

第71回総会シンポジウム

I. 新しい抗酸菌検査法の診断治療における位置づけ

座長 青柳昭雄 (国立療養所東埼玉病院)

受付 平成8年9月24日

The 71st Annual Meeting Symposium

I. PRESENT STATUS OF NEW EXAMINATION METHODS FOR ACID FAST BACILLI IN DIAGNOSIS AND TREATMENT

Chairman: Teruo AOYAGI*

Symposium Topics and Presenters:

1. Advances and Future Prospects in Diagnostic Methods for Mycobacteria: Chiyoji ABE (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)
 2. Issues and Problems Encountered in Applying New Detection Methods: Toshio YAMAZAKI (Department of Bacteriology, National Institute of Health)
 3. Clinical Usefulness of Molecular Biological Techniques for Diagnosis of Mycobacteriosis: Hironobu KOGA (The Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine)
 4. Clinical Utility of PCR (AMPLICOR) in the Diagnosis of Mycobacterial Infection: Akira KAJIKI, et al. (National Ohmuta Hospital)
 5. Results of Questionnaire Survey on New Examinations for Mycobacteria: Atsuyuki KURASHIMA (Department of Respiratory Diseases, National Tokyo Hospital)
- Special Guest Speaker: Results Obtained with Applying MTD to Several Types of Specimen and Understanding the Clinical Course Based on MTD: Mitsuhiko OHSUMI, et al. (National Higashi Saitama Hospital)

(Received 24 September 1996)

In Japan, the laboratory diagnosis of mycobacterial infection has traditionally been based on staining and culture using Ogawa's medium. Staining is a low sensitivity though rapid method while Ogawa's method has acceptable sensitivity but requires up to 4 weeks for detection of mycobacteria.

Accordingly, the development of new bacteriological diagnostic methods for mycobacteria has long been eagerly awaited.

BACTEC method has markedly reduced the detection time for mycobacteria, but general use is prohibited due to nuclear waste dispersal regulation in our country. Currently, MGIT is anticipated to serve as superior new liquid medium.

The application of molecular biological techniques to diagnosing mycobacteriosis has advanced in the past decade.

* From the National Sanatorium Higashi Saitama Hospital, 4147 Kurohama, Hasuda-shi, Saitama 349-01 Japan.

DNA probes and DDH for identification of mycobacteria are already commercially available and have expedited identification.

In 1992, a method of directly detecting mycobacteria based on amplification of nucleic acid from specimens was developed. Furthermore, since 1994, two new methods, i. e. MTD and AMPLICOR, based on amplifying rRNA and DNA, respectively, have become established diagnostic procedures and have been covered by the national health insurance program. Thereafter, the frequency at which these methods are utilized has since been increasing. Consequently, the problems of false positive and negative cases, with these technique, have been pointed out.

Recently, a method for predicting drug resistance by the detection of gene alterations related to antituberculous drug resistance was developed.

This symposium focused on these issues. Let me summarize the reports presented by each speaker, according to the main point.

1. Rapid method using liquid media

MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) is superior to traditional media in that the time needed to detect bacilli is markedly shorter, the test tube is small and a CO₂ incubator is not needed (ABE).

2. Nucleic acid amplification method

1) Basic study

(1) False positive; The causes of false positive results are carry over, cross contamination, bacilli killed by drugs and lack of proper culture technique. MTD and home made PCR yielded positive results identical to those of living bacilli for BCG treated with RFP, high pressure sterilization and UV irradiation. False positives were obtained when a 5% concentration of blood was included in the reactive solution (Yamazaki).

(2) False negative; Complete removal of substances altering the reactions necessitates thorough washing (Yamazaki).

Some specimens were negative even when positive control were added (Kajiki).

2) Results on clinical specimens

(1) Comparison between MTD, AMPLICOR and home made PCR; No significant differences were recognized between MTD and AMPLICOR in terms of the detection sensitivity for *in vitro* bacilli (Yamazaki, Koga). For clinical specimens, the sensitivity of MTD was superior or equal to that of AMPLICOR (Abe, Yamazaki). As to sputum and gastric juice, the sensitivity of AMPLICOR was superior to that of MTD. In bronchial specimen, MTD was superior to AMPLICOR (Koga).

(2) False positive; (a) Tubercle bacilli; the number of smear and culture negative specimens which were positive by the amplification method was 10 in 256 specimens for home made PCR, 22 in 306 for MTD and 15 in 284 for AMPLICOR while true positive cases identified clinically were 1, 4 and 2, respectively (Koga). The number of smear and culture negative AMPLICOR positive was 48 among 1672 and there was one true false positive case in pleural fluid (Kajiki).

The number of culture (by both Ogawa and MB check) negative MTD positive specimens was 21 in 225 and there was one true positive case for sputum (Ohsumi). (b) MAC; Although 31 smear and culture negative specimens were AMPLICOR positive, no true false positive cases were seen (Kajiki).

(3) False negative; The number of smear or culture positive specimens which were negative by the amplification method on tubercle bacilli accounted 6 of 22 for home made PCR, 3 of 22 for MTD and 3 of 18 for AMPLICOR (Koga), 9 of 56 for AMPLICOR (Kajiki) and 6 of 69 (Ogawa and/or MB check positive) for MTD (Ohsumi). It was noted that most of these specimens included only a few bacilli (Ohsumi).

There were 16 of 72 culture positive specimens with *M. intracellulare* and 15 of 26 with *M. avium* undetected by AMPLICOR (Kajiki).

3) Results on the course after chemotherapy

It was reported that the negative results of both MTD and AMPLICOR provide a rapid prediction of negative culture after the initiation of treatment (Ohsumi, Kajiki). In analyzing the period from conversions to negative by the culture and amplification methods, the difference between culture and MTD was smaller than that of AMPLICOR. This result could be explained by the observation that the amount of rRNA remaining in the test tube after addition of RFP had gradually decreased, while the DNA content was unchanged (Koga).

4) Results of specimens other than sputum

The sensitivity of AMPLICOR for bronchial alveolar lavage was equal to that of culture (Koga, Kajiki), while that of MTD for these specimens was higher than that of traditional culture (Koga, Ohsumi). The positive MTD and AMPLICOR rates for pleural fluid were higher than that of culture (Ohsumi, Kajiki). The efficacy of MTD in detecting tubercle bacilli from spinal fluid was described (Ohsumi).

3. Drug sensitivity test

1) DNA-probe method; The results of sensitivity to RFP, INH, SM and EB could be determined semiquantitatively within a 3 days, using accuprobe (Koga).

2) A methods of sensitivity testing based on molecular biological techniques.

Gene alterations related to resistance to INH, RFP, SM, TH and CFLX can already be determined and have been applied to determining drug resistance (Abe). Resistance to RFP could be predicted at a rate exceeding 90% by PCR-direct sequencing analysis of a 69 bp core region in the *rpoB* gene of tubercle bacilli (Koga).

4. Results of questionnaire survey on the present status of examinations for Mycobacteria

Answers were obtained from 593 institutions. Two million specimens were examined over a one year period. The frequency of utilization of nucleic acid amplification methods has increased from 12% in 1995 to 27.8% in 1996. It was pointed out that amplification methods have several disadvantages such as high cost, requirements for increased trained staff numbers, the necessity of improving equipment, the complexity of the techniques, etc. However, these methods are advantageous in terms of rapidity and high sensitivity. Improved cooperation between clinicians and laboratory staff is needed to resolve problems related to false positive and negative results (Kurashima).

Key words : MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube), MTD, AMPLICOR, *rpoB* gene, Questionnaire survey on the examination for mycobacterium

キーワード : ミジット, MTD, アンプリコア, *rpoB* 遺伝子, 抗酸菌検査のアンケート調査

シンポジスト

1. 新しい抗酸菌検査法の現状と将来
阿部千代治 (結核予防会結核研究所)
2. 新しい抗酸菌検査法の手技上の問題点
山崎 利雄 (国立予防衛生研究所細菌部)
3. 抗酸菌感染症に対する分子生物学的検査法の臨床的有用性
古賀 宏延 (長崎大学医学部第二内科)
4. PCR法による抗酸菌検査法の診断治療上の位置づけ
加治木 章, 他 (国立療養所大牟田病院)

5. 新しい抗酸菌検査法に関するアンケート調査成績

倉島 篤行 (国立療養所東京病院呼吸器科)

特別発言: 各種臨床検体における MTD の成績および MTD による効果判定の可能性についての検討

大角 光彦, 他 (国立療養所東埼玉病院)

結核症の診断は検体より結核菌を証明することである。このためには現在一般に行われている方法は塗抹, 培養検査である。塗抹検査は短時間で判明するが感度が劣り, 培養検査は菌の発育までに 2~3 週間を要する。

したがってより迅速で感度の高い抗酸菌検査法の開発が望まれていた。

BACTEC はすぐれた検査法であるが, わが国では放射性廃棄物の問題で一般には使用が許可されず, 液体培地として MGIT が検討され有望視されている。

抗酸菌の遺伝子診断法では同定法として DNA プローブ, DDH が市販されその時間が短縮した。1992 年頃より検体中の核酸を増幅して抗酸菌を直接検出する方法が開発され, RNA を増幅する MTD と DNA を増幅するアンプリコアが 1994 年に保険適応となった。培養と比較して遜色ない感度を有し短時間で判定可能であるので使用頻度が増加するとともに偽陽性, 偽陰性例の報告が散見されるようになり手技上の問題点も指摘されるようになった。

