

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科 医療保健学専攻 博士課程

酵素を添加した WST-1 法による結核菌と非結核性
抗酸菌鑑別の迅速化にむけた検討

2023年度入学

2026年3月10日 博士

医療保健学研究科 医療保健学専攻 感染制御学

学籍番号 HD023001 岩間 暁子

研究指導教員 松村 有里子

副研究指導教員 岩澤 篤郎、森屋 恭爾

論文題目	酵素を添加した WST-1 法による結核菌と非結核性抗酸菌鑑別の迅速化にむけた検討
氏名	岩間 暁子
所属	東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 医療保健学専攻 博士課程 感染制御学
助成金	なし

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 医療保健学専攻
博士論文 要旨

酵素を添加した WST-1 法による結核菌と非結核性抗酸菌鑑別
の迅速化にむけた検討

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科 医療保健学専攻
博士課程
領 域 名 感染制御学
学籍番号 HD023001
氏 名 岩間 暁子

背景

結核は *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) による感染症であり、空気感染予防策、飛沫感染予防策および接触感染予防策をとる必要がある。一方、非結核性抗酸菌症は *non-tuberculosis mycobacteria* (NTM) による感染症であり、標準予防策の対象となる。標準的な抗酸菌検査では、塗抹検査、培養検査、同定検査、薬剤感受性検査、核酸増幅検査が実施される。結核患者が排菌している場合は入院する必要がある、退院には塗抹検査と 6~8 週間の培養を要する培養検査で MTBC の排菌がないことを証明する必要がある。結核治療中に NTM が塗抹陽性として検出された患者において、入院が長期化した報告例がある。これは培養検査結果を待つためであり、起因菌に即した感染予防策への早期変更や、入院期間を長期化させないために、MTBC と NTM を迅速に鑑別する方法が求められている。菌の生存や増殖を簡便かつ迅速に評価できる手法として近年注目されている Water-soluble tetrazolium (WST) 法を抗酸菌の鑑別に用いることを着想した。WST 法は、水溶性のテトラゾリウム塩 (WST-1) 等を電子メディエーター存在下で生細胞と培養し、細胞内の酵素が電子メディエーターを介して WST-1 を還元することにより生成される水溶性の黄色ホルマジン量を比色定量する方法である。抗酸菌は脂質に富んだ細胞壁を有し抗菌薬等の菌体内への侵入の障壁となっていることから、細胞壁を部分的に損傷させることで、WST 法で測定する吸光度に影響を与えるものと考えた。本研究では WST 法においてテトラゾリウム塩として WST-1 法を用いた WST-1 法を採用した。抗酸菌の種類により細胞壁の構成成分が異なるためトリプシンまたはリパーゼを添加することで、菌種により吸光度の変化に違いが生じ MTBC と NTM の鑑別、さらには NTM 菌種間の鑑別が可能になるものと考えられる。

目的

トリプシンまたはリパーゼを添加した WST-1 法による抗酸菌鑑別の迅速化にむけた方法の確立を目的とした。

方法

供試菌株は、NTM として *M. kansasii*、*M. gordonae* および *M. intracellulare* の臨床分離株と、*M. kansasii* ATCC®12478 と 35775、*M. gordonae* ATCC®14470、*M. avium* ATCC®19421、*M. intracellulare* ATCC®13950 および *M. abscessus* ATCC®19977 を用い、MTBC は臨床分離株を用いた。11.1 mM の WST-1 溶液と 8.0 mM の電子メディエーター溶液を 9:1(v/v) の比率で混合して検出試薬とした。菌懸濁液 400 μ L にトリプシンまたはリパーゼのストック溶液 400 μ L を混合後、検出試薬 160 μ L を添加して、96 ウエルマイクロプレート各ウエルに 200 μ L ずつ分注後シーリングした。35 $^{\circ}$ C で培養し、対照波長を 620 nm として 450 nm の吸光度を経時的に測定した。

結果

抗酸菌に対して WST-1 法を用いる場合の観測波長は 450 nm を使用でき、菌株の前培養には Middlebrook 7H10 寒天培地が適していた。供試する菌懸濁液は 35 $^{\circ}$ C で前培養して発育した菌株から Middlebrook 7H9 Broth を用いて McF 0.5 に調製したものをを用いることが適していた。電子メディエーターは PMS が適しており、検査における培養温度は室温より 35 $^{\circ}$ C が適していた。WST-1 法の培養において酵素添加により細胞壁に損傷を与えられた抗酸菌は、細胞内代謝活性が細胞外 WST-1 試薬へより効率的に伝達され、ホルマジン生成が増強された結果として吸光度が上昇したことが推察された。

MTBC と NTM の鑑別には、酵素添加時の吸光度が上昇する培養時間の違いと吸光度の値、培養 48 時間と培養 72 時間のリパーゼを共存下した結果を総合すること、酵素添加時の吸光度変化量、またはリパーゼ添加の有無における 24 時間あたりの吸光度増加量比が適用可能であることが示唆された。さらにリパーゼ終濃度 100 Units/mL 共存下の吸光度増減挙動により培養 24 時間で MTBC、*M. kansasii*、および *M. avium* が他の NTM と鑑別可能であり、培養 48 時間で *M. kansasii* と *M. avium* が鑑別できる可能性が示唆された。

酵素添加時の吸光度変化量により *M. gordonae* の鑑別への適用には注意を要するものの、NTM 間の鑑別として *M. abscessus*、*M. intracellulare*、および *M. avium* の鑑別が可能であることが示唆された。

結論

トリプシンまたはリパーゼを添加した WST-1 法は、酵素が抗酸菌細胞壁に部分的な構造変化を与えることで電子メディエーターの透過性や還元反応に差異を生じさせ、結果として MTBC と NTM を鑑別できる可能性が示唆された。その検査時間は 48 時間から 72 時間以内と従来の 6~8 週間を要する培養検査より大幅に短縮できることが示された。

キーワード (Key Words)

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis* complex)、非結核性抗酸菌 (non-tuberculosis mycobacteria: NTM)、WST-1 法 (WST-1 assay)、トリプシン (Trypsin)、リパーゼ (Lipase)

目次

第1章	序章.....	1
第2章	WST-1法によるMTBCとNTM鑑別に向けた測定条件の検討.....	5
2.1.	実験方法.....	5
2.1.1.	試験菌株.....	5
2.1.2.	検出試薬.....	5
2.1.3.	吸収スペクトルの測定.....	5
2.1.4.	マイクロプレートリーダーによる吸光度の測定.....	5
2.2.	結果.....	6
2.2.1.	吸収スペクトルの経時変化.....	6
2.2.2.	マイクロプレートリーダーによる吸光度の測定結果.....	6
2.3.	考察.....	9
2.4.	結論.....	11
第3章	MTBCとNTMの鑑別及びNTM間の菌種鑑別.....	12
3.1.	実験方法.....	12
3.1.1.	試験菌株.....	12
3.1.2.	酵素.....	12
3.1.3.	吸収スペクトルの測定.....	12
3.1.4.	マイクロプレートリーダーによる吸光度測定.....	12
3.2.	結果.....	13
3.2.1.	トリプシン添加時の吸収スペクトルの経時変化.....	13
3.2.2.	吸光度の経時変化へのトリプシン濃度の影響.....	13
3.2.3.	マイクロプレートリーダーで測定した吸光度に対するリパーゼの影響.....	13
3.2.4.	WST-1法によるNTMとMTBCの吸光度の比較.....	14
3.2.5.	吸光度に対する酵素の影響.....	14
3.3.	考察.....	16
3.4.	結論.....	19
第4章	結語.....	20
	謝辞.....	22
	引用文献.....	23
	Figure.....	26
	Table.....	49
	Abstract.....	54

第1章 序章

結核は *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) の感染によって発症する感染症であり、エジプトのミイラからもその痕跡が見つかるなど、人類の歴史とともに存在してきた最も古い感染症の一つである¹⁾。原因菌である MTBC は、1882 年にロベルト・コッホにより発見された細長い桿菌で、菌の大きさは長さ約 2~10 μm 、幅 0.3~0.6 μm の形態を有している。乾燥に強く飛沫核でも生存可能であり、飛沫核となった結核菌は、床や地面に落下しにくく空气中を漂い空気の流れにのり広範囲に広がるため、空気感染予防策、飛沫感染予防策および接触感染予防策をとる必要がある。結核の蔓延は自然に減少するものではなく国際的な危機対応がなければ制御不能になることから、世界保健機関 (World Health Organization: WHO) は、1993 年に結核の緊急事態宣言を行い、世界が優先的に取り組むべき課題として結核を取り上げ、結核対策を実効性のあるものとする戦略として直接監視下治療 (Directly Observed Treatment, Short-course: DOTS) を提唱した²⁾。WHO の「世界結核報告書 2024³⁾」によると、新規、再発症例報告数は 2010 年の約 570 万人から 2019 年は約 710 万人に増加し、2020 年は約 580 万人と減少したが、2023 年は約 820 万人に増加している。人口 10 万人あたりの罹患率は、新規、再発症例報告数と同様に 2010 年の 82.9 から増加し 2019 年は 92、2020 年は 74 と減少した後、2023 年は 101 に増加した (Fig. 1-1.)。2023 年の人口 10 万人あたりの罹患率は、東南アジア地域 167、アフリカ地域 152、西太平洋地域 99、東地中海地域 79、米州地域 26、欧州地域 18 である。また患者数、罹患率が高い結核高負担国 30 カ国のうち、人口 10 万人あたりの罹患率はフィリピンが 632、インドネシアが 388、南アフリカが 335、インドが 192、バングラデシュが 177、ナイジェリアが 161 と高値を示しており、主に東南アジア地域とアフリカ地域に集中している (Fig. 1-2.)。一方本邦では、明治以降の産業革命による人口集中に伴い結核が国内に蔓延し、「結核は国民病」と呼ばれるようになった。1951 年の結核罹患率は人口 10 万人あたり 698 人であり⁴⁾、非常に多くの国民が結核で苦しんでいたため、現在の感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症法) の前身である結核予防法を定め、国家としての本格的な結核対策を始めた。結核患者の届け出数が減少していたものの 1997 年に増加に転じたことから、1999 年に厚生省 (現・厚生労働省) は結核緊急事態宣言を発した。その後、新登録結核患者数は 2022 年に 10,235 人、2023 年に 10,096 人と減少し、人口 10 万人あたりの結核罹患率は 2021 年に 9.2 となり結核低蔓延国の水準 (罹患率 10.0 以下) を達成した⁵⁾。その後も 2022 年は 8.2、2023 年は 8.1 と患者数と同様に減少し、低蔓延国水準を維持している (Fig. 1-3.)。結核の標準治療は、イソニコチン酸ヒドラジド (Isonicotinic acid hydrazide: INH)、リファンピシン (Rifampicin: RFP)、エタンブトール (Ethambutol: EB)、ピラジナミド (Pyrazinamide: PZA) の 4 剤処方である^{6,7)}。本邦での初回標準治療は INH、RFP、EB もしくはストレプトマイシン (Streptomycin sulfate: SM)、PZA の 4 剤を 2 カ月投与後、INH と RFP の 2 剤を 6 カ月投与するものである⁸⁾。一方、非結核性抗酸菌症 (non-tuberculosis mycobacteria: NTM 症) は非結核性抗酸菌 (non-tuberculosis mycobacteria: NTM) によって引き起こされる感染症である。原因菌である NTM は土壌や水環境中に広く分布し、人から人へは感染せず標準予防策の対象とされる。本邦では、NTM 症の罹患率は人口 10 万人当たり 2007 年には 5.7、2014 年には 14.7、2017 年には 19.2 と増加しており^{9,10)}、結核を上回っている (Fig. 1-4.)。世界的にも 1990 年代以降徐々に増加し、2000 年代以降は増加傾向が

明らかとなっている¹¹⁾。NTM 症の治療は原因菌により薬剤感受性や治療反応性が異なるため、菌種に応じた化学療法を選択が必要となり治療期間が 6 カ月～3 年程度と長期に及ぶこともある¹²⁾。

医療機関において結核や NTM 症が疑われると、感染巣があると思われる部位から検体が採取され微生物検査室に提出される。提出された検体は、*N*-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム (NALC-NaOH) 法¹³⁾により検体中に存在する抗酸菌以外の常在菌を除去する前処理を行った後、抗酸菌検査として塗抹検査、培養検査、同定検査、薬剤感受性検査、核酸増幅検査が実施される。抗酸菌は発育速度が遅いものの、感染制御の観点から抗酸菌検査は迅速な検査が求められる。塗抹検査は検体中の抗酸菌の有無と菌量を調べることを目的とした検査である。迅速に結果が得られ有用性が高いが、塗抹検査陽性の感度は検体中に 5,000～10,000 CFU/mL の菌数が必要である。集菌塗抹蛍光法を用いると塗抹検査より 10 倍程度高感度になるものの、菌種の判別はできず生菌と死菌の鑑別は行えない欠点がある。培養検査は、発育した菌株の菌種同定と薬剤感受性試験を行うことを目的とした検査である。培養検査の感度は 10～100 CFU/mL と塗抹検査より高く、菌種を同定できるものの、最終的な結果を得るまでに液体培地では 6 週間、固形培地では 8 週間と長時間を要する。核酸増幅検査は、菌種の同定を目的とした検査であり、培養検査と同程度の感度を有し迅速に結果報告が可能である。診断時の利用法として塗抹検査陽性の場合、MTBC または NTM の鑑別が数時間から 2 日程度で可能であり有用性が高い検査である。しかし本邦で体外診断用医薬品として保険収載されている遺伝子検査キットの検出対象菌種は MTBC、*M. avium* および *M. intracellulare* に限定されており、生死の判別はできない欠点がある。米国 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) は、抗酸菌検査に要する時間の勧奨を行っており、塗抹検査結果は 24 時間以内に報告すること、結核菌群の培養同定結果を 21 日以内に報告すること、核酸増幅法検査は検体受領から 48 時間以内に報告することを推奨している (Table 1.)¹⁴⁾。

本邦における結核患者の入院は、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づき、第 19 条および第 20 条により感染管理を目的として実施される。入院の解除 (退院) 基準は第 22 条に定められている。その基準は、「① 2 週間以上の標準的化学療法が実施され、咳、発熱、痰等の臨床症状が消失している。② 2 週間以上の標準的化学療法を実施した後の異なった日の喀痰の塗抹検査又は培養検査の結果が連続して 3 回陰性である。ただし、3 回目の検査は核酸増幅法による陰性確認でもよい。この場合、核酸増幅法の結果が陽性であっても、その後の培養検査で陰性であれば陰性とみなすものとする。③ 患者が治療の継続及び感染拡大の防止の重要性を理解しかつ、退院後の治療の継続及び他者への感染の防止が可能であると確認できている。」と記載されている。結核診療ガイドライン 2024⁸⁾では①から③の全てを満たした場合に退院となる。「退院させることができる基準」として、喀痰の塗抹検査または培養検査で陰性であることが求められ、塗抹検査と培養検査で抗酸菌が検出された場合は、それが結核菌でないことを証明する必要がある¹⁵⁾。上述のように、抗酸菌検査の塗抹検査は迅速性があるが菌種の判別はできず、培養検査は菌種の判別は可能だが時間を要する。核酸増幅検査には迅速性はあるが、生死にかかわらず核酸が存在すれば陽性となるため、治療経過のフォローアップには推奨されていない¹³⁾。

結核治療中に NTM が塗抹陽性として検出されると、塗抹検査では菌種の判別ができない

ために、培養検査の結果を待つ必要がある。培養検査は時間を要するために、不必要な結核治療や入院期間の長期化を招くことがあり、結核治療中に NTM を合併した症例で、平均入院期間が非合併例（平均 58.3±3.5 日）に比べ、有意に長い（平均 98.8±7.9 日）ことが報告されている¹⁶⁾。退院に必要な検査結果を待つ時間を短縮することは、患者の生活の質や休職による社会的損失の軽減、医療機関における感染対策上の負担軽減、不要な入院期間の短縮による医療費の削減につながるものと考えられる。以上の背景をもとに MTBC と NTM を迅速かつ確実に鑑別できる方法の開発が強く求められている。

抗酸菌に関する新たな検査方法として、培養細胞の生存率や増殖能を評価する方法の一つである Water-soluble tetrazolium (WST) 法が菌の生存や増殖を簡便かつ迅速に評価できる手法として注目されている¹⁷⁾。WST 法は代謝活性に基づく比色法であり、細胞の代謝活性を測定する目的で広く使用されている¹⁸⁾。水溶性のテトラゾリウム塩である 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1) 等を電子メディエーター存在下で生細胞と培養すると、細胞内の酵素が電子メディエーターを介して WST-1 を還元して水溶性の黄色ホルマゼンを生成するため、黄色ホルマゼン量を比色定量することで代謝活性を測定する原理である (Fig. 1-5.)。水溶性テトラゾリウム塩には WST-1 に加え WST-8 など複数存在し、WST-1 を用いた方法は WST-1 法と呼称されている。近年、WST-1 法を遅発育性非結核性抗酸菌の薬剤感受性試験に応用し、従来の Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 法で 2 週間要するところ 3 日と短期間で評価でき、CLSI 法で得られる結果と同等であることが示された¹⁹⁾。しかし、現在のところ、標準的な抗酸菌検査に WST-1 法を用いた報告例や抗酸菌の鑑別に応用した報告例はなく、抗酸菌を対象とした検査方法は十分に確立されていない。抗酸菌は他の細菌に比べて増殖が遅く、Fig. 1-6. に示すように脂質に富んだ細胞壁をもつ細菌である。細胞壁は脂質としてミコール酸、糖脂質としてリポアラビノマンナンとアラビノガラクトンから構成され、強い疎水性および低い透過性を示すことから、抗菌薬等の菌体内への侵入の障壁となっている²⁰⁾。細胞壁の構造をより詳細にみると、ペプチドグリカン層は細胞膜に最も近い位置にあり、ペプチド結合で架橋された糖鎖で構成されている。ペプチドグリカンはまた、細胞質膜と外側のミコリン酸層の間に位置する細胞壁の「コア」としてアラビノガラクトンを含む巨大高分子を形成する。このコアは、その非還元末端で α -アルキル- β -ヒドロキシ長鎖ミコール酸にエステル結合している²¹⁾。抗酸菌に WST-1 法を適用する際には、菌体内への電子メディエーターの取り込みが必要となることから、本研究では酵素により細胞壁を部分的に損傷させることで、膜透過性や代謝活性に変化が生じるのではないかと仮説を立てた。そこで、抗酸菌の細胞壁内のペプチド結合およびエステル結合に選択的かつ適度な損傷を与えるために、リジン残基またはアルギニン残基のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解するトリプシン、およびエステル結合を分解するリパーゼを用いることで、WST-1 法で測定する吸光度が影響を受けるものと考えた。細胞壁の構成成分は抗酸菌の種類により異なることから、トリプシンまたはリパーゼを添加した WST-1 法を用いることで、MTBC と NTM の鑑別、さらには NTM 菌種間の鑑別が可能になるものと考えられる。

以上の背景をもとに本研究では、トリプシンまたはリパーゼを添加した WST-1 法による抗酸菌鑑別の迅速化にむけた方法の確立を目的とした。

第2章では、抗酸菌の検査として最適な WST-1 法の条件を設定するために、検査波長と検査に用いる抗酸菌の前培養培地を決定し、WST-1 法における培養温度、菌液濃度、および電子メディエーターの種類について検討する。

第3章では、WST-1 法に酵素を添加することで、MTBC と NTM の鑑別および NTM 間の鑑別を行うために、第2章で確立した WST-1 法において、検査波長への酵素の影響を検討するとともに、酵素濃度の最適化を行い、鑑別方法について検討する。

第4章では以上の検討結果を総括し今後の展望を示す。

第2章 WST-1 法による MTBC と NTM 鑑別に向けた測定条件の検討

WST-1 法は一般的に細胞の生存率や増殖能を評価する目的で細胞培養に用いられ、微生物の検出や薬剤感受性試験にも応用されている¹⁷⁾。しかし、抗酸菌の検出に特化した条件は標準化されていない。本章では抗酸菌に対して最適な WST-1 法の条件を設定するために、検査波長と検査に用いる抗酸菌の前培養培地を決定し、WST-1 法における培養温度、供試する菌液濃度、および電子メディエーターの種類について検討した。

2.1. 実験方法

2.1.1. 試験菌株

NTMは東京医療保健大学大学院医療保健学研究科医療保健学専攻感染制御学領域保有の *Mycobacterium kansasii*、*M. goodnae* および *M. intracellulare* の臨床分離株と、*M. avium* ATCC® 19421、*M. abscessus* ATCC® 19977 を用い、*M. tuberculosis complex* (MTBC) は国保君津中央病院保有の臨床分離株を用いた。固形培地は抗酸菌検査ガイドライン 2025²²⁾に従い自家調整した Middlebrook 7H10 寒天培地 (Middlebrook 7H10 agar (Becton, Dickinson and Company: BD) 3.8 g を MilliQ 水 180 mL に溶解後 Glycerol 1 mL を添加し、高圧蒸気滅菌したあとに Middlebrook OADC Enrichment (BD) 20 mL を添加混合して、プラスチック製試験管に分注)、または 2 %小川培地 (極東製薬工業株式会社、株式会社セロテック) を使用した。菌株を 35 °C で 5 日から 2 週間培養後、Middlebrook 7H9 Broth (極東製薬工業株式会社) で McFarland Standard No. 0.5 (McF 0.5) の菌懸濁液を調製した。

2.1.2. 検出試薬

WST-1 (株式会社同仁化学研究所) は滅菌リン酸緩衝液 (ダルベッコ PBS(-)、ナカライテスク株式会社) に溶解して 11.1 mM の WST-1 溶液とした。電子メディエーターには 1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (PMS、株式会社同仁化学研究所)、1-Methoxy-5-ethylphenazinium ethylsulfate (PES、株式会社同仁化学研究所)、または 2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzoquinone (BQ、東京化成工業株式会社) を用いた。PMS と PES は滅菌蒸留水に溶解し、BQ は Dimethyl sulfoxide (富士フィルム和光純薬株式会社) に溶解し、いずれも 8.0 mM の電子メディエーター溶液とした。なお滅菌蒸留水は、純水装置オートスチル WG250 (ヤマト科学株式会社) から得られた蒸留水を高圧蒸気滅菌して使用した。WST-1 溶液と電子メディエーター溶液は 9:1 (v/v) の比率で混合して検出試薬とした。

2.1.3. 吸収スペクトルの測定

1.5 mL PMMA 2 面透過セミマイクロキュベットに菌懸濁液 1 mL と検出試薬 100 μ L を入れて室温 (25 °C) で静置した。紫外可視分光光度計 UV-2600 (株式会社島津製作所) を用いて経時的に吸収スペクトルを測定した。

2.1.4. マイクロプレートリーダーによる吸光度の測定

菌懸濁液 400 μ L に Middlebrook 7H9 Broth 400 μ L と電子メディエーターとして PMS を使用した検出試薬 160 μ L を混合後、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 200 μ L ずつ分注してシーリングした。25 °C または 35 °C で培養し、対照波長を 620 nm とし 450 nm の

