

[原 著]

キャピリア TB の結核菌群同定上の評価—特に培地の種類について—

児玉朱実¹⁾・斎藤 肇²⁾¹⁾ 国立病院機構東広島医療センター研究検査部²⁾ 広島県環境保健協会

(平成 18 年 10 月 25 日受付, 平成 19 年 4 月 19 日受理)

キャピリア TB の結核菌群同定上の有用性について検討した。①BACTEC MGIT 960 サプリメント加 MGIT と BACTEC MGIT 960 機器を用いて分離した結核菌群 21 株の $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml の 0.1 ml を BBL MGIT, KRD “ニチビー”, マイコアシッド, 2% 小川の各培地に接種し, 培養が陽性になった当日のキャピリア TB は MGIT 培地, 小川培地で全株, KRD 培地で 16 株が陽性, マイコアシッド培地で全株が陰性であった。②Middlebrook 7H9 ブロス継代の研究室保存 26 菌種 141 株のうちキャピリア TB 陽性は結核菌群 59 株のみで, 偽陽性菌株が *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium avium* の中に見られたほかはすべて陰性であった。③*M. marinum* 4 株のキャピリア TB は, MGIT 培養菌で 14 日後, マイコアシッド培養菌で 21 日後に全株陽性, KRD 培養菌で 21 日後に 1 株陽性, 3 株偽陽性であったが, 小川培養菌は集落初発 21 日後も全株陰性であった。④小川培地初代分離菌を室温, 3 週間～7 カ月間保存した 173 株中結核菌群と同定された 126 株はアキュプローブ結核菌群全株, キャピリア TB 125 株, ナイアシン蓄積 124 株が陽性であったが, 非結核性抗酸菌の 47 株はこれらのいずれも陰性であった。⑤上記①と同様のシステムで分離された抗酸菌 71 株中結核菌群と同定された 48 株はアキュプローブ結核菌群, キャピリア TB, ナイアシン蓄積陽性であったが, 非結核性抗酸菌の 23 株はこれらのいずれも陰性であった。

Key words: キャピリア TB, 結核菌群, 抗 MPB64 単クローン抗体, 免疫クロマトグラフィー, 迅速診断

序 文

「結核の統計 2005」¹⁾によれば, 2003 年における世界の推定全結核新発生患者数は 881 万人, 結核死亡者数は 175 万人といわれており, 人口増加の著しい発展途上国での発生がほとんどを占めている。先進国であるわが国の結核について見ると, 1980 年以降患者数減少の鈍化傾向が見られ, 2004 年における新発生患者数は 29,736 人, 死亡者数は 2,328 人で, 今もって結核は重要な感染症の一つである。一方, 非結核性抗酸菌によるヒトの感染症は近年増加傾向にあり,

2003 年には 4,506 人の新患者の発生が見られている²⁾。ヒトからヒトへの感染性があり, 治療方針が確立されている結核と, ヒトからヒトへの感染性がなく, 一部を除くと治療方針も確立されておらず, 一般に難治性の非結核性抗酸菌症とを鑑別することは, 疫学上ならびに患者の治療上極めて重要なことである。

結核菌群はナイアシンの蓄積³⁾, パラニトロ安息香酸 (PNB) 培地³⁾および *p*-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropylphenone (NAP) 培地³⁾上での発育, アキュプローブ (結核菌群, マイコバクテリウム アビウム コンプレックス)³⁾, DDH マイコバクテリア³⁾の検査, 特異遺伝子による核酸増幅法⁴⁾, 細胞壁脂肪酸のガス液体クロマトグラフィー⁵⁾, ミコール酸の高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁶⁾によって非結核性抗酸菌から鑑別することが可能である。これらの検査法は一般に操作が煩雑で熟練を要し, かつ時間を要するという欠点があり, より簡便, 迅速, かつ特異性の高

著者連絡先: (〒739-0041) 東広島市西条町寺家 513
国立病院機構東広島医療センター研究検査部
児玉朱実
TEL: 082-423-2179 (内線 2403)
FAX: 082-422-4675
E-mail: kodama-akemi@hiro-hosp.jp

い結核菌群検出法が望まれてきた。

Tomiyama ら⁷⁾は結核菌群特異分泌タンパク質抗原 MPB64 に対する単クローン抗体を用いた免疫クロマトグラフィーにより結核菌群を簡便、迅速、かつ感度よく特異的に検出する方法を考案し、これがキット化されてキャピリア TB (日本ベクトン・ディッキンソン) として市販されており、すでにその有用性に関するいくつかの報告がなされている^{8~13)}。

本研究は数種の抗酸菌培地における抗酸菌検出日数ならびにキャピリア TB による結核菌群同定上の有用性の比較、さらに研究室継代保存株と、保存期間を異にした初代臨床分離株のキャピリア TB の結核菌群同定上の有用性を評価した。

