

●原 著

リアルタイム PCR を用いた抗酸菌群検査キット (コバス TaqMan[®]) の精度評価米丸 亮¹⁾ 堀場 昌英¹⁾ 多田 敦彦²⁾ 永井 崇之³⁾

要旨：抗酸菌群の迅速診断を目的として、リアルタイム PCR を用いた DNA 検出法(コバス TaqMan[®] MTB, コバス TaqMan[®] MAI) が開発された。TaqMan は DNA 増幅と検出を同時に行うので、検査時間が大幅に短縮される。本研究では TaqMan とコバスアンプリコア[®]法の診断精度を比較検討した。塗抹陽性検体では *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* で TaqMan とアンプリコアの結果は 100% 一致した。塗抹陰性検体を加えても一致率は、それぞれ 99.1%, 99.0%, 99.7% と良好であった。アンプリコア陽性/TaqMan 陰性の 5 検体中 3 検体は培養陽性、アンプリコア陰性/TaqMan 陽性の 12 検体中 10 検体は培養陽性であった。アンプリコアで PCR 不応の 21 検体中 12 検体では TaqMan の結果が得られ、培養結果と一致していた。これらより TaqMan はアンプリコアと同等以上の性能を有し、迅速診断法として抗酸菌群 DNA 検出に有用性が高いことが示唆された。

キーワード：結核菌, MAC, Real-time PCR, TaqMan 法, 迅速診断

Mycobacterium tuberculosis, *Mycobacterium avium* complex, Real-time PCR, TaqMan method, Rapid diagnosis

緒 言

結核は年々減少傾向にあるものの、2007 年日本における結核罹患患者数は約 2 万 5,000 人、結核による死亡者数は約 2,200 人にのぼる¹⁾。欧米諸国と比べて罹患率が高いことから、依然として日本は結核中進国とされる。結核菌 *M. tuberculosis* (以下 MTB) は空気感染により人・人感染を生じるため、呼吸器感染症として極めて重要な位置を占める。

非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria (NTM)) 症は抗酸菌症全体の約 3 割を構成するが、近年明らかに増加傾向をしめす。NTM 症の約 8 割は *M. avium* (以下 MAV) 症あるいは *M. intracellulare* (以下 MIN) 症である²⁾。これら 2 菌は類似性が高く、統合的に *M. avium* complex (以下 MAC) と呼ばれることが多い。肺に基礎疾患を有する患者や免疫不全症で呼吸器あるいは全身の感染症を引き起こす³⁾。近年では、基礎疾患のない中高年女性における気管支型肺 MAC 症の増加が懸念されている⁴⁾。MAC は抗結核剤を含む多くの抗

菌薬に対し良好な薬剤感受性を示さず、治療抵抗性に進行する肺 MAC 症への対処が問題となっている²⁾。

結核と NTM 症は胸部 X 線所見、臨床所見が類似している症例が多い。また、結核では空気感染による人・人感染を生じるので、病原抗酸菌の迅速・鋭敏な検出・鑑別が求められる。塗抹検査は感度が低く菌種の同定は不可能である。培養検査は結果を得るまでに週単位の期間が必要であり迅速性に劣る。近年、核酸増幅検査法が開発され、MTB および MAC の迅速検出法として急速に普及した^{5)~9)}。

今回、リアルタイム PCR を用いることにより、検出時間のさらなる短縮化および検査手技の簡素化を実現した臨床診断キット、コバス TaqMan[®] MTB およびコバス TaqMan[®] MAI (ロシュ・ダイアグノスティクス社、以下 TaqMan) が開発された。本研究では TaqMan の抗酸菌 DNA 検出性能を、本邦で広く普及しているコバスアンプリコア[®] (以下アンプリコア) との比較において検討したので報告する。

対象と方法

1. 対象症例と検体

国立病院機構東埼玉病院、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターおよび国立病院機構南岡山医療センターの各施設において、2005 年 7 月から 2006 年 3 月までのいずれかの 3 カ月間に、外来および入院患者から採取され、PCR 検査依頼もなされた抗酸菌検査検体を連