吸光度を Multiskan TMFC (Thermo Fisher Scientific, Inc) または iMark マイクロプレートリーダー™ (BIO-RAD) で経時的に測定した。結果は平均値± Standard Deviation (SD) で記載した。有意差検定は Fisher's F-test 後、Student's t-test または Welch's t-test を行った。

2.2. 結果

2.2.1. 吸収スペクトルの経時変化

WST-1 法を用いたときの各菌株の吸収スペクトルと 450 nm の吸光度の経時変化をそれぞれ Fig. 2-1. と Fig. 2-2. に示した。吸収スペクトルは菌種によらず培養時間が長くなると 420~480 nm 付近にブロードな吸収が認められ、その極大波長は 450 nm であった。600 nm より長波長側では吸収は認められなかった。450 nm の吸光度は *M. kansasii* の臨床分離株 (Fig. 2-2. (a)●) では培養 36 時間後、*M. intracellulare* の臨床分離株 (Fig. 2-2. (a)▲) では培養 45 時間後に急激に上昇し始め、*M. gordonae* の臨床分離株 (Fig. 2-2. (a)○) では培養 36 時間後から上昇し始めた。*M. abscessus* ATCC®19977 (Fig. 2-2. (a)□) と *M. avium* ATCC® 19421 (Fig. 2-2. (a)■) は培養時間が長くなるとともに吸光度が緩やかに上昇し、その上昇度は *M. abscessus* ATCC®19977 の方が大きかった。菌懸濁液の濁度の影響を排除するために 450 nm の吸光度から 620 nm の吸光度を減算すると、培養開始時の *M. kansasii* の臨床分離株の吸光度は 0.14 から 0.07 に、*M. intracellulare* の臨床分離株は 0.18 から 0.11 に、*M. gordonae* の臨床分離株は 0.34 から 0.18 に、*M. abscessus* ATCC®19977 は 0.14 から 0.07 に、*M. avium* ATCC® 19421 は 0.23 から 0.10 になった。また減算した吸光度の上昇挙動 (Fig. 2-2. (b)) は 450 nm の吸光度の挙動 (Fig. 2-2. (a)) と同様であった。

2.2.2. マイクロプレートリーダーによる吸光度の測定結果

2.2.2.1. 前培養培地の影響

2%小川培地または Middlebrook 7H10 寒天培地を前培養培地として用いて、発育した菌株から McF 0.5 に調製した菌懸濁液に、電子メディエーターとして PMS を使用して 35 °C で培養したときの吸光度を Fig. 2-3. に示す。*M. kansasii* の臨床分離株の吸光度は、2%小川培地で前培養すると培養 24 時間で 0.09 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.16 ± 0.01 、Middlebrook 7H10 寒天培地で前培養するとそれぞれ 0.09 ± 0.01 および 0.18 ± 0.02 となり、いずれの前培養培地でも培養時間が長くなると高値となった (Fig. 2-3. (a))。 *M. gordonae* の臨床分離株の吸光度は、2%小川培地で前培養すると培養 24 時間で 0.15 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.94 ± 0.04 、Middlebrook 7H10 寒天培地で前培養するとそれぞれ 0.22 ± 0.01 および 1.11 ± 0.05 となり、いずれの前培養培地でも培養時間が長くなると高値となった (Fig. 2-3. (b))。 *M. avium* ATCC®19421 の吸光度は、2%小川培地で前培養すると培養 24 時間で 0.11 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.20 ± 0.00 、Middlebrook 7H10 寒天培地で前培養すると、それぞれ 0.21 ± 0.00 および 0.38 ± 0.01 でいずれの前培養培地でも培養時間が長くなると高値となった (Fig. 2-3. (c))。 *M. intracellulare* の臨床分離株の吸光度は、2%小川培地で前培養すると培養 24 時間で 0.35 ± 0.00 、培養 48 時間で 2.44 ± 0.09 、Middlebrook 7H10 寒天培地で前培養するとそれぞれ 0.52 ± 0.03 および 3.25 ± 0.08 となり、いずれの前培養培地でも培養時間が長くなると高値となった (Fig. 2-3. (d))。 *M. abscessus* ATCC®19977 の吸光度は、2%小川培地で前培養すると培養 24 時間で 1.58 ± 0.05 、Middlebrook 7H10 寒天培地で前培養すると培養 24 時間で 2.07 ± 0.15

であったが、培養 48 時間ではいずれの前培養培地でも検出限界値以上となった (Fig. 2-3. (e))。MTBC の吸光度は 2%小川培地で前培養すると培養 24 時間で 0.10 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.14 ± 0.00 、Middlebrook 7H10 寒天培地で前培養するとそれぞれ 0.11 ± 0.00 および 0.22 ± 0.00 となり、いずれの前培養培地を用いても培養時間が長くなると高値となった (Fig. 2-3. (f))。

2.2.2.2. 培養温度の影響

NTM は Middlebrook 7H10 寒天培地に発育した菌株を、MTBC は 2%小川培地に発育した菌株を用いて McF 0.5 に調製した菌懸濁液に、PMS を電子メディエーターとして使用して 25 °C または 35 °C で培養したときの吸光度を Fig. 2-4. に示す。*M. kansasii* の臨床分離株を 25 °C で培養したときの吸光度は、培養 24 時間で 0.04 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.05 ± 0.01 と培養時間による吸光度の変化は認められなかった (Fig. 2-4. (a))。35 °C で培養したときの吸光度は、それぞれ 0.08 ± 0.01 および 0.14 ± 0.02 と培養時間が長くなると高値となった (Fig. 2-4. (a))。*M. gordonae* の臨床分離株を用いたときの吸光度は、25 °C で培養すると培養 24 時間で 0.11 ± 0.01 、培養 48 時間で 0.20 ± 0.01 となり、35 °C で培養するとそれぞれ 0.20 ± 0.01 および 1.11 ± 0.04 となり培養時間が長くなるといずれの培養温度でも高値となった (Fig. 2-4. (b))。*M. avium* ATCC® 19421 を 25 °C で培養したときの吸光度は、培養 24 時間で 0.11 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.20 ± 0.01 、35 °C で培養したときの吸光度はそれぞれ 0.25 ± 0.00 および 0.39 ± 0.01 で、培養時間が長くなるといずれの培養温度でも高値となった (Fig. 2-4. (c))。*M. intracellulare* の臨床分離株を 25 °C で培養したときの吸光度は、培養 24 時間で 0.15 ± 0.01 、培養 48 時間で 0.34 ± 0.01 、35 °C で培養したときの吸光度は、それぞれ 0.38 ± 0.03 および 3.00 ± 0.16 と、培養時間が長くなるといずれの培養温度でも高値となった (Fig. 2-4. (d))。*M. abscessus* ATCC® 19977 を 25 °C で培養したときの吸光度は、培養 24 時間で 0.50 ± 0.04 、培養 48 時間で 2.02 ± 0.03 、35 °C で培養したときの吸光度は培養 24 時間で 2.47 ± 0.12 、培養 48 時間は検出限界値以上であった (Fig. 2-4. (e))。MTBC を 35 °C で培養したときの吸光度は、培養 24 時間で 0.11 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.22 ± 0.00 となった (Fig. 2-4. (f))。

2.2.2.3. 供試菌液濃度の影響

Middlebrook 7H10 寒天培地に発育した菌株を用いて McF 0.5 (*ca.* 10^8 CFU/mL) に調製した菌懸濁液を Middlebrook 7H9 Broth で 10 倍希釈 (*ca.* 10^7 CFU/mL) と 100 倍希釈 (*ca.* 10^6 CFU/mL) の菌懸濁液を作成し、PMS を電子メディエーターとして使用して、35 °C で培養したときの吸光度を Fig. 2-5. に示す。*M. kansasii* の臨床分離株は Fig. 2-5. (a) に示すように、*ca.* 10^8 CFU/mL の菌懸濁液を用いると、吸光度は培養 24 時間で 0.08 ± 0.01 、培養 48 時間で 0.14 ± 0.02 と培養時間が長くなると高値となった。*ca.* 10^7 CFU/mL の菌懸濁液を用いると、吸光度は培養 24 時間で 0.06 ± 0.01 、培養 48 時間で 0.06 ± 0.01 と培養時間が長くなっても上昇は認められなかった。*M. gordonae* の臨床分離株は、Fig. 2-5. (b) に示すように *ca.* 10^8 CFU/mL の懸濁液を用いると、吸光度は培養 24 時間で 0.20 ± 0.01 、培養 48 時間で 1.11 ± 0.04 と培養時間が長くなると高値となった (Fig. 2-5. (b))。*ca.* 10^7 CFU/mL の菌懸濁液を用いると、吸光度は培養 24 時間で 0.05 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.08 ± 0.01 と培養時間が長くなると僅かに高値となった。*ca.* 10^6 CFU/mL の菌懸濁液を用いたときの吸光度は、培養 24 時間で 0.03 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.04 ± 0.00 と培養時間が長くなっても上昇しなかった。*M. avium*

ATCC®19421 は、 Fig. 2-5. (c) に示すように $ca. 10^8$ CFU/mL の菌懸濁液を用いたときの吸光度は、培養 24 時間で 0.25 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.39 ± 0.01 、 $ca. 10^7$ CFU/mL の菌懸濁液を用いると、吸光度は培養 24 時間で 0.07 ± 0.01 、培養 48 時間で 0.11 ± 0.02 と培養時間が長くなるといずれの菌液濃度でも吸光度は高値となった。 $ca. 10^6$ CFU/mL の菌懸濁液を用いたときの吸光度は、培養 24 時間で 0.03 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.04 ± 0.00 と培養時間が長くなっても上昇を認めなかった。*M. intracellulare* の臨床分離株は、 Fig. 2-5. (d) に示すように、 $ca. 10^8$ CFU/mL の菌懸濁液を用いたときの吸光度は、培養 24 時間で 0.38 ± 0.03 、培養 48 時間で 2.99 ± 0.16 、 $ca. 10^7$ CFU/mL の菌懸濁液を用いると、培養 24 時間で 0.05 ± 0.00 、培養 48 時間で 0.29 ± 0.03 と培養時間が長くなるといずれの菌液濃度でも高値となった。*M. abscessus* ATCC®19977 では、 Fig. 2-5. (e) に示すように $ca. 10^8$ CFU/mL の菌懸濁液を用いたときの吸光度は、培養 24 時間で 2.47 ± 0.12 、培養 48 時間は検出限界値以上であった。 $ca. 10^7$ CFU/mL の菌懸濁液を用いたときの吸光度は、培養 24 時間で 0.37 ± 0.03 、培養 48 時間で 3.10 ± 0.09 と培養時間が長くなると高値となった。

2.2.2.4. 電子メディアーターの種類の影響

Middlebrook 7H10 寒天培地に発育した菌株を用いて McF 0.5 に調製した菌懸濁液に、各電子メディアーターを用いて 35 °C で培養したときの吸光度を Fig. 2-6. に示す。電子メディアーターとして PMS を用いたときの *M. abscessus* ATCC®19977 (Fig. 2-6. (a)□) と *M. intracellulare* の臨床分離株 (Fig. 2-6. (a)▲) の吸光度は、培養 12 時間から上昇し始め、培養 24 時間のときに *M. abscessus* ATCC®19977 は 1.68 ± 0.19 、*M. intracellulare* の臨床分離株は 0.66 ± 0.03 となり、培養 48 時間以降はいずれの菌種も検出限界値以上であった。*M. gordonae* の臨床分離株 (Fig. 2-6. (a)○) の吸光度は培養 24 時間から緩やかに上昇し始め、培養 24 時間で 0.25 ± 0.00 であったが、培養 72 時間では 2.50 ± 0.22 と培養時間が長くなるとともに高値となった。*M. avium* ATCC®19421 (Fig. 2-6. (a)■) と *M. kansasii* の臨床分離株 (Fig. 2-6. (a)●) および MTBC (Fig. 2-6. (a)△) の吸光度は、培養 72 時間で、それぞれ 0.52 ± 0.02 、 0.36 ± 0.07 および 0.44 ± 0.08 と培養時間が長くなるとともに僅かに高値となった。PES を用いたときの *M. abscessus* ATCC®19977 (Fig. 2-6. (b)□) と *M. intracellulare* の臨床分離株 (Fig. 2-6. (b)▲) の吸光度は、培養 12 時間から上昇し始め、培養 24 時間でそれぞれ 1.74 ± 0.19 および 1.11 ± 0.03 であり、培養 48 時間ではいずれの菌種でも検出限界値以上となった。*M. gordonae* の臨床分離株 (Fig. 2-6. (b)○) の吸光度は、培養 24 時間から緩やかに上昇し、培養 24 時間で 0.39 ± 0.01 、培養 48 時間で 2.06 ± 0.14 と培養時間が長くなると高くなり、培養 72 時間では検出限界値以上となった。*M. avium* ATCC®19421 (Fig. 2-6. (b)■) の吸光度は、培養 48 時間で 0.41 ± 0.01 、培養 72 時間で 0.85 ± 0.03 と培養時間が長くなると緩やかに高値となった。*M. kansasii* の臨床分離株 (Fig. 2-6. (b)●) と MTBC (Fig. 2-6. (b)△) の吸光度は、培養 72 時間でそれぞれ 0.43 ± 0.01 および 0.13 ± 0.00 と培養時間が長くなると僅かに高値となった。BQ を用いたときの *M. avium* ATCC®19421 (Fig. 2-6. (c)■) の吸光度は、培養開始直後から上昇し始め、培養 24 時間で 3.29 ± 0.06 、培養 48 時間で検出限界値以上となった。*M. kansasii* の臨床分離株 (Fig. 2-6. (c)●) の吸光度は、*M. avium*® ATCC19421 と同様に培養開始直後から上昇し培養 24 時間 2.07 ± 0.05 、培養 72 時間で検出限界値以上となった。MTBC (Fig. 2-6. (c)△) の吸光度は培養開始直後から上昇し、培養 24 時間で 1.91 ± 0.11 、培養 72 時間で 3.00 ± 0.45 と

培養時間が長くなると高値となった。

2.3. 考察

抗酸菌は発育速度と発色性の違いにより Table 2. に示す Runyon 分類で分類され、IV 群に分類される迅速発育菌を除く抗酸菌は長時間の培養を要する。細菌の発育速度は世代時間に律され、世代時間が短いほど同一系内に生息する菌数が増えることから、結果として代謝産物量が増加する。近年、NTM の薬剤感受性試験における最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) に対して代謝活性の指標として細胞増殖能を評価する方法の一つである WST-1 法を用いると、CLSI 法で 2 週間要するところ 3 日と短期間で同等の結果が得られることが報告された¹⁹⁾。WST-1 法は、2000 年代から微生物の生存率、代謝活性、および代謝速度の評価にも広く応用されている方法である²³⁾。しかし、NTM に適用した報告例は少なく^{19,23)}、MTBC と NTM の標準的な鑑別方法に応用した報告例はない。そこで、抗酸菌に対して WST-1 法を用いるときに、比色定量の対象となる黄色ホルマザンの吸収スペクトルに影響が無いか検討した。本研究で供試した 5 種の抗酸菌の吸収スペクトルは、菌種によらず同様のスペクトル形状となったことから、黄色ホルマザンの吸収スペクトルに抗酸菌の代謝産物等が影響を及ぼさないことが明らかとなった (Fig. 2-1.)。黄色ホルマザンの吸収極大波長に相当する 450 nm の吸光度に着目すると、培養時間が長くなるとともに吸光度が高値となったことから (Fig. 2-2.)、抗酸菌の種類によらず WST-1 法を適用可能であることが示唆された。さらに、一般細菌、芽胞、酵母様真菌への WST-1 法への適用報告例²⁴⁾があることから、細菌の種類によらず微生物の代謝測定に WST-1 法を適用可能であることが示唆された。また、450 nm の吸光度の増加曲線は菌種により異なり、Runyon 分類 I 群に分類される *M. kansasii* (Fig. 2-2. ●) と III 群に分類される *M. intracellulare* (Fig. 2-2. ▲) の吸光度が急激に増加し始める培養時間は異なり、II 群に分類される *M. gordonae* (Fig. 2-2. ○) と IV 群に分類される *M. abscessus* (Fig. 2-2. □) では緩やかな吸光度の上昇がみられた。一方、III 群に分類される *M. avium* の吸光度は培養時間に対して直線的に吸光度が増加したが、その傾きは小さかった (Fig. 2-2. ■)。菌種により吸光度の増加曲線が異なることから、抗酸菌の鑑別に WST-1 法を適用可能であることが示唆された。WST-1 法では、マイクロプレートを用いて吸光度を測定することで、同時に同条件の試験を多く実施することが可能である。抗酸菌の検査に適した WST-1 法の条件検討には、マイクロプレートを用いて培養し、吸光度の測定にはフィルター式マイクロプレートリーダーを用いることとした。検査波長は、マイクロプレートリーダーの光学フィルターの種類を勘案して、対照波長を 620 nm、検査波長を 450 nm とした。

WST-1 法では前培養したコロニーから菌懸濁を調製することから、前培養に使用する固形培地を選定する必要がある。臨床検査室において抗酸菌培養に一般的に用いられる固形培地として、卵をベースとした本邦で最も多く用いられている小川培地と諸外国で主に用いられている Löwenstein-Jensen 培地がある。抗酸菌の研究に用いられる固形培地には、寒天をベースとした Middlebrook 7H10 寒天培地も用いられている。Middlebrook 7H10 寒天培地は小川培地より雑菌の影響を受けやすいものの、検出感度が高いことに加え、CO₂ 濃度 5~10 % で炭酸ガス培養すると菌の増殖が速くなり 1~2 週間でコロニー形成が認められる利点がある²²⁾。これまでに小川培地または Middlebrook 7H10 寒天培地を用いた比率法による薬剤感受性試験において、薬剤成分が卵成分に吸着され薬効が失活することにより

MTBC のニューキノロン系薬に対する MIC 値が Middlebrook7H10 寒天培地より 1%小川培地の方が高い傾向があることが報告された²⁵⁾。WST-1 法においても、前培養培地の種類により測定結果に影響を与える可能性が考えられることから、WST-1 法の前培養に用いる最適な培地を選択する必要がある。本研究では、前培養培地に含有される卵成分の影響を検討するために、2%小川培地と Middlebrook7H10 寒天培地を用いた。いずれの培地に発育した菌株を用いても、培養時間が長くなると吸光度の上昇を認め、その吸光度はいずれの培養時間でも Middlebrook 7H10 寒天培地に発育した菌株の方が、2%小川培地に発育した菌株より高かった (Fig. 2-3.)。WST-1 法では、試料にコンタミしている還元性物質が結果に影響を及ぼすことから、2%小川培地に含有される卵成分が結果に影響を及ぼしたものと推察される。以上より、卵成分を含まない Middlebrook 7H10 寒天培地が WST-1 法に用いる抗酸菌の前培養培地として適した培地であることが明らかとなった。

微生物検査室において、室温で培養できると取り扱いが容易となる。先行研究¹⁹⁾において WST-1 法を用いた NTM の薬剤感受性試験の培養温度が $36 \pm 1^\circ\text{C}$ であることから、本研究では室温 (25°C) と 35°C のいずれが適した培養温度であるか検討した。室温 (25°C) で培養すると *M. kansasii* の臨床分離株の吸光度は上昇を認めず、他の NTM の吸光度は培養時間が長くなると高値となった (Fig. 2-4. 白)。一方、 35°C で培養すると供試したすべての菌種において、吸光度の上昇を認めた (Fig. 2-4. 黒)。また、いずれの菌種も 35°C で培養した吸光度の方が室温 (25°C) で培養するより高値となった。WST-1 法では、電子メディエーターを介した水溶性テトラゾリウム塩の還元反応でコハク酸デヒドロゲナーゼ活性を検出することから、吸光度は水溶性テトラゾリウム塩が還元されたホルマザン量を反映している^{17,18)}。一般に、コハク酸デヒドロゲナーゼ活性は温度に大きく依存し低温ほど反応速度は遅くなる^{17,18)}。本検討において室温 (25°C) より反応速度が速いことが予測される 35°C での培養が、WST-1 法において有効な培養条件であると示された。

測定系内の細菌数に依存して測定対象であるホルマザン量が多くなることから、供試菌液濃度について検討した。McF 0.5 ($ca. 10^8$ CFU/mL) の菌液濃度で供試すると、いずれの菌種でも培養時間が長くなるとともに吸光度は高値となった (Fig. 2-5. 黒)。 $ca. 10^7$ CFU/mL の菌液濃度では、*M. kansasii* の臨床分離株のみ培養時間が長くなっても吸光度の上昇を認めなかった (Fig. 2-5. 灰色)。以上より、本研究における検討では、培養後に吸光度の上昇が明瞭に認められた $ca. 10^8$ CFU/mL の菌液濃度で供試することとした。

WST-1 法に用いられる水溶性テトラゾリウム塩はそれ自身が細胞内の電子にアクセスできないため、細胞内から細胞外の水溶性テトラゾリウム塩に電子を伝達する橋渡し役となる電子メディエーターが必要である²⁶⁾。WST-1 法を用いた細胞増殖アッセイキットでは電子メディエーターとして PMS が使用されている。一方、WST-1 法を用いた NTM の薬剤感受性試験では BQ が使用され、WST-1 法のブランクとして BQ を Middlebrook 7H9 Broth に混合すると、非細胞性還元反応を起こすレベルが低く NTM の代謝活性に由来する吸光度に影響を与えないことが報告されている¹⁹⁾。そこで本研究手法に適した電子メディエーターとして、キットで使用されている PMS、PMS より親油性の高い PES、および BQ について検討した。PMS と PES を用いたときの吸光度 (Fig. 2-6. (a), (b)) は、培養 36 時間のとき MTBC に比べて *M. abscessus* ATCC®19977(□)、*M. intracellulare* の臨床分離株 (▲) および *M. goodnae* の臨床分離株 (○) の吸光度に差異を認めた。一方、BQ を使用したときの吸光

度 (Fig. 2-6. (c)) は、いずれの菌種も培養直後から上昇し MTBC(Δ)の吸光度に比べて *M. avium* ATCC[®]19421 (■) の吸光度は差異を認めたが、*M. intracellulare* の臨床分離株 (\blacktriangle) の吸光度に差異は認められなかった。抗酸菌の鑑別には、菌種による吸光度に差異が認められる電子メディエーターを選択する必要があることから、BQ より PMS と PES が適していることが示唆された。本研究では、WST-1 法の細胞増殖アッセイキットで使用されている PMS を選択することとした。

2.4. 結論

本章では抗酸菌の検査として最適な WST-1 法の条件を設定するために、検査波長と検査に用いる抗酸菌の前培養培地を決定し、WST-1 法における培養温度、菌液濃度、および電子メディエーターの種類について検討し、検討結果に基づいて条件の設定を行った。その結果、抗酸菌に対して WST-1 法を用いる場合の検査波長は、細胞に対して観測する 450 nm を使用できることが明らかとなった。WST-1 法に用いる菌株の前培養培地には Middlebrook 7H10 寒天培地が適しており、供試菌液濃度は McF 0.5 が適していることが明らかとなった。WST-1 法で使用する電子メディエーターは PMS が適しており、検査における培養温度は室温より 35°C が適していた。以上より、抗酸菌に適した WST-1 法の実験条件は、Middlebrook 7H10 寒天培地で前培養して発育した菌株から Middlebrook 7H9 Broth で McF 0.5 に調製した菌懸濁液を検体として用い、PMS を電子メディエーターとする WST-1 検出試薬と混合後 35°C で培養して、マイクロプレートリーダーで対照波長を 620 nm とした 450 nm の吸光度を測定することと決定された。

