

原 著

PCR 法を利用した抗酸菌 DNA 検出キット
(アンプリコア™ マイコバクテリウム)
による臨床検体からの抗酸菌迅速検出

青 木 正 和	結核予防会結核研究所
片 山 透	国立療養所東京病院
山 岸 文 雄	国立療養所千葉東病院
横 田 総一郎	国立療養所刀根山病院
亀 田 和 彦	結核予防会大阪支部
斎 藤 肇	国立多摩研究所
原 耕 平	長 崎 大 学
江 崎 孝 行	岐 阜 大 学
河 合 忠	自 治 医 科 大 学
四 元 秀 毅	東 京 大 学
関 口 進	防 衛 医 科 大 学
	受付 平成 6 年 5 月 6 日
	受理 平成 6 年 7 月 4 日

EFFICACY OF PCR-MICROWELL PLATE HYBRIDIZATION METHOD
(AMPLICOR™ MYCOBACTERIUM) FOR DETECTION OF
M. TUBERCULOSIS, *M. AVIUM* AND/
OR *M. INTRACELLULARE* IN
CLINICAL SPECIMENS

Masakazu AOKI*, Toru KATAYAMA, Fumio YAMAGISHI, Soichiro YOKOTA,
Kazuhiko KAMEDA, Hajime SAITO, Kohei HARA, Takayuki EZAKI,
Tadashi KAWAI, Hideki YOTSUMOTO
and Susumu SEKIGUCHI

(Received 6 May 1994/Accepted 4 July 1994)

Recently, a new kit to detect and identify mycobacteria in clinical specimens was developed by Japan Roche Co. Limited. The new method is based on amplification of DNA of mycobacteria in clinical specimens by PCR and hybridization of amplified DNA by microwell plate hybridization method, which is the "Amplicor™ Mycobacteria, Roche. (AMP-M)". Cooperative study was organized with 15 tuberculosis hospitals and institutions throughout Japan, and 349 clinical specimens from newly admitted tuberculosis patients and/or suspects were collected during July and August, 1993. All the specimens were examined by smear microscopy (Ziehl-Neelsen's staining), culture on Ogawa egg media, culture on variant 7H9 liquid media and by AMP-M. Excluding 25 specimens which had failed to identify the species of mycobacteria because of contamination, disability to multiply on the transplanted solid media and so on, the results of the examinations in 324 specimens consisting of 167 specimens from previously untreated cases and those of 157 specimens from previously treated cases were analysed. Main results obtained were as follows ;

1. Of 70 smear positive specimens from previously untreated cases, culture positive on Ogawa media and 7H9 media, and by AMP-M positive were 59 (84.3%), 61 (87.1%) and 66 (94.3%), respectively. Of 97 smear negative specimens, culture positive were 20 (20.6%), 22 (22.7%) and 27 (27.8%), respectively. The AMP-M showed the highest positive rate in both groups.

2. The sensitivity and the specificity of AMP-M in previously untreated cases were calculated by assuming that positive on Ogawa and/or variant 7H9 media is "positive". The sensitivity was 95.8% (68/71) and the specificity was 94.8% (91/96) for *M. tuberculosis* in previously untreated cases. The sensitivity and the specificity for *M. avium* and *M. intracellulare* were all 100%, although the numbers observed were small.

3. So-called false positive of the AMP-M were observed in 5 cases out of 96 culture negatives on both Ogawa and variant 7H9 media. However, all 5 cases were positive by repeated AMP-M, 3 become culture positive later, and another 2 showed clinical findings consistent with tuberculosis. Hence, the authors considered that the false positive rate of the AMP-M method is to be very low in previously untreated cases.

4. Of 86 smear positive cases with history of previous chemotherapy, the positive culture on Ogawa media, variant 7H9 media and that by AMP-M method were 64 (74.4%), 77 (89.5%) and 85 (98.8%), respectively. In the smear negative cases, culture positive was 10 out of 71 (14.1%), 13 (18.3%) and 24 (33.8%), respectively.

5. The sensitivity and the specificity of the AMP-M were 98.7% (77/78) and 81.0% (64/79) for *M. tuberculosis* in previously treated cases calculated by the same method as in previously untreated cases. They were 77.8% (7/9) and 100% (148/148) for *M. avium*, and 100% (4/4) and 100% (153/153) for *M. intracellulare*.

Based on these results, the authors concluded that the AMP-M is a very efficient and rapid method to detect and identify *M. tuberculosis*, *M. avium* and/or *M. intracellulare* in clinical specimens. This method will be useful to diagnose tuberculosis and diseases caused by mycobacteria other than *M. tuberculosis* rapidly.

* From the Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.

