

原 著

結核菌の迅速検出のための MTD の評価に関する共同研究

阿 部 千代治 ・ 森 亨

結核予防会結核研究所

藤 井 英 治 ・ 浅 場 ますみ

株式会社エスアールエル

宇田川 宏 和

株式会社大塚東京アッセイ研究所

岡 澤 和 恵

株式会社シオノギバイオメディカル東京ラボラトリー

日 吉 末 広 ・ 星 野 和 夫

株式会社ビー・エム・エル

芦 原 義 久 ・ 坂 井 康 郎 ・ 成 澤 忠

株式会社三菱化学ビーシーエル

受付 平成 7 年 3 月 28 日

受理 平成 7 年 5 月 24 日

REPRODUCIBILITY OF MTD SYSTEM FOR DETECTION OF *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS : A COOPERATIVE STUDY
AMONG SIX LABORATORIES

Chiyoji ABE*, Toru MORI, Eiji FUJII, Masumi ASABA, Hirokazu UTAGAWA,
Kazue OKAZAWA, Suehiro HIYOSHI, Kazuo HOSHINO,
Yoshihisa ASHIHARA, Yasuo SAKAI
and Tadashi NARISAWA

(Received 28 March 1995/Accepted 24 May 1995)

The Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (MTD) is a rapid

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.

test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*, utilizing the rRNA amplification method. For assessing the reliability and reproducibility of the method, a co-operative blind study was conducted among 6 laboratories. Materials for test were sputum and water samples containing known numbers of *Mycobacterium bovis* BCG or *Mycobacterium avium*, and samples without bacteria. From three of 6 laboratories, false-positive results were reported for bacteria negative samples, however, the ratio was below 10% ; 8.3% (3/36 samples), 5.6% (2/36), and 2.8% (1/36), respectively. It indicates the indispensability of negative controls for sample pretreatment and RNA extraction stages in the routine MTD test. In every laboratory, all the samples with 10^2 BCG in water and 10^4 BCG in sputum were found to be MTD positive. For the sputum samples with 10^2 BCG, positive results with the ratio above 80% were reported from 4 laboratories. These results indicate that the MTD test based on rRNA amplification method is quite useful for the rapid diagnosis of *M. tuberculosis* infection.

Key words : rRNA amplification method (MTD), Detection of *M. tuberculosis*, Co-operative blind study

キーワード : rRNA 増幅法 (MTD), 結核菌の検出, 盲検共同研究

はじめに

非結核性抗酸菌症の増加, HIV 感染 (エイズ) に伴う抗酸菌症¹⁾ など抗酸菌症はこれまでとは大きく様変わりしてきており, 分離培養を含む抗酸菌の検出の面でより有効な方法が要求されるようになった。液体培地を基礎とした二相性 MB-チェックを用いることにより従来からの卵培地を用いる小川法に比べ患者材料からの結核菌の分離率を有意に高める²⁾ ことが可能になった。しかしそれでも検出までには2週間以上を要する。

ここ数年核酸増幅法による結核菌の迅速検出の報告³⁾⁻⁸⁾ がされている。迅速診断法としての有効性と同時に偽陽性, 偽陰性例も報告されており, 日常検査への導入には疑問があった。昨年わが国で2社より核酸増幅法による臨床材料からの結核菌検出のためのキットが発売された。これらキットの有効性と再現性を検討する目的で共同研究を実施した。この研究ではすでに多くの施設で臨床検査項目に取り入れている DNA プローブ「中外」-MTD を評価した。安全性の点から研究には毒力の強い結核菌の使用を避け, *M. bovis* BCG を用いた。