材料と方法

1. 菌分離培養法

1) 喀痰前処理法

N-acetyl-L-cysteine (NALC)-NaOH 法¹⁴⁾によった。すなわち、0.1 M クエン酸ナトリウム・2H₂O と 4% NaOH の等量混液に使用時 0.5% の割合に NALC 粉末を加えた NALC-NaOH 溶液を喀痰の 2 倍量加え、室温で 15 分間処理後、冷却遠心器で 3,000×g, 20 分間遠心し、得られた沈渣を 2 ml の M/15 リン酸緩衝液 (pH 6.8) に浮遊した。

2) 培養法

管底に蛍光性の酸素センサーを埋め込み、変法 Middlebrook 7H9 プロスを入れた MGIT 試験管 (日本ベクトン・ディッキンソン) に BACTEC MGIT 960 サプリメントキット (日本ベクトン・ディッキンソン) を加え、これに上記処理喀痰の 0.5 ml を接種し、BACTEC MGIT 960 機器 (日本ベクトン・ディッキンソン) で菌発育を 6 週間にわたってモニターした (以下、BACTEC MGIT 960 システム¹⁵⁾)。

BACTEC MGIT 960 発育サプリメントキットは発育促進剤 OADC (オレイン酸, 牛アルブミン, デキストロース, カタラーゼ, ステアリン酸, ポリオキシエチレン; 日本ベクトン・ディッキンソン) と凍結乾燥した BBL MGIT PANTA (ポリミキシン B, アンホテリシン B, ナリジクス酸, トリメトプリム, アズロシリン; 日本ベクトン・ディッキンソン) 抗生物質合剤よりなり、OADC 15 ml で PANTA 1 バイアルを復元し、その 0.8 ml を MGIT 試験管 7 ml に加えて用いた。他方、処理喀痰の 0.1 ml を 2% 小川培地 (極東製薬工業) へ接種して 37°C, 8 週間培養し、集落発育の有無ないし程度、所要日数を読み取った。

2. 供試菌

① BACTEC MGIT 960 システムで喀痰から分離した初代抗酸菌を用いて培地の種類とキャピリア TB について検討した 30 株 (Table 1, 2), ② 初代分離菌を用いてキャピリア TB の結核菌群同定上の有用性について検討した 71 株 (うち 19 株は抗酸菌の発育シグナルが陽性になったときにおける培養液中の CFU/ml の測定にも使用) (Table 3, 4), ③ Middlebrook 7H9 プロス (自家製) 継代の ATCC 由来の基準株ならびに筆者の一人斎藤により培養学的・生化学的・分子遺伝学的方法により同定された臨床分離株を含む研究室保存株を同種培地で 37°C (*Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans* は 32°C), 14~28 日間培養した 26 菌種, 計 141 株 (Table 5), ④ 喀痰から 2% 小川培地で分離された抗酸菌発育後、室温に 3~6 週間保存した 72 株 (Table 6) と 2~7 カ月間保存した 101 株 (Table 7) 計 173 株, 総計 415 株について下記の実験を行った。

3. 菌の同定法

1) アクユブローブと DDH マイコバクテリア

BACTEC MGIT 960 システムで抗酸菌発育シグナ

Table 1. Time to detection of mycobacteria with MGIT, KRD "Nichibi," MYCOACID or 2% Ogawa culture medium

Species	Number of strains	Average time for detection (days)			
		MGIT	KRD	MYCOACID	Ogawa
<i>M. tuberculosis</i> complex	21	9.9 (7-14)	9.8 (8-15)	6.7 (5-9)	14.2 (9-19)
<i>M. kansasii</i>	5	7.8 (7-9)	8.6 (8-9)	7.2 (7-8)	8.8 (8-12)
<i>M. avium</i> complex	4	6.8 (6-9)	8.3 (7-10)	7.0 (6-8)	18.8 (17-22)

Table 2. Identification of *M. tuberculosis* complex by CapiliaTB of culture samples taken on the same day when the MGIT, KRD “Nichibi,” MYCOACID or 2% Ogawa culture medium became positive for acid-fast bacilli