Key words : PCR, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, rapid detection, Amplicor

キーワード : PCR, 結核菌, *M. avium*, *M. intracellulare*, 迅速検出, アンプリコア

緒 言

現在、わが国では抗酸菌の検出は主にチール・ネルゼン染色による塗抹検査と小川培地での培養検査により行われている。前者は簡便で迅速であるが、感度と再現性に問題を残す。後者は簡便で低コストな方法でありながら培養に4~8週を要し、感度も十分とは言えない。迅速性と感度を両立させる目的で、液体培地を用いる方法¹⁾(MBチェック)や放射性標識物質を導入した方法²⁾(バクテック)が開発されたが、コストや操作性、安全性の問題から一般に普及するには至っていない。培養分離された抗酸菌は、その生化学的性状、あるいは、核酸の相同性を利用³⁾して同定されるが、これらはいずれも菌の分離が前提であり、迅速な菌種同定には問題が残されている。

一方、1985年にPCR法が初めて報告⁴⁾されて以来、遺伝子増幅による菌の遺伝子検出は研究室レベルでは日常のものとなっている。しかし、PCR法の実施にあっては偽陽性の問題⁵⁾、感度・特異性の問題、コストの問題、処理可能な検体数の問題等があり、一般病院での日常検査には未だほとんど導入されていない。

今回、PCR・マイクロウェルプレート(MWP)ハイブリダイゼーション法⁶⁾を用い、抗酸菌DNAを増幅して検出、同定するキット(アンプリコアTMマイコバクテリウム、日本ロシュ、以下本キット)が開発されたので、われわれはその臨床的諸問題を検討する目的で共同研究を実施したので、その成績を報告する。

研究対象ならびに研究方法

1. 研究対象および検体

研究対象とした検体は共同研究者あるいはその関連の15施設に、1993年7月9日から8月31日までの間に新たに入院した結核患者および同疑い例、さらに主に入院1カ月以内の患者から採取された喀痰または気管支洗浄液(以下BALF)である。未治療例183検体、既治療例166検体の計349検体であり、このうち328検体は喀痰で、BALFは21検体のみであった。BALFは例数が少ないので喀痰の成績に加え分析した。なお、BALF 21例の成績は付1(p.602)に再掲した。

2. 検査方法

1) 前処理(CDC変法⁷⁾)

喀痰は全量を50ml容量のコニカル遠沈管に採取し、BALFは全量を50mlのコニカル遠沈管で遠心し、その沈渣を用いた。まず、4%水酸化ナトリウム溶液と1%NALC(N-acetyl-L-cystein)溶液の等量混合液を検体の2倍量加え5~20秒混和した。15分間室温にて放置後、0.067Mリン酸緩衝液(pH6.8)をトップリングまで加えて転倒混和し3000rpmにて15分遠心した。上清を除去した沈渣を0.2%牛血清アルブミン(BSA)1mlに懸濁して下記の検査に用い、一部は再検査用に-80°Cにて凍結保存した。

2) 塗抹検査

処理菌体懸濁液0.1mlをpoly-L-lysineコートをしたスライドガラスに塗布し、常法通りチール・ネルゼン染色して検鏡した。判定結果は検出菌数に応じ、ガフキー号数で報告した。

3) 小川培地での培養

市販の小川培地(極東製薬)2本に処理菌体懸濁液各0.1mlを接種後37°Cで培養した。4週後に肉眼でコロニー形成の有無を観察し、コロニーが形成された場合にはチール・ネルゼン染色で抗酸菌の判定を行った。4週目に陰性の場合にはさらに4週後、もう一度同様に判定した。8週の時点で肉眼でコロニー形成が認められない場合を陰性としたが、これらは念のため12週まで観察を継続した。

4) 7H9変法培地(以下液体培地と略)での培養

市販の7H9変法培地(MBチェックボトル、ベクンディッキンソン)1本に処理菌体懸濁液0.1mlを接種後、37°Cで培養した。4週間経過時に、肉眼で培地の混濁の有無を観察し、混濁が確認された場合には培養液1mlを遠心し、沈渣をチール・ネルゼン染色して抗酸菌の判定を行った。4週で陰性の場合にはさらに4週後もう一度同様に判定した。8週で混濁が認められない場合を陰性としたが、これらは念のため12週まで観察を継続した。

5) 菌種の同定

菌種の同定は市販のDDHキット(DDHマイコバクテリア‘小林’、極東製薬)を使用して行った。小川培地で陽性だったものは培地上の菌体を用いた。小川培地で陰性かつ液体培地のみ陽性なのは、培養液の遠心沈渣を小川培地に接種し、発育した菌体を用いた。検体処理、検出操作、判定はDDHキットの添付文書に準じ

