

[原 著]

薄層免疫クロマトグラフィー法を用いた結核菌群検出キット
「Qライン極東TB」の精度評価

五十嵐ゆり子¹⁾・近松絹代¹⁾・青野昭男¹⁾・伊 麗娜²⁾³⁾・阪下健太郎³⁾⁴⁾
大藤 貴²⁾³⁾・山田博之¹⁾・高木明子¹⁾・御手洗聡¹⁾³⁾

¹⁾ 結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科

²⁾ 結核予防会複十字病院呼吸器内科

³⁾ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

⁴⁾ 東京都立多摩総合医療センター呼吸器科

(平成 27 年 6 月 20 日受付, 平成 27 年 12 月 8 日受理)

結核菌群が特異的に産生する MPT64 抗原の検出キットである Q ライン極東 TB (極東製薬工業) とキャピリア TB-Neo (タウンズ) について精度評価を行った。被検菌は抗酸菌基準株 151 種 (結核菌群 4 種, 非結核性抗酸菌 147 種), 臨床分離菌 155 株 (結核菌群 105 株, 非結核性抗酸菌 50 株) とした。結核菌群基準株 4 種についてはどちらのキットも陽性であった。非結核性抗酸菌基準株 147 種について, Q ライン極東 TB は 146 種を陰性と判定し, *Mycobacterium riyadhense* に対してのみ偽陽性を示した。キャピリア TB-Neo は 147 種全てを陰性と判定した。臨床分離株に対する Q ライン極東 TB の感度は 97.1% (102/105), 特異度は 100% (50/50) であり, キャピリア TB-Neo も全て同じ結果を示した。結核菌群偽陰性を示したのは, *mpt64* 遺伝子の一部および全体を欠失している *Mycobacterium tuberculosis* 2 株と, *Mycobacterium bovis* BCG Connaught 1 株であった。小川培地および MGIT 陽性培養液を用いた結核菌基準株における検討では, 全て Q ライン極東 TB 陽性であった。結核菌基準株の最小検出感度に関する検討では, Q ライン極東 TB は 5.7×10^5 CFU/mL, キャピリア TB-Neo は 2.9×10^6 CFU/mL まで明瞭に検出可能であった。

Q ライン極東 TB は *M. riyadhense* に対する偽陽性を示したものの, コロニーが白色である等の特徴から容易に鑑別可能と考えられた。また臨床分離株についてはキャピリア TB-Neo と同等の高い検出精度を示した。しかしながら, Q ライン極東 TB も *mpt64* 遺伝子に変異を持つ株に対しては偽陰性となることから, キャピリア TB-Neo 等と同様の注意が必要と考えられた。

Key words: 結核菌群同定, イムノクロマトグラフィー法, 迅速診断

序 文

日本国内における結核罹患数は近年減少しているものの, 依然年間約 2 万人の新規結核患者が登録されて

いる¹⁾。他方, 非結核性抗酸菌症は増加傾向にあり, 2014 年に実施されたアンケート調査によると人口 10 万人対の推定罹患率は 14.9 であり, 同期間の結核の暫定罹患率 (12.9) よりも高かったと報告されている²⁾。すなわち, 抗酸菌感染症と診断した場合の半数以上が肺非結核性抗酸菌症ということになる。結核と非結核性抗酸菌症は感染制御上の扱いや治療方針が異なる為, 両者の迅速な鑑別は極めて重要である。抗酸菌の同定方法には生化学法, 遺伝子プローブ法や核酸増幅法があるが³⁾, 操作が煩雑であること, 特別な機器や

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部細菌科
五十嵐ゆり子
TEL: 042-493-5711 (ext. 396)
FAX: 042-492-4600
E-mail: meriko34@gmail.com

技術を要すること、また安全性確保を含むコストの問題等から、実施可能な施設は限られている。

結核菌群が特異的に産生する MPT64 抗原⁴⁾⁵⁾に対応するモノクローナル抗体を用いた免疫クロマトグラフィキットは、迅速で簡便かつ安価である等の利点から結核菌群の同定キットとして広く用いられている。Q ライン極東 TB (極東製薬工業) は同原理による結核菌群の同定キットとして新たに開発されたものである。今回、抗酸菌基準株および臨床分離株における Q ライン極東 TB の精度評価、結核菌基準株における最小検出感度について検討し、同時に実施したキャピリア TB-Neo (タウンズ) との精度比較を行ったので報告する。