第3章 MTBC と NTM の鑑別及び NTM 間の菌種鑑別

感染予防策の異なる MTBC と NTM との鑑別は感染対策上重要である。抗酸菌は脂質に富んだ細胞壁構造を有しており、ペプチド結合の加水分解酵素であるトリプシンやエステル結合に対する分解酵素であるリパーゼを用いることで細胞壁に損傷を与えることが可能であると考えられる。起因菌に即した感染予防策への変更を早期に行うために、WST-1 法にこれらの酵素を添加することで、6~8 週間を要する既存の培養検査期間を短縮することを着想した。本章では、MTBC と NTM の鑑別及び NTM 間の菌種鑑別に、これらの酵素を添加した WST-1 法を適用するために、第2章で確立した WST-1 法において、検査波長への酵素の影響を検討するとともに、酵素濃度の最適化を行い、鑑別方法の検討を行った。

3.1. 実験方法

3.1.1. 試験菌株

NTM は東京医療保健大学大学院医療保健学研究科医療保健学専攻感染制御学領域保有の *Mycobacterium kansasii*、*M. gordonae* および *M. intracellulare* の臨床分離株と、*M. kansasii* ATCC®12478 と 35775、*M. gordonae* ATCC®14470、*M. avium* ATCC®19421、*M. intracellulare* ATCC®13950、*M. abscessus* ATCC®19977 を用い、MTBC は君津中央病院保有の臨床分離株を用いた。固形培地は抗酸菌検査ガイドライン 2025²²⁾に従い自家調整した Middlebrook 7H10 寒天培地 (Middlebrook 7H10 agar (Becton, Dickinson and Company: BD) 3.8 g を MilliQ 水 180 mL に溶解後 Glycerol 1 mL を添加し、高圧蒸気滅菌したあとに Middlebrook OADC Enrichment (BD) 20 mL を添加混合して、プラスチック製試験管に分注) を使用した。菌株を 35 °C で 5 日から 2 週間培養後、Middlebrook 7H9 Broth (極東製薬工業株式会社) で McF 0.5 の菌懸濁液を調製した。

3.1.2. 酵素

トリプシンはトリプシン粉末 (ブタ膵臓由来、トリプシン活性 4000 USP Units/mg 以上、キモトリプシン活性 75 USP Units/mg 以下、富士フィルム和光純薬株式会社) を使用し、MilliQ 水に溶解して 44 Units/mL と 194 Units/mL のストック溶液を調製した。リパーゼはリパーゼ粉末 (*Candida cylindracea* 由来リパーゼ AYS アマノ 30000 Units/g 以上、富士フィルム和光純薬株式会社) を使用し、MilliQ 水に溶解して 240 Units/mL のストック溶液を調製した。

3.1.3. 吸収スペクトルの測定

1.5 mL PMMA2 面透過セミマイクロキュベットに菌懸濁液 500 µL とトリプシンのストック溶液 500 µL を入れた後、11.1 mM WST-1 溶液と 8.0 mM PMS 溶液を 9:1(v/v) の比率で混合した検出試薬 100 µL を添加して、室温 (25 °C) で紫外可視分光光度計 UV-2600 (株式会社島津製作所) を用いて経時的に吸収スペクトルを測定した。

3.1.4. マイクロプレートリーダーによる吸光度測定

菌懸濁液 400 µL にトリプシンのストック溶液またはリパーゼのストック溶液または Middlebrook 7H9 Broth、400 µL を加えて混合した後、11.1 mM WST-1 溶液と 8.0 mM PMS

溶液を 9:1(v/v) の比率で混合した検出試薬 160 μL を添加して、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 200 μL ずつ分注後シーリングした。35 $^{\circ}\text{C}$ で培養し、対照波長を 620 nm として 450 nm の吸光度を Multiskan TMFC (Thermo Fisher Scientific, Inc) で経時的に測定した。結果は平均値 \pm Standard Deviation (SD) で記載し、有意差検定には Fisher's F-test 後、Student's t-test または Welch's t-test を行った。

3.2. 結果

3.2.1 トリプシン添加時の吸収スペクトルの経時変化

トリプシン添加時の WST-1 法による各菌株を、セミマイクロキュベットを用いて測定した吸収スペクトルと、450 nm における吸光度の経時変化をそれぞれ Fig. 3-1. および Fig. 3-2. に示した。吸収スペクトルはいずれの菌種でも培養時間が長くなると 420 nm から 480 nm 付近に 450 nm に吸収極大をもつブロードな吸収が認められ、600 nm より長波長側では吸収は認められなかった (Fig. 3-1.)。 *M. abscessus* ATCC[®]19977 の 450 nm における吸光度は、培養 25 時間後に急激に上昇し始めた (Fig. 3-2. (a)□)。 *M. intracellulare* の臨床分離株 (Fig. 3-2. (a)▲) と *M. gordonae* の臨床分離株 (Fig. 3-2. (a)○) の吸光度は培養 35 時間後に、 *M. kansasii* の臨床分離株 (Fig. 3-2. (a)●) の吸光度は培養 38 時間後に急激に上昇し始め、培養 72 時間後の吸光度はいずれも検出限界値以上であった。 *M. avium* ATCC[®]19421 の吸光度は、培養時間が長くなるとともに緩やかに上昇し、培養 72 時間後の吸光度は 0.71 であった (Fig. 3-2. (a)■)。 450 nm の吸光度から 620 nm の吸光度を減算しても、吸光度の増加曲線は 450 nm の吸光度の増加曲線と同様であった (Fig. 3-2. (b))。

3.2.2. 吸光度の経時変化へのトリプシン濃度の影響

セミマイクロキュベットを用いて測定したトリプシン添加時の吸光度増加曲線を Fig. 3-3. に示す。 *M. kansasii* の臨床分離株の吸光度が急激に上昇する培養時間は、トリプシン非添加時は 35 時間 (Fig. 3-3. (a)赤→) であったが、トリプシンが共存すると終濃度 20 Units/mL で 36 時間 (Fig. 3-3. (a)青→) であり、終濃度 100 Units/mL では 48 時間 (Fig. 3-3. (a)緑→) であった。 *M. gordonae* の臨床分離株ではトリプシン非添加時は 44 時間 (Fig. 3-3. (b)赤→) から緩やかに吸光度が上昇したのに対し、トリプシン終濃度 20 Units/mL 共存下では 32 時間から急激に上昇した (Fig. 3-3. (b) 青→)。 *M. avium* ATCC[®]19421 の吸光度はトリプシン非添加時 (Fig. 3-3. (c) 赤→) とトリプシン終濃度 20 Units/mL (Fig. 3-3. (c) 青→) 共存下では緩やかに上昇したのに対し、トリプシン終濃度 100 Units/mL (Fig. 3-3. (c) 緑→) 共存下では 36 時間から急激に上昇した。 *M. intracellulare* の臨床分離株の吸光度が急激に上昇する培養時間は、トリプシン非添加時 (Fig. 3-3. (d) 赤→) は 43 時間であったのに対し、トリプシン終濃度 20 Units/mL (Fig. 3-3. (d) 青→) 共存下では 32 時間であった。 *M. abscessus* ATCC[®]19977 の吸光度が急激に上昇する培養時間は、トリプシン非添加時 (Fig. 3-3. (e) 赤→) は 45 時間であったが、トリプシン終濃度 20 Units/mL (Fig. 3-3. (e) 青→) 共存下では 21 時間であった。

3.2.3 マイクロプレートリーダーで測定した吸光度に対するリパーゼの影響

リパーゼを添加して培養したときの吸光度を Fig. 3-4. に示す。培養 24 時間のときの吸光

度は、Fig. 3-4. (a) に示すように、非添加時とリパーゼを終濃度 20 Units/mL 共存下ではそれぞれ、*M. gordonae* の臨床分離株は 0.25 (●) および 0.34、*M. avium* ATCC® 19421 は 0.18 (△) および 0.27、*M. kansasii* ATCC®12478 は 0.09 (○) および 0.23、MTBC は 0.17 (▲) および 0.24 となり、いずれの菌株でもわずかに吸光度の上昇を認めた。リパーゼの終濃度 100 Units/mL 共存下では、MTBC のみ 0.10 (▲) とわずかに減少したものの、NTM では終濃度 20 Units/mL 共存下と同程度の値となり、終濃度 1000 Units/mL 共存下では、*M. gordonae* の臨床分離株は 0.42 (●)、*M. avium* ATCC® 19421 は 0.35 (△)、*M. kansasii* ATCC®12478 は 0.26 (○)、MTBC は 0.12 (▲) と、いずれの菌株も終濃度 100 Units/mL 共存下と同程度の値となった。培養 48 時間における吸光度は、Fig. 3-4. (b) に示すように、非添加時とリパーゼを終濃度 20 Units/mL で共存すると *M. gordonae* の臨床分離株はそれぞれ 1.12 (●) および 1.37、*M. avium* ATCC® 19421 は 0.38 (△) および 0.65、*M. kansasii* ATCC®12478 は 0.29 (○) および 0.63 といずれの菌株でもわずかな上昇を認めたが、MTBC は 0.27 (▲) および 0.30 とほぼ同程度の値となった。リパーゼの終濃度が高くなると、終濃度 1000 Units/mL 共存下では *M. gordonae* の臨床分離株は 1.76 (●)、*M. avium* ATCC® 19421 は 1.00 (△)、*M. kansasii* ATCC®12478 は 0.73 (○) と終濃度 20 Units/mL 共存下よりわずかに高値を示したが、MTBC は終濃度 100 Units/mL 共存下では 0.14 (▲) とわずかに減少し、終濃度 1000 Units/mL でも 0.16 であった。

3.2.4. WST-1 法による NTM と MTBC の吸光度の比較

NTM 5 菌種 9 株と MTBC 5 株について WST-1 法による吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した結果を Fig. 3-5. に示す。*M. kansasii* の吸光度 (Fig. 3-5. (a)) は、いずれの菌株でも培養時間が長くなると徐々に上昇し、培養 72 時間には ATCC®12478 は 0.52 ± 0.02 、ATCC®35775 は 0.32 ± 0.02 、臨床分離株は 0.36 ± 0.07 であった (Fig. 3-5. (a))。*M. gordonae* ATCC®14470 および臨床分離株の吸光度は、いずれの菌株も培養 48 時間のときに急激に上昇し、それぞれ 2.09 ± 0.04 および 1.12 ± 0.06 であり、培養 72 時間では ATCC®14470 は検出限界値以上の値となり、臨床分離株は 2.50 ± 0.22 であった (Fig. 3-5. (a))。*M. avium* ATCC® 19421 の吸光度は、培養時間が長くなるにつれ徐々に上昇し、培養 72 時間の吸光度は 0.55 ± 0.02 であった (Fig. 3-5. (b) Mav)。*M. intracellulare* ATCC®13950 および臨床分離株の吸光度は、培養 24 時間ではそれぞれ 0.87 ± 0.02 および 0.66 ± 0.03 となり、培養 48 時間ではいずれの菌株も急激に上昇し、検出限界値以上となった (Fig. 3-5. (b))。*M. abscessus* ATCC®19977 の吸光度は、培養 24 時間に 1.80 ± 0.20 と上昇し、培養 48 時間時は検出限界値以上となった (Fig. 3-5. (b) Mav)。MTBC の臨床分離株の吸光度は、はいずれの株も培養時間の経過とともに徐々に上昇し、培養 72 時間で、MTBC-1 は 0.39 ± 0.03 、MTBC-2 は 0.47 ± 0.03 、MTBC-3 は 0.37 ± 0.03 、MTBC-4 は 0.57 ± 0.06 、MTBC-5 は 0.44 ± 0.08 であった (Fig. 3-5. (c))。

3.2.5. 吸光度に対する酵素の影響

酵素を添加した WST-1 法による吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した結果を NTM の標準菌株は Fig. 3-6. に、NTM の臨床分離株は Fig. 3-7. に、MTBC の臨床分離株は Fig. 3-8. に示す。*M. kansasii* ATCC®12478 と 35775 の吸光度は、Fig. 3-6. (a), (b) に示すように、トリプシン共存下ではトリプシン濃度によらず培養 48 時間までは未添加系と同程度の

値を示し、培養 72 時間で *M. kansasii* ATCC® 35775 の吸光度が未添加系より僅かに減少した。リパーゼ共存下では、いずれの菌株も培養 48 時間までは未添加系と同程度の値を示し、培養 72 時間で僅かに減少した。*M. kansasii* の臨床分離株でも標準菌株と同様の傾向を示した (Fig. 3-7. (a))。

M. gordonae ATCC®14470 の吸光度は (Fig. 3-6. (c)) に示すように、トリプシン共存下では培養 24 時間で非添加系より高くなるものの、培養 48 時間以降は非添加系より減少した。リパーゼ共存下ではいずれの培養時間でも吸光度は非添加系より減少した。*M. gordonae* の臨床分離株は、トリプシン共存下では培養 48 時間まで非添加系より高くなり、培養 72 時間では非添加系より減少したが、リパーゼ共存下では標準菌株と異なり高値を示した (Fig. 3-7. (b))。

M. avium ATCC®19421 の吸光度は、培養時間によらずトリプシン共存下では非添加系より高くなるのに対し、リパーゼ共存下では非添加系より減少した (Fig. 3-6. (d))。*M. avium* の臨床分離株でも標準菌株と同様の傾向を示した (Fig. 3-7. (c))。

M. intracellulare ATCC®13950 の吸光度は、(Fig. 3-6. (e)) に示すように、培養 72 時間では酵素の共存の有無によらず吸光度は検出限界値以上の値を示した。トリプシン共存下では培養 24 時間は非添加系より吸光度が増加するのに対し、培養 48 時間は減少した。リパーゼ共存下ではいずれの培養時間でも非添加系より減少した。*M. intracellulare* の臨床分離株は、(Fig. 3-7. (d)) に示すように、培養 48 時間以降の非添加系の吸光度は検出限界値以上となった。培養 24 時間ではトリプシン共存下の吸光度は非添加系より高くなるものの、リパーゼ共存下では非添加系より低くなり、培養 48 時間ではトリプシン共存下の方がリパーゼ共存下より高い吸光度を示した。

M. abscessus ATCC®19977 の吸光度は、(Fig. 3-6. (f)) に示すように、培養 24 時間ではトリプシン共存下で非添加系より僅かに増加したのに対し、リパーゼを共存下では非添加系より減少した。培養 48 時間以降の吸光度は 3.30 ± 0.00 であった。*M. abscessus* の臨床分離株でも標準菌株と同様の傾向を示した (Fig. 3-7. (e))。

MTBC の吸光度は、トリプシン共存下では MTBC-1、2、3、4 の吸光度は非添加系より高値となったが (Fig. 3-8. (a)~(d))、MTBC-5 の吸光度は非添加系より僅かに減少した (Fig. 3-8. (e))。リパーゼ共存下ではいずれの菌株でも非添加系より吸光度の増加を認めた。MTBC-1 から MTBC-5 までの 5 株の吸光度を平均すると、トリプシン共存下でも、リパーゼ共存下でも培養時間によらず非添加系の吸光度より高値を示した (Fig. 3-8. (f))。

3.3. 考察

WST-1 法は水溶性テトラゾリウム塩から還元された黄色ホルマザンを比色定量する方法である。ホルマザンの生成は細胞内 NADH の還元反応に由来するため、吸光度を測定することで菌体の代謝活性を定量的に評価することができる。しかし、水溶性テトラゾリウム塩は細胞透過性が低いため、WST-1 法による代謝活性評価には細胞膜を透過して水溶性テトラゾリウム塩に電子を授受できる電子メディエーターを必要とする^{23,26)}。抗酸菌の細胞壁の構造は、Fig. 1-6 に示すようにミコール酸を主成分とする脂質と巨大高分子からなる複雑な構造を持ち、抗菌薬の透過を効果的に阻害している²⁰⁾。このような細胞壁の構造は、電子メディエーターの膜透過を低減することで、WST-1 法での呈色反応を阻害するものと予想される。ペプチド結合を特異的に加水分解するトリプシンでペプチドグリカン層におけるペプチド結合を切断すること、または脂質のエステル結合を分解するリパーゼでアラビノガラクトタンに結合しているミコール酸のエステル結合またはトレハロースジミコレートのエステル結合^{21,27)}を切断することで、抗酸菌の細胞壁構造に損傷を与えることが期待される。細胞壁構造への損傷は、WST-1 法で使用する電子メディエーターの膜透過性に影響を及ぼし、水溶性テトラゾリウム塩への電子の授受から生じるホルマザンの生成量が変わることで吸光度が変化し、抗酸菌の鑑別に有利に働くものと考えた。

トリプシン共存下の吸収スペクトル (Fig. 3-1.) は、非共存下の吸収スペクトル (Fig. 2-1.) と同様に 420~480 nm 付近に 450 nm に吸収極大をもつブロードな吸収を示したことから、吸収スペクトルの形状にトリプシン添加の影響はなく、WST-1 法にトリプシンを添加できることが示唆された。WST-1 法において吸光度の増加は、水溶性テトラゾリウム塩の還元により生成される黄色ホルマザン量の増加を示し、菌体の代謝活性が高いことを意味している。そこで 1 時間あたりの吸光度増加量が 0.05 以上となる培養時間を算出し (Table 3-1.)、吸光度の増加を検出するまでの培養時間に与えるトリプシン添加の影響を検討した。*M. kansasii* の臨床分離株の吸光度増加量が 0.05 以上となる培養時間は、トリプシン非共存下では 35 時間であったが、トリプシン共存下では培養時間が延長した。一方、*M. gordonae* の臨床分離株と *M. intracellulare* の臨床分離株の培養時間は、トリプシンの共存により約 10 時間短縮された。*M. avium* ATCC®19421 はトリプシン非共存下とトリプシン終濃度 20 Units/mL 共存下で吸光度増加量が 0.05 以上の増加を示す培養時間を認めず、トリプシン終濃度 100 Units/mL 共存下で 36 時間となり、トリプシン共存により吸光度の増加を検出することが可能となった。さらに迅速発育菌である *M. abscessus* ATCC®19977 は、トリプシン共存により 24 時間短縮された。Runyon 分類に対応すると、I 群に分類される *M. kansasii* は培養時間が延長し、II 群の *M. gordonae* と III 群の *M. avium* と *M. intracellulare* は培養時間が短縮した。さらに III 群の *M. avium* と *M. intracellulare* はトリプシン濃度により影響が異なり、*M. avium* はトリプシン終濃度 100 Units/mL の共存により培養時間が短縮した。以上より、抗酸菌への WST-1 法におけるトリプシンの共存は、ホルマザンの生成に影響する可能性があり、これらの違いは、抗酸菌の細胞壁構造が菌種により異なることを反映しているものと推察される。これまでに、*Escherichia coli* をトリプシン存在下で培養すると、細胞壁のリポタンパク質とペプチドグリカン層との間に存在するペプチド結合が切断され、結果として細胞壁全体の構造に歪みが生じることが報告されている²⁸⁾。また、*M. smegmatis* の膜小胞のペプチド結合の切断にトリプシンを使用した報告例²⁹⁾があることから、本研究

対象である抗酸菌の細胞膜に近接するペプチドグリカン層に存在するペプチド鎖間のペプチド結合にトリプシンが作用したことが示唆された。WST-1 法の培養において酵素の添加による吸光度の増加は、酵素が細胞壁に損傷を与えた結果として電子メディエーターの細胞透過性を高めたことに相当するものと示唆された。一方、酵素を添加しても吸光度の増減を認めない、あるいは吸光度の減少は、細胞壁構造がこの酵素の作用による細胞膜透過性に対して感受性が低い、あるいはホルマザン生成に抑制的に作用した可能性を示唆している。酵素により細胞壁に損傷を与えられた抗酸菌は、細胞内代謝活性を細胞外に存在する WST-1 試薬により効率的に伝達され、ホルマザン生成が増強され、結果として吸光度が上昇したものと推察された。

WST-1 法にリパーゼを添加した場合、Fig. 3-4. に示すように、NTM はリパーゼの終濃度によらず培養 24 時間でも培養 48 時間でもリパーゼ非共存下の吸光度より高値を示した。一方、MTBC は終濃度 20 Units/mL の時、非共存下の吸光度より培養 24 時間で 0.07 高値を示し、培養 48 時間で 0.03 高値を示したのに対し、終濃度 100 Units/mL では、それぞれ 0.07 および 0.13 低値を示し、リパーゼの終濃度がより高くなっても測定された吸光度はほぼ同程度の値を示した。このことは、抗酸菌の鑑別に適したリパーゼ終濃度は 100 Units/mL であることを意味している。

WST-1 法を用いて MTBC と NTM の鑑別および NTM 間の菌種鑑別を行うと、Fig. 3-5. に示すように MTBC と NTM の吸光度は培養時間が長くなると高くなり、MTBC と *M. kansasii* および *M. avium* ATCC®19421 の吸光度は培養時間の経過とともに徐々に増加し、培養 72 時間の吸光度は 0.60 以下であった。他の NTM の吸光度が 0.60 を超える培養時間をみると、*M. gordonae* ATCC®14470 と臨床分離株は 48 時間、*M. intracellulare* ATCC®13950 と臨床分離株、および *M. abscessus* ATCC®19977 は 24 時間となり、吸光度の上昇する培養時間の違いと吸光度の値により MTBC と NTM を鑑別できる可能性が認められた。

酵素添加による WST-1 法の吸光度への影響は、Fig. 3-6.～Fig. 3-8. に示すように、MTBC-1～5 までの 5 株の吸光度を平均した吸光度は、トリプシン共存下でも、リパーゼ共存下でも培養時間によらず非添加系の吸光度より高かったのに対して、リパーゼ共存下の NTM の吸光度は、いずれの菌種でも非添加系の吸光度より低くなった。トリプシンの共存による吸光度への影響は菌種により異なるため、Fig. 3-6. の結果を基に酵素添加時の吸光度から非添加時の吸光度を減算した値に着目した。1 時間あたりの吸光度が増加する培養時間の算出に吸光度増加量が 0.05 以上となる基準を設定したことから (Table 3-1.)、酵素を添加した WST-1 法による吸光度増加量が 0.12 以上を up (増加) とし、-0.06 以下を down (減少) とし、-0.06～0.12 を— (変化なし) として Table 3-2. に示す。MTBC の吸光度増加量がリパーゼを終濃度 100 Units/mL 共存下で培養 48 時間から増加したのに対して、NTM の吸光度増加量は *M. kansasii* では増減を認めず、*M. gordonae* ATCC®14470、*M. avium* ATCC®19421、*M. intracellulare* ATCC®13950、および *M. abscessus* ATCC®19977 は減少した。これらのことから MTBC と NTM の鑑別及び、NTM 間の菌種鑑別において、*M. kansasii* と他の NTM が鑑別できる可能性が示唆された。リパーゼ終濃度 100 Units/mL 共存下では培養 24 時間で *M. gordonae*、*M. intracellulare*、*M. avium* を互いに鑑別できないものの他の抗酸菌から鑑別でき、培養 48 時間では、リパーゼを添加した結果とトリプシン終濃度 80 Units/mL 共存下の結果を使用することで、*M. gordonae* と *M. intracellulare* は互いに鑑別できないが、*M. avium* と

