

免疫クロマトグラフィによる結核菌群迅速同定に関する検討

¹⁾三菱化学ピーシーエル臨床微生物, ²⁾防衛医科大学校検査部, ³⁾東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野

長谷川美幸¹⁾ 小山 悦子¹⁾ 内野卯津樹¹⁾ 佐藤 弓枝¹⁾
小林 寅詰¹⁾ 西園寺 克²⁾ 渡辺 彰³⁾

(平成 14 年 7 月 10 日受付)

(平成 14 年 12 月 17 日受理)

Key words : immunochromatographic assay, *Mycobacterium tuberculosis*, rapid identification

要 旨

全国の医療施設より抗酸菌感染症を疑い収集した多数の喀痰検体を対象とし, MGIT960 を用い培養後, 陽性を呈した 100 検体を検討に用いた. 抗酸菌の同定にはイムノクロマトグラフィを用いたキャピリア TB(CTB)と対照としてアキュプローブを使用した. 喀痰検体を MGIT960 にて培養し, 陽性を呈した時点で培養液を CTB に接種し, 判定を行った.

MGIT960 陽性サンプル 100 検体から検出された抗酸菌の内訳は *Mycobacterium tuberculosis* complex 49 株, *M. avium-intracellulare* complex (MAC) 46 株, その他 5 株であった.

これらのサンプルの直接同定において, CTB, アキュプローブ結核菌群 (APMT) で両者が陽性を示した検体は 48 検体であった. CTB が陽性で APMT が陰性を示す 1 検体は MGIT チューブを追加培養後, APMT にて陽性を示した. 逆に CTB が陰性で APMT が陽性の検体は認められなかった. MAC が検出された 46 検体およびその他の抗酸菌検出検体では, CTB はすべて陰性であった.

MGIT960 陽性と同時に CTB を使用することで, 抗酸菌症における主要起炎菌の結核菌群を迅速に鑑別可能であった. CTB は感度と特異性が高く, 操作は簡便であることから, 結核症の迅速診断に有用で, 我が国の結核症対策に大きく寄与するものと考えられた.

[感染症誌 77 : 110~115, 2003]

序 文

厚生労働省の平成 12 年結核発生動向調査¹⁾によれば平成 12 年の結核菌罹患率は 4 年ぶりに低下傾向を示し, 新規の結核登録患者数および結核による死亡数は対前年を下回った. しかし今後も継続的に減少するか否かは予断を許さない状況である. 結核症および非結核性抗酸菌症は類似の症状を呈すが, 治療や感染拡大防止のために結核症を

早期に鑑別診断することが極めて重要である. しかし, 現在多用されているナイアシン試験や DNA-Probe 法には判定までに要する期間の長さや操作の煩雑さ等の問題がある.

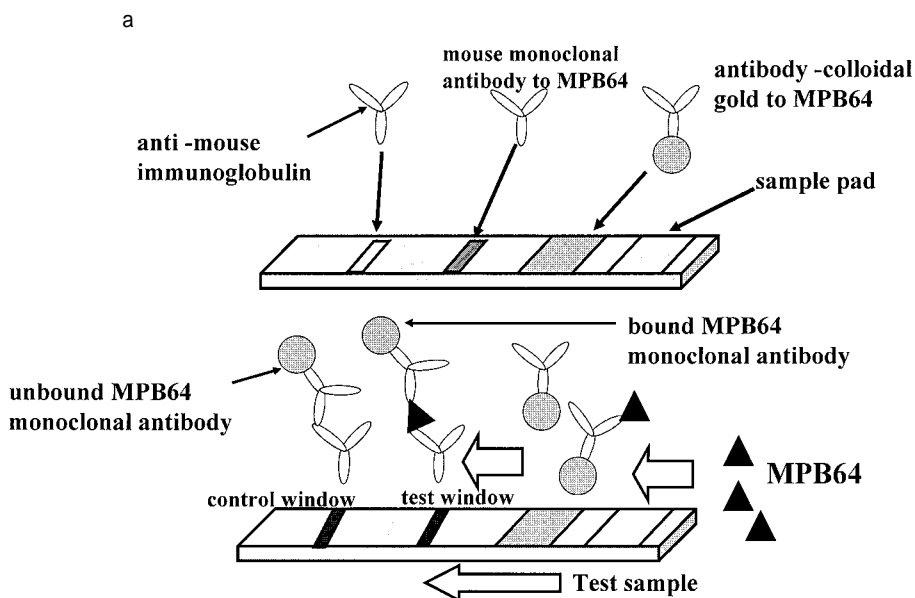
2001 年 7 月に保険収載された結核菌群同定試薬キャピリア TB はイムノクロマトグラフィを用いた簡便な同定キットであり, 結核菌群に特異的な分泌蛋白である *Mycobacterial protein fraction from Rm of 0.64 in electrophoresis* (MPB64) を標的として検出する. サンプルパッド部分に試料を滴下すると金コロイド標識抗 MPB64 抗体が溶解

