

differences in the RGV were used as equivalent to those of the electron density. In order to confirm the position of the PM and OM in the plot profile (Figure S1B), a line of 150 nm, which was perpendicular to the CE, was drawn on each RGV measurement, where the center dot was set on the OM (Figure S1A). The differences of RGV between the PM and the median position of the CE (i.e., the midpoint between the PM and OM) along with the 150 nm line were calculated and compared among the 3 strains. At least 3 different positions in each bacterial cell were determined. For the measurement of the RGV of the bacterial cell, squares (250 nm on a side) were set on the cell and background; then, the RGV of the cell area was calculated by subtracting the background RGV (Figure S1C). The size measurements were also performed using the plot profile option of ImageJ (Figure S1D).

2.5. Statistical analysis

Averages and standard deviations were calculated, and the randomization test for 2 independent samples was used to calculate statistical significance according to the formula²³:

$$t = \frac{x - y}{\sqrt{\left\{ \sum_{i=1}^n (x_i - x)^2 + \sum_{j=1}^m (y_j - y)^2 \right\} / (n + m - 2) / \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}}}$$

where x and y are the average values, and n and m are the number of the examined cell and the subject of one group and another, respectively. Finally, the p value was determined from the obtained t value using a t distribution table.

3. Results

3.1. Confirmation of loss of acid-fastness in $\Delta kasB$ strain

We first confirmed the loss of acid-fastness in the $\Delta kasB$ strain by conventional Ziehl-Neelsen staining using basic fuchsin as the primary stain. As shown in Figure 1b, the $\Delta kasB$ strain completely lost acid-fastness and was counterstained with methylene blue, while wild-type (Figure 1a) and complement strains (Figure 1c) were resistant to destaining and retained the primary stain.

3.2. Comparison of cell wall thickness among three strains in RFS and CEM samples

We initially compared electron micrographs obtained by the RFS method of the $\Delta kasB$ strain with the wild-type and complement strains, focusing on the difference in CE thickness, because the

$\Delta kasB$ strain should have a thinner CE than the other strains due to its envisaged shortened MA composition. As shown in Figure 2a–f, examination of RFS samples revealed that all 3 strains had a similar CE structure, including the PM, periplasmic space, and OM. As the thickness of the CE varies from position to position in the same cell with this preparation, this comparison could not identify any significant differences in CE thickness among the 3 strains (Table 1).

We then examined glutaraldehyde-fixed bacterial cells with ice-embedded whole mount CEM. Electron micrographs obtained by CEM are shown in Figure 3a–f. Similar to the results obtained from the RFS preparation, there were no apparent differences in CE structure or thickness among the 3 strains (wild-type: 43.35 ± 6.13 nm; $\Delta kasB$: 45.98 ± 11.32 nm; complement: 40.71 ± 6.3 nm; Figure 4a).

3.3. Electron density of the cell wall significantly decreased in $\Delta kasB$ mutant strain compared to wild and complement strain

As mentioned above, we found that loss of acid-fastness did not correlate with the thickness of the CE, as determined by RFS and CEM. However, there should be logical reason, which discriminates between positive and negative property in Ziehl-Neelsen staining. Then, we compared the electron density in the CE, where MA plays an important structural role. As shown in Figure S1A and S1B, in CE area, plasma membranes had the highest electron density, then, the density decreased gradually toward the region just beneath the outer membrane and increase again at the outer membrane. We calculated and compared RGV, which were measured by ImageJ software and equal to the difference of the electron density between plasma membrane and median position of CE as described in Materials and methods (Figure S1A and S1B), among the three strains. Using the plot profile analysis in the analyze menu of ImageJ, plot profiles were obtained, then, the difference of RGVs between plasma membrane and the midpoint of the cell wall were calculated. There were significant differences in the RGVs between the $\Delta kasB$ and wild-type strains (567.1 ± 372.7 vs. 301.4 ± 262.1 , respectively, $p < 0.02$; Figure 4b) and between the $\Delta kasB$ and complement strains (567.1 ± 372.7 vs. 235.2 ± 174.9 , respectively, $p < 0.001$; Figure 4b), but not between the wild-type and complement strains (301.4 ± 262.1 vs. 235.2 ± 174.9 , $p > 0.2$; Figure 4b).

Furthermore, we compared the whole bacterial cell electron density, which were measured by ImageJ and calculated as RGVs. However, there were no significant differences among three strains (wild; 1928.7 ± 685.6 RGV, $\Delta kasB$; 1954.2 ± 783.0 RGV, complement; 1738.3 ± 626.5 RGV, Figure S2). Finally, the total shape

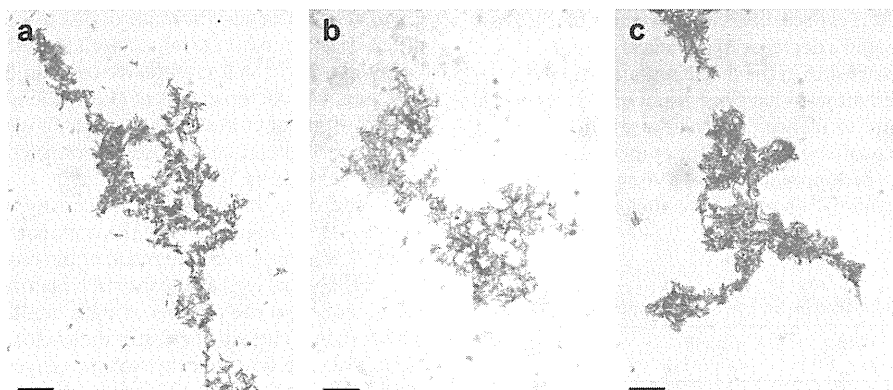


Figure 1. CDC1550 wild-type (a), $\Delta kasB$ (b), and $kasB$ complement (c) strains were stained with the Ziehl-Neelsen method. The $\Delta kasB$ mutant (b) was shown to completely lose its acid-fastness. Bar indicates 10 μ m.

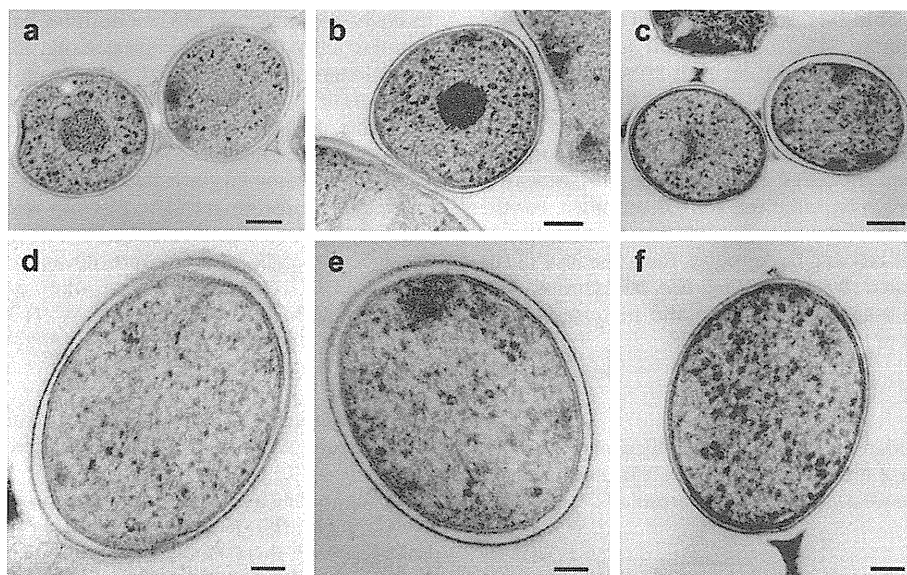


Figure 2. TEM images of RFS-processed CDC1551 wild-type (a and d), $\Delta kasB$ mutant (b and e), and $kasB$ complement (c and f) strains. a, b, and c were taken at 60,000 \times magnification, while d, e, and f were taken at 100,000 \times magnification. Bar indicates 100 nm (a–c), 50 nm (d–f).

properties of the cells were determined and compared with ImageJ; interestingly, there were significant differences in the width, the length and the aspect ratio among three strains, where the complement strain had a significantly thinner width than the wild-type and $\Delta kasB$ strains (complement; $0.51 \pm 0.03 \mu\text{m}$ vs. wild; $0.54 \pm 0.04 \mu\text{m}$, $p < 0.02$, and vs. $\Delta kasB$; $0.54 \pm 0.03 \mu\text{m}$, $p < 0.005$), was significantly longer than the $\Delta kasB$ strain (complement; $3.09 \pm 0.54 \mu\text{m}$ vs. $\Delta kasB$; $2.66 \pm 0.48 \mu\text{m}$, $p < 0.02$), and showed a significantly higher aspect ratio than the $\Delta kasB$ strain (complement; 6.15 ± 1.25 vs. $\Delta kasB$; 4.97 ± 0.85 , $p < 0.05$, respectively, Figure S3).

4. Discussion

The mechanisms underlying acid-fastness and Ziehl-Neelsen staining were extensively studied in the 1960s by Murohashi et al.^{32,33} and Barksdale et al.³⁴; however, they have still not been elucidated. Recently, Bhatt et al. constructed the $\Delta kasB$ mutant strain of *M. tuberculosis* CDC1551, and revealed that the mutant lost its acid-fastness and had attenuated pathogenicity in mice. They also examined total MA levels by thin layer chromatography and the relative abundance of the 3 classes of MA methyl esters in the $\Delta kasB$ mutant. They demonstrated a decrease in the levels of keto-MA and an increase in the levels of α -MA in the $\Delta kasB$ mutant.⁵ On the other hand, MA cyclopropane synthases have been shown to play roles in cording, persistence, and virulence.⁹ Furthermore, Barkana et al. demonstrated that dioctylamine, an inhibitor of methyltransferase, which plays a role in the cyclopropanation of MA, caused the loss of acid-fastness.³⁵ Furthermore, Deb et al. have shown that multiple

stress factors led to the loss of acid-fastness in tubercle bacilli with the accumulation of triacylglycerol and wax ester.⁸

We initially thought that there would be significant differences in CE thickness among the 3 strains because it is believed that KasB may contribute to the final elongation of the MA chain; however, we observed no such differences. On the contrary, there were significant differences in electron density, as determined by CEM, among the 3 strains; the electron density in the area of the CE was significantly reduced in the $\Delta kasB$ mutants, with normal thickness between the PM and OM, compared to the wild-type and $kasB$ complement strains. Therefore, in the $\Delta kasB$ mutant strain, it is suggested that the full-length MA formed by the intact KasA may result in the apparently intact CE thickness,⁵ while the mixture of full-length and truncated MA chains and less density of total MA molecule bundles due to loss of KasB function may cause the reduced electron density in the CE area located between the PM and OM, which might cause the loss of acid-fastness in the $\Delta kasB$ mutant.

Although some authors examined the ultrastructure of mycobacterial CE with cryo-electron microscopy of vitreous section (CEMOVIS) in the auxotroph mutants of tubercle bacilli, precise image analyses on CEMOVIS, such as measurement of thickness in CE, may be influenced because of distortion by sectioning and the differences of measured value raised from the position of sectioned bacterial cell.^{12,21,22} Therefore, we compared CE ultrastructure with whole mount bacterial cells of glutaraldehyde-fixed wild type and mutant strain of virulent tubercle bacilli without distortion, where measurements can be precisely performed in CE throughout the surface of the cells.