の鑑別の可能性が示唆された。

細胞内代謝活性による電子の授受をより効率的に細胞外 WST-1 試薬へ伝達することでホルマゼン生成が増強されることから、酵素添加による吸光度変化量より MTBC と NTM の鑑別、さらに NTM の菌種鑑別が可能か検討した。標準菌株を用いたとき、Fig. 3-9. に示すようにトリプシン終濃度 15 Units/mL 共存下で、培養 24 時間ではいずれの菌種でも吸光度変化量は増加した。培養 48 時間と培養 72 時間では *M. avium* ATCC®19421 と MTBC は増加するものの、その他の遅発育菌群の NTM は減少した。この現象はトリプシン終濃度 80 Units/mL 共存下でも認め、その変化量は大きくなった。これは本研究において供試した濃度において、トリプシンの終濃度が高い方が検出感度が高いことを意味しており、トリプシンを添加した WST-1 法による鑑別には終濃度 80Unit/mL の方が適していることが示唆された。リパーゼを終濃度 100 Units/mL 共存すると、培養時間に依らず MTBC の吸光度変化量は増加したのに対し、NTM はいずれの菌種でも減少した。

菌種間の鑑別を行うため、吸光度変化量を酵素毎にプロットすると (Fig. 3-10.)、培養 24 時間ではリパーゼ添加により吸光度増加量が大きな負の値を示す *M. abscessus* が鑑別可能であり、トリプシン添加の結果とリパーゼ添加の結果を総合すると、トリプシン共存下には 0.2 程度の正の変化量を示しリパーゼ共存下に 0.2 程度の負の変化量を示す *M. intracellulare* の鑑別が可能であることが示唆された。培養 48 時間では、トリプシン共存下の結果とリパーゼ共存下の結果を総合すると、トリプシン共存下時には 0.2 程度の正の変化量を示しリパーゼ共存下に 0.2 程度の負の変化量を示す *M. avium* の鑑別の可能性が示され、いずれの酵素を添加しても 0.2 以上の負の変化量を示す *M. gordonae* と *M. intracellulare* が他の菌種から鑑別できる可能性が示された。Table 3-2. に示す吸光度増加量により鑑別できなかった *M. gordonae* と *M. intracellulare* は、*M. intracellulare* の方が吸光度減少量が大きく鑑別ができる可能性を認めた。また、トリプシン共存下の結果とリパーゼ共存下の結果を総合すると、いずれの培養時間でも MTBC のみが吸光度変化量の増加を継続することから、培養時間をフォローすることで MTBC と NTM の鑑別の可能性が示唆された。NTM の臨床分離株を用いると Fig. 3-11. に示すように、終濃度 15 Units/mL のトリプシン共存下における培養 24 時間での吸光度変化量は、標準菌株と同様にいずれの菌種でも増加した。培養 48 時間では *M. gordonae* の吸光度変化量は標準菌株ほど減少しなかったが、培養 48 時間と培養 72 時間でも標準菌株と同様の増減を示した。終濃度 100 Units/mL のリパーゼ共存下では、いずれの培養時間でも *M. gordonae* の臨床分離株の吸光度変化量に増加を認め標準菌株の現象とは異なるものの、その他の NTM は標準菌株と同様の増減を示した。以上より、吸光度変化量を用いることで MTBC と NTM の鑑別が可能であり、*M. gordonae* の鑑別への適用には注意を要するものの、NTM 間の鑑別として *M. abscessus*、*M. intracellulare*、および *M. avium* の鑑別が可能である可能性が示唆された。

酵素添加の有無で 24 時間あたりの吸光度増加量比 (Ratio) を算出することで鑑別が可能か検討した (Table 3-3.)。Ratio が 1 の時、24 時間あたりの吸光度増加量に添加した酵素の影響はなく、1 より高いときは WST-1 法の還元反応、菌体内への電子メディエーターの取り込み、電子授受後の電子メディエーターの菌体外への放出のいずれか、または複数が進んだことを意味し、1 より低いときはこれらのいずれか、または複数が低下したことを意味する。MTBC はいずれの酵素を添加しても Ratio は 1 を下回ることはなかった。MTBC

の Ratio がトリプシン共存下は終濃度に依らずいずれのタームでも 1 以上であったのに対して、*M. avium* ATCC®19421 以外の NTM は第 2 ターム以降の Ratio は 1 以下となり、MTBC と *M. avium* ATCC®19421 以外の NTM の鑑別が可能となった。リパーゼ共存下は、第 2 ターム以降は *M. avium* ATCC®19421 を含めた MTM の Ratio は 1 以下となり、MTBC と NTM の鑑別が可能となった。NTM 間の菌種では、トリプシン共存下で *M. avium* ATCC®19421 は Ratio が 1 以下とならなかったが、他の NTM は第 2 ターム以降の Ratio が 1 以下となり NTM 間の鑑別の可能性も示唆された。

3.4. 結論

WST-1 法の培養において酵素添加により細胞壁に損傷を与えられた抗酸菌は、細胞内代謝活性がより効率的に細胞外 WST-1 試薬へ伝達されることでホルマジン生成が增強され、結果として吸光度が上昇したものと推察された。酵素添加による WST-1 法を用いると、吸光度の増減挙動から、培養 24 時間では、リパーゼを終濃度 100 Units/mL 共存下で *M. gordonae* と *M. intracellulare* を互いに鑑別できないものの、MTBC、*M. kansasii*、および *M. avium* との鑑別が可能であり、培養 48 時間では、リパーゼを共存下の結果とトリプシン終濃度 80 Units/mL 共存下の結果を使用することで、*M. kansasii* と *M. avium* が鑑別できる可能性が示唆された。さらに、MTBC と NTM の鑑別は、培養 48 時間と培養 72 時間のリパーゼ共存下の結果とトリプシン終濃度 80 Units/mL 共存下の結果を総合することで鑑別できる可能性が示唆された。吸光度変化量を用いることで、MTBC と NTM の鑑別が可能であり、*M. gordonae* の鑑別への適用には注意を要するものの、NTM 間の鑑別として *M. abscessus*、*M. intracellulare*、および *M. avium* が鑑別できる可能性が示唆された。酵素添加の有無における 24 時間あたりの吸光度増加量比 (Ratio) より、リパーゼを共存下の Ratio から培養 24~48 時間に MTBC と NTM の鑑別が可能となった。NTM 間の鑑別はトリプシン共存下の Ratio から *M. avium* が他の NTM から鑑別でき、さらにリパーゼ共存下の Ratio を総合して *M. gordonae* が他の NTM から鑑別できる可能性が示唆された。

第4章 結語

MTBC と NTM の鑑別は感染対策上重要であり、NTM 菌種間の鑑別は NTM 症の治療における化学療法を選択を決定する上で必要である。これら菌種の鑑別を行う検査方法として、一般的に細胞の生存率や増殖能を評価する目的で細胞培養に用いられる WST 法に着目した。検出対象とする抗酸菌は、脂質に富んだ細胞壁構造を有しており、ペプチド結合の加水分解酵素であるトリプシンやエステル結合に対する分解酵素であるリパーゼを用いることで細胞壁に損傷を与えることが可能であると考えられた。そこで本研究ではトリプシンまたはリパーゼ存在下における WST-1 法を用いて、MTBC と NTM の鑑別、さらには異なる NTM 菌種間の鑑別を迅速に可能とする鑑別方法の確立を目的とした。

第2章では抗酸菌に適した WST-1 法の実験条件が、Middlebrook 7H10 寒天培地で前培養して発育した菌株から Middlebrook 7H9 Broth で McF 0.5 に調製した菌懸濁液を検体として用い、PMS を電子メディエーターとする WST-1 検出試薬と混合後 35°C で培養して、マイクロプレートリーダーで対照波長を 620 nm とした 450 nm の吸光度を測定することと決定された。

第3章では、第2章で決定した条件を用いて酵素を添加しない WST-1 法では 48 時間の培養で *M. goodii* と *M. intracellulare* 間の鑑別はできないものの、他の遅発育性抗酸菌から鑑別できる可能性が示され、吸光度の経時変化を追跡することで *M. kansasii* と MTBC 間の鑑別はできないものの、他の遅発育性抗酸菌から鑑別できる可能性が示された。トリプシンまたはリパーゼを添加すると、酵素共存下による吸光度の増減挙動 (Table 3-2.) より、72 時間以内の培養で MTBC、*M. kansasii*、*M. avium* が鑑別可能であり、吸光度変化量 (Fig. 3-10.) より、MTBC と NTM の鑑別さらに *M. abscessus*、*M. intracellulare*、および *M. avium* が鑑別できる可能性が示唆された。また、トリプシン共存下に吸光度が増加し始める培養時間が、Runyon 分類で I 群に分類される *M. kansasii* は延長し、II 群の *M. goodii* および III 群の *M. avium* と *M. intracellulare* は短縮した。さらに III 群の *M. avium* と *M. intracellulare* はトリプシン濃度により影響が異なり、*M. avium* はトリプシン 100 Units/mL 共存下で培養時間が短縮することを示した (Table 3-1.)。これは、抗酸菌の細胞壁構造が菌種により異なることを反映しているものと推察された。

鑑別の対象とする抗酸菌のペプチドグリカン層は細胞膜に最も近い位置にあり、ペプチド結合で架橋された糖鎖で構成される (Fig. 1-6.)。細胞壁は自然界で最も長鎖の脂肪酸であるミコール酸を豊富に含み、糖脂質としてリポアラビノマンナンとアラビノガラクトンから構成される³⁰⁾。Mycobacterium 属のミコール酸の炭素数は 60~90 程度で、天然では稀な α -アシル- β -ヒドロキシ脂肪酸であり、菌種により炭素鎖長や修飾基が異なる。MTBC は、シクロプロパン環を 2 個持つ α -ミコール酸からなり、遠位のシクロプロパン環がメトキシ基に置換されたメトキシミコール酸やケト基に置換されたケトミコール酸が混在する構造である。*M. avium* complex はメトキシミコール酸が欠損し、 α -ミコール酸とケトミコール酸に加えてジカルボキシミコール酸を有する構造であり、近位のシクロプロパン環には、シス型とトランス型の幾何異性体が存在する³¹⁾。トリプシンの分子量は 23 kDa であり、ペプチドグリカン層のペプチド結合に作用することが期待される。一方リパーゼの分子量は 33 kDa であり、アラビノガラクトンの非還元末端に存在するエステル結合²¹⁾や細胞壁の最外層にトレハロースミコール酸 (TMM) やトレハロースジミコール酸 (TDM/Cord Factor)

を固定するエステル結合に作用することが期待される。抗酸菌の種類による外膜の構成成分が異なるため、この菌種の違いにおける酵素の反応性の違いが、WST-1 法における電子メディエーターの膜透過性に変化を生じ、菌種の鑑別に繋がる結果となったと考えられる。

以上を総括すると、本研究ではトリプシンまたはリパーゼ存在下における WST-1 法を用いて、MTBC と NTM の鑑別に加えて NTM 菌種間の鑑別を可能とする鑑別方法の確立を目的に迅速化にむけて検討を行った。WST-1 法が抗酸菌の代謝活性を測定するのに有効であることを確認した。これは *M. gordonae* ATCC 14470、*M. intracellulare* ATCC 13950、および *M. abscessus* ATCC 19977 が酵素非共存下でも吸光度の有意な増加を示したことで実証され、WST-1 法を用いてこれらの NTM を他の NTM や MTBC から明確に区別できることを示唆している。さらに重要なのは MTBC と NTM を区別するために、酵素添加という簡便で新たな概念を導入した点である。抗酸菌培養同定試験は通常 1~2 週間を要するが、本法では所要時間を 48~72 時間に短縮できる可能性がある。微生物検査室における質量分析装置を用いた同定法では前処理を含む工程が必要であるのに対し、本法は酵素添加という簡便な操作で実施可能であり、汎用性の高い培養検査法であると考えられる。時間を要する培養検査を待つことなく、治療効果の早期評価や退院基準の判定が可能になることが期待される。近年、NTM 感染症の発生率が増加していること、また治療法は原因菌種によって異なることから、NTM と MTBC と区別することに加え、NTM を同定できる可能性を示した本法の臨床的有用性は大きく、鑑別までに要する時間が大幅に短縮された意義は大きい。本研究では、臨床検体から高頻度に検出される NTM 菌種を対象としたが n 数が少ない点、Runyon 分類の中から各 1 菌種を選択しているため、その他の菌種についても検討しなければならない点、そのうえで近年増加している NTM 菌種については十分に検討できておらず更なる検討が必要で今後の課題である。臨床現場では、培養検査前に喀痰検体を NALC-NaOH で処理し、粘液溶解を促進し汚染物質を除去することが一般的である²²⁾。本研究の限界として、この過酷なアルカリ処理がマイコバクテリアの細胞壁に及ぼす影響は不明であり、その後に実施する酵素を添加した WST-1 法における酵素反応性および WST-1 法全体の感度への影響は不明である。

本論文の第 2 章の一部および第 3 章の内容は *医療関連感染誌* 第 19 巻に掲載されている。

謝辞

この博士論文作成するにあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。

研究指導教員の東京医療保健大学大学院 医療保健学科の松村有里子 教授、副研究指導教員の岩澤篤郎 教授、感染制御学教育研究センター長 森屋恭爾 教授、また名誉学長 木村哲 教授には研究活動を通じてたくさんのご教授頂きました。深く感謝いたします。

松村有里子 教授には、研究方法の立案からスライド作成、論文執筆に至るまで、多岐にわたり丁寧にご指導いただきました。研究の過程で壁に直面した際には、常に的確な示唆をいただき、前進することができました。

岩澤篤郎 教授は、研究に使用する培地の作成など急なお願いにも快くご対応いただき、また微生物に関する多くの貴重な知識をご教示いただきました。

森屋恭爾 教授は、論文作成や研究ゼミでの発表に際し、数多くの有益なご助言を賜りました、特に前向きなお言葉に幾度となく励まされました。

木村哲 名誉学長は修士課程では副指導教員として、博士課程では名誉教授になられても、研究の進捗を常に気にかけていただき、研究ゼミでいただいたごコメントが大きな励みとなりました。

東京医療保健大学大学院 医療保健学科の感染制御学の先生方には、研究ゼミにおいて多大なるご指導とご助言を賜りました。検査技師以外の多様な専門的視点からのご指導は、貴重なものとなりました。

研究を継続することができたのは、君津中央病院 医療技術局 臨床検査科 微生物検査室の皆様のご支援のおかげです。また、家族の理解と協力により、最後まで研究をやり遂げることができました。ここに深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 岩井 和郎、前田 伸司、村瀬 良朗. 結核菌と結核症の考古学. *Kekkaku*. 2010;85(5):465-475.
- 2) WHO, “What is DOTS? A Guide to Understanding the WHO-recommended TB Control Strategy Known as DOTS”, <https://iris.who.int/items/6f019944-112b-42f0-9ea3-e3bbcfa10dda> (Accessed 10 Feb. 2026)
- 3) WHO, “Global tuberculosis report 2024”. <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024> (Accessed 10 Feb. 2026)
- 4) Infectious Agents Surveillance Report (IASR). 結核の法的取扱いの変遷（結核予防法，感染症法），2017;38:233-234.
- 5) 公益財団法人 結核予防会 結核研究所 疫学情報センター <https://jata-ekigaku.jp/nenpou/> (Accessed 16 Feb. 2026)
- 6) WHO consolidated guidelines on tuberculosis: Module 4: treatment and care. Geneva: World Health Organization; 2022.
- 7) P, Dorman SE, Alipanah N, Barry PM, Brozek JL, Cattamanchi A, et al. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America clinical practice guidelines: Treatment of drug-susceptible tuberculosis. *Clin Infect Dis*. doi: 10.1093/cid/ciw376.
- 8) 結核診療ガイドライン 2024. 東京：南江堂；2024.
- 9) Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, Hoshino Y, Hasegawa N, Ato M, et al. Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(6):1116–1117. doi: 10.3201/eid2206.151086.
- 10) Hamaguchi Y, Morimoto K, Mitarai S. Laboratory-based surveillance of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in Japan. *ERJ Open Res*. 2025; 11:00337-2024. doi: 10.1183/23120541.00337-2024.
- 11) Ratnatunga CN, Lutzky VP, Kupz A, Doolan DL, Reid DW, Field M, et al. The rise of non-tuberculosis mycobacterial lung disease. *Front Immunol*. 2020; 11: 303. doi: 10.3389/fimmu.2020.00303

- 12) 日本結核・非結核性抗酸菌症学会 非結核性抗酸菌症対策委員会, 日本呼吸器学会 感染症・結核学術部会. 成人肺非結核性抗酸菌症化学療法に関する見解—2023年改訂—. 2023
- 13) WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organization; 2021.
- 14) Shinnick TM, Iademarco MF, Ridderhof JC; National Plan for Reliable Tuberculosis Laboratory Services Using a Systems Approach. MMWR Recommendations and Reports. 2005.54(RR06)1-12
- 15) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=79998826&dataType=0&pageNo=1
(Accessed 10 Feb. 2026)
- 16) 勝部 乙大、吉川 弥須子、滝澤 秀典、長谷 衣佐乃、森田 弘子、野村 由至、小川 佳亮、沼尾 利郎. 非結核性抗酸菌の併存が肺結核診療に及ぼす影響.
Kekkaku. 2015; 90(8): 607-612.
- 17) Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi M, He PG. A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 1993; 41(6): 1118–1122.
- 18) Sarı C, Kolaylı S, Celep Eyüpoğlu F. A comparative study of MTT and WST-1 assays in cytotoxicity analysis. *Haydarpaşa Numune Med J*. 2021; 61(3): 281-288.
doi: 10.14744/hnhj.2019.16443
- 19) Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M. et al. Rapid susceptibility testing for slowly growing nontuberculous mycobacteria using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium WST-1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34: 1965–1973.
- 20) Batt SM, Burke CE, Moorey AR, Besra GS. Antibiotics and resistance: the two-sided coin of the mycobacterial cell wall. *Cell Surf*. 2020; 6:100044. doi: 10.1016/j.tcs.2020.100044
- 21) Jackson M. The mycobacterial cell envelope—lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4: a021105. doi: 10.1101/cshperspect. a021105
- 22) 抗酸菌検査ガイド 2025. 東京: 南江堂; 2025

- 23) de Souza MQ, Bierhals DV, Reis AJ, Chimara E, Vianna JS, von Groll A, da Silva PA, Ramis IB. 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride as colorimetric indicator for drug susceptibility testing against nontuberculous mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2024; 108: 116096. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2023.116096
- 24) Braissant O, Astasov-Frauenhoffer M, Waltimo T, Bonkat G. A review of methods to determine viability, vitality, and metabolic rates in microbiology. *Front Microbiol.* 2020; 11: 547458. doi: 10.3389/fmicb.2020.547458
- 25) 山根誠久, Chilima BZ, 戸坂雅一, 岡沢豊, 丹野和信. 異なる培地組成でのニューキノロン系抗菌薬 6 剤の *Mycobacterium tuberculosis* 臨床分離株に対する *in vitro* 抗菌活性の測定. *Kekkaku.* 1996; 71(8): 453-458.
- 26) Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005; 11: 127–152. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7
- 27) Alderwick LJ, Harrison J, Lloyd GS, Birch HL. The mycobacterial cell wall—peptidoglycan and arabinogalactan. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015; 5(8): a021113.
- 28) Braun V, Rehn K. Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *Escherichia coli* cell wall: the specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur J Biochem.* 1969; 10: 426-438.
- 29) Haagsma AC, Driessen NN, Hahn MM, Lill H, Bald D. ATP synthase in slow- and fast-growing mycobacteria is active in ATP synthesis and blocked in ATP hydrolysis direction. *FEMS Microbiol Lett.* 2010; 313(1): 68–74. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02123. x.
- 30) Butler WR, Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct; 14(4): 704–726. doi: 10.1128/CMR.14.4.704-726.2001.
- 31) 藤原永年. 世界の結核研究の動向(26) 結核菌に特徴的な脂質分子と宿主応答. 複十字. 2022; 402: 20-22

Figure

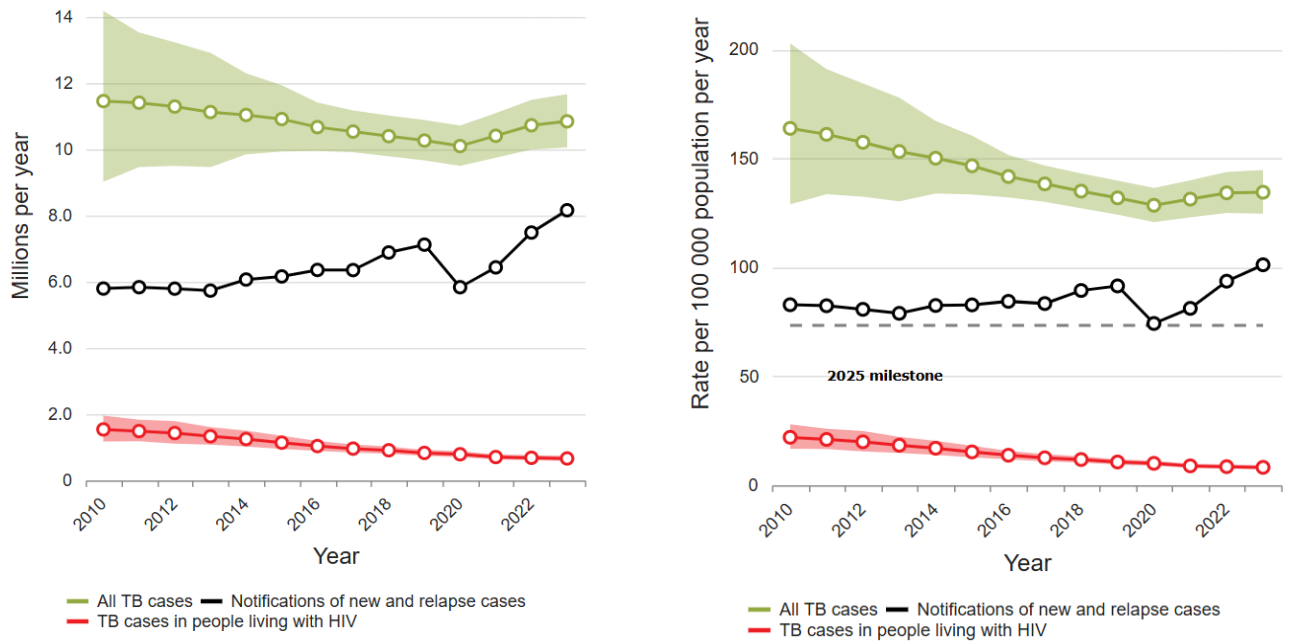


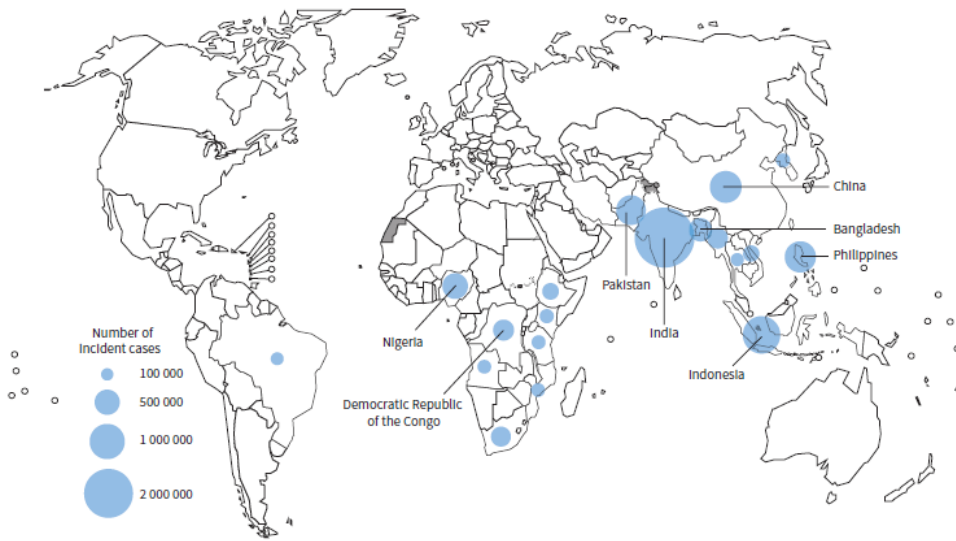
Fig. 1-1. 推定結核菌陽性率³⁾.