別刷請求先 : (〒174 8555 東京都板橋区志村 3 30 1

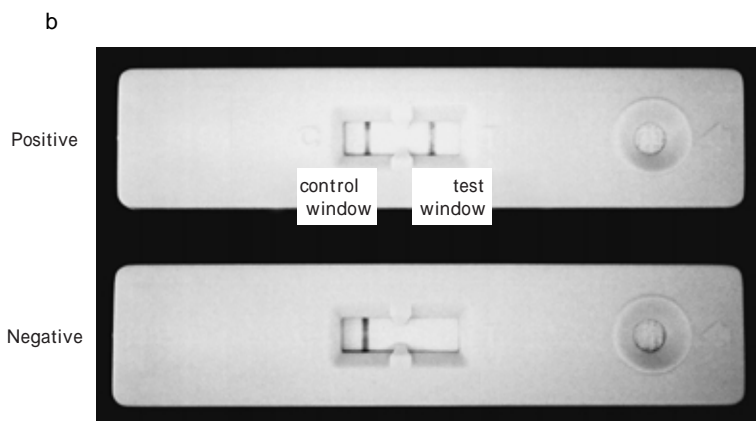
三菱化学ピーシーエル臨床微生物

小林 寅詰

Fig. 1 a : Principle of capilia TB
 b : Capilia TB showing positive result (upper) and negative result (lower)



MPB64: Mycobacterial protein fraction from BCG of Rm 0.64 in electrophoresis



し、試料中の MPB64 と免疫複合体を形成する。この免疫複合体は展開部を毛細管現象により移動し、判定部に固定化された MPB64 抗体に補足され、赤紫色のラインを形成する。この赤紫色のラインを目視で確認し、試料中の MPB64 の存在の有無から判定を行う (Fig. 1a , 1b) .

今回われわれは、液体培養後にキャピリア TB を用いることによる検査所要日数の短縮および検査精度について検討を行ったので報告する。

材料と方法

1. 対象検体

全国の医療施設より抗酸菌感染症を疑い収集した多数の喀痰検体を対象とし、既法²⁾に従い MGIT 960 を用い培養後、陽性を呈した 100 試料を検討に用いた。

2. 同定キット

Mycobacterium tuberculosis complex (結核菌群) の同定にはイムノクロマトグラフィを用いたキャ

Table 1 Comparison of the results obtained with Capilia TB and AccuProbe

Capilia TB	AccuProbe		No. of samples
	MTC	MAC	
+	+	NT	48
+	-	-	1*
-	-	+	46
-	-	-	5
Total			100

MTC : *M. tuberculosis* complexMAC : *M. avium-intracellulare* complex

NT : Not tested

* : AccuProbe-positive after additional incubation

ピリア TB(日本ベクトン・ディッキンソン)と、対照として DNA-Probe 法による同定検査試薬アキュプローブ結核菌群(極東製薬)を、また *M. avium-intracellulare* complex の同定にはアキュプローブアビウム・イントラセルラー(極東製薬)を使用した。これらで同定不可能の場合は DDH マイコバクテリウム(極東製薬)を用い DNA-DNA hybridization により菌名を決定した。

3. 同定方法

MGIT960 にて培養し、陽性を呈した時点で MGIT チューブから採取した培養液 100 μ l をキャピリア TB に接種し、イムノクロマトグラフィによる判定を行った。またアキュプローブには同培養液の遠心集菌沈渣を検査に供した。

