

原 著

核酸 (ribosomal RNA) 増幅を利用した結核菌
検出法の臨床的有用性に関する検討

大 角 光 彦 ・ 豊 田 丈 夫
川 城 丈 夫 ・ 青 柳 昭 雄

国立療養所東埼玉病院内科

受付 平成8年6月25日

受理 平成8年8月12日

EVALUATION OF A NEW DETECTION METHOD OF *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS IN CLINICAL SPECIMENS BY AMPLIFICATION OF
RIBOSOMAL RNA AND ITS CLINICAL APPLICATION

Mitsuhiko OSUMI*, Takeo TOYODA,
Takeo KAWASHIRO and Teruo AOYAGI

(Received 25 June 1996/Accepted 12 August 1996)

A new rapid *M. tuberculosis* detection method, the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (MTD), which allows direct detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens by amplification of *M. tuberculosis* ribosomal RNA (rRNA), was evaluated.

In the present study, MTD and conventional smear and culture examinations were performed on 225 sputum, 36 pleural fluid (PF), nine cerebrospinal fluid (CSF) and 41 bronchoalveolar lavage fluid (BALF) specimens.

Among 225 sputum specimens from 132 patients, 20 culture-negative specimens from 14 patients and one specimen which was culture-positive for *M. fortuitum* on Ogawa's egg medium were MTD-positive.

On the other hand, there were 6 *M. tuberculosis* culture-positive but MTD-negative specimens from 6 patients. The amount of bacilli in all six cases, however, was very few. The sensitivity of *M. tuberculosis* detection by MTD, as compared with Ogawa's egg medium and MB-Check, was 93 and 92%, respectively, in sputum specimens, and the specificity of MTD was 80 and 85%, respectively. Taking into account not only culture-positive specimens but also MTD-positive specimens from patients clinically diagnosed as active tuberculosis, the sensitivity and specificity of MTD were 93% and 99%, respectively.

Among 36 PF specimens from 31 patients, of which 20 specimens from 16 patients were clinically diagnosed as tuberculous, only 4 from 4 patients were culture-positive for *M. tuberculosis* while 7 from 5 patients were MTD-positive.

* From the Department of Internal Medicine, National Higashi-Saitama Hospital, 4147 Kurohama, Hasuda-City Saitama 349-01 Japan.

The results of MTD in 9 CSF specimens coincided well with those of MB-Check, but one MTD-positive specimen yielded a false-negative result with Ogawa's egg medium.

Among 41 BALF specimens from 39 patients, only one was culture-positive while one culture-positive and 7 culture-negative specimens were positive on MTD. All these MTD-positive patients were later verified as having pulmonary tuberculosis either by transbronchial lung biopsy and other examinations, or by the clinical course of the disease, particularly the response to anti-tuberculosis drugs.

Inconsistent results were seen in 21 sputum specimens from 15 patients, 4 PF specimens from 3 patients and 7 BALF specimens from 7 patients, all of which were culture-negative for *M. tuberculosis* but MTD-positive. None of these patients had any clinical findings inconsistent with diagnosis as tuberculosis.

It was noted that MTD was very useful for rapid detection of *M. tuberculosis* in sputum as well as other clinical specimens.

We observed the clinical course of 20 pulmonary tuberculosis patients by monthly examinations of sputum, using smears, Ogawa's egg medium, MB-Check and MTD. MTD-positivity rates fell down in parallel with decreased pulmonary tuberculous activity. During the clinical course, out of 61 MTD-negative specimens only 4 (6.6%) were culture-positive for *M. tuberculosis*, while out of 63 smear-and-culture-negative specimens 6 (9.5%) were MTD-positive.

These data suggest that MTD is useful to assess the clinical activity and course of tuberculosis.

Key words : rRNA amplification, MTD, *Mycobacterium tuberculosis*, SPCN

キーワード : リボソーム RNA 増幅, MTD, 結核菌, 塗抹陽性培養陰性

はじめに

結核症の診断は検体中の結核菌を証明することにより確定する。しかし結核の統計¹⁾によると新規登録結核患者の中で、培養を含め菌陽性者は約42% (1993年度)に過ぎず、残りの約60%の患者は臨床症状、ツベルクリン反応、画像所見、炎症反応などにより診断されている。現在まで結核菌検査法として塗抹、培養、同定、耐性検査が通常行われてきたが、感度、迅速性において決して満足できるものではなかった。

最近同定検査に使用されている DNA プローブ法は抗酸菌が少量であっても同定が可能であり、これによって抗酸菌同定がより迅速にできるようになった²⁾。しかし、同定には $10^5 \sim 10^6$ CFU の菌数が必要であり³⁾、このプローブを使用して検体中の抗酸菌を増菌することなしに直接証明する試みが行われたが、塗抹で Gaffky 3号以上の菌量がないと陽性を示さなかった⁴⁾。

そこで検体中の抗酸菌の核酸を増幅することによって、増菌することなしに検体より直接、迅速に抗酸菌を検出する方法が検討された^{5)~9)}。現在わが国では検体中の ribosomal RNA (rRNA) を増幅して測定する方法

(Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test, 中外, 以下 MTD と略す; 結核菌群のみを検出) と DNA を polymerase chain reaction (PCR) により増幅して検出する方法 (アンプリコア™ マイコバクテリウム, ロッシュ, 以下アンプリコアと略す; 結核菌群・*Mycobacterium avium*・*M. intracellulare* を検出) が検討され^{10)~12)}、1994年より臨床の場で用いられるようになった。

これら核酸増幅法の欠点は carryover あるいは大気中の抗酸菌の混入による偽陽性の存在である¹³⁾¹⁴⁾。そのためこれら核酸増幅法の臨床応用および結果の解釈には慎重であるべきとの意見が出されている¹⁵⁾¹⁶⁾。

われわれは1994年、MTD を塗抹および培養と比較した成績を報告した¹⁰⁾。その後被験検体数を増し、また喀痰以外の検体についても MTD を施行した¹⁷⁾。それらの中において、培養と MTD の結果が一致しないケースが少なからず認められた。