材料と方法

1) 共同研究参加施設

MTD システムによる検査をすでに検査項目に取り入れている5検査センター, 株式会社エスアールエル, 株式会社大塚東京アッセイ研究所, 株式会社シオノギバイ

オメディカル東京ラボラトリー, 株式会社ビー・エム・エル, 株式会社三菱化学ビーシーエルと結核予防会結核研究所の6施設が共同研究に参加した。

2) 喀痰

非感染性呼吸器疾患患者から得られた誘導喀痰を用いた。喀痰は採取後ただちに染色, 培養, 核酸増幅法により結核菌の存在をチェックし, 残りは -30°C に凍結保存された。使用時に喀痰はプールされ, マグネティックスターラーで均一化の後連続分注器で $200\ \mu\text{l}$ ずつスクリュウキャップ付きチューブ ($1.5\ \text{ml}$) に分注された。血液成分は核酸増幅反応を阻害することが知られていることから, 血液の混入が肉眼的に観察された喀痰は除かれた。喀痰の分注操作は同一の条件下に安全キャビネットの中で行われた。

3) 使用水

フィルターろ過超純水 (オルガノ, ピューリック R 型) を実験に用いた。超純水は採取後高圧蒸気滅菌を行い使用時まで保存された。

4) 使用菌と材料の調製

実験には *Mycobacterium bovis* BCG 日本株と *Mycobacterium avium* 臨床分離株1株を用いた。菌はミドルブルック 7H9 液体培地で培養された。培養7~14日目の全培養から McFarland No.0.5 濁度の菌液とその1:100希釈菌液を調製した。連続分注器を用い菌液を分注し, 次の7種の検査材料を調製した。(1) 喀痰のみ, (2) 喀痰+ 10^2 個のBCG, (3) 喀痰+ 10^4 個のBCG, (4) 喀痰+ 10^3 個の *M. avium*, (5) 喀痰+ 10^3 個

の *M. avium*+10² 個の BCG, (6) 超純水, (7) 超純水+10² 個の BCG

材料は調製後直ちに-20°Cに保存され、冷凍状態で各施設に輸送され、各施設では使用時まで-20°Cに保存された。

5) 材料の前処理

喀痰材料の前処理は米国の CDC が喀痰材料の前処理に推奨しており、このキットでも指示されている N-アセチル-L-システイン・NaOH 法 (NALC-NaOH)⁹⁾ で行われた。喀痰材料 (200 μl) に 200 μl の NALC-NaOH 液を加え、チューブミキサーで混和後室温で 15 分間処理した。500 μl の 0.067 M リン酸緩衝液を加え混和後微量高速遠心機で 10,000~12,000 RPM で 10 分間遠心した。上清を注意深く捨て、1 ml のリン酸緩衝液を加え混和後再度同じ条件で遠心濃縮した。沈渣を 200 μl の超純水に懸濁し、その 50 μl を溶菌のステップに用いた。超純水材料については前処理の工程を省いた。

6) MTD による増幅と増幅 RNA の検出

キットのマニュアルに従い増幅および検出の操作を行った。施設 F は検出にリーダー I を用いたが他の 5 施設ではリーダー 450 を用いた。

結 果

1) 試験のための施設および設備

核酸増幅法を日常の臨床検査に取り入れる上で、その目的にあった施設および設備の確立はバイオハザード対策並びに検査の精度を保つ上で重要である。

前処理のための部屋の構造について、6 施設すべてが陰圧の部屋でその中に安全キャビネットを設置し処理を行っていた。遠心操作はエアゾール発生の危険の高い作業の一つである。施設 A, B, F の 3 施設はバイオハザード対策遠心機を備え、前処理に使用していた。

このキットは増幅から増幅産物の検出まで一連の操作になっており、その操作中に反応チューブから他のチューブへの反応液の分注作業はない。そのためすべての施設が増幅と検出と同じ部屋で行っていた。5 施設は前処理室と増幅・検出室を別室にしていたが施設 C は同室で行っていた。

作業場所をクリーンに保つことは重要である。核酸の汚染の除去には塩素系の薬剤が効果的である。6 施設すべてが塩素系の薬剤を汚染除去に用いていた。他には消毒用アルコールも用いられていた。5 施設は使用前後に作業場所や使用器具を薬剤で消毒していた。1 施設は作業後のみ行っていた。また使用済みのチップなどは塩素系の薬剤 (有効塩素濃度約 1%) の中に少なくとも 1 時間以上放置後に廃棄していた。作業着はそれぞれの部屋専用としていた。