対象と方法

1. 被検抗酸菌株

抗酸菌基準株は結核研究所抗酸菌部の保有する結核菌群 4 種 (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*)、非結核性抗酸菌 (NTM) 147 種の計 151 種を用いた (Table 1)。

結核菌臨床株はミロクメディカルラボラトリーより提供された 105 株を用いた (Table 2)。この内 *M. tuberculosis* 2 株について *mpt64* 遺伝子に変異を持つことが事前に明らかとなっており、1 株は *mpt64* 遺伝子の 196 番目から 63 bp が欠失、もう 1 株は Rv1977 の 874 番目から Rv1981c の 905 番目までの 3,659 bp、すなわち *mpt64* 遺伝子を含んだ大幅な欠失が認められ、キャピリア TB-Neo 陰性が確認されている⁶⁾。NTM 臨床株は 2002 年及び 2007 年に結核療法研究議会在が実施した耐性結核菌全国調査にて分離された 49 株と、結核研究所抗酸菌部で収集した 1 株の計 50 株を用いた (Table 2)。同定は各施設にて TaqManPCR 法、TRC 法、DDH 法、16S rRNA 解析のうち 1 つ以上の方法を用いて実施され、同定不能の場合は当研究所にて 16S rRNA 解析を行っている⁶⁾。

2. 結核菌基準株及び抗酸菌臨床分離株に対する検討

被検対象株をマイコプロス (極東製薬工業) に接種し、McFarland No. 1 になるまで培養した。ただし生育にヘモグロビンもしくはヘミンを要する *Mycobacterium haemophilum* に限り 60 µM ヘミン添加 Middlebrook 7H9 培地を用いた。得られた培養菌液 200 µL に、キット付属の希釈液を等量加えて混和し、Q ライン極東 TB テストプレートの試料滴下部に 80 µL 滴下した。15 分後、判定部に出現するラインの有無から

陽性・陰性を判定した (Figure 1)。キャピリア TB-Neo では同じ培養菌液 80 µL を用い、希釈液等はいずれそのまま試料滴下部に滴下した。15 分後、判定部に出現するラインの有無から陽性・陰性を判定した。

3. 最小検出感度の検討

結核菌基準株をマイコプロスに接種し、McFarland No. 1 になるまで培養した。得られた菌液を、滅菌精製水を用いて 5 倍、25 倍、125 倍、625 倍、3125 倍の 5 段階に希釈し、それぞれ Q ライン極東 TB およびキャピリア TB-Neo を実施した。また使用した菌液 100 µL を Middlebrook 7H10 培地に接種し、CFU を算定した。

4. 結核菌基準株を用いたその他培地での検討

結核菌基準株を用いて小川培地と MGIT 陽性培地における検討を行った。結核菌基準株 (H37Rv 株) を 2% 小川培地 (極東製薬工業) に培養し、コロニーをキット付属の希釈液 200 µL に懸濁した後、Q ライン極東 TB を実施した。結核菌基準株を BACTEC MGIT 960tube (Becton Dickinson) に接種し、BACTEC MGIT 960 システムにより結核菌群の発育陽性を確認した。陽性を確認後 24 時間以内に MGIT 培養液 200 µL を等量の希釈液に加えて混和し、Q ライン極東 TB を実施した。

結 果

結核菌群基準株について、Q ライン極東 TB とキャピリア TB-Neo は 4 菌種全てを陽性と判定した。NTM 基準株 147 種について、Q ライン極東 TB は 146 菌種を陰性と判定し、*Mycobacterium riyadhense* 1 菌種のみ陽性と判定した。キャピリア TB-Neo は 147 菌種全て陰性であった (Table 1)。両者の一致率は 99.3%、κ 指数は 0.854 であった。

結核菌群臨床分離株について両者の結果は全て一致し、105 株中 102 株 (97.1%) を陽性、3 株 (2.9%) を陰性と判定した。陰性判定となった 3 株のうち、2 株は *mpt64* 遺伝子に変異を持つ *M. tuberculosis*、1 株は *Mycobacterium bovis* BCG Connaught 株であった。*Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株は両者とも陽性を示した。NTM 臨床分離株 50 株については、両者とも全ての株で陰性であった (Table 2)。