今回われわれは、かかる不一致例の臨床的意義を明らかにする目的で、培養陰性で MTD 陽性例あるいは培養陽性で MTD 陰性例について検討を行った。また MTD が治療効果の指標になりうるか否か、MTD 測定

値と排菌量との相関についても検討を行い、核酸増幅法の臨床的有用性について研究を行ったので報告する。

対 象

国立療養所東埼玉病院において、結核が疑われた症例、もしくは鑑別診断にあげられた症例、あるいは結核と診断された後の治療経過で抗酸菌検査に提出された喀痰225検体(132症例)、胸水36検体(31症例)、髄液9検体(9症例)、気管支洗浄液と気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid, 以下BALFと略す)41検体(39症例)を対象とした。この中には複数回MTDを施行した症例も含まれている。

また、肺結核患者20症例について、経時的に喀痰の塗抹、培養およびMTD検査を施行した。内訳は、入院時より調査したもの14例、入院1カ月後より2例、その他4例であった。この20症例の延べ総検体数は105検体であった。

研究 方法

1. 塗抹・培養法

検体をスライドグラスに塗抹し、蛍光法による塗抹検査を行った。次にNALC-NaOH液(2.94% Sodium Citrate 50ml + 1N NaOH 50ml + N-acetyl-L-cystein 0.25g)を用いて、すでに報告した方法¹⁰⁾で前処理を施した検体を2本の小川K培地(極東、以下小川と略す)のそれぞれに0.1ml、液体培地(MB-Check, 日本ベクトンディキンソン)に0.2ml接種した。残りは1mlのチューブに移して-20℃にて保存し、50μlをMTD検査に供した。

小川およびMB-Checkとも8週間観察し判定を行った。小川、MB-Checkの双方または一方で抗酸菌が検出された場合を培養陽性とし、両者とも抗酸菌陰性の場

表1 小川培地とMTDの比較成績(喀痰225検体)

小川培地		塗 抹	MTD
-	146	-123 + 23	-114 + 32
+	<i>M. tuberculosis</i>	- 12 + 42	- 4 + 50
	<i>M. avium complex</i>	- 12 + 4	- 16 + 0
	そ の 他	- 0 + 6	- 5* ¹ + 1
汚 染	3	- 2 + 1	- 2 + 1
total	225	225	-141 + 84

#1: 小川培地で *M. fortuitum* が検出された検体が MTD 陽性を示した

合を培養陰性とした。

2. 同 定 法

培養によって得られた集落は、一部の検体を除き、特異的 DNA プローブを用いて同定する方法(Accuprobe法, 中外)およびマイクロプレートハイブリダイゼーションにより菌種を同定する方法(DDH マイコバクテリア‘極東’, 極東)により同定した。

ただし小川、MB-Checkともに陽性の検体のうち1検体はAccuprobe法で結核菌群および *M. avium* Complexを否定され、またMB-Checkのみ陽性の検体のうち10検体はAccuprobe法で結核菌群を否定され、それ以後の同定がなされなかった。

3. MTD測定¹⁰⁾

増幅はrRNAを標的とし、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性、RNaseH活性およびDNA依存性DNAポリメラーゼ活性の3つの酵素活性を持つ逆転写酵素ならびにDNA依存性RNAポリメラーゼを用いた。この増幅産物をアクリジニウムで標識された結核菌群に特異的なDNAプローブを用いたhybridization protection assay (HPA)により検出した。判定は化学発光強度で行い、30,000 relative light unit (RLU)以上を陽性とした。

今回、塗抹および培養検査は国立療養所東埼玉病院細菌検査室で行い、MTDの測定はblindにて中外製薬診断薬事業部で行われた。

研究 結果

1. MTDと培養法との比較成績

1) 喀痰(表1, 2)

小川で結核菌が検出された54検体中50検体はMTD

表2 MB-CheckとMTDの比較成績(喀痰225検体)

MB-Check		塗 抹	MTD
-	131	-115 + 16	-107 + 24
+	<i>M. tuberculosis</i>	- 15 + 50	- 5 + 60
	<i>M. avium complex</i>	- 11 + 4	- 15 + 0
	そ の 他	- 0 + 3	- 3 + 0
未同定* ¹	11	- 8 + 3	- 11 + 0
total	225	225	-141 + 84

#1: DNAプローブ法(Accuprobe)により結核菌群を否定された検体

表3 胸水の検査成績 (36検体)

塗抹	小川培地 ^{#1} and/or MB-Check	同 定	MTD	
			+	-
+ 2	+ 2	<i>M.tuberculosis</i> 2	2	0
		NTM ^{#2} 0	0	0
	- 0	0	0	0
-34	+ 2	<i>M.tuberculosis</i> 2	1	1
		NTM ^{#2} 0	0	0
	-32	32 ^{#3}	4	28
total		36	7	29

1 : 小川培地, MB-Check の双方あるいはいずれか一方で抗酸菌が検出された場合を (+)

2 : non-tuberculous mycobacteria

3 : 結核を否定された16検体を含む

表5 BALF の検査成績 (41検体)

塗抹	小川培地 ^{#1} and/or MB-Check	同 定	MTD	
			+	-
+ 3	+ 2	<i>M.tuberculosis</i> 0	0	0
		NTM ^{#2} 2	0	2
	- 1	1	1	0
-38	+ 2	<i>M.tuberculosis</i> 1	1	0
		NTM ^{#2} 1	0	1
	-36	36	6	30
total		41	8	33

1 : 小川培地, MB-Check の双方あるいはいずれか一方で抗酸菌が検出された場合を (+)

2 : non-tuberculous mycobacteria

陽性であり, 小川陰性であった146検体中32検体がMTD陽性であった。また, 小川で結核菌以外の抗酸菌(non-tuberculous mycobacteria, 以下NTMと略す)が検出された検体が計22検体存在し, うち21検体はMTD陰性であったが, *M.fortuitum* の1検体がMTDで陽性を示した。

同様にMB-Checkによる培養で結核菌が検出された65検体中60検体はMTD陽性であり, MB-Check陰性の131検体中24検体がMTD陽性であった。MB-CheckでNTMが検出された29検体はすべてMTD陰性であった。