一方, RFP の耐性遺伝子が明らかとなり, これを応用した核酸菌の耐性検査の報告が見られている。

このような現状にて本シンポジウムが行われた。本抄録では各演者よりの報告を項目別に要約する。

1. 液体培地による迅速診断法

MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) の平均発育日数は従来の液体培地に比し迅速で, 小試験管である, 炭酸ガス培養の不要などの利点がある (阿部)。

2. 核酸増幅法検査

1) 基礎的検討

(1) 偽陽性: 核酸増幅法の偽陽性は, ①キャリアオーバー, ②クロスコンタミネーション, ③治療後の死菌体, ④培養法の不備などで, 抗結核薬, 高圧滅菌, UV 照射処理後の菌 (BCG) でも MTD, 自家製 PCR で生菌なみに陽性を示すこと, 血液が反応液中に 5% 以上ある際は陽性となる (山崎)。

(2) 偽陰性: 検体中の反応阻害物質 (血液, ヘパリン, 喀痰溶解剤, SDS) を除去するために洗浄操作を充分に行うことが必要である (山崎)。アンプリコア検査で陽性コントロールを添加しても陰性の喀痰がある (加治木)。

2) 臨床検体での検討成績

(1) MTD, アンプリコア, 自家製 PCR の比較: 試験管内結核菌検出感度は MTD, アンプリコアに有意差は認められない (山崎, 古賀)。臨床検体についても自家製 PCR (プライマーは IS 6110) と MTD (阿部), 自家製 nested PCR (Pab 遺伝子) と MTD, アンプリコアと MTD (山崎), 自家製 nested PCR (Pab 遺伝子), MTD, アンプリコア (古賀) の比較成績がなされ, 感度は MTD > PCR (阿部), MTD = PCR (山崎), 喀痰, 胃液ではアンプリコア > MTD, 気管内採痰では MTD > アンプリコア (前者では治療後の検体が多い, 古賀) などの成績が示された。

(2) 偽陽性: ①結核菌…塗抹, 培養陰性核酸増幅法陽性は自家製 PCR 256 検体中 10, MTD 306 中 22, アンプリコア 284 中 15 検体で, 真の偽陽性はそれぞれ 1, 4, 2 検体 (全検体に占める頻度は 0.3%, 1.2%, 0.7%) (古賀), 塗抹, 培養陰性アンプリコア陽性 48 検体 29 例中, 胸水の 1 例 (加治木), 小川, 液体培地とも陰性 MTD 陽性 21 検体 15 例中 1 例 (大角) が真の偽陽性である。治療中の検体では従来法陰性核酸増幅法陽性が高率である (古賀, 加治木)。②MAC…塗抹, 培養陰性アンプリコア陽性は 31 検体, 26 例であるが真の偽陽性は見られない (加治木)。

(3) 偽陰性: 塗抹培養陽性で核酸増幅法陰性の検体は PCR 22 検体中 6 (27.3%), MTD 22 中 3 (13.6%), アンプリコア 18 中 3 (16.7%) (古賀), アンプリコアで結核菌 56 検体中 9 (16.1%), *M. intracellulare* 72 中 16 (22.2%), *M. avium* 26 中 15 (57.7%) (加治木), 小川, MB チェックのいずれかが陽性 69 検体中 MTD 陰性は 6 (8.7%) でいずれも微量排菌の検体である (大角)。

わずかであるが真の偽陽性例の見られること, また核酸増幅法の感度は培養に比し高いが, 核酸増幅法陰性必ずしも培養陰性に直結せず, これはアンプリコア法の MAC で高率である。

3) 経過を追った成績

結核治療開始より経過を追って塗抹, 培養と比較した成績では, 核酸増幅法が長期に陽性を示す例もあるが, MTD, アンプリコアとも培養陰性を迅速に予測しうる (大角, 加治木)。

MTD はアンプリコアよりも塗抹, 培養の陽性期間の差が一致し, これは薬剤添加後試験管内に含まれる

DNAは不変であるがrRNAは低下する成績と一致した(古賀)。

4) 喀痰以外の検体の成績

アンプリコアでは気管内採痰、BALの感度は培養と同率であるが(古賀、加治木)、MTDでは高率である(古賀、大角)、胸水ではPCR、MTDとも培養に比し陽性率が高い(大角、加治木)、結核性髄膜炎の診断に髄液のMTD検査が有用であった(大角)。

3. 薬剤感受性検査

1) DNAプローブ法

菌の増殖の程度をAccuprobeを用いてrRNAを半定量してSM、INH、RFP、EBの耐性を3日以内に判定することが出来る(古賀)。

2) 薬剤耐性遺伝子による感受性検査

INH、RFP、SM、TH、CFLXに対する耐性遺伝

子が判明している(阿部)。

直接塩基配列決定法にて、*rpoB*遺伝子の変異の好発部位である69bpの塩基配列を決定し、アミノ酸の変異の部位や種類とRFPのMICとの関係を検討し、変異の部位よりRFPのMICが90%以上予測可能であった(古賀)。

4. 抗酸菌検査の現状に関するアンケート結果

全国593施設からの回答成績で、抗酸菌検査は年間200万検体行われている。核酸増幅法検査は1995年12%、96年には27.8%が導入されている。この検査の迅速性は高く評価されているが、コストの高さ、人員、設備の必要性、検査手技の複雑さなどいっそうの自動化が望まれている。また従来法や臨床像との不一致例などの評価のために臨床と検査双方のいっそうの協力が求められている(倉島)。

1. 新しい抗酸菌検査法の現状と将来

結核予防会結核研究所 阿部 千代治

1. 分離培養法

正しい方法で実施された抗酸菌の分離培養の成績は塗抹染色の成績より高く、抗酸菌症の診断や治療に重要な情報を与えてくれる。抗酸菌が分離されることでその後菌種の同定や感受性試験の実施が可能になる。わが国で標準法として用いてきた水酸化ナトリウム液による前処理と3%小川培地による培養法は諸外国で用いられている方法に比べて、排菌量の多い場合には増殖支持力、雑菌の汚染からの防止、作業能率の点で勝っていた。しかし化学療法が広く行われていることもあり、塗抹陽性・培養陰性菌の出現が多く見られるようになり、もっと栄養豊富な培地の使用が要求されるようになってきた。ここ数年来外国ではエイズに伴う結核が増加している。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迅速な診断が要求される¹⁾。

これまでも液体培地の有効性を否定する研究者はいなかったが、同時に前処理後にも材料中に生残する抗酸菌以外の微生物の増殖も高めることが予想されることから、わが国では使われなかった。この間欧米諸国において、多くの研究者が選択培地の開発に力を注ぎ、5種の薬剤からなる抗菌補助剤を確立した。その結果、寒天培地、液体培地と寒天培地の二相からなるMB-Check(Septi-Chek)、放射性基質を用いたBACTECなどが開発され、初代分離に用いられるようになった。寒天培地またはSepti-Chekを用いることにより患者材料から

の抗酸菌の検出率をあげることができるようになった²⁾。しかし従来からの小川法と比べ仕事が煩雑であること、炭酸ガスインキュベーターを必要とすること、培養スペースを多く必要とすることなどのため、わが国では一般に広まっていない。BACTEC 460システムは¹⁴C CO₂の産生を検出することにより抗酸菌の存在を検出する方法である。この方法を使用することにより検出までの時間と薬剤感受性試験が短縮可能になった³⁾。しかしわが国では使用後のボトルの廃棄の問題があり、日常の検査に用いることは不可能である。諸外国においても同様の問題があり、使用国と使用施設に制限が見られる。

近年増殖している菌の迅速検出のための非放射性培養システム、BBL[®] Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) が米国ベクトン・ディッキンソン社により開発された³⁾。このシステムはMiddlebrook 7H9液体培地を分注してある小試験管(16x100mm)の底に溶存酸素に鋭敏な蛍光センサー(ルテニウム金属複合体)を埋め込んだ培養システムである。365nmの波長のトランスイルミネーターで蛍光を観察することにより陽性試験管を検出できる。

4培養システムで305例の喀痰材料を培養した成績をTable 1に示した。液体培地を基礎としたMGITまたはSepti-Chekの検出率は84.3%であったのに対し小川法の検出率は60.2%と低かった。この検出率の差は有意であった(p<0.001)。塗抹陽性材料はもとより塗抹陰性材料からもMGITとSepti-Chekで高率に菌を検出

Table 1 Recovery of Mycobacteria from 305 Smear-positive and Smear-negative Specimens with Different Media

Isolates(n)	No. (%) of isolates detected by the following methods :			
	MGIT	Septi-Chek	Modified Ogawa	Ogawa
Smear-positive <i>M. tuberculosis</i> (27)	22 (81.5)	26 (96.3)	24 (88.9)	20 (74.1)
Smear-negative <i>M. tuberculosis</i> (12)	10 (83.3)	11 (91.7)	9 (75.0)	6 (50.0)
Smear-positive MOTT (19)	19 (100)	18 (94.7)	17 (89.5)	15 (78.9)
Smear-negative MOTT (25)	19 (76.0)	15 (60.0)	13 (52.0)	9 (36.0)
Total (83)	70 (84.3)	70 (84.3)	63 (75.9)	50 (60.2)

MOTT: Mycobacteria other than *M. tuberculosis*
For detection of total mycobacteria; MGIT or Septi-Chek vs Ogawa: $p < 0.001$