¹⁾ 国立病院機構東埼玉病院呼吸器科

²⁾ 国立病院機構南岡山医療センター呼吸器内科

³⁾ 大阪府立病院機構大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター結核内科

〒259-1132 神奈川県伊勢原市桜台 2-17-1

⁴⁾ 神奈川県厚生連伊勢原協同病院内科

(受付日平成 21 年 3 月 16 日)

Table 1 Summary of test methods at each hospital

		Saitama *1		Osaka *2		Okayama *3
Pre-treatment		Presolve + NALC-NaOH		Sputazyme + CCE <i>Nichibi</i>		NALC-NaOH
Smear *4		Fluorescent stain		Ziehl-Neelsen stain		Ziehl-Neelsen stain
Culture	Medium	BACTEC MGIT	2% Ogawa	BACTEC MGIT	2% Ogawa	3% Ogawa
	Endpoint	6 weeks	6 weeks	6 weeks	6 weeks	8 weeks
Mycobacteria identification		AMPLICOR/Capilia with positive culture media	DDH	AMPLICOR/Capilia with positive culture media	DDH	AMPLICOR with positive culture media

*1 East Saitama National Hospital

*2 Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergy Diseases

*3 National Hospital Organization Minami-Okayama Medical Center

*4 The smear was conducted with precipitation after centrifugation to concentrate the mycobacteria in the specimens

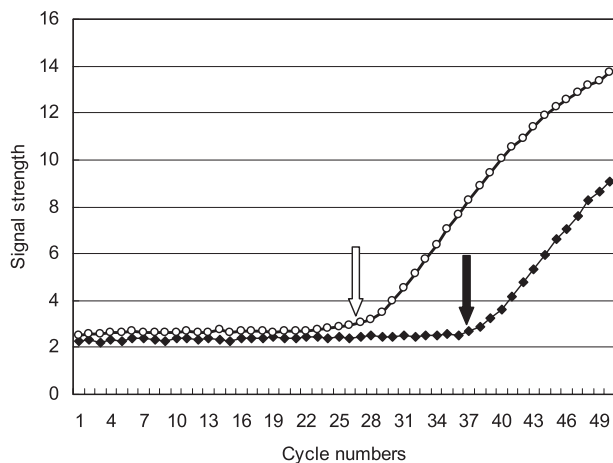


Fig. 1 Growth curve of TaqMan signal (fluorescent emission) and critical threshold (Ct) value. An example of signal growth curves in the TaqMan MTB assay is shown.

Open circle: Signal growth curve of MTB specific probe.

Closed circle: Signal growth curve of internal control (IC) specific probe.

White arrow: Ct value of MTB. The value was determined by data analysis software.

Black arrow: Ct value of internal control. The value was determined by data analysis software.

続的に収集した。検体は、喀痰 766 検体、気管支肺胞洗浄液 8 検体、胃液 6 検体、胸水 1 検体の計 781 検体であった。

2. 検査法

N-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム (NALC-NaOH) 法を基本とする前処理にて可溶化した検体により、各施設において塗抹検査、培養検査を実施した (施設ごとの検査方法は Table 1 にまとめた)。残りの検体の一部をアンプリコアおよび TaqMan に使用した。なお、検体は分析まで -80°C にて冷凍保存した。

核酸抽出には、アンプリコア検体前処理試薬セット II を用いた。簡潔には、NALC-NaOH 処理済み検体 $100\mu\text{L}$ に検体洗浄液 $500\mu\text{L}$ を加え、 $13,000\text{g}$ で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、溶菌試液 $100\mu\text{L}$ を加え、 60°C で 45 分間加温した後、中和試液 $100\mu\text{L}$ を加え、DNA 溶液とした。

アンプリコアは、抗酸菌群 DNA の 16S-rRNA 遺伝子領域の約 580 塩基対を増幅対象として PCR を行ったのち、検出を行う。一方 TaqMan では、アンプリコアと同様に抗酸菌群 DNA の 16S-rRNA 遺伝子領域を増幅対象として PCR を行うが、各サイクルにおける蛍光プローブのシグナルをリアルタイムにモニターしながら抗酸菌群 DNA を検出する。増幅産物が検出され、陽性と判定できた PCR サイクル数を Critical threshold value (以下 Ct 値) と呼ぶ (Fig. 1)。