結核菌基準株を用いた最小検出感度の検討について、Q ライン極東 TB は 1.1×10^5 CFU/mL、キャピリア TB-Neo は 5.7×10^5 CFU/mL まで検出したが、各最小検出濃度におけるバンドは非常に不明瞭であった。明瞭に判定可能だったのは、Q ライン極東 TB は 5.7×10^5 CFU/mL、キャピリア TB-Neo は 2.9×10^6

Table 1-1. Comparative results of Q-Line Kyokuto TB and Capilia TB-Neo with type strains

Species	Strain	Q-Line Kyokuto TB	Capilia TB- Neo	Species	Strain	Q-Line Kyokuto TB	Capilia TB- Neo
<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>	ATCC19977	-	-	<i>M. kumamotoense</i>	JCM13453	-	-
<i>M. abscessus subsp. bolletii</i>	JCM15297	-	-	<i>M. kyorinense</i>	JCM15038	-	-
<i>M. africanum</i>	ATCC25420	+	+	<i>M. lacus</i>	JCM15657	-	-
<i>M. agri</i>	ATCC27406	-	-	<i>M. lentiflavum</i>	ATCC51985	-	-
<i>M. aichiense</i>	ATCC27280	-	-	<i>M. litorale</i>	JCM17423	-	-
<i>M. algericum</i>	DSM45454	-	-	<i>M. llutzerense</i>	JCM16229	-	-
<i>M. aromaticivorans</i>	JCM16368	-	-	<i>M. longobardum</i>	DSM45394	-	-
<i>M. arosiense</i>	DSM45069	-	-	<i>M. mageritense</i>	ATCC700351	-	-
<i>M. arupense</i>	DSM44942	-	-	<i>M. malmoense</i>	ATCC29571	-	-
<i>M. asiaticum</i>	ATCC25276	-	-	<i>M. mantenii</i>	JCM18113	-	-
<i>M. aubagnense</i>	JCM15296	-	-	<i>M. marinum</i>	ATCC00927	-	-
<i>M. aurum</i>	ATCC23366	-	-	<i>M. marseillense</i>	JCM17324	-	-
<i>M. austroafricanum</i>	ATCC33464	-	-	<i>M. microti</i>	ATCC19422	+	+
<i>M. avium subsp. avium</i>	ATCC25291	-	-	<i>M. minnesotense</i>	JCM17932	-	-
<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	ATCC19698	-	-	<i>M. monacense</i>	JCM15658	-	-
<i>M. avium subsp. silvaticum</i>	ATCC49884	-	-	<i>M. montefiorensis</i>	ATCCBAA-256	-	-
<i>M. bacteremicum</i>	DSM45578	-	-	<i>M. moriokaense</i>	ATCC43059	-	-
<i>M. boenickei</i>	JCM15653	-	-	<i>M. mucogenicum</i>	ATCC49650	-	-
<i>M. bohemicum</i>	JCM12402	-	-	<i>M. murale</i>	JCM13392	-	-
<i>M. bovis</i>	ATCC19210	+	+	<i>M. nebraskense</i>	DSM44803	-	-
<i>M. branderi</i>	ATCC51789	-	-	<i>M. neoaurum</i>	ATCC25795	-	-
<i>M. brisbanense</i>	JCM15654	-	-	<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC19530	-	-
<i>M. brumae</i>	ATCC51384	-	-	<i>M. noviomagense</i>	JCM16367	-	-
<i>M. canariensis</i>	JCM15298	-	-	<i>M. novocastrensis</i>	JCM18114	-	-
<i>M. celatum</i>	ATCC51131	-	-	<i>M. pallens</i>	JCM16370	-	-
<i>M. chelonae</i>	ATCC35752	-	-	<i>M. palustre</i>	DSM44572	-	-
<i>M. chimaera</i>	JCM14737	-	-	<i>M. paraffinicum</i>	ATCC12670	-	-
<i>M. chitae</i>	ATCC19627	-	-	<i>M. parafortuitum</i>	ATCC19686	-	-
<i>M. chloropenolicum</i>	ATCC49826	-	-	<i>M. parakoreense</i>	DSM45575	-	-
<i>M. chubuense</i>	ATCC27278	-	-	<i>M. parascrofulaceum</i>	JCM13015	-	-
<i>M. colombiense</i>	JCM16228	-	-	<i>M. paraseoulense</i>	JCM16952	-	-
<i>M. conceptionense</i>	JCM15299	-	-	<i>M. parmense</i>	JCM14742	-	-
<i>M. confluentis</i>	ATCC49920	-	-	<i>M. peregrinum</i>	ATCC14467	-	-
<i>M. conspicuum</i>	ATCC700090	-	-	<i>M. phlei</i>	ATCC11758	-	-
<i>M. cookii</i>	ATCC49103	-	-	<i>M. phocaicum</i>	JCM15301	-	-
<i>M. cosmeticum</i>	JCM14739	-	-	<i>M. porcinum</i>	ATCC33776	-	-
<i>M. crocinum</i>	JCM16369	-	-	<i>M. poriferae</i>	ATCC35087	-	-
<i>M. diernhoferi</i>	ATCC19340	-	-	<i>M. pseudoshottsii</i>	JCM15466	-	-
<i>M. doricum</i>	JCM12405	-	-	<i>M. psychrotolerans</i>	JCM13323	-	-
<i>M. duvalii</i>	ATCC43910	-	-	<i>M. pulveris</i>	ATCC35154	-	-
<i>M. elephantis</i>	JCM12406	-	-	<i>M. pyrenivorans</i>	JCM15927	-	-
<i>M. engbaekii</i>	ATCC27353	-	-	<i>M. rhodesiae</i>	ATCC27024	-	-
<i>M. europaeum</i>	DSM45397	-	-	<i>M. riyadhense</i>	DSM45176	+	-