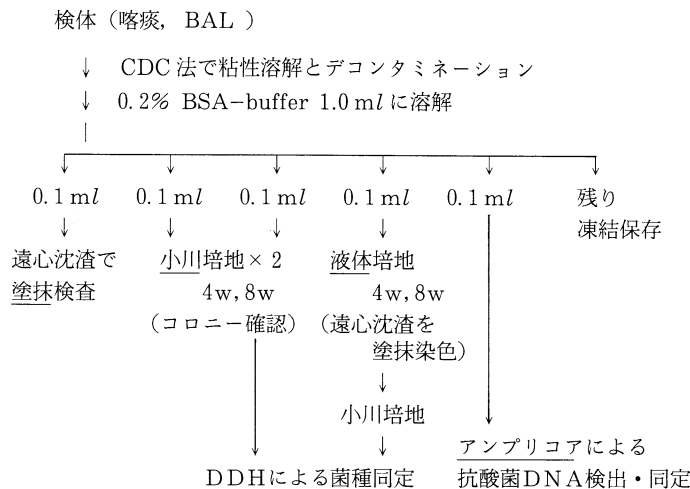


図 臨床検体からの研究実施方法

た。小川培地での培養で明らかに形態の異なる2種類以上の集落が増殖した場合は、それぞれをDDHに供し同定した。

6) 抗酸菌DNA検出キット（以下本キットまたはアンプリコアと略）での検出

処理菌体懸濁液0.1 mlをアンプリコア喀痰処理キット（日本ロシュ）で処理した。得られたDNA溶液200 μlのうち50 μlを増幅反応に供した。増幅はすべての抗酸菌に共通のプライマーを用い、DNA溶液50 μlとアンプリミックス50 μlを専用チューブに加え、添付文書に指定の条件でPCRを実施した。反応終了後、抗酸菌属、*M. tuberculosis*, *M. avium* および *M. intracellulare* 用それぞれのアンプリコア検出試薬セット（日本ロシュ）で増幅DNAを検出した。

なお、検査実施方法の概略を図示すると上図のとおりである。

採取された検体は株式会社エス・アール・エルにて収集され、前処理に供された後、対照検査は同ラボラトリーにて実施され、アンプリコアによる検査はブラインドにより、日本ロシュ株式会社のPCRラボラトリーにて実施された。

研究成績

検体総数349検体のうち25検体は、次の理由により菌種同定が不能だったため、以下の分析から除外した。すなわち、①培地汚染・溶解のためDDH不能（5例）、②液体培地のみ陽性で増菌培養できずDDH不能（16例）、③DDHと本キットが異なる菌種と判定し分類できなかったもの（3例）、および④菌の分離はできたがDDHで同定不能（1例）の計25検体である。これら

については別途論ずる。このため、分析に用いた検体総数は324検体であった。未治療、既治療別、塗抹陽性、陰性別に対象数をみると、表1のとおりである。

1. 未治療例での各検出法の比較

検討を行った未治療患者の167検体について各検査法での検査結果の関係をみると表2のとおりである。この成績をまとめ、それぞれの検査法による陽性、陰性別にほかの検査法による陽性率をみると、表3および表4のごとくである。未治療塗抹陽性の70例では、小川培地、液体培地、本キットの陽性率は84.3、87.1、94.3%、塗抹陰性97例ではそれぞれ20.6、22.7、27.8%で、本法による陽性率ももっとも高かった。小川培地で陽性とされた検体の96.2%は本キットで陽性であり、陰性例でも19.3%が陽性とされ、塗抹検査あるいは液体培地より高率であった。また、液体培地で陽性とされた例の97.6%は本キットでも陽性であり、陰性とされた例でも14.3%が本キットでは陽性とされた。

表1 既往治療有無、塗抹検査成績別
主要な分析に供した検体数
(除外例別掲)

	総数	塗抹検査成績	
		陽性	陰性
総数	324(25)	156(7)	168(18)
未治療	167(16)	70(5)	97(11)
既治療	157(9)	86(2)	71(7)

() は分析から除外した検体数で別掲

表2 未治療例(167例)における各検査法別(培養-同定)成績

塗抹 検査	小川 培地	液体 培地	アンブリコア キット	菌種内訳				
				<i>M. tb</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. intra</i>	MOTT	
+	70	+	+57	45	6	4	2	
			57	- 0	-	-	-	
		-	+ 2	2	-	-	-	
	-	59	2	- 0	-	-	-	
		70	+	+ 4	4	-	-	-
				4	- 0	-	-	-
		11	-	+ 3	3	-	-	-
	7		- 4	-	-	-		
-	97	+	+14	8	5	-	1	
			16	- 2	2	-	-	
		-	+ 3	3	-	-	-	
	77	20*	4	- 1	1	-	-	
		97	+	+ 6	6	-	-	-
				6	- 0	-	-	-
		77	-	+ 4	2	-	-	2
	71		-67	-	-	-		

*のうち1例は小川培地で分離培養は出来たが、継代して増菌することは不能であった。
MOTT=他の抗酸菌

表3 各検出法で陽性例の、他の検出法での陽性率
(未治療例)

	塗抹陽性 70例		小川陽性 79例		液体培地 陽性 83例		アンブリコア 陽性 93例	
	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
塗抹陽性	70	100.0	59	74.7	61	73.5	66	71.0
小川陽性	59	84.3	79	100.0	73	88.0	76	81.7
液体培地陽性	61	87.1	73	92.4	83	100.0	81	87.1
アンブリコア 陽性	66	94.3	76	96.2	81	97.6	93	100.0

表4 各検出法で陰性例の、他の検出法での陽性率
(未治療例)