In addition, to correlate MA density with the loss of acid-fastness, it is suggested that the attenuated pathogenicity of the $\Delta kasB$ mutant might be the result of the reduced ability to increase host response as well as the increased permeability of its CE due to the reduction in the number of tight bundles of MA, which facilitates the direct attack of effector molecules from host cells, such as nitric oxide or lysosome hydrolytic enzymes, and also results in their inability to resist the acidic environment of the host cell caused by the phagosomal membrane H^+ ATP pump.^{5,6,10,11,35,36}

Several models for mycobacterial CE have been proposed. In some models, MA chains were located in and proposed as the major

Table 1

CE thickness data obtained from rapid freeze-substitution samples (nm).

| | Wild (n = 10) | $\Delta kasB$ (n = 14) | Complement (n = 12) |
|-----------------|------------------|---------------------------|------------------------|
| Plasma membrane | 6.3 ± 0.8 | 8.1 ± 1.8 | 7.0 ± 1.7 |
| Cell wall | 9.8 ± 3.0 | 9.7 ± 3.8 | 7.0 ± 3.8 |

Data were measured and calculated using ImageJ software from electron micrographs and expressed as average \pm SD.

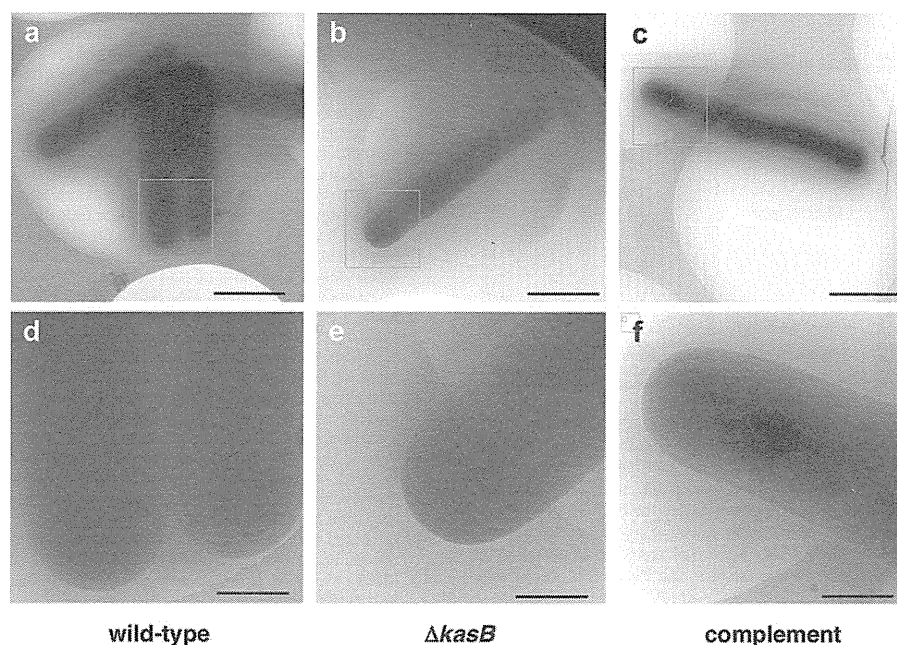


Figure 3. CEM of CDC1551 wild-type (a and d), $\Delta kasB$ mutant (b and e), and *kasB* complement (c and f) strains are shown. As described in the materials and methods in the supporting online material, the micrographs were taken at 10,000 \times magnification. The areas indicated by the squares in a, b, and c were enlarged with ImageJ and are shown in d, e, and f, respectively. Bar indicates 1 μ m (a–c), and 250 nm (d–f).

component of OM.^{12,21,22} In other models, authors have proposed schemata for mycobacterial CE, where MA chains were located in periplasmic space, between PM and outer layer (capsule) or outside of PM without OM.^{37–39}

In the former models, Zuber et al. compared thickness of mycobacterial CE components with those of *Corynebacterium glutamicum* in detail although there were few discussion with those of Gram-negative bacteria with OM, but not MA in their CE.²² In the report, CEM data revealed that the thickness of mycobacterial OMs is equivalent or similar to that of Gram-negative bacteria, for example, the average thickness of OM in *M. smegmatis* and *Escherichia coli* was 7.1 ± 0.6 nm and 6.9 ± 1.0 nm, respectively, without significant difference between them.²² On the other hand, Sani et al. proposed different model, in which MA chains were located in 'mycomembrane' layer with free intercalating glycolipids.¹² However, there was only a little discussion about difference between mycomembrane and OM of Gram-negative bacteria. Our RFS data (Figure 2) correlate well to the report by Yamaguchi et al.,²⁴ in which several Gram-negative bacilli as well as Gram-positive bacteria were examined after processed by RFS procedure. Therefore, because the OMs of both Gram-negative bacteria and mycobacteria have quite similar structural properties, at least in electron microscopy, it is not rational that OMs of Gram-negative bacteria are constituted with non-MA lipid bilayer and, on the other hand, those of mycobacteria are composed of mycobacteria-specific extremely long MA chains, defects of which may be responsible for the loss of acid-fastness.

Here, we propose a novel model for the mycobacterial CE in which the OM is composed of a lipid bilayer, not of MA, similar to those of the PM and OM observed in Gram-negative bacteria with electron microscope (Figure 5). In this model, because MA chains are embedded in the periplasmic layer, not in OM, non-acid-fastness observed in $\Delta kasB$ mutant can be explained from our present data. This novel model of mycobacterial CE structure is similar to those of the latter previous models above^{37–39} and supports them. However, these previous models have not described about OM in detail, it seems that it is because the authors did not

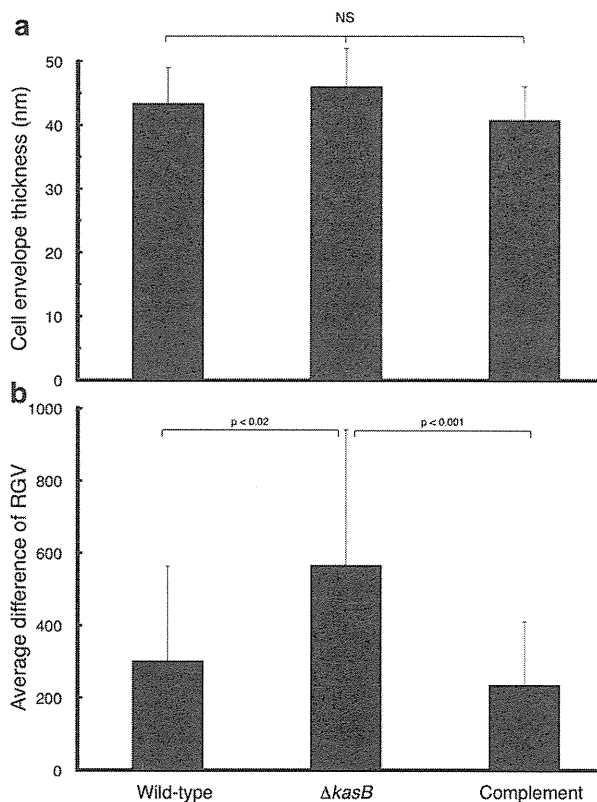


Figure 4. (a) Comparison of CE thickness of the cells among CDC1551 wild-type ($n = 18$), $\Delta kasB$ mutant ($n = 19$), and *kasB* complement ($n = 28$) strains. NS: not significant. (b) Comparison of RGVs of the cells among CDC1551 wild-type ($n = 19$), $\Delta kasB$ mutant ($n = 17$), and $\Delta kasB$ mutant complement ($n = 28$) strains. As described in the materials and methods in the supporting online material, the data are expressed as the average difference of the RGVs between the PM and the midpoint of the cell wall and analyzed with ImageJ. Higher RGVs indicate the more reduced electron density.

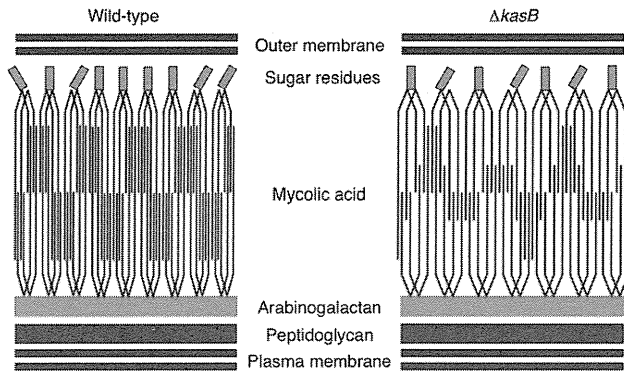


Figure 5. Schema of proposed CE structure illustrating the normal (wild-type) and shortened and thin-dense ($\Delta kasB$) MA-containing cell wall and OM. As KasB activity was lost in the $\Delta kasB$ mutant, while KasA activity was retained, it is assumed that the mutant can synthesize full-length meromycolate, although at a reduced level compared to wild-type strain; however, it cannot synthesize the tight MA bundles in the cell wall. The reduced bundle formation and the consequent reduced MA density may result in the loss of acid-fastness and attenuated pathogenicity, independent of normal OM formation, which is similar or equivalent to the PM or OM observed in Gram-negative bacteria.

examine bacilli with CEM and could not obtain detail data about OMs. Then, there were less discussion about comparison of OMs between mycobacteria and Gram-negative bacteria.

In conclusion, our results are the first evidences obtained from electron microscopical observation of tubercle bacilli which lost acid-fastness. These data strongly suggested that $\Delta kasB$ mutant might have less density of MA, embedded in periplasmic space, with normal thickness in the CE, which results in loss of acid-fastness and, therefore, that the acid-fastness of wild-type strains might be kept by the rigid cell wall structure constructed by closely bundled of MAs and show highly virulent phenotype in *M. tuberculosis*. In future, investigation combined with both biochemical and ultrastructural approaches will provide further evidences which discover the differences between intact and MA synthesis related genes disrupted mutant, and lead the detailed understanding of the mechanisms of the acid-fastness, persistence, drug resistance and ability to resist against killing activity by host cells.

Acknowledgments

HY thanks Kazuyoshi Murata (NIPS) for helping with Cryo-TEM data analyses.

Appendix. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.tube.2012.02.006.

Funding: This work was supported, in part, by the Cooperative Study Program of National Institute for Physiological Sciences (2008 and 2009). AB is funded by a Career Development Award from the Medical Research Council (UK).

Competing interests: None.

Ethical approval: Not required.