WHO 「世界結核報告書 2024」 より引用

Green—: All TB cases, Black —: Notification of new and relapse cases,

Red—: TB cases in people living with HIV

Estimated number of incident TB cases in 2023, for countries with at least 100 000 incident cases*



* The labels show the eight countries that accounted for about two thirds of the global number of people estimated to have developed TB in 2023.

Fig. 1-2. 2023 年の新規結核症例数推定値
(新規症例数が少なくとも 100,000 件以上の国々について)
WHO「世界結核報告書 2024」より引用³⁾.

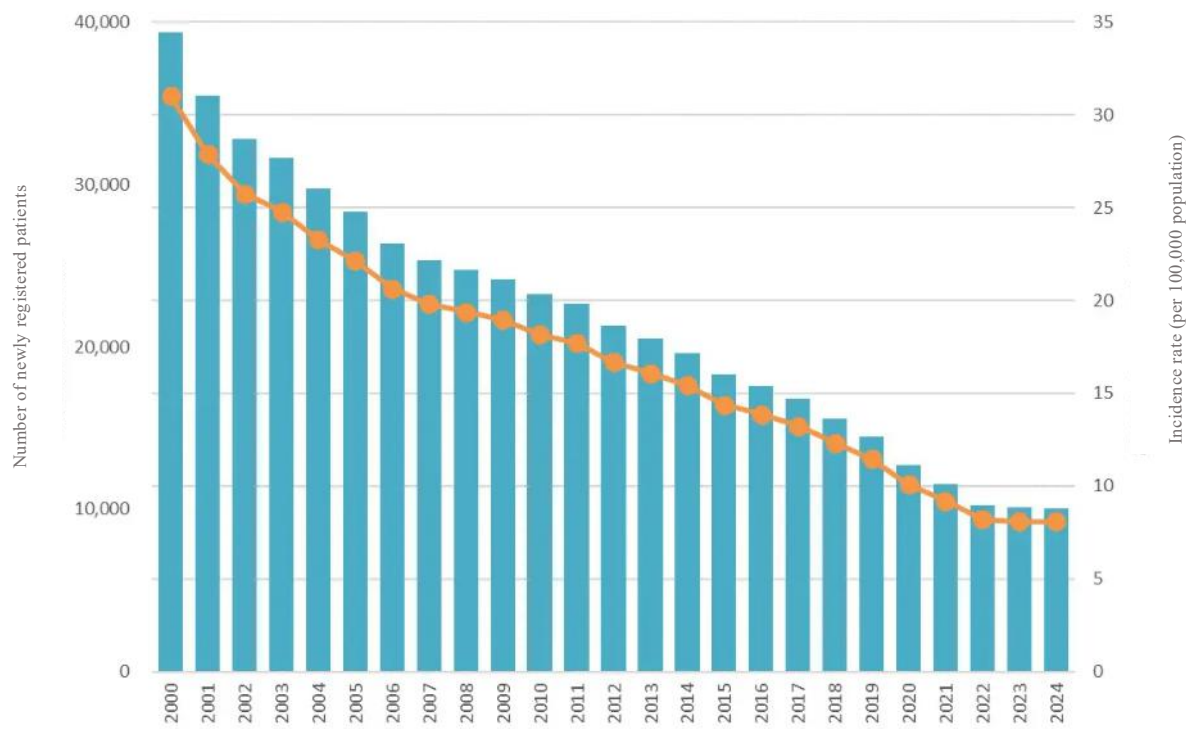


Fig.1-3. 新登録結核患者数と罹患率の推移⁵⁾.

公益社団法人結核予防会結核研究所ホームページより

■ 新規登録患者数、● 罹患率

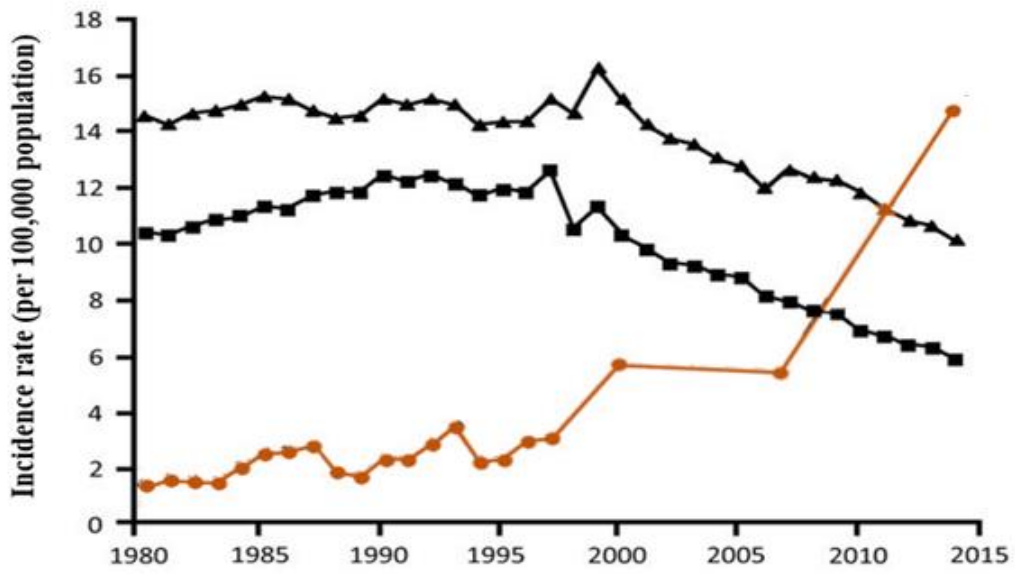


Fig.1-4. 本邦の結核と肺 NTM 症罹患率の推移⁹⁾.

● : 肺 NTM 症、■ : 結核塗抹検査陽性、▲ : 結核培養検査陽性

Namkoog H. et al. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016;22(6): 1116-1117

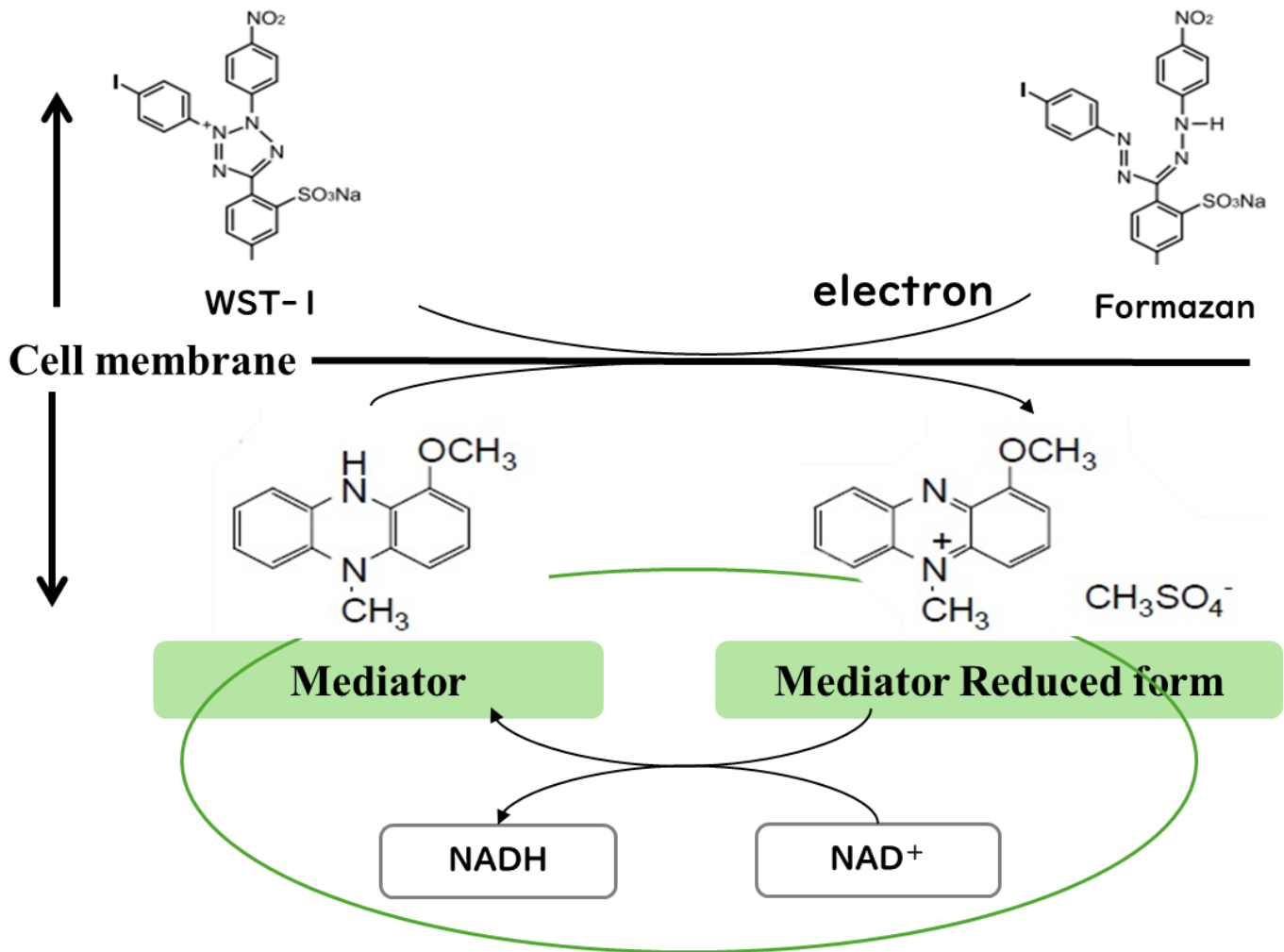


Fig. 1-5. Water-soluble tetrazolium salts WST-1 method.

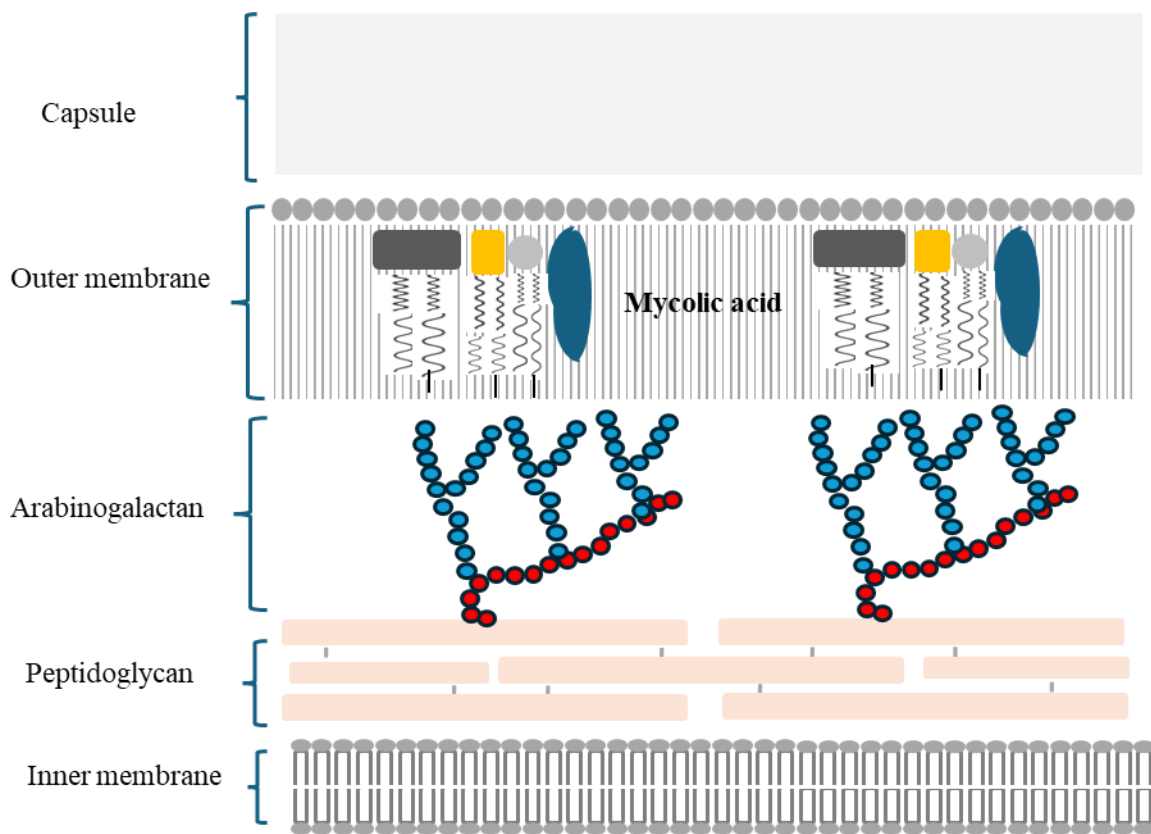






Fig. 1-6. Schematic diagram of the cell wall of Mycobacterium

 Trehalose 6,6'-dimycolate (TDM),
  Protein,
  Trehalose-6-monomycolate (TMM),
  Phthiocerol dimycocerosates (PDIM)

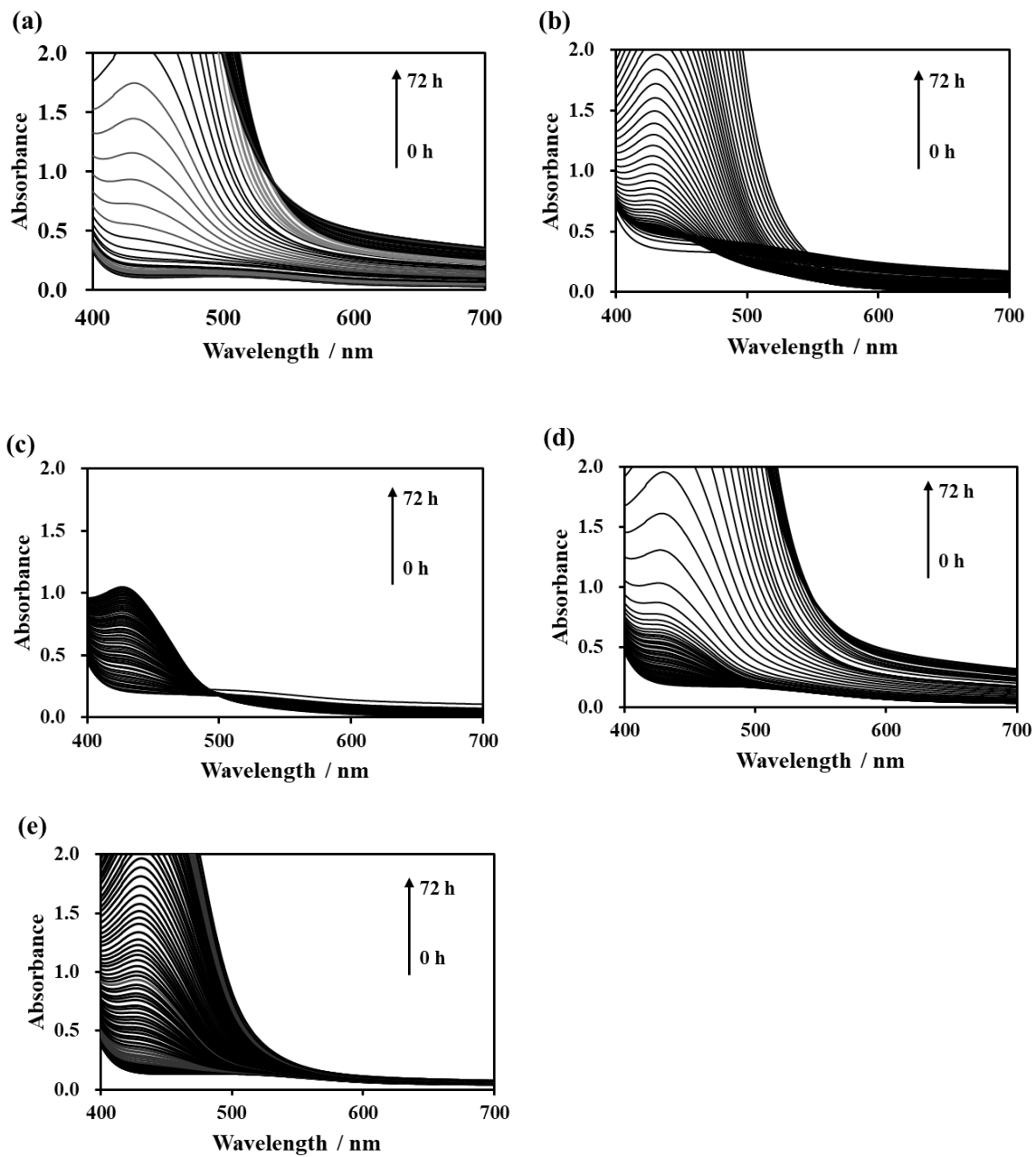


Fig. 2-1. Absorption spectra measured using the WST-1 assay.

Mediator; PMS, Bacterial suspension concentration; McF 0.5, Incubation temperature; 25 °C
 (a) Clinical isolate of *M. kansasii*, (b) Clinical isolate of *M. goodii*, (c) *M. avium* ATCC®19421
 (d) Clinical isolate of *M. intracellulare*, (e) *M. abscessus* ATCC®19977

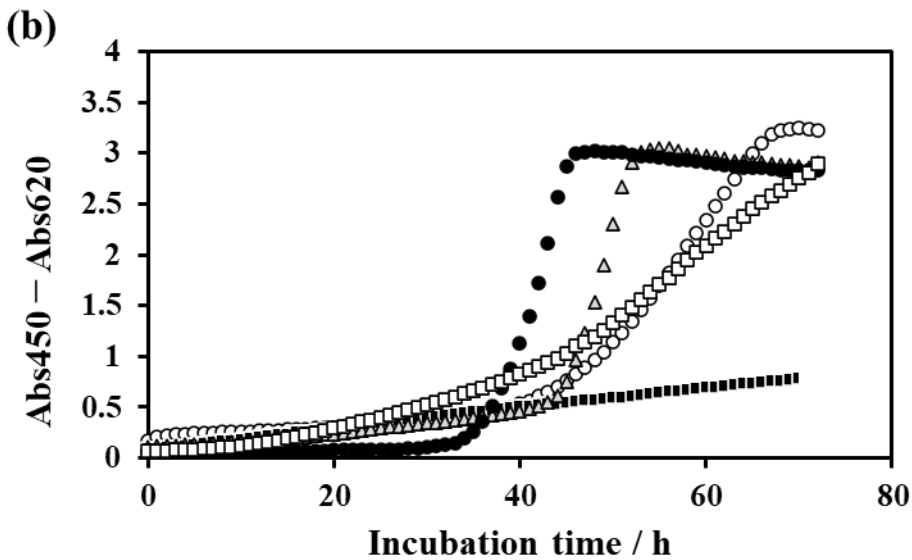
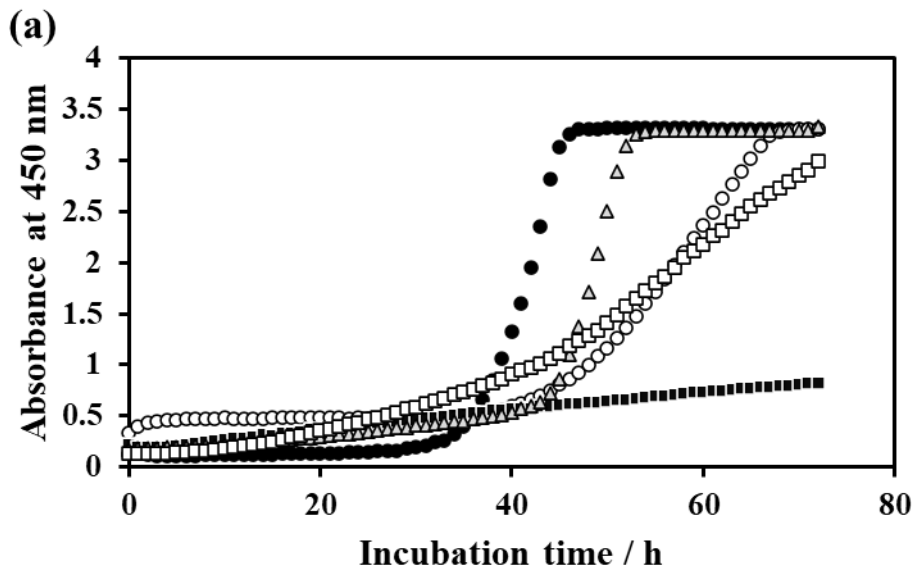


Fig. 2-2. Time-dependent changes in absorbance measured by the WST-1 assay

(a) Absorbance at 450 nm

(b) Subtract the absorbance at 620 nm from the absorbance at 450 nm

Clinical isolate of *M. kansasii* (●)

Clinical isolate of *M. gordonae* (○)

M. avium ATCC®19421 (■)

Clinical isolate of *M. intracellulare* (▲)

M. abscessus ATCC®19977 (□)

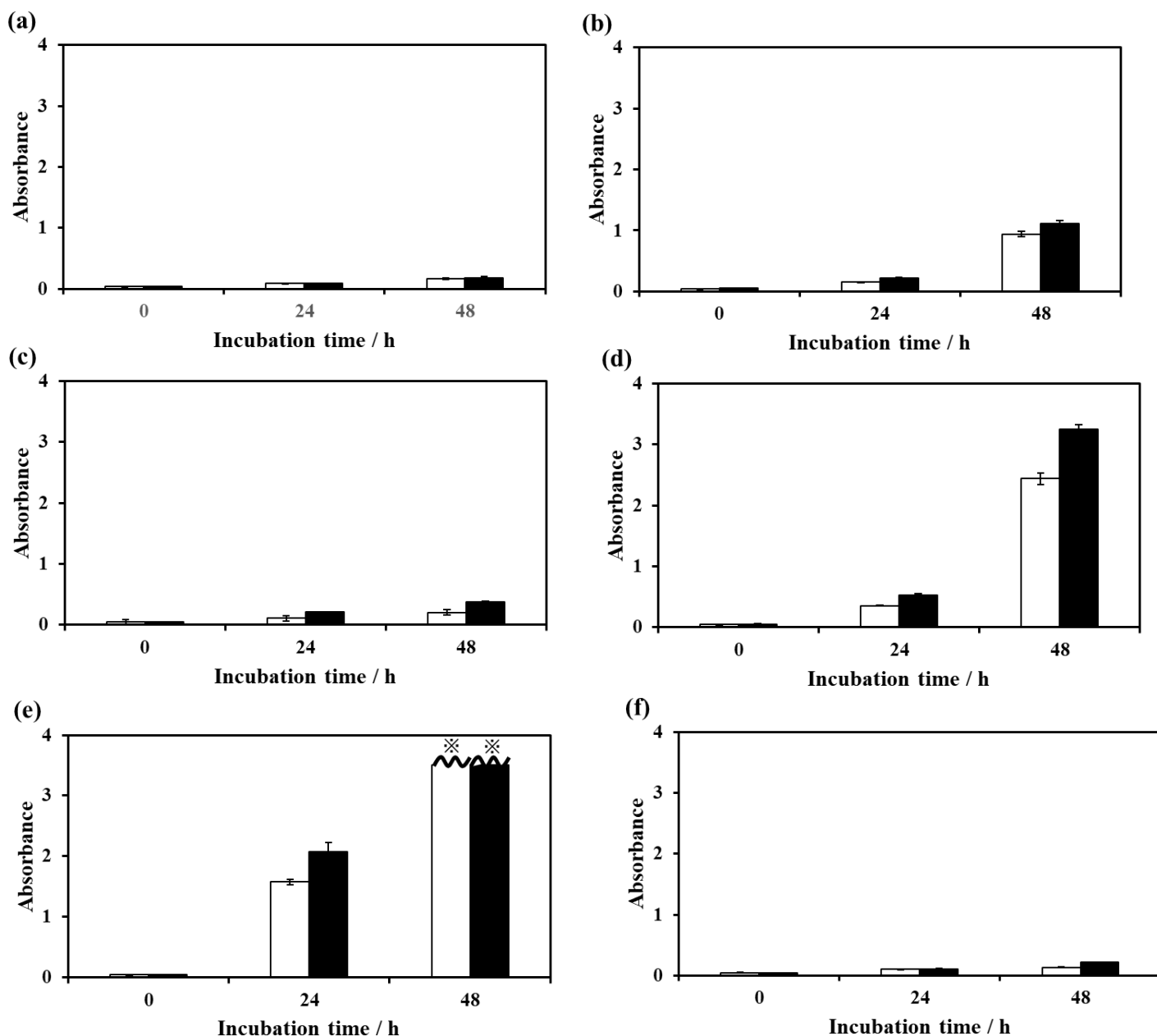


Fig. 2-3. The effect of pre-culture medium on absorbance for WST-1 assay.