	塗抹陰性 97例		小川陰性 88例		液体培地 陰性 84例		アンプリコア 陰性 74例	
	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
塗抹陽性	0	—	11	12.5	9	10.7	4	5.4
小川陽性	20	20.6	0	—	6	7.1	3	4.1
液体培地陽性	22	22.7	10	11.4	0	—	2	2.7
アンプリコア 陽性	27	27.8	17	19.3	12	14.3	0	—

本キットで陽性とされた93例でみると、塗抹検査、小川培地、液体培地の陽性率はそれぞれ71.0、81.7%、87.1%であった。本キットで陰性だった74例では、ほかの検査で陽性とされたものはいずれも少数のみであった。

2. 小川/液体培地いずれかで陽性例との比較(未治療例)

未治療例167例について、小川培地または液体培地のいずれかで陽性だったものを「培養陽性」とし、本キットの成績と比較すると表5のとおりである。ただし、ここでは結核菌について検討するときには結核菌以外の抗酸菌が陽性でも「結核菌陰性」とし *M. avium* および *M. intracellulare* でも同様に扱った。

未治療例総数でみると、結核菌では「培養陽性」71例中68例、95.8%が陽性とされた。感度は95.8% (68/71)、特異性94.8% (91/96) ということになる。塗抹陽性例では感度100% (51/51)、特異性84.2% (16/19)、塗抹陰性例では感度85.0% (17/20)、特異性97.4% (75/77) であった。

M. avium および *M. intracellulare* はいずれも例数が少なかったが、感度、特異性ともに100%であった。

3. 既治療例での各検出法の比較

検討を行った既治療患者157例について各検査法での検査結果の関係をみると表6のとおりである。この成績をまとめ、それぞれの検査法による陽性、陰性例別に、ほかの検出法による陽性率をみると表7および表8のと

表5 未治療例/小川培養または液体培地培養のいずれかで陽性の場合を陽性例としてアンプリコアとの比較

			小川/液体						小川/液体						小川/液体		
結核菌			+	-	計	<i>M. avium</i>			+	-	計	<i>M. intra</i>			+	-	計
総 数	アンプリコア	+	68	5	73	総 数	アンプリコア	+	11	0	11	総 数	アンプリコア	+	4	0	4
	キット	-	3	91	94		キット	-	0	156	156		キット	-	0	163	163
	計			71	96		167	計			11		156	167	計		
塗 抹 +	アンプリコア	+	51	3	54	塗 抹 +	アンプリコア	+	6	0	6	塗 抹 +	アンプリコア	+	4	0	4
	キット	-	0	16	16		キット	-	0	64	64		キット	-	0	66	66
	計			51	19		70	計			6		64	70	計		
塗 抹 -	アンプリコア	+	17	2	19	塗 抹 -	アンプリコア	+	5	0	5	塗 抹 -	アンプリコア	+	0	0	0
	キット	-	3	75	78		キット	-	0	92	92		キット	-	0	97	97
	計			20	77		97	計			5		92	97	計		

おりである。既治療患者で塗抹陽性の86例では小川培地、液体培地、本キットの陽性率はそれぞれ74.4、89.5および98.8%、塗抹陰性例71例ではそれぞれ14.1、18.3および33.8%で本キットでの陽性率がもっとも高かった。小川培地で陽性だった検体の98.6%は本キットで陽性であり、陰性例でも43.4%が陽性であった。また、液体培地で陽性とされた例の96.7%は本キットでも陽性であり、陰性例でも32.8%が陽性であった。

本キットで陽性とされた109例で見ると、小川培地で陽性67.0%、液体培地陽性79.8%で、いずれも未治療例の同様の率より低かった。また、本キットで陰性とされた48例では、小川培地で陽性とされたものは1例、2.1%のみであった。

4. 小川/液体培地いずれかで陽性例との比較（既治療例）

既治療例157例について、小川培地または液体培地の

いずれかで陽性のものを「培養陽性」とし、本キットの成績と比較すると表9のとおりである。

結核菌では感度98.7% (77/78)、特異性81.0% (64/79) で未治療例に比して特異性がやや低かった。塗抹陽性例では感度98.5% (66/67)、特異性63.2% (12/19)、塗抹陰性例では感度100% (11/11)、特異性86.7% (52/60) であった。

M. avium あるいは *M. intracellulare* の培養陽性例は9例または4例と少なかったが、本キットでは *M. avium* の2例が陰性だったため、既治療例の *M. avium* の感度は77.8% (7/9) とやや低かったが、特異性は100%であった。既治療の *M. intracellulare* では感度、特異性ともに100%であった。