References

- World Health Organization Global tuberculosis control 2011. <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html>.
- Yamada H, Mitarai S, Aguiman L, Matsumoto H, Fujiki A. Preparation of mycobacteria-containing artificial sputum for TB panel testing and microscopy of sputum smears. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;**10**:899–905.
- Yamada H, Mitarai S, Fujiki A. Stability for long-term storage and reproducibility of positivity in the panel test slide prepared with the polyacrylamide-based artificial sputum. *Kekkaku* 2008;**83**:65–71.
- Yamada H, Mitarai S, Wahyunitisari MR, Mertaniasih NM, Sugamoto T, Chikamatsu K, Aono A, Matsumoto H, Fujiki A. Improved polyacrylamide-based artificial sputum with formalin-fixed tubercle bacilli for training of tuberculosis microscopists. *J Clin Microbiol* 2011;**49**:3604–9.
- Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurcha SS, Kremer L, Chen B, Chan J, Porcelli SA, Kobayashi K, Besra GS, Jacobs Jr WR. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:5157–62.
- Bhatt A, Molle V, Besra GS, Jacobs Jr WR, Kremer L. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol Microbiol* 2007;**64**:1442–54.
- Marrakchi H, Bardou F, Lan elle MA, Daff  M. A comprehensive overview of mycolic acid structure and biosynthesis. In: Daff  M, Reyrat JM, editors. *The mycobacterial cell envelope*. Washington, DC: ASM Press; 2008. p. 41–62.
- Deb C, Lee C-M, Dubey VS, Daniel J, Abomoelak B, Sirakova TD, Pawar S, Rogers L, Kolattukudy PE. A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *PLoS ONE* 2009;**4**:e6077.
- Glickman MS, Jacobs Jr WR. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* 2001;**104**:477–85.
- Meena LS, Rajni. Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS J* 2010;**277**:2416–27.
- Miller JL, Velmurugan K, Cowan MJ, Briken V. The Type I NADH Dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF- α -mediated host cell apoptosis. *PLoS Pathog* 2010;**6**:e1000864.
- Sani M, Houben ENG, Geurtsen J, Pierson J, de Punder K, van Zon M, Wever B, Piersma SR, Jiménez CR, Daff  M, Appelmelk BJ, Bitter W, van der Wel N, Peters PJ. Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS Pathog* 2010;**6**:e1000794.
- Stokes RW, Norris-Jones R, Brooks DE, Beveridge TJ, Doxsee D, Thorson LM. The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun* 2004;**72**:5676–86.
- Kurth DG, Gago GM, de la Iglesia A, Lyonnet BB, Lin T-W, Morbidoni HR, Tsai SC, Gramajo H. ACCase 6 is the essential acetyl-CoA carboxylase involved in fatty acid and mycolic acid biosynthesis in mycobacteria. *Microbiol* 2009;**155**:2664–75.
- Misra A, Sharma SK, Surolia N, Surolia A. Self-acylation properties of type II fatty acid biosynthesis acyl carrier protein. *Chemist Biol* 2007;**14**:775–83.
- Sacco E, Slama N, B ckbro K, Parish T, Laval F, Daff  M, Eynard N, Qu emard A. Revisiting the assignment of rv0241c to fatty acid synthase type II of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 2010;**192**:4037–44.
- Veyron-Churlet R, Molle V, Taylor RC, Brown AK, Besra GS, Zanella-Cl on I, F tterer K, Kremer L. The *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III activity is inhibited by phosphorylation on a single threonine residue. *J Biol Chem* 2009;**284**:6414–24.
- Beveridge TJ, Davies JA. Cellular responses of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to the gram stain. *J Bacteriol* 1983;**156**:846–58.
- Beveridge TJ. Mechanism of gram variability in select bacteria. *J Bacteriol* 1990;**172**:1609–20.
- Davies JA, Anderson GK, Beveridge TJ, Clark HC. Chemical mechanism of the gram stain and synthesis of a new electron-opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain. *J Bacteriol* 1983;**156**:837–45.
- Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:3963–7.
- Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daff  M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* 2008;**190**:5672–80.
- Yamada H, Mitarai S, Chikamatsu K, Mizuno K, Yamaguchi M. Novel freeze-substitution electron microscopy provides new aspects of virulent *Mycobacterium tuberculosis* with visualization of the outer membrane and satisfying biosafety requirements. *J Microbiol Methods* 2010;**80**:14–8.
- Yamaguchi K, Suzuki K, Tanaka K. Examination of electron stains as a substitute for uranyl acetate for the ultrathin sections of bacterial cells. *J Electron Microscop* 2010;**9**:113–8.
- Yamaguchi M, Biswas SK, Ohkusu M, Takeo K. Dynamics of the spindle pole body of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* examined by freeze-substitution electron microscopy. *FEMS Microbiol Lett* 2009;**296**:257–65.
- Yamaguchi M, Okada H, Namiki Y. Smart specimen preparation for freeze substitution and serial ultrathin sectioning of yeast cells. *J Electron Microscop* 2009;**8**:261–6.
- Danev R, Glaeser RM, Nagayama K. Practical factors affecting the performance of a thin-film phase plate for transmission electron microscopy. *Ultra-microscopy* 2009;**109**:312–25.

28. Shigematsu H, Sokabe T, Danev R, Tominaga M, Nagayama KA. 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by Zernike phase-contrast cryoelectron microscopy. *J Biol Chem* 2010;**285**:11210–8.
29. Nitta K, Nagayama K, Danev R, Kaneko Y. Visualization of BrdU-labelled DNA in cyanobacterial cells by Hilbert differential contrast transmission electron microscopy. *J Microsc* 2009;**234**:118–23.
30. Yui H, Minamikawa H, Danev R, Nagayama K, Kamiya S, Shimizu T. Growth process and molecular packing of a self-assembled lipid nanotube: phase-contrast transmission electron microscopy and XRD analyses. *Langmuir* 2008;**24**:709–13.
31. Rasband WS, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>.
32. Murohashi T, Yoshida K. Biology of the mycobacterioses. Biological significance of acid-fastness of mycobacteria. *Ann NY Acad Sci* 1968;**154**:58–67.
33. Murohashi T, Kondo E, Yoshida K. The role of lipids in acid-fastness of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1969;**99**:794–8.
34. Barksdale L, Kim KS. Mycobacterium. *Bacteriol Rev* 1977;**41**:217–372.
35. Barkana D, Liuc Z, Sacchettinic JC, Glickman MS. Mycolic acid cyclopropanation is essential for viability, drug resistance and cell wall integrity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* 2009;**16**:499–509.
36. Ramón-García S, Martín C, Thompson CJ, Ainsa JA. Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;**53**:3675–82.
37. Daffé M. The global architecture of the mycobacterial cell envelope. In: Daffé M, Reyat JM, editors. *The mycobacterial cell envelope*. Washington, DC: ASM Press; 2008. p. 3–11.
38. Crick D, Mahapatra S, Brennan PJ. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* 2001;**11**:107R–18R.
39. Crick D, Brennan PJ. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Daffé M, Reyat JM, editors. *The mycobacterial cell envelope*. Washington, DC: ASM Press; 2008. p. 25–40.

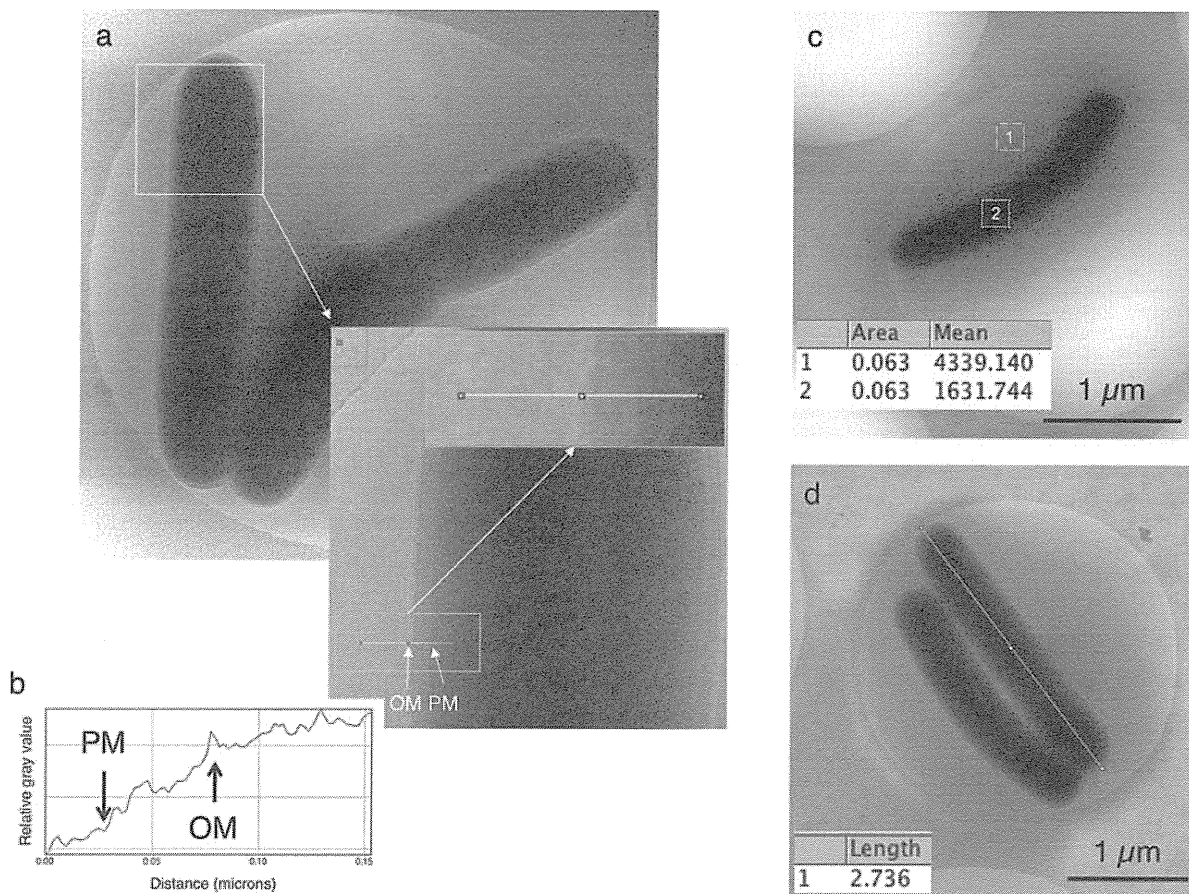


Figure S1. Illustration of the methods used to obtain the plot profile data. The area indicated by the yellow square in the top image was enlarged with ImageJ and shown in the middle panel. The inset is a further enlargement of the area of measurement, where the 150 nm line perpendicular to the CE is drawn (A). Plot profile data were obtained along with the line. (B) The chart shows an example of a plot profile that indicates a representative RGV of the CE. (C) and (D) illustrate the measurement of the RGV of the bacterial cell and the size of the cell, respectively. For the measurement of the RGV of the bacterial cell, squares (250 nm on a side) were set on the cell and background; then, the RGV of the cell area (2) was calculated by subtracting the background RGV (1)

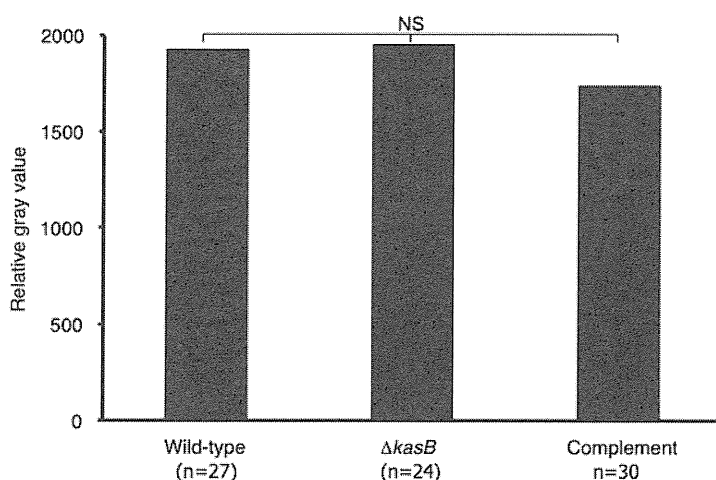


Figure S2. Comparison of the electron density of whole bacterial cells determined from CEM and measured with ImageJ software among the wild-type ($n = 27$), $\Delta kasB$ mutant ($n = 24$), and complement ($n = 30$) strains. There were no significant (NS) differences in the RGVs for the cells among the 3 strains

