

[原 著]

GENECUBE 専用抗酸菌検出試薬における抗酸菌交差反応性の評価

川嶋洋介¹⁾・近松絹代²⁾・杉山明生³⁾・鈴木広道⁴⁾・御手洗聡²⁾

¹⁾ 東洋紡株式会社バイオテクノロジー研究所

²⁾ 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

³⁾ 東洋紡株式会社診断システム事業部

⁴⁾ 筑波大学医学医療系感染症内科学

(令和3年3月2日受付, 令和3年4月19日受理)

168種の抗酸菌基準株を対象にジーンキューブMTB/MAC/MAI (G-MTB, G-MAC, G-MAI)の最小検出限界と交差反応性を評価した。各検出試薬の検出対象菌は正しく同定され、各々の最小検出限界はMcFarland No. $1 \times 10^{-5} - 10^{-6}$ であった。G-MTBは交差反応を認めなかったが、*M. haemophilum*の融解曲線解析結果では低温に検出ピークを認めた。G-MAIの*M. intracellulare*検出試薬ではピークが認められた非検出対象菌は15種あり、うち7種は偽陽性、8種は低温でのピークであった。G-MAIの*M. avium*検出試薬では検出対象菌以外にピークを認めた種は16種であり、全て低温ピークであった。難培養性と言われる*M. genavense*はG-MACおよびG-MAIの*M. intracellulare*検出試薬で陽性と判定された一方で、*M. avium*検出試薬では低温でピークを認めた。*M. lentiflavum*も同様の結果を示したが、*M. intracellulare*検出試薬における最小検出限界は、*M. genavense*がMcFarland No. 1×10^{-4} に対し*M. lentiflavum*は 10^{-1} であり1,000倍の差が認められた。本研究によりGENECUBE専用の抗酸菌検出試薬で様々な抗酸菌が特徴的な検出パターンを示すことが明らかとなった。

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Non-tuberculosis mycobacterium, Cross-reactivity, GENECUBE, QProbe

序 文

結核菌は病原性が強くヒト-ヒト感染を起こすため、結核菌を迅速に検出することは臨床的にも公衆衛生的にも重要である。結核菌の迅速検査法としては主に塗抹検査、培養検査、核酸増幅法検査が行われる。しかし、塗抹検査で抗酸菌が認められても、それが結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) か、それとも *Mycobacterium avium* complex (MAC) 等の非結核性抗酸菌 (Non-tuberculosis *Mycobacterium*: NTM) であるかの区別は困難である。そのため、結核菌群を迅速に同定する検査法としては核酸増幅法検査が主に用いられている。また、主要なNTMであるMACも核酸増幅法検査による検出が行われている。

日本国内において、結核菌群およびMACの核酸増幅法検査が可能な遺伝子検査システムは複数販売されており、GENECUBE (東洋紡株式会社) もその一つである。GENECUBE (東洋紡株式会社) に対応する結核菌群検出試薬であるジーンキューブMTB (G-MTB, 東洋紡株式会社), MACを一括して検出する試薬であるジーンキューブMAC (G-

MAC, 東洋紡株式会社), *Mycobacterium avium* 検出用のプライマー・プローブ試薬と *Mycobacterium intracellulare* 検出用のプライマー・プローブ試薬をセットで用いて両菌種を区別して検出するジーンキューブMAI (G-MAI, 東洋紡株式会社) は、PCRによって結核菌群またはMACの核酸を増幅し、その後消光プローブ (Quenching probe: QProbe) を用いた融解曲線解析によって増幅産物を検出する¹⁾。

QProbeとは、DNAの5'末端または3'末端に位置するシトシンに蛍光が標識されたプローブであり、単体で遊離している時には蛍光が発光し、逆に標的核酸と結合し二本鎖を形成している時にはその蛍光が消光する²⁾。標的核酸と結合したQProbeは、QProbeと標的核酸とのTm (melting temperature: 融解温度) 値付近の温度で標的核酸から乖離し、この時に消光していた蛍光が発光する。Tm値は標的核酸配列とQProbeの配列によって決まり、それが融解曲線解析における検出温度に反映される。GENECUBEではこの原理を利用し、融解曲線解析によって生じる検出ピークが特定の温度範囲内であれば陽性と判定される。標的核酸とQProbeとの間に塩基配列のミスマッチが生じた場合、QProbeと標的核酸とのTm値が低下する。Tm値が低下するとQProbeと標的核酸との乖離がより低温で生じるため、検出ピークが生じる温度が低下する。Tm値の低下度合いは乖離する塩基の種類や位置、数によって異なる。標的核酸の塩基配列によってQProbeとのTm値が変化することを利用し、QProbeを用いて遺伝子変異や多型の検出を行うことが可能である³⁾⁻⁶⁾。

著者連絡先: (〒914-8550) 福井県敦賀市東洋町10番24号
東洋紡株式会社バイオテクノロジー研究所
川嶋洋介
TEL: 0770-22-7643
FAX: 0770-22-7671
E-mail: yosuke_kawashima@toyobo.jp

本研究は、G-MTB, G-MAC, G-MAIにおける抗酸菌に対する交差反応性を評価することを目的として行った。現時点では抗酸菌として192菌種が報告されており⁷⁾、結核菌群が6種、らい菌が2種、非結核性抗酸菌が184種である。本研究ではこのうち結核菌群4種と非結核性抗酸菌164種の基準株からそれぞれ抽出した核酸を上記の3試薬で測定し、各試薬の最小検出限界および交差反応性を評価した。また、各菌を測定した際の融解曲線解析で得られた波形を確認し、特有の波形を示す抗酸菌を検討した。

材料と方法

抗酸菌基準株の調製

評価対象菌種として、結核菌4変異体 (*M. tuberculosis* var. *tuberculosis*, *M. tuberculosis* var. *africanum*, *M. tuberculosis* var. *bovis*, *M. tuberculosis* var. *microti*)、NTM 164種 (*Mycobacterium abscessus*, *M. avium*, *Mycobacterium fortuitum*, *M. intracellulare* の亜種を含む) の計168種の基準株を用いた (Table 1)。基準株は2%小川培地 (極東製薬工業株式会社) またはマイコプロス (極東製薬工業株式会社) を用いて培養した。基準株が発育した培地は後述する核酸抽出を行うまで冷蔵で保管した。

基準株からの核酸抽出

発育した基準株の菌液を調製し、この菌液から核酸を抽出した。菌液の調製は以下のとおり行った。まず、分散チューブ“ニチビー” (日本ビーシー製薬株式会社) のチューブに添付の10% ツイーン80液を3滴滴下した。次に発育した基準株のコロニーをディスポールで適量かきとり、ツイーン80液滴下済みのチューブに懸濁した。この菌懸濁液に水 (Sigma-Aldrich) 約1 mLを加えて混和し、高濃度菌液を調製した。水に高濃度菌液をMcFarland No. 1になるよう添加した。濁度計測はBD フェニックススベック (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いて行った。