Table 1-2. Comparative results of Q-Line Kyokuto TB and Capilia TB-Neo with type strains

Species	Strain	Q-Line Kyokuto TB	Capilia TB- Neo	Species	Strain	Q-Line Kyokuto TB	Capilia TB- Neo
<i>M. fallax</i>	ATCC35219	-	-	<i>M. rufum</i>	JCM16372	-	-
<i>M. farcinogenes</i>	ATCC35753	-	-	<i>M. rutilum</i>	JCM16371	-	-
<i>M. flavescens</i>	ATCC14474	-	-	<i>M. salmoniphilum</i>	DSM43276	-	-
<i>M. florentinum</i>	JCM14740	-	-	<i>M. saskatchewanense</i>	JCM13016	-	-
<i>M. fluoranthenvivorans</i>	JCM14741	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC19981	-	-
<i>M. fortuitum subsp. acetamidolyticum</i>	ATCC35931	-	-	<i>M. senegalense</i>	ATCC35796	-	-
<i>M. fortuitum subsp. fortuitum</i>	ATCC06841	-	-	<i>M. senuense</i>	JCM16017	-	-
<i>M. fragae</i>	DSM45731	-	-	<i>M. seoulense</i>	JCM16018	-	-
<i>M. frederiksbergense</i>	DSM44346	-	-	<i>M. septicum</i>	ATCC700731	-	-
<i>M. gadium</i>	ATCC27726	-	-	<i>M. setense</i>	JCM15660	-	-
<i>M. gastrii</i>	ATCC15754	-	-	<i>M. sherrisii</i>	DSM45441	-	-
<i>M. genavense</i>	ATCC51234	-	-	<i>M. shimoidei</i>	ATCC27962	-	-
<i>M. gilvum</i>	ATCC43909	-	-	<i>M. shinjukuense</i>	JCM14233	-	-
<i>M. goodii</i>	ATCC700504	-	-	<i>M. shottsii</i>	JCM12657	-	-
<i>M. gordonae</i>	ATCC14470	-	-	<i>M. simiae</i>	ATCC25275	-	-
<i>M. haemophilum</i>	ATCC29548	-	-	<i>M. smegmatis</i>	ATCC19420	-	-
<i>M. hassiacum</i>	JCM12690	-	-	<i>M. stomatepiae</i>	JCM17783	-	-
<i>M. heckeshornense</i>	DSMZ44428	-	-	<i>M. szulgai</i>	ATCC35799	-	-
<i>M. heidelbergense</i>	ATCC51253	-	-	<i>M. terrae</i>	ATCC15755	-	-
<i>M. hiberniae</i>	ATCC49874	-	-	<i>M. thermoresistibile</i>	ATCC19527	-	-
<i>M. hodleri</i>	JCM12141	-	-	<i>M. tokaiense</i>	ATCC27282	-	-
<i>M. holsaticum</i>	JCM12374	-	-	<i>M. triplex</i>	ATCC700071	-	-
<i>M. houstonense</i>	JCM15656	-	-	<i>M. triviale</i>	ATCC23292	-	-
<i>M. immunogenum</i>	DSM45595	-	-	<i>M. tuberculosis</i>	ATCC27294	+	+
<i>M. insubricum</i>	JCM16366	-	-	<i>M. tusciae</i>	JCM12692	-	-
<i>M. interjectum</i>	ATCC51457	-	-	<i>M. ulcerans</i>	ATCC19423	-	-
<i>M. intermedium</i>	ATCC51848	-	-	<i>M. vaccae</i>	ATCC15483	-	-
<i>M. intracellulare</i>	ATCC13950	-	-	<i>M. vanbaalenii</i>	JCM13017	-	-
<i>M. iranikum</i>	JCM17461	-	-	<i>M. vulneris</i>	JCM18115	-	-
<i>M. kansasii</i>	ATCC12478	-	-	<i>M. wolinskyi</i>	ATCC700010	-	-
<i>M. komossense</i>	ATCCC33013	-	-	<i>M. xenopi</i>	ATCC19250	-	-
<i>M. koreense</i>	DSM45576	-	-	<i>M. yongonense</i>	DSM45126	-	-
<i>M. kubicae</i>	ATCC700732	-	-				

