (Ser) への遺伝子変異を認めた。症例4は516部位にアスパラギン酸 (Asp) からチロシン (Tyr) へ、症例5は511部位にロイシン (Leu) からプロリン (Pro) へ、症

Table 1 Group 1: Rifampicin-resistant isolates by the line probe assay, despite susceptible by the drug susceptibility testings (6 cases)

Patient No.	Drug susceptibility testing				RFP resistance-conferring mutation		
	MGIT-AST ^a	Wellpack-S ^b	BrothMIC	MTB-1 ^c : MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Line probe assay	Amino acid affected : Amino acid change	
1	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow AGC (Ser)	
2	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow AGC (Ser)	
3	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow AGC (Ser)	
4	S	S	R	4	Δ S2	516 : GAC (Asp) \rightarrow TAC (Tyr)	
5	S	S	I	1	Δ S1	511 : CTG (Leu) \rightarrow CCG (Pro)	
6 ^d	S	S	S	0.03	WT	None : None	
6	S	S	I	0.25	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow CTC (Leu)	

S: Susceptible R: Resistant I: Intermediate WT: wild type

^a Resistant to rifampicin at 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by BACTEC MGIT 960 AST^b Resistant to rifampicin at 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by the proportion method on egg-based Ogawa medium^c Resistant to rifampicin at 4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by the broth micro-dilution method^d Strains from the case 6 during from the first therapy**Table 2** Group 2: Rifampicin-resistant isolates by the line probe assay, whereas the different determinations by the drug susceptibility testings (3 cases)

Patient No.	Strain	Drug susceptibility testing				RFP resistance-conferring mutation			Time span (mo)
		MGIT-AST ^a	Wellpack-S ^b	BrothMIC	MTB-1 ^c : MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Line probe assay	Amino acid affected : Amino acid change		
1	1	ND	S	I	0.25	Δ S3	522 : TCG (Ser) \rightarrow TTG (Leu)		0
	2	# ^a	R	R	4	Δ S3	522 : TCG (Ser) \rightarrow TTG (Leu)		17
2	1	R	S	R	4	Δ S1	509-511 Deletion		0
	2	R	S	R	4	Δ S1	509-511 Deletion		4
3	1	ND	S	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)		0
	2	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)		24
	3	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)		31
	4	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)		34
	5	S	R	I	0.5	Δ S4	526 : CAC (His) \rightarrow TGC (Cys)		40

^a Not grown ND: Not determined S: Susceptible R: Resistant I: Intermediate^b Resistant to rifampicin at 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by BACTEC MGIT 960 AST^c Resistant to rifampicin at 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by the proportion method on egg-based Ogawa medium^d Resistant to rifampicin at 4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by the broth micro-dilution method

例6の菌株6は526部位にヒスチジン (His) からロイシン (Leu) への変異を認めた。しかし症例6の前回治療保存菌株6^dについては *rpoB* 遺伝子領域に変異は認められなかった (Table 1)。

グループ2において、症例1は522部位にセリン (Ser) からロイシン (Leu) への変異、症例2は509-511の欠失を認めた。症例3は526部位にヒスチジン (His) からシステイン (Cys) への変異が認められ、菌株間の遺伝子変異に変化は認められなかった (Table 2)。

RFLP法

グループ1の症例1, 2, 3は同じRFLPパターンを示した。症例6の2菌株も互いに同じパターンを示した。グループ2の症例1, 2, 3については治療中に排除された菌株のRFLPパターンは変化を認めなかった。

考 察

わが国で従来広く用いられている薬剤感受性検査は、長らく小川培地を用いた絶対濃度法であったが、1997年に日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会が提案した比率法が標準となった⁷⁾。しかし操作の煩雑さや試験結果が得られるまで時間がかかることが問題とされている。MDR-TBにおいては時折発育がとても遅い菌が存在する場合があるために正確な判定が困難となることがある。

分子遺伝学的手法の導入により、結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子の研究が進んでいる⁸⁾⁻¹²⁾。RFPの場合、RNAポリメラーゼ β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子に変異が見られ、特に hot spot 領域 (69bp) の変異がRFP耐性結核菌の95%に認められる¹³⁾。ジェノスカラー・Rif TBはこの *rpoB* 遺伝子変異を検出する試薬であり、迅速なRFP感受性判定が可能である^{11,12,14)}。