成績

広く普及しているアンプリコアを基準として、アンプリコアと TaqMan との全体一致率、陽性一致率、陰性一致率を評価した (Table 2)。

MTB において、アンプリコアと TaqMan の全体一致率、陽性一致率および陰性一致率は、塗抹陽性、陰性を合わせた全検体でそれぞれ 99.1% (764/771)、97.4% (148/152) および 99.5% (616/619) であった。結果が乖離した 7 検体は全て塗抹陰性であった。なお、内部コントロール陰性 (検体に由来する何らかの反応阻害: Table 2 の inhibition) による測定無効 7 検体は計算から除外した。

MAV において、アンプリコアと TaqMan の全体一致率、陽性一致率および陰性一致率は、全検体でそれぞれ 99.0% (773/781)、99.2% (127/128) および 98.9% (646/653) であった。結果が乖離した 8 検体は全て塗抹陰性であった。なお、内部コントロール陰性による測定

Table 2 Concordance between AMPLICOR and TaqMan in MTB, MAV and MIN

		Smear Positive			Smear Negative			Total		
		AMPLICOR			AMPLICOR			AMPLICOR		
TaqMan		+	-	Inh	+	-	Inh	+	-	Inh
	+	94	0	0	54	3	0	148	3	0
	-	0	100	0	4	516	4	4	616	4
	Inh	0	0	1	0	0	2	0	0	3
Total concordance		100%	194/194		98.8%	570/577		99.1%	764/771	
Positive concordance		100%	94/94		93.1%	54/58		97.4%	148/152	
Negative concordance		100%	100/100		99.4%	516/519		99.5%	616/619	

		Smear Positive			Smear Negative			Total		
		AMPLICOR			AMPLICOR			AMPLICOR		
TaqMan		+	-	Inh	+	-	Inh	+	-	Inh
	+	52	0	0	75	7	1	127	7	1
	-	0	142	0	1	504	3	1	646	3
	Inh	0	0	1	0	0	2	0	0	3
Total concordance		100%	194/194		98.6%	579/587		99.0%	773/781	
Positive concordance		100%	52/52		98.7%	75/76		99.2%	127/128	
Negative concordance		100%	142/142		98.6%	504/511		98.9%	646/653	

		Smear Positive			Smear Negative			Total		
		AMPLICOR			AMPLICOR			AMPLICOR		
TaqMan		+	-	Inh	+	-	Inh	+	-	Inh
	+	29	0	0	46	2	0	75	2	0
	-	0	165	0	0	539	4	0	704	4
	Inh	0	0	1	0	0	2	0	0	3
Total concordance		100%	194/194		99.7%	585/587		99.7%	779/781	
Positive concordance		100%	29/29		100%	46/46		100%	75/75	
Negative concordance		100%	165/165		99.6%	539/541		99.7%	704/706	

Inh: inhibition

Inhibition indicates the number of specimens inhibiting PCR activation.

Specimens inhibiting either AMPLICOR or TaqMan were excluded from the calculation.

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

MAV: *Mycobacterium avium*

MIN: *Mycobacterium intracellulare*

無効7検体は計算から除外した。

MINにおいて、アンプリコアとTaqManの全体一致率、陽性一致率および陰性一致率は、全検体でそれぞれ99.7% (779/781), 100% (75/75) および99.7% (704/706)であった。結果が乖離した2検体はいずれも塗抹陰性であった。ここでも内部コントロール陰性による測定無効7検体は計算から除外した。

アンプリコアとTaqManの結果が一致しなかった検

体については、培養結果とともにTable 3に示した。アンプリコア陽性/TaqMan陰性の5検体中3検体は培養陽性、アンプリコア陰性/TaqMan陽性の12検体中10検体は培養陽性であった (Table 3)。アンプリコアでPCR不応の検体は21検体あり (Table 2)。このうち12検体ではTaqManの結果が得られ、培養結果と一致していた (Table 3)。