CFU/mLまでであった (Table 3)。結核菌群基準株を用いた小川培地とMGIT培養液の検討においても、マイコプロスの結果と同様にQライン極東TB陽性であった。

考 察

抗酸菌基準株と抗酸菌臨床分離株を用いて、Qライン極東TBとキャピリアTB-Neoの結核菌群同定に関する精度を評価した。Qライン極東TBは基準株151種中*M. riyadhense*1種に対し偽陽性を示し、残り150

種を正しく判定した。一方キャピリアTB-Neoは151種全てを正しく判定した。臨床分離株についてQライン極東TBの結果はキャピリアTB-Neoと全て一致し、同等の検出特異性が示された。またキャピリアTB-Neoにはない菌液の希釈工程が含まれるが、最小検出感度に関しては優れていた。小川培地・MGIT陽性培地についても、結核菌基準株のみの検討ではあるが正しく判定することができた。その操作は極めて簡単であり、検査開始からわずか15分程度で判定が可能であった。

Table 2. Comparative results of Q-Line KyokutoTB and CapiliaTB-Neo with clinical MTC and NTM isolates

Species	No. of strains	Q-Line KyokutoTB		CapiliaTB-Neo	
		Positive	Negative	Positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i>	102	100	2*	100	2*
<i>M. bovis</i> BCG Tokyo	2	2	0	2	0
<i>M. bovis</i> BCG Connaught	1	0	1	0	1
<i>M. abscessus</i>	6	0	6	0	6
<i>M. avium</i>	10	0	10	0	10
<i>M. chelonae</i>	2	0	2	0	2
<i>M. fortuitum</i>	6	0	6	0	6
<i>M. gordonae</i>	4	0	4	0	4
<i>M. intermedium</i>	1	0	1	0	1
<i>M. intracellulare</i>	5	0	5	0	5
<i>M. kansasii</i>	8	0	8	0	8
<i>M. marinum</i>	1	0	1	0	1
<i>M. nonchromogenicum</i>	1	0	1	0	1
<i>M. peregrinum</i>	1	0	1	0	1
<i>M. scrofulaceum</i>	2	0	2	0	2
<i>M. szulgai</i>	1	0	1	0	1
<i>M. xenopi</i>	2	0	2	0	2

* A deletion of 63 bp in *mpt64* gene and a 3,659-bp deletion including the *mpt64* gene.

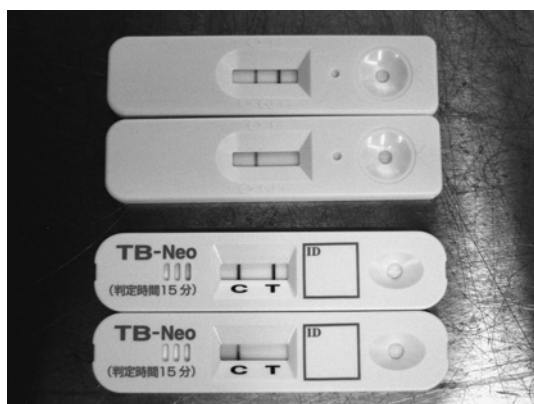


Figure 1. Identification example of MTC by the Q-Line KyokutoTB (upper) and CapiliaTB-Neo (lower) immunochromatography assay kit. Double positive of control and test lines indicates MPT64 exists, while single positive of control line indicates MPT64 absence.