5. 本キットと他検出法との不一致例

1) いわゆる偽陽性例

未治療患者では表5でみたように、小川培地および液

表6 既治療例(157例)における各検査法別(培養-同定)成績

塗抹 検査	小川 培地	液体 培地	アンプリコ ア キット	菌種内訳				
				<i>M. tb</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. intra</i>	MOTT	
+	+	+	+62	50	6	4	2	
		62	- 0	-	-	-	-	
		-	+ 2	2	-	-	-	
	64	2	- 0	-	-	-	-	
		86	+	+14	14	-	-	-
			15	- 1	1	-	-	-
	22	7	- 0	-	-	-	-	
	-	+	+	+ 6	3	1	-	2
			7	- 1	-	1	-	-
			-	+ 3	3	-	-	-
10		3	- 0	-	-	-	-	
		71	+	+ 5	5	-	-	-
6			- 1	-	1	-	-	
-			+10	8	-	-	2	
61	55	-45	-	-	-	-		

MOTT=他の抗酸菌

表7 各検出法で陽性例の他の検出法での陽性率

(既治療例)

	塗抹陽性 86例		小川陽性 74例		液体培地 陽性 90例		アンプリコア 陽性 109例	
	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
塗抹陽性	86	100.0	64	86.5	77	85.6	85	78.0
小川陽性	64	74.4	74	100.0	69	76.7	73	67.0
液体培地陽性	77	89.5	69	93.2	90	100.0	87	79.8
アンプリコア 陽性	85	98.8	73	98.6	87	96.7	109	100.0

表8 各検出法で陰性例の他の検出法での陽性率

(既治療例)

	塗抹陰性 71例		小川陰性 83例		液体培地 陰性 67例		アンプリコア 陰性 48例	
	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
塗抹陽性	0	-	22	26.5	9	13.4	1	2.1
小川陽性	10	14.1	0	-	5	7.5	1	2.1
液体培地陽性	13	18.3	21	25.3	0	-	3	6.3
アンプリコア 陽性	24	33.8	36	43.4	22	32.8	0	-

表9 既治療例/小川培養または液体培地培養のいずれかで陽性の場合を陽性としてアンプリコアとの比較

		小川/液体					小川/液体					小川/液体					
結核菌		+	-	計	<i>M. avium</i>		+	-	計	<i>M. intra</i>		+	-	計			
総 数	アンプリコア	+	77	15	92	総 数	アンプリコア	+	7	0	7	総 数	アンプリコア	+	4	0	4
	キット	-	1	64	65		キット	-	2	148	150		キット	-	0	153	153
	計		78	79	157		計		9	148	157		計		4	153	157
塗 抹 +	アンプリコア	+	66	7	73	塗 抹 +	アンプリコア	+	6	0	6	塗 抹 +	アンプリコア	+	4	0	4
	キット	-	1	12	13		キット	-	0	80	80		キット	-	0	82	82
	計		67	19	86		計		6	80	86		計		4	82	86
塗 抹 -	アンプリコア	+	11	8	19	塗 抹 -	アンプリコア	+	1	0	1	塗 抹 -	アンプリコア	+	0	0	0
	キット	-	0	52	52		キット	-	2	68	70		キット	-	0	71	71
	計		11	60	71		計		3	68	71		計		0	71	71

表10 未治療，従来培養法陰性，本キット陽性（結核菌）例

番号	治療	塗抹	小川	液体	アンプリコア	アンプリ.再検	SOD-PCR	備考
64	無	G = 2	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	2日前の検体で，G = 1，培養(+)
71	無	G = 2	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	2日前の検体で，G = 2
125	無	G = 0	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i> 再発疑いで入院
150	無	G = 0	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	
179	無	G = 2	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	BAL，同日採取喀痰で，G = 3

G : ガフキー号数, *M. tb* : *M. tuberculosis*

表11 既治療，従来培養法陰性，本キット陽性（結核菌）例

番号	治療	塗抹	小川	液体	アンプリコア	アンプリ.再検	SOD-PCR	改良抽出	備考
34	< 2 w	G = 2	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	3週前採取検体で，G = 6，培養(+)
35	< 2 w	G = 0	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	2週前採取検体で，G = 0，培養(+)
39	< 1 M	G = 4	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	
47	< 2 w	G = 0	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	3週前，前医採取検体で，G = 6
132	< 2 w	G = 0	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	培養(+)で膿胸合併，bII3 rpl (em)
134	< 2 w	G = 0	-	-	<i>M. tb</i>	-	-	-	3週前採取検体で，G = 5，培養(+)
173	< 1 M	G = 0	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	2週後採取検体で，G = 1，培養(+)
187	2.5 Y	G = 2	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	前日採取検体で，G = 0，培養(+)
281	3 M	G = 0	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	前日採取組織診で <i>M. tb</i> と診断
288	< 2 w	G = 3	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	1週前採取検体で，G = 4，培養(+)
296	1 M	G = 0	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	
305	2 M	G = 3	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	7週前採取検体で，G = 5，培養(+)
310	2 Y	G = 6	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	3週前採取検体で，G = 6，培養(+)
324	3 M	G = 2	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	4週前採取検体で，G = 4，培養(+)
326	2 M	G = 0	-	-	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	3週前採取検体で，G = 1

w : week, M : month, Y : year, G : ガフキー号数, *M. tb* : *M. tuberculosis*, nd : not done