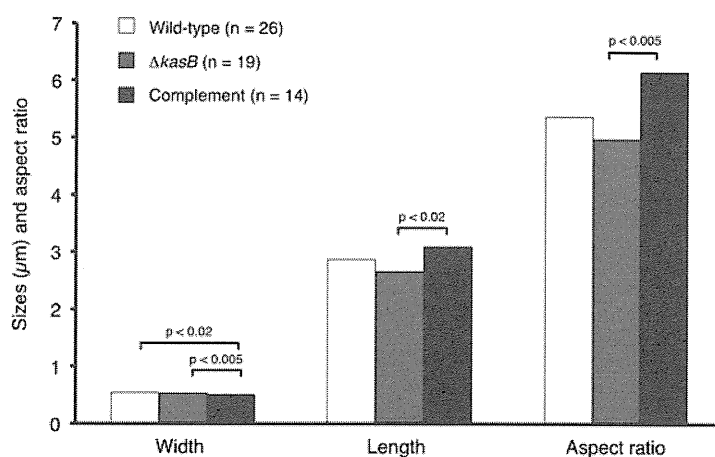


Figure S3. Comparison of cell sizes determined from CEM and the calculated aspect ratio among the 3 strains. The complement strain had the narrowest width, longest length, and highest aspect ratio. There were significant differences in width between the complement strain and the wild-type ($p < 0.02$) and $\Delta kasB$ mutant ($p < 0.005$) strains. There were also significant differences in the length and aspect ratio between the $\Delta kasB$ mutant and complement strains ($p < 0.02$, $p < 0.005$, respectively).

GenoType® MTBDR_{sl}による結核菌の fluoroquinolone, aminoglycoside および ethambutol 感受性検査に関する精度評価

近松 絹代 青野 昭男 山田 博之 御手洗 聡

要旨：〔目的〕 Line Probe Assay (LPA) の一種である GenoType® MTBDR_{sl} (Hain Lifescience, Germany) の, fluoroquinolone (FQ), aminoglycoside (AG) および ethambutol (EB) の耐性検出能を評価した。〔方法〕 臨床分離超多剤耐性結核菌 (XDR-TB) 13 株, 多剤耐性結核菌 (非超多剤) (MDR-TB) 29 株, 全薬剤感受性結核菌 4 株および薬剤感受性検査外部精度保証プログラムで使用した結核菌 30 株合計 76 株を対象とし GenoType® MTBDR_{sl} による FQ, AG および EB の耐性検査精度を検討した。また, *gyrA*, *rrs* および *embB* をダイレクトシーケンスし, 変異を解析した。1% 小川培地による比率法感受性検査を評価基準とした。〔結果〕 GenoType® MTBDR_{sl} による FQ, kanamycin (KM), amikacin (AMK), capreomycin (CPM) および EB の耐性検出感度は, それぞれ 82.4%, 57.1%, 100%, 83.3% および 55.8% であった。同様に, 特異度は FQ が 97.6%, KM, AMK, CPM, および EB がそれぞれ 100%, 一致率はそれぞれ 90.8%, 80.3%, 100%, 93.3% および 75.0% であった。国内で分離された FQ 耐性結核菌 20 株のうち GenoType® MTBDR_{sl} で耐性を検出したものは MUT3A (D94A) が 7 株 (35.0%), MUT3C (D94G) が 6 株 (30.0%), MUT1 (A90V) が 2 株 (10.0%), MUT1 と MUT3C 両方とも陽性が 1 株 (5.0%) であった。同様に KM 耐性結核菌 18 株のうち GenoType® MTBDR_{sl} で耐性を検出したものは MUT1 (A1401G) が 10 株 (55.6%) であった。EB 耐性結核菌 34 株のうち GenoType® MTBDR_{sl} で耐性を検出したものは MUT1B (M306V) が 9 株 (26.5%), MUT1A (M306I) が 2 株 (5.9%), 野生型プローブ WT1 (codon 306) のバンドの消失のみによるものが 8 株 (23.5%) であった。*embB* のシーケンスは GenoType® MTBDR_{sl} で検出した 19 株以外に D328Y を 2 株, D354A, G406D, G406S の変異をそれぞれ 1 株ずつ検出した。日本国内分離株に関する GenoType® MTBDR_{sl} の遺伝子変異検出感度は, FQ, KM, AMK, CPM ではシーケンスとほぼ同等であり, EB ではシーケンスよりもやや劣るものの有意差はなかった。〔考察〕 GenoType® MTBDR_{sl} は国内分離については KM および EB 耐性の感度が劣るものの, FQ では約 80% の耐性検出感度が確認された。GenoType® MTBDR_{sl} は操作が簡便で, 検査時間も約 6 時間と短いため, 超多剤耐性結核の早期診断に有用であると考えられた。

キーワード： Line Probe Assay, Fluoroquinolone, Aminoglycoside, Ethambutol, *gyrA*, *rrs*, *embB*, 多剤耐性結核菌, 超多剤耐性結核菌

はじめに

多剤耐性結核菌 (Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: MDR-TB) および超多剤耐性結核菌 (Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: XDR-TB)

は不適切な治療によって生じることから, 治療開始時には適切な検体からの薬剤感受性検査が必要である。国内の全国調査で MDR-TB 中 XDR-TB の割合は 28.3~28.6% であり¹⁾²⁾, 二次薬についても迅速な薬剤感受性検査は治療, 感染管理上重要である。しかし薬剤感受性検査の結

果を得るには菌の発育を認めてから液体培地を使用する方法で4~12日, 1%小川培地を使用する標準法は4~6週間かかる。そのため, 迅速診断法として薬剤耐性に関連する遺伝子変異を検出する方法が用いられている。しかしシーケンス法は一般検査室では実施が難しいため簡便で迅速な Solid Phase Reverse Hybridization Assay (Line Probe Assay: LPA) がよく使用されている。現在日本で唯一保険適用のあるLPAであるジェノスカラー・RifTB (ニプロ) は *rpoB* 変異が集中している Rifampicin Resistance Determining Region (RRDR) 領域の変異から rifampicin (RFP) 耐性を判定する。また, 世界的に多く利用されているLPAである GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience, Germany) は, *rpoB*, *katG* および *inhA* promoter の変異から RFP と isoniazid (INH) の耐性を同時に検出する。しかし, 二次抗結核薬と ethambutol (EB) の薬剤感受性検査のためのLPAはこれまでなかった。GenoType® MTBDRsl (Hain Lifescience, Germany) は fluoroquinolone (FQ), aminoglycoside (AG) および EB 耐性に関する *gyrA*, *rrs* および *embB* 遺伝子変異を検出するLPAである。今回, 標準的薬剤感受性検査と GenoType® MTBDRsl 法, *gyrA/rrs/embB* の DNA 直接シーケンス法による耐性菌検出法を比較し, GenoType® MTBDRsl による FQ, AG および EB に関する耐性の診断精度を評価した。

対象と方法

〔結核菌株〕

2002年度に実施された結核療法研究協議会による耐性結核菌全国調査で同定された XDR-TB 13株, MDR-TB 29株, 2010年に結核予防会複十字病院で分離された抗結核薬全剤感受性である結核菌4株および Supra-national Reference Laboratory Network (SRLN 29施設) で実施された薬剤感受性検査外部精度評価プログラムで使用した結核菌30株を対象とした。

〔薬剤感受性検査〕

比率法による薬剤感受性検査は1%小川培地または Löwenstein-Jensen 培地を用いて, 結核菌検査指針2007に従って結核研究所にて2名で実施した。毎年パネルテストにより精度保証を行っている。国内で分離された結核菌は levofloxacin (LVFX), kanamycin (KM) および EB, 薬剤感受性検査外部精度評価プログラムで使用した結核菌は ofloxacin (OFLX), KM, amikacin (AMK), capreomycin (CPM) および EB について薬剤感受性検査を実施した。

〔GenoType® MTBDRsl〕

GenoType® MTBDRsl による判定は使用説明書に従って行った。GenoType® MTBDRsl は PCR にて増幅した各遺伝子をプローブが固相化されたストリップにハイブリ

ダイズさせた後, 酵素標識ストレプトアビジンを添加してビオチン-アビジン結合を行い洗浄後基質を添加し, 酵素反応により各遺伝子が結合し発色したプローブの位置から各遺伝子内の変異を検出する。まず, 対象結核菌 DNA を ISOPLANT (ニッポンジーン) で抽出し, ビオチン標識プライマーとヌクレオチドを含む PNM (Primer Nucleotide Mix) を使用して *gyrA*, *rrs*, *embB* 領域を multiplex PCR により増幅した。次にストリップ上に固相化された各プローブと PCR 産物を専用の振盪インキュベーター (TwinCubator: Hain Lifescience, Germany) を使って 45°C でハイブリダイズさせた。プローブは野生型と変異型があり, 野生型は *gyrA* 3種類, *rrs* 2種類, *embB* 1種類, 変異型は *gyrA* 6種類, *rrs* 2種類, *embB* は2種類で構成されている (Fig.)。ハイブリッドを形成したプローブについて発色反応を行い, ストリップ上の発色したバンドのパターンにより *gyrA*, *rrs*, *embB* の変異遺伝子型 (変異の有無) を判定した。

〔*gyrA*, *rrs* および *embB* の塩基配列解析〕

gyrA, *rrs* および *embB* の増幅およびダイレクトシーケンスについては Sekiguchi ら³⁾ のプライマー (Table 1) を使用した。すなわち *gyrA* は Fluoroquinolone Resistance Determining Region (QRDR) を含む 398 bp, *rrs* は 1329 bp を増幅後 nucleotide 1401, 1484 を含む領域, *embB* は 2748 bp を増幅後 codon 306 を含む領域をシーケンスした。DNA サンプル 1 μ l に EX Taq HS (タカラバイオ) 0.25 μ l, プライマー 10 pmol, buffer, dNTPs を加え全量 50 μ l とし, 98°C 10秒, 62°C 30秒, 72°C 1~2分のサイクルを30回繰り返した。PCR 産物を MagExtractor™ (東洋紡績) で精製後, BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および ABI 3137 automatic sequencer (Applied Biosystems) により, それぞれの領域についてダイレクトシーケンスを実施した。シーケンスの解析には GENETYX-WIN ver. 5.2 (GENETYX Co., Japan) を使用した。

結 果

〔FQ 感受性に関する GenoType® MTBDRsl とシーケンスの比較〕

FQ 感受性結核菌 42株のうち 41株 (97.6%) は GenoType® MTBDRsl で FQ 感受性と判定され, *gyrA* シーケンスでも変異は認められなかった。1株 (2.4%) は野生型プローブ WT1 (codon 85-90) が消失し FQ 耐性と判定された。また, *gyrA* では G88C の変異を認め GenoType® MTBDRsl の結果と一致した。FQ 耐性の 34株のうち 28株 (82.4%) は GenoType® MTBDRsl で FQ 耐性と判定され, *gyrA* に変異を認めたものは 28株 (82.4%) であった。被験 FQ 耐性結核菌のうち国内で分離された結核菌は 20