Table 2 Mean Time to Detection of Patients Who Were Positive for All Methods

Isolates(n)	Days to positive culture			
	MGIT	Septi-Chek	Modified Ogawa	Ogawa
<i>M. tuberculosis</i> (25)	12.9	21.2	21.2	21.6
MOTT (19)	7.4	11.0	18.3	20.4

できたが、小川培地を用いた時に塗抹陰性材料からの検出率は低かった。この傾向は結核菌群のみならず非結核性抗酸菌でも同様であった。

抗酸菌の検出までに要する日数を、4培養システムすべてで検出できた例について比較した (Table 2)。MGITによる結核菌の検出までに要する平均日数は12.9日、非結核性抗酸菌では7.4日であった。これに対し Septi-Chek、小川法の結核菌の検出までに要する日数は21日であり、MGITより1週間多い日数を必要とした。このMGITは小試験管を使用していることから培養に場所を取らないこと、試験管ラックごとトランスイルミネーターにのせ短時間のうちに観察できること、検出感度は小川法と比べ有意に高いこと、しかも迅速に結果が得られることなどから将来広く利用されるものと期待される⁹⁾。この培地は臨床材料からの抗酸菌の検出のみならず、薬剤感受性試験にも利用可能であり、約1週間で感受性の結果が得られる。

2. 核酸を用いた検査法

近年、分子遺伝学的手法を用いた診断法が急速に進歩し、短時間のうちにインビトロで多量のDNA、RNAを増幅することが可能となった。数コピーの核酸では検出不可能であるが、増幅後では容易に検出できる。これらの手法は結核の臨床検査に応用できる段階まできており、すでに2社から診断のためのキットが発売されてい

る。「アンプリコア」キットはDNAの増幅に基づいたものであり、「MTD」キットはRNAの増幅に基づいたものである。これらのキットは指示された設備を備えた施設で、指示された操作法で試験したとき高い特異性が期待できる。

Table 3に、染色体DNA上に複数コピー存在する因子 (IS 6110) の配列に基づいたヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRとMTDを臨床材料に応用したときのわれわれの成績⁹⁾を示した。塗抹陽性・培養陽性例のほとんどすべてはPCRとMTDで検出できたが、培養陰性・塗抹陽性例のなかにPCRまたはMTDで検出できなかった例が見られた。また培養陰性例でPCRまたはMTD陽性例も見られた。これらの例はいずれも結核の臨床所見を示していた。非結核性抗酸菌の検出された例のすべてがPCRとMTDの両者とも陰性であった。

結核菌の検出のためのPCRとMTDの全体の感度は84.2%と91.9%であった (Table 4)。また塗抹試験のそれは71.9%、Septi-Chekを用いた培養では96.9%、小川培地では75.0%であった。アンプリコアでも同様の成績であった。このように臨床材料からの結核菌の検出のためのPCRとMTDの感度は卵培地を用いた培養法より勝れていたが、液体培地を用いた培養法と同等であった。しかし核酸の増幅に基づいた両法は臨床材料から直接結核菌をしかも迅速に検出できることから結核菌の検

Table 3 Comparison of Two Systems Based on Nucleic Acid Amplification with Conventional Smear and Culture Examinations in Sensitivity of Detection of *M. tuberculosis* in Clinical Specimens

	PCR		MTD	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Smear positive-culture positive for <i>M. tuberculosis</i> complex	21	1	22	0
Smear negative-culture positive for <i>M. tuberculosis</i> complex	5	5	7	3
MOTT positive in culture	0	18	0	18
Smear positive-culture negative	1	2	1	2
Smear negative-culture negative	5	77	4	78
Total	32	103	34	101

Table 4 Comparison of Two Systems Based on Nucleic Acid Amplification with the Conventional Smear and Culture Examinations

No. of specimens tested	No. of specimens positive for <i>M. tuberculosis</i>			
	Smear	Culture	PCR	MTD
135	23	32 (24)*	32	34

* Figure in parenthesis indicates the number of positive specimens with Ogawa egg medium.

Table 5 Molecular Mechanisms of Drug Resistance

1. INH resistance
1) Total deletion of <i>katG</i> gene
2) Alteration of <i>katG</i> gene
3) Alteration of <i>inhA</i> operon
2. RFP resistance
Mutation in the <i>rpoB</i> encoding the β -subunit of RNA polymerase
3. SM resistance
1) Mutation in the ribosomal protein S12
2) Mutation in 16S rRNA gene
4. Quinolone resistance
Mutation in the <i>gyrA</i> gene

出率が低い肺外結核例や迅速な診断が要求される HIV 感染例の診断に有効である。

分子遺伝学的手法の導入により結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子も少しずつ明らかになってきた。INH, RFP, SM, ETH, CFLX に対する耐性遺伝子が調べられ報告されている。それぞれの薬剤に対する耐性に関与する遺伝子は独立しており染色体性と考えられている。また薬剤耐性は個々の薬剤の間で複数の機構⁶⁾により発現されることも明らかになってきた (Table 5)。これら耐性に関与する遺伝子の変異はその領域を PCR 法で増幅後に電気泳動すること (PCR/Single stranded conformational polymorphism analysis) によ

り⁷⁾,あるいは検体の PCR 産物と感受性株の PCR 産物の間のハイブリッドの電気泳動 (PCR/Heteroduplex formation analysis) パターンにより⁸⁾迅速に検出できる。これまでに明らかにされた遺伝子の変異と耐性発現の関係を調べてみると INH 耐性株と SM 耐性株では 60~70%のみが既知の遺伝子に変異が見られるが, RFP 耐性株についてはその90%以上は変異が RNA ポリメラーゼの β -サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子内の70ベース領域内に見られる⁸⁾ことがわかり, RFP 耐性株の迅速検出のために有効であることが明らかになった。今後さらに耐性遺伝子の解明が進めば,臨床検査への応用が可能となる。

3. 検査法の将来

核酸増幅法により定量的に核酸の増幅を行うことは理論的に可能であるが,現在市販されているキットではそれができない。結核の対策の上で患者の排菌量を知ることが重要であり,その意味で塗抹検査は省くことのできない検査である。

全体の抗酸菌症に占める非結核性抗酸菌症の割合が年々増えている⁹⁾。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。また上述のように耐性に関与する遺伝子についても日常検査に応用できるほどの情報は無い。これらのことは培養試験は臨床の場で今なおその重要性を失っていないことを示

している。非放射性 MGIT システムは現在多くの施設で評価中であり、有効性が確かめられれば将来卵培地に加えて広く使われるようになる。

喀痰以外の材料からの結核菌の検出はまれである。増幅酵素阻害物質の問題は残るが、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。また病気の進行の速い HIV 感染例や確定診断が早急に要求される例への導入も有効である。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ことから、核酸増幅法の導入の価値は余り高くないと考えられる。塗抹と培養検査の重要性、検査技師の仕事量、経済性を考えたとき、すべての材料に使用するのではなく、有効と考えられる例のみ核酸増幅法が使われるものと考ええる。これら生物学的検査に完全（100%）を期待できない。それぞれは補助手段の1つであり、結核の診断は他の検査の結果を加え総合的に行われるものとする。

文 献

- 1) Snider DE, Ropper 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) Stitt DT, Parks TL, Mellarkey JC, et al.: A rapid non-radiometric method for detecting the growth of mycobacteria. Abstr. 6th Eur

Congress Clin Microbiol Infect Dis. 1993; Sevilla.

- 4) 阿部千代治: 酸素反応性蛍光センサーを用いた新しい抗酸菌迅速培養システムの検討. 感染症誌. 1996; 70: 360-365.
- 5) 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.
- 6) Morris S, Bai GH, Suffys P, et al.: Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis. 1995; 171: 954-960.
- 7) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Direct automated detection of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single stranded conformation polymorphism analysis. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 2054-2058.
- 8) Williams D, Waguespack C, Eisenach K, et al.: Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 2380-2386.
- 9) 坂谷光則: 非定型抗酸菌症の疫学と臨床. 結核. 1994; 69: 119-124.