2) MTD による結核菌の検出

MTD システムの評価のために次のように超純水または喀痰に種々の濃度に菌を含む材料が調製された。超純水のみ 15 検体、超純水+10² 個の BCG 15 検体、喀痰のみ 15 検体、喀痰+10² 個の BCG 21 検体、喀痰+10⁴ 個の BCG 15 検体、喀痰+10³ 個の *M. avium* 6 検体、喀痰+10³ 個の *M. avium*+10² 個の BCG 5 検体の計 92 検体が各施設に送付された。各施設において材料と方法に記載された方法で MTD 試験が行われた。

BCG を含まない超純水のみで 3 施設は偽陽性の報告をした。1 施設は 15 検体の中の 3 検体 (20%) を、2 施設はそれぞれ 1 検体 (6.7%) を MTD 陽性と報告した (表 1)。超純水+10² 個の BCG 15 検体ははず

表 1 水材料の MTD 陽性数の施設別比較

施設	BCG の CFU 数 (材料数)	
	0 (15)	10 ² (15)
A	0	15
B	3	15
C	1	15
D	1	15
E	0	15
F	0	15

れの施設もすべて陽性であった。また得られた化学発光強度 (RLU) もすべて高い値であった (成績省略)。

喀痰材料の検出成績を表 2 に示した。共同研究参加 6 施設の中で 1 施設は BCG を加えていない喀痰材料 21 検体 (喀痰のみ 15 検体、喀痰+*M. avium* 6 検体) 中の 1 検体を MTD 陽性と報告したが他の 5 施設は 21 検体すべてを陰性と報告した。10⁴ 個の BCG を含む喀痰材料はいずれの施設もすべて陽性であった。試験喀痰材料中に 10² 個の BCG を含む 21 検体の成績を表 3 に示したが、このように BCG の数が少ない検体では施設により成績が異なった。特に施設 B は 26 検体の中で 12 (46%) は MTD 試験陰性であった。これに対し施設 C, D, E, F の 4 施設は検体の 80% 以上に MTD 陽性の結果を得た。成績は示さなかったが、10⁴ 個の BCG を加えた材料ではすべてがリーダー 450 で 200~300 万の RLU 値を、またリーダー I で 100 万以上の値を示したのに対し、含まれる菌数が少ない例では 50 万以下の値が多数みられた。なお *M. avium* は MTD 試験に影響を示さなかった。

表2 喀痰および *M. avium* を含む喀痰材料のMTD陽性数の施設別比較

施設	喀痰中のBCGのCFU数(材料数)			<i>M. avium</i> を含む喀痰中のBCGのCFU数(材料数)	
	0(15)	10 ² (21)	10 ⁴ (15)	0(6)	10 ² (5)
A	0	15	15	0	4
B	0	13	15	0	1
C	0	20	15	1	5
D	0	20	15	0	5
E	0	19	15	0	5
F	0	16	15	0	5

表3 BCGを10²個含む喀痰材料のMTD試験

材料	施設A	施設B	施設C	施設D	施設E	施設F
1	196,864 *	228,317	106,517	16,120	1,322,630	69,925
2	523,766	31,770	813,185	127,824	644,600	6,278
3	15,589	61,745	190,194	665,479	30,883	9,774
4	15,723	373,855	568,856	242,210	471,155	145,253
5	483,599	839,653	435,300	51,033	926,867	84,285
6	36,984	24,302	251,706	116,951	634,235	68,829
7	313,263	17,620	589,051	873,762	382,713	165,797
8	113,781	21,197	391,420	53,571	712,948	163,037
9	26,294	24,864	741,784	330,388	771,995	102,217
10	284,114	14,973	42,511	210,131	745,268	78,956
11	24,747	5,690	1,365,374	633,786	347,091	45,932
12	109,026	19,769	844,557	130,561	765,728	23,066
13	16,944	10,952	469,961	608,719	267,314	39,543
14	29,323	137,063	213,857	1,218,651	568,429	68,454
15	122,502	55,654	108,402	202,891	636,379	21,188
16	149,945	75,378	276,385	231,259	103,672	114,677
17	138,664	732,937	1,872,889	615,836	5,688	51,735
18	1,831,653	1,289,819	570,879	46,640	155,975	50,113
19	158,896	119,756	2,454	819,549	26,768	61,772
20	125,377	2,381,127	411,646	58,186	436,504	13,525
21	305,794	47,309	204,032	393,321	140,159	107,221