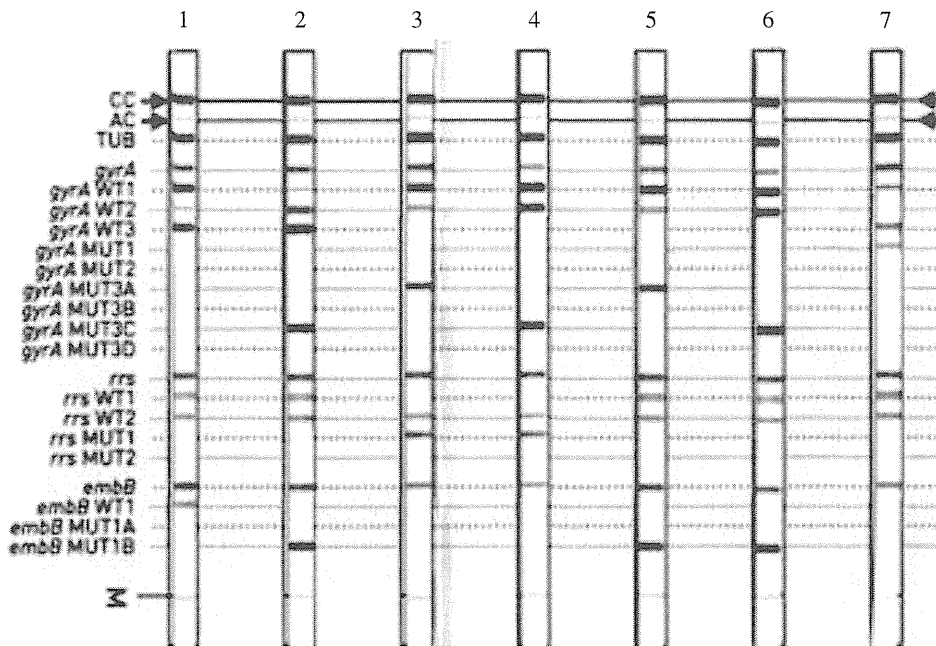


Fig. Hybridization patterns observed in GenoType® MTBDRsl assay. CC, conjugate control; AC, amplification control; TUB, *M.tuberculosis* complex-specific control; *gyrA*, control for *gyrA* amplification; *gyrA* WT1 to WT3, *gyrA* wild-type probes located in regions from codons 85 to 97; *gyrA* MUT1 to MUT3D, *gyrA* mutant probes testing mutations for codons A90V, S91P, D94A, D94N/Y, D94G, and D94H; *rrs*, control for *rrs* amplification; *rrs* WT1 and WT2, *rrs* wild-type probes located in regions for nucleotides 1401 and 1402 and nucleotide 1484; *rrs* MUT1 and MUT2, *rrs* mutant probes testing mutations for A1401G and G1484T; *embB*, amplification control for *embB*; *embB* WT1, *embB* wild-type probe located in codon 306; *embB* MUT1A and MUT1B, mutant probes testing mutations M306I and M306V. Typical hybridization patterns were obtained and are shown in the figure as follows: lane 1 = Representative patterns of a pan-susceptible strain; lane 2 = *gyrA* mixtures of strain, *gyrA* WT and *gyrA* MUT3C (D94G), *embB* MUT1B (M306V); lane 3 = *gyrA* MUT3A (D94A), *rrs* MUT1 (A90V), *embB* WT1 disappearing (306); lane 4 = *gyrA* MUT3C (D94G), *rrs* MUT1 (A1401G), *embB* WT1 disappearing (306); lane 5 = *gyrA* MUT3A (D94A), *embB* MUT1B (M306V); lane 6 = *gyrA* MUT3C (D94G), *embB* MUT1B (M306V); lane 7 = *gyrA* MUT1 (A90V), *embB* WT1 (306) disappearing.

Table 1 Oligonucleotide primers used in PCR and direct sequencing

| Target gene | Primer name | Nucleotide sequence (5'-3') |
|--------------------|----------------|------------------------------------|
| PCR primers | | |
| <i>gyrA</i> | PR15 (forward) | GAT GAC AGA CAC GAC GTT GC |
| | PR16 (reverse) | GGG CTT CGG TGT ACC TCA T |
| <i>rrs</i> | PR13 (forward) | AAA CCT CTT TCA CCA TCG AC |
| | PR14 (reverse) | GTA TCC ATT GAT GCT CGC AA |
| <i>embB</i> | PR7 (forward) | CCG ACC ACG CTG AAA CTG CTG GCG AT |
| | PR8 (reverse) | GCC TGG TGC ATA CCG AGC AGC ATA G |
| Sequencing primers | | |
| <i>gyrA</i> | PR15 | GAT GAC AGA CAC GAC GTT GC |
| <i>rrs</i> | PR31 | GTT CGG ATC GGG GTC TGC AA |
| <i>embB</i> | PR23 | ACG CTG AAA CTG CTG GCG AT |

株であり、内訳を Table 2 に示した。FQ 耐性検出率は 80.0% であった。

[AG 感受性に関する GenoType® MTBDRsl と *rrs* シークエンスの比較]

KM 感受性結核菌 41 株すべて GenoType® MTBDRsl は AG 感受性の判定であった。また、*rrs* にも変異は認め

られなかった。KM 耐性結核菌 35 株のうち GenoType® MTBDRsl の変異型プローブが陽性であった 20 株 (57.1%) が AG 耐性と判定された。AMK 感受性結核菌 20 株すべて GenoType® MTBDRsl は AG 感受性の判定であった。AMK 耐性結核菌 10 株 (100%) すべて GenoType® MTBDRsl は AG 耐性の判定であった。CPM 感受性結核菌 18 株す

Table 2 GenoType® MTBDRsl in comparison with DNA sequencing for the detection of LVFX, KM and EB resistances in clinical *M. tuberculosis* isolates in Japan

| DST | GenoType® MTBDRsl | | DNA sequencing | | No.(%) of isolates | | |
|-------------|-------------------|---------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------|----------|
| | Probes | Mutations analyzed | Mutations analyzed | | XDR-TB (13) | MDR-TB (29) | S-TB (4) |
| <i>gyrA</i> | LVFX ^r | MUT1 (+) | A90V | A90V | 1 (7.7) | 1 (3.4) | |
| | LVFX ^r | MUT1 (+), MUT3C (+), WT2 (+), WT3 (+) | A90V*, D94G* | G88A*, A90V*, D94G* | 1 (7.7) | | |
| | LVFX ^r | MUT3A (+) | D94A | D94A | 5 (38.5) | 2 (6.9) | |
| | LVFX ^r | MUT3C (+) | D94G | D94G | 3 (23.1) | 2 (6.9) | |
| | LVFX ^r | MUT3C (+), WT3 (+) | D94G* | G88A*, D94G* | 1 (7.7) | | |
| | LVFX ^r | None | | None | 2 (15.4) | 2 (6.9) | |
| | LVFX ^s | Missing WT1 | 85-90 | G88C | | 1 (3.4) | |
| | LVFX ^s | None | | None | | 21 (72.4) | 4 (100) |
| <i>rrs</i> | KM ^r | MUT1 (+) | A1401G | A1401G | 10 (76.9) | | |
| | KM ^r | None | | None | 3 (23.1) | 5 (17.2) | |
| | KM ^s | None | | None | | 24 (82.8) | 4 (100) |
| <i>embB</i> | EB ^r | MUT1A (+) | M306I (ATG→ATA) | M306I (ATG→ATA) | | 2 (6.9) | |
| | EB ^r | MUT1B (+) | M306V | M306V | 1 (7.7) | 7 (24.1) | |
| | EB ^r | MUT1B (+) | M306V | M306V, E378A | | 1 (3.4) | |
| | EB ^r | Missing WT1 | 306 | M306I (ATG→ATC) | 7 (53.8) | 1 (3.4) | |
| | EB ^r | None | | D328Y | 2 (15.4) | | |
| | EB ^r | None | | D354A | | 1 (3.4) | |
| | EB ^r | None | | G406D | | 1 (3.4) | |
| | EB ^r | None | | G406S | | 1 (3.4) | |
| | EB ^r | None | | None | 2 (15.4) | 8 (27.6) | |
| | EB ^s | None | | E378A | | | 1 (25.0) |
| | EB ^s | None | | None | 1 (7.7) | 7 (24.1) | 3 (75.0) |

*Wild type and mutation type

DST: Drug Susceptibility Testing, XDR-TB: Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

MDR-TB: Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, S-TB: Susceptible *Mycobacterium tuberculosis*

べてGenoType® MTBDRslはAG感受性の判定であった。CPM耐性結核菌12株のうち10株(83.3%)がGenoType® MTBDRslでAG耐性と判定された。KM, AMK, およびCPMのいずれかが耐性の36株のうち*rrs*に変異を認めたものは計20株(55.6%)であった。

被験KM耐性結核菌のうち国内で分離された結核菌は18株であり、内訳をTable 2に示した。KMの耐性検出率は55.6%であった。GenoType® MTBDRslの結果は*rrs*シーケンスの結果と一致した。

〔EB感受性に関するGenoType® MTBDRslとシーケンスの比較〕

EB感受性結核菌33株すべてGenoType® MTBDRslはEB感受性の判定であった。一方、*embB*には6株(18.2%)に変異が認められ耐性の判定となった。内訳はE378Aが1株(国内分離株), V282Aが5株(外部精度評価プログラム株)であった。EB耐性結核菌43株のうち24株(55.8%)がGenoType® MTBDRslでEB耐性と判定された。*embB*シーケンスは32株(74.4%)に変異が認められた。被験EB耐性結核菌のうち国内で分離された結核菌は34株であり、内訳をTable 2に示した。EB耐性検出率は55.9%であった。GenoType® MTBDRslで検出した*embB*の変異は*embB*シーケンスの結果と一致したが、

*embB*のシーケンスではこれらの変異以外にD328Yが2株, D354A, G406D, G406Sをそれぞれ1株ずつ検出した。

〔GenoType® MTBDRslとDNAシーケンスの精度の比較〕

FQ, KM, AMK, CPMおよびEBに対する感度, 特異度, 一致率をTable 3に示した。FQ, KM, AMKおよびCPMの感受性についてはGenoType® MTBDRslとDNAシーケンスの感度, 特異度, 一致率は同じであった。EB感受性についてはGenoType® MTBDRslがDNAシーケンスと比較して感度は劣るものの, 統計的有意差はなかった(χ^2 test: $P=0.07$)。特異度については, 国内分離株では両方法に有意差は認められなかったものの, 全菌株ではGenoType® MTBDRslがDNAシーケンスと比較して良好であった($p=0.03$)。

考 察

GenoType® MTBDRslの精度について国内で検出されたXDR-TB, MDR-TB, 感受性結核菌およびSRLNの薬剤感受性検査外部精度評価プログラムで使用した結核菌を用いて評価した。今回の検討ではGenoType® MTBDRslのFQ, KM, AMKおよびCPMの感度はそれぞれ82.4