結核菌基準株を用いた検出感度の検討においては、Q ライン極東 TB は 5.7×10^5 CFU/mL、キャピリア TB-Neo は 2.9×10^6 CFU/mL までを明瞭に判定することができた。キャピリア TB-Neo の添付文書には *M. bovis* BCG tokyo に対する検出感度は 1.2×10^6 CFU/

mL と記載されており、使用した菌種は異なるが今回のキャピリア TB-Neo の結果とほぼ同じ値となった。臨床分離株における MGIT 陽性培養液を用いた検討では全てキャピリア TB 陽性と報告されている⁷⁾⁸⁾。最小検出感度においてキャピリア TB-Neo に劣らないことから、MGIT 陽性培養液においても Q ライン極東 TB の有用性が期待される。

Q ライン極東 TB とキャピリア TB-Neo の臨床分離株に対する感度は 97.1% (102/105)、BCG 亜株を除くと 98.0% (100/102)、特異度は 100% (50/50)、両者の一致率は 100% であった。MPT64 抗原は結核菌群が特異的に産生・分泌するタンパク質であり⁴⁾⁵⁾、結核菌群同定の標的として有効であるが、稀に *mpt64* 遺伝子に変異や欠失を持つ株による偽陰性が報告されている。免疫クロマトグラフィー法は抗体の認識部位に標的抗原が結合することが呈色の最低条件の一つである。*mpt64* 遺伝子の部分的欠失により不完全な MPT64 抗原が合成された場合、また遺伝子全体が欠失し MPT64 抗原を産生しない場合は、結果として結核菌群が存在しようとも陰性と判定されると一般に考えられている。Hirano ら⁹⁾の報告では、臨床分離結核菌群の 0.8% (3/384) に *mpt64* 遺伝子の変異によるキャピリア TB 偽陰性を認めている。また Chikamatsu ら⁶⁾の報告では 0.6% (3/500) にキャピリア TB-

Table 3. Detection sensitivity of Q-Line KyokutoTB and CapiliaTB-Neo with H37Rv

Dilution	CFU/mL	Q-Line KyokutoTB	CapiliaTB-Neo
Mcfarland No. 1×1	7.2×10 ⁷	+	+
Mcfarland No. 1×5	1.4×10 ⁷	+	+
Mcfarland No. 1×5 ²	2.9×10 ⁶	+	+
Mcfarland No. 1×5 ³	5.7×10 ⁵	+	± *
Mcfarland No. 1×5 ⁴	1.1×10 ⁵	± *	-
Mcfarland No. 1×5 ⁵	2.3×10 ⁴	-	-

*A very weak signal.

Neo 偽陰性を認めており、同一の偽陰性株 3 株を今回の対象株に用いたが、Q ライン極東 TB においても陰性（非結核菌群）と判定された。

BCG 亜株の中には *mpt64* 遺伝子をコードしている RD2 領域が欠失し、MPT64 抗原を産生しない株が存在する⁴⁾⁵⁾¹⁰⁾。今回 RD2 領域を持たない Connaught 株は陰性、一方 RD2 領域を持つ Tokyo 株は陽性となった。日本国内で BCG が分離されるとすれば、BCG ワクチン接種および膀胱内注入療法（イムノブラダー膀胱注用、日本化薬）に用いられる Tokyo 株、同じく膀胱内注入療法に用いる Connaught 株（イムシスト膀胱注用、サノフィ）にはほぼ限られている。しかしそれらによる BCG 感染症はごく稀である¹¹⁾¹²⁾。Connaught 株やその他 MPT64 タンパク質を産生しない BCG 株の検出は、ターゲットの異なる同定法を用いることが望ましい。16S rRNA を標的とする TaqManPCR 法、TRC 法、DDH 法、あるいは *gyrB* 遺伝子および IS6110 領域を標的とする LAMP 法などを用いれば結核菌群として検出可能と予想される。結核と BCG の鑑別をする場合は、マルチプレックス PCR¹³⁾¹⁴⁾が有効であり、BCG 亜種の同定まで可能である。