Strain No.	Tests						DDH	Identification (No. of strains)
	CapiliaTB ^{a)}				AccuProbe			
	MGIT	KRD	MYCOACID ^{b)}	Ogawa	MTBC ^{c)}	MAC		
1	3+	3+	-(2+)	3+	+	-		
3	3+	3+	-(±)	3+	+	-		
4	3+	1+	-(±)	3+	+	-		
5	3+	1+	-(±)	3+	+	-		
6	3+	3+	-(1+)	3+	+	-		
7	3+	±	-(±)	3+	+	-		
8	3+	3+	-(1+)	3+	+	-		
9	3+	2+	-(±)	3+	+	-		
10	3+	1+	-(1+)	3+	+	-		
11	3+	2+	-(3+)	3+	+	-		
12	3+	1+	-(1+)	3+	+	-	Not tested	NTBC (21 strains)
13	3+	±	-(±)	3+	+	-		
14	3+	±	-(1+)	3+	+	-		
15	3+	±	-(3+)	3+	+	-		
16	3+	1+	-(±)	3+	+	-		
17	3+	3+	-(1+)	3+	+	-		
18	3+	1+	-(1+)	3+	+	-		
19	3+	1+	-(1+)	3+	+	-		
20	3+	1+	-(2+)	3+	+	-		
21	3+	1+	-(1+)	3+	+	-		
59	3+	±	-(1+)	3+	+	-		
22	-	-	-(-)	-	-	-	<i>M. kansasii</i>	
23	-	-	-(-)	-	-	-	<i>M. kansasii</i>	
24	-	-	-(-)	-	-	-	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>
25	-	-	-(-)	-	-	-	<i>M. kansasii</i>	
26	-	-	-(-)	-	-	-	<i>M. kansasii</i>	
27	-	-	-(-)	-	-	+		
28	-	-	-(-)	-	-	+	Not tested	MAC (4 strains)
29	-	-	-(-)	-	-	+		
60	-	-	-(-)	-	-	+		

^{a)} Intensity of the CapiliaTB test: ±, faint reddish violet; 1+, pale reddish violet; 2+, reddish violet; 3+, deep reddish violet.

^{b)} Parentheses indicate the results of CapiliaTB test at 7 days after culture medium became positive for acid-fast bacilli.

^{c)} *M. tuberculosis* complex.

ルが陽性になった日からさらに7日間培養した菌についてまずアキュプローブ結核菌群（極東製薬工業）、次いでアキュプローブ マイコバクテリアウム アビウム コンプレックス（極東製薬工業）を用いたテスト³⁾を行い、その他の抗酸菌については2%小川培地発育菌を用いてDDH マイコバクテリア（極東製薬工業）³⁾で同定した。

2) キャピリア TB テスト

Hasegawa らの方法¹¹⁾に準じて行った。すなわち、液体培地として Middlebrook 7H9 プロスを用いた場合には37°Cで菌の発育による培養液の濁りが確認できるまで、また BACTEC MGIT 960 システムを用いた場合には発育陽性シグナルが見られるまで培養を続けた。固形培地として2%小川培地を用いた場合に

Table 3. Identification of 71 culture samples taken on the same day when the BACTEC MGIT 960 system became positive for acid-fast bacilli

No. of isolates	Time to detection (days)		No. of positive isolates				Identification
	Range	Average	CapiliaTB	AccuProbe		Niacin (Ogawa)	
				MTBC ^{a)}	MAC		
48	4-23	10.0	48	48	Not tested	48	<i>M. tuberculosis</i> complex
19	4-22	7.9	0	Not tested	19	0	<i>M. avium</i> complex
4	3- 6	4.8	0	0	0	0	1 <i>M. kansasii</i> , 1 <i>M. szulgai</i> , 2 <i>M. abscessus</i> ^{b)}

^{a)} *M. tuberculosis* complex.

^{b)} Identified with DDH.

Table 4. CFU of clinical culture samples taken on the same day when the BACTEC MGIT 960 system became positive for acid-fast bacilli

Species (No. of strains)	Sample No.	CFU/ml
<i>M. tuberculosis</i> complex (11)	29	1.4×10 ⁵
	30	2.7×10 ⁵
	31	8.7×10 ⁴
	33	2.0×10 ⁴
	37	2.7×10 ⁵
	38	8.0×10 ⁴
	39	2.5×10 ⁵
	40	9.2×10 ⁴
	42	2.7×10 ⁵
	43	7.7×10 ⁵
	44	4.2×10 ⁵
<i>M. avium</i> complex (4)	34	6.7×10 ⁶
	35	1.3×10 ⁷
	36	4.1×10 ⁷
	48	5.4×10 ⁷
<i>M. kansasii</i> (1)	7	4.2×10 ⁶
<i>M. szulgai</i> (1)	41	1.0×10 ⁶
<i>M. abscessus</i> (2)	45	1.0×10 ⁵
	46	7.0×10 ⁶

は37°Cで菌集落が認められるまで培養を続け、培養菌の1μl白金耳量を0.1% Tween 80加10mMリン酸緩衝液(pH 7.4) 200μlに浮遊し、15秒間ボルテックスした。上記いずれの場合にも検体の100μlをテストプレートの試料滴下部へ滴下し15分間静置した。成績の判定は、テストプレートのテスト判定部(T)とコントロール判定部(C)の両方に赤紫色のラインが認められた場合を陽性、Tにかすかに認められる

赤紫色のラインと、Cに赤紫色のラインが認められた場合を偽陽性、Tに赤紫色のラインが認められずCに赤紫色のラインが認められた場合を陰性と目視判定した。実験によっては陽性反応をその強さの程度に応じて弱陽性(薄い赤紫色, 1+), 中等度陽性(赤紫色, 2+), 強陽性(濃赤紫色, 3+)で表した場合もある。