McFarland No. 1の菌液からの核酸抽出は以下の通り行った。まず、ジーンキューブ専用イージー・ビーズ (東洋紡株式会社) に水を1 mL加えたものを準備した。水とイージー・ビーズが入ったチューブにMcFarland No. 1の菌液200 μ Lを加え、攪拌せずに13,000 \times gで3分間遠心した。遠心後、上清1,050 μ Lをマイクロピペットで抜き取って除去した。約150 μ Lの残液があるチューブにジーンキューブ専用溶解液 (東洋紡株式会社) 50 μ Lを加え、95°Cで10分間加熱した。加熱後のチューブをDISRUPTOR GENIE (Scientific industries) にセットし最高速度 (2,850 rpm) で3分間振とうさせ、チューブ内のビーズで菌を破碎した。破碎処理後にチューブを13,000 \times gで3分間遠心し、遠心後の上清を抽出核酸として回収した。

交差反応性試験

基準株から抽出した核酸を、GENECUBEおよびG-MTB, G-MAC, G-MAIを用いて測定した。各試薬の陽性または陰性の結果判定はGENECUBEに出力された測定結果をそのまま採用した。また、各試験の融解曲線解析結果を参照し、核酸検出を示すピークの有無およびピーク発生温度を確認した。また、2テストともピークが生じなかった場合、その抗酸菌は陰性であるとした。

最小検出限界試験

各試薬で陽性となった抗酸菌および陰性であるが何らかの検出ピークが認められた抗酸菌に対しては、以下の方法で最小検出限界試験を行った。McFarland No. 1の菌液から回収した抽出核酸をジーンキューブ専用試料溶解液 (東洋紡株式会社) で10倍ずつ段階希釈し、最小でMcFarland No. 1 \times 10⁻⁷相当となる抽出核酸試料を調製した。これらの段階希釈試料を対象試薬を用いてN=2で測定し、2テストとも検出された濃度をその抗酸菌の最小検出限界とした。

結 果

ジーンキューブ MTB の最小検出限界および交差反応

G-MTBでは結核菌群4種が全て陽性となり、正しく同定された。各菌種の最小検出限界はいずれもMcFarland No. 1 \times 10⁻⁵であった (Figure 1)。各菌種の検出温度の中央値は63.2-63.6°Cであり、種間差は認められなかった。非結核性抗酸菌164種は全て結核菌群陰性と判定され、偽陽性はなかった。ただし、*Mycobacterium haemophilum* の融解曲線解析結果を確認したところ、約57°Cで増幅された核酸の検出を示すピークが認められた (Figure 1)。

ジーンキューブ MAC の最小検出限界および交差反応

G-MACでは検出対象である*M. avium*の3亜種および*M. intracellulare*の3亜種が全てMAC陽性となり、正しく同定された。各菌種の最小検出限界は*M. avium*がMcFarland No. 1 \times 10⁻⁶、*M. intracellulare*がMcFarland No. 1 \times 10⁻⁵であり、亜種間差は認められなかった。検出温度の中央値は*M. avium*が55.0-55.2°C、*M. intracellulare*が54.6-55.0°Cであった (Table 2)。

検出対象種以外にMACと同様の温度で検出ピークを示したため偽陽性となったのは9種であった。また、陰性判定を示したがMACよりも低温で検出ピークが認められた菌種が5種あった (Table 2)。

ジーンキューブ MAI の最小検出限界および交差反応

G-MAIでは検出対象である*M. avium*の亜種3種が全て*M. avium*陽性となり、*M. intracellulare*の亜種3種が全て*M. intracellulare*陽性となった。最小検出限界は*M. avium* subsp. *avium*がMcFarland No. 1 \times 10⁻⁵、他二つの亜種がMcFarland No. 1 \times 10⁻⁶であった。また、*M. intracellulare*の最小検出限界はMcFarland No. 1 \times 10⁻⁵であり、亜種間差は認められなかった。検出温度の中央値は*M. avium*が61.3-61.4°C、*M. intracellulare*が56.1-56.7°Cであった (Table 3, Table 4)。

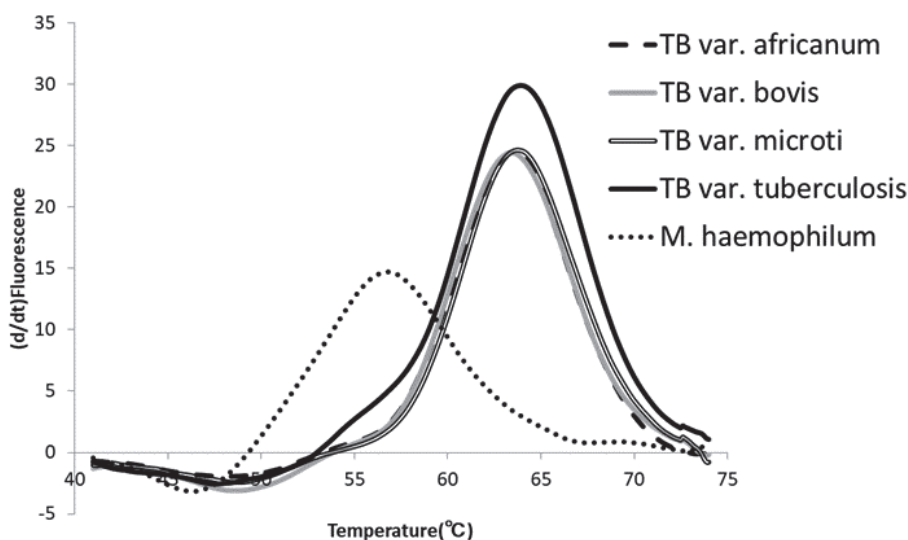
G-MAIの*M. avium*検出試薬で測定した結果を確認したところ、*M. avium*偽陽性となった菌種は認められなかったが、低温で検出ピークが認められた菌種が16種あった (Table 4)。また、同様に*M. intracellulare*検出試薬で測定した結果、検出対象種以外に*M. intracellulare*と同様の検出ピークを示した (偽陽性) 菌種は7種あった。これらの融解曲線解析結果を確認したところ、7種のうち4種 (*Mycobacterium florentinum*, *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium lentiflavum*, *Mycobacterium triplex*) は*M. avium*検出試薬で前述した低温ピークが認められた。残る3種 (*Mycobacterium marseillense*, *Mycobacterium stomatepieae*, *Myco-*

