

## [症例報告]

### GENECUBE で偽陽性反応を示した非結核性抗酸菌の2症例

山下有加<sup>1)</sup>・諸熊由子<sup>1)</sup>・持丸朋美<sup>1)</sup>・西田留梨子<sup>1)2)</sup>・清祐麻紀子<sup>1)</sup>

堀田多恵子<sup>1)</sup>・村田昌之<sup>3)</sup>・下野信行<sup>4)</sup>・康 東天<sup>1)5)</sup>

<sup>1)</sup>九州大学病院検査部

<sup>2)</sup>九州大学大学院医学研究院病態修復内科学

<sup>3)</sup>九州大学病院総合診療科

<sup>4)</sup>九州大学病院グローバル感染症センター

<sup>5)</sup>九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野

(平成 28 年 12 月 9 日受付, 平成 29 年 4 月 26 日受理)

今回我々は、抗酸菌 PCR 検査機器である GENECUBE で *Mycobacterium avium complex* (MAC) 偽陽性反応を示した非結核性抗酸菌の2症例について本邦で初めて報告する。症例1は80代女性。喀痰から抗酸菌が検出され、GENECUBE で MAC 陽性となったが、小川培地上では黄色の発色コロニーを形成した。遺伝子解析の結果、*Mycobacterium lentiflavum* と同定された。症例2は30代男性、不特定多数の異性・同性との性的接触歴があり、HIV 感染症と診断された。血液培養、骨髓液、喀痰、便検体から抗酸菌が検出され、いずれも GENECUBE で MAC 陽性となったが、半年以上培養しても小川培地に未発育であった。遺伝子解析の結果、*Mycobacterium genavense* と同定された。検査材料や液体培地培養液からの PCR 測定は迅速である反面、集落所見との妥当性が評価できない欠点がある。PCR 法による迅速報告後にも、臨床所見や他の関連検査項目にも留意し、総合的に結果を最終判断することが重要である。

**Key words:** MAC 偽陽性, *Mycobacterium lentiflavum*, *Mycobacterium genavense*, GENECUBE, 非結核性抗酸菌

## 序 文

抗酸菌検査において、polymerase chain reaction (PCR) 法などの遺伝子検査は、結核菌群及び *Mycobacterium avium complex* (MAC) を数時間で検出することができるため、数週間に及ぶ培養期間を待たずに治療方針の決定や感染対策実施の判断を可能とする重要な検査法の一つである。

東洋紡株式会社から製造・販売されている GENECUBE は核酸抽出、増幅、検出の3つの工程が全自動かつ短時間で可能な遺伝子検査機器であり、PCR

法による標的核酸遺伝子の増幅と蛍光標識プローブ (Q-probe) を用いた検出法を原理としている<sup>1)</sup>。

当院では2013年4月に抗酸菌 PCR 検査機器として GENECUBE を導入した。GENECUBE には MAC 検出用試薬として「ジーンキューブ MAC」(MAC 試薬) と「ジーンキューブ MAI」(MAI 試薬) がある。MAC 試薬は MAC を検出し、MAI 試薬は *Mycobacterium avium* 検出用試薬 (MAV 試薬) と *Mycobacterium intracellulare* 検出用試薬 (MIN 試薬) の2種類の試薬から構成される。今回、GENECUBE で偽陽性反応を示した症例を2例経験したので報告する。