2) 胸水 (表3)

胸水の培養で結核菌が検出された4検体中, 3検体がMTD陽性であったが, 1検体はMTDでは陰性と判定された。胸水の培養で結核菌陰性であった32検体のうち, 喀痰検査, 胸水 adenosine deaminase (ADA) 値, 胸膜組織像および経過より臨床的に結核性胸膜炎と診断されたものが16検体あり, うち4検体がMTDで陽性

表4 髄液の検査結果 (9検体)

塗抹	小川培地 ^{#1} and/or MB-Check	同 定	MTD	
			+	-
+ 0	+ 0	<i>M.tuberculosis</i> 0	0	0
		NTM ^{#2} 0	0	0
	- 0	0	0	0
- 9	+ 2	<i>M.tuberculosis</i> 2	2	0
		NTM ^{#2} 0	0	0
	- 7	7 ^{#3}	0	7
total		9	2	7

1 : 小川培地, MB-Check の双方あるいはいずれか一方で抗酸菌が検出された場合を (+)

2 : non-tuberculous mycobacteria

3 : 多発性硬化症2例および細菌性髄膜炎2例の計4症例を含む

を示した。胸水の原因として結核を否定された残りの16検体はすべてMTD陰性であった。

3) 髄液 (表4)

粟粒結核で結核性髄膜炎を合併した2症例の髄液でMTDが陽性を示し, その後培養でも結核菌陽性と判明した。結核症であるが髄膜炎が存在しない3検体および対照群4検体(多発性硬化症2例, 細菌性髄膜炎2例)ではすべて培養, MTDともに陰性であった。

4) BALF (表5)

培養で結核菌が証明された1検体はMTDも陽性であった。塗抹陽性培養陰性(smear positive culture negative, 以下SPCNと略す)かつMTD陽性の検体が1検体存在した。培養でNTMが検出された3検体はいずれもMTDは陰性であった。それ以外の36検体中, 以前に喀痰より結核菌が証明されている症例, あるいは画像所見, 病理所見, 治療経過などより臨床的に肺結核と診断された症例からの検体が14検体あり, うち6検体がMTDで陽性を示した。残りの22検体は臨床的に活動性肺結核を否定された症例の検体で, MTDはすべて陰性であった。

2. 培養で結核菌陰性かつMTD陽性例についての検討

1) 喀痰

小川, MB-Checkともに結核菌陰性の検体は156検体(105症例)あり, うちMTD陽性の検体は21検体(15症例)認められた。この15例はすべて以前に結核菌が証明され, 結核の治療中の症例であった。この21検体のうち10検体は塗抹陽性, 11検体(10症例)は塗抹陰性であった。塗抹陽性の1検体は小川で*M.fortuitum* (+2 colony)が検出された。塗抹および培養とも陰性の10例および*M.fortuitum*と判定された1例の臨床像と

表6 塗抹培養結核菌陰性かつMTD陽性例(喀痰)

症 例	臨床診断	入院時所見 学類分類 Gaffky	培養経過と MTD 陽性の時期的関係
症例 1	45歳, 男	肺結核 b I 3 10号	治療開始後も9カ月間塗抹あるいは培養が陽性 培養陰性化した11カ月後 MTD 陽性, 胸部 X 線 b II 3
症例 2	65歳, 男	肺結核 b II 3 8号	培養陰性化した3カ月後 MTD 陽性で、翌月 SPCN でやはり MTD 陽性
症例 3	70歳, 男	肺結核 b II 3pl 0号	培養陰性化直後に MTD 陽性
症例 4	49歳, 男	肺結核 b I 3pl 7号	培養陰性化した13, 14 カ月後 MTD 陽性 血沈亢進持続, 胸部 X 線 b II 3, 多剤耐性
症例 5	41歳, 女	肺結核 b II 3 9号	培養陰性化した後 SPCN が2カ月あり, さらにその 翌月 MTD 陽性
症例 6	55歳, 男	肺結核 b II 3 9号	培養陰性化後もしばらく塗抹陽性が継続 SPCN の2回を含め計3回培養陰性 MTD 陽性
症例 7	43歳, 男	肺結核 b II 3 2号	培養陰性化後もしばらく塗抹陽性が継続 SPCN の2回を含め計3回培養陰性 MTD 陽性
症例 8	35歳, 男	肺結核 b II 3 9号	培養陰性化した3カ月後 MTD 陽性
症例 9	20歳, 男	肺結核 l II 2 4号	培養陰性化した1カ月後 MTD 陽性
症例10	30歳, 男	肺結核 b I 3pl 9号	治療開始後も3カ月培養陽性、時折 SPCN あり 培養陰性化した7カ月後 MTD 陽性, 有癭性膿胸
症例11	60歳, 男	肺結核 b II 2 0号	培養陰性化した3カ月後, Gaffky 5号・培養で <i>M.fortuitum</i> が検出され MTD 陽性

MTD検査時期を表6に示す。なお SPCN の検体については別に考察の項で述べる。

2) 胸 水

塗抹および培養ともに陰性であった32検体中4検体(3症例)がMTDで陽性を示した。この3症例の胸水検査の時期および結核症と判定した理由を表7に示した。その中で経過を通して一度も結核菌が検出されず、MTD陽性を示した1症例を呈示する。

症例12: E.O. 24歳, 女性(ペルー人)。

1994年1月咳嗽を訴え, 胸部 X 線写真で大量に左胸水を認めたため, 当院へ紹介入院となった。当時兄が肺

結核で治療中であった。入院時施行された胸水検査の結果は滲出性であり, 細胞分画ではリンパ球が94%と優位であった。ADAは63.4U/lと高値を示し, 胸水のMTDは陽性であった。胸水および喀痰の培養では結核菌は検出されなかったが, 抗結核薬の投与により順調に改善し, 結核性胸膜炎と診断された。

3) 髄 液

髄液9検体(9症例)すべてにおいてMTDの結果は臨床診断および培養結果と一致した(表4)。しかし, 粟粒結核で結核性髄膜炎を伴った2症例の髄液において, MB-Checkは2例とも結核菌陽性であったが, 小川で