そこでわれわれは生物学的手法を用いる薬剤感受性検査で起こりうる、臨床経過とRFP感受性検査との間の齟齬が生じる症例や、複数回の感受性結果が変動するためRFP感受性判定が困難な症例を対象として、迅速かつ明確な判定が可能なRFP耐性結核菌検出キットを用いた遺伝子レベルでの感受性判定の有益性の検討を行った。

今回グループ1における6症例は、いずれかの薬剤感受性検査でRFP感受性、もしくは判定保留域と判定された。しかしプロスミックMTB-1法で得られたMIC値は比較的高い値(0.25~4 µg/ml)を示したため、通常の薬剤感受性検査では耐性と判定されない低レベルのRFP耐性と考えられた。症例6の場合、再発時における菌株6のMIC値は初回発病時における菌株の値よりも上昇が認められた(0.03 µg/mlから0.25 µg/ml)ことからRFPの耐性化による再燃が考えられた。このような結核菌は通常の薬剤感受性検査では見過ごされやすく、薬剤耐性結核菌の早期発見のうえでもMIC値測定的重要性が示唆された。

グループ2における3症例のうち、症例1の菌株1についてはMGIT-AST法が当センターに導入される前に検出された検体であったため実施されていなかったが、ウエルバック培地S法ではRFP感受性、プロスミックMTB-1法ではMIC値0.25 µg/mlの判定保留域であった。17カ月後に排菌された菌株2においてはMGIT-AST法では菌の発育不良による判定不能となり、他の2法ではRFP耐性と判定されMIC値も4 µg/mlと上昇していた。初回治療の場合と違って、いったん排菌が停止された後に再度排菌し治療を開始するときには耐性結核の頻度が高いことから¹⁵⁾、薬剤感受性検査を実施することは必須である。またAmerican Thoracic Society (ATS)のガイドラインでも患者が3カ月の治療の後にも培養陽性の喀痰を呈し続ける場合や、培養陰性の後に培養陽性となった場合には薬剤感受性検査を繰り返さなければならないとしている¹⁶⁾。今回のグループ2の検討で長期持続排菌症例にRFPの耐性化が認められたことから、長期持続排菌症例に対しては低レベル耐性結核菌の可能性を考慮し、薬剤感受性検査を繰り返す必要があると考えられた。

ある患者の生体内において感受性菌と耐性菌が混在している場合、薬剤感受性検査で耐性菌の割合が1%を超えると治療効果が乏しいという臨床的根拠からcritical pointを1%として採用している。遺伝子検査ではDNAの割合の優勢なほうがより増幅されるという特徴がある。したがって薬剤感受性検査と遺伝子検査は相関性が良好であると考えられる。稀なケースではあるが、薬剤感受性検査でRFP耐性と判定されたがジェノスカラー・Rif TBでwild typeと判定され、シークエンス解析では感受性菌と耐性菌が混在していた1菌株をHiranoらは報告

している⁴⁾。阿部らは、薬剤感受性検査で耐性と判定されたにもかかわらずジェノスカラー・Rif TBとシークエンス解析でwild typeと判定された4株を報告し、*rpoB*以外の遺伝子がRFP耐性に関与している可能性を述べている¹⁷⁾。今回の検討ではこのような例は含まれていなかったが、遺伝子検査を行ううえでは十分留意すべき点である。

阿部らは230株中1株に低レベルRFP耐性菌があり、通常の薬剤感受性検査で感受性、ジェノスカラー・Rif TBとシークエンス解析で耐性となったとしている¹⁷⁾。この症例は標準化学療法で菌陰性化に成功したが、今回のグループ1の6症例はいずれも臨床的效果が乏しかった。臨床的経過をgold standardと考えるならば、遺伝子解析による感受性判定が生体内での薬剤感受性を正確に反映している可能性が示唆された。しかし薬剤耐性の機序はまだ未解明な面が残されており、薬剤感受性検査と併用することが重要である。薬剤感受性検査においても卵培地上で発育の悪い菌が液体培地上で発育する場合や、その逆の例もある。今回各薬剤感受性検査間で結果に不一致が生じた要因として、低レベルRFP耐性の可能性と同時に菌の発育状況が使用培地によって左右されることも十分考えられる。そのような場合、遺伝子検査結果を参考にすることは非常に有益であろう。