## 症 例

### 1. 症例 1

患者: 80 代, 女性

主訴: 発熱, 盗汗

既往歴: 肺結核 (15 歳時, 治療歴不明), 高血圧,

著者連絡先: (〒812-8582) 福岡市東区馬出 3-1-1

九州大学病院検査部

山下有加

TEL: 092-642-5757

FAX: 092-642-5755

E-mail: yuka-y@med.kyushu-u.ac.jp

表 1. 症例, 材料毎の抗酸菌検査結果

Case	Specimen	Ziehl-Neelsen stain	Culture		GENECUBE			Sequencing result	
			Liquid medium/days to culture positivity	2% Ogawa's medium	Test sample	MAC	MAV		MIN
1	Sputum	(-)	(+) <sup>a</sup> /23	(-)	Bacterial culture medium	(+)	(-)**	(-)	<i>M. lentiflavum</i>
	Blood	NA	(+) <sup>b</sup> /40-50	NA	Bacterial culture medium	(+)	(-)**	(+)	<i>M. genavense</i>
	Bone marrow	(3+)	(+) <sup>c</sup> /44	(-)*	Bone marrow, bacterial culture medium	(+)	(-)**	(+)	<i>M. genavense</i>
2	Stool	(1+)	NA	(-)*	Stool	(+)	(-)**	(+)	<i>M. genavense</i>
	Sputum	(1+)	(-) <sup>c</sup>	(-)*	Sputum	(+)	NA	NA	NA
	Urine	(-)	(-) <sup>c</sup>	(-)	Urine	(-)	NA	NA	NA

(+), positive; (-), negative; NA, not analyzed.

\*, Cultured over the six months.

\*\*\*, The result was negative but the non-specific reaction was shown at low-temperature area.

<sup>a</sup>, Cultured by BactT/ALERT 3D system.

<sup>b</sup>, Cultured by BACTEC FX system.

<sup>c</sup>, Cultured by BACTEC MGIT 960 system.

## 胃癌

家族歴：結核の家族歴は不明

現病歴：8年前より高血圧性腎硬化症による慢性腎不全のため腎臓内科へ通院していた。入院の5ヵ月前より盗汗を伴う38℃台の発熱を認めるようになり、胃癌の治療歴もあることから、フルオロデオキシグルコース (FDG) を用いた Positron Emission Tomography (PET) が施行された。傍大動脈・腸間膜・腎門部リンパ節と第5腰椎に異常集積を認め、肺野には活動性病変は認められなかった。結核性リンパ節炎および脊椎炎または転移性腫瘍が鑑別疾患として考えられ、喀痰の抗酸菌検査が3回施行された。

微生物学的検査：1回目に提出された喀痰の Ziehl-Neelsen 染色、PCR および固形培養は陰性であったが、培養23日目に MP 抗酸菌培養ボトル (MP ボトル：シスメックス・ビオメリユー株式会社) が陽性となった。MP ボトル培養液を用いて GENECUBE 測定を実施したところ、MAC 陽性となったが鑑別のために MAI 試薬を用いた測定では *M. avium*, *M. intracellulare* とともに陰性であった (表1)。*M. avium* は陰性の判定であったが、蛍光曲線グラフで通常の MAV 試薬の判定温度である 54℃ から 64℃ よりも低温度領域

の 50℃ から 54℃ 付近にピークを認めた (図1. a)。MP ボトル培養液を 2% 小川培地 (日水製薬株式会社) に接種し 35℃ で 3 週間培養すると黄色コロニーが観察された。2% 小川培地に発育したコロニーを用いて 16SrRNA 遺伝子, *dnaJ* 遺伝子, *hsp65* 遺伝子のシーケンス解析を実施した結果, *Mycobacterium lentiflavum* と同定された。その後, 2 回目, 3 回目に提出された喀痰から抗酸菌は検出されなかった。