2. 新しい抗酸菌検査法の手技上の問題点

国立予防衛生研究所細菌部 山崎利雄

はじめに

近年、新しい抗酸菌検査法として PCR 法¹⁾が開発され、研究室では、臨床材料中の抗酸菌の検出・同定が一日で可能になった²⁾が、手技の煩雑さ故に、一般の臨床検査室では用いられていなかった。ところが、一昨年、逆転写酵素と RNA ポリメラーゼを用いて RNA を増幅し、Hybridization protection assay により検出する DNA プローブ「中外」-MTD キット（中外製薬、以下 MTD と略）が市販され、結核の迅速診断に利用されるようになった³⁾。続いて PCR 増幅 DNA 産物を Microwell plate hybridization 法によって検出する Amplicor キット（日本ロッシュ）が市販され、一般

の臨床検査室でも *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* の3菌種を迅速に検出することが可能になった⁴⁾。しかし、新しい抗酸菌検査法には、いくつかの手技上の問題があり、これらについて検討を行ったので報告する。

核酸増幅検査の偽陽性について

核酸増幅法は、理論的には菌1個の核酸が増幅反応系に存在すれば検出できる高感度検出法である。そのため、菌の核酸混入により偽陽性が出やすい。偽陽性の原因としては、①増幅反応系に混入した核酸によるキャリーオーバーコンタミネーション、②検体間でのクロスコンタミネーション、③化学療法後の死菌体からの検出、④培養

法の不備, が考えられる。前処理時の NaOH 濃度が高すぎたり, 放置時間が長すぎた場合, また, 培地の不備により菌は生きているが, 培地上にコロニーを形成できない場合に培養陰性と判断され, 偽陽性と判定される場合が考えられる。

核酸増幅検査の偽陰性について

偽陰性の原因には, ①抗酸菌 DNA 抽出の困難性がある。結核菌の細胞壁は, 非常に強固で, DNA 抽出方法によって陰性になる場合がある。②増幅あるいは検出時の反応阻害物質の存在である。現在知られているのは, 血液 (ヘモグロビン), ヘパリン, 喀痰溶解剤, SDS 等である。③検査法の検出限界がある。MTD では, 反応系に1.7cfu 存在すれば陽性になった。吉村らは, 1.2cfu が検出限界とっている⁵⁾。Amplicor-TB キットの場合は3.1cfu, 自家製 PCR では12cfu であったが, 実際の臨床各種検体からの検出感度は, 上記①, ②の原因も加わりこれより低くなる。④検出用プローブの特異性である。増幅はされるが, プローブとハイブリダイズしない塩基配列である場合には最終的に検出されない。各々のキットで使われているプローブの場合, 現在どの程度この種の結核菌が存在するのか不明である。*M. avium* と *M. intracellulare* の中間にある MAC は, Amplicor Kit にて検出されない可能性がある。⑤洗浄操作の不備で試料流出, 粗雑洗浄操作等があげられる。

核酸増幅法による生菌および死菌の検出

核酸増幅法では, 検体中に存在する菌の生死に関係なく菌の核酸増幅が行われる。そこで, MTD による生菌, 死菌の検出感度の差を調べるために, *M. bovis* BCG

表1 MTD による生菌および死菌の検出

10倍希 釈系列	cfu/assay	生菌	MTD による判定結果		
			殺菌処理方法		
			RFP	高圧滅菌	UV照射
0	1.7×10 ⁶	+	ND	+	+
-1	1.7×10 ⁵	+	+	+	+
-2	1.7×10 ⁴	+	+	+	+
-3	1.7×10 ³	+	+	+	+
-4	1.7×10 ²	+	+	+	+
-5	1.7×10 ¹	+	+	-	+
-6	1.7	+	+	-	+
-7	0.17	-	-	-	-
-8	0.017	-	-	-	-

ND: not done

+: 陽性 (≥30,000RLU), -: 陰性 (<30,000RLU)

使用菌: *M. bovis* BCG Tokyo (NIHJ1608) 生菌数 3.4×10⁷ cfu/ml

表2 血液の存在がMTDの判定結果に与える影響

血液 (%)	MTD の測定値と判定結果			
	PBS (RLU)	判定	BCG* (RLU)	判定
0	1,307	-	1,905,847	+
2.5	8,501	-	393,833	+
5.0	22,523	-	21,900	-

*25 cfu/assay

+: 陽性 (≥30,000RLU), -: 陰性 (<30,000RLU)

Tokyo 株の 1mg/ml の菌液の10倍段階希釈系列を作り, 各濃度の菌液を4分割し, それぞれ未処理, 抗結核薬処理 (RFP 10μg/ml 3週間), 高圧滅菌処理 (121℃ 15分間), UV照射処理 (30cmの高さから30分間) を行った。各濃度の処理済み菌液について検出を行った結果を表1に示す。未処理で10⁻⁶ 希釈液まで検出されるサンプルでは, RFP 処理, UV 処理をしても10⁻⁶ まで, 高圧滅菌処理では, 10⁻⁴ まで検出された。この結果より, MTD は, 死菌であっても検出し, その程度は, 生菌なみであることがわかった。この傾向は, 自家製の PCR でも同様であった (データ示さず)。このように, 死菌が存在しても検査陽性となる核酸増幅法を治療中の患者由来検体に適用する場合には, 時期によって死菌が検出される場合もあるので注意が必要である。

検体中の血液の影響

MTD, Amplicor 両キットとも CDC の推奨する前処理方法を行うように指示している。血液は, 増幅酵素の活性を著しく阻害するのでフェノール精製が望ましい。しかし, キット使用の場合, 作業簡略化のために, PBS 懸濁液が, 直接反応系に入る。そこで PBS にて 0, 2.5, 5.0% になるように血液を添加し, BCG を 25cfu/反応に加えた系について, 血液の影響を調べた結果を表2に示す。

血液が5.0% 存在すると, PBS のみの判定は, 22,523RLU で陰性で cut off 値30,000RLU に近い値を示した。このことは, 血液が, 反応液中に5.0% より高濃度に存在すると, 偽陽性になる可能性があることを示唆している。BCG 25cfu/反応では, 2.5% までは陽性と判定されたが, 5.0% では陰性となった。このことは, 試料中の菌数が, 検出限界に近い検体では, 偽陽性になる可能性があることを示唆している。

Panaccio らによれば, 血液は, 1% 以下の濃度で, Taq polymerase の活性を完全に阻害すると報告している⁶⁾。このように MTD を用いる場合の血液混入は結果に大きく影響するが, 検体の NALC-NaOH 処理を忠実に実施すれば, 血液は溶血し, 逆転写酵素の活性を

表3 同一検体のAMPLICOR-TBと
MTD 結果の比較

		略痰、気管支洗浄液68例		
		AMPLICOR-TB		合計
		陽性	陰性	
MTD	陽性	14	2*	16
	陰性	4*	48	52
合計		18	50	68

*: すべて塗抹陰性、培養陰性の検体
MTD 陽性の一致率: 77.8%
両法の一致率: 91.2%

表4 同一略痰培養結果と塗抹検査、MTD、PCR
結果の比較

		略痰 110例			
		培養		感度 (%)	特異度 (%)
		陽性	陰性		
塗抹検査	陽性	44	6	59.5	83.3
	陰性	30	30		
MTD	陽性	70	11	94.6	69.4
	陰性	4	25		
PCR	陽性	70	10	94.6	72.2
	陰性	4	26		

阻害するヘモグロビンは、除去することができる。

Amplificor の場合は、PBS による洗浄操作が特に重要である。Amplificor のプロトコルでは、PBS 懸濁液をさらに1回略痰洗浄液により洗浄操作をするので、PBS 洗浄操作を丁寧に行うことにより血液の影響をほとんど取り除くことができる。血液に限らず、阻害物質による偽陰性をできるだけ防ぐためには、PBS 洗浄操作を丁寧に行うことが最も重要である。

Amplificor-TB キットと MTD キットの比較

略痰、気管支洗浄計68例について、Amplificor-TB と MTD の両キットを用いて検出した同一検体の成績を表3に示す。MTD 陽性は16例あったが、Amplificor-TB では14例が陽性、2例は陰性であった。MTD 陰性は52例あったが、Amplificor-TB では4例が陽性、48例は陰性であった。MTD の Amplificor-TB との陽性の一致率は77.8%、陰性を含めた完全一致率は91.2%であった。

MTD 陽性 Amplificor-TB 陰性 2例、MTD 陰性 Amplificor-TB 陽性の4例の計6例に食い違いがみられたが、これらは塗抹検査、培養検査のいずれも陰性で

あり、両キットは、おおむね同程度の検出能力を持っていることが確認された。キットの手技、装置の特殊性など、一長一短があり、優劣は付け難かった。キット化により、手技が簡略化されても偽陽性が出やすい事実は改良されておらず、検査結果の解釈が重要となる。

同一検体の培養結果と塗抹検査、MTD、 自家製 PCR 結果との比較

患者略痰で、非定型抗酸菌が分離された略痰を除いた110例について、培養結果と塗抹検査、MTD、自家製 PCR (38kDa の *paB* 遺伝子⁷⁾ を標的にした Nested-PCR) の各結果の比較を表4に示す。塗抹検査の感度は59.5% 特異度は83.3%であった。MTD、PCR とも感度は、94.6%であったが、特異度が MTD 69.4%、PCR 72.2%と低い値であった。これは、治療開始2~6週間の入院患者の略痰70例が含まれているので、治療により殺菌された菌を検出したために、培養陰性、核酸増幅検査陽性例が増え、特異度が下がったものと考えられる。この結果より、結核の治療中の経過判定目的に、核酸増幅検査法を使うのは、問題があると考えられた。

ま と め

核酸増幅法は、分離培養の結果を待たずに結核菌の存在を証明する事ができる。そのため、操作の全過程において手技上の問題による偽陽性、偽陰性を出さぬよう細心の注意が必要である。また、核酸増幅検査法は、死菌であっても生菌と同程度に検出するので、必ず核酸増幅法と分離培養法は並行して行い核酸増幅法の結果を、分離培養結果で確認する必要がある。

謝 辞

発表を終えるにあたり、国立予防衛生研究所・渡邊治雄、芳賀伸治、和田昭仁、日本 BCG 研究所・中村玲子、兵庫県医科大学・田村俊秀、林 公子、国家公務員等共済組合連合会虎の門病院・藪崎礼子、国立療養所南横浜病院・藤野忠彦、国立国際医療センター・豊田恵美子、結核予防会結核研究所・和田雅子の諸先生方のご協力に心から御礼申し上げます。また、資料を提供してくれた中外製薬株式会社、日本ロッシュ株式会社に感謝します。

文 献

- 1) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel, et al.: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988; 239: 487-491.
- 2) 山崎利雄, 中村玲子: ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 法による抗酸菌の検出。結核。

- 1992; 67: 441-447.
- 3) 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. 結核. 1994; 69: 7-14.
- 4) 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.
- 5) 吉村忠司, 宮城千恵子, 後藤 進, 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.