体培地で培養陰性だったのに，本キットでは陽性の例が5例，5.2% (5/96) あり，既治療例では表9でみたように同様の例が15例，19.0% (15/79) 認められた。これら培養陰性で本キット陽性例の検査結果および臨床事項をみると，表10（未治療例）および表11（既治療例）のとおりである。これらについては，本キットで再検査が行われており，さらに念のため本キットとは別の遺伝子（Superoxide dismutase gene, SOD-gene）を標的とするPCR法でも検出を行っているが，SOD-PCRによる成績は本分析には加えず，参考に表示するにとどめた。

表10にみるように，未治療例では5例中3例は2日以内にはほかの検査法でも陽性となっており，既治療例では化学療法開始前には培養陽性で，治療開始後に培養陰性，本キットは陽性だったものが15例中10例あり，残り5例のうち塗抹陽性が2例，以前に塗抹陽性が2例，さらに，前日組織診断で結核と確定しているものが1例

であった。

2) 本キットでの陰性例

小川培地または液体培地では培養陽性で，本キットでは陰性だった例は，表5あるいは表9でみたように未治療例，既治療例各々に3例ずつ認められた。既治療例の3例中の1例は結核菌，ほかの2例は *M. avium* である。

これら症例の各検査の成績および臨床事項をみると，表12および表13のとおりである。表の改良抽出は，処理検体に洗浄試薬を加えて遠心する際，洗浄試薬 25 ml にラテックス試薬（オリゴテックスTM，日本合成ゴム，日本ロシュ）20 μl を加えて共沈効果と沈殿の可視化を試みたものである。この方法の成績も当分析には加えず，参考のためここに表示するにとどめた。

未治療例で本キット陰性の3例中2例は塗抹陽性であったが，小川培地では15コロニー以下の少数のコロニーのみが認められたものである。既治療の3例中2例は

表12 未治療, 従来培養法陽性, DDH=結核菌, 本キット陰性例

番号	治療	塗抹	小川	液体	DDH	アンプリコア	アンプリ.再検	SOD-PCR	改良抽出	備 考
120	無	G=2	+ ₅	+	<i>M. tb</i>	-	-	nd	<i>M. tb</i>	塗抹, 培養陰性の陈旧性結核
146	無	G=2	+ ₁₅	-	<i>M. tb</i>	-	-	nd	<i>M. tb</i>	同日採取検体で, G=0, 培養(+)
319	無	G=0	+ ₁	+	<i>M. tb</i>	-	-	nd	-	前日採取検体で, G=0, 培養(+)

G: ガフキー号数, *M. tb*: *M. tuberculosis*, nd: not done

表13 既治療, 従来培養法陽性, 本キット陰性例

番号	治療	塗抹	小川	液体	DDH	アンプリコア	アンプリ.再検	SOD-PCR	改良抽出	備 考
4	1M	G=0	+ ₄	+	<i>M. av</i>	-	-	nd	-	4週前採取検体で, G=0, 培養(+)
153	<2w	G=2	-	+	<i>M. tb</i>	-	-	nd	<i>M. tb</i>	1週後採取検体で, G=2, 培養(+)
218	1M	G=0	-	+	<i>M. av</i>	-	-	nd	-	2日前採取検体で, G=0, 培養(+)

w: week, M: month, G: ガフキー号数, *M. tb*: *M. tuberculosis*, *M. av*: *M. avium*, nd: not done

M. avium であり, いずれも液体培地では陽性であったが, 小川培地では1例で4コロニーを認めたのみであった。

付1 BALF 21例中, 培養, 本キットとも陽性は1例, 本キットのみ陽性は2例であった。この2例中の1例は同時採取の喀痰でも塗抹陽性, 他の1例は組織診で結核と診断されたものであった。

付2 主要分析から除外した25例について

研究成績の項の最初に述べたように, 総検体数349例

中25例は菌種の同定ができなかったため分析から除外した。このうち5例は培地の汚染・溶解のためDDHが不能だったものである。液体培地のみ陽性で増菌できず, DDHが不能だった16例の検査成績, 臨床事項は表14に, DDHと本キットの菌種同定結果が異なり, いずれとも決められなかった3例は表15に示した。また, 小川培地で菌は分離できたがDDHで判定基準を満たさず, 判定不能だった1例の検査成績は表16に示した。