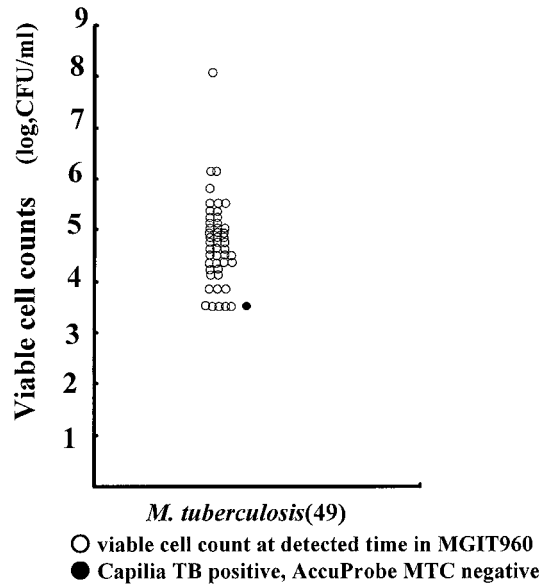
4. 抗酸菌数定量

培養液中菌量の測定は、培養液の 10 倍希釈系列を滅菌生理食塩水にて作製し、Middlebrook 7H11 agar にコンラージ塗抹した。35 $^{\circ}$ C、5~14 日間培養後発育したコロニーを観察し培養液 1ml あたりの菌量を求めた。

成 績

MGIT960 陽性サンプル 100 検体から検出された抗酸菌の内訳は *M. tuberculosis* complex (結核菌群) 49 株、*M. avium-intracellulare* complex (MAC) 46 株、*M. abscessus* 3 株、*M. kansasii* 2 株であった。

Table 1 に MGIT 培養液からのキャピリア TB とアキュプローブ法の同定成績比較を示した。

Fig. 2 Density of *M. tuberculosis* required to generate a positive signal with the MGIT960 system

キャピリア TB、アキュプローブ結核菌群で両者陽性を示した検体は 48 検体であった。キャピリア TB 陽性で、アキュプローブ結核菌群、MAC 共に陰性が 1 検体存在した。キャピリア TB とアキュプローブ結核菌群で成績が乖離した 1 検体は MGIT チューブを追加培養後、アキュプローブ結核菌群にて陽性を示した。キャピリア TB 陰性でアキュプローブ結核菌群陰性、アキュプローブ MAC 陽性は 46 検体であった。いずれのキットにおいても陰性は 5 検体で、これらは DDH マイコバクテリアを用い検出菌を同定した結果、*M. abscessus* 3 検体、*M. kansasii* 2 検体であった。

MGIT960 培養陽性時の培養液 1ml あたりの抗酸菌生菌数を Fig. 2 に示した。各白丸は結核菌群の菌量を示し約 10^8 CFU/ml であった 1 検体を除き、 $10^3 \sim 10^6$ CFU/ml の菌量で MGIT960 は陽性を示した。黒丸で示した 1 検体は前述したアキュプローブ法での直接同定不成功検体であった。また成績には示さなかったが、MAC 等の結核菌群以外の抗酸菌の培養液中の菌量は既報³⁾と同様、結核菌群に比較し高かった。

考 察

今回われわれは、臨床サンプル多数による MGIT960 抗酸菌陽性培養液を用いた新規同定検査法のキャピリア TB と結核菌群迅速同定法であるアキュプロープによる直接同定成績を比較し、基礎的性能について検討を行った。

結核菌を他の抗酸菌と鑑別するためには、我が国では古くからナイアシンテストが用いられてきたが、小川培地を培養に用い菌株が産生するナイアシンの蓄積を検出する本法は、培養から判定までに極めて長い時間を要し、実際の臨床の現場に大きな支障を与えている。またナイアシン蓄積性試験は結核菌以外の MAC, *M. simiae*, *M. chelonae* 等でも陽性を示すことが報告されている⁴⁾。そのためナイアシンテストや生化学的性状試験に代わって DNA-RNA hybridization 法や遺伝子増幅法等の迅速同定法が用いられている⁵⁾。しかしこれらの方法は迅速に同定が可能なものの操作が煩雑で、技術の習得を必要とする。遺伝子増幅の場合は増幅産物の汚染防止の観点から専用の検査室の設置を要し、また高コスト等のデメリットがあげられる。