3) ナイアシン蓄積

ナイアシン試験紙³⁾によった。すなわち、2%小川培地の1/3程度に発育した培養菌に沸騰水を1.5ml加え、培地全面が覆われるようにして約5分間静置してナイアシンを抽出し、その1mlをスクリュウキャップ付小試験管に移し、これにナイアシン試験紙(ナイアシンテスト極東; 極東製薬工業)をピンセットで先端が尖っているほうを下に入れ、直ちに密栓し、立てたまま静置して試験紙の上端まで自然に吸収させ、その後時々試験管を軽く振り15分間反応させた。そして抽出液の黄色着色がキットの陽性コントロールにおけると同程度以上の場合を陽性と判定した。

4. BACTEC MGIT 960 システム培養陽性時のCFU測定法

結核菌群11株, MAC 4株, *M. kansasii* 1株, *M. szulgai* 1株, *M. abscessus* 2株, 計19株を滅菌蒸留水で10⁻²~10⁻⁵倍に至る10倍通減希釈し、各希釈液の0.1mlをMiddlebrook 7H11寒天平板¹⁴⁾に接種後、CO₂ふらん器内で37°C, 28日間培養し、発育集落数をカウントして、培養液中のCFU/mlを求めた。

結 果

1. 培地の種類による抗酸菌の発育所要日数ならびにキャピリアTBテスト

1) 発育所要日数

Table 1に示すように、BACTEC MGIT 960 シス

Table 5. CapiliaTB test of mycobacterial species subcultured in Middlebrook 7H9 broth

Species	No. of strains	Positive	False positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i>	59	59	0	0
<i>M. avium</i>	15	0	1	14
<i>M. intracellulare</i>	6	0	0	6
<i>M. kansasii</i>	10	0	0	10
<i>M. marinum</i>	6	0	6	0
<i>M. simiae</i>	1	0	0	1
<i>M. intermedium</i>	1	0	0	1
<i>M. scrofulaceum</i>	1	0	0	1
<i>M. szulgai</i>	1	0	0	1
<i>M. gordonae</i>	1	0	0	1
<i>M. interjectum</i>	1	0	0	1
<i>M. lentiflavum</i>	1	0	0	1
<i>M. xenopi</i>	1	0	0	1
<i>M. celatum</i>	1	0	0	1
<i>M. malmoeense</i>	1	0	0	1
<i>M. shimoidei</i>	3	0	0	3
<i>M. nonchromogenicum</i>	1	0	0	1
<i>M. terrae</i>	1	0	0	1
<i>M. branderi</i>	1	0	0	1
<i>M. genavense</i>	1	0	0	1
<i>M. ulcerans</i>	20	0	16	4
<i>M. shinshuense</i>	3	0	0	3
<i>M. haemophilum</i>	1	0	0	1
<i>M. fortuitum</i>	1	0	0	1
<i>M. abscessus</i>	1	0	0	1
<i>M. chelonae</i>	2	0	0	2
Total	141	59	23	59

Table 6. CapiliaTB, AccuProbe and niacin tests for 3- to 6-week-old clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria grown on 2% Ogawa medium

Species	No. of strains	CapiliaTB		AccuProbe (<i>M. tuberculosis</i> complex)		Niacin	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i> complex	63	62	1	63	0	63	0
<i>M. avium</i> complex	4	0	4	0	4	0	4
<i>M. kansasii</i> ^{a)}	5	0	5	0	5	0	5

^{a)} Identified with DDH.

テムで喀痰から分離され、アキュプローブ結核菌群で結核菌群と同定された 21 株、アキュプローブ マイコバクテリウム アビウム コンプレックスで *M. avium* complex (MAC) と同定された 4 株ならびに DDH で *Mycobacterium kansasii* と同定された 5 株、計 30 株の 10⁴~10⁵ CFU/ml の各 0.1 ml を BBL MGIT 培地 (日本ベクトン・ディッキンソン)¹⁴⁾、KRD 培地 “ニチビー” (日本 BCG)¹⁶⁾、マイコアシッド培地 (極東製薬

工業)¹⁷⁾ および 2% 小川培地へ接種して、37°C で培養した。その結果、結核菌群の平均発育所要日数は MGIT 培地 9.9 日、KRD 培地 9.8 日およびマイコアシッド培地 6.7 日、MAC では MGIT 培地 6.8 日、KRD 培地 8.3 日、マイコアシッド培地 7.0 日で、いずれも 2% 小川培地における結核菌群 14.2 日、MAC 18.8 日よりも優れていた ($p < 0.05$)。また、結核菌群ではマイコアシッド 6.7 日で MGIT 培地 9.9 日およ

Table 7. CapiliaTB, AccuProbe and niacin tests for 2- to 7-month-old clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria grown on 2% Ogawa medium

Species	No. of strains	CapiliaTB		AccuProbe (<i>M. tuberculosis</i> complex)		Niacin	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i> complex	63	63	0	63	0	61	2
<i>M. avium</i> ^{a)}	22	0	22	0	22	0	22
<i>M. intracellulare</i> ^{a)}	13	0	13	0	13	0	13
<i>M. kansasii</i> ^{a)}	1	0	1	0	1	0	1
<i>M. szulgai</i> ^{a)}	1	0	1	0	1	0	1
<i>M. fortuitum</i> ^{a)}	1	0	1	0	1	0	1

^{a)} Identified with DDH.