今回評価した抗酸菌基準株に対しては、Q ライン極東 TB は *M. riyadhense* に対してのみ偽陽性を示し、キャピリア TB-Neo は偽陽性、偽陰性ともに認めなかった。しかし *M. riyadhense* は R 型の白色コロニーを形成する為¹⁵⁾、コロニー性状やコード形成の有無により結核菌との鑑別が可能と考えられる。*M. riyadhense* は 2009 年に新たに新種登録された遅育性の NTM である。16S rRNA 遺伝子の系統解析では *M. szulgai* に最も近く、ESAT-6 及び CFP-10 をコードしている RD1 領域を保有している¹⁵⁾。Hain GenoType MTBC (Hain Lifescience) と Hain GenoType CM (Hain Lifescience) に対し結核菌群偽陽性を示すと報告されており¹⁵⁾、これは MPT64 ではなく RD1 領域が検出

された為と考えられる。万が一 *M. riyadhense* の感染が疑われた場合、抗酸菌の同定に用いる 16S-23S ITS のシーケンス解析によって同定できる¹⁶⁾。これまでにサウジアラビア¹⁵⁾¹⁷⁾、韓国¹⁸⁾、フランス、バーレーン¹⁹⁾において計 6 症例の報告があるが、日本での報告はまだない。報告された株は全て Rifampicin, Ethambutol 感受性であり、患者は若年者が多く（平均年齢 30.0 歳）、また全ての症例で治療は成功したと報告されている^{15)17)~19)}。

免疫クロマトグラフィー法による偽陽性は過去にくつか報告されている^{6)~8)}。キャピリア TB-Neo の前駆品であるキャピリア TB では *Mycobacterium marinum* 偽陽性が報告されていたが⁷⁾⁸⁾、キャピリア TB-Neo では改善されている⁶⁾。今回使用した対象株の中に *M. marinum* 基準株および臨床分離株の計 2 株が含まれ、基準株は前キャピリア TB 偽陽性と報告される株の 1 つであるが、Q ライン極東 TB はどちらも正しく陰性と判定した。児玉ら⁸⁾の報告では *M. marinum* を Middlebrook 7H9 培地および同培地をベースとした液体培地で培養した場合のみキャピリア TB 陽性を示し、一方小川培地を用いた場合では正しく陰性判定となることから、培地が *M. marinum* 偽陽性に大きく影響することが示唆されている。*M. riyadhense* における偽陽性に関しても、培地による影響を考慮し小川培地を用いて再検討したが結果は変わらず陽性であった（データ未掲載）。*M. riyadhense* 偽陽性の原因については、キャピリア TB-Neo と Q ライン極東 TB に使用されているモノクローナル抗体の認識部位が異なる為、*M. riyadhense* の産生する MPT64 と似た構造の抗原と反応したと予想されるが、推測の域を出ない。今後抗酸菌の分類が進むにつれて免疫クロマトグラフィーに限らず同定法の偽陽性は増えていくことが予想され、患者背景、臨床症状、塗抹鏡検、コロニー性状、他の診断法などを合わせた

総合的な判断が引き続き重要であると考えられた。

両キットの異なる点について、Q ライン極東 TB における *M. riyadhense* 偽陽性が認められたが、コロニー性状の違いから容易に鑑別可能と考えられた。また操作にキャピリア TB-Neo にはない菌液の希釈工程が含まれるが、検出感度においては劣るところはなかった。結果として、Q ライン極東 TB は高い同定精度を示し、結核菌群の検出に有用であると考えられた。一方で *mpt64* 遺伝子に変異を持つ結核菌株に対してはキャピリア TB-Neo と同様に偽陰性を示し、その点は使用上の留意点であると考えられた。

謝辞：本研究において使用した菌株の一部は結核療法研究協議会による全国耐性結核菌調査およびミロクメディカルラボラトリーにて収集された抗酸菌を使用いたしました。心より感謝申し上げます。