経過：*M. lentiflavum* に関しては 1 回のみでの検出であったためコンタミネーションと判断された。

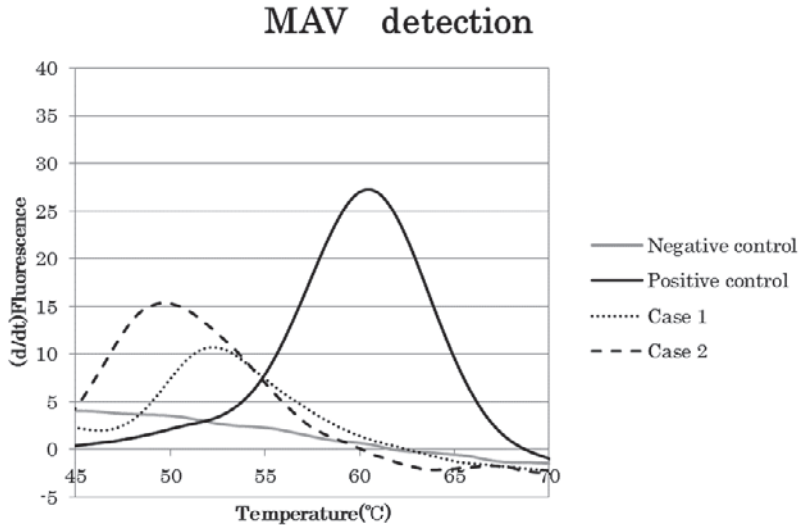
## 2. 症例 2

患者：30 代, 男性

主訴：発熱, 頭痛, 腹痛, 下痢

現病歴：5 年前より不全型ベーチェット病と診断され, プレドニゾロン, アダリムマブで治療されていた。入院 4 週間前より, 発熱, 腹痛が増悪し入院となったが, 治療抵抗性であり, 関節炎や皮疹も伴っていた。Computed Tomography (CT) 検査および PET-CT では両側鎖骨上窩, 縦隔, 大動脈周囲を含む後腹膜, 腸間膜, 右単径部にリンパ節腫大と FDG 集積亢進を認めた。内視鏡検査で新規病変として, 十二指腸下降脚以遠に多発する発赤びらんを認めた。不特定多数の

## a. MAV 試薬測定結果



## b. MIN 試薬測定結果

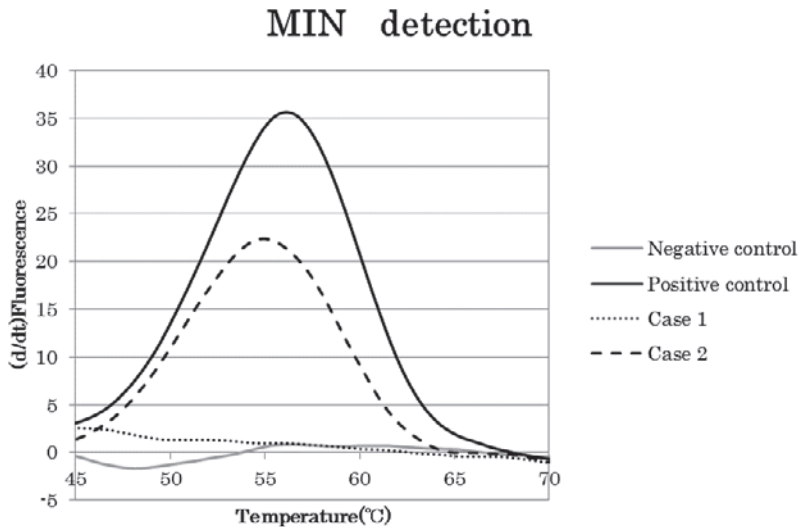


図1. GENECUBE 蛍光曲線グラフ (症例1, 2)

同性・異性とでの性的接触歴があったことより, human immunodeficiency virus (HIV) 感染症に関する検査が行われた結果, HIV-RNA ウイルス量  $1 \times 10^7$  コピー/ $\mu\text{L}$  以上, HIV-1 ウエスタンブロット陽性, CD4 陽性細胞数は  $10 / \mu\text{L}$  で同感染症と診断された。HIV 感染症と腹部症状, 内視鏡所見より, 播種性非結核性抗酸菌症が疑われ, 血液, 喀痰, 尿, 便および骨髄液検体が抗酸菌検査に提出された。

微生物学的検査: 入院4日目から18日目の間に BACTEC Myco/F ボトル (血液培養ボトル: 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) が3本, 喀痰, 尿, 便および骨髄液検体が抗酸菌検査に提出された。喀痰, 便, 骨髄液検体にて Ziehl-Neelsen 染色陽性, GENECUBE で MAC 陽性となり, 鑑別測定の結果 *M. intracellulare* 陽性となった (表1)。しかしながら, いずれの材料も固形培養は陰性で, 半年以上延長培養