* Relative Light Units

考 察

十数年前と比べ結核の様子も様変わりしてきており、それに伴い結核の迅速診断の要求性も高まってきた。近年核酸増幅法が結核の診断に有効である³⁾⁻⁸⁾とする成績が多数報告されている。同時に核酸の汚染からくる偽陽性、増幅反応の阻害物質の存在からくる偽陰性についても報告されている。オランダのグループにより計画さ

れた国を越えてのPCRの評価に関する共同研究¹⁰⁾は各国で独自に開発された結核菌検出のためのPCRには感度と特異性に大きな差があることを示している。それゆえ核酸増幅法を日常の臨床検査に導入する前に多くの研究者の評価が要求される。

核酸増幅法を用いた結核菌の検出のためのキットが現在わが国で2社より発売されている。これらのキットを臨床検査に応用する上で感度と特異性が十分であるかど

うかを調べる目的で共同研究が計画された。この研究ではこれまでに多くの施設で臨床検査項目に取り入れており、しかもすでに試験の例数も多いMTDシステムが選ばれ評価された。

日常検査において材料は15mlのチューブに採取され、その中で前処理される。この研究では材料の保存ならびに輸送の都合から日常の検査で行われている方法の一部が変更された。すなわち喀痰は1.5mlのスクリーキャップ付きチューブに分注され、輸送され、材料と方法に記載された方法で各施設において前処理された。

10²個のBCGを含む材料を試験したとき、前処理が省かれた超純水材料では試験された材料すべてがMTD陽性で、しかも高いRLU値(リーダー450で測定したとき300万前後、リーダーIで100万以上のRLU値)を示した(成績省略)。これに対しNALC-NaOH法で前処理された喀痰材料では50万以下のRLU値を示した例が多数みられ、施設によってはカットオフ値前後のRLU値を示し再試験の必要な例がみられた。これらの結果は、喀痰材料については増幅酵素の阻害物質の存在は否定できないが、遠心操作を含む前処理法が結核菌の検出感度を高める上で重要であることを示している。しかしこれまでの報告と比べ高い感度を示したことはNALC-NaOH法はMTDのための前処理に有効であることを示している。

Noordhoekらの共同研究¹⁰⁾において前処理、核酸の抽出精製、増幅、検出は研究者独自の方法で行われた。増幅酵素の阻害物質を含まない水材料を試験した時10²個のBCG(10³個のBCGから抽出されたDNAの10~20%が反応に用いられた)が存在する材料の検出感度は60~80%であった。今回のMTD研究で同じ10²個のBCGを含む水材料を試験したとき、その検出感度は100%であった。このことはMTDシステムの検出感度はこれまで報告されたPCRと比べていくぶん高いことを示している。この研究では詳しい検討はしなかったが喀痰材料については10²個の菌がMTDシステムの検出限界と考えられる。

超純水のみで3施設、喀痰材料で1施設は偽陽性の報告をした。偽陽性の結果の原因は明らかでない。増幅および検出の陽性および陰性コントロールはMTDキットに含まれている。しかし材料の前処理、核酸の抽出の工程における汚染のチェックはキットに含まれていない。偽陽性が1施設ではBCGを含んでいない材料の8.3%(3/36)にもみられたことは前処理、核酸の抽出工程のチェックのための陰性コントロールは必須であることを示している。