キャピリア TB はこれらの問題を解決した新しい同定検査法である。抗酸菌が産生する菌体外蛋白質のうち MPB64 は結核菌群に特異的な分子量 22,400 の蛋白質である。1986 年に Harboe と Nagai⁶⁾によって単離され、1993 年に Li⁷⁾によって結核菌群に特異的な分泌蛋白であると報告された。キャピリア TB はこの MPB64 をイムノクロマトグラフィにより検出することで結核菌群を同定する新規キットである。実際の操作は極めて簡便で抗酸菌培養液、もしくは菌体を懸濁した抗原抽出液 100 μ l をサンプルパッド部に接種し、15 分間静置後、判定部のラインを肉眼で判別する (Fig. 1b)のみである。このため抗酸菌を扱う設備のある施設であれば特別な装置や高等技術の習得は不要で、小規模な医療機関においても利用が可能である。

結果に示したようにキャピリア TB とアキュプロープ結核菌群を用いた成績は結核菌群が検出された検体で全て一致した。また結核菌群以外の菌

種が検出された検体でキャピリア TB が疑陽性を示した検体はなかった。

今回の検討で MGIT960 培養陽性菌液を用い直接同定を行った場合、キャピリア TB 陽性、アキュプロープ結核菌群陰性、アキュプロープ MAC 陰性が 1 検体認められた。MGIT チューブを追加培養後、再度両アキュプロープを実施し、アキュプロープ結核菌群陽性、アキュプロープ MAC 陰性となり、結核菌群が検出された。この検体では MGIT960 陽性直後の培養液中抗酸菌量は 10^3 CFU/ml 程度と低く、これがアキュプロープ法で直接同定に失敗した原因と考えられた。すなわち標的となる結核菌群の RNA 量が少なかったため反応強度が cut off 値に満たなかったものと推測される。一方、キャピリア TB の標的物質は菌体外蛋白質の MPB64 であることから、菌体量には直接左右されず、成績に差が生じたと考えられた。このようにキャピリア TB は DNA-Probe 法を用いたアキュプロープと同等かそれ以上の感度と特異性を示した。

本キットについて Abe⁸⁾は、*Mycobacterium bovis* BCG 日本株を Middlebrook 7H9 broth 中で培養した菌体を用いキャピリア TB による検査を実施し、検出限界を $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml と示している。この報告ではキャピリア TB の検出限界はわれわれの成績に比較し 10 倍以上高い菌量となっている。しかし Abe⁸⁾の実験手法は 0.1% tween 80 添加リン酸 buffer で菌体を 1 回洗浄し、同液で希釈系列を作製しており、これは培養 broth 中に菌が放出した MPB64 を取り除く為と記載している。われわれは実際の臨床検体について MGIT を用い培養を行い、陽性となった時点での抗酸菌量とキャピリア TB の反応性について検討を行った。サンプルとした液体培地中には結核菌群が発育する際に培養液中に分泌した MPB64 が含まれているため、Abe⁸⁾の論文に比較し菌量が少量であってもキャピリア TB は陽性を示したことが示唆される。臨床検体を用いることで実際の抗酸菌培養検査に、より近い現象が反映されたと考える。

また Hasegawa⁹⁾は MGIT 陽性サンプルを室温で 1 年間放置しキャピリア TB の反応性が変化

しなかったことを報告している。すなわちキャピリア TB 陽性サンプルは 1 年後においても陽性を示し、*M. tuberculosis* complex 以外の抗酸菌が含まれる MGIT 陽性、キャピリア TB 陰性サンプルは 1 年後においてもキャピリア TB 陰性であった。このことはキャピリア TB の標的物質の MPB 64 は安定な物質であり、キャピリア TB の反応も安定に維持されることを示している。

さらに Hasegawa ら⁹⁾は結核症患者の化学療法中の継続観察を 4 週毎に 12 週まで行い、MGIT 陽性、アキュプローブ結核菌群陽性の検体はすべてキャピリア TB 陽性であることを示し、キャピリア TB は高い感度と特異性を持つと結論している。

既報²⁾でわれわれは MGIT960 を用いて培養を行った場合、陽性までに要する平均日数は 12.5 日であることを報告した。米国の Centers for Disease Control and Prevention (CDC) の勧告¹⁰⁾では報告日数に関して *M. tuberculosis* の同定成績は 2~3 週間以内に報告する必要があるとしている。国内の抗酸菌症の起炎菌の内訳は報告者、対象とした母集団によっても大きく異なるが、われわれが多数の臨床検体を対象として実施した検討²⁾では約 70% が結核菌群であった。MGIT960 陽性時に直ちにキャピリア TB を用い同定を行うことで、MGIT960 陽性とほぼ同時に抗酸菌症起炎菌の 70% を占める結核菌群を同定することが可能で、平均 12.5 日で結核菌群の検出と同定を終了させることができる。すなわちキャピリア TB を用いることで国内の抗酸菌症の約 70% を迅速、簡便に鑑別できると考えられる。