したものの、菌の発育は認められなかった。培養 44 日目に骨髓液検体の Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT: 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) が陽性となり、また、血液培養ボトルも培養 40 日から 50 日目に 3 本全て陽性となった。MGIT および血液培養ボトル培養液から GENECUBE 測定を実施したところ、いずれも MAC 陽性で、鑑別の結果 *M. intracellulare* 陽性となったが、MGIT および血液培養ボトル培養液を 2% 小川培地に接種し半年以上培養しても菌の発育は認められなかった。尿以外の全ての検体で *M. avium* は陰性の判定であったが、蛍光曲線グラフで通常の MAV 試薬の判定温度である 54°C から 64°C よりも低温度領域の 47°C から 51°C 付近にピークを認め (図 1. a), MIN 試薬では通常、*M. intracellulare* 陽性と判定される 52°C から 60°C の温度域内でピークを認めた (図 1. b)。MGIT 培養液を用いた 16SrRNA 遺伝子、*dnaJ* 遺伝子、*hsp65* 遺伝子のシーケンス解析により *Mycobacterium genavense* と同定された。

経過: 播種性非結核性抗酸菌症の診断となり、clarithromycin (CAM), rifabutin (RFB), ethambutol (EB) での治療が導入され、播種性非結核性抗酸菌症の病勢が安定した後、抗 HIV 療法が開始された。

#### 基準株を用いた検討

結核予防会結核研究所より提供された *M. lentiflavum* ATCC 51985 及び *M. genavense* ATCC 51234 を用いて、MAC 試薬及び MAI 試薬との反応性を検証した。その結果、*M. lentiflavum* ATCC 51985 は、MAC 陽性、*M. avium* 陰性、*M. intracellulare* 陰性であった。*M. avium* は陰性の判定であったが、蛍光曲線グラフで通常の MAV 試薬の判定温度である 54°C から 64°C よりも低温度領域の 50°C から 54°C 付近にピークを認めた (図 2. a)。*M. genavense* ATCC 51234 は、MAC 陽性、*M. avium* 陰性、*M. intracellulare* 陽性となった。*M. avium* は陰性の判定であったが、MAV 試薬で 47°C から 51°C 付近の低温度領域にピークを認め (図 2. a), MIN 試薬では通常、*M. intracellulare* 陽性と判定される 52°C から 60°C の温度域内でピークを認めた (図 2. b)。

#### 考 察

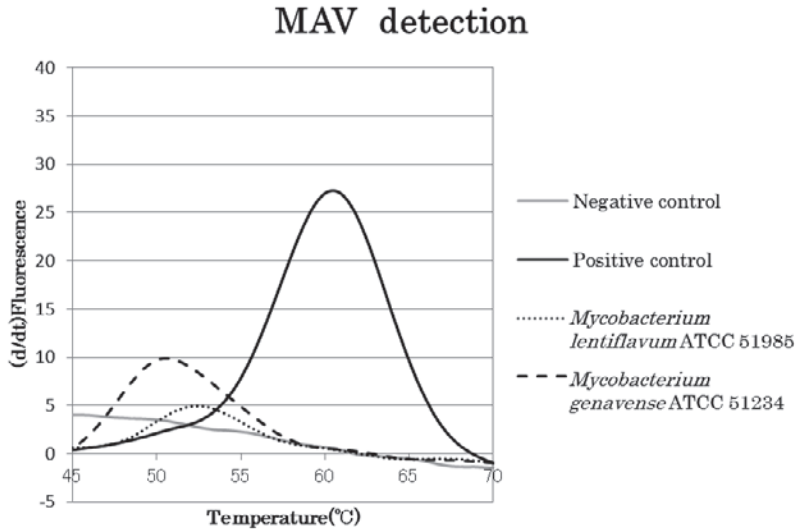
*M. lentiflavum* および *M. genavense* が GENECUBE で MAC 陽性反応を示した事例を経験した。いずれも GENECUBE で MAC 陽性となったが、小川培地にて MAC 様集落は認められず、培養所見や遺伝子解析結果より交差反応による偽陽性と考えられた。