同じ臨床材料の検査に同じキットを用いても施設により得られた検出感度と特異性に差がみられた。報告され

た部屋の構造、設備や使用器具、汚染の防止方法に大きな差がみられないことから前処理を含む増幅操作に施設間で違いがあることが考えられる。しかし1施設を除く5施設では、感度および特異性の両者とも良好な成績を示した。このことは結核の診断のための補助手段としてMTDシステムは有効であることを示している。

塗抹陽性患者は感染源となる危険が高いのみならず、これらの患者から感染を受けた場合には塗抹陰性患者からの感染よりも発病率が高い¹¹⁾といわれている。理論的には、定量的に核酸増幅法を行うことは可能である。しかし現在市販されているキットは結核菌を定量的に測定できない。このことは結核の対策をする上で塗抹検査は省くことができない検査であることを示唆している。

抗結核薬に対する耐性に関与する遺伝子について研究が進められてきている。しかし日常検査に利用できるほどの遺伝的情報¹²⁾の蓄積はまだない。非結核性抗酸菌による感染症が少しずつ増えている。これら菌種の間で治療は異なることから正しい治療をする上で菌種の同定は重要である。これらのことは、培養試験は臨床の場では今なおその重要性を失っていないことを示している。

日常の臨床検査への核酸増幅法の導入に関して議論はあまりされていない。上述の理由から、結核の対策および治療の上で、従来からの塗抹検査と培養検査を省くことはできない。喀痰以外の材料からの結核菌の検出は稀である。増幅酵素阻害物質の存在の問題は残るがこれらの材料への核酸増幅法の導入は結核の診断に有効である。外国ではエイズに伴う結核が増加¹⁾しており、エイズ患者においては結核の病変の進展が早いことから、核酸増幅法を含む迅速な診断が要求される。また呼吸器疾患の診断に当たって、結核性疾患か否かの確定診断が早急に要求される例が多数ある。検出感度が高くしかも迅速に結果が出る核酸増幅法のこれらの例への導入は有効である。しかし塗抹陽性例については、液体培地を使用することにより早急に結果が得られる²⁾ことから、核酸増幅法の導入の価値は低いといえるのではなからうか。今後この点に関しては、引き続き議論が必要であると考えられる。

謝 辞

この研究は平成6年度厚生省健康政策調査研究の補助のもとに行われた。喀痰を分与くださった複十字病院水谷清二先生、小松優子先生、国立療養所東京病院町田和子先生、MTDキットを分与下さった中外製薬株式会社に深謝致します。

文 献

- 1) Snider DE, Roper WL : The new tuberculosis. N Engl J Med. 1992 ; 326 : 703-705.
- 2) Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al. : Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 878-881.
- 3) Pao CC, Lin SS, Wu SY, et al. : The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical specimens with cloned *Mycobacterium tuberculosis* DNA as probes. Tubercle. 1988 ; 69 : 27-36.
- 4) Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, et al. : Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet. 1989 ; ii : 1069-1071.
- 5) Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, et al. : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 2567-2575.
- 6) Abe C, Hirano K, Wada M, et al. : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. J Clin Microbiol. 1993 ; 31 : 3270-3274.
- 7) 青柳昭雄, 豊田丈夫, 大角光彦, 他 : 核酸 (rRNA) 増幅を応用した結核菌直接検出法 (Gen-Probe ; MTD) の臨床的検討—小川培地と液体培地 (MB チック) との比較を中心として—. 結核. 1994 ; 69 : 7-14.
- 8) 青木正和, 片山 透, 山岸文雄, 他 : 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. 結核. 1994 ; 69 : 593-605.
- 9) Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, et al. : Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1963 ; 87 : 775-779.
- 10) Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G, et al. : Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* : a blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol. 1994 ; 32 : 277-284.
- 11) Grzybowski S, Barnett GD, Styblo K : Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. Bull IUAT. 1975 ; 50 : 90-106.
- 12) 阿部千代治 : 多剤耐性結核. 臨床と微生物. 1994 ; 21 : 675-679.