*rpoB*変異領域を5分類したうえで遺伝子変異の起こる頻度について検討したRossauらによると、RFP耐性菌193株中103株(53.4%)にS5領域の変異を認め、ついでS4領域(31.1%)、S2領域(10.4%)の変異と続き、S3領域は3.6%、S1領域は1.6%の割合で変異が認められるとしている¹⁸⁾。今回コントロール対照のRFP耐性株8株中S5領域に変異の認められたのは4株で、ついでS4領域に2株、S3領域とS1領域に各1株認められた。しかし供試菌15株では一番高頻度に変異が認められるS5領域に変異は認められなかった。

MDR-TBは薬剤耐性遺伝子の変異が多重に蓄積された菌株である。薬剤耐性獲得は菌の適応度(フィットネス)を低下させるものであり、適応に払う犠牲(フィットネス・コスト)を最小限に抑えられた菌株が耐性結核として優勢に出現するとも考えられている¹⁹⁾。Cavusogluらは*rpoB*遺伝子変異はコドン531、ついで526、516、511に多く認められたと報告している。そのなかでコドン531(S5領域)ではTCGからTTGへの変異、511(S1領域)ではCTGからCCGへの変異が高率に出現することから、この変異型は菌の生存するうえでの適応度が高い(フィットネス・コストが低い)ために優勢的であるのだろうと推察している²⁰⁾。今回、グループ1の症例5でコドン511に同様の変異を認めた。この菌株はフィットネス・コストが低い可能性が考えられた。続いて

Cavusogluらはコドン526と516には多様な変異型が認められ、これらの変異をもつ菌株は高レベルRFP耐性であることから⁽¹⁰⁾⁽²¹⁾、様々な塩基に容易に変化できるため高い薬剤耐性を獲得する能力をもつのであろうとしている⁽²⁰⁾。今回の結果ではコドン516の変異は1株しかなかったが、コドン526では3種類の遺伝子変異を認めた。グループ2の症例3における2塩基変異(CAC→TGC)は他の報告でも見られたが⁽²⁰⁾⁽²²⁾、グループ1の症例1, 2, 3で認めた変異は今までに報告はない。*rpoB*遺伝子変異の多くはpoint mutationであるが、少数ながらコドンの欠失、挿入、2塩基変異などが様々なアミノ酸部位に報告されている⁽²¹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽²³⁾。コドン526の変異の多様性から考えて、今回の変異も十分妥当なものであると考えられる。また耐性を獲得したと考えられるグループ1の症例6においてコドン526の変異を認めたことはこのアミノ酸変異の獲得耐性能力の高さを示唆するものである。

今回グループ2の症例1では、MIC値が上昇していたにもかかわらず*rpoB*遺伝子の変異は522(S3領域)のみで変化がなかった。Cavusogluらは30株に多重なアミノ酸変異を認めており、うち2株はコドン522~525の欠失と、515と533のdouble mutationを認めたが、残り28株は高頻度に表れる変異(531, 526, 516, 511)のいずれかを伴っていた⁽²⁰⁾。またコドン522の変異はpoint mutationがほとんどであり、他の領域の変異を伴うという報告は現在のところ見当たらない^{(4)(9)(18)(20)~(22)(24)}。したがって、今回のコドン522の変異は多重に変異を蓄積しやすいと思われる高頻度変異とは連動せずに、耐性レベル

を上昇させている可能性がうかがえた。

今回の結果ではコドン531変異は見られなかったが、高い耐性獲得能力をもつコドン526, 516変異や、適応能力に優れたコドン511の変異を認めたことから、低レベルRFP耐性菌はRFP治療継続により高レベルのRFP耐性菌へと移行する危険性も考えられた。また今回検体数が少なかったことと、コドン526と531のdouble mutationが現時点で報告されていることから⁽²⁰⁾⁽²²⁾、今後コドン531変異が検出される可能性も考えられる。低レベルRFP耐性結核菌と*rpoB*遺伝子変異が起こる部位に何らかの菌側の遺伝的背景が関連しているかもしれないと考え、今後菌株数を増やして低レベルRFP耐性菌に特徴的な変異部位の詳細な検証を計画中である。

RFLP法による検討では、グループ1における症例1, 2, 3のRFLPパターンが一致し、薬剤感受性検査結果ならびに*rpoB*遺伝子解析結果も一致していた。これらの症例を示した3患者は居住地が近接し発病時期も近かったことから、疫学的にも同一菌株による感染と推測された。