GENECUBE で偽陽性を示した報告は今回が初めてである。

GENECUBE は PCR 法による核酸増幅と Q-probe による標的核酸検出を原理としている。Q-probe は消光プローブであり、標的遺伝子と結合している時は蛍光を発さず、解離した際に蛍光を発する性質を持つ。GENECUBE ではプローブと反応後、低温から高温へ徐々に温度を上昇させて継時的な蛍光値の変化を測定し、最大の蛍光変化量とピーク検出時の温度から標的遺伝子の有無を判定する<sup>1)</sup>。今回、*M. lentiflavum*、*M. genavense* とともに MAV 試薬では陰性であったが、通常より低温度域で蛍光値のピークを認めた。これは検体中の抗酸菌 DNA とプローブが結合したものの配列にミスマッチがあり、通常よりも低い温度でプローブが解離し蛍光を発したためと考えられた。MAC 試薬、MIN 試薬ではこのような反応温度の変化は認められず (図 1. b)、*M. lentiflavum* は MAC 試薬のプローブと、*M. genavense* は MAC 試薬、MIN 試薬のプローブとミスマッチなく通常どおり結合・反応し、陽性と判定されたと考えられる。

GENECUBE は *dnaJ* 遺伝子領域をターゲットとしているが、他の遺伝子領域を対象とした検査法でも同様に *M. lentiflavum* における偽陽性反応の報告がある。16SrRNA 遺伝子領域をターゲットとしたコバスタqMan MAI (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) においても *M. lentiflavum* は *M. intracellulare* 検出用試薬で偽陽性を示すことが報告されている<sup>2)</sup>。また、長野らは DDH マイコバクテリア '極東' (DDH 法: 極東製薬工業株式会社) で、*M. lentiflavum* の 14 株中 7 株が *M. intracellulare* を含む他菌種に同定されたと報告しており<sup>3)</sup>、偽陽性反応に対する情報の蓄積、共有と対策が望まれる。*M. genavense* は過去に PCR での偽陽性反応の報告例はないが、比較的最近報告されてきている新菌種であること<sup>4)</sup>、日本での分離が非常に稀であることから現在市販されている試薬における検証が不十分な可能性がある。東洋紡株式会社が公表している特異度試験のデータでは *M. lentiflavum* は MAI 試薬との交差反応は認められないことは示してあるが、MAC 試薬との反応性については表記されていない。また、*M. genavense* は MAC 試薬、MAI 試薬ともに交差反応を調べた菌種の中に含まれておらず、反応性について明確になっていない。しかしながら、今回、*M. lentiflavum*、*M. genavense* の当院臨床分離株において GENECUBE で MAC に交差反応を示すことが確認された。また、我々の検証により基準株でも同様の結果を示すことが明らかに

## a. MAV 試薬測定結果



## b. MIN 試薬測定結果

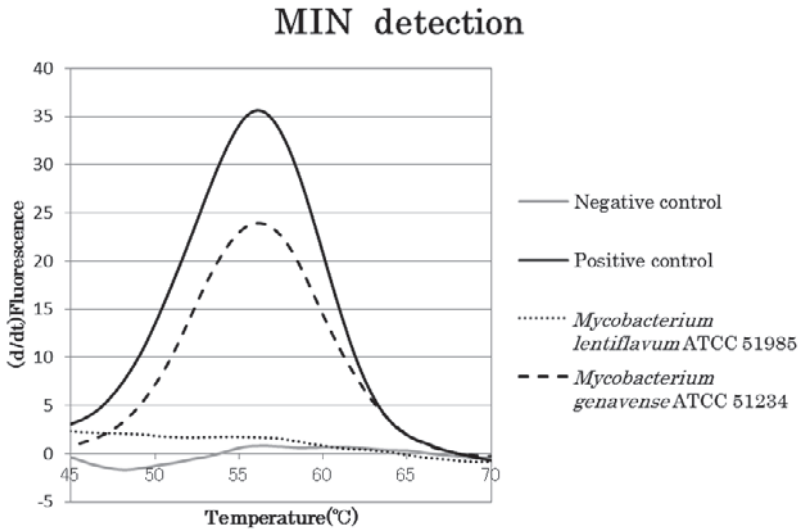


図2. GENECUBE 蛍光曲線グラフ (基準株)

なった。今後、複数の臨床分離株においても同様の反応が認められるか更なるデータの蓄積が必要と考える。

*M. lentiflavum* は1996年にSpringerらによりヒトの脊椎椎間板炎病巣から分離された非結核性抗酸菌で<sup>5)</sup>、Runyon分類でII群に分類される発色菌である。今回の症例では固形培地の集落観察により偽陽性反応