表7 塗抹培養結核菌陰性かつMTD陽性例(胸水)

症 例	治療開始後 検査時期	結核症と診断した理由
症例 12	24歳, 女 入院時	ADA 高値, 臨床経過(抗結核薬に反応良好) 兄が肺結核
症例 13	62歳, 男(膿胸) 7カ月, 2年3カ月	入院時胸水・喀痰より結核菌(+) 5カ月後胸水塗抹(+), MB-Check(+)
症例 14	54歳, 男 入院時	入院時喀痰より結核菌(+) ADA 高値, 臨床経過(抗結核薬に反応良好)

表8 塗抹培養結核菌陰性かつMTD陽性例(BALF)

症例	気管支鏡検査を 施行した理由	治療開始時から 気管支鏡検査 までの期間	結核症と診断した理由
症例15	陰影増悪	2カ月	入院時の喀痰より結核菌(+) 前医で胃液よりGaffky 7号, 臨床経過
症例16	肺癌合併精査	1カ月	入院時の喀痰より結核菌(+) 臨床経過
症例17	陰影精査	入院時	肺組織像—ラング ハンス型巨細胞, 肉芽腫(+) 臨床経過
症例18	確定診断	3カ月	画像所見, 肺組織像—肉芽腫(+) 臨床経過
症例19	陰影精査	入院時	肺組織像—ラング ハンス型巨細胞, 肉芽腫(+) 臨床経過
症例20	陰影増悪	10カ月	入院時喀痰よりGaffky 9号—結核菌(+) 臨床経過

は1例のみが陽性であった。MTDによって2例とも迅速に陽性と判明した。

4) BALF

SPCNでMTD陽性の1例は多剤耐性の慢性持続排菌の結核患者であった。塗抹および培養ともに陰性の36検体中6検体(6症例;表8, 症例15~20)がMTDで陽性を示した(表5)。この6症例のうち, 経過を通して培養で結核菌が一度も検出されなかった3症例を呈示する。

症例17: M.N. 40歳, 男性。

1993年2月頃より右背部痛あり, その後咳嗽が出現したため8月近医を受診し入院した。肺炎として治療を受けたが改善せず, 退院後当院を受診した。肺結核の疑いで9月6日入院したが, 喀痰検査では結核菌は検出されなかった。9月14日気管支鏡検査を施行され, BALFは塗抹培養ともに陰性であったがMTDが陽性であり, 同時に肺生検でもラングハンス型巨細胞および肉芽腫性病変を認めたため, 肺結核と診断された。抗結核薬の投与により順調に改善し退院した。

症例18: H.S. 47歳, 男性。

1994年5月より発熱, 咳嗽を訴え当院を受診した。胸部X線写真で右肺に空洞を伴う病変を認め, 肺結核の疑いで6月3日当院に入院した。喀痰検査施行後抗結核薬の投与を開始された。喀痰検査の結果はすべて塗抹培養とも陰性であったため, 9月14日気管支鏡検査を施行された。BALFのMTDが陽性であり, 病理学的にも結核に矛盾しない結果であった。BALFの培養も陰性であったが, 抗結核薬の継続により順調に改善し, 臨床経過と合わせ肺結核と診断された。

症例19: H.Y. 43歳, 男性。

1994年7月右上葉の胸部異常陰影で当院に入院した。

喀痰検査では有意な結果が得られず, 気管支鏡検査を施行された。BALFの塗抹および培養は陰性であったが, MTDが陽性であった。肺生検ではラングハンス型巨細胞および類上皮細胞肉芽腫を多数認め, 一部は凝固壊死を伴っており病理学的にも肺結核と診断された。抗結核薬の投与により陰影は順調に改善し10月軽快退院した。

3. 培養で結核菌陽性かつMTD陰性例についての検討

1) 喀痰

小川で結核菌陽性かつMTD陰性例は4検体(4症例)存在した(表1)。塗抹陽性が1検体(Gaffky 1号), 塗抹陰性が3検体であり, いずれも培養で(+2 colony ~ 1+)の少量排菌例であった。小川陰性で, MB-Checkによって結核菌が検出されたがMTDが陰性であった2検体(2症例)は, 塗抹陰性の1検体とGaffky 1号の1検体であった。

2) 胸水

培養で結核菌が検出された4検体のうち, 1検体のみMTD陰性であったが, その検体のMTDにおける化学発光強度は22,381RLUとcut-off値(30,000RLU)に近い値を示した。

3) 髄液

髄液では培養陽性でMTD陰性例は認められなかった。

4) BALF

培養でNTMが検出された3検体(*M. avium* complex 2検体, *M. szulgai* 1検体)はMTD陰性であった。

4. 経時的に施行した喀痰のMTD検査結果の推移と臨床経過に関する検討

すでに治療を開始されている症例を含め, 肺結核で当

表9 肺結核20症例の経時的全検査成績

塗抹	小川培地 ^{#1} and/or MB-Check	MTD	
		+	-
+30	+22	21	1
	-8	8	0
-75	+12	9	3
	-63	6	57
105	105	44	61

#1:ここでは小川培地, MB-Checkの双方あるいはいずれか一方で結核菌が検出された場合を(+)

院に入院した20症例について経時的に喀痰の塗抹, 培養およびMTD検査を施行した。20症例の全検査成績(表9)で検討すると, MTD陰性の61検体中, 培養で結核菌陽性は4検体(6.6%), うち小川陽性はわずかに2検体(3.3%)であった。その4検体の内訳は塗抹陰性が3検体, Gaffky 1号が1検体といずれも少量排菌であった。逆に塗抹および培養ともに陰性の63検体のうち6検体(9.5%)がMTD陽性であった。これらは治療開始時より計算すると3カ月後の1検体, 4カ月後の2検体, 5カ月後の2検体, 10カ月後の1検体であった。治療開始5カ月後以降にMTDのみ陽性を示した3症例は, いずれも入院時大量排菌例であり, かつ学会分類