表14 液体培養のみ陽性ながら, 小川培地で増菌培養できず, DDH実施不可だった例

番号	治療	塗抹	液体	DDH	培養液沈渣のアンプリ	アンプリコア	備 考
51	無	G=5	+	不可	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	
76	無	G=1	+	不可	-	-	1日前採取検体で, G=0, 培養(+)
81	24Y	G=0	+	不可	-	-	1日前採取検体で, G=0, 培養(+)
82	無	G=1	+	不可	-	-	過去25年間, 排菌・治療無し
106	無	G=0	+	不可	-	-	画像的に病巣認めず
167	2Y	G=4	+	不可	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	1日前採取検体で, G=8, 培養(+)
186	無	G=0	+	不可	-	-	1日前採取検体でも, G=0, 培養(-)
197	<2w	G=0	+	不可	-	-	1日前後の採取検体でも, G=0, 培養(-)
203	無	G=0	+	不可	-	-	BAL, 1日前の採取検体でも, G=0, 培養(-)
210	無	G=0	+	不可	-	-	学会分類「IV ₁ 」
234	無	G=0	+	不可	-	-	結核性胸膜炎, 肺内病巣無し
236	無	G=0	+	不可	-	-	学会分類「II ₁ 」, <i>M. kansasii</i> 分離
291	無	G=0	+	不可	-	-	1日前の採取検体でも, G=0, 培養(-)
311	2M	G=2	+	不可	-	-	
312	1M	G=0	+	不可	-	<i>M. tb</i>	
350	無	G=0	+	不可	-	-	1日後の採取検体で, G=0, 培養(+)

Y: year, w: week, M: month, G: ガフキー号数, *M. tb*: *M. tuberculosis*

表15 本キット陽性例で、DDHと不一致例

番号	治療	塗抹	小川	液体	DDH	アンプリコア	アンプリ.再検	SOD-PCR	改良抽出	備考
73	無	G=1	+ ₃₀ , + ₂	+	<i>M. tb</i> & <i>M.?</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	<i>M. tb</i>	2日前採取検体で、G=0、培養(+)
124	無	G=1	+ ₁₀ , + ₁₀	+	<i>M. tb</i> & <i>M. av</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	<i>M. tb</i> & <i>M. av</i>	
233	無	G=0	+ ₅	+	<i>M. int</i>	<i>M. tb</i>	<i>M. tb</i>	nd	<i>M. tb</i>	

w: week, M: month, G: ガフキー号数, *M. tb*: *M. tuberculosis*, *M. av*: *M. avium*, *M. int*: *M. intracellulare*, *M.?*: DDH 判定不能, nd: not done

表16 DDHで同定不可能、本キット陰性例

番号	治療	塗抹	小川	液体	DDH	アンプリコア	アンプリ.再検	SOD-PCR	改良抽出	備考
115	無	G=1	+ ₂	+	判定基準を満たさず	-	-	nd	nd	1週後採取検体で、G=0、培養(+), ナイアシン(-)

G: ガフキー号数, nd: not done

考 察

結核症はもちろん、すべての抗酸菌症の診断には、抗酸菌の検出、同定が最重要であることはここに述べるまでもない。わが国では従来、塗抹検査と小川培地による培養が専ら用いられてきたが、その検出率、検出までの時間には問題があった。

今回、PCR法を用いた抗酸菌の検出・同定キット（アンプリコア™ マイコバクテリウム、日本ロシュ）が開発されたので、その感度、特異性、問題点などを検討する目的で本研究を実施した。

1. 未治療例での成績

小川培地または液体培地のいずれかで陽性だったものを「培養陽性」として本キットの結果と比較した成績は表5にみたとおりでである。本キットによる抗酸菌DNAの検出・同定は迅速性に優れ、感度の面では小川培地での培養に勝り、液体培地による培養と比べてもまったく遜色のない成績であった。また、本キットのみ陽性の5例も、少なくとも3例は表10でみたように、本キットの偽陽性とは言い難いと考えられた。未治療例では、真の意味の偽陽性は極めて少なく、治療前の検査法として極めて有用性の高いものであると結論できよう。

2. 既治療例での成績

既治療例では表9でみたように、本キットの感度は未治療例と同様、極めて高いが、特異性が63~80%とやや低い点が注目された。しかし、既治療例では化学療法により、菌自体が増菌能力を失い、あるいは減退している可能性があるし、本キットが死菌のDNAを検出している可能性も考えられた。表11に示した各症例の詳細もこの考え方を支持している。

既治療例について、塗抹、小川、液体培地および本キットの成績の関係を表6でみたが、本キットによる抗酸菌DNAの検出・同定は、既治療例においても感度の面では現行の培養法に比べて遜色なく、検査に要する時間ははるかに短い点で優れた方法と考えられた。

3. 菌種同定不能で除外した例

349検体中25検体は、培地汚染、増菌不能、あるいは、菌種同定で結論が得られなかったため分析から除外した。これらのうち、菌は分離できたがDDHで同定できなかった1例（表16）は、DDHで同定可能な18菌種以外の菌種と考えられたが、これ以上の検討はできなかった。

アンプリコアとDDHで菌種の判定が一致しなかった3例（表15）中の2例は、培養で2種類の異なる抗酸菌が検出されたものである。本キットでは結核菌のみが検出されている。

液体培地の培養液の遠心沈渣で抗酸菌を認めたが、小川培地では増菌できず、したがってDDHが行えなかったものが16例みられたことは表14にみたとおりでである。液体培地で培養後にも小川培地で増菌不能だった菌について今回はこれ以上の検討は行わなかったが、これら16例中14例は培養液の遠心沈渣を用いた本キットでも陰性であった。