Table 3 Total performances of GenoType® MTBDRsl and DNA sequencing

| | | Sensitivity (%) | Specificity (%) | Efficiency (%) |
|----------|------------|-----------------|-----------------|----------------|
| FQ (76) | MTBDRsl | 82.4 (80.0) | 97.6 (96.2) | 90.8 (89.1) |
| | Sequencing | 82.4 (80.0) | 97.6 (96.2) | 90.8 (89.1) |
| KM (76) | MTBDRsl | 57.1 (55.6) | 100 (100) | 80.3 (82.6) |
| | Sequencing | 57.1 (55.6) | 100 (100) | 80.3 (82.6) |
| AMK (30) | MTBDRsl | 100 | 100 | 100 |
| | Sequencing | 100 | 100 | 100 |
| CPM (30) | MTBDRsl | 83.3 | 100 | 93.3 |
| | Sequencing | 83.3 | 100 | 93.3 |
| EB (76) | MTBDRsl | 55.8 (55.9) | 100* (100) | 75.0 (67.4) |
| | Sequencing | 74.4 (70.6) | 81.8*(91.7) | 77.6 (76.1) |

(): 46 strains isolated in Japan

*: Chi-square test, $p=0.03$

%, 57.1%, 100%, 83.3%, 特異度はそれぞれ97.6%, 100%, 100%, 100%, 一致率はそれぞれ90.8%, 80.3%, 100%, 93.3%であり, *gyrA*および*rrs*のダイレクトシーケンスによる方法との間に有意差は認められなかった。GenoType® MTBDRslのEBの感度, 特異度および一致率はそれぞれ55.8%, 100%, 75.0%であり, *embB*のダイレクトシーケンスによる方法と感度および一致率は有意差を認めなかったが, 特異度はGenoType® MTBDRslがダイレクトシーケンスより優れていた。また日本国内の臨床分離株に関するGenoType® MTBDRslの精度はダイレクトシーケンスと同等であった。他の研究での臨床分離株に対するGenoType® MTBDRslの耐性の検出感度はFQが75.6~90.6%, KMが43.2~100%, EBが56.2~64.2%と報告されており^{4)~7)}今回の結果はこれらと同等であった。

GenoType® MTBDRslによる*gyrA*のQRDRにおける遺伝子変異は80.0%に認められ, これまでの報告^{8)~10)}と同様であった。GenoType® MTBDRslの変異型検出用プローブおよび野生型検出用プローブは*gyrA*のQRDRの一部(70%)で設計されているため, この領域以外の変異は検出することができない。Anら⁹⁾は*gyrB*にのみ変異が認められた株および*gyrA*と*gyrB*どちらにも変異が認められなかった株はそれぞれ4.6%および17.4%と報告している。今回検討に用いたFQ耐性株も*gyrB*の変異または*gyrA*と*gyrB*以外の遺伝子変異がある可能性が考えられた。

GenoType® MTBDRslによるKMの検出感度は十分ではなかったがGenoType® MTBDRslと*rrs*シーケンスの結果は同じであったことからGenoType® MTBDRslは*rrs*遺伝子変異の検出感度は良好であったと考えられた。KMの遺伝子変異による耐性検出感度は他の報告^{7)10)~12)}では43.2~86.5%とばらつきが見られた。本邦の株を使用しているSuzukiら¹¹⁾はKM耐性株における*rrs*遺伝子

の変異は67.4%であるとし, われわれの報告同様に十分な耐性検出感度ではなかったと報告している。Zaubrecherら¹³⁾はKM耐性およびAMK感受性株について*eis*遺伝子promoter領域のシーケンスを行い79%の株に変異があったと報告している。Huangら⁷⁾とCampbellら¹⁰⁾はKM耐性株の*rrs*遺伝子の変異はそれぞれ43.2%, 57.7%であるが*rrs*遺伝子および*eis*遺伝子promoterの変異は70.3%, 86.5%と報告している。GenoType® MTBDRslはAG耐性を*rrs*遺伝子の変異のみを検出することで行っているため*rrs*遺伝子と*eis*遺伝子promoterの変異が関係するKM耐性の検出感度が低いと考えられた。

GenoType® MTBDRslのEBの検出感度は十分ではなかった。EB耐性に関係していると言われている*embB* codon 306の変異は47.6%~68.5%の株で認められるとの報告¹⁰⁾¹⁴⁾がある。今回検討したGenoType® MTBDRslおよびDNAシーケンスのどちらでも*embB* codon 306の変異は55.9%であった。DNAシーケンスではEB耐性のhot spotである*embB* codon 306-497の変異のうちcodon306以外の変異を5株(14.7%)検出した。Plinkerら¹⁵⁾は*embB* codon 306に変異のないEB耐性株の91.2%に*embCAB*の変異があり, 特に*embB* codon 406および497はhot spotであると述べている。今回の検討でも*embB* codon 406に変異がある2株を検出した。GenoType® MTBDRslに*embB* codon 406および497の変異を検出する野生型プローブまたは変異型プローブを追加することによりEB耐性検出感度の向上が見られる可能性が示唆される。今回EB感受性にもかかわらず*embB*に変異がある3株(*embB* E378A, V282A)を検出したが, *embB* codon 378に変異を認めるEB感受性結核菌の報告³⁾もあることから, *embB* codon 378はEB耐性に関係がない可能性が考えられた。

今回評価した遺伝子変異以外にefflux pump活性の増加による薬剤耐性メカニズムが結核菌において報告さ

れている。efflux pump inhibitorによる結核菌の最少発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) の低下^{16)~18)}やefflux pump 遺伝子の過剰発現が観察されており¹⁸⁾, われわれが使用した菌株についてもefflux pump活性の増加による耐性が含まれている可能性も考えられた。

われわれは以前に*rpoB*, *katG*, *inhA* 遺伝子変異を検出するLPAであるGenoType® MTBDR*plus*を使ってMDR-TBの検索を行った¹⁹⁾が, GenoType® MTBDR*sl*と組み合わせることでXDR-TBの迅速検出が可能である。今回用いた国内のXDR-TB 13株のうち両法によりXDR-TBと判定しえた株は8株(61.5%)であった。GenoType® MTBDR*sl*は現在一般的に用いられているDNAシーケンス法と検出感度は同等でありDNA抽出・増幅, ハイブリダイゼーション, 遺伝子変異の検出までを約6時間で終了でき, 通常の薬剤感受性検査と比較すると数週間早く臨床に結果を提供できることから, 超多剤耐性結核の早期診断に有用であると考えられた。

謝 辞

今回の検討に使用した菌株は, 第13回結核療法研究協議会全国耐性結核菌調査にて収集された結核菌を使用しました。結核療法研究協議会に対して深謝申し上げます。

文 献

- 1) Tuberculosis Research Committee (Ryoken): Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: a nationwide survey, 2002. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11: 1129-1135.
- 2) 豊田恵美子, 川辺芳子, 四元秀毅, 他: 多剤および超多剤耐性結核の全国調査 (2006年). *結核.* 2008; 83: 773-777.
- 3) Sekiguchi JI, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, et al.: Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 179-192.
- 4) Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E: Feasibility of the GenoType MTBDR*sl* Assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1767-1772.
- 5) Brossier F, Veziris N, Aubry A, et al.: Detection by Geno Type MTBDR*sl* test of complex mechanisms of resistance to second-line drug and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 1683-1689.
- 6) Keit VS, Lan NTN, An DD, et al.: Evaluation of the MTBDR*sl* test for detection of second-line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 2934-2939.
- 7) Huang W-L, Chi T-L, Wu M-H, et al.: performance assessment of the GenoType MTBDR*sl* test and DNA sequencing for detection of second-line and ethambutol drug resistance among patients infected with multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 2502-2508.
- 8) Shi R, Zhang J, Li C, et al.: Emergence of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by *gyrA* mutation analysis using denaturing high-pressure liquid chromatography and DNA sequencing. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4566-4568.
- 9) An DD, Duyen NTH, Lan NTN, et al.: Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 4835-4839.
- 10) Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, et al.: Molecular detection of mutation associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 2032-2041.
- 11) Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, et al.: Detection of Kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1220-1225.
- 12) Jugheli L, Bzekalava N, Rijk P, et al.: High level of Cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 5064-5068.
- 13) Zaunbrecher MA, Sikes RD, Metchock B, et al.: Over-expression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 20004-20009.
- 14) Lee H, Myoung H-J, Bang H-E, et al.: Mutation in the *embB* locus among Korean clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to ethambutol. *Yonsei Med J.* 2002; 43: 59-64.
- 15) Plinke C, Cox HS, Zarkua N, et al.: *embCAB* sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without *embB306* mutation. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1359-1367.
- 16) Escribano I, Rodriguez JC, Llorca B, et al.: Importance of efflux pump systems in the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Fluoroquinolones and Linezolid. *Chemotherapy.* 2007; 53: 397-401.
- 17) Singh M, Jadaun GPS, Ramdas, et al.: Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J Med Res.* 2011; 133: 535-540.
- 18) Machado D, Couto I, Perdigo J, et al.: Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE.* 2012; 7: e34538.
- 19) 近松絹代, 水野和重, 青野昭男, 他: GenoType® MTBDR*plus*による多剤耐性結核菌同定に関する検討. *結核.* 2011; 86: 697-702.

Original Article

EVALUATION OF GenoType® MTBDRsl FOR TESTING RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLATES TO FLUOROQUINOLONE, AMINOGLYCOSIDE, AND ETHAMBUTOL

Kinuyo CHIKAMATSU, Akio AONO, Hiroyuki YAMADA, and Satoshi MITARAI

Abstract [Objective] To evaluate the ability of GenoType® MTBDRsl (Hain Lifescience, Germany) in detecting resistance to fluoroquinolone (FQ), aminoglycoside (AG), and ethambutol (EB).

[Method] We evaluated the resistance of 76 *Mycobacterium tuberculosis* samples, namely, 13 extensively drug-resistant (XDR), 29 multi-drug resistant (MDR), and 4 susceptible clinical isolates from Japan, and 30 strains from Supra-national Reference Laboratory Network, to FQ, AG, and EB by using GenoType® MTBDRsl. The *gyrA*, *rrs*, and *embB* were directly sequenced for all the strains, and the mutations were confirmed. The susceptibility testing result obtained using the standard proportion method with 1% Ogawa medium was considered as the gold standard.

[Results] The sensitivities of GenoType® MTBDRsl for resistance to FQ, kanamycin (KM), amikacin (AMK), capreomycin (CPM), and EB were 82.4%, 57.1%, 100%, 83.3%, and 55.8%, respectively. The specificity for FQ was 97.6%, and that for KM, AMK, CPM, and EB were 100%. The mutant strains detected by GenoType® MTBDRsl were as follows: in 20 Japanese FQ resistant isolates, 7 *gyrA* MUT3A (D94A) (35.0%), 6 MUT3C (D94G) (30.0%), 2 MUT1 (A90V) (10.0%), and 1 MUT1 with MUT3C (5.0%); in 18 KM resistant isolates, 10 *rrs* MUT1 (A1401G) (55.6%); and in 34 EB resistant isolates, 9 *embB* MUT1B (M306V) (26.5%), 2 MUT1A (M306I) (5.9%), and 8 WT1 deficits (covering codon 306; 23.5%). Direct sequencing showed additional substitutions in *embB* (2 D328Y, 1 D354A, 1 G406D, and 1

G406S). The sensitivity of GenoType® MTBDRsl was similar to that by sequencing method for resistance to FQ and AG, but that for EB was slightly less than by sequencing method, but the difference was not significant.