でI型あるいは拡がり3の重症例であった。

20例中15例について調査開始約1年後に再検したところ, 塗抹, 培養, MTDともすべて結核菌は陰性であった。

また今回の経過を追った調査でSPCNが, 小川で12検体, MB-Checkで9検体認められたが, それぞれ11検体および9検体はMTD陽性であった。これらは従来では結核菌か否か判定できなかったが, MTDを用いることによって結核菌と同定された検体である。小川でSPCNかつMTD陰性の1検体はMB-Check陽性で結核菌であった。

5. MTDの定量性について

喀痰225検体中MTD陽性の84検体について, Gaffky号数別にRLU値を対数目盛軸にプロットした(図1)。Gaffky 0-3号の検体をA群, Gaffky 4-9号の検体をB群として統計学的処理を行ったところ, A群42検体の平均は $1,459,596 \pm 756,754$ (S.D.)であり, B群42検体の平均は $1,679,827 \pm 613,636$ (S.D.)で両群間に有意差は認めなかった(図2)。

またMTDキットに添付した陽性コントロールの希釈系列を作成し, RLU値を測定した。原液3検体のRLU値は $2,436,743 \pm 43,717$ (S.D.), 1,000倍希釈液3検体のRLU値は $2,397,448 \pm 99,760$ (S.D.)であり,

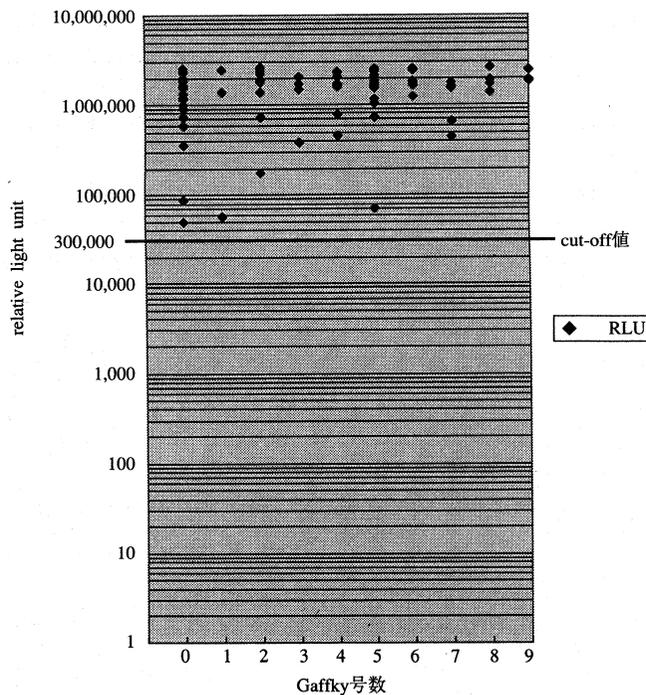


図1 Gaffky号数別MTD測定値の分布(N=84)

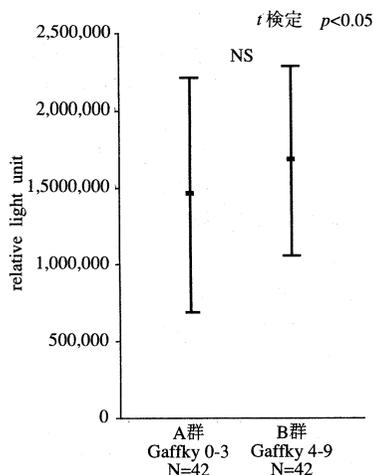


図2 A群とB群におけるMTD測定値の比較

両群間に有意差は認めなかった。

考 察

1. 喀痰を検体とした場合のMTDの感度および特異性について

喀痰225検体でMTDの感度および特異性について小川およびMB-Checkと比較し、さらに不一致例につき臨床的検討を加えた結果を示す(表10)。

小川あるいはMB-Checkのいずれかにおいて結核菌が検出された検体に対し、MTDの感度は63/69で91%であった。培養で結核菌が検出された69検体中6検体がMTD陰性であったため感度が91%となったが、結

果の項ですでに述べたごとく、この6検体はすべて微量排菌の検体であった。これらがMTDで陰性を示した原因については、菌が微量の場合、検体中のinhibitor¹⁹⁾²⁰⁾の影響を受けるため、あるいは菌が検体中に一様に分布していないためと推察した。核酸増幅法の結果が陰性であっても、微量な菌が検体中に含まれている場合が存在することは留意すべきである。

またMTDに限らず、核酸増幅法を臨床に応用する際に常に問題にされるのがcontaminationなどによる偽陽性の問題である¹³⁾¹⁴⁾。

喀痰225検体(132症例)中、培養陰性でMTD陽性の検体は21検体(15症例)認められた。この全例は以前に結核菌が証明されていた症例であり、そのほとんどの場合、近い過去あるいは前後して検査された検体より培養で結核菌が検出されていた。また培養で菌陰性化した後にある期間を経てMTDが陽性を示した症例は、いずれも超重症肺結核あるいは多剤耐性肺結核の症例であった(表6)。病歴および臨床経過などを含め検討した結果、塗抹および培養とも陰性でMTDのみ陽性を示した検体は、偽陽性ではなく微量の結核菌が検体中に含まれていたものと推察した。

MTDの特異性は小川との比較では80%、MB-Checkとの比較では85%、小川and/or MB-Checkの結果と比較すると87%であった。阿部らの報告によるとMB-Checkでの菌の検出率は小川培地に比べ有意に高率であり²¹⁾、MTDの特異性は比較する培養法の感度に伴って上昇する傾向が認められた。したがってMTDの特異性が80~87%と低かったのは、小川およびMB-Checkに比しMTDの感度が高いためと考えた。

表10 MTDの感度・特異性に関する検討(喀痰225検体)

M T D	小川培地 ^{#1}		MB-Check		小川培地 ^{#3} and/or MB-Check		培養+臨床診断 ^{#4}	
	+	-	+	-	+	-	+	-
	+	-	+	-	+	-	+	-
+	50	34	60	24	63	21	83	1 ^{#5}
-	4	137	5	136	6	135	6	135
計	54	171	65	160	69	156	89	136
感 度	50/54 =93%		60/65 =92%		63/69 =91%		83/89 =93%	
特異性	137/171 =80%		136/160 =85%		135/156 =87%		135/136 =99%	