これら菌種同定が不能または不一致だったものは数が少なく、主な分析から除外しても結論には影響しないと考えられたが、今後さらに検討が必要であろう。

4. 本キットの特徴

本キットは、臨床検体から直接DNAを抽出し、PCR法を利用して抗酸菌の遺伝子を増幅し、各菌種に特異的なDNAプローブを固相化したマイクロウエル

プレート上でハイブリダイゼーションさせ菌種の鑑別・同定を行うものである。増幅の対象となる遺伝子は、ゲノム中の16S rRNAの配列で、抗酸菌の菌種間で保存された領域 (conserved region) に相補的な配列を持つ1組のプライマーで増幅する。その後、菌種に特異的な領域 (specific region) に相補的な配列を持つプローブで鑑別する。本キットの特徴を列挙すると次のとおりである。

① 検体採取から菌種判定まで5~6時間と極めて短時間に終了する。20検体/バッチの実際所要時間は、検体前処理30分、DNA抽出60分、増幅115分、検出・判定135分であった。従来法に比し極めて短時間で判定できる。

② PCR法に必要な試薬 (プライマー、酵素、基質など) がすべて事前に調整されたアンプリミックスとして供されるため、調合ミスや汚染を最小限におさえ得る。また、液状試薬で半年以上の有効期限があるので日常検査に好都合である。

③ 1検体につき1増幅反応でありながら、3種類の抗酸菌DNAを同時検出・鑑別できるパネルアッセイを採用している。これまでは、培養時の集落の外観で菌種のおよその予測を行い、確定にはコロニー毎にDDHなどを行う必要があった。1検体につき1増幅反応で複数の抗酸菌が同定可能なキットは現代では他に類をみない。

④ PCRでは、以前に増幅されたDNAのcarry over contaminationによる「偽陽性」が、試薬成績の信頼性上で大きな問題となっている。本キットでは、基質として通常のdTTPの代わりにdUTPを用い、マスターミックスにuracil-N-glycosylase (UNG)を導入する⁸⁾ことで、以前に増幅されたDNAを特異的に分解するシステムを導入し、この偽陽性問題をほぼ解消している。日常、検査室で、増幅したDNAを逐次完全に分解してコントロールすることは事実上不可能であり、本システムは遺伝子増幅を伴う検査技術には必須のものと考えられる。

PCR法を利用した菌検出は、現状では菌数の多少にかかわらず陽性となること、死菌でも生菌と同様に陽性とされることなどの問題があり、これらについては今後の検討が必要であろう。しかし、PCR法の最大の欠点とされた偽陽性の問題はほぼ解決し、感度、特異性ともに極めて優れ、しかも短時間で検出・同定を行うことができる本キットは、結核およびほかの抗酸菌症の診断に極めて有用なものであると考えられた。

結 語

1. PCR・マイクロウェルプレート (MWP) ハイ

ブリダイゼーション法を用い抗酸菌DNAを増幅して検出、同定する目的で開発されたキット (アンプリコア™ マイコバクテリウム, 日本ロシュ) の臨床的諸問題を検討するため共同研究を行った。本キットは、結核菌、*M. avium*, および *M. intracellulare* を検出し、鑑別・同定するものである。

2. 未治療の結核または、同疑い例の主として喀痰167検体、既治療例157検体について、塗抹検査、小川培地および7H9変法液体培地での培養、ならびに本キットでの検出を行った結果、感度、特異性ともに小川培地より優れ、液体培地と比較しても遜色ないものであることが確認できた。

3. PCR法で問題となる偽陽性は未治療例ではほとんど認められず、実際上問題になるとは考えられなかった。

4. PCR法では、発育不良の菌あるいは死菌も生菌と同様に検出するので既治療例では特異性が63~86%とやや低かった。これらの臨床的意義については今後なお検討が必要であろう。

5. 本キットによる抗酸菌の検出・同定は、検体採取から判定まで5~6時間で完了でき、結核症またはほかの抗酸菌症の診断に極めて有用であると考えられた。

文 献

- 1) 斎藤 肇, 富岡治明, 重藤えり子, 他: MBチェックシステムによる抗酸菌の迅速診断法. 結核. 1992; 67: 535-538.
- 2) Roberts GD et al.: Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of Mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J Clin Microbiol. 1983; 18: 689-696.
- 3) Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E: Fluorometric deoxyribonucleic acid deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotope are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int J Syst Bacteriol. 1989; 30: 224-229.
- 4) Saiki R, Scharf S, Amheim N et al.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle cell anemia. Science. 1985; 230: 1350-1354.
- 5) Zaaijer HL, Cuypers HTM, Lelie PN et al.:

- Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet*. 1993 ; 341 : 722-724.
- 6) Loeffelholz MJ, Lewinski CA, Dragon EA et al. : Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992 ; 30 : 2847-2851.
- 7) Kent PT et al. : A guide for the level III laboratory. *Public Health Microbiology*. 1985 ; USA-CDC.
- 8) Longo MC, Berninger MS, Hartley JL et al. : Use of uracil-N-glycosylase (UNG) to control carry-over contamination in PCR. *Gene*. 1990 ; 93 : 125-128.