- 6) Panaccio M, and Lew A: PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Research*. 1991; 19: 1151.
- 7) Sjöbring U, Mecklenburg M, Andersen AB, et al.: Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1990; 28: 2200-2204.

3. 抗酸菌感染症に対する分子生物学的検査法の臨床的有用性

長崎大学医学部第二内科 古賀 宏 延

はじめに

近年の分子生物学の技術進歩は、遺伝病、悪性疾患、感染症などの診断や治療に盛んに応用されるようになった。私たちは1989年より抗酸菌症への応用を考え、結核症の遺伝子診断あるいはDNA診断の臨床的有用性を検討してきた。本シンポジウムでは、現在までの当教室での成績と今後の展望について発表した。

I. 核酸増幅法による抗酸菌の検出

結核菌の遺伝子同定法として、DNAプローブ法が開発され、短時間での抗酸菌同定が可能となった¹⁾²⁾。しかし、本法による臨床検体中の抗酸菌検出は困難であったことから、私たちはpolymerase chain reaction (PCR)の応用を考えて臨床的検討を行った。

1) PCRによる抗酸菌の検出

PCRを施行するにはまず標的遺伝子を決定し、適切なプライマーを合成する必要がある。私たちは結核菌に対しては38kDaの蛋白抗原, protein antigen b (Pab)をコードする遺伝子を標的としたnested PCRを³⁾⁴⁾、また非結核性抗酸菌には16s rRNAをコードする遺伝子のPCRを検討し⁵⁾⁶⁾、すでにそれらの臨床的有用性を本学会で報告した。

2) 抗酸菌検出キットの検討

平成6年から2種類の抗酸菌迅速検出キットが市販され、私たちも従来の塗抹・培養法、Pab遺伝子 nested PCR法 (Pab-PCR)³⁾⁴⁾、rRNAを増幅するキットであるGen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test (MTD, 中外製薬株式会社)^{7)~10)}、および16s rRNAをコードしているDNAを増

幅するアンプリコア™マイコバクテリウム(Amplicor, 日本ロッシュ株式会社)^{11)~13)}の4種類の方法を比較検討した。その結果、*in vitro*の結核菌検出感度は、Pab-PCRとAmplicorが 1.8×10^{-1} CFU, MTDが1.8 CFUで、各検査法間に有意差はみられなかった。また、呼吸器感染症患者163症例から得られた410検体(喀痰214, 気管内採痰100, 胃液50, 胸水27, 尿9, その他10)を用いた検討では、塗抹・培養法との比較において、各検査法の感度, 特異性, 一致率に有意差はみられなかった(表1)。不一致例として、偽陰性例と偽陽性例が表1のようにみられたが、偽陰性の原因として核酸増幅阻害物質の存在や検体中の菌量の問題などが考えられたものの、詳細は不明である。一方、偽陽性は偽陰性より多くみられたために、各症例の臨床経過を検討したところ、明らかに結核症とは考えにくい症例から得られた検体、つまり、真の偽陽性と考えられた検体はPab-PCRが10例中1例(全検体中に占める頻度は0.3%), MTDが22例中4例(1.2%), Amplicorが15例中2例(0.7%)であった。

また、検体の種類別の陽性率を比較するために、肺結

表1 各検査法における感度および特異性の比較

	PCR		MTD		Amplicor	
	+	-	+	-	+	-
塗抹・培養	+					
	16	6	19	3	15	3
	10	276	22	286	15	269
感度 (%)	72.7		86.4		83.3	
特異性 (%)	96.5		92.9		94.7	
一致率 (%)	94.8		92.4		94.0	

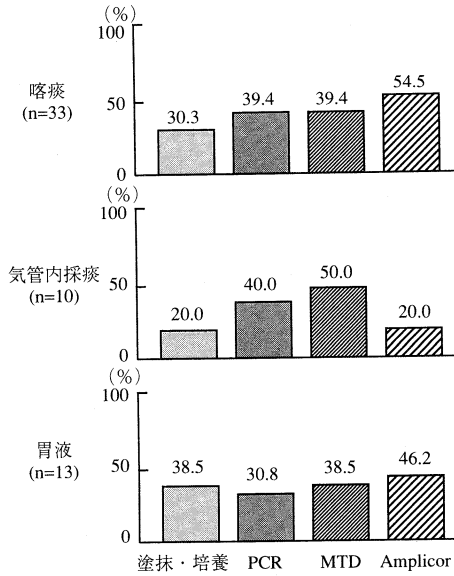


図1 検体別の各検査法の陽性率

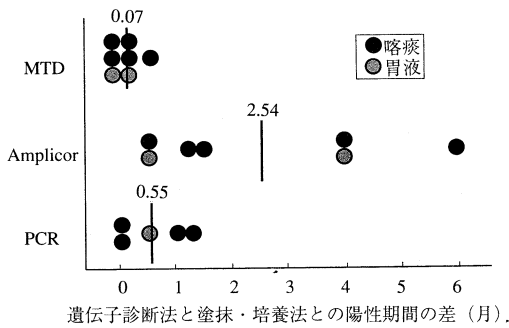


図2 遺伝子診断法と塗抹・培養法との陽性期間の比較

核確診例17症例から得られた、治療前後での喀痰など56検体を用いて検討を行った(図1)。これらの検体の中には塗抹・培養陰性化後の検体も多数含まれていたために、全体としての陽性率はかなり低値であった。喀痰および胃液での陽性率はAmplicorが最も高く(それぞれ55%と46%)、また気管内採痰ではMTDが最も高い成績(50%)であった。これらの結果が各検査法の感度の差によるものか否かは検体数が少ないために明確ではない。しかし一つの可能性として、喀痰や胃液には治療により死滅した菌が多数含まれていると仮定すれば、このような検体に対してはDNAを増幅の対象としているAmplicorの感度が高く、逆にほとんどが塗抹・培養陰性例に施行された治療開始直前の気管内採痰では、生菌の排菌量が非常に少ないために、コピー数の多いrRNAを増幅の対象としているMTDの感度が高いものと推測された。これらの成績から、臨床検体の種類によって適切な検出法を選択する必要性が示唆されたが、その結論を得るにはさらに多くの検体での検討を要すると思われた。

一方、遺伝子診断法を治療効果判定に用いることは是非が大きな問題として問われている。図2には肺結核症例から得られた喀痰(5例)と胃液(2例)を用い、治療開始前後で2週間毎に各遺伝子診断法を施行し、その陽性期間と塗抹・培養の陽性期間との差を検討したものである。MTDでは6症例からの喀痰や胃液はいずれも塗抹・培養とほぼ同時期に陰性化し、平均0.1カ月の差であった。これに対し、Amplicorでは症例によっては6カ月も長く陽性期間が持続し、平均2.5カ月の差がみられた。なおPab-PCRでは平均0.6カ月であった。

以上の結果より、Amplicorは生菌の持続排菌を判定するには不向きと考えられたが、MTDは塗抹・培養法の結果とよく一致したために、治療効果判定への応用の可能性が示唆された。この現象を*in vitro*の実験系で確認するために、結核菌(H37Rv株)を薬剤添加や

表2 死菌に対する遺伝子診断の判定

培養条件	検査法	培養期間(週)				
		0	1	2	3	4
INH 10μg/ml RFP 50μg/ml の併用	塗抹	+	-	-	-	-
	培養 (菌数定量)	3.3×10 ⁶	<10	<10	<10	<10
	MTD	+	+	+	+	+
	PCR	+	+	+	+	+
pH 3.0	塗抹	+	-	-	-	-
	培養 (菌数定量)	3.3×10 ⁶	<10	<10	<10	<10
	MTD	+	+	+	+	+
	PCR	+	+	+	+	+

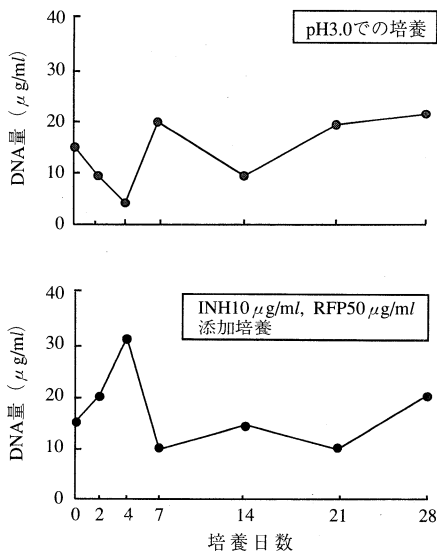


図3 酸性条件下および薬剤添加時のDNA量の変化

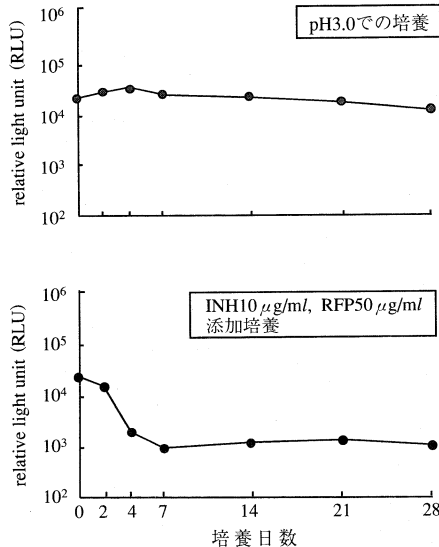


図4 酸性条件下および薬剤添加時のrRNA量の変化

酸性条件下（胃液内を想定）で培養し、1週間毎に菌液のMTDとPab-PCRを施行した（表2）。その結果、塗抹・培養は培養開始時のみ陽性でその後は陰性化したのに対し、MTDとPab-PCRは培養4週間後まですべて陽性であった。つまり、微量の核酸を検出する遺伝子診断法は、試験管内ではたとえほとんど死菌であっても陽性となり、死菌と生菌の差を遺伝子診断法で明確にすることは困難であった。