Smallらは薬剤感受性検査とRFLPの比較で、再発した肺結核症17症例のうち6症例にRFLPは不変だったが薬剤感受性検査に変化が見られたことから、内因性再燃による再発と報告している⁽²⁵⁾。グループ1における症例6は初診、再発の菌株間でRFLPパターンが一致し、再治療時における菌株のMIC値が上昇して耐性化していることから同一菌により耐性を獲得し、再燃したという考えがRFLP法から更に示唆された。グループ2におけ

Table 3 Comparison of the results of the line probe assay with three drug susceptibility testings for INH and RFP

Group and patients	Strains	Drug susceptible testings									Line probe assay
		MGIT-AST		Wellpack-S			BrothMIC MTB-1				
		m-INH	m-RFP	INH0.2	INH1.0	RFP	INH	RFP	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
Group 1	1	R	S	R	S	S	R	I	0.25	Δ S4	
	2	R	S	R	S	S	R	I	0.25	Δ S4	
	3	R	S	R	S	S	I	I	0.25	Δ S4	
	4	R	S	S	S	S	S	R	4	Δ S2	
	5	R	S	R	R	S	R	I	1	Δ S1	
	6 ^a	R	S	R	S	S	R	S	0.03	WT	
Group 2	1	ND	ND	R	R	S	R	I	0.25	Δ S3	
		# ^a	# ^a	R	R	R	R	R	4	Δ S3	
	2	R	R	R	S	S	R	R	4	Δ S1	
		R	R	R	S	S	R	R	4	Δ S1	
	3	1	ND	ND	R	R	S	R	I	0.5	Δ S4
		2	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4
		3	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4
		4	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4
		5	R	S	R	R	R	R	I	0.5	Δ S4

^aNot grown ND: Not determined S: Susceptible R: Resistant I: Intermediate WT: wild type

^bStrains from the case 6 during the first therapy

る症例1, 2, 3のRFLPパターンは症例ごとに同じで、同一の菌による持続感染と考えられた。

RFP耐性結核菌の多くはイソニアジド (INH) 耐性を併せもつことが報告されており²⁶⁾²⁷⁾、今回、Table 3で示したINHとRFPの薬剤感受性検査結果でも、供試菌15株はすべて3種類の薬剤感受性検査のいずれかでINH耐性と判定されていた。2002年の結核療法研究協議会による全国調査では、初回治療例の0.7%、既治療例の9.8%でMDR-TBが認められたと報告されており²⁸⁾、大多数のMDR-TBは不確実な服薬や中断により耐性を獲得したと考えられている。しかし今回グループ1の6症例のうち5症例は初回治療例であり、*rpoB*遺伝子変異が存在するけれども、薬剤感受性検査で耐性と判定されないため見逃されている比較的初期のMDR-TBの存在がうかがわれた。このような場合、RFP感受性菌と過小評価されたまま治療が続き、再発した際にはより深刻なMDR-TBに進行している危険性が少なからず存在すると考えられた。HIV陰性者におけるMDR-TBの外來性再感染事例²⁹⁾³⁰⁾が報告されており、低レベルRFP耐性結核菌を早期に検出することはMDR-TBによる院内感染を防ぐためにも非常に重要である。本キットにより適切な治療法の迅速な選択が可能となり、治療成績を高められる効果が期待できる。

ま と め

RFPに対する通常の薬剤感受性検査結果と臨床効果との間に乖離がある症例や、長期排菌症例で薬剤感受性検査結果が不安定な場合、低レベルRFP耐性結核菌による感染の可能性がある。その際MIC値の測定やline probe assayによる遺伝子変異の有無の検討が臨床的に有用であることが示唆された。