に気付くことができ、MACと誤報告することはなかった。*M. lentiflavum* は、リンパ節炎<sup>6)</sup>や肺感染症<sup>7)</sup>などの報告があるが、本菌は環境からも分離される菌で偽アウトブレイクの報告もあるため<sup>8)</sup>、起炎菌かどうかの解釈には注意が必要である。本症例では3回の喀痰検査のうち1回のみでの分離であったため、コンタミネーションと判断された。

*M. genavense* は Böttger らにより acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) 患者による播種性感染症の原因菌として 1992 年に報告された<sup>4)</sup>。Runyon 分類で III 群に分類され、卵や寒天をベースとした抗酸菌分離用培地に発育しないという特徴がある。今回の症例でも提出された全ての材料で 2% 小川培地には未発育であった。本症例は AIDS 患者における播種性 *M. genavense* 感染症であったが、検体材料からの PCR で MAC と誤報告されたため、播種性 MAC 症として治療がなされていた。固形培地にも未発育であったために偽陽性と気付くのが遅れ、最終的な菌種の同定に半年以上も要した。しかしながら、*M. genavense* 感染症の治療は CAM, rifampicin, RFB, EB, amikacin のうち 2 剤から 3 剤を併用する播種性 MAC 症に準じた治療が実施されていることが多く<sup>9)~11)</sup>、幸いにも誤同定による治療への影響は無かった。検査材料や液体培地培養液からの PCR 測定は迅速である反面、集落所見を確認して妥当性を評価できない欠点があり、菌種同定には複数の方法による総合的な結果判断の重要性を認識した症例であった。播種性 *M. genavense* 感染症患者では発熱や体重減少の他に、腹痛や下痢等の腸管症状がみられることが多いことが報告されている<sup>4)11)12)</sup>。Thomsen らは播種性 *M. genavense* 感染症患者の方が播種性 MAC 感染症患者よりも便での塗抹陽性率が有意に高いことを報告している<sup>12)</sup>。また、*M. genavense* 感染症では培養陽性率が低く、培養陽性になったとしても発育までに長期間を要する<sup>4)10)~12)</sup>。HIV 患者における播種性非結核性抗酸菌症では臨床所見にも注意し、便での塗抹陽性例や塗抹陽性にもかかわらず培養陰性の場合には、本菌も念頭において検査する必要がある。

*M. lentiflavum* および *M. genavense* の菌種同定は従来の集落形態の観察や生化学的方法では困難であり、DDH 法等の市販の同定キットにも対象菌種として含まれていないため、最終的な菌種同定には遺伝子解析による判断が必要となる。さらに *M. genavense* 感染症例では培養陰性のため検査材料からのダイレクトシーケンス法により菌種を確定する例が多い<sup>10)11)</sup>。今回の症例でも喀痰、便検体は培養陰性であり、N-アセチル-L シスチン・水酸化ナトリウム法による前処理後の検体を用いた遺伝子解析も実施した。

今回発見された *M. lentiflavum* および *M. genavense* における MAC 偽陽性反応は MAC 試薬測定のみでは気付くことが困難であり、MAC 試薬で陽性となった場合は固形培地集落の確認や臨床所見、

MAV 試薬、MIN 試薬測定時の蛍光曲線グラフで蛍光値のピークを示す反応温度にも注意して総合的に結果を判定する必要がある。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