しかし、実際に試験管内に含まれているDNAとRNAの量に差はないかどうかを検討したところ（図3, 4）、DNA量はpH3.0条件下や薬剤添加にても4週目まではほぼ10~20 μg/mlであったのに対し、rRNAをhybridization protection assay (HPA)法で半定量してみると、pH3.0の条件下ではrelative light unit (RLU)は約10⁴ではほぼ一定であったのに対し、薬剤添加時にはRLUの測定限界以下と思われる10³程度に低下した。つまり、薬剤添加により死菌となった時のrRNA量は明らかに低下していたことから、試験管内ではMTDの結果に差はみられなかったものの、生体内ではrRNA量を良く反映し、治療後の塗抹・培養陰性化の時期とMTDの結果がよく一致したものと推測された。

II. DNAプローブ法による薬剤感受性検査

抗酸菌の検出・同定とともに、臨床的に重要な検査は菌の薬剤感受性検査である。通常は3~4週間を要する感受性検査を迅速に行うために、DNAプローブ法の応用を試みた。つまり菌の増殖の程度を、AccuProbeを

用いたrRNAの半定量(RLU値)で判定するもので、INHとRFPに対する有用性に関してはすでに宮本らが報告している¹⁴⁾¹⁵⁾。図5, 6には同様の方法を用いた時のEBとSMに関する結果を示した。EBでは培養開始3日目以降に、SMでは1日目以降に感受性の判定が可能であった。この方法を用いることにより主要な抗結核薬4剤に対する培養結核菌の感受性を1~3日で判定することができ、しかも非放射性で安全、かつ操作も簡便なことから、結核菌の迅速薬剤感受性検査法として有用であると考えられた。

III. 薬剤耐性遺伝子による薬剤感受性の推定

DNAプローブ法の応用で、薬剤感受性検査の迅速化が期待できるとしても、そのためには菌が培養されることが前提条件である。たとえば、培養陰性、PCR陽性の検体では薬剤感受性検査は施行できない。そこで、PCRを用いた耐性菌の判定法について検討した。

RFP耐性にはRNA polymerase β subunit (*rpoB*) 遺伝子内のpoint mutationが深く関与していることがすでに報告されている¹⁶⁾。しかし同様の現象がわが国の耐性株でもみられるか否か、またpoint mutationの部位や種類と耐性レベルには関係はあるのかなど、不明確な点も多い。

教室の大野らはPCRを用いた直接塩基配列決定法(PCR direct sequence)にて、*rpoB*遺伝子内の変異の好発部位である69bp (core region)の塩基配列を決定し、アミノ酸の変異の部位や種類とRFPのMICとの関係を検討した¹⁷⁾¹⁸⁾(図7)。その結果、変異の部位

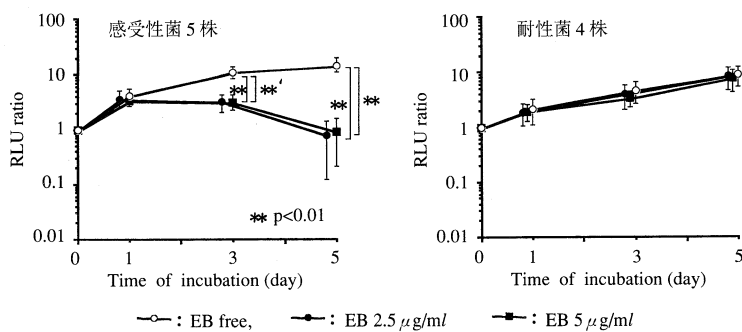


図5 EB感受性菌と耐性菌のRLU ratioの比較

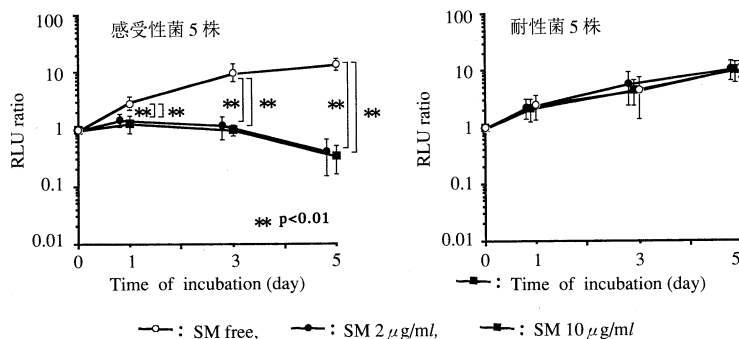


図6 SM感受性菌と耐性菌のRLU ratioの比較

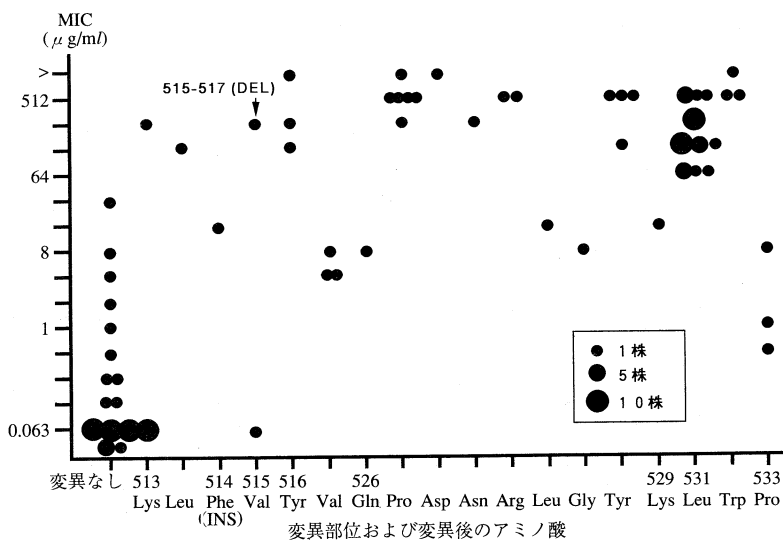


図7 RFPのMICとrpoB遺伝子内変異部位との関係

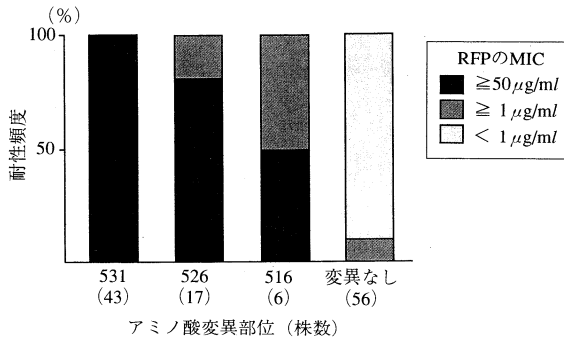


図8 アミノ酸の変異部位による RFP 耐性頻度

や種類は Telenti らの報告¹⁶⁾ とほぼ一致し、しかも変異の部位により RFP の MIC がある程度予測可能であることが示唆された。つまり、図8に示したように、point mutation がコドン531番に存在する場合には RFP の MIC が $50 \mu\text{g/ml}$ 以上の確率は100%、526番では80% (残りの20%も MIC $1 \mu\text{g/ml}$ 以上)、516番では50% (残り50%も MIC $1 \mu\text{g/ml}$ 以上) となり、いずれにしても非常に高い確率で耐性菌であることが予測できた。一方、コドン515番や533番の変異、あるいは変異のない株では、90%以上が MIC $1 \mu\text{g/ml}$ 以下の感受性菌であった。

以上より、多少複雑ではあるものの、*rpoB* 遺伝子の塩基配列を知ることにより RFP 耐性の予測が可能なことから、現在ではこれを喀痰などの臨床検体に直接応用し、結核菌の検出と同時に RFP 耐性の予測を行う方法を検討中である。今後このような方法は、INH 耐性に関与する catalase-peroxidase 遺伝子¹⁹⁾ や *inhA* 遺伝子²⁰⁾ などに対しても検討が必要であると思われる。

結 語

結核症に対する遺伝子診断の有用性は高い。しかし、核酸汚染による偽陽性や、増幅阻害物質による偽陰性の問題、あるいは治療経過判定への応用の是非など、未解決の問題を積極的に解決していく必要がある。

(最後に、発表の機会を与えて頂いた片山透会長、座長の労をお取り頂いた青柳昭雄先生、本研究に御協力頂いた教室の諸先生方に感謝致します。)