#1: 小川培地汚染の3検体は小川(-)として計算
 #2: ここでは結核菌のみを(+)とし、NTMが検出された場合は(-)
 #3: ここでは小川培地、MB-Checkの双方あるいはいずれか一方で結核菌が検出された場合を(+)
 #4: (上記#3の基準で培養陽性の場合)あるいは(MTD陽性かつ臨床的に結核症と診断された場合)を(+)
 #5: 小川培地で*M. fortuitum*が検出された検体

培養陰性であってもMTD陽性で、なおかつ臨床的に活動性結核と診断した症例を含めて検討すると、MTDの感度は93%、特異性は99%であった。特異性が100%とならなかった原因の症例数は1例であった。その1例において培養で*M. fortuitum*が検出された検体がMTD陽性を示したが、数カ月前に結核菌の排菌を認めていた症例であった。*M. fortuitum*は迅速発育菌であり、一般にすべての抗結核薬に対し耐性である。Gaffky 5号ながらわずか2コロニーという微量な培養結果から推察すると、結核菌が同時に排菌(SPCN)されていた可能性も十分考えられる。したがってMTDの特異性はほぼ100%と考えても差し支えないと思われる。

MTDの感度および特異性について、Jonasらは、培養で結核菌が検出された喀痰119検体について、MTDの感度82%、特異性99%と報告している²²⁾。その他諸家の報告もほとんど同程度の成績である^{23)~25)}。またMTDとPCRの成績の比較を試みた報告もある¹²⁾²⁶⁾。PCRではプライマーおよび反応条件の設定により、またnested PCR²⁷⁾²⁸⁾を用いるか否かで全く成績が異なるため、条件を統一しない限り比較はできない²⁹⁾。MTDとアンプリコアとの比較では、成績に有意差はなかったと報告されている¹²⁾。

喀痰225検体について従来の方法と比較検討したところ、MTDの検査成績は培養法より優れ、培養陰性かつMTD陽性例には活動性肺結核症として矛盾する症例は認められなかった。また、MTDは喀痰からわずか5時間で直接結核菌の検出が可能であり、肺結核の迅速診断には極めて有用と考えられた。

核酸増幅法の普及によって結核菌検出の陽性率が高まり、結核症の診断の精度が上がると予想される。

2. 喀痰以外の検体について

結核性胸膜炎における胸水からの菌の検出率は低く、培養で陽性になる症例は2.1~28.3%といわれている³⁰⁾³¹⁾。したがって穿刺液の性状、細胞成分、生化学的データ、胸膜病理組織像および抗結核薬に対する反応性を含めた臨床経過などにより診断されるケースが多い。近年胸水のADA値が測定可能となり、結核性胸膜炎の診断の信頼度がやや高まったが³¹⁾³²⁾、本来ADAは宿主側の免疫応答を反映するものであり、決して結核に特異的なものではない。最近、結核性胸膜炎の診断に核酸増幅法を導入し、優秀な成績であったとの報告もあるが、まだごく少数である³³⁾³⁴⁾。

今回の症例の中に塗抹および培養ともに陰性でMTD陽性例がみられ、それらはすべて臨床的に結核性と診断された。結核性胸膜炎として治療された16症例中小川あ

るいはMB-Checkで陽性は4症例(25%)、MTDで陽性は培養陽性の3症例を含め5症例(31%)であった。小川陽性でMTD陰性が1例みられたが、本検体では22,381RLUとかなり高値であった。MTDは30,000RLUをcut-off値しているが、コントロール検体のほとんどすべてが10,000RLU以下であることから、20,000RLU以上の際は疑陽性とするなど配慮が必要であろう。結核性胸膜炎であっても胸水中に結核菌が存在するとは限らず³⁰⁾、MTD陰性であっても結核を否定はできないが、核酸増幅法を結核性胸膜炎の胸水検査に積極的に導入することにより診断の精度が高まると期待される。

髄膜炎の場合には迅速かつ正確な診断がさらに要求される。結核性髄膜炎における髄液からの結核菌検出率は、松島ら³⁵⁾は37%、Wrightら³⁶⁾は79.2%と報告している。野崎ら³⁷⁾は結核性髄膜炎の自験例4症例について、髄液のADA値が診断および経過観察に有用であったと述べ、PCRで陽性だった1例以外においては髄液から結核菌は検出されなかったと報告している。髄液のMTD検査で陽性であった本研究の2症例のいずれの塗抹も陰性であり、MTDにより迅速に診断が行われ、予後は良好であった³⁸⁾。2症例とも検体提出約4週後に培養で結核菌が確認された。その迅速診断の臨床的意義は非常に大きく、結核性髄膜炎が疑われる場合にはMTDなどの核酸増幅法は必須の検査といえる。

また気管支鏡検査の普及により結核菌の検出率が高まり、結核症の診断の精度が上がったといわれている³⁹⁾。しかし今回検討したBALF41検体(39症例)中、小川で結核菌が検出されたのはわずか1検体であった。臨床的に結核症と診断されながら、経過を通して喀痰の塗抹培養およびBALFの塗抹培養ともに陰性の3症例(症例17, 18, 19)がMTDで陽性を示した。したがってBALF検体についてもMTDは臨床的に有用であった。

経過を通して一度も結核菌が塗抹および培養のいずれにおいても検出されず、MTDだけが陽性を示した場合に結核症と診断することが妥当か、あるいは抗結核薬を投与すべきか否かが、临床上最も大切な問題であろう。かかる例が胸水で1症例(表7;症例12)、BALFで3症例(表8;症例17, 18, 19)存在したが、前述のごとくいずれも臨床的に活動性結核症に相応する臨床像、検査所見を有していた。MTDの臨床使用に関して、精度管理を行うことで偽陽性の存在は無視しうるレベルになると考えた。