[Discussion] The sensitivity of GenoType® MTBDRsl for the detection of FQ resistance was approximately 80% to that by standard drug sensitivity test results by using conventional proportion methods, while it was relatively less accurate for the diagnosis of resistance to KM and EB in Japanese isolates. Thus, GenoType® MTBDRsl is useful for the early diagnosis and infection control of XDR-TB, because of a short turnaround time of approximately 6 h.

Key words: Line Probe Assay, Fluoroquinolone, Aminoglycoside, Ethambutol, *gyrA*, *rrs*, *embB*, Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Kinuyo Chikamatsu, Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: chikamatsu@jata.or.jp)

[原 著]

抗酸菌塗抹検査外部精度評価の試み

青野昭男¹⁾・近松絹代¹⁾・山田博之¹⁾・村田正太²⁾・結城 篤³⁾
三澤成毅⁴⁾・小栗豊子⁵⁾・御手洗 聡¹⁾

¹⁾ 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部

²⁾ 千葉大学医学部附属病院検査部

³⁾ 防衛医科大学校病院検査部

⁴⁾ 順天堂大学医学部附属順天堂医院臨床検査部

⁵⁾ 亀田総合病院臨床検査部

(平成24年8月8日受付, 平成24年10月23日受理)

人工痰を使用したパネルテストスライドによる抗酸菌塗抹検査外部精度評価を試行し、本邦における抗酸菌塗抹検査の精度を評価するとともに、パネルテストの実践性そのものを評価した。参加施設は病院検査室(83施設)および検査センター(病院内ブランチラボを含む・4施設)の計87施設で、使用された染色法はチール・ネールゼン(Z-N)法が56施設、蛍光法(オーラミンO染色, オーラミン・ローダミン染色, アクリジンオレンジ染色)が31施設であった。また2施設が蛍光法とZ-N法の両方の結果を報告していた。陽性度既知の塗抹スライド5枚を各施設に送付し、435枚分の検査結果(100%)を受領した。標準予定結果との比較で判定一致405枚(93.1%), 低偽陰性26枚(6.0%), 低偽陽性2枚(0.5%), 高偽陽性・陰性各1枚(各0.2%)という結果であった。またZ-N法が蛍光法に対して陽性検出感度がやや低い傾向が認められた。今回のパネルテストの結果から、全体として抗酸菌塗抹検査の質が高精度に維持されており、さらに人工痰を用いた抗酸菌パネルテストスライドを使用することで、各検査室の抗酸菌塗抹検査の精度を比較的容易に評価できることが示された。

Key words: 抗酸菌塗抹検査, 外部精度評価, 人工痰

序 文

今日の抗酸菌検査において、遺伝学的手法や免疫学的手法が導入されたことで、検査結果が得られるまでの迅速性は飛躍的に向上した^{1),2)}。その中においても、迅速・簡便・安価で実施可能な塗抹検査は、なおも結核患者を発見するための重要な検査法の一つである。また、塗抹検査も他の検査と同様に、質の高い検査結果を臨床へ提供するためには、その精度が保証されなければならない。外部精度管理(External quality assessment, EQA)にはパネルテスト(Panel testing)、再検査試験(Cross re-checking)、そして検査室立ち入

り評価(On-site evaluation)の三つの方法がある。パネルテストは検査室の総合的な技量に関する基本的なデータを収集するのに役立つ³⁾。

わが国において、薬剤感受性検査のパネルテストは実施されているものの⁴⁾、塗抹検査におけるパネルテストは実施されていない。これは塗抹検査において再現性の高い、安全で簡便な標本を作製する手法がないためと考えられる⁵⁾。しかし近年、結核研究所にて開発した、人工痰および人工痰にホルマリン固定済み結核菌を混ぜて作製した試料にて、標本を作製することで-, 土, 1+, 2+, 3+の五つの陽性度を正しく再現することが可能となった^{6)~8)}。

今回われわれは、この人工痰を用いた抗酸菌パネルテストスライドによる抗酸菌塗抹検査外部精度評価を試行し、パネルテストにより抗酸菌塗抹検査の精度を評価するとともに、パネルテストの実践性そのものを評価した。

著者連絡先: (〒204-8533) 東京都清瀬市松山3-1-24
結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンス部
青野昭男
TEL: 042-493-5711 (内線: 397)
FAX: 042-492-4600
E-mail: aono@jata.or.jp

対象と方法

1. 施設の参加要件

今回の抗酸菌塗抹検査外部精度評価を実施するにあたっては、実施要項に同意し、定められた期間内に結果を返送可能であること、また参加を希望する施設は、①施設名、②担当者名、③通信用メールアドレスをコーディネーターに連絡可能であることを条件とした。

2. 検査に使用する検体

結核研究所で開発した人工痰、あるいは人工痰にホルマリン固定した結核菌を混じた試料を作製し、これをスライドガラス（MASコートスライド：Matsunami）に塗布し、乾燥・火炎固定した5枚のパネルテストスライドを参加施設に郵送にて送付した。各パネルテストスライドの菌量は0 cfu/ml（陰性相当）、約 1×10^4 cfu/ml（±相当）、約 1×10^5 cfu/ml（1+相当）、約 1×10^6 cfu/ml（2+相当）、約 1×10^7 cfu/ml（3+相当）に調整した。

3. 検査方法

上記のスライドをそれぞれの施設で通常使用している抗酸菌染色法にて染色し、鏡検した。鏡検の方法は各施設の標準法に従った。結果は結核菌検査指針にしたがって、簡易法（-、±、1+、2+、3+）にて記録し⁹⁾、ガフキー号数は解析が複雑化することから不可とした。

4. 結果の報告

パネルテストを実施する場合、繰り返し検査によるバイアスを回避するため、結果回収までの時間を制限するのが一般的であることから、検査結果の返送は検体受領後1週間以内とした。上記の方法で記録した結果をフォーマットに従ってスプレッドシートに入力し、電子メールにてコーディネーターに送付した。結果の返送を受けて、標準予定結果を各施設に報告した。

5. 結果の評価

それぞれのスライドの判定結果について、標準予定結果と比較評価した。External Quality Assessment for AFB Smear Microscopyの基準⁵⁾に従って、結果が一致している場合と、陽性度が1段階異なる場合を「一致：Correct」と判定した。陽性の判定であって、陽性度に2段階以上の差がある場合「定量エラー：QE (quantification error)」とした。さらに陰性検体を「±」と判定した場合は「低偽陽性：LFP (low false positive)」, 「±」を陰性と判定した場合は「低偽陰性：LFN (low false negative)」とする。陰性検体を「1+」以上と判定した場合は「高偽陽性：HFP (high false positive)」, 「1+」以上の陽性度の検体を陰性と

表1. パネルテスト結果と標準予定結果との比較 (全体)

| 施設判定 | 標準予定結果 | | | | |
|------|--------|----|----|----|----|
| | - | ± | 1+ | 2+ | 3+ |
| - | 84 | 26 | 1 | 0 | 0 |
| ± | 2 | 58 | 4 | 0 | 0 |
| 1+ | 1 | 3 | 63 | 2 | 0 |
| 2+ | 0 | 0 | 19 | 74 | 1 |
| 3+ | 0 | 0 | 0 | 11 | 86 |

参照：パネルテストスライドの標準的判定システム (世界保健機関)

| 施設判定 | 標準予定結果 | | | | |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | - | ± | 1+ | 2+ | 3+ |
| - | Correct | LFN | HFN | HFN | HFN |
| ± | LFP | Correct | Correct | QE | QE |
| 1+ | HFP | Correct | Correct | Correct | QE |
| 2+ | HFP | QE | Correct | Correct | Correct |
| 3+ | HFP | QE | QE | Correct | Correct |

LFN=low false negative, HFN=high false negative, LFP=low false positive, HFP=high false positive, QE=quantification error

判定した場合は「高偽陰性：HFN (high false negative)」とし、標準予定結果に対する各施設判定の評価を表1参照に示した。集計の利便のため、HFN, HFPおよびLFPに0点、LFNとQEに5点、Correctに10点を付与し、合計の点数を評価した。また間違いの起こりやすさの傾向など評価した。

6. 結果の解析

すべての参加施設のデータについて、陽性度別一致率などを総合評価した。統計解析にはJMP 6.0.3 (SAS Institute, CA, USA) を使用してカイ2乗検定を実施し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

今回研究に参加したのは病院検査室（83施設）および検査センター（病院内ブランチャボを含む・4施設）の計87施設であった。平成24年2月23日に結核研究所より郵送にて検体を発送し、同年3月8日までに1施設を除きすべての施設より結果の報告を受けた。また残り1施設についても同年3月13日には結果の報告を受けた。

総計としてスライド435枚分の検査結果（100%）を受領した。塗抹検査に使用された染色法はチール・ネールゼン（Z-N）法が56施設、蛍光法（オーラミン

O染色、オーラミン・ローダミン染色、アクリジンオレンジ染色のいずれか)が31施設であった。また2施設が蛍光法とZ-N法の両方の結果を報告していた。一部の施設からスライドに記載した番号が読みづらいとの指摘があったが、最終的にはすべての番号が予定(配布)番号と一致し、評価が可能であった。また送付に関連して検体の破損や紛失は報告されていないが、一部の地域で遅配があった可能性があった。

表1にすべての施設・検体に対する標準予定結果との比較を示した。全体では判定一致405枚(93.1%)、低偽陰性26枚(6.0%)、低偽陽性2枚(0.5%)、高偽陽性・陰性各1枚(各0.2%)という結果であった。評価点数を見ると50点(満点)が59施設(67.8%)、45点が25施設(28.7%)、40/35/30点がそれぞれ1施設(各1.1%)であった。平均点は48.0±3.4(30~50)であった。また土を陰性(-)と判定した施設が26施設(当該陽性度の29.9%)認められた。

検査方法をZ-N法と蛍光法に分けた結果を表2および表3に示した。Z-N法による結果は56施設(280枚)分であり、蛍光法は31施設(155枚)分であった。

Z-N法による結果を見ると、判定一致253枚(90.4%)、低偽陰性23枚(8.2%)、低偽陽性2枚(0.7%)、高偽陽性・陰性各1枚(各0.4%)という結果であった。評価点数を見ると50点が31施設(55.4%)、45点が22施設(39.3%)、40/35/30点がそれぞれ1施設(各

1.8%)であった。平均点は47.2±3.9(30~50)であった。また土を陰性(-)と判定した施設が23施設(当該陽性度の41.1%)認められた。

これに対して、蛍光染色による鏡検を実施した施設は31施設あり、判定一致152枚(98.1%)と低偽陰性3枚(1.9%)という結果であった。評価点数を見ると50点が28施設(90.3%)、45点が3施設(9.7%)であった。平均点は49.5±1.5(45~50)であった。また土を陰性(-)と判定した施設は3施設(当該陽性度の9.7%)認められた。Z-N法と蛍光法で低偽陰性(土を陰性と判定する誤り)率を比較したところ $p=0.007$ (カイ2乗検定・Yates補正值)であり、統計的に有意差を認めた。陽性・陰性の判定だけで比較したところ、Z-N法の感度(陽性検出率)は65.6%(147/224)であり、蛍光法の感度は72.6%(90/124)であった。