Table 1. The list of strains used in this study

| No. | Genus | Species | Type strain No. | No. | Genus | Species | Type strain No. |
|-----|----------------------|---|-----------------|-----|----------------------|-------------------------|-----------------|
| 1 | <i>Mycobacterium</i> | <i>abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> | ATCC19977 | 85 | <i>Mycobacterium</i> | <i>kubicae</i> | ATCC700732 |
| 2 | <i>Mycobacterium</i> | <i>abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> | JCM15297 | 86 | <i>Mycobacterium</i> | <i>kumamotoense</i> | JCM13453 |
| 3 | <i>Mycobacterium</i> | <i>abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> | JCM15300 | 87 | <i>Mycobacterium</i> | <i>kyorinense</i> | JCM15038 |
| 4 | <i>Mycobacterium</i> | <i>agri</i> | ATCC27406 | 88 | <i>Mycobacterium</i> | <i>lacus</i> | JCM15657 |
| 5 | <i>Mycobacterium</i> | <i>aichiense</i> | ATCC27280 | 89 | <i>Mycobacterium</i> | <i>lentiflavum</i> | ATCC51985 |
| 6 | <i>Mycobacterium</i> | <i>algericum</i> | DSM 45454 | 90 | <i>Mycobacterium</i> | <i>litorale</i> | JCM17423 |
| 7 | <i>Mycobacterium</i> | <i>alvei</i> | JCM12272 | 91 | <i>Mycobacterium</i> | <i>llatzerense</i> | JCM16229 |
| 8 | <i>Mycobacterium</i> | <i>anyangense</i> | JCM30275 | 92 | <i>Mycobacterium</i> | <i>longobardum</i> | DSM 45394 |
| 9 | <i>Mycobacterium</i> | <i>arabiense</i> | JCM18538 | 93 | <i>Mycobacterium</i> | <i>madagascariense</i> | JCM13574 |
| 10 | <i>Mycobacterium</i> | <i>aromaticivorans</i> | JCM16368 | 94 | <i>Mycobacterium</i> | <i>mageritense</i> | ATCC700351 |
| 11 | <i>Mycobacterium</i> | <i>arosiense</i> | DSM 45069 | 95 | <i>Mycobacterium</i> | <i>malmoense</i> | ATCC29571 |
| 12 | <i>Mycobacterium</i> | <i>arupense</i> | DSM 44942 | 96 | <i>Mycobacterium</i> | <i>mantenii</i> | JCM18113 |
| 13 | <i>Mycobacterium</i> | <i>asiaticum</i> | ATCC25276 | 97 | <i>Mycobacterium</i> | <i>marinum</i> | ATCC927 |
| 14 | <i>Mycobacterium</i> | <i>aubagnense</i> | JCM15296 | 98 | <i>Mycobacterium</i> | <i>marseillense</i> | JCM17324 |
| 15 | <i>Mycobacterium</i> | <i>aurum</i> | ATCC23366 | 99 | <i>Mycobacterium</i> | <i>minnesotense</i> | JCM17932 |
| 16 | <i>Mycobacterium</i> | <i>austrorfricanum</i> | ATCC33464 | 100 | <i>Mycobacterium</i> | <i>monacense</i> | JCM15658 |
| 17 | <i>Mycobacterium</i> | <i>avium</i> subsp. <i>avium</i> | ATCC25291 | 101 | <i>Mycobacterium</i> | <i>montefiorensis</i> | ATCC BAA-256 |
| 18 | <i>Mycobacterium</i> | <i>avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> | ATCC19698 | 102 | <i>Mycobacterium</i> | <i>moriokaense</i> | ATCC43059 |
| 19 | <i>Mycobacterium</i> | <i>avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> | ATCC49884 | 103 | <i>Mycobacterium</i> | <i>mucogenicum</i> | ATCC49650 |
| 20 | <i>Mycobacterium</i> | <i>bacteremicum</i> | DSM 45578 | 104 | <i>Mycobacterium</i> | <i>murale</i> | JCM13392 |
| 21 | <i>Mycobacterium</i> | <i>boenickei</i> | JCM15653 | 105 | <i>Mycobacterium</i> | <i>nebraskense</i> | DSM 44803 |
| 22 | <i>Mycobacterium</i> | <i>bohemicum</i> | JCM12402 | 106 | <i>Mycobacterium</i> | <i>neoaurum</i> | ATCC25795 |
| 23 | <i>Mycobacterium</i> | <i>botniense</i> | JCM17322 | 107 | <i>Mycobacterium</i> | <i>neworleansense</i> | JCM 15659 |
| 24 | <i>Mycobacterium</i> | <i>bourgelatii</i> | DSM 45746 | 108 | <i>Mycobacterium</i> | <i>nonchromogenicum</i> | ATCC19530 |
| 25 | <i>Mycobacterium</i> | <i>branderi</i> | ATCC51789 | 109 | <i>Mycobacterium</i> | <i>noviomagense</i> | JCM16367 |
| 26 | <i>Mycobacterium</i> | <i>brisbanense</i> | JCM15654 | 110 | <i>Mycobacterium</i> | <i>novocastrense</i> | JCM18114 |
| 27 | <i>Mycobacterium</i> | <i>brumae</i> | ATCC51384 | 111 | <i>Mycobacterium</i> | <i>obuense</i> | JCM6372 |
| 28 | <i>Mycobacterium</i> | <i>canariense</i> | JCM15298 | 112 | <i>Mycobacterium</i> | <i>pallens</i> | JCM16370 |
| 29 | <i>Mycobacterium</i> | <i>celatum</i> | ATCC51131 | 113 | <i>Mycobacterium</i> | <i>palustre</i> | DSM 44572 |
| 30 | <i>Mycobacterium</i> | <i>celeriflavum</i> | JCM 18439 | 114 | <i>Mycobacterium</i> | <i>paraense</i> | DSM 46749 |
| 31 | <i>Mycobacterium</i> | <i>chelonae</i> | ATCC35752 | 115 | <i>Mycobacterium</i> | <i>paraffinicum</i> | ATCC12670 |
| 32 | <i>Mycobacterium</i> | <i>chitae</i> | ATCC19627 | 116 | <i>Mycobacterium</i> | <i>parafortuitum</i> | ATCC19686 |
| 33 | <i>Mycobacterium</i> | <i>chlorophenicum</i> | ATCC49826 | 117 | <i>Mycobacterium</i> | <i>paragordoniae</i> | JCM 18565 |
| 34 | <i>Mycobacterium</i> | <i>chubuense</i> | ATCC27278 | 118 | <i>Mycobacterium</i> | <i>parakoreense</i> | DSM 45575 |
| 35 | <i>Mycobacterium</i> | <i>colombiense</i> | JCM16228 | 119 | <i>Mycobacterium</i> | <i>parascrofulaceum</i> | JCM13015 |
| 36 | <i>Mycobacterium</i> | <i>conceptionense</i> | JCM15299 | 120 | <i>Mycobacterium</i> | <i>paraseoulense</i> | JCM16952 |
| 37 | <i>Mycobacterium</i> | <i>confluentis</i> | ATCC49920 | 121 | <i>Mycobacterium</i> | <i>parmense</i> | JCM14742 |
| 38 | <i>Mycobacterium</i> | <i>conspicuum</i> | ATCC700090 | 122 | <i>Mycobacterium</i> | <i>peregrinum</i> | ATCC14467 |
| 39 | <i>Mycobacterium</i> | <i>cookii</i> | ATCC49103 | 123 | <i>Mycobacterium</i> | <i>phlei</i> | ATCC11758 |
| 40 | <i>Mycobacterium</i> | <i>cosmeticum</i> | JCM14739 | 124 | <i>Mycobacterium</i> | <i>phocaicum</i> | JCM15301 |
| 41 | <i>Mycobacterium</i> | <i>crocinum</i> | JCM16369 | 125 | <i>Mycobacterium</i> | <i>porcinum</i> | ATCC33776 |
| 42 | <i>Mycobacterium</i> | <i>diernhoferi</i> | ATCC19340 | 126 | <i>Mycobacterium</i> | <i>poriferae</i> | ATCC35087 |
| 43 | <i>Mycobacterium</i> | <i>doricum</i> | JCM12405 | 127 | <i>Mycobacterium</i> | <i>pseudoshottisii</i> | JCM15466 |
| 44 | <i>Mycobacterium</i> | <i>duvalii</i> | ATCC43910 | 128 | <i>Mycobacterium</i> | <i>psychrotolerans</i> | JCM13323 |
| 45 | <i>Mycobacterium</i> | <i>elephantis</i> | JCM12406 | 129 | <i>Mycobacterium</i> | <i>pulveris</i> | ATCC35154 |
| 46 | <i>Mycobacterium</i> | <i>engbaekii</i> | ATCC27353 | 130 | <i>Mycobacterium</i> | <i>pyrenivorans</i> | JCM15927 |
| 47 | <i>Mycobacterium</i> | <i>europaeum</i> | DSM 45397 | 131 | <i>Mycobacterium</i> | <i>rhodesiae</i> | ATCC27024 |
| 48 | <i>Mycobacterium</i> | <i>fallax</i> | ATCC35219 | 132 | <i>Mycobacterium</i> | <i>riyadhense</i> | DSM 45176 |
| 49 | <i>Mycobacterium</i> | <i>farcinogenes</i> | ATCC35753 | 133 | <i>Mycobacterium</i> | <i>rufum</i> | JCM16372 |
| 50 | <i>Mycobacterium</i> | <i>flavescens</i> | ATCC14474 | 134 | <i>Mycobacterium</i> | <i>rutilum</i> | JCM16371 |
| 51 | <i>Mycobacterium</i> | <i>florentinum</i> | JCM14740 | 135 | <i>Mycobacterium</i> | <i>salmoniphilum</i> | DSM 43276 |
| 52 | <i>Mycobacterium</i> | <i>fluoranthenivorans</i> | JCM14741 | 136 | <i>Mycobacterium</i> | <i>saskatchewanense</i> | JCM13016 |
| 53 | <i>Mycobacterium</i> | <i>fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> | ATCC35931 | 137 | <i>Mycobacterium</i> | <i>scrofulaceum</i> | ATCC19981 |
| 54 | <i>Mycobacterium</i> | <i>fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> | ATCC6841 | 138 | <i>Mycobacterium</i> | <i>sediminis</i> | JCM 17899 |
| 55 | <i>Mycobacterium</i> | <i>fragae</i> | DSM45731 | 139 | <i>Mycobacterium</i> | <i>senegalense</i> | ATCC35796 |
| 56 | <i>Mycobacterium</i> | <i>franklinii</i> | DSM 45524 | 140 | <i>Mycobacterium</i> | <i>senuense</i> | JCM16017 |
| 57 | <i>Mycobacterium</i> | <i>frederiksbergense</i> | DSM 44346 | 141 | <i>Mycobacterium</i> | <i>seoulense</i> | JCM16018 |
| 58 | <i>Mycobacterium</i> | <i>gadium</i> | ATCC27726 | 142 | <i>Mycobacterium</i> | <i>septicum</i> | ATCC700731 |
| 59 | <i>Mycobacterium</i> | <i>gastri</i> | ATCC15754 | 143 | <i>Mycobacterium</i> | <i>setense</i> | JCM15660 |
| 60 | <i>Mycobacterium</i> | <i>genavense</i> | ATCC51234 | 144 | <i>Mycobacterium</i> | <i>sherrisii</i> | DSM 45441 |
| 61 | <i>Mycobacterium</i> | <i>gilvum</i> | ATCC43909 | 145 | <i>Mycobacterium</i> | <i>shimoidei</i> | ATCC27962 |
| 62 | <i>Mycobacterium</i> | <i>goodii</i> | ATCC700504 | 146 | <i>Mycobacterium</i> | <i>shinjukuense</i> | JCM14233 |
| 63 | <i>Mycobacterium</i> | <i>gordoniae</i> | ATCC14470 | 147 | <i>Mycobacterium</i> | <i>shottisii</i> | JCM12657 |