3. 治療経過におけるMTDの意義について

今回の肺結核20症例の経過を追った検討成績によれば(表9)、MTD陰性61検体中小川and/or MB-Check

表11 入院時より追跡した初回治療肺結核10症例の検査成績

症 例	検 査 法	入院時	1 ヵ月	2 ヵ月	3 ヵ月	4 ヵ月	5 ヵ月	1 年
(a) ■■■■	塗 抹	0	0	0	0	0	0	0
	小川培地	+	-	-	-	-	-	-
	MB-Check	+	-	-	-	n.d.	n.d.	-
	MTD	+	-	-	-	n.d.	n.d.	-
(b) ■■■■	塗 抹	2	5	5	0	0	0	0
	小川培地	+	+	+	-	-	-	-
	MB-Check	+	+	+	-	-	n.d.	-
	MTD	+	+	+	-	-	n.d.	-
(c) ■■■■	塗 抹	0	8	0	1	0	0	0
	小川培地	+	+	-	-	-	-	-
	MB-Check	+	+	-	+	-	-	-
	MTD	+	+	-	+	-	-	-
(d) ■■■■	塗 抹	6	5	1	3	0	0	0
	小川培地	+	+	-	-	-	-	-
	MB-Check	+	+	+	-	-	+	-
	MTD	+	+	-	+	+	+	-
(e) ■■■■	塗 抹	7	0	0	0	0	0	0
	小川培地	+	+	-	-	-	+#1	-
	MB-Check	+	-	-	-	-	+	-
	MTD	+	-	-	-	-	-	-
(f) ■■■■	塗 抹	4	0	0	0	0	0	0
	小川培地	+	-	-	-	-	-	-
	MB-Check	+	+	-	-	-	-	-
	MTD	+	-	-	-	-	-	-
(g) ■■■■	塗 抹	0	0	0	7	0	0	0
	小川培地	-	-	+#2	-	-	-	-
	MB-Check	-	-	+	-	n.d.	n.d.	-
	MTD	-	-	-	+	n.d.	n.d.	-
(h) ■■■■	塗 抹	5	1	0	0	0	0	/
	小川培地	+	-	-	-	-	-	
	MB-Check	+	+	-	-	n.d.	-	
	MTD	+	+	-	-	n.d.	+	
(i) ■■■■	塗 抹	0	0	0	0	0	0	0
	小川培地	+	+	-	-	-	-	-
	MB-Check	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
	MTD	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
(j) ■■■■	塗 抹	5	1	0	0	0	/	/
	小川培地	+	-	-	-	-		
	MB-Check	+	+	n.d.	-	n.d.		
	MTD	+	+	n.d.	-	n.d.		

1 : Accuprobe により NTM と判定された

n.d. (not done)

2 : Accuprobe により結核菌と判定された

による培養陽性検体は4検体(6.6%)であった。したがって治療開始後の経過でMTDが陰性の場合、90%以上は培養陰性と判定できると考えた。MTDにより菌が陽性か陰性かを培養の結果を待たずに判定でき、臨床経過と総合して判断するならば、MTDは治療効果の指標になりうると考えられる⁴⁰⁾。

この20症例のうち、初回治療症例で入院治療開始時より追跡しえた肺結核10症例について各検査結果の経過を一覧表に示す(表11)。培養とMTDはともに治療経過に伴って陰性化する傾向が認められ、菌陰性化時期が不

明の3例(症例 d, g, h)を除いた7症例で検討すると、菌陰性化までの平均期間は、小川1.7ヵ月、MB-Check 2.3ヵ月、MTD 2.1ヵ月であった。退院の指標に、①塗抹および培養が陰性化、②MTDが陰性化、のいずれかを採用した場合、この7症例では全例②の方が退院が早まる。核酸増幅法の適切な使用により、入院期間の短縮、ひいては医療費の削減にもつながる可能性がある。

核酸増幅法は死菌でも陽性と判定される可能性があるため、治療開始後も長期間MTDが陽性を示すことが危惧されたが、MTDの成績は臨床経過と相関していた。

4. MTDの定量性に関する検討

MTDで測定されるRLU値と検体中の菌量との間に相関は認められず(図1, 2), また陽性コントロールの希釈系列を用いた検討でも同様の結果であり, MTDの測定値から排菌量を推測することは不能と判断した。

5. SPCNについて

今回の喀痰225検体中に小川でSPCNを示した検体が23検体あり, うち16検体がMTD陽性であった。その16検体のうちMB-Check陽性が8検体含まれていた。また培養法の比較では結核菌に関して小川陰性でMB-Check陽性が15検体, 小川陽性でMB-Check陰性が4検体存在していた。MTDが低活性菌のみならず死菌をも陽性と判定している場合も存在するとは考えられるが, 培養陰性でMTD陽性のすべてを死菌あるいは偽陽性と判断するのは早計であろう。

青柳の報告⁴⁾以来SPCNの臨床的意義についてはさまざまな議論がなされているが, 青柳が指摘しているようにSPCNを示した症例が後に結核菌培養陽性となる場合もあり, 注意が必要である。

結 論

1. 喀痰, 胸水, 髄液およびBALFについてMTDと培養の成績を比較した結果, 感度においてMTDは小川より優れ, MB-Checkと比較しても遜色ないことが確認された。

2. 培養陰性でMTD陽性を示した全症例について臨床的検討を行ったが, 明らかに偽陽性といえるものは1例も存在しなかった。

3. 経過を追ってMTDを施行した場合, 培養の結果を待たずに菌の陰性化を判定でき, 治療効果の重要な指標の1つになりうると考えた。

4. MTDの測定値(RLU)と排菌量との間に相関は認められず, MTDによる定量的検討は不能であった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲いただいた慶應義塾大学医学部内科池田康夫教授に深謝申し上げます。

また本研究に御協力いただいた中外製薬診断薬事業部並びに国立療養所東埼玉病院細菌検査室佐藤蓉子氏に感謝致します。

文 献

- 1) 厚生省保険医療局エイズ結核感染症課: 結核の統計 1994. 財団法人結核予防会. 1994.
- 2) Norm CN, Daniel LK.: Chemiluminescent DNA probes; a comparison of the acridini-

um ester and dioxetane detection systems and their use in clinical diagnostic assays. Clinica Chimica Acta. 1990; 194: 73-90.