文 献

- 鈴木定彦, 市原寛生, 田丸亜貴, 他: DNAチップによる結核菌の耐性診断. *Bio Industry*. 2000; 5: 36-44.
- Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, et al.: Use of the genotype MDRDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3699-3703.
- Lin SYG, Probert W, Lo M, et al.: Rapid detection of isoniazid and rifampin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex from cultures or smear-positive sputa by use of molecular beacons. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 4204-4208.
- Hirano K, Abe C, Takahashi M: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 2663-2666.
- 阿野裕美, 松本智成, 吉多仁子, 他: 結核治療中患者から経時的に得られた結核菌株での、薬剤耐性菌と感受性菌の割合の変化. *結核*. 2003; 78: 739-746.
- van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al.: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 406-409.
- 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 「新結核菌検査指針2000」. 結核予防会, 東京, 2000, 95-106.
- Zhang Y, Heym B, Allen B, et al.: The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 1992; 358: 591-593.
- Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al.: Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38: 2380-2386.
- Ohno H, Koga H, Kohno S, et al.: Relationship between rifampin MICs for *and rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 1053-1056.
- Scorpio A, Zhang Y: Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*. 1996; 2: 662-667.
- Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, et al.: Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 1677-1681.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993; 341: 647-650.
- 林 浩志, 竹村一男, 兒崎隆純, 他: マイクロアレイを用いた結核菌の検査. *臨床検査*. 2005; 49: 539-545.
- Abe C, Hirano K, Wada M, et al.: Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001; 5: 46-52.
- American Thoracic Society: Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161: 1376-1395.
- 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他: Line Probe Assay (LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核*. 2000; 75: 575-581.
- Rossau R, Traore H, de Beenhouwer H, et al.: Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 2093-2098.
- Gagneux S, Long CD, Small PM, et al.: The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2006; 312: 1944-1946.
- Cavusoglu C, Hilmioğlu S, Guneri S, et al.: Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 4435-4438.
- Hwang HY, Chang CY, Chang LL, et al.: Characterization

- of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 239-245.
- 22) Valim ARM, Rossetti MLR, Ribeiro MO, et al.: Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3119-3122.
- 23) Matsiota-Bernard P, Vrioni G, Marinis E: Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 20-23.
- 24) Morlock GP, Plikaytis BB, Crawford JT: Characterization of spontaneous, in vitro-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 3298-3301.
- 25) Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, et al.: Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1137-1144.
- 26) Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, et al.: Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1969-1973.
- 27) Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, et al.: Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet.* 1994; 344: 273-278.
- 28) Tuberculosis Research Committee (Ryoken): Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: a nationwide survey, 2002. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11: 1129-1135.
- 29) Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, et al.: Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21: 596-602.
- 30) 露口一成: 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例について. *複十字.* 2003; 293: 8-11.
- 31) Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al.: Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 717-720.
- 32) Bandera A, Gori A, Catozzi L, et al.: Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2213-2218.

Original Article

EVALUATION OF THE DISCREPANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS BETWEEN ANY ORDINARY SUSCEPTIBILITY TESTING AND *rpoB* GENE ANALYSIS BY THE LINE PROBE ASSAY

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ²Motohisa TOMITA, ³Masaji OKADA, and ³Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] Evaluation of rifampicin-resistance by the line probe assay, for rifampicin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains which were classified as rifampicin-resistant by the phenotypic drug susceptibility testings.

[Materials and Methods] A total of 15 clinical isolates from NHO Kinki-chuo Chest Medical Center consisting of 6 rifampicin-resistant strains by the line probe assay despite susceptible result by the drug susceptibility testings, and 9 clinical isolates which showed the fluctuating results on repeated drug susceptibility testings. After we conducted 3 drug susceptibility testings and the line probe assay, we have examined the sequence analysis for confirming mutations in the *rpoB* gene.

[Results] All strains were determined rifampicin-susceptible or intermediate by the drug susceptibility testings with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) which ranged from 0.25 to 4 $\mu\text{g/ml}$ by BrothMIC MTB-1, whereas these isolates indicated rifampicin-resistance by the line probe assay and

revealed mutations in the hot-spot region (69 bp) by the sequence analysis.

[Conclusion] We verified that the line probe assay might be useful for the correct determination of drug susceptibility, especially about the low-level rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains.

Key words: *M. tuberculosis*, Drug susceptibility testing, Resistance-conferring mutation, *rpoB*, MIC

¹Clinical Research Center, ²Department of Clinical Laboratory, ³Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

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)

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

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

要旨:〔目的〕遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 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, アクユプローブ法と 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ケンス解析を行った。〔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 法とシーケ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クユプローブ 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ケ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 シーケンス解析

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^{1)~3)}。

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^{1)~3)}。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⁴⁾。

アクユプローブ法は検体の 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⁵⁾。結核菌群と *M. avium* complex (MAC), *M. kansasii*, *M. gordonae* の 4 種類のキットがあり, アクユプローブ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⁶⁾や, 結核菌群 87.2%, MAC 78.6%, *M. kansasii* 91.7%, *M. gordonae* 85.9% とする報告⁶⁾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¹臨床研究センター, ²研究検査科, ³内科, ⁴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の比率をバイオチン-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塩基配列の同一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⁹⁾。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⁸⁾⁹⁾。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 のプローブがあることから抗酸菌の確定が可能である¹⁰⁾。