Table 8. CapiliaTB test for *Mycobacterium marinum*

Culture medium	Strains	Inoculum size (CFU)	Days to detection	Days after detection of positive signal in MGIT medium			
				0	7	14	21
MGIT	MA- 2	10	4	—	±	1+	2+
	MA-17	57	4	—	±	1+	2+
	MA-18	76	4	—	1+	2+	2+
	MA-19	56	4	—	±	2+	2+
MYCOACID	MA- 2	10	8	—	—	—	3+
	MA-17	57	6	—	—	1+	3+
	MA-18	76	6	—	1+	2+	2+
	MA-19	56	6	—	—	±	2+
KRD	MA- 2	10	6	—	—	—	±
	MA-17	57	6	—	—	—	±
	MA-18	76	6	—	—	—	±
	MA-19	56	8	—	—	—	1+
2% Ogawa	MA- 2	10	5	—	—	—	—
	MA-17	57	5	—	—	—	—
	MA-18	76	5	—	—	—	—
	MA-19	56	5	—	—	—	—

び KRD 培地 9.8 日より有意に優れていた ($p < 0.05$) が, *M. kansasii*, MAC ではこれら 3 培地間に有意差は見られなかった。

2) キャピリア TB テスト

上記 1) の結核菌群 21 株, *M. kansasii* 5 株および MAC 4 株を MGIT, KRD, マイコアシッドおよび小川の各培地に接種してこれを 37°C で培養し, 発育が陽性になった日に前 3 者では培養液を, また小川培地では発育集落を用いてキャピリア TB を行った。その結果は Table 2 に示すように, MGIT 培地および小川培地では供試 21 株中全株が強陽性, KRD 培地では 21 株中 16 株が弱～強陽性, 5 株が偽陽性であった

が, マイコアシッド培地では 21 全株が陰性で, 発育が陽性になってから 7 日後に 7 株が偽陽性, 14 株が弱～強陽性となった。

2. BACTEC MGIT 960 システムにより分離された初代分離抗酸菌

1) 同定

Table 3 に示すように, 分離抗酸菌 71 株のうち 48 株はキャピリア TB およびアキュプローブ結核菌群陽性, さらに前処理喀痰の 2% 小川培地上の培養菌について行ったナイアシン蓄積が陽性で結核菌群と同定された。他方, キャピリア TB 陰性の 23 株中 19 株はアキュプローブ マイコバクテリウム アビウム コンブ

レックスによって MAC と同定され、他の 4 株は DDH により 1 株は *M. kansasii*, 1 株は *Mycobacterium szulgai* および 2 株は *Mycobacterium abscessus* と同定された。

2) 菌培養陽性時の CFU

Table 4 に示すように、結核菌群では $2.0 \sim 9.2 \times 10^4 \sim 1.4 \sim 7.7 \times 10^5$ CFU/ml, 平均 2.4×10^5 CFU/ml, MAC では $6.7 \times 10^6 \sim 1.3 \sim 5.4 \times 10^7$ CFU/ml, 平均 2.9×10^7 CFU/ml, *M. kansasii* では 4.2×10^6 CFU/ml, *M. szulgai* では 1.0×10^6 CFU/ml, *M. abscessus* では $1.0 \times 10^5 \sim 7.0 \times 10^6$ CFU/ml であった。

3. 保存抗酸菌のキャピリア TB

1) Middlebrook 7H9 プロス継代菌

Middlebrook 7H9 プロス継代の研究室保存株の 0.5 ml を新たに調製した同種培地 7 ml に移植し、37°C (*M. marinum*, *M. ulcerans* は 32°C), 14~28 日培養の 26 菌種、141 株についてキャピリア TB を行った。その結果は Table 5 に示すように、結核菌群 59 株は全株が陽性 (濃赤紫色) であったのに対して非結核性抗酸菌 82 株のうち偽陽性を呈した *M. marinum* 6 株中 6 株, *M. ulcerans* 20 株中 16 株および *Mycobacterium avium* 15 株中 1 株を除いた 22 菌種、59 株はすべて陰性であった。

2) 小川培地培養菌

培養菌の保存期間とキャピリア TB の反応性との関係について検討した。

(1) 菌発育後 3~6 週間室温保存菌

Table 6 に示すように供試 72 株中結核菌群と同定された 63 株はアキュプローブ結核菌群およびナイアシン蓄積が陽性で、キャピリア TB はうち 1 株を除く 62 株が陽性であったが、他の 9 株はこれらのいずれのテストも陰性で、うち 4 株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で MAC, 5 株は DDH で *M. kansasii* と同定された。