利益相反：申告すべき利益相反はありません。

文 献

- 1) 結核予防会. 2014. 結核の統計 2014. 結核予防会, 東京.
- 2) 倉島篤行. 2015. NTM の疫学. 結核 90 (2): 142.
- 3) 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. 結核予防会, 東京.
- 4) Harboe, M., S. Nagai, N. Cruz, et al. 1986. Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun 52: 293-302.
- 5) Li, H., J.C. Ulstrup, M. Harboe, et al. 1993. Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun 61: 1730-1734.
- 6) Chikamatsu, K., A. Aono, S. Mitarai, et al. 2014. Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. BMC Infect Dis 14: 54.
- 7) Abe, C., K. Hirano, T. Tomiyama. 1999. Simple and rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 37: 3693-3697.
- 8) 児玉朱実, 齋藤 肇. 2007. 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—. 日本臨床微生物学会誌 17: 109-118.
- 9) Hirano, K., A. Aono, C. Abe, 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.
- 10) Behr, M.A., M.A. Wilson, P.M. Small, et al. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science 284: 1520-1523.
- 11) 小山 明, 戸井田一郎, 中田志津子. 2009. BCG 接種後の骨炎. 結核 84: 125-132.
- 12) 山下和昭, 富安一夫, 戸井田一郎, 他. 2000. イムノブラダー発売後の副作用発現状況. BCG・BRM 療法研究会誌 24: 81-88.
- 13) Bedwell, J., S.K. Kairo, M.A. Behr, et al. 2001. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. Vaccine 19: 2146-2151.
- 14) Seki, M., A. Sato, I. Honda, et al. 2005. Modified multiplex PCR for identification of Bacillus Calmette-Guerin substrain Tokyo among clinical isolates. Vaccine 23: 3099-3102.
- 15) Van Ingen, J., S.A. Al-Hajj, D. van Soolingen, et al. 2009. *Mycobacterium riyadhense* sp. nov., a non-tuberculous species identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex by a commercial line-probe assay. Int J Syst Evol Microbiol 59: 1049-1053.
- 16) Kirschner, P., B. Springer, U. Vogel, et al. 1993. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. 31: 2882-2889.
- 17) Saad, M.M., A.N. Alshukairi, A.S. Omrani, et al. 2015. *Mycobacterium riyadhense* infections. Saudi Med J 36: 620-625.
- 18) Choi, J.L., J.H. Lim, J. Jeong, et al. 2012. Lung infection caused by *Mycobacterium riyadhense* confused with *Mycobacterium tuberculosis*: the first case in Korea. Ann Lab Med 32: 298-303.
- 19) Godreuil, S., H. Marchandin, G. Panteix, et al. 2012. *Mycobacterium riyadhense* pulmonary infection, France and Bahrain. Emerg Infect Dis 18: 176-178.

Evaluation of Q-Line KyokutoTB, a rapid chromatographic immunoassay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex

Yuriko Igarashi¹⁾, Kinuyo Chikamatsu¹⁾, Akio Aono¹⁾, Lina Yi^{2) 3)}, Kentaro Sakashita^{3) 4)},
Takashi Ohfuji^{2) 3)}, Hiroyuki Yamada¹⁾, Akiko Takaki¹⁾, Satoshi Mitarai^{1) 3)}

¹⁾Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

²⁾Respiratory Medicine Section, Fukuji Hospital, JATA

³⁾Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

⁴⁾Department of Respiratory Medicine, Tokyo Metropolitan Tama Medical Center

Q-Line KyokutoTB (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Japan) is a newly developed *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) identification assay based on thin-layer immunochromatography utilizing anti-MPT64 monoclonal antibody. In this study, we evaluated the performance of Q-Line KyokutoTB with clinical mycobacterial isolates and the type strains compared with CapiliaTB-Neo (tauns).

A total of 151 type strains (4 MTC and 147 non-tuberculosis mycobacteria: NTM) and 155 clinical isolates (147 MTC and 4 NTM) were tested. Both kits correctly identified four MTC tested. Q-Line KyokutoTB showed one false positive to *Mycobacterium riyadhense*. The species specificity of CapiliaTB-Neo to type strains was 100%. False-positive caused by *M. riyadhense* was considered to be solved by confirmation of colony morphology and cord formation.

Q-Line KyokutoTB and CapiliaTB-Neo showed same results for clinical MTC and NTM isolates. The sensitivity and specificity of both kits to clinical isolates were then 97.1% (102/105) and 100% (50/50). Two *Mycobacterium tuberculosis* isolates with mutation and deletion in *mpt64*, and *Mycobacterium bovis* BCG Connaught were test-negative by both kits.

With 2% Ogawa medium and MGIT positive medium, Q-Line KyokutoTB showed positive to *M. tuberculosis* H37Rv. Detection sensitivity about *M. tuberculosis* H37Rv was 5.7×10^5 CFU/mL on Q-Line KyokutoTB and 2.9×10^6 CFU/mL on CapiliaTB-Neo.

In conclusion, Q-Line KyokutoTB is a useful test for the identification of MTC. Q-Line KyokutoTB showed high sensitivity and specificity as CapiliaTB-Neo. The mutation and/or deletion in *mpt64* still cause false negative result, which is common in CapiliaTB-Neo, even in Q-Line KyokutoTB.