考 察

今回本邦で初めてとなる、人工痰を使用した抗酸菌パネルテストスライドによる抗酸菌塗抹検査外部精度評価を試行した。抗酸菌検査の中で塗抹検査は、最も多くの検査室で実施されている検査法である¹⁰⁾。また標本作成から結果判定まで、その工程の多くが手法によるものである。こうしたことから検査の質の保証が強く求められる。しかし適切な標本作製することが困難であることから、わが国では抗酸菌塗抹検査のパネルテストは実施されてこなかった。今までに報告されたパネルテストスライド作製法は、抗酸菌陽性および陰性の患者喀痰を集めるため、陰性喀痰が確実に陰性であることの難しさ、また大量の陽性喀痰を扱う危険性、さらに標本中に含まれる菌量の標準化が困難であるなどの問題点があった^{5),6)}。

今回われわれは結核研究所で開発した、ポリアクリルアミドを基材とし培養THP-1細胞を用いた人工痰と、ホルマリン固定した培養結核菌を用いてパネルテストスライドを作製した。これは人工痰に混ぜ合わせるホルマリン固定済み結核菌の量を調整することで、正確に3+~陰性までの各グレードのパネルテストスライドを作製することが可能である^{7),8)}。また用いる結核菌はホルマリン固定されているため、標本作製の際のバイオハザードへの配慮も不要で、一般的な実験台の上で作業が可能である。このためパネルテストスライドを100施設(500枚)分準備(塗抹)したが、ボランティア7名でおよそ2時間の作業により作製が可能であった(人工痰と定量したホルマリン固定済み結核菌は事前に準備した)。また参加ボランティア施

表2. パネルテスト結果と標準予定結果との比較
(チール・ネールゼン法のみ)

| 施設判定 | 標準予定結果 | | | | |
|------|--------|----|----|----|----|
| | - | ± | 1+ | 2+ | 3+ |
| - | 53 | 23 | 1 | 0 | 0 |
| ± | 2 | 32 | 4 | 0 | 0 |
| 1+ | 1 | 1 | 46 | 2 | 0 |
| 2+ | 0 | 0 | 5 | 51 | 1 |
| 3+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 55 |

表3. パネルテスト結果と標準予定結果との比較
(蛍光法のみ)

| 施設判定 | 標準予定結果 | | | | |
|------|--------|----|----|----|----|
| | - | ± | 1+ | 2+ | 3+ |
| - | 31 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| ± | 0 | 26 | 0 | 0 | 0 |
| 1+ | 0 | 2 | 17 | 0 | 0 |
| 2+ | 0 | 0 | 14 | 23 | 0 |
| 3+ | 0 | 0 | 0 | 8 | 31 |

設からの申し込みおよび結果の報告にはすべて電子メールを使用したため、一部の施設で文字化け・セキュリティ上の問題による添付ファイルの開封などに問題があったが、大きな問題は生じなかった。さらに検体の送付も郵送によったためコスト上の問題も低く抑えることが可能であった。

総合的な結果として、Z-N法（1,000倍鏡検）が蛍光法（200倍鏡検）に対して陽性検出感度がやや低い傾向が認められ、特に土の検体について明確であり、Z-N法と蛍光法の間には統計的に有意な差が認められた。これは鏡検倍率の違いによる観察面積の差に由来するものと考えられた。1,000倍での実視野面積は視野数26.5の場合の1視野で0.0552 mm²であり、同様に200倍ではその25倍の1.3789 mm²となる。今回の検体は2×3 cmサイズで作製しているので、全体の面積は471.2389 mm²となり、1,000倍および200倍でそれぞれ300および30視野観察を行うと、観察範囲は1,000倍・300視野観察で全体の3.5%、200倍・30視野観察で全体の8.8%となる。つまり蛍光法で鏡検した場合、Z-N法のおよそ2倍の面積を検査することになり、検出感度は上昇する。なお1×2 cmサイズで塗抹を作製した場合、1,000倍・300視野でも全体の10.5%を観察することが可能と考えられる。しかし塗抹サイズを小さくした場合、塗抹作製の際の乾燥に要する時間が長くなり作業効率が低下すると思われる。

また今回蛍光法で1+を2+と判定した施設が14施設あったが、これは作製したパネルテストスライドの濃度（1+：約100,000 cfu/ml）が日本の基準⁸⁾では2+にオーバーラップするためであると考えられ、実際には定量の間違い（QE）ではないと思われる。

今回大きな間違いはほとんど認めなかったものの、Z-N法で検査された検体が偽陽性3件と偽陰性1件が認められた。検体を結核研究所に再送付してもらい原因を調べたが、明確な理由は不明であった。一般的な可能性としての偽陽性の原因としては染色液の汚染や夾雑物の誤判定が考えられ、また偽陰性の原因としては染色液の濃度や質、さらに染色温度や時間の影響が考えられたが、今回のパネルテストではそこまでの情報を収集していないため、詳細は不明であった^{11), 12)}。さらに顕微鏡の質も結果に影響する可能性があることから¹³⁾、各施設の試薬や顕微鏡の種類および管理方法、また検査手順についての情報を得る必要があると考えられた。

今回本邦では初めての抗酸菌塗抹検査外部精度評価を試行した。パネルテストはその属性から、日常の検

体ではなく試験であることが明確であり、最大能力評価であると考えられている。今回のパネルテストでは各施設の情報を収集していないため、どのような状況で検査が実施されたか不明であるが、比較的短期のうちに回答を求めたことから、ある程度日常の検査を反映しているのではないと思われる。今回の成績のみの限定的な情報ではあるが、全体の96.5%の施設で評価点数45点以上を示したことから、抗酸菌塗抹検査の質が高精度に維持されていると推察された。さらに人工痰を用いた抗酸菌パネルテストスライドを使用することで、各検査室の抗酸菌塗抹検査の精度を比較的容易に評価できることが示された。また、一般に高精度と信じられていた抗酸菌塗抹検査においても偽陽性・偽陰性が認められており、継続的・拡大的実施が必要と思われた。

謝 辞 本研究を実施するにあたり、全国87の抗酸菌検査実施施設のご協力をいただきました。ここに改めて深謝申し上げます。なお本研究は、平成23年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）の研究課題「地域における効果的な結核対策の強化に関する研究」（H23—新興—一般—001：主任研究者・石川信克）による補助を受けた。

文 献

- 1) Mitarai, S., A. Kurashima, A. Tamura, H. Nagai, H. Shishido. 2001. Clinical evaluation of Amplicor Mycobacterium detection system for the diagnosis of pulmonary mycobacterial infection using sputum. *Tuberculosis* 81: 319-325.
- 2) Hillemann, D., S. Rüscher-Gerdes, E. Richter. 2005. Application of the Capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 9: 1409-1411.
- 3) Martinez-Guarneros, A., S. Balandrano-Campos, M. A. Solano-Ceh, F. Gonzalez-Dominguez, H. B. Lipman, J. C. Ridderhof, A. Flisser. 2003. Implementation of proficiency testing in conjunction with a re-checking system for external quality assurance in tuberculosis laboratories in Mexico. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 7: 516-521.
- 4) 御手洗 聡（日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会）. 2006. 抗酸菌検査施設に対する結核菌薬剤感受性試験外部精度評価. *結核* 81: 501-509.
- 5) Aziz, A. M., F. Ba, M. Becx-Bleumink, et al. 2002. External quality assessment for AFB smear microscopy. p. 1-111. Washington, DC, USA: Association for Public Health Laboratories.
- 6) Yamada, S., S. Mitarai, L. Aguiman, H. Matsumoto,

- A. Fujiki. 2006. Preparation of mycobacteria-containing artificial sputum for TB panel testing and microscopy of sputum smears. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10: 899-905.
- 7) Yamada, H., S. Mitarai, M. R. Wahyunitisari, N. M. Mertaniasih, T. Sugamoto, K. Chikamatsu, A. Aono, H. Matsumoto, A. Fujiki. 2011. An improved polyacrylamide-based artificial sputum with formalin-fixed tubercle bacilli for the training of tuberculosis microscopists. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3604-3609.
- 8) 山田博之, 松本宏子, 御手洗 聡, 藤木明子. 2008. ポリアクリルアミドを用いた人工痰の長期保存と塗抹鏡検所見の再現性. *Kekkaku*, 83(2): 65-71.
- 9) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 2007. 結核検査指針2007. 東京: 結核予防会.
- 10) 御手洗 聡. 2004. 結核菌検査とくに薬剤感受性検査の信頼性に関する研究. 平成15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「小児結核および多剤耐性結核の予防, 診断, 治療における技術開発に関する研究」(主任研究者 森 亨) 分担研究報告書.
- 11) Selvakumar, N., M. G. Sekar, F. Rahman, A. Syamsunder, M. Duraipandian, F. Wares, P. R. 2005. Narayanan. Comparison of variants of carbol-fuchsin solution in Ziehl-Neelsen for detection of acid-fast bacilli. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9: 226-229.
- 12) Van Deun, A., A. Hamid Salim, K. J. Aung, M. A. Hossain, N. Chambugonj, M. A. Hye, A. Kawria, E. Declercq. 2005. Performance of variations of carbol-fuchsin staining of sputum smears for AFB under field conditions. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9: 1127-1133.
- 13) Lumb, R., A. Van Deun, P. Kelly, I. Bastian. 2006. Not all microscopes are equal. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10: 227-229.

External Quality Assessment for Direct Acid-Fast Bacilli Smear Microscopy

Akio Aono,¹⁾ Kinuyo Chikamatsu,¹⁾ Hiroyuki Yamada,¹⁾ Syota Murata,²⁾
Atsushi Yuki,³⁾ Shigeki Misawa,⁴⁾ Toyoko Oguri,⁵⁾ Satoshi Mitarai¹⁾

- ¹⁾ Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association
- ²⁾ Department of Clinical Laboratory, Chiba University Hospital
- ³⁾ Department of Laboratory Medicine, National Defense Medical College Hospital
- ⁴⁾ Department of Clinical Laboratory, Juntendo University Hospital
- ⁵⁾ Department of Laboratory Medicine, Kameda Medical Center

A panel testing was conducted to assess the laboratory performance of smear microscopy examination for the detection of acid-fast bacilli (AFB), and its feasibility. A total of 87 volunteer facilities, including 83 hospitals and 4 private laboratories, attended the external quality assessment (EQA) trial. The conventional Ziehl-Neelsen (Z-N) and fluorescent (i.e. auramine-O, auramine-rhodamine, or acridine orange) staining methods were used in 56 and 31 facilities, respectively. Two facilities reported the results of Z-N and fluorescent staining methods. Five unstained slides with known AFB smear positivity which were prepared using artificial sputum specimen were sent to each volunteer facility by mail, and the total of 435 reading results (100%) was reported. Comparing to the standard results, 405 (93.1%) results were correct, while 26 (6.0%), 2 (0.5%), 1 (0.2%) and 1 (0.2%) were low false negative, low false positive, high false positive and high false negative, respectively. Z-N was relatively less sensitive than fluorescent staining method in general. The EQA for AFB smear microscopy was implemented. It was relatively easy to conduct using standardized panel testing slides, and showed generally high quality of performance in the participating facilities. The activity could be further expanded to monitor the general quality of smear microscopy in Japan.