Ogawa medium (open bar), Middlebrook 7H10 agar medium (solid bar)

Mediator; PMS, Bacterial suspension concentration; McF 0.5, Incubation temperature; 35 °C

(a) Clinical isolate of *M. kansasii* (n=4~8), (b) Clinical isolate of *M. goodii* (n=8~12),

(c) *M. avium* ATCC®19421 (n=7~8), (d) Clinical isolate of *M. intracellulare* (n=8~12),

(e) *M. abscessus* ATCC®19977 (n=8~12), (f) MTBC (n=4~8)

※: Above the detection limit.

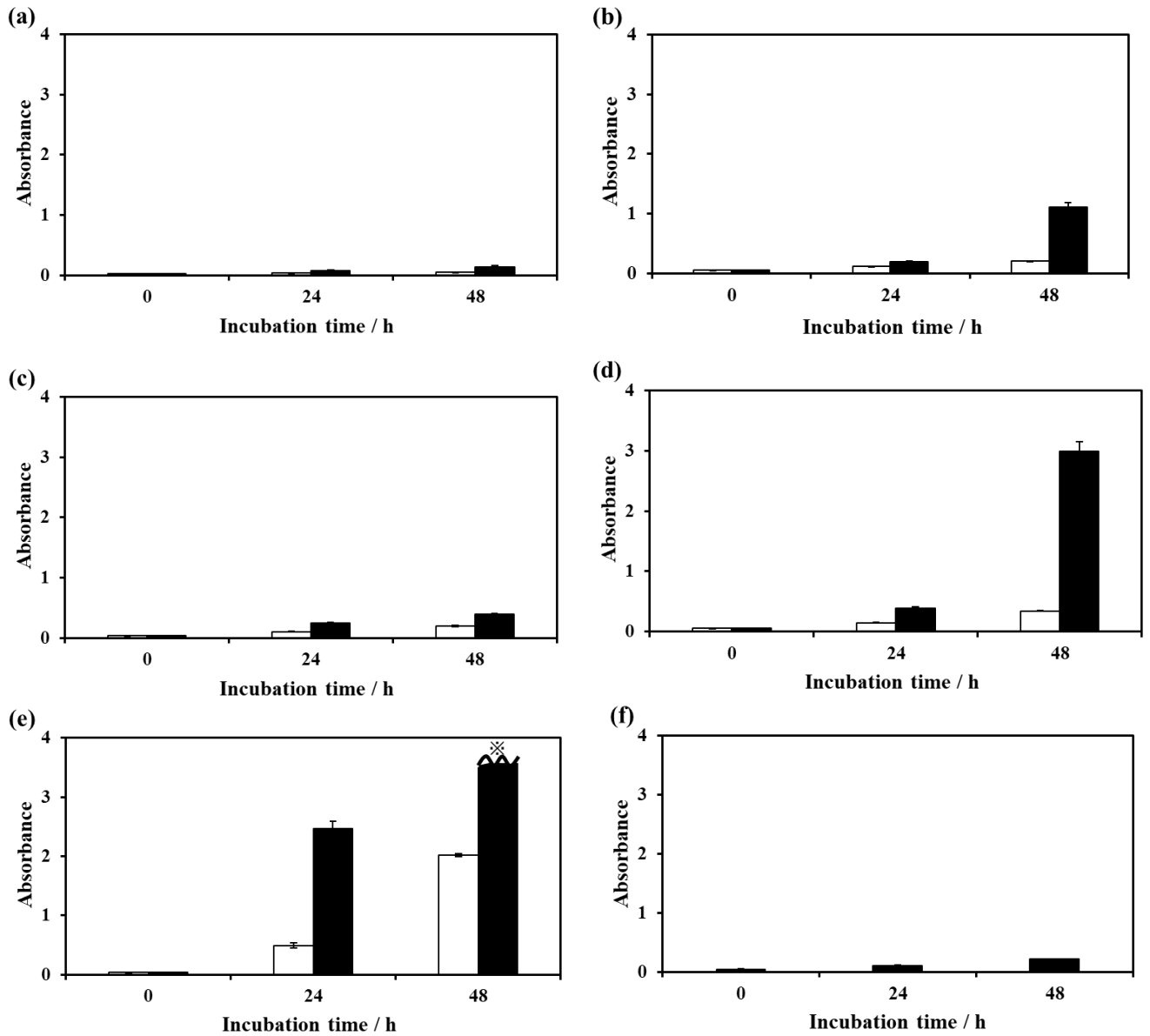


Fig. 2-4. The effect of incubation temperature on absorbance for WST-1 assay.

25 °C (open bar), 35 °C (solid bar)

Mediator; PMS, Bacterial suspension concentration; McF 0.5, Culture medium; Middlebrook 7H10 agar medium

(a) Clinical isolate of *M. kansasii*, (b) Clinical isolate of *M. goodii*,

(c) *M. avium* ATCC®19421, (d) Clinical isolate of *M. intracellulare*,

(e) *M. abscessus* ATCC®19977, (f) MTBC

※: Above the detection limit.

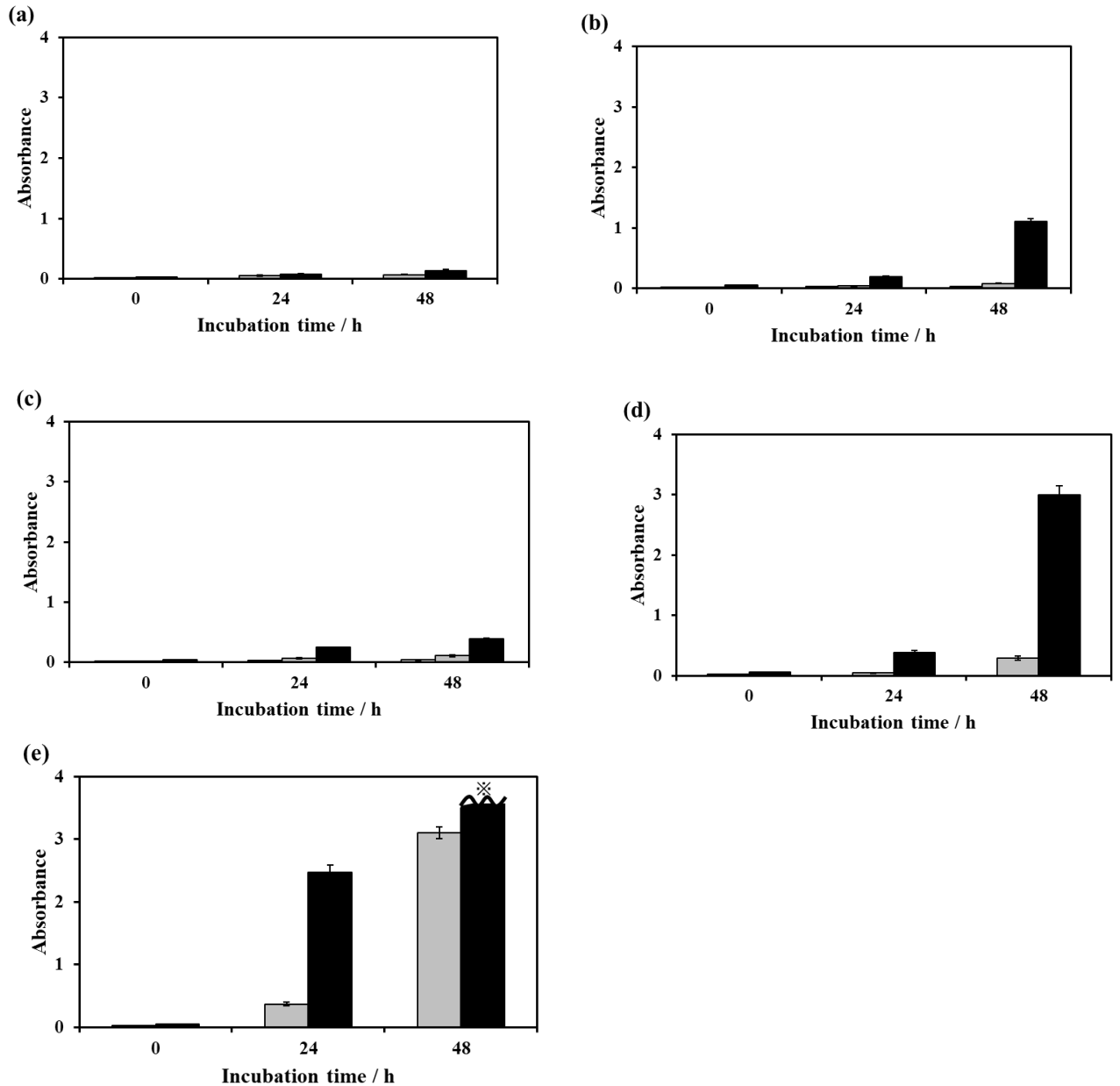


Fig. 2-5. The effect of bacterial concentration on absorbance for WST-1 assay.

McF 0.5 (*ca.* 10^8 CFU/mL; solid bar), 10-fold dilution (*ca.* 10^7 CFU/mL; shaded bar), 100-fold dilution (*ca.* 10^6 CFU/mL; open bar)

Mediator; PMS, Culture medium; Middlebrook 7H10 agar medium, Incubation temperature; 35 °C

(a) Clinical isolate of *M. kansasii*, (b) Clinical isolate of *M. goodnae*,

(c) *M. avium* ATCC®19421, (d) Clinical isolate of *M. intracellulare*,

(e) *M. abscessus* ATCC®19977,

※: Above the detection limit.

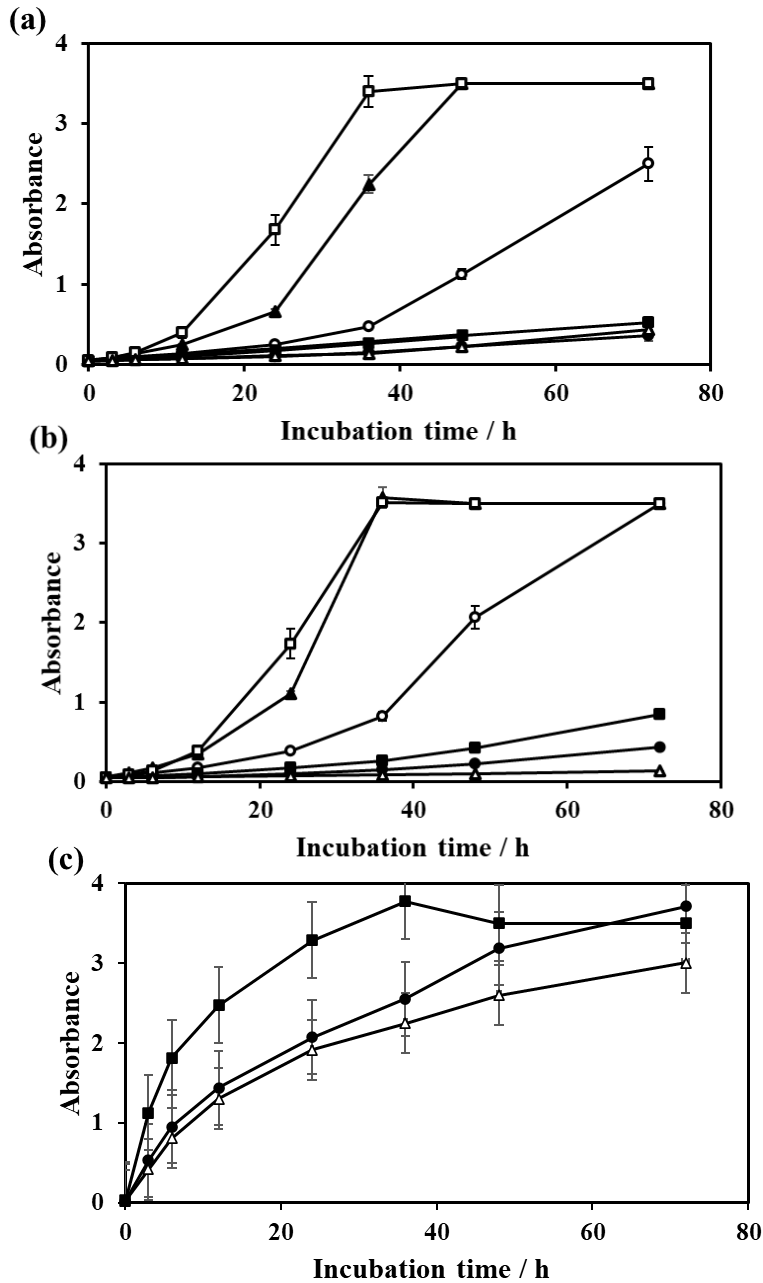


Fig. 2-6. The effect of electron mediators on absorbance for WST-1 assay.

(a) 1-Methoxy PMS n=4~8, (b) 1-Methoxy PES n=4~12, (c) 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-BQ n=4

Bacterial suspension concentration; McF 0.5, Culture medium; Middlebrook 7H10 agar medium, Incubation temperature; 35 °C

Clinical isolate of *M. kansasii* (●), Clinical isolate of *M. gordonae* (○),

M. avium ATCC®19421 (■), Clinical isolate of *M. intracellulare* (▲)

M. abscessus ATCC®19977 (□), MTBC (△)

※: Above the detection limit.

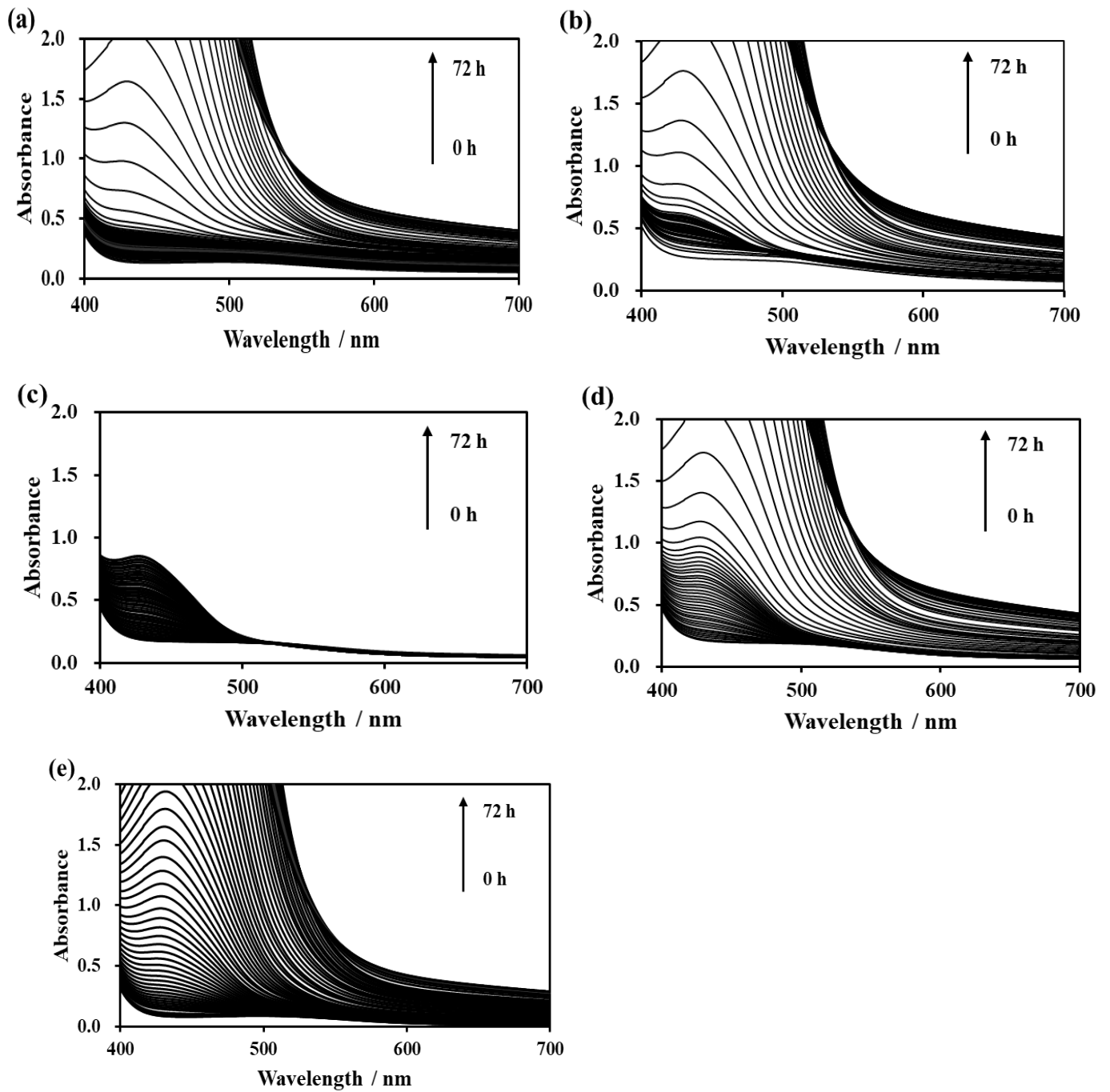


Fig. 3-1. Absorption spectra measured using the WST-1 assay in the presence of trypsin at a final concentration of 20 Units/mL.

Mediator; PMS, Bacterial suspension concentration; McF 0.5, Incubation temperature; 25 °C

(a) Clinical isolate of *M. kansasii*, (b) Clinical isolate of *M goodii*, (c) *M. avium* ATCC®19421

(d) Clinical isolate of *M. intracellulare*, (e) *M. abscessus* ATCC®19977

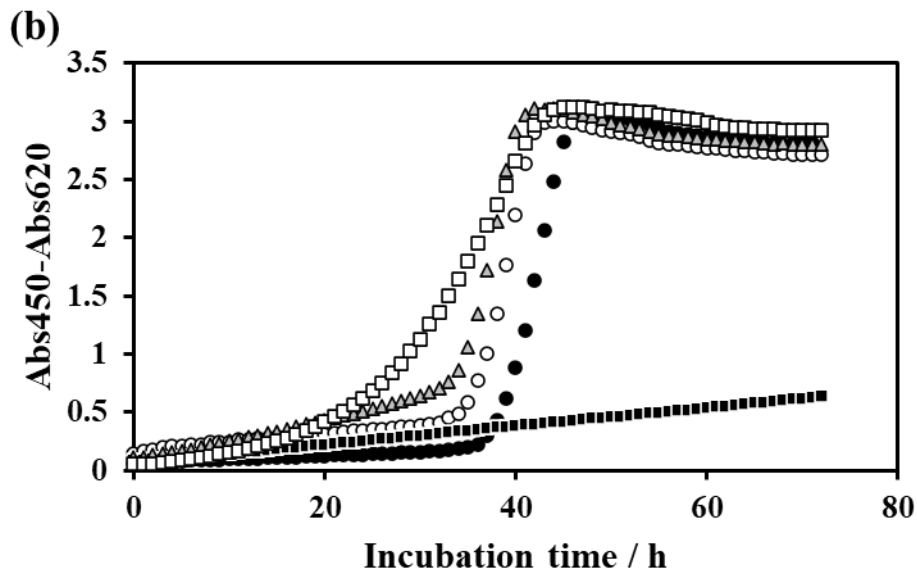
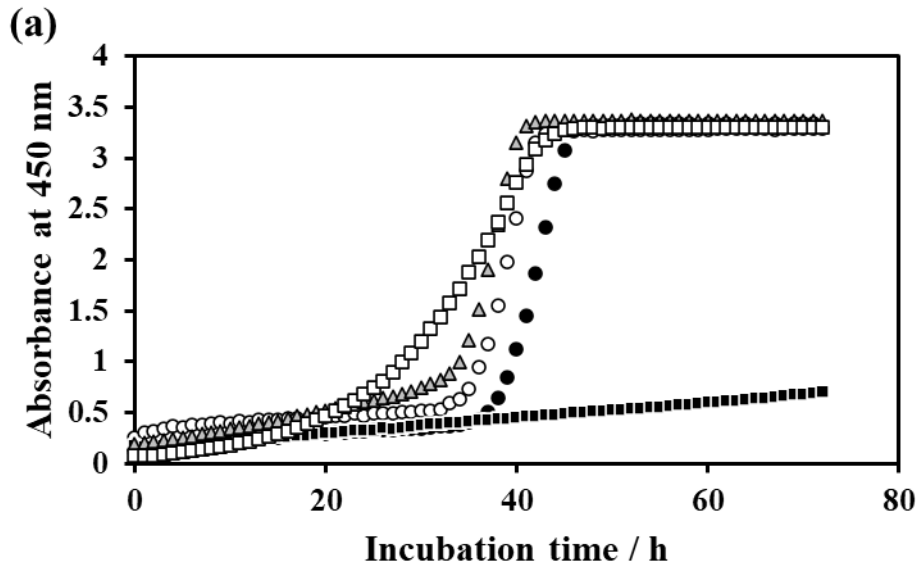


Fig. 3-2. Time-dependent change in absorbance measured by WST-1 assay in the presence of trypsin at a final concentration of 20 Units/mL.