Table 3 Culture results of the discrepant specimens between AMPLICOR and TaqMan

		MTB culture		MAV culture		MIN culture	
AMPLICOR	TaqMan	+	-	+	-	+	-
+	-	2	2	1	0	0	0
-	+	2	1	7	0	1	1
Inh	+	0	0	1	0	0	0
Inh	-	0	4	0	3	0	4

+: positive

-: negative

Inh: inhibition

考 察

抗酸菌症の主流を占める結核と、非結核性抗酸菌症は臨床的に類似する点はあるが、感染様式や治療法が異なっており、細菌学的鑑別が重要となる。非結核性抗酸菌の大部分が *M. avium* と *M. intracellulare* であり、これらは類似性が高く従来より統合的に *M. avium* complex と呼ばれてきた。しかし、MAV 症と MIN 症との間で薬剤感受性、治療反応性に差異があるとも報告されている^{9)~11)}。MAV 症および MIN 症の比率には地域差があり、近畿以東では MAV 優位、中国、四国と九州では MIN 優位である²⁾¹⁰⁾。さらに、MAV の血清型 4 の症例は長期の経過で肺病変が増悪し、予後が悪いとの報告もある¹²⁾。MAV と MIN との鑑別を含む MAC の菌型分類は、NTM 症の疫学・臨床像の理解に重要な要素となろう。本キットは MAV、MIN および MTB を迅速に鑑別できるのが利点である。

TaqMan は増幅と検出を同時に行うことができるので、アンプリコアで増幅のみに要していた時間とほぼ同じ時間で検出までが可能である (TaqMan : 3.5 時間、アンプリコア : 5.5 時間)。また、TaqMan では波長の異なる蛍光物質で MTB、MAV、MIN 検出用のプローブを標識し、蛍光を検知する。TaqMan MTB、TaqMan MAV、TaqMan MIN では各 1 本の反応チューブで増幅・検出が可能であり、アンプリコアより手技が簡素化されている。

本研究の目的は MTB、MAV、MIN に対する精度評価であるため、その陽性検体数に極度の偏りが出ないように、国立病院機構東埼玉病院、大阪府立呼吸器・アレルギー医療センターおよび国立病院機構南岡山医療センターの 3 施設で検体を収集した。精度評価に足る MTB、MAV および MIN 陽性検体数を得ることができたと考える。

塗抹陽性検体においては、MTB、MAV、MIN いずれの菌種もアンプリコアと TaqMan の結果は 100% 一

致した。塗抹陰性検体においては、3 菌種ともにアンプリコアと TaqMan で結果が乖離した検体を少数認めたため (Table 2, 3)、考察を加える。

① MTB

MTB において、従来¹³⁾¹⁴⁾と同様、アンプリコアと TaqMan の一致率は全体で 99.1% (764/771) と良好であったが、両者の結果が乖離した検体が 7 検体あり、その全てが塗抹陰性であった (Table 2)。

アンプリコア陰性/TaqMan 陽性になった 3 検体のうち 2 検体は培養陽性であり、TaqMan の結果の正当性が支持された。培養陰性の 1 検体 (検体 777) は二重測定による再検査を行ったところ、アンプリコア陰性/TaqMan 陽性が確認された (Table 4)。TaqMan で再現性良く陽性結果が得られたものの、増幅を検出できる PCR サイクル数 (Ct 値) が 45 前後と大きかった。本キットの内部コントロール (DNA 約 20 コピー/PCR) の Ct 値は 38 前後の値を得ることから、本検体では MTB の DNA が存在したとしても非常に低濃度である可能性がある。また、本結果は TaqMan の検出感度が高いことの現れでもあろう。しかし、培養陰性であるため TaqMan 偽陽性の可能性がある。