(2) 菌発育後 2~7 カ月室温保存菌

Table 7 に示すように、供試 101 株中アキュプローブ結核菌群およびキャピリア TB 陽性 63 株は結核菌群と同定されたが、これらの中には 2 株のナイアシン蓄積陰性株があった。他の 38 株はこれらいずれのテストも陰性で、DDH により 22 株は *M. avium*, 13 株は *Mycobacterium intracellulare*, 1 株は *M. kansasii*, 1 株は *M. szulgai*, 1 株は *Mycobacterium fortuitum* と同定された。

4. *M. marinum* のキャピリア TB

Table 8 に示すように、2% 小川培地継代の研究室保存の *M. marinum* 4 株の Middlebrook 7H9 プロ

ス中 32°C, 5 日培養菌 ($10 \sim 76 \times 10^3$ CFU/ml) の滅菌蒸留水による 100 倍希釈液の 0.1 ml (接種生菌 CFU: $10 \sim 76$) を接種した BBL MGIT, マイコアシッド, KRD および 2% 小川の各培地における平均発育日数はそれぞれ 4, 6.5, 6.5 および 5 日であった。この際、供試いずれの培地においても培養が陽性となった日におけるキャピリア TB は陰性であったが、その後、MGIT 培地およびそれより若干遅れてマイコアシッド培地では日時の経過とともに反応は出現、増強し、21 日後では全株が中等度~強陽性を呈したが、KRD 培地では 21 日後になって 1 株が弱陽性、3 株が偽陽性となったのに対して小川培地では観察期間中全株が陰性であった。

考 察

ヒトからヒトへの感染性のある結核菌群を、その感染性のないとされている非結核性抗酸菌と鑑別することは疫学ならびに患者治療の観点からも極めて重要なことである。従来、これら両者間の鑑別には Konno らのナイアシンテスト¹⁸⁾が国際的に広く用いられてきたが、本法を実施するにあたっては菌の培養に長時間を要し、また結核菌群および非結核性抗酸菌の中に例外株が見られることなどが指摘されてきた¹⁹⁾。その後、分子遺伝学的同定法としてアキュプローブ, DDH, 核酸増幅法などが広く臨床検査分野に導入されて今日に至っている。これらは極めて優れた鑑別・同定法であるが、操作が煩雑で、供試菌の発育までに日時を要するなどの欠点があり、迅速、簡便で、感度と特異性が高く、特殊な機器を要しない検査法の開発が望まれてきた。これらの問題点を解決した新しい検査法として登場したのが Tomiyama ら⁷⁾により開発されたキャピリア TB である。本法は結核菌群が特異的に産生する MPB64 と呼ばれる分子量 22,400 の菌体外分泌タンパク質を測定対象とした免疫クロマトグラフィーである。MPB64 タンパク質は、Harboe ら²⁰⁾, Nagai ら²¹⁾によって *Mycobacterium bovis* BCG 東京株から単離され、その後 Li ら²²⁾によって MPB64 遺伝子が結核菌群と一部の BCG 亜種に存在することが報告された。キャピリア TB に関する諸家の報告によれば、検体として液体培地 (MGIT, Dubos, MB-REDOX, BACTEC 12B)^{8~13)} の培養液、あるいは固型培地 (小川, Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H11 寒天)^{7~11, 13)} 培養菌が供試されている。われわれはキャピリア TB を行うにあたりいずれの培地での菌の培養が最も適しているかについて以下のような検討を試みた。すなわち、BACTEC MGIT 960 システ

ムで喀痰から分離された結核菌群, MAC および *M. kansasii*, 計 30 株を BBL MGIT, KRД, マイコアシッドおよび 2% 小川の各培地に接種したところ, 前 3 種の培地における菌の発育所要日数は小川培地よりも有意に短かったが, 培養が陽性となった日におけるキャピリア TB は結核菌群では MGIT および 2% 小川各培養菌では強陽性を示したのに対して, KRД培養菌では偽陽性ないし強陽性とさまざまであり, またマイコアシッド培養菌では全株陰性であった。したがって, 本テストを行うにあたっては発育が迅速で, かつその反応性が優れている MGIT 培地による培養が最も適しているように思われる。今回別途行った BACTEC MGIT 960 システムおよび 2% 小川培地による分離抗酸菌 71 株中結核菌群と同定された 48 株の平均発育所要日数は 10 日で, キャピリア TB, アキュプローブ結核菌群, ナイアシン蓄積のいずれも陽性であったが, 残りの非結核性抗酸菌の 23 株はこれらのいずれも陰性であった。この際, MGIT 培地が抗酸菌陽性シグナルを示した日の培地中の菌の CFU は結核菌群で $2.0 \times 10^4 \sim 7.7 \times 10^5$ /ml, 平均 2.4×10^5 /ml, その他の抗酸菌 (MAC, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. abscessus*) では $1.0 \times 10^5 \sim 5.4 \times 10^7$ /ml, 平均 1.6×10^7 /ml であった。キャピリア TB の検出感度は液体培地 (Middlebrook 7H9, MGIT) あるいは小川培地での培養菌を用いた検討によれば, $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml^{8~10)} で, われわれの成績はこれらに一致するものであった。