(a) Absorbance at 450 nm

(b) Subtract the absorbance at 620 nm from the absorbance at 450 nm

Clinical isolate of *M. kansasii* (●)

Clinical isolate of *M. gordonae* (○)

M. avium ATCC[®]19421 (■)

Clinical isolate of *M. intracellulare* (▲)

M. abscessus ATCC[®]19977 (□)

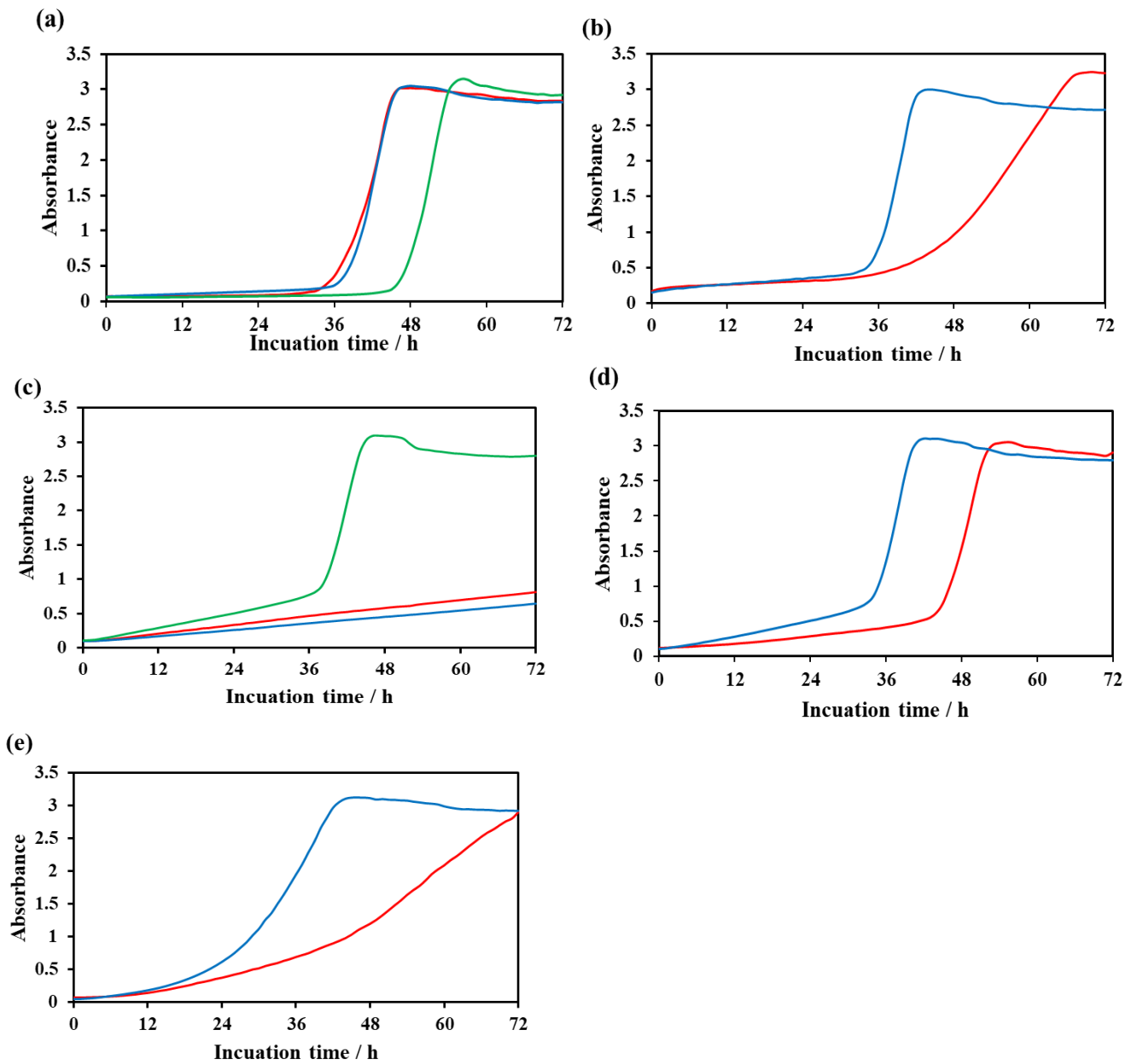


Fig. 3-3. The effect of trypsin addition on absorbance
 Trypsin 0 Units/mL (Red line), Trypsin final concentration 20 Units/mL (Blue line),
 Trypsin final concentration 100 Units/mL (Green line)
 (a) *M. kansasii*, (b) *M. gordonae*, (c) *M. avium* ATCC®19421,
 (d) *M. intracellulare*, (e) *M. abscessus* ATCC®19977

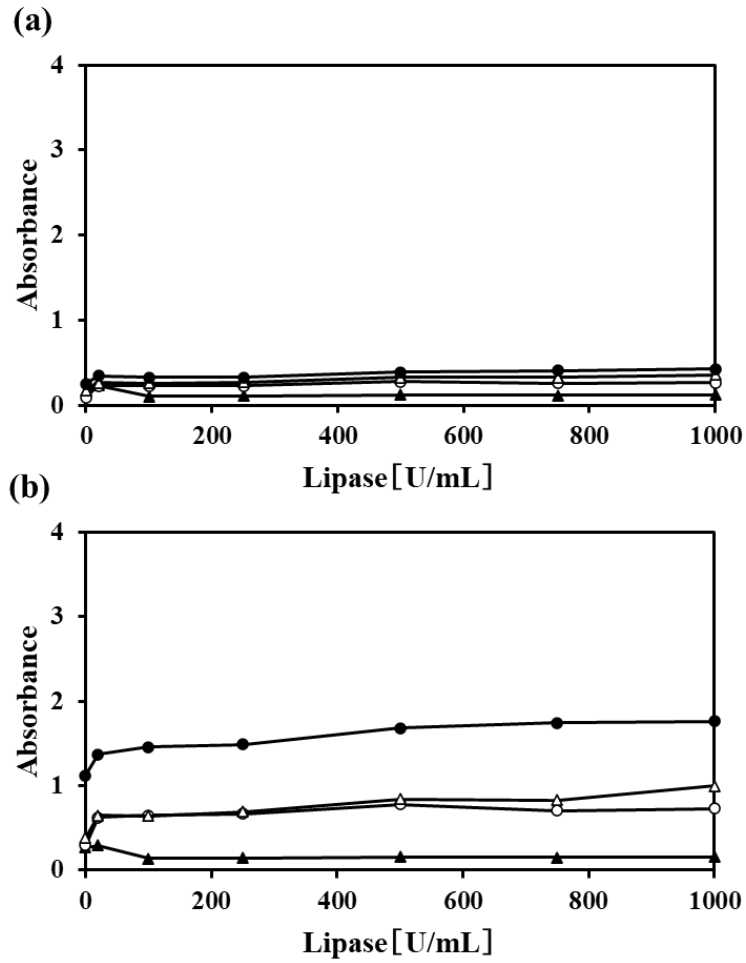


Fig. 3-4. The effect of Lipase solution concentration on absorbance at 450 nm

(a) Incubation time at 24 hours, (b) Incubation time at 48 hours

M. kansasii ATCC®12478 (○), Clinical isolate of *M. gordonae* (●),

M. avium ATCC®19421 (△), MTBC (▲)

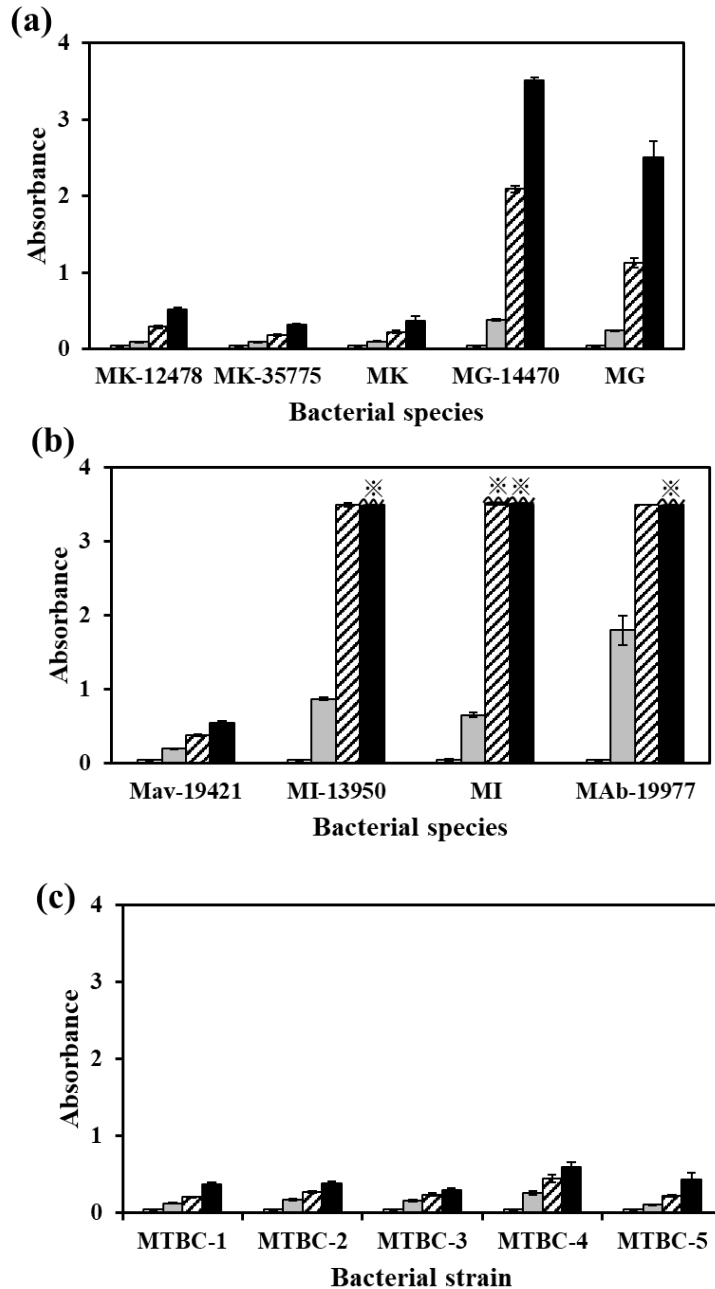


Fig. 3-5. Time-dependent changes in absorbance of mycobacteria using the WST-1 assay
 Incubation 0 hour (open bar), 24 hours (shaded bar), 48 hours (hatched bar), 72 hours (solid bar)
 (a) MK-12478(*M. kansasii* ATCC®12478) n=16, MK-35775(*M. kansasii* ATCC®35775) n=16, MK
 (Clinical isolate of *M. kansasii*) n=16, MG-14470 (*M. goodii* ATCC®14470) n=24, MG (Clinical
 isolate of *M. goodii*) n=12
 (b) Mav-19421 (*M. avium* ATCC®19421) n=16, MI-13950 (*M. intracellulare* ATCC®13950) n=24,
 MI (Clinical isolate of *M. intracellulare*) n=16, MAb-19977 (*M. abscessus* ATCC®19977 n=16
 (c) MTBC - 1~5 (5 strains of *M. tuberculosis* complex) MTBC-1~4 n=24, MTBC-5 n=8
 ※: Above the detection limit.

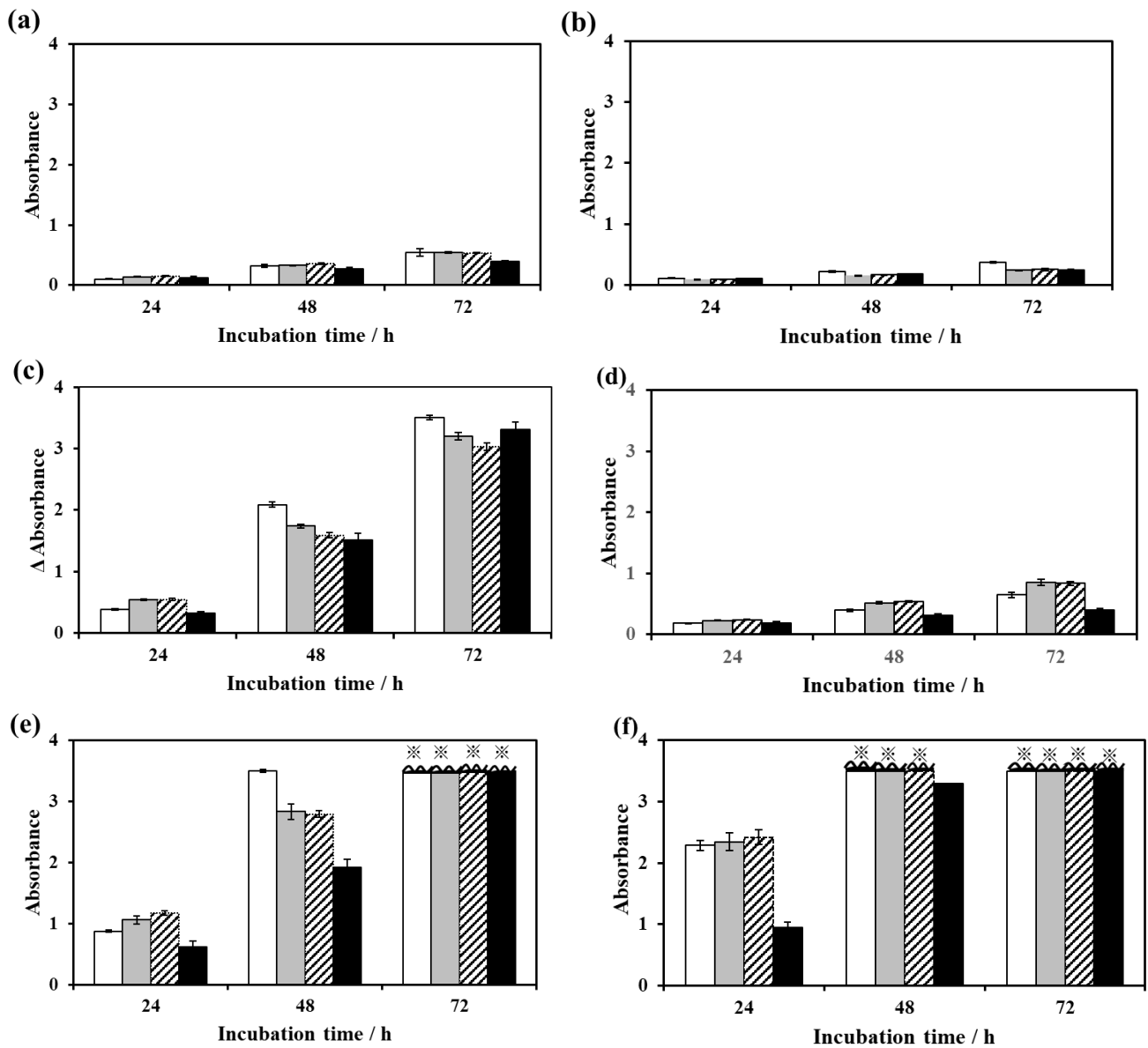


Fig. 3-6. The effect of enzymes on absorbance (NTM strain of ATCC)

Trypsin 0 Units/mL (Open bar), Trypsin final concentration 15 Units/mL (Shaded bar),

Trypsin final concentration 80 Units/mL (Hatched bar), Lipase final concentration 100 Units/mL (Solid bar)

(a) *M. kansasii* ATCC®12478 n=16, (b) *M. kansasii* ATCC®35775 n=16, (c) *M. goodnae* ATCC®14470 n=20,

(d) *M. avium* ATCC®19421 n=12, (e) *M. intracellulare* ATCC®13950 n=24, (f) *M. abscessus* ATCC®19997 n=12

※ : Above the detection limit.

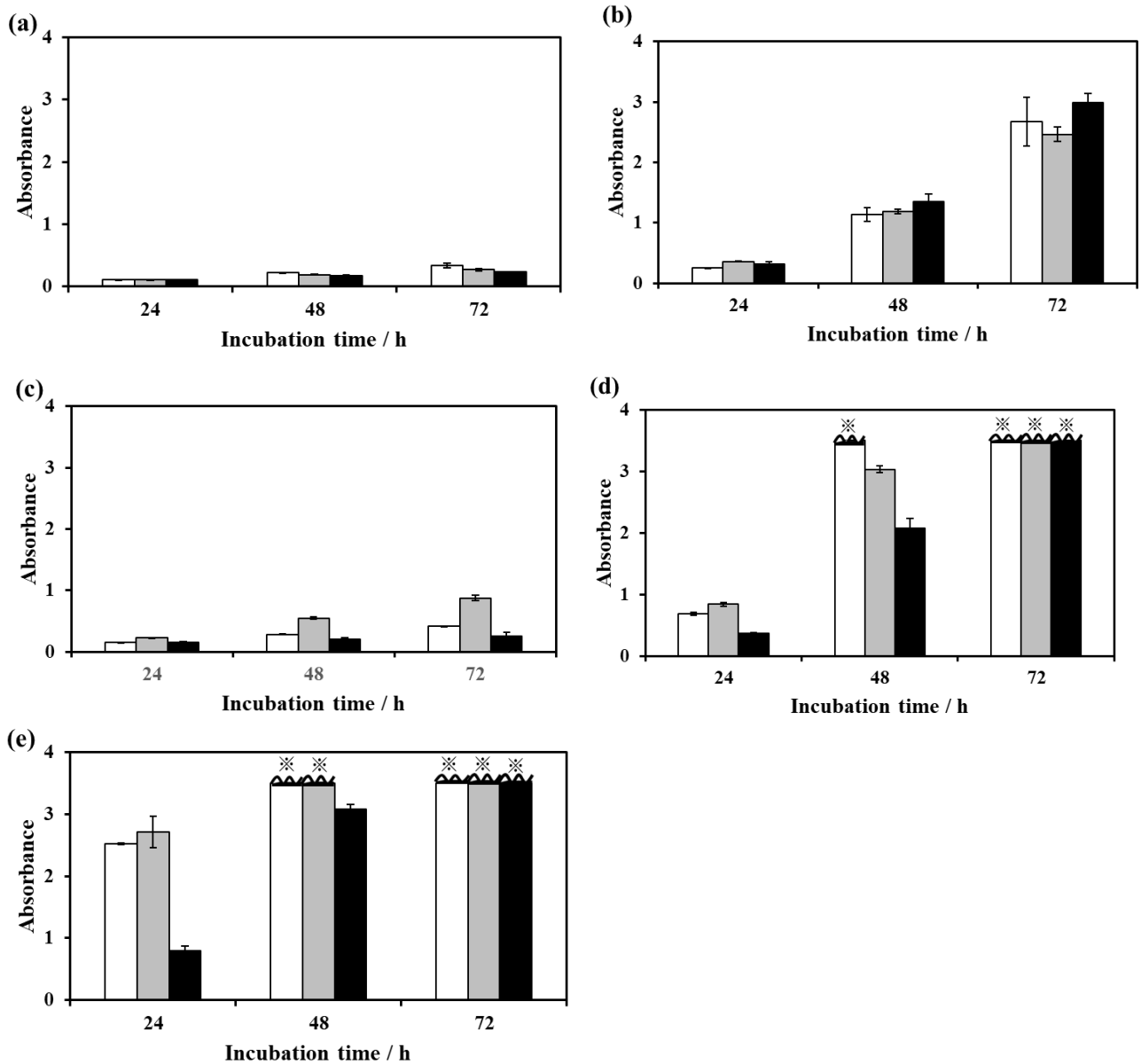


Fig. 3-7. The effect of enzymes on absorbance (Clinical isolates of NTM)
 Trypsin 0 Units/mL (Open bar), Trypsin final concentration 15 Units/mL (Shaded bar),
 Lipase final concentration 100 Units/mL (Solid bar)
 (a) Clinical isolate of *M. kansasii* n=8~1, (b) Clinical isolate of *M. goodii* n=8~12,
 (c) Clinical isolate of *M. avium* n=8, (d) Clinical isolate of *M. intracellulare* n=12,
 (e) Clinical isolate of *M. abscessus* n=8~12
 ※ : Above the detection limit