アンプリコア陽性/TaqMan 陰性になった 4 検体のうち、2 検体では培養陽性であり、アンプリコアの結果の正当性が支持された。培養陰性の 2 検体 (検体 278, 675) について再検査を行った。検体 278 は二重測定による再検査の両方で十分な吸光度を示すアンプリコア陽性を示し、TaqMan も一方は陽性であった (Table 4)。本検体は結核治療中に経過観察の目的で採取されたものであり、治療による菌量軽度低下あるいは死菌化が考えられた。検体 675 は、二重測定による再検査の一方のみでアンプリコア陽性、両方で TaqMan 陰性であった。アンプリコアの吸光度は弱く、菌量が極めて少ないか偽陽性の可能性があると考えられた。なお、この検体は、結核のスクリーニングの目的で採取された検体であった。ア

Table 4 Re-test results of the discrepant specimens between AMPLICOR and TaqMan

ID	AMPLICOR *1				TaqMan MTB*2		TaqMan MAI*2			Smear	Culture
	MTB	MAV	MIN	IC	MTB	IC	MAV	MIN	IC		
777	0.21 (-)	N/A *3	N/A	3.53 (+)	43.7 (+)	36.9 (+)	N/A	N/A	N/A	-	-
	0.14 (-)			> 4 (+)	45.2 (+)	37.1 (+)					
	0.00 (-)			> 4 (+)	48.4 (+)	37.3 (+)					
278	3.24 (+)	N/A	N/A	3.85 (+)	- (-)	37.3 (+)	N/A	N/A	N/A	-	-
	2.77 (+)			> 4 (+)	- (-)	37.2 (+)					
	2.47 (+)			> 4 (+)	47.5 (+)	37.7 (+)					
675	1.30 (+)	N/A	N/A	> 4 (+)	- (-)	37.5 (+)	N/A	N/A	N/A	-	-
	0.00 (-)			> 4 (+)	- (-)	37.5 (+)					
	0.61 (+)			> 4 (+)	- (-)	37.4 (+)					
117	N/A	0.58 (+)	N/A	3.31 (+)	N/A	N/A	- (-)	N/A	36.1 (+)	-	+ *4
		0.00 (-)		3.83 (+)			- (-)		37.0 (+)		
		1.37 (+)		3.83 (+)			43.1 (+)		36.5 (+)		
594	N/A	N/A	0.04 (-)	3.84 (+)	N/A	N/A	N/A	41.8 (+)	37.2 (+)	-	-
			0.01 (-)	3.18 (+)				43.0 (+)	37.4 (+)		
			0.17 (-)	3.35 (+)				- (-)	37.3 (+)		

The data given at the top line of each column are the results of the first assay. The results of re-examination are given in the second and third lines of each column.

*1 AMPLICOR results were given with absorbance at 660 nm (A660). The cut off value for the assay was 0.35 OD.

*2 The TaqMan assay provides qualitative (+ / -) results. For discussion, the Ct values are also presented in the table. The minus sign instead of the Ct value indicates that the signal growth did not exceed the critical threshold until the end of PCR.

*3 N/A : data not available

*4 A single colony of *M. avium* grew on the solid culture medium

IC: internal control

ンプリコア陽性/TaqMan 陰性の 4 検体に関しては、アンプリコア偽陽性の可能性があるのは検体 675 のみであり、TaqMan よりアンプリコアの結果に妥当性がある。

一方、アンプリコアで阻害を生じた 7 検体のうち 4 検体では、TaqMan で阻害を生じず陰性と判定された。この 4 検体は培養陰性であり、TaqMan の結果の正当性が支持された (Table 3)。

TaqMan の阻害率の低さはアンプリコアに対して優れた特長と考えられる。培養結果との一致率も高く、MTB の検出において TaqMan の信頼性はアンプリコアと同等以上であると判定される。

② MAV

MAV において、アンプリコアと TaqMan の一致率は全体で 99.0% (773/781) であり、結果が乖離した 8 検体は全て塗抹陰性であった (Table 2)。

アンプリコア陰性/TaqMan 陽性になった 7 検体はすべて培養陽性であり、TaqMan の結果の正当性が支持された。データには示さなかったが、TaqMan における Ct 値が全て 40.0 以上と大きかったことから、これら 7 検体の菌量はかなり少量であったと考えられる。

アンプリコア陽性/TaqMan 陰性になった 1 検体 (検体 117) は、アンプリコアの吸光度は低値であった。二重測定による再検査で、アンプリコア、TaqMan とともに一方の結果のみ陽性となった (Table 4)。培養結果は陽性であったが、菌量が少ない検体と考えられる。