INNO-LiPA法の検討はこれまでにいくつか報告はあるが^{10)~13)}、現時点でわが国における検討報告はなされてない。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 μ lに懸濁した。56℃、15~30分処理後10秒間 vortex し、正確に100℃、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ブ (MYC genus) および菌種鑑別のための22本のITS遺伝子プローブが固相化されたストリップ状のキットである。プローブは12菌種のプローブに加えて、3種類の subtype が鑑別可能な *M. kansasii* プローブ、4種類の MAIS complex プローブ、*M. abscessus* を含んだ3種類の *M. chelonae* complex プローブが配置されている。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. goodii</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

で、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 シーケ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¹⁰⁾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ブ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 株のうちアキュブローブ

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。一方アキュブローブ 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ブローブ 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. goodii* 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 Amplifier system	16S rRNA gene			Identity (%)	Identity (%)
		AccuProbe	DDH	INNO-LiPA		
9 isolates	Negative	Negative	Unidentified**	MYC genus	429/429 (100)	
2	Negative	Negative	Unidentified**	<i>M. kansasii</i> 3	441/441 (100)	<i>M. kansasii</i> , MkaF
19	Negative	Negative	Unidentified**	<i>M. kansasii</i> 3	440/440 (100)	<i>M. kansasii</i> , MkaC
14	Negative	NT	Unidentified**	<i>M. gordonae</i>	440/440 (100)	<i>M. gordonae</i> , MgoC
22	Negative	NT	Unidentified**	MYC genus	430/430 (100)	
7	Negative	NT	Unidentified***	<i>M. abscessus</i>	428/428 (100)	<i>M. abscessus</i> DSM44196
6	Negative	NT	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	428/428 (100)	<i>M. chelonae</i> Mche B
5	Negative	NT	<i>M. fortuitum</i>	MYC genus	428/428 (100)	
23	<i>M. intracellulare</i>	MAC*	NT	MAIS	442/442 (100)	
13	Negative	NT	Unidentified***	<i>M. fortuitum</i>	423/428 (98.8)	
18	Negative	NT	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. intracellulare</i> 2	439/439 (100)	

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

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

シークエ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。

小川培地上で遅発育菌と観察され、コバスマイクロバクテリア法, アクユプロープ法, 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クエンス解析で *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種類の亜型プローブを使って亜型判定を可能としている。菌株23はアクユプロープMAC法でMAC, コバスマイクロバクテリア法で *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亜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¹⁾。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、シークエンス解析で相同性を確認することが重要となってくる。

シークエ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はアクユプロープ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。遅発育菌である同菌株は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プMAC法は陰性であったと報告している¹⁰⁾。一方Lebrunらはアクユプロ-

ブ MAC 法陰性、INNO-LiPA 法では MAIS のみにバンドに発色があり、シーケンス解析で *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¹³⁾。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 5 bp 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¹⁵⁾、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 の可能性があると報告している¹⁶⁾。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*、シーケンス解析で *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¹²⁾。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¹⁷⁾、迅速発育菌の詳細な亜型解析にはシーケ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、シーケンス解析では *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¹⁸⁾。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 遺伝子のシーケンス解析から *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 時間の照射のところで 6~24 時間の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사가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*¹⁹⁾ 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*²⁰⁾ 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*¹⁴⁾ が今回シーケンス解析により 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²¹⁾²²⁾と合わせて総合的に判断するべきである。

文 献

- 1) Ichihara 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.
- 2) 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.
- 3) Wobeser WL, Kraiden M, Conly J, et al.: Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 134-139.
- 4) 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.
- 5) Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, et al.: Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2476-2478.
- 6) Reisner BS, Gatson AM, Woods GL: Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium goodii* directly from BACTEC TB broth cultures. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 2995-2998.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 齊藤 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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 mucrogenicum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45: 262-267.
- 16) 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.
- 17) Richter E, Niemann S, Rüsche-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.
- 18) Tortoli E: Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16: 319-354.
- 19) 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.
- 20) The Research Committee of the British Thoracic Society: Pulmonary disease caused by *M. malmoense* in HIV negative patients: 5-yr follow-up of patients receiving standardised treatment. *Eur Respir J.* 2003; 21: 478-482.
- 21) 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.
- 22) 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

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ⁴Tomotada IWAMOTO,
²Motohisa TOMITA, ¹Masaji OKADA, and ³Mitsunori 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

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

コッホ現象への対応

平成19年度

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

「結核菌に関する研究」の分担研究

「小児結核の予防方策及び診療システムの確立」班