文 献

- 1) Maesaki S, Kohno S, Koga H, et al.: A clinical comparison between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections. *Chest*. 1993; 104: 1408-1411.
- 2) 後藤美江子, 奥住捷子, 岡 慎一, 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.
- 3) 古賀宏延, 宮崎義継, 河野 茂, 他: 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.
- 4) 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.
- 5) 橋本敦郎, 古賀宏延, 河野 茂, 他: Nested PCR 法と DNA プローブ法を併用した抗酸菌の迅速同定. *結核*. 1994; 69: 767-772.
- 6) Hashimoto A, Koga H, Kohno S, et al.: Rapid detection and identification of mycobacteria by combined method of polymerase chain reaction and hybridization protection assay. *J Infection*. 1996; in press.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 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) Damato RF, Wallman AA, Hochstein LH, et al.: Rapid diagnosis of pulmonary

- tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1832-1834.
- 13) Yajko DM, Wagner C, Tevere VJ, et al.: Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the Amplicor PCR assay. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1944-1947.
- 14) 宮本潤子, 古賀宏延, 河野 茂, 他: Hybridization protection assay (HPA法)を用いた結核菌の迅速薬剤感受性検査. 結核. 1995; 70: 377-383.
- 15) Miyamoto J, Koga H, Kohno S, et al.: New drug susceptibility test for *Mycobacterium tuberculosis* using the hybridization protection assay. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1323-1326.
- 16) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 2054-2058.
- 17) 大野秀明, 古賀宏延, 河野 茂, 他: PCR法を用いた Rifampicin 耐性結核菌の迅速検出法に関する検討. 結核. 1994; 69: 773-778.
- 18) Ohno H, Koga H, Kohno S, et al.: Relationship between rifampin MICs and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 1053-1056.
- 19) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al.: The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature. 1992; 358: 591-593.
- 20) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al.: *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 1994; 263: 227-230.

4. PCR法による抗酸菌検査法の診断治療上の位置づけ

国立療養所大牟田病院 加治木 章・横山 俊伸・二宮 英昭
丸山 正夫・北原 義也・原田 泰子
原田 進・田中 靖・高本 正祇
石橋 凡雄

はじめに

細菌の肺抗酸菌症の疫学上の問題点として、肺結核症の発生数の減少傾向の鈍化と非定型抗酸菌症の増加が指摘されている。

今後は、さらに患者の高齢化、HIVなど compromised hostにおける抗酸菌症、国際化に伴う外国人の抗酸菌症の問題など複雑化が予想される。

感染症の診断治療は早期診断、早期治療が必須であり、結核の場合も、特に周囲への二次感染の防止という意味でも早期診断が強く望まれる。現在までの肺抗酸菌症の診断は、胸部X線写真などの画像診断、ツベルクリン反応などの補助診断、喀痰など検体の塗抹培養検査などで行われてきた。しかし、これからの複雑化した状況下では、画像上非典型例の増加が予想され、また、一般臨床医の抗酸菌症への認識不足もあり、診断の遅れが懸念される。塗抹検査は早期診断に有用であるが、感度が低

いこと、結核菌と非定型抗酸菌の鑑別が出来ないことが問題である。培養検査は感度は高いが、診断まで通常4～8週必要であり早期診断はできない。

最近、医学の分野において分子生物学の技術が急速に進歩しており、感染症でもその臨床応用が進んでいる。抗酸菌の診断においても、遺伝子分析により直接検体より抗酸菌を検出するPCR法とMTD法が保険適用となり、日常診療に応用され始めた。これらの方法は、感度に優れ、早期診断が可能であり、診断上の有用性が報告されている¹⁾²⁾。しかし、偽陽性、偽陰性の問題、死菌や発育不良菌の検出の問題などが指摘されている。

われわれの施設では全抗酸菌症入院患者中約20%を非定型抗酸菌症が占めており、その大部分はMAC症であるため、これらの菌も検出できるPCR法による抗酸菌DNA検出キット(アンプリコア™マイコバクテリウム)を採用した。平成6年12月より臨床応用を開始し、この方法の利点、問題点について検討を試みた。

対象および方法

平成6年12月より平成7年11月までに入院あるいは外来受診した抗酸菌症例および抗酸菌症の鑑別が必要であった症例計586症例1,831検体について検討した。検体の内訳は、喀痰1,669検体、気管支肺胞洗浄液(BAL)122検体、胸水27検体、胃液5検体、膿5検体、尿1検体、髄液1検体、組織1検体であった。

PCR法は日本ロッシュ社製のキット、アンプリコア™マイコバクテリウムを用い、塗抹法は蛍光法、培養法は1%小川培地を用いた。検体は2%でNaOHで処理し、塗抹培養を行い残りの検体を使用書に従ってPCR法を行った。ただしN-Acetyl-L-Cystein法は行わなかった。

結果

全検体についての各検査法の陽性率はPCR11.3%(塗抹培養と同一検体については11.4%)、塗抹3.2%、培養8.6%であった。菌種別の陽性検体数は*M. tuberculosis*107検体、*M. intracellulare*92検体、*M. avium*17検体であった。検体別にみると、喀痰は全検体とほぼ同様であり、BALはPCR10.0%、塗抹3.3%、培養10.8%、胸水はPCR7.7%、塗抹、培養はいずれも陽性例はなかった(表1)。

同一検体でPCR、塗抹培養検査が行われた1,672検体

表1 陽性率

全検体		PCR 207/1831(11.3%) [190/1672(11.4%)]*	
<i>M. tuberculosis</i>	107/1831		
<i>M. intracellulare</i>	92/1831		
<i>M. avium</i>	17/1831		
塗抹	54/1672 (3.2%)		
培養	144/1672 (8.6%)		
喀痰			
PCR	172/1515 (11.4%)		
塗抹	49/1515 (3.2%)		
培養	129/1515 (8.5%)		
BAL			
PCR	12/120 (10.0%)		
塗抹	4/120 (3.3%)		
培養	13/120 (10.8%)		
胸水			
PCR	2/26 (7.7%)		
塗抹	0/26 (0%)		
培養	0/26 (0%)		

* [] 内は塗抹培養と同一検体についての結果

表2 塗抹培養との比較(全検体)

		全菌種			
		塗抹 (+)		塗抹 (-)	
PCR	+	培養(+)	培養(-)	培養(+)	培養(-)
		(190)	41	7	66
	-	2	0	23	1457
		sensitivity		107/132	81.1%
		specificity		1457/1540	94.6%

		<i>M. tuberculosis</i>			
		塗抹 (+)		塗抹 (-)	
PCR	+	培養(+)	培養(-)	培養(+)	培養(-)
		(99)	23	7	21*
	-	1	0	8	1564

*:1例 *M. int* (+) **:2例 *M. int* (+)

		<i>M. intracellulare</i>			
		塗抹 (+)		塗抹 (-)	
PCR	+	培養(+)	培養(-)	培養(+)	培養(-)
		(85)	16*	0	40**
	-	1	0	15	1571

*:1例 *M. av* (+) **:3例 *M. av* (+)
***:2例 *M. av* (+) 3例 *M. tbc* (+)

		<i>M. avium</i>			
		塗抹 (+)		塗抹 (-)	
PCR	+	培養(+)	培養(-)	培養(+)	培養(-)
		(15)	3*	0	8**
	-	1	0	14	1642

*:1例 *M. int* (+) **:3例 *M. int* (+)
***:2例 *M. int* (+)

について、PCRと塗抹培養検査との比較検討を行った(表2)。MAC以外の非定型抗酸菌は塗抹培養陰性として検討した。PCRの感度は81.1%、特異度は94.6%であった。

塗抹培養検査とPCRの不一致例についてみると、偽陰性は、25検体19症例であった。結核については、9検体9症例であった。このうち4検体についてはinhibitorの検討を行った。inhibitorは検体に測定キットの

表3 塗抹培養との比較(未治療検体)

		塗抹(+)		塗抹(-)	
		培養(+)	培養(-)	培養(+)	培養(-)
PCR	+	21	0	34	16
	(71)				
	-	2	0	11	794
	(807)				

陽性率 PCR 8.1%
塗抹 3.1%
培養 8.8%

sensitivity 55/68 80.9%
specificity 794/810 98.0%

表4 結核菌陰性化後も PCR 陽性であった症例

No	学会分類	最終排菌後	治療開始後
1.	bIII ₂	29M	30M
2.	lII ₂	6M+*	6M+
3.	rII ₂	6M	6M
4.	bII ₂ pl	6M	6M
5.	bI ₃	5M+	11M+
6.	bI ₃	5M	9M
7.	bII ₂ (珪肺結核)	5M	5M
8.	bI ₂	4M	11M
9.	rII ₂	4M	10M
10.	bIII ₂ pl	4M	6M
11.	rII ₂	4M	4M
12.	bII ₁	3M+	6M+
13.	bIII ₁ pl	3M+	3M+
14.	bII ₂ pl	3M	4M
15.	rIII ₂ (気管支結核)	2M	3M
16.	bIII ₂ Op	2M	2M
17.	rII ₁	1M+	1M+
18.	bIII ₂ pl	1M	2M

* +は最終検査時に陽性であったもの

陽性コントロールを添加し測定しても陰性であったものを inhibitor 陽性とした。この結果、4 検体中 3 検体に inhibitor が陽性であった。9 症例中 6 症例では 2 回以上検査をしていたが、このうち 3 症例では別の検体で陽性であった。MAC については、16 検体 10 症例が偽陰性であった。7 検体について inhibitor の検討を行い、4 検体に inhibitor を認めた。2 回以上検査した 10 症例中 6 症例は別の検体で陽性であった。