アンプリコアで阻害を生じた 7 検体中、TaqMan では 1 検体で陽性、3 検体で陰性と判定され、培養結果と陽性、陰性が一致していた (Table 3)。

培養結果との一致性、阻害率の低さを考慮すれば、MAV の検出における TaqMan の信頼性はアンプリコアに優ると考えられる。

③ MIN

MIN において、アンプリコアと TaqMan の一致率は全体で 99.7% (779/781) であり、結果が乖離した 2 検体はどちらも塗抹陰性であった (Table 2)。

アンプリコア陰性/TaqMan 陽性になった 2 検体のうち 1 検体は培養陽性であり、TaqMan の結果の正当性が支持された。他の 1 検体 (検体 594) は培養陰性であった。二重測定による再検査で、TaqMan は一方のみが陽性かつ Ct 値が 40.0 以上 (Table 4) であったことか

ら、菌量の少ない検体が偽陽性の可能性がある。MIN ではアンプリコア陽性/TaqMan 陰性の検体を認めなかった。

アンプリコアで阻害を生じた7検体中4検体が TaqMan で陰性と判定され、培養結果とも一致した (Table 3)。MIN でも TaqMan の信頼性はアンプリコアに優ると考えられる。

アンプリコアにおいて、MTB で7検体、MAV で7検体、MIN で7検体の阻害検体が見られたが、TaqMan ではそれぞれ3検体ずつに反応阻害を認めたのみで、阻害率は半分以下に低減していた。TaqMan の阻害率の低さはアンプリコアに対して優れた特長と考えられる。キット添付文書によるとアンプリコアと TaqMan では、DNA ポリメラーゼ、試薬組成、核酸増幅の温度プロトコルなどが異なり、これらが反応阻害率に影響を与えた可能性がある。阻害率低減は再検査を要する検体数の減少を意味し、臨床医に検査結果を報告するまでに長時間を必要とする検体が減少する。少数ながらアンプリコア、TaqMan とともに増幅反応に阻害が生じる検体も存在した。両方の検出法で反応阻害が生じたのは、MTB、MAV、MIN とともに同一の3検体であった。これらはいずれも培養陽性であり、培養菌はそれぞれ MIN (塗抹陽性)、MAV (塗抹陰性)、*M. kansasii* (塗抹陰性) と同定された。今後さらに反応阻害率の低い核酸増幅方法が開発されることを期待したい。

塗抹陽性検体におけるアンプリコア陰性/TaqMan 陰性は MTB、MAV、MIN に限ったものであり、3菌種以外の抗酸菌が存在する可能性がある。アンプリコアでは増幅産物がビオチン化されており、これを DNA チップなどにより別途解析することで MAV、MIN 以外の非結核性抗酸菌種の同定が可能である¹⁵⁾。TaqMan もアンプリコアと増幅領域がほぼ同じであり、増幅産物も同様にビオチン化されている。よって、TaqMan による増幅産物も別途 DNA チップ等で解析すれば、MTB、MAV、MIN 以外の菌種鑑別が可能であると考えられる。

少数ながら偽陽性を否定できない検体、反応阻害による測定不能検体が TaqMan においても認められるため、臨床においては抗酸菌培養結果を確認することが不可欠である。しかし、本研究により TaqMan は低い反応阻害率、高い感度および特異度を持つ優れた抗酸菌群 DNA 迅速検査法であることが示された。

謝辞：本研究にあたり、測定およびデータ解析に多大なご協力を戴きました、ロシュ・ダイアグノスティックス社 田口直子、渡辺江理子、原田新治、玉造滋の各氏に深甚なる謝意を表します。