## 文 献

- 1) 曾家義博. 2013. 全自動遺伝子解析装置「GENECUBE」を用いた遺伝子検出法の開発. 生物試料分析 36: 310-315.
- 2) 富田元久, 吉田志緒美, 露口一成, 他. 2014. *Mycobacterium lentiflavum* のコパス TaqMan MAI における *Mycobacterium intracellulare* 偽陽性反応についての遺伝子学的検討. 結核 89: 703-709.
- 3) 長野 誠, 市村禎宏, 伊藤伸子, 他. 2008. 16SrRNA 遺伝子及び ITS-1 領域をターゲットとした Invader 法による 23 菌種の抗酸菌の同定. 結核 83: 487-496.
- 4) Böttger, EC, A Teske, P Kirschner, et al. 1992. Disseminated "*Mycobacterium genavense*" infection in patients with AIDS. Lancet 340: 76-80.
- 5) Springer, B, WK Wu, T Bodmer, et al. 1996. Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. J Clin Microbiol 34: 1100-1107.
- 6) Piersimoni, C, G Goteri, D Nista, et al. 2004. *Mycobacterium lentiflavum* as an emerging causative agent of cervical lymphadenitis. J Clin Microbiol 42: 3894-3897.
- 7) 開 陽子, 大河内康実, 徳田 均. 2012. 検体の遺伝子学的解析で診断しえた *Mycobacterium lentiflavum* 肺感染症の一例. 結核 87: 713-718.
- 8) 戸田宏文, 山口逸弘, 鹿住裕子, 他. 2013. 採痰ブース内水道水を介した *Mycobacterium lentiflavum* による Pseudo-Outbreak の分子疫学的解析. 環境感染誌 28: 319-324.
- 9) 新野大介, 松本 啓, 田中健之, 他. 2011. AIDS 患者における播種性非結核性抗酸菌症 (*Mycobacterium genavense*) の 1 例. 診断病理 28: 18-20.
- 10) 小川吉彦, 小泉祐介, 渡邊 大, 他. 2015. 播種性 *Mycobacterium genavense* 感染症を呈した AIDS 患者の 1 例. 感染症学雑誌 89: 259-264.
- 11) Charles, P, O Lortholary, A Dechartres, et al. 2011. *Mycobacterium genavense* infections: a retrospective multicenter study in France, 1996-2007. Medicine 90: 223-230.
- 12) Thomsen, VO, UB Dragsted, J Bauer, et al. 1999. Dis-

seminated infection with *Mycobacterium genavense*:  
a challenge to physicians and mycobacteriologists. J

Clin Microbiol 37: 3901-3905.

## Two cases of non-tuberculosis mycobacteria misidentified as *Mycobacterium avium* complex with GENEUCUBE

Yuka Yamashita<sup>1)</sup>, Yuiko Morokuma<sup>1)</sup>, Tomomi Mochimaru<sup>1)</sup>, Ruriko Nishida<sup>1) 2)</sup>, Makiko Kiyosuke<sup>1)</sup>,  
Taeko Hotta<sup>1)</sup>, Masayuki Murata<sup>3)</sup>, Nobuyuki Shimono<sup>4)</sup>, Dongchon Kang<sup>1) 5)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Science

<sup>3)</sup>Department of General Internal Medicine, Kyushu University Hospital

<sup>4)</sup>Center for the Study of Global Infection, Kyushu University Hospital

<sup>5)</sup>Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences

We report two cases of non-tuberculosis mycobacteria misidentified as *Mycobacterium avium* complex (MAC) with GENEUCUBE (Toyobo), which is an instrument used for mycobacterium polymerase chain reaction (PCR). The first case is an 80s female. Acid-fast bacilli (AFB) were detected in a liquid medium of sputum culture after 23 days of incubation. A GENEUCUBE analysis of the isolate indicated MAC. However, the strain was slow-growing and formed yellow-pigmented non-tuberculosis mycobacteria colonies on a two percent Ogawa's medium. This strain was identified as *Mycobacterium lentiflavum* by 16SrRNA, *dnaJ* and *hsp65* gene sequencing. The second case is a 30s male with human immunodeficiency virus infection. Ziehl Neelsen staining of bone marrow, sputum and stool were positive. AFB were detected in blood culture and a liquid medium of bone marrow. A GENEUCUBE analysis of the specimens and isolates indicated MAC, but in all samples, the cultures on solid media did not show any colony formation over the six months. These strains were identified as *Mycobacterium genavense* by 16 SrRNA, *dnaJ* and *hsp65* gene sequencing. This is the first report about misidentifications of MAC with GENEUCUBE in Japan. PCR reaction has a merit in its rapid reaction directly from samples and culture bottles, but also has a demerit not to confirm validity by colony observation. We should make final identification in a comprehensive manner by paying attention to clinical findings and other examination results.