塗抹培養陰性 PCR 陽性例は 76 検体 56 症例であった。結核では 48 検体 29 症例であり、明らかな偽陽性と考えられたものが 1 検体 1 症例あった。この症例は癌性胸膜炎の症例で検体は胸水であった。また、MAC 症確診例の 1 例で結核菌の PCR が陽性であった。この症例は真の偽陽性かどうか経過観察中である。その他の症例はすべて肺結核症、陳旧性肺結核症の症例であり、偽陽性と

表5 肺結核確診未治療例

No	同一検体			連続検痰(3~7日間)		
	PCR	塗抹	培養	塗抹	培養	経過中 PCR
1.	+	G4	+++			
2.	+	G4	+++			
3.	+	G4	++			
4.	+	G4	++			
5.	+	G4	++			
6.	+	G3	++			
7.	+	G2	10col			
8.	+	-	++			
9.	+	-	+			
10.	+	-	+			
11.	+	-	+			
12.	+	-	+			
13.	+	-	+			
14.	+	-	15col			
15.	+	-	10col			
16.	+	-	7col			
17.	+	-	5col			
18.	-	G5	++			
19.	-	-	+			+(1カ月後)
20.	-	-	5col			
21.	-	-	3col			-
22.	-	-	2col			
23.	-	-	-	G3	++	+(6カ月後)
24.	-	-	-	-	+	+(1カ月後)
25.	-	-	-	-	+	
26.	-	-	-	-	5col	+(1カ月後)
27.	-	-	-	-	-	+(1カ月後)
28.	-	-	-	-	-	+(胸水)
29.	-	-	3col	-	+(胃液)	+(3カ月後)

は判断しなかった。MAC については 31 検体 26 症例が塗抹培養陰性 PCR 陽性であった。このうち MAC 症確診例は 12 症例、疑診例 8 症例、陳旧性肺結核症 2 症例、肺結核症 3 症例、肺結核症疑診例 1 症例であり、これらも偽陽性とは判断しなかった。

これまで示した結果は治療の有無にかかわらず全症例についてのものであったが、抗酸菌症の診断への寄与という観点で検討する場合、未治療検体での解析が必要となる。表 3 に未治療検体 878 検体についての塗抹培養検査との比較成績を示す。陽性率は PCR 8.1%、塗抹 3.1%、培養 8.8% であった。PCR 法の感度は 80.9%、特異度は 98.0% であった。感度は全症例についてのもとはほぼ同等であったが、特異度はさらに高くなっている。これは治療後培養陰性となった後も PCR 陽性のものが多いことを表している。表 4 に結核菌陰性化後も PCR が陽性であった症例の一覧を示す。最長は菌陰性化後 29 カ月目の検体で PCR 陽性であった。この症例は培養は陰性であったが、画像など臨床的に再発が疑われた症例であった。残りの症例は菌陰性化後 1 カ月目から 6 カ月

後 PCR 陽性であった。

肺結核症確診例 29 症例の治療前の PCR, 塗抹培養検査の結果を表 5 に示す。症例 1 から症例 27 までは喀痰の成績であり, 症例 28 は胸水, 症例 29 は胃液の成績である。喀痰については, PCR 陽性は 27 症例中 17 症例で, 陽性率は 63% であった。陰性であった 10 例中 5 例は治療経過中 PCR 陽性検体が得られ, そのうち 4 例は入院翌月陽性であった。培養陽性は 27 症例中 22 症例で, 陽性率 81.5% であった。当院では抗酸菌症が強く疑われる症例については, 3~7 日間の連続培養を行っている。連続培養の結果を加えると培養陽性率は 27 症例中 26 例, 96.3% と非常に高い値を示した。

考 察

抗酸菌検出における PCR 法の最大の利点は早期診断が可能であるということ論を待たない。しかし, 問題点として, 偽陽性, 偽陰性の問題がある。偽陽性については, アンプリコアのキットでは carry over contamination の問題は解決されており, 残る問題は cross contamination である。今回の検討では, 明らかな偽陽性は 1 例のみであり, 実際の臨床には問題となることは少ないと思われる。一方, 偽陰性については, 一部の検体については inhibitor の存在が示唆された。胸水, 血液などでは inhibitor の存在が報告され, 洗浄操作など DNA 抽出法の工夫により inhibitor 除去が可能とされている³⁾⁴⁾。本報告の検体は喀痰であったが, その一部については, 検体の洗浄操作を繰り返すことにより PCR が陽性となったものもあった。また, 他の検体で陽性となったものも多く, 保険医療上の制約はあるものの, 症例によっては頻回の検査をすることも必要であろう。いずれにしても, 臨床医は検査室と密接な連携をとり, 臨床疑念があれば, 再検などで問題解決を計るべきである。

塗抹培養との比較において, 未治療検体に比較して全検体では特異度が低かった。これは, 既治療例では菌陰性化後も PCR が陽性となるものがあることを示している。治療開始前から治療開始後, 連続的に PCR, 塗抹培養の経過を追えた症例では, 培養陰性と同時に PCR も陰性となるもの, いったん陰性となったものが再び陽性化するもの, 培養陰性となっても, PCR 陽性が持続するものなどさまざまであった。最終排菌後最長では, 29 カ月後に PCR 陽性となったものもあった (表 4)。

結核病学会予防・治療合同委員会の勧告⁵⁾では結核の治療中の経過判定に PCR など核酸増幅法を用いないこととしている。しかし, 本症例では画像上再発が疑われ

たことより, PCR の結果が治療開始の一つの判断材料となり, その後の経過に有用であった。また, 治療開始後 PCR が陰性化した場合は退院時期決定の判断材料となると思われる。もちろん, PCR 陽性のみで退院させないというのは論外である。塗抹培養陰性 PCR 陽性については, 発育不良菌や死菌が含まれていると思われるが, これらの症例については, 単純に死菌と判断せず, 今後十分その経過, 予後を観察し, その臨床的意義を検討する必要がある。

PCR の感度については, 陽性率を全検体でみると PCR 11.4%, 培養 8.6% と PCR が最も高い値を示したが (表 1), 未治療検体では PCR 8.1%, 培養 8.8% と培養のほうが高かった (表 3)。さらに, 表 5 に示すように, 連続培養の結果も考慮に入れると, 診断まで時間がかかるという欠点があるものの連続培養法の有用性の高さは特記すべき結果であった。

先の結核病学会の勧告⁵⁾ではさらに気管支鏡検体の取扱いについての注意も述べられているが, われわれの症例では contamination と思われる症例はなかった。定期的な気管支鏡の汚染のチェック, 気管支鏡症例の綿密なチェックで contamination は防げられると思われる。

PCR 法は従来の検査法と併用することにより, 結核症, MAC 症の早期診断に極めて有用であるが, 臨床医は PCR の結果を他の臨床所見とあわせ総合的に判断する必要がある。

文 献

- 1) 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.
- 2) 阿部千代治, 森 亨, 藤井英治, 他: 結核菌の迅速検出のための MTD の評価に関する共同研究. 結核. 1995; 70: 7-12.
- 3) 布施川久恵, 宮地勇人, 大島利夫, 他: 胸水, 胃液からの PCR 法による結核菌検出—IS6110 遺伝子とアンプリコア™ マイコバクテリウムの比較—。臨床病理. 1995; 43: 941-947.
- 4) 玉造 滋, 多和田行男, 矢守貞昭, 他: 胸水からの *Mycobacterium tuberculosis* DNA の検出. 感染症学雑誌. 1996; 70: 95-97.
- 5) 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.

5. 新しい抗酸菌検査法に関するアンケート調査成績

国立療養所東京病院呼吸器科 倉島篤行

目 的

最近数年間の遺伝子工学の著しい進歩を反映し、結核菌発見後100年間以上も基本的に変化のなかった抗酸菌検査の現場にも、菌種同定としてのDNAハイブリダイゼーション法や核酸増幅としてのPCR法、MTD法がやつぎばやに導入され、かつてない変貌の中にあるといえる。このような中で、わが国の抗酸菌検査の基本とされてきた喀痰塗抹と小川培地を中心とした固形培地培養検査法が、現在どのような規模、どのような方法で行われているか？新しい検査法が入ってくる中で検査者自体がどのような意義を認め、どのような意識を持って検査を行っているか？臨床側の要求に対して検査全体としてどのように応えているか？今後の動向は？

これらの点を明らかにするため1995年2月第一次アンケート調査を行い、さらに1996年2月追加調査を行った。従来からこの種の調査はさまざまな機関、特に抗酸菌検査を多く抱える国立療養所であれば行われてきたが、本研究では従来調査が把握し得なかった大学付属病院、民間病院を含む全国の広範囲な医療施設を対象としている点と、実際に多くの検査を実施している検査センターを網羅している点で画期的といえるであろう。

方 法

自由意見記載含め合計111項目からなるアンケートを作成、すべての大学付属病院、600床以上の病院、40床以上の結核病床を有する病院のどれかに該当する全国の580病院と全国425の臨床検査施設合計1,005施設に送付し、1995年2月末日締め切りで回答を集計、解析検討を行った。また1996年2月には第1回調査回答施設に検体直接核酸増幅法についての追加アンケート調査を行った。

結 果

回答は593施設(59%)からあり、事前の予測では病院の2/3、検査施設の1/3から回収しようと考えたが、この予測数528