引用文献

- 1) 財団法人結核予防会. 結核の統計 2008. 財団法人結核予防会, 東京, 2008.
- 2) 坂谷光則. 非定型抗酸菌症. 結核 2005;80:25—30.
- 3) American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:S1—S25.
- 4) 藤田次郎, 日比谷健司, 原永修作, 他. 非結核性抗酸菌症. 結核 2007;82:721—727.
- 5) Wobeser WL, Krajden M, Conly J, et al. Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1996;34:134—139.
- 6) Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche PCR-microwell plate hybridization method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for direct detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 1996;34:130—133.
- 7) 古賀宏延, 河野 茂, 朝野和典, 他. Ligase Chain Reaction (LCR) 法を用いた結核菌群 DNA 検出試薬の臨床的検討. 感染症学雑誌 1996;71:1246—1251.
- 8) 藤原久二, 加悦みわ子, 岡田 淳. 結核菌同定用「*M. TB* プローブアッセイキット」の基礎的検討. 感染症学雑誌 1991;65:1317—1323.
- 9) 浦野哲哉, 野崎博之, 松本信吾, 他. DNA Probe テストによって同定された *Mycobacterium avium* と *Mycobacterium intracellulare* による肺感染症の病像比較. 結核 1990;65:639—641.
- 10) 水谷清二. DNA Probe で同定されたわが国の *Mycobacterium avium* 肺感染症と *Mycobacterium intracellulare* 肺感染症の病像の比較. 結核 1991;66:19—38.
- 11) 豊田丈夫, 青柳昭雄, 斉藤 肇. *M. avium* 症と *M. intracellulare* 症. 結核 1993;68:63—69.
- 12) Maekura R, Okuda Y, Hirotsu A, et al. Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. J Clin Microbiol 2005;43:3150—3158.
- 13) 渡邊あゆみ, 林 英子, 長田智美, 他. 結核菌群核酸増幅同定検査試薬コバス® TaqMan® MTB の基礎的検討およびアンプリコア® マイコバクテリウムとの比較検討. 医学と薬学 2007;58:331—337.
- 14) 吉多仁子, 松本智成. 結核菌検出におけるコバス TaqMan MTB 法とコバスアンプリコア法の比較検討. 日本臨床微生物学雑誌 2008;18:252—258.
- 15) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, et al. Further de-

velopment of multiplex single nucleotide polymorphism typing method, the DigiTag2 assay. Anal Bio-

chem 2007; 364: 78—85.

Abstract

Evaluation of COBAS TaqMan : A real-time PCR-based diagnostic kit for mycobacteria

Makoto Yonemaru^{1,4)}, Masahide Horiba¹⁾, Atsuhiko Tada²⁾ and Takayuki Nagai³⁾

¹⁾Department of Respiratory Medicine, East Saitama National Hospital

²⁾Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Minami-Okayama Medical Center

³⁾Department of Tuberculosis Medicine, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergy Diseases

⁴⁾Department of Internal Medicine, Isehara Kyodo Hospital

The real-time PCR-based diagnostic kits, COBAS TaqMan MTB and COBAS TaqMan MAI (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan), were developed to detect *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and *M. avium* (MAV)/*M. intracellulare* (MIN), respectively. The TaqMan kits simultaneously perform amplification and detection of mycobacterial DNA to reduce assay time. We evaluated the diagnostic accuracy of both TaqMan kits in 781 clinical specimens, and compared the results with those obtained from the AMPLICOR MTB and MAI kits. With smear-positive specimens, the TaqMan kits showed 100% concordance with AMPLICOR in MTB, MAV and MIN. With all specimens, the concordances of TaqMan with AMPLICOR were 99.1%, 99.0%, and 99.7% in MTB, MAV and MIN, respectively. Four specimens for MTB and one for MAV were AMPLICOR positive/TaqMan negative. Among them, two specimens were culture-positive for MTB and one for MAV. Three specimens for MTB, seven for MAV, and two for MIN were AMPLICOR negative/TaqMan positive. Among them, two specimens were culture-positive for MTB, seven for MAV, and one for MIN. In twelve out of 21 specimens in which AMPLICOR failed to activate PCR, TaqMan successfully determined the results which were in concordance with those of mycobacterial culture. Thus, our data suggest that the accuracy of TaqMan in detecting mycobacterial DNA is superior to that of AMPLICOR. We conclude that TaqMan, which is an easy and rapid DNA amplification test, is useful for detecting MTB, MAV and MIN.