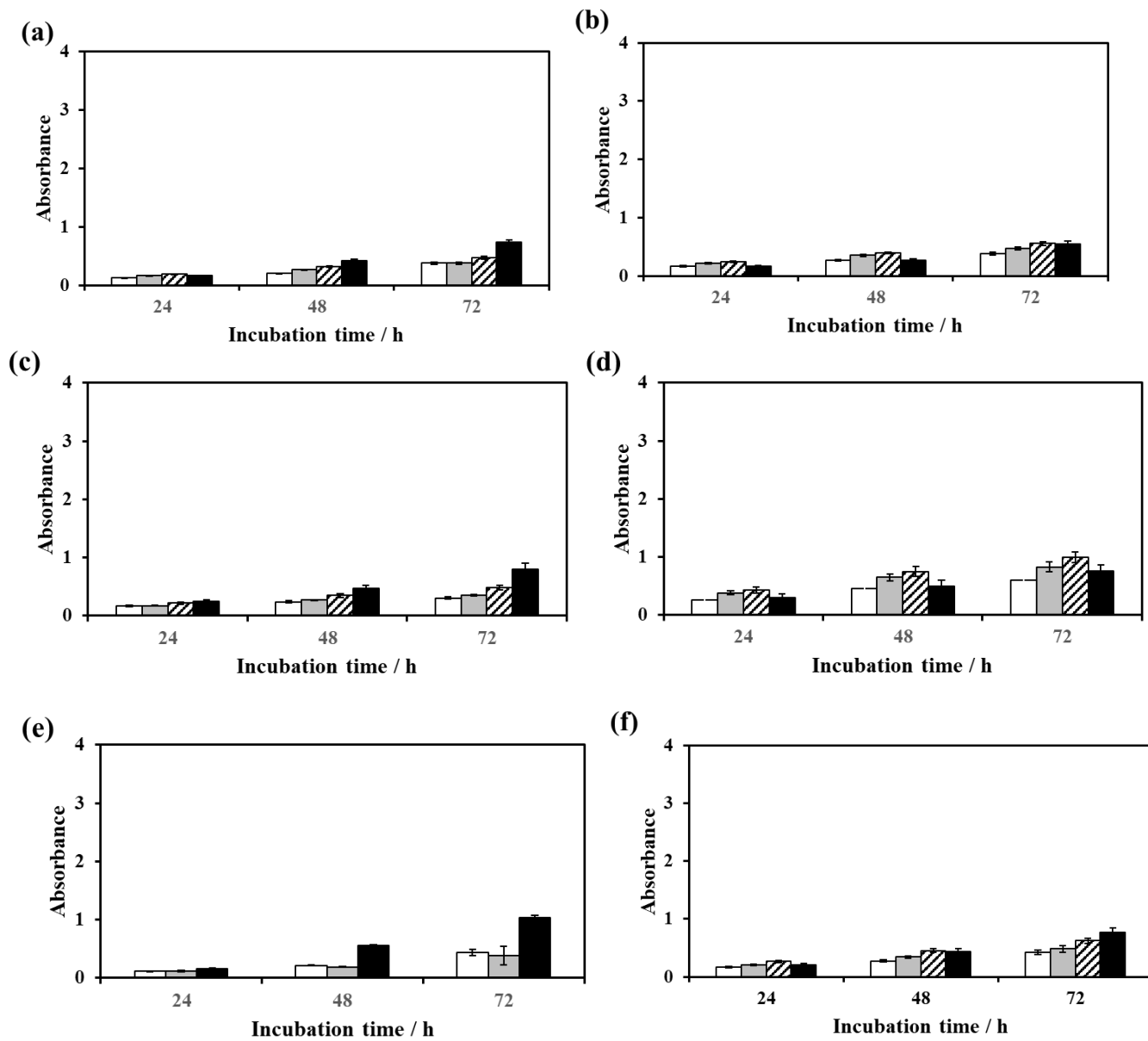


Fig. 3-8. The effect of enzymes on absorbance (MTBC)

Trypsin 0 Units/mL (Open bar), Trypsin final concentration 15 Units/mL (Shaded bar),

Trypsin final concentration 80 Units/mL (Hatched bar),

Lipase final concentration 100 Units/mL (Solid bar)

(a) MTBC-1 n=24, (b) MTBC-2 n=24, (c) MTBC-3 n=24, (d) MTBC-4 n=24, (e) MTBC-5 n=8,

(f) Average value of 5 strains of MTBC n=8~24

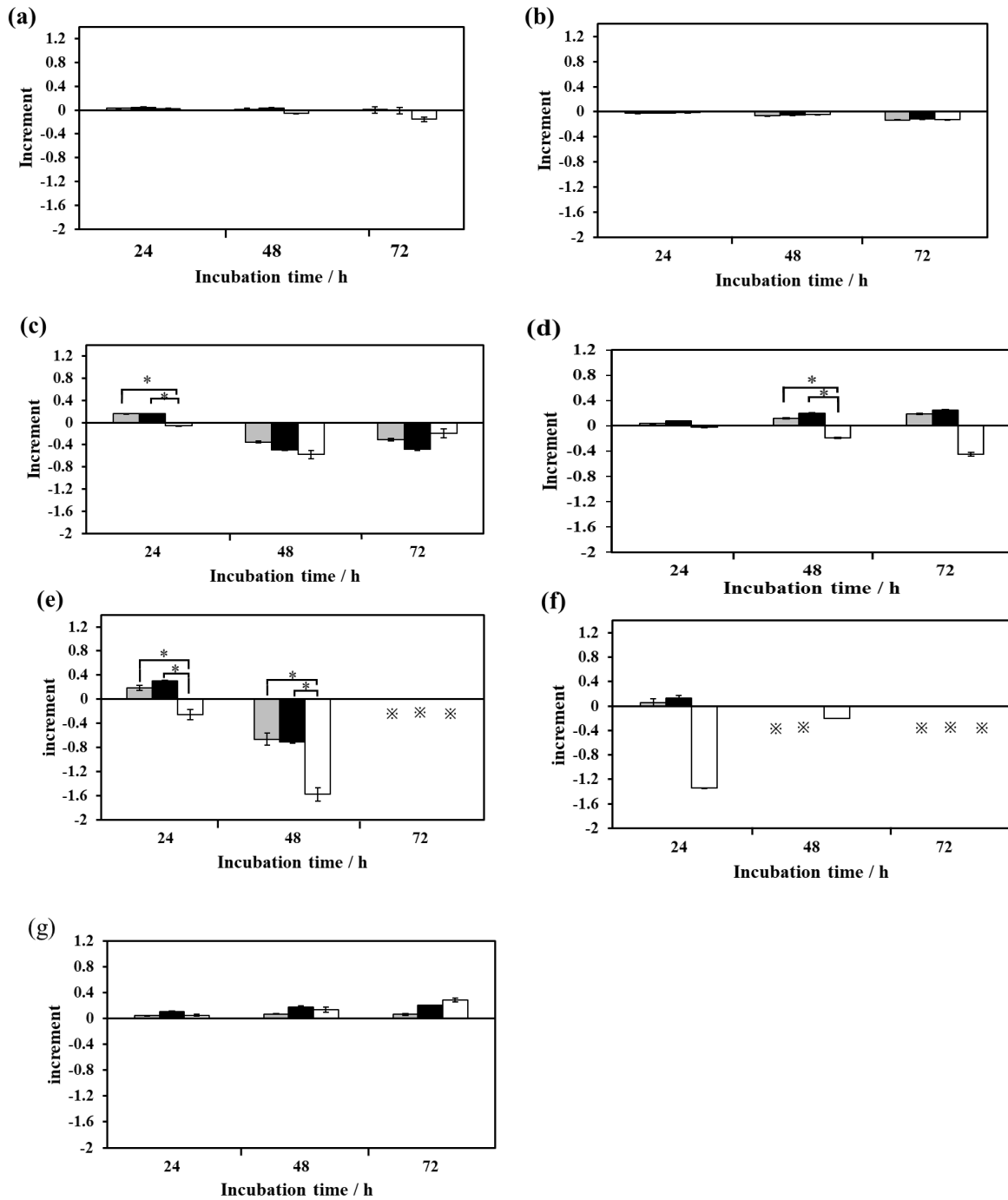


Fig. 3-9. The increment on absorbance

Calculated by subtracting the absorbance without additives from the absorbance with additives, was plotted over time.

Trypsin final concentration 15 Units/mL (Shaded bar), Trypsin final concentration 80 Units/mL (Solid bar), Lipase final concentration 100 Units/mL (Open bar)

(a) *M. kansasii* ATCC12478, (b) *M. kansasii* ATCC35775, (c) *M. goodii* ATCC14470, (d) *M. avium* ATCC19421, (e) *M. intracellulare* ATCC13950, (f) *M. abscessus* ATCC19997, (g) Average value of 5 strains of MTBC.

*: $p \leq 0.05$, ※: The detected absorbance exceeded the upper limit.

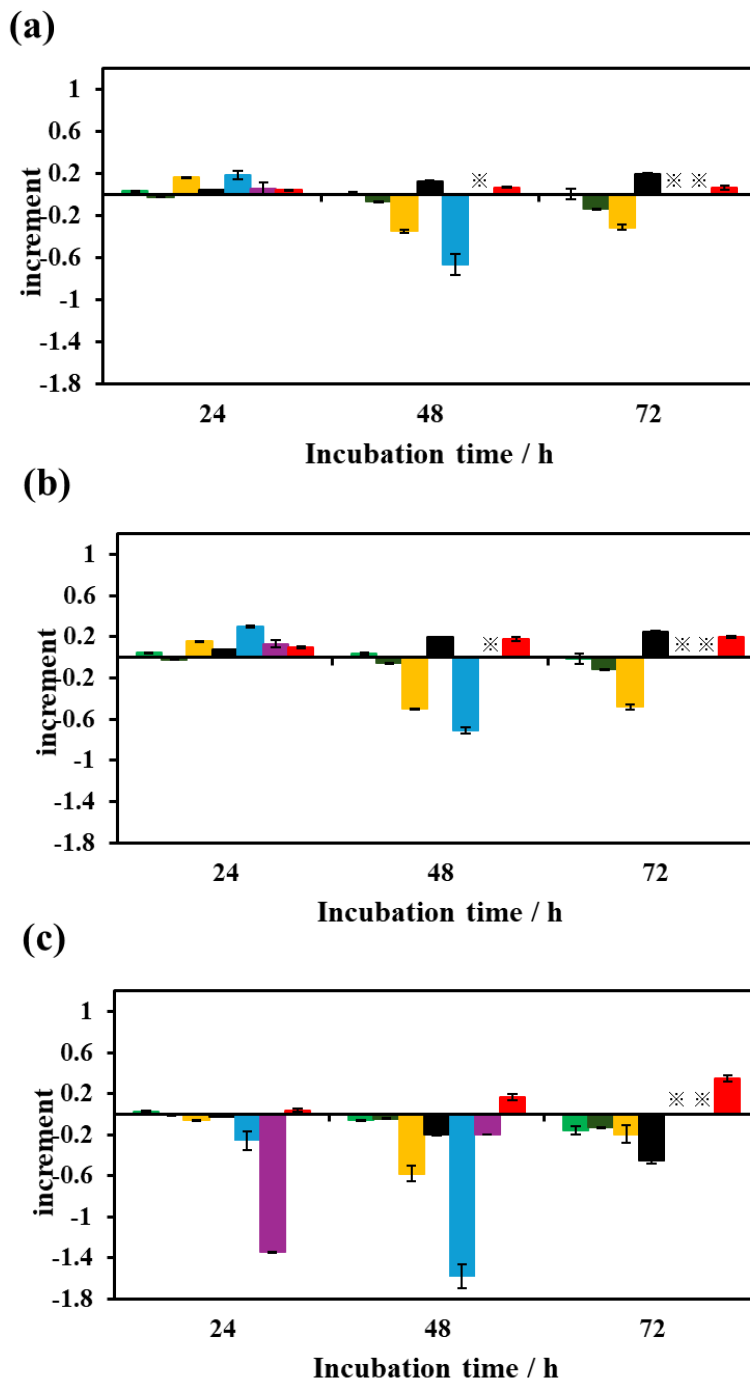


Fig. 3-10. The increment on absorbance (NTM strain of ATCC and MTBC)

The values obtained by subtracting the absorbance without additives from the absorbance with additives were plotted for each culture time point.

Absorbance values of 3.5 or higher were recorded as 3.5.

(a) Trypsin final concentration 15 Units/mL, (b) Trypsin final concentration 80 Units/mL,

(c) Lipase final concentration 100 Units/mL

■ *M. kansasii* ATCC®12478, ■ *M. kansasii* ATCC®35775, ■ *M. gordonae* ATCC®14470,
 ■ *M. avium* ATCC®19421, ■ *M. intracellulare* ATCC®13950 ■ *M. abscessus* ATCC®19997
 ■ MTBC

※ : The detected absorbance exceeded the upper limit.

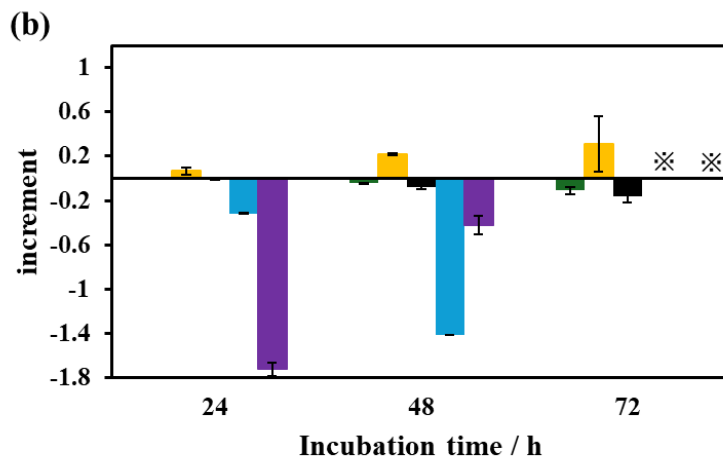
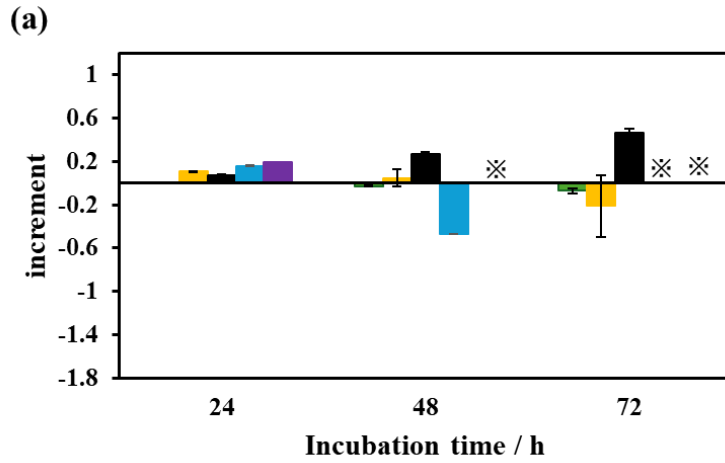


Fig3-11. The increment on absorbance (Clinical isolates)

The values obtained by subtracting the absorbance without additives from the absorbance with additives were plotted for each culture time point.

Absorbance values of 3.5 or higher were recorded as 3.5.

(a) Trypsin final concentration 15 Units/mL, (b) Lipase final concentration 100 Units/mL

■ Clinical isolate of *M. kansasii*, ■ Clinical isolate of *M. gordonae*,
 ■ Clinical isolate of *M. avium*, ■ Clinical isolate of *M. intracellulare*,
 ■ Clinical isolate of *M. abscessus*

※ : The detected absorbance exceeded the upper limit.

Table

Table 1. 米国 CDC による抗酸菌の検査所要推奨時間¹⁴⁾

項目	推奨時間
塗抹検査結果の報告	24 時間
結核菌群の培養同定結果の報告	21 日
薬剤感受性試験結果の報告	30 日
検査結果が得られてから依頼者への報告	1 日
核酸増幅法検査の検体受領から報告まで	48 時間

MMWR Recommendations and Reports 2005 54(RR06) 1-12 より改変

Table 2. Runyon 分類

群別	分類	菌名	
遅発育菌	結核菌群	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. microti</i>
			<i>M. africanum</i>
			<i>M. bovis</i>
	I 群	<i>M. kansasii</i>	<i>M. simiae</i>
	光発色菌	<i>M. marinum</i>	<i>M. asiaticum</i>
	II 群	<i>M. xenopi</i>	<i>M. gordonae</i>
	暗発色菌	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. szulgai</i>
		<i>M. ulcerans</i>	
	III 群	<i>M. avium</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
	非光発色菌	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. shimoidei</i>
<i>M. malmoense</i>		<i>M. terrae</i>	
迅速発育菌	IV 群	<i>M. abscessus</i>	<i>M. goodii</i>
		<i>M. fortuitum</i>	<i>M. smegmatis</i>
		<i>M. chelonae</i>	

抗酸菌検査ガイド 2025 より改変²²⁾

Table3-1. The incubation time at which the increase in absorbance reaches 0.05 or more.

菌種	Trypsin 濃度 Units/mL	培養時間
<i>M. kansasii</i>	0	35 h
	20	36 h
	100	48 h
<i>M. gordonae</i>	0	44 h
	20	32 h
<i>M. avium</i> ATCC® 19421	0	-
	20	-
	100	36 h
<i>M. intracellulare</i>	0	43 h
	20	32 h
<i>M. abscessus</i> ATCC® 19977	0	45 h
	20	21 h

Subtract the absorbance at 450 nm from the absorbance spectra measured every hour and determine the culture time at which it reaches 0.05 or higher.

Table3-2. The effect of additives on absorbance

Bacteria	Trypsin 15 Units/mL			Trypsin 80 Units/mL			Lipase 100 Units/mL		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>M. kansasii</i> ATCC12478	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>M. kansasii</i> ATCC35775	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>M. goodii</i> ATCC14470	up	down	down	up	down	down	down	down	down
<i>M. avium</i> ATCC19421	—	—	up	—	up	up	—	down	down
<i>M. intracellulare</i> ATCC13950	up	down	※	up	down	※	down	down	※
<i>M. abscessus</i> ATCC19997	—	※	※	up	※	※	down	down	※
MTBC es※	—	—	—	—	up	up	—	up	up

Subtract the absorbance without additives from the absorbance with additives.

0.12 or higher: up, below -0.06: down, -0.06~0.12: —

up: Increment of absorbance, down: Decrement of absorbance, -: all must the same

※: Unable to calculate

*: Average of 5 clinical isolates

Trypsin and Lipase: final concentration

Table3-3. The ratios of absorbance with additives to those without additives

Bacteria	Ratio								
	Trypsin 15Units/mL			Trypsin 80Units/mL			Lipase 100Units/mL		
	0-24h	24-48h	48-72h	0-24h	24-48h	48-72h	0-24h	24-48h	48-72h
<i>M. kansasii</i> ATCC12478	1.62	0.88	0.96	1.82	0.93	0.80	1.43	0.63	0.56
<i>M. kansasii</i> ATCC35775	0.77	0.59	0.55	0.82	0.66	0.58	0.88	0.70	0.45
<i>M. goodii</i> ATCC14470	1.48	0.70	1.03	1.49	0.61	1.01	0.82	0.70	1.27
<i>M. avium</i> ATCC19421	1.33	1.38	1.32	1.42	1.41	1.17	1.06	0.57	0.37
<i>M. intracellulare</i> ATCC13950	1.23	0.68	※	1.36	0.62	※	0.69	0.50	※
<i>M. abscessus</i> ATCC19997	1.03	0.96	※	1.06	0.89	※	0.40	1.94	※
MTBC es *	1.00	1.29	1.00	2.08	1.80	1.19	1.69	2.24	2.27

es*: Average of 5 clinical isolates

※: The absorbance exceeds the upper limit.

Trypsin, Lipase: final concentration

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Increase in absorbance per 24 hours in the presence of added enzyme}}{\text{Increase in absorbance per 24 hours in the absence of added enzyme}}$$

Abstract

A Study of Rapid Differentiation of Mycobacterium tuberculosis Complex and Nontuberculous Mycobacteria Using the WST-1 Assay with Enzymatic Treatment

Akiko Iwama

Division of Infection Prevention and Control, Department of Healthcare, Postgraduate School of Healthcare, Postgraduate school, Tokyo Healthcare University

BACKGROUND. Tuberculosis is an infection caused by the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), requiring airborne precautions, droplet precautions, and contact precautions. On the other hand, non-tuberculous mycobacterial disease is an infection caused by non-tuberculosis mycobacteria (NTM) and is subject to standard precautions. Standard acid-fast bacilli testing includes smear examination, culture examination, identification method, susceptibility testing, and nucleic acid amplification test. Tuberculosis patients who are shedding bacteria require hospitalization. Discharge requires proof of no MTBC shedding through a smear test and a culture test involving 6 to 8 weeks of incubation. There have been reports of prolonged hospital stays in patients undergoing tuberculosis treatment who tested smear-positive for NTM. This is to await culture examination results, and a rapid method for differentiating MTBC from NTM is required to enable early adjustment of infection control measures based on the causative organism and to prevent prolonged hospital stays. We devised the idea of using the water-soluble tetrazolium (WST) assay, which has recently gained attention as a simple and rapid method for evaluating bacterial survival and proliferation, for the identification of acid-fast bacteria. The WST assay is a colorimetric method that quantifies the amount of water-soluble yellow formazan produced when water-soluble tetrazolium salts (WST-1) are cultured with living cells in the presence of an electron mediator. This formazan is generated as WST-1 is reduced by intracellular enzymes via the electron mediator. The lipid-rich cell wall of acid-fast bacteria acts as barriers to the entry of antimicrobial agents and other substances into the cell. Therefore, we hypothesized that partially damaging the cell wall would affect the absorbance measured by the WST assay. In this study, the WST-1 assay was adopted as the tetrazolium salt method for the WST assay. Since the composition of the cell wall differs among acid-fast bacteria species, the addition of trypsin or lipase is expected to induce differences in absorbance changes depending on the bacterial species. This is considered to enable differentiation MTBC from NTM, and further differentiation among NTM species.

OBJECTIVE. The objective of this study is to establish a rapid test method for acid-fast bacilli using the WST-1 assay combined with trypsin or lipase.

METHODS. The test strains included clinical isolates of *M. kansasii*, *M. goodii*, and *M. intracellulare* as NTM, along with *M. kansasii* ATCC®12478 and 35775, *M. goodii* ATCC®14470, *M. avium* ATCC®19421, *M. intracellulare* ATCC®13950, and *M. abscessus* ATCC®19977 were used, while MTBC was represented using clinical isolates.

The detection reagent was prepared by mixing 11.1 mM WST-1 solution and 8.0 mM electron mediator solution at a 9:1 (v/v) ratio. After mixing 400 μ L of bacterial suspension with 400

μL of trypsin or lipase stock solution, 160 μL of detection reagent was added. Each well of a 96-well microplate was dispensed with 200 μL of the mixture and sealed. The plate was incubated at 35°C, and the absorbance at 450 nm was measured over time with a reference wavelength of 620 nm.

RESULTS. For the WST-1 assay against acid-fast bacteria, an observation wavelength of 450 nm can be used, and Middlebrook 7H10 agar medium was suitable for pre-culturing the strains. The bacterial suspension to be tested was appropriately prepared by pre-culturing the developed strains at 35 °C and then adjusting the concentration to McF 0.5 using Middlebrook 7H9 Broth. The PMS was suitable as an electron mediator, and 35 °C was found to be more appropriate than room temperature for culturing during testing. In WST-1 assays, acid-fast bacilli whose cell walls were damaged by enzyme addition during culturing exhibited increased absorbance. This was inferred to result from enhanced transmission of intracellular metabolic activity to the extracellular WST-1 reagent, leading to increased formazan production.

Differentiation between MTBC and NTM can be achieved by combining the following factors: differences in incubation time required for absorbance increase upon enzyme addition, absorbance values, results from lipase co-incubation at 48 and 72 hours of incubation, the magnitude of absorbance change upon enzyme addition, or the ratio of absorbance increase per 24 hours with and without lipase addition. Furthermore, the behavior of absorbance increases or decreases at a final lipase concentration of 100 Units/mL suggested that MTBC, *M. kansasii*, and *M. avium* could be distinguished from other NTMs at 24 hours of culture, and that *M. kansasii* and *M. avium* could potentially be distinguished at 48 hours of culture.

Although caution is required when applying this method to differentiate *M. gordonae* based on the change in absorbance with enzyme addition, it was suggested that differentiation between NTM species, specifically *M. abscessus*, *M. intracellulare*, and *M. avium*, is possible.

CONCLUSIONS. The WST-1 assay supplemented with trypsin or lipase demonstrated the potential to differentiate MTBC from NTM by inducing partial structural changes in the acid-fast bacilli cell wall. These changes alter the permeability of the electron mediator and the reduction reaction, thereby affecting assay outcomes. The test duration was significantly reduced to 48 to 72 hours, compared to the conventional culture-based testing requiring 6 to 8 weeks.