次に研究室継代保存菌のキャピリア TB について見ると, Middlebrook 7H9 ブロス保存の 26 抗酸菌種 141 株では先人^{7~13)}の液体培地 (MGIT, Dubos, MB-REDOX, BACTEC 12B) を用いての報告に見られるように結核菌群は陽性, 非結核性抗酸菌では, 偽陽性反応を示した *M. marinum* を除き, 陰性であった。さらに今回われわれの検討で皮膚の進行性壊死性潰瘍の原因菌である *M. ulcerans* の 4 週間培養液がキャピリア TB 偽陽性反応を呈することが明らかとなった。また今回供試した *M. avium* の中の 1 株に偽陽性反応が見られた。現在のところ, これらの菌種のキャピリア TB の偽陽性反応を呈する機序については明らかではない。*M. marinum* のキャピリア TB については MGIT 培養液を用いた阿部ら⁸⁾は 3 株中 1 株, また Hasegawa ら¹¹⁾は 6 株中全株が陰性であったと報告しており, われわれの Middlebrook 7H9 ブロス 2 週間培養菌についての 6 株中全株が偽陽性であったという成績と異なるものであった。そこでその理由を明らかにするために研究室保存の *M. marinum* 4 株を

BBL MGIT, KRД, マイコアシッドおよび 2% 小川の各培地に接種し, 菌発育が陽性となった日にキャピリア TB を行ったところ, 培地の種類に関係なく全株が陰性であった。その後培養日数の経過とともに KRД培地では偽陽性~陽性, BBL MGIT 培地, マイコアシッド培地では中等度~強陽性と反応の増強が見られたが, 小川培養菌では終始陰性であった。したがって, *M. marinum* のキャピリア TB は培養日数ならびに培地の種類によって異なることが分かった。その理由については推測の域を出ないが, Middlebrook 7H9 ブロスあるいはその変法培地のような液体培地では抗 MPB 64 モノクローナル抗体と反応性を有するが, それとの親和性が強くない抗原が産生されやすく, 卵をベースとした小川培地では産生されにくいかもしれない。

小川培地で菌発育後 3~6 週間ならびに 2~7 カ月間室温に保存した抗酸菌のキャピリア TB について検討したところ, 保存期間に関係なく結核菌群ではキャピリア TB (1 株を除く), アキュプローブ結核菌群全株, ナイアシン蓄積 (2 株を除く) が陽性であり, その他の抗酸菌ではこれらのいずれのテストも陰性であった。Hirano ら²³⁾はわが国で分離された 12 株 (われわれの分離した 1 株を含む) のキャピリア TB 陰性結核菌群はナイアシン蓄積, ピラジナミダーゼ, 硝酸塩還元, TCH 感受性の諸性状ではキャピリア TB 陽性結核菌群と何ら異なる点はなかったが, *mpb64* 遺伝子内の変異によってタンパク質の C 末端領域のディリーションが起こった結果, 不完全タンパク質の産生に至ったものと考えられると述べている。

(本論文の要旨は 23rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 2002 年 6 月 23~26 日, 於クロアチアで報告された。)

文 献

- 1) 阿彦忠之, 石井信克, 今井順子, 他. 2005. 結核の統計 2005. p. 1-119 (財団法人結核予防会編), 財団法人結核予防会, 東京.
- 2) 石川信克, 内村和宏, 大森正子, 他. 2004. 結核の統計 2004. p. 1-119 (厚生労働省健康局結核感染症課監), 財団法人結核予防会, 東京.
- 3) 斎藤 肇. 2000. 抗酸菌の同定. 新結核検査指針 2000. p. 43-77 (日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編), 財団法人結核予防会, 東京.
- 4) 古賀宏延. 2000. 核酸増幅法. 新結核検査指針 2000. p. 78-94 (日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編), 財団法人結核予防会, 東京.
- 5) Tisdall, P. A., D. R. DeYoung, G. D. Roberts, et al. 1982. Identification of clinical isolates of