- 3) 後藤美江子, 他: アクリジニウムエステル標識DNAプローブ法による抗酸菌同定の有用性について. 感染症誌. 1992; 66: 81-86.
- 4) 古賀宏延, 宮崎義継, 河野茂, 他: 第67回総会シンポジウム I. 抗酸菌感染症の迅速診断法: 5. 抗酸菌症に対するDNA probe法とPCR法. 結核. 1992; 67: 795-802.
- 5) Saiki PK, et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988; 239: 487-491.
- 6) 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.
- 7) Pao CC, Yen TSB, You J-B, et al.: Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1877-1880.
- 8) Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al.: Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Dis. 1990; 161: 977-981.
- 9) Boddingtonhaus B, Rogall T, Flohr T, et al.: Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1751-1759.
- 10) 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チェック)との比較を中心として—. 結核. 1994; 69: 7-14.
- 11) 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.
- 12) Vuorinen P, Miettinen A, Vuento R, et al.: Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens by Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and Roche Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1856-1859.

- 13) 阿部千代治, 森 亨, 他: 結核菌迅速検出のための MTD の評価に関する共同研究. 結核. 1995; 70: 467-472.
- 14) 阿部千代治: 第68回総会シンポジウム I. 結核研究の進歩: 1. 抗酸菌検査法の進歩. 結核. 1993; 68: 701-708.
- 15) 日本結核病学会予防・治療合同委員会: 核酸増幅法による結核菌検査の臨床での利用について. 結核. 1995; 70: 711-712.
- 16) Grosset J, Mouton Y: Is PCR a useful tool for the diagnosis of tuberculosis in 1995. Tubercle and Lung Disease 1995; 76: 183-184.
- 17) Osumi M, Toyoda T, Kawasiro T, et al.: Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in clinical specimens other than sputum by a specific DNA probe with amplification of the ribosomal RNA. Kansenshou-shi. 1995; 69: 1376-1382.
- 18) 吉村忠司, 宮城千恵子, 阿部千代治, 他: RNA 増幅と HPA 法を組み合わせた MTD (DNA プローブ「中外」-MTD) による *Mycobacterium Tuberculosis* の検出. 臨床と微生物. 1994; 21: 221-228.
- 19) Victor T, Toit R, Helden P: Purification of sputum sample through scarose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992; 30: 1514.
- 20) Kolk AHJ, et al.: *Mycobacterium smegmatis* stain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and quantification of bacteria. J Clin Microbiol. 1994; 32: 1354-1356.
- 21) 阿部千代治, 細島澄子: 第67回総会シンポジウム I. 抗酸菌感染症の迅速診断法: 3. 液体培地による抗酸菌の迅速診断. 結核. 1992; 67: 781-786.
- 22) Jonas V, Alden MJ, Curry JI, et al.: Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Sputum Sediments by Amplification of rRNA. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2410-2416.
- 23) Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, et al.: Direct Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens by a Target-Amplified Test System. J Clin Microbiol. 1994; 32: 918-923.
- 24) Miller N, Hernandez SG, Cleary TJ.: Evaluation of Gen-probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and PCR for Direct Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Clinical Specimens. J Clin Microbiol. 1994; 32: 393-397.
- 25) Bodmer T, Gurther A, Schopfer K, et al.: Screening of Respiratory Tract Specimens for the Presence of *Mycobacterium Tuberculosis* by Using the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. J Clin Microbiol. 1994; 32: 1483-1487.
- 26) 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 based on the amplification of its nucleic acids. J Clin Microbiol. 1993; 31: 3270-3274.
- 27) Lecossier PCD, Boussougant Y, Bocart D, et al.: Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. J Clin Microbiol. 1991; 29: 712-717.
- 28) Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, et al.: Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2228-2232.
- 29) 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.
- 30) 青柳昭雄: 結核の各病型—結核性胸膜炎—. 臨床と微生物. 1989; 16: 434-437.
- 31) 宮本潤子, 古賀宏延, 河野茂, 他: 当科および関連施設で経験した結核性胸膜炎の臨床的検討. 結核. 1992; 67: 509-513.
- 32) 藤田信一, 吉田知孝, 松原藤継: 結核性胸膜炎患者における胸水中の BCG 抗原量と adenosine deaminase (ADA) 活性. 感染症誌. 1987; 61: 662-667.
- 33) 林光俊, 永井篤志, 小林健司, 他: 結核性胸水の診断における PCR (Polymerase Chain Reaction)

- 法に関する検討. 日胸疾会誌. 1995;33:253-256.
- 34) Kuwano K, Minamide W, Kusunoki S, et al. : Evaluation of Nested polymerase Chain Reaction for Detection Mycobacterial DNA in plural Fluid. Kansenshou-shi. 1995;69:175-180.
- 35) 松島敏春: 結核性髄膜炎. 結核. 1985;60:88-90.
- 36) Wright NL: Observations on the diagnosis of tuberculous meningitis. J Lad Clin Med. 1958;52:48-52.
- 37) 野崎博之, 福内靖男, 厚東篤生, 他: 結核性髄膜炎における髄液 adenosine deaminase (ADA) の経時的変動について. 結核. 1994;69:663-670.
- 38) 豊田丈夫, 大角光彦, 青柳昭雄, 他: 結核菌群核酸増幅同定検査 (MTD) により迅速診断が可能であった結核性髄膜炎の2例. 感染症誌. 1995;69:945-949.
- 39) 倉島篤行, 高野智子: 第67回総会シンポジウム I. 核酸菌感染症の迅速診断法: 1. 臨床的診断法. 結核. 1992;67:771-774.
- 40) 豊田丈夫, 青柳昭雄, 大角光彦, 他: Gen-Probe Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (MTD) による肺結核患者の経時的観察. 感染症誌. 1995;69:303-307.
- 41) 青柳昭雄: 塗抹陽性培養陰性結核菌. 結核. 1984;59:531-538.