Table 1. The list of strains used in this study (continued)

| No. | Genus | Species | Type strain No. | No. | Genus | Species | Type strain No. |
|-----|----------------------|--|-----------------|-----|----------------------|--|-----------------|
| 64 | <i>Mycobacterium</i> | <i>haemophilum</i> | ATCC29548 | 148 | <i>Mycobacterium</i> | <i>simiae</i> | ATCC25275 |
| 65 | <i>Mycobacterium</i> | <i>hassiacum</i> | JCM12690 | 149 | <i>Mycobacterium</i> | <i>smegmatis</i> | ATCC19420 |
| 66 | <i>Mycobacterium</i> | <i>heckeshornense</i> | DSM 44428 | 150 | <i>Mycobacterium</i> | <i>sphagni</i> | DSM 44076 |
| 67 | <i>Mycobacterium</i> | <i>heidelbergense</i> | ATCC51253 | 151 | <i>Mycobacterium</i> | <i>stomatepiae</i> | JCM17783 |
| 68 | <i>Mycobacterium</i> | <i>heraklionensis</i> | JCM 30995 | 152 | <i>Mycobacterium</i> | <i>szulgai</i> | ATCC35799 |
| 69 | <i>Mycobacterium</i> | <i>hiberniae</i> | ATCC49874 | 153 | <i>Mycobacterium</i> | <i>terrae</i> | ATCC15755 |
| 70 | <i>Mycobacterium</i> | <i>hippocampi</i> | JCM 30996 | 154 | <i>Mycobacterium</i> | <i>thermoresistibile</i> | ATCC19527 |
| 71 | <i>Mycobacterium</i> | <i>hodleri</i> | JCM12141 | 155 | <i>Mycobacterium</i> | <i>timonense</i> | JCM30726 |
| 72 | <i>Mycobacterium</i> | <i>holsaticum</i> | JCM12374 | 156 | <i>Mycobacterium</i> | <i>tokaiense</i> | ATCC27282 |
| 73 | <i>Mycobacterium</i> | <i>houstonense</i> | JCM15656 | 157 | <i>Mycobacterium</i> | <i>triplex</i> | DSM 44626 |
| 74 | <i>Mycobacterium</i> | <i>immunogenum</i> | DSM 45595 | 158 | <i>Mycobacterium</i> | <i>triviale</i> | ATCC23292 |
| 75 | <i>Mycobacterium</i> | <i>insubricum</i> | JCM16366 | 159 | <i>Mycobacterium</i> | <i>tuberculosis</i> var. <i>africanum</i> | ATCC25420 |
| 76 | <i>Mycobacterium</i> | <i>interjectum</i> | ATCC51457 | 160 | <i>Mycobacterium</i> | <i>tuberculosis</i> var. <i>bovis</i> | ATCC19210 |
| 77 | <i>Mycobacterium</i> | <i>intermedium</i> | ATCC51848 | 161 | <i>Mycobacterium</i> | <i>tuberculosis</i> var. <i>microti</i> | ATCC19422 |
| 78 | <i>Mycobacterium</i> | <i>intracellulare</i> subsp. <i>chimaera</i> | JCM14737 | 162 | <i>Mycobacterium</i> | <i>tuberculosis</i> var. <i>tuberculosis</i> | ATCC27294 |
| 79 | <i>Mycobacterium</i> | <i>intracellulare</i> subsp. <i>intracellulare</i> | ATCC13950 | 163 | <i>Mycobacterium</i> | <i>tusciae</i> | JCM12692 |
| 80 | <i>Mycobacterium</i> | <i>intracellulare</i> subsp. <i>yongonens</i> | DSM 45126 | 164 | <i>Mycobacterium</i> | <i>ulcerans</i> | ATCC19423 |
| 81 | <i>Mycobacterium</i> | <i>iranicum</i> | JCM17461 | 165 | <i>Mycobacterium</i> | <i>vaccae</i> | ATCC15483 |
| 82 | <i>Mycobacterium</i> | <i>kansasii</i> | ATCC12478 | 166 | <i>Mycobacterium</i> | <i>vulneris</i> | JCM18115 |
| 83 | <i>Mycobacterium</i> | <i>komossense</i> | ATCC33013 | 167 | <i>Mycobacterium</i> | <i>wolinskyi</i> | ATCC700010 |
| 84 | <i>Mycobacterium</i> | <i>koreense</i> | DSM 45576 | 168 | <i>Mycobacterium</i> | <i>xenopi</i> | ATCC19250 |



| Species | Result | Limit of detection (dilution ratio of McFarland) | Median of the detecting temperature (°C) |
|---|----------------|--|--|
| <i>M. tuberculosis</i> var. <i>africanum</i> | + | 10 ⁻⁵ | 63.6 |
| <i>M. tuberculosis</i> var. <i>bovis</i> | + | 10 ⁻⁵ | 63.2 |
| <i>M. tuberculosis</i> var. <i>microti</i> | + | 10 ⁻⁵ | 63.3 |
| <i>M. tuberculosis</i> var. <i>tuberculosis</i> | + | 10 ⁻⁵ | 63.4 |
| <i>M. haemophilum</i> | - ^a | 10 ⁻⁵ | 57.0 |

Figure 1. The graphs of testing result of *M. tuberculosis*, their variants and *M. haemophilum* by G-MTB

“TB” indicates *M. tuberculosis*. In the case of *M. haemophilum*, the temperature of the peak by the G-MTB was lower than that of *M. tuberculosis*.

+ : Positive, - : Negative, ^a The peak is shown at low temperature in the graph of the melting curve analysis.

bacterium timonense) は *M. avium* 検出試薬では検出ピークが認められなかったため *M. intracellulare* と全く区別で

きなかった。さらに判定は陰性であるが *M. intracellulare* の検出ピークよりも低温でピークが認められた菌種は 8 種で

Table 2. The species that showed positive result or the peak at low temperature by G-MAC

| Species | Result | Limit of detection (dilution ratio of McFarland) | Median of the detecting temperature (°C) |
|---|----------------|---|---|
| <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> | + | 10 ⁻⁶ | 55.2 |
| <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> | + | 10 ⁻⁶ | 55.0 |
| <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> | + | 10 ⁻⁶ | 55.2 |
| <i>M. intracellulare</i> subsp. <i>chimaera</i> | + | 10 ⁻⁵ | 54.9 |
| <i>M. intracellulare</i> subsp. <i>intracellulare</i> | + | 10 ⁻⁵ | 54.6 |
| <i>M. intracellulare</i> subsp. <i>yongonensis</i> | + | 10 ⁻⁵ | 55.0 |
| <i>M. arosiense</i> | + ^b | 10 ⁻⁶ | 53.0 |
| <i>M. colombiense</i> | + ^b | 10 ⁻⁵ | 51.4 |
| <i>M. genavense</i> | + ^b | 10 ⁻⁴ | 53.1 |
| <i>M. lentiflavum</i> | + ^b | 10 ⁻⁴ | 53.2 |
| <i>M. mantenii</i> | + ^b | 10 ⁻³ | 53.3 |
| <i>M. marseillense</i> | + ^b | 10 ⁻³ | 54.3 |
| <i>M. parmense</i> | + ^b | 10 ⁻³ | 53.8 |
| <i>M. timonense</i> | + ^b | 10 ⁻⁶ | 54.9 |
| <i>M. vulneris</i> | + ^b | 10 ⁻³ | 53.7 |
| <i>M. bourgelatii</i> | - ^a | — | 44.1 |
| <i>M. florentinum</i> | - ^a | 10 ⁻⁴ | 43.8 |
| <i>M. hiberniae</i> | - ^a | 10 ⁻² | 45.4 |
| <i>M. senuense</i> | - ^a | 10 ⁻³ | 46.4 |
| <i>M. stomatepiae</i> | - ^a | 10 ⁻² | 45.1 |

+ : Positive, - : Negative, ^a The peak was shown at low temperature in the graph of melting curve analysis,

^b False positive.

Table 3. The species that showed positive result or a peak at low temperature by the *M. avium* detection reagent of G-MAI

| Species | Result | Limit of detection (dilution ratio of McFarland) | Median of the detecting temperature (°C) |
|--|----------------|---|---|
| <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> | + | 10 ⁻⁵ | 61.4 |
| <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> | + | 10 ⁻⁶ | 61.3 |
| <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> | + | 10 ⁻⁶ | 61.3 |
| <i>M. bourgelatii</i> | - ^a | 10 ⁻¹ | 48.9 |
| <i>M. colombiense</i> | - ^a | 10 ⁻⁵ | 45.3 |
| <i>M. florentinum</i> | - ^a | 10 ⁻⁵ | 50.7 |
| <i>M. fluoranthenvivorans</i> | - ^a | 10 ⁻¹ | 48.8 |
| <i>M. genavense</i> | - ^a | 10 ⁻⁵ | 51.1 |
| <i>M. heidelbergense</i> | - ^a | 10 ⁻³ | 53.1 |
| <i>M. intermedium</i> | - ^a | 10 ⁻³ | 49.0 |
| <i>M. kubicae</i> | - ^a | 10 ⁻³ | 48.3 |
| <i>M. lentiflavum</i> | - ^a | 10 ⁻⁴ | 52.0 |
| <i>M. mantenii</i> | - ^a | 10 ⁻³ | 55.2 |
| <i>M. montefiorensis</i> | - ^a | 10 ⁻² | 51.7 |
| <i>M. nebraskense</i> | - ^a | — | 44.2 |
| <i>M. scrofulaceum</i> | - ^a | — | 49.0 |
| <i>M. seoulense</i> | - ^a | — | 51.3 |
| <i>M. simiae</i> | - ^a | 10 ⁻² | 50.6 |
| <i>M. triplex</i> | - ^a | 10 ⁻⁶ | 51.1 |

+ : Positive, - : Negative, ^a The peak is shown at low temperature in the graph of melting curve analysis.

あった (Table 4)。

考 察

本研究では、抗酸菌基準株を用いて G-MTB, G-MAC, G-MAI の最小検出限界を確認した。各試薬における検出対象

菌の最小検出限界は McFarland No. 1×10⁻⁵-10⁻⁶であった。結核菌における McFarland No. 1 を 1.0×10⁷ CFU/mL とすると⁸⁾, G-MTB の最小検出限界は 1.0×10² CFU/mL であった。同様に、MAC における McFarland No. 1 を 3.0×10⁸ CFU/mL とすると⁹⁾, G-MAC および G-MAI の最小検出限

Table 4. Species that showed positive results or peaks at low temperature by the *M. intracellulare* detection reagent of G-MAI

| Species | Result | Limit of detection (dilution ratio of McFarland) | Median of the detecting temperature (°C) |
|---|----------------|---|---|
| <i>M. intracellulare</i> subsp. <i>chimaera</i> | + | 10 ⁻⁵ | 56.6 |
| <i>M. intracellulare</i> subsp. <i>intracellulare</i> | + | 10 ⁻⁵ | 56.1 |
| <i>M. intracellulare</i> subsp. <i>yongonensis</i> | + | 10 ⁻⁵ | 56.7 |
| <i>M. florentinum</i> | + ^b | 10 ⁻³ | 55.8 |
| <i>M. genavense</i> | + ^b | 10 ⁻⁴ | 56.0 |
| <i>M. lentiflavum</i> | + ^b | 10 ⁻¹ | 54.9 |
| <i>M. marseillense</i> | + ^b | 10 ⁻⁴ | 55.7 |
| <i>M. stomatepiae</i> | + ^b | 10 ⁻² | 56.0 |
| <i>M. timonense</i> | + ^b | 10 ⁻⁶ | 56.8 |
| <i>M. triplex</i> | + ^b | 10 ⁻⁶ | 53.7 |
| <i>M. anyangense</i> | - ^a | 10 ⁻³ | 50.4 |
| <i>M. celeriflavum</i> | - ^a | 10 ⁻⁴ | 49.3 |
| <i>M. conspicuum</i> | - ^a | 10 ⁻⁵ | 42.8 |
| <i>M. hodleri</i> | - ^a | - | 43.5 |
| <i>M. noviomagense</i> | - ^a | 10 ⁻² | 42.1 |
| <i>M. riyadhense</i> | - ^a | 10 ⁻³ | 49.5 |
| <i>M. szulgai</i> | - ^a | 10 ⁻⁵ | 49.9 |
| <i>M. triviale</i> | - ^a | 1.0 | 41.5 |

+ : Positive, - : Negative, ^a The peak was shown at low temperature in the graph of melting curve analysis,

^b False positive.

Table 5. The G-MAI testing results of species that showed false positive by G-MAC

| Species | Result of MAC | Result of MAV | Result of MIN |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>M. colombiense</i> | + ^b | - ^a | - |
| <i>M. mantenii</i> | + ^b | - ^a | - |
| <i>M. genavense</i> | + ^b | - ^a | + ^b |
| <i>M. lentiflavum</i> | + ^b | - ^a | + ^b |
| <i>M. arosiense</i> | + ^b | - | - |
| <i>M. parmense</i> | + ^b | - | - |
| <i>M. vulneris</i> | + ^b | - | - |
| <i>M. marseillense</i> | + ^b | - | + ^b |
| <i>M. timonense</i> | + ^b | - | + ^b |

+ : Positive, - : Negative, ^a The peak was shown at low temperature in the graph of melting curve analysis,

^b False positive.

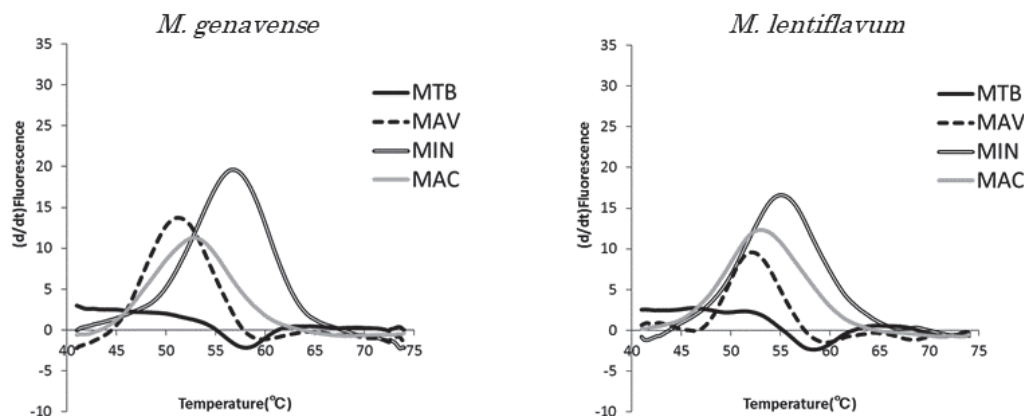
“MAC,” “MAV,” and “MIN” means the names of reagents. “MAV” is *M. avium* detection reagent of G-MAI, and “MIN” is *M. intracellulare* detection reagent of it.

界は、*M. avium* では 3.0×10^2 CFU/mL, *M. intracellulare* では 3.0×10^3 CFU/mL であった。しかしながら、*M. intracellulare* subspecies の測定結果を確認したところ、*M. intracellulare* subsp. *chimaera* は G-MAI では 3.0×10^2 および 3.0×10^1 CFU/mL 相当の試料が 2 テスト中 1 テストで陽性であり、G-MAC では 3.0×10^2 CFU/mL が 2 テスト中 1 テストで陽性であった。同様に、*M. intracellulare* subsp. *yongonensis* では G-MAI では 3.0×10^2 CFU/mL が 2 テスト中 1 テストで陽性であった。以上を考慮すると、G-MAI および G-MAC における *M. intracellulare* subspecies の検出限界は 3.0×10^3

から 3.0×10^2 CFU/mL の間であると考えられた。

G-MTB の交差反応性の検討では偽陽性は認められなかったが、*M. haemophilum* は G-MTB を用いた測定で特徴的な検出ピークを示した (Figure 1)。G-MTB の測定で他に低温ピークを生じた NTM は認められなかったため、G-MTB を用いた抗酸菌遺伝子検査においてこの様な測定結果が示された場合、*M. haemophilum* が検出されている可能性が考えられた。G-MTB のプローブ配列と *M. haemophilum* の *dnaJ* 遺伝子のうち、プローブが結合しうる領域の塩基配列の一致率を算出したところ、一致率は 88.2% であった。塩基配列に類似性があったため、G-MTB により低温ピークが出現したと考えられた。

G-MAC では 9 種が偽陽性を示したが、このうち 7 種は G-MAI を併用することで *M. avium* または *M. intracellulare* 以外の NTM であると推測できる可能性が考えられた (Table 5)。7 種のうち *Mycobacterium colombiense*, *Mycobacterium mantenii* は *M. avium* 検出試薬では低温でピークを示し、*M. intracellulare* 検出試薬では検出ピークが認められなかった。*M. genavense*, *M. lentiflavum* は *M. intracellulare* 検出試薬でも陽性となったが *M. avium* 検出試薬では低温での検出ピークが認められた。この現象は過去に報告されていたが¹⁰⁾、本研究でも再現された。*Mycobacterium arosiense*, *Mycobacterium parmense*, *Mycobacterium vulneris* は G-MAI では全く検出ピークが認められなかった。一方で、*M. marseillense* と *M. timonense* は G-MAI でも *M. intracellulare* 偽陽性となり、*M. intracellulare* subspecies と全く区別されなかった。この 2 種と *M. intracellulare* の発育温度を比較すると、*M. intracellulare* は 30°C および 37°C で発育するのに対し¹¹⁾、*M. marseillense* と *M. timonense* は 45°C で



| Species | Result of MAC | Result of MAV | Result of MIN | Limit of detection by MIN (McFarland) |
|---|---------------|----------------|----------------|---------------------------------------|
| <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> | + | + | - | - |
| <i>M. intracellulare</i> subsp. <i>intracellulare</i> | + | - | + | 10^{-5} |
| <i>M. genavense</i> | + | - ^a | + ^b | 10^{-4} |
| <i>M. lentiflavum</i> | + | - ^a | + ^b | 10^{-1} |

Figure 2. The graphs of testing results of *M. genavense* and *M. lentiflavum* by the reagents of GENECUBE “MTB”, “MAV”, “MIN”, and “MAC” means the names of reagents. “MAV” is the *M. avium* detection reagent of G-MAI, while “MIN” is the corresponding *M. intracellulare* detection reagent. The concentration of sample was McFarland 1.0. The table under the graphs shows the testing results of *M. avium* subsp. *avium*, *M. intracellulare* subsp. *intracellulare*, *M. genavense*, and *M. lentiflavum* by G-MAC, *M. avium* detection reagent of G-MAI, and *M. intracellulare* detection reagent of it. The data in this table was referred from Table 2 to 4.

+ : Positive, - : Negative, ^a The peak was shown at low temperature in the graph of melting curve analysis, ^b False positive.

発育可能であるため¹²⁾¹³⁾, 発育温度の差を利用することで鑑別できる可能性があると考えられた。

G-MAIの*M. avium*検出試薬では偽陽性を示す菌種は認められず, 16菌種が低温で検出ピークを示した。一方で,*M. intracellulare*検出試薬では7菌種が偽陽性を示したが, このうち4種は*M. avium*検出試薬による融解曲線解析で低温での検出ピークが認められ,*M. intracellulare*を測定した場合とは結果が異なった。残る*M. marseillense*, *M. stomatepiae*, *M. timonense*は融解曲線解析結果でも*M. intracellulare*と区別できなかったが,*M. stomatepiae*はG-MACでは低温ピークを示す点で*M. intracellulare*と区別された。また,*M. stomatepiae*は30°Cでのみ発育可能であるため¹⁴⁾, *M. intracellulare*との発育温度の差を利用することで鑑別できる可能性があると考えられた。

培養が難しい菌の一つとして知られる*M. genavense*は¹⁰⁾¹⁵⁾, 今回の試験においてG-MACおよびG-MAIの*M. intracellulare*検出試薬で偽陽性を示した一方で,*M. avium*検出試薬では低温での検出ピークが認められた(Figure 2)。*M. genavense*と同じ検出パターンを示した菌種は*M. lentiflavum*のみであった。*M. genavense*と*M. lentiflavum*の最小検出限界は,*M. avium*検出試薬ではMcFarland No. 1 $\times 10^{-5}$ とMcFarland No. 1 $\times 10^{-4}$ であった。*M. intracellulare*検出試薬ではMcFarland No. 1 $\times 10^{-4}$ とMcFarland No. 1 $\times 10^{-1}$ であり,*M. intracellulare*検出試薬における2種の最小検出限界には1,000倍の差が認められた。これは菌種間の塩基配列の相違によって*M. intracellulare*検出試薬での両菌

種の反応性が異なり,*M. lentiflavum*ではPCR産物が得られにくかったためと推測される。

*M. genavense*と*M. lentiflavum*を*M. avium*検出試薬で測定した際の検出ピーク温度の差は約1°Cであったため(Figure 2), 検出温度差でこの2種を区別することは困難であると考えられた。一方で,*M. intracellulare*検出試薬での最小検出限界は前述の通りであり, 二つの菌種で明確に異なっていた。McFarland No. 1の菌濃度をMACと同じく 3.0×10^8 CFU/mLと仮定すると, 検出に必要な*M. lentiflavum*の濃度は 3.0×10^7 CFU/mL以上である。塗抹3+での菌数が約 1.0×10^7 CFU/mLに相当するため¹⁶⁾, G-MAIにて*M. avium*検出試薬で低温ピークを示し, かつ*M. intracellulare*検出試薬およびG-MACで陽性となった臨床検体は, 塗抹検査結果が2+以下であれば*M. genavense*と推測できると考えられた。これに対して, 培養試料の場合は菌濃度が高濃度になるため,*M. lentiflavum*でも検出可能な菌濃度になりえる。*M. genavense*は培地での生育が遅い菌であるため, 塗抹検査で強陽性検体でありながら液体培養陰性, かつGENECUBEによる測定で前述のような結果になった場合には*M. genavense*である可能性が考えられる。

GENECUBEによる測定で様々な抗酸菌が特徴的な検出ピークを示した理由は, 標的遺伝子の性質にあると考えられる。G-MTB等の試薬では各検出対象菌の*dnaJ*遺伝子を標的遺伝子としている。*dnaJ*は16SrRNA遺伝子,*rpoB*,*hsp 65*と同じハウスキーピング遺伝子であり, 抗酸菌間で広く保存されているが, その一方で*dnaJ*の塩基配列は種間差が

あることも知られている。抗酸菌 56 種を対象とした遺伝子配列解析では、16SrRNA 遺伝子の抗酸菌種間での配列類似性が 96.6%, *rpoB* が 91.3%, *hsp65* が 91.1% であったのに対し, *dnaJ* は 80.4% であった¹⁷⁾。本研究で用いた試薬は抗酸菌間で保存され配列類似性がある *dnaJ* を検出対象としているため、一部の抗酸菌の *dnaJ* は各試薬のプライマーおよび QProbe と類似的な塩基配列を有し, *dnaJ* の PCR 産物と QProbe が反応したと考えられた。その上で、菌種ごとの *dnaJ* の配列多様性により QProbe と *dnaJ* PCR 産物との Tm 値が抗酸菌ごとに特徴的な値になったと推測された。一方で、各菌種の *dnaJ* 遺伝子塩基配列や QProbe と *dnaJ* PCR 産物との配列類似性から低温ピークの有無や検出温度を推測することは困難であった。

本研究では抗酸菌基準株を用いて各試薬の性能評価を行った。一方で、今回用いた株は基準株のみであり、臨床分離株での検討は行わなかったため、各菌種における検出ピーク温度の同種株間差については、臨床分離株を用いたさらなる検討が必要であると考えられた。また、抗酸菌は 2021 年 1 月時点で 192 菌種 (14 亜種) が明らかになっているが⁷⁾、今回解析対象とした菌種は 168 種 (亜種含む) であり、一部の抗酸菌に対する交差反応性は確認できていない点に留意する必要がある。

本研究を通じて QProbe を用いた融解曲線解析によって様々な抗酸菌が特徴的な温度で検出ピークを示すことが明らかになった。遺伝子として抗酸菌間で広く保存され、かつ菌種ごとに特有の Tm 値を示す領域を QProbe で検出する検出系を構築することで、抗酸菌種を網羅的に鑑別する検出法の構築が期待できる。

利益相反: 川嶋洋介および杉山明生は東洋紡株式会社の社員である。東洋紡株式会社は鈴木広道の所属先である筑波大学 医学医療系 感染症内科学に対して学術指導料を支払っている。その他、申告事項なし。

文 献

- Hida, Y., K. Hisada, A. Shimada, et al. 2012. Rapid Detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Use of Quenching Probe PCR (geneCube). *J. Clin. Microbiol.* 50: 3604-3608.
- Kurata, S., T. Kanagawa, K. Yamada, et al. 2001. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY(RR) FL-labeled probe or primer. *Nucleic. Acids. Res.* 29: E34.
- Takatsu, K., T. Yokomaku, S. Kurata, et al. 2004. A new approach to SNP genotyping with fluorescently labeled mononucleotides. *Nucleic. Acids. Res.* 32: E60.
- Ono, A., Y. Okuhashi, Y. Takahashi, et al. 2012. Advantages of the quenching probe method over other PCR-based methods for detection of the JAK2 V617F mutation. *Oncol Lett.* 4: 205-208.
- 川嶋洋介, 上倉佳子, 山下計太, 他. 2018. 全自動遺伝子解析装置 GENECUBE を利用した *Mycoplasma pneumoniae* のマクロライド耐性遺伝子変異検出法の構築および評価. *日臨微誌* 28: 98-105.
- Morinaga, Y., H. Suzuki, S. Notake, et al. 2020. Evaluation of GENECUBE *Mycoplasma* for the detection of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *J Med Microbiol.* 69: 1346-1350.
- LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <https://lpsn.dsmz.de/> 2021 年 1 月 25 日現在
- Martin-Casabona, N., D. Xairó Mimó, T. González, et al. 1997. Rapid method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* by using DNA probes. *J Clin Microbiol.* 35: 2521-2525.
- Thomson, R., R. Carter, C. Gilpin, et al. 2008. Comparison of methods for processing drinking water samples for the isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl Environ Microbiol.* 74: 3094-3098.
- 山下有加, 諸熊由子, 持丸朋美, 他. 2017. GENECUBE で偽陽性反応を示した非結核性抗酸菌の 2 症例. *日臨微誌* 27: 306-312.
- 日本結核・非結核性抗酸菌症学会. 2020. 抗酸菌検査ガイド 2020.
- 近松網代, 五十嵐ゆり子, 青野昭男, 他. 2016. TRCReady[®] MTB による *Mycobacterium tuberculosis* complex と TRCReady[®] MAC による *Mycobacterium avium* および *Mycobacterium intracellulare* の同定精度評価. *結核* 91: 623-629.
- Ben Salah, L., C. Cayrou, D. Raoult, et al. 2009. *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchodurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59: 2803-2808.
- Pourahmad, F., F. Cervellione, K. D. Thompson, et al. 2008. *Mycobacterium stomatepieae* sp. nov., a slowly growing, non-chromogenic species isolated from fish. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 2821-2827.
- 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 の 1 例. *感染症誌* 89: 259-264.
- 青野昭男, 近松網代, 山田博之, 他. 2012. 抗酸菌塗抹検査外部精度評価の試み. *日臨微誌* 22: 279-283.
- Yamada-Noda, M., K. Ohkusu, H. Hata, et al. 2007. *Mycobacterium* species identification - A new approach via *dnaJ* gene sequencing. *Syst Appl Microbiol.* 30: 453-462.

Species specificity evaluation of GENECUBE reagents detecting mycobacteria

Yosuke Kawashima¹⁾, Kinuyo Chikamatsu²⁾, Akio Sugiyama³⁾, Hiromichi Suzuki⁴⁾, Satoshi Mitarai²⁾

¹⁾Biotechnology Research Laboratory, TOYOBO CO., LTD.

²⁾Department of Mycobacterium Reference and Research, the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

³⁾Diagnostic System Department, TOYOBO CO., LTD.

⁴⁾Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

We evaluated the limit of detection (LoD) and cross-reactivity of GENECUBE MTB (G-MTB), GENECUBE MAC (G-MAC) and GENECUBE MAI (G-MAI) in 168 standard strains of *Mycobacterium* species. All reagents detected the target species correctly, and the LoD was found to be between McFarland No. 1×10^{-5} and 10^{-6} .

All non-target species tested by G-MTB were negative, although a peak in the melting curve analysis was detected for *Mycobacterium haemophilum* in the low-temperature range (57°C). In the G-MAC assay, 14 non-target species showed peaks (9: false positive, 5: low temperature). In the G-MAI (*M. intracellulare* detection reagent, MIN), 15 non-target species showed peaks (7: false positive, 8 low temperature). In G-MAI (*M. avium* detection reagent, MAV), 16 non-target species showed peaks (0: false positive, 16: low temperature). *Mycobacterium genavense*, a culturable but very slow-growing organism even in liquid culture medium and generally reported to be culture negative, showed a unique pattern (MAC: positive, MIN: positive, MAV: low temperature). *Mycobacterium lentiflavum* showed a similar pattern. The difference in the LoD of *M. genavense* and *M. lentiflavum* was one thousand-fold. Subsequently, we suggest that specimens that are strongly smear-positive, culture-negative, and show this unique pattern in GENECUBE indicate an infection by *M. genavense*.

In this study, the characteristic detection patterns were obtained from the analysis of various *Mycobacterium* species with GENECUBE. This suggests that there is the possibility of exhaustive discrimination of *Mycobacterium* species by combination of some of *Mycobacterium* detection reagents using the Quenching probe.