結核症および非結核性抗酸菌症は類似の症状を呈すことから、治療や感染拡大防止のために結核症を早期に鑑別診断することが求められる。日本国内の結核症の実態は欧米諸国に比べ極めて劣悪な状況にあると言われ、この状況を改善するためにも、原因菌となる抗酸菌に対する迅速で精度の

高い検査の普及が望まれる。

キャピリア TB は感度と特異性が高く、操作は簡便であることから結核症の迅速診断に有用で、我が国の結核症対策に大きく寄与するものと考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省：平成 12 年、結核発生動向調査，東京，2001；p.1-2.
- 2) 小林寅詰，戸田陽代，小山悦子，長谷川美幸，橋口則重，荒井秀夫，他：Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) を用いた自動抗酸菌検出装置の検出能力に関する検討。感染症誌 1999；73：172-8.
- 3) 長谷川美幸，小山悦子，小林寅詰，渡辺 彰：臨床検体を用いた Mycobacteria Growth Indicator Tube 培養陽性試料からの抗酸菌直接同定に関する検討。感染症誌 2001；75：300-6.
- 4) 日本結核病学会，抗酸菌検査法検討委員会：新結核菌検査指針 2000。財団法人結核予防会，東京，2000；p.67.
- 5) 斎藤 肇：最近の抗酸菌検査，同定検査。臨床と微生物 2001；28：287-95.
- 6) Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, Torres ML, Ramirez C, Cruz N : Properties of protein MPB 64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun 1986；52：293-302.
- 7) Li H, Ulstrup JC, Jonassen TO, Melby K, Nagai S, Harboe M : Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun 1993；61：1730-4.
- 8) Abe C, Hirano K, Tomiyama T : Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1999；37：3693-7.
- 9) Hasegawa N, Miura T, Ishii K, Yamaguchi K, Lindner TH, Merritt S, et al. : New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex : a multicenter study. J Clin Microbiol 2002；40：908-12.
- 10) Centers for Disease Control and Prevention : CDC guidelines for tuberculosis control in health care facilities. Morbid Mortal Weekly Rep, 1994；43：1-13.

Evaluation of Rapid Identification Method for *Mycobacterium tuberculosis*
Complex using the Immunochromatographic Slide Test Kit

Miyuki HASEGAWA¹⁾, Etsuko KOYAMA¹⁾, Utsuki UCHINO¹⁾, Yumie SATO¹⁾,
Intetsu KOBAYASHI¹⁾, Katsu SAIONJI²⁾ & Akira WATANABE³⁾

¹⁾Department of Clinical Microbiology, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.

²⁾Department of Laboratory Medicine, National Defense Medical College

³⁾Department of Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Institute of
Development, Aging and Cancer, Tohoku University

Capilia TB, a lateral flow immunochromatographic slide test kit for directly identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) was evaluated by using culture-positive specimens from Mycobacteria Growth Indicator Tubes (MGIT)

Sputum specimens from patients suspected of having tuberculosis were treated with NALC-NaOH and cultivated in MGIT960. Liquid specimens were collected from the positive tubes and directly inoculated with Capilia TB. Liquid specimens were also directly tested with AccuProbe.

Of the organisms isolated from the 100 MGIT positive tubes, *M. tuberculosis* complex was identified in 49 (49%) tubes with Capilia TB and not identified in 51 (51%) with Capilia TB. *Mycobacterium avium-intracellulare* complex(MAC)was identified in 46(46%)with AccuProbe MAC and other acid-fast bacteria were identified in 5 (5%) by DNA-DNA hybridization method.

There were one tube in which *M. tuberculosis* complex was detected with Capilia TB and *M. tuberculosis* complex was not detected with AccuProbe MTC, but no tubes in which *M. tuberculosis* complex was detected with AccuProbe MTC and *M. tuberculosis* complex was not detected with Capilia TB.

Capilia TB is excellent in sensitivity and specificity and very suitable for rapid diagnosis of tuberculosis and is considered to contribute to public health intervention measures taken for the tuberculosis control in Japan.