- mycobacteria with gas-liquid chromatography. A 10-month follow-up study. *J. Clin. Microbiol.* 16: 400-402.
- 6) Butler, W. R., M. M. Floyd, V. Silcox, et al. 1996. Standardized Method for HPLC Identification of Mycobacteria. Steering Committee Members of the HPLC Users Group, edition. p. 1-99, U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, CDC, Atlanta.
 - 7) Tomiyama, T., K. Matsuo, C. Abe. 1997. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* by an immunochromatography using anti-MPB64 monoclonal antibodies. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1 (Suppl. 1): S59.
 - 8) Abe, C., K. Hirano, T. Tomiyama. 1999. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3693-3697.
 - 9) 尾西裕美, 松浦 徹, 吉友和夫, 他. 1999. 抗MPB64抗体を用いたイムノクロマトグラフィーによる結核菌群迅速同定法の検討. *日本臨床微生物学雑誌* 9: 228-233.
 - 10) 叶 一乃, 飯草正実, 森 三樹雄. 2001. イムノクロマトグラフィーによる結核菌群同定キット Capilia® TB の評価. *臨床と微生物* 28: 297-301.
 - 11) Hasegawa, N., T. Miura, K. Ishii, et al. 2002. New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: A multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 40: 908-912.
 - 12) 長谷川美幸, 小山悦子, 内野卯津樹, 他. 2003. 免疫クロマトグラフィーによる結核菌群迅速同定に関する検討. *感染症学雑誌* 77: 110-115.
 - 13) 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: 1490-1411.
 - 14) 斎藤 肇. 2000. 分離培養法. 新結核検査指針 2000, p. 27-42 (日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編), 財団法人結核予防会, 東京.
 - 15) Della-Latta, P. 2004. Mycobacteriology and antimycobacterial susceptibility testing. p. 7.4.2.1-7.4.2.4, In: *Clinical microbiology procedures handbook*, 2nd ed. (Isenberg, H. D. ed.), America Society for Microbiology. Washington, D.C.
 - 16) 前田重隆, 吉田伸子, 林 雪子. 2002. KRD 培地 “ニチビー” およびその検査システムの評価. *医学検査* 51: 1017-1021.
 - 17) 阿野裕美, 吉多仁子, 石田智恵子, 他. 2001. 酸化還元インジケーター (STC) を用いた抗酸菌迅速培養システム (マイコアシッド) と酸素反応性蛍光センサーを用いた抗酸菌迅速培養システム (MGIT) および新しく開発された 2% 小川培地 (S) の比較検討. *結核* 76: 729-739.
 - 18) Konno, K., R. Kurzman, K. T. Bird, et al. 1958. Differentiation of human tubercle bacilli from atypical acid-fast bacilli. *Amer. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* 77: 666-674.
 - 19) Tsukamura, M. 1974. Niacin-negative *Mycobacterium tuberculosis*. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 10: 101-103.
 - 20) Harboe, M., S. Nagai, M. E. Patarroyo, et al. 1986. Properties of protein MPB64, MPB70 and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 52: 293-302.
 - 21) Nagai, S., H. G. Wiker, M. Harboe, et al. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 59: 372-382.
 - 22) Li, H., J. C. Ulstrup, T. O. Jonassen, et al. 1993. Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 61: 1730-1734.
 - 23) Hirano, K., A. Anno, M. Takahashi, et al. 2004. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia-TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42: 390-392.

Evaluation of CapiliaTB for Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex, with Special Reference to the Culture Medium

Akemi Kodama,¹⁾ Hajime Saito²⁾

¹⁾ Clinical Laboratory, National Hospital Organization, Higashi-hiroshima Medical Center

²⁾ Hiroshimashi Environment and Health Association

CapiliaTB is a newly developed *Mycobacterium tuberculosis* complex identification assay based on immunochromatography utilizing anti-MPB64 monoclonal antibody. Of 30 cultures tested on the day when BBL MGIT supplemented with MGIT OADC and MGIT PANTA, KRD "Nichibi," MYCOACID or 2% Ogawa medium which was inoculated with 0.1 ml of 10^4 – 10^5 CFU/ml of isolates from sputum with BACTEC MGIT 960 system became positive for acid-fast bacilli, 21 *M. tuberculosis* complex were strongly positive in MGIT, false positive to strongly positive in KRD and strongly positive in Ogawa for CapiliaTB, while no positive reaction was observed in MYCOACID. Of 141 laboratory stock cultures of 26 mycobacterial species grown in Middlebrook 7H9 broth, all 59 *M. tuberculosis* strains displayed positive reactions. Among nontuberculous mycobacteria, 59 strains of 22 species showed no positive signal and 6 of 6 *Mycobacterium marinum*, 16 of 20 *Mycobacterium ulcerans* and 1 of 15 *Mycobacterium avium* showed a false positive signal. None of *M. marinum* strains grown on 2% Ogawa medium showed a positive reaction for the CapiliaTB during the course of the experiment (21 days), while all strains grown on MGIT, MYCOACID or KRD medium eventually displayed a positive reaction which intensified with time. Among 173 cultures which were isolated from sputum on 2% Ogawa medium and stocked at room temperature for 3 weeks to 7 months, 126 *M. tuberculosis* complex were positive for CapiliaTB except for one strain and for both AccuProbe and the niacin accumulation, and 47 nontuberculosis mycobacteria showed no positive reactions. These results indicate that CapiliaTB is simple, rapid and reliable identification test for *M. tuberculosis* complex in liquid culture systems, especially with MGIT or a conventional solid medium such as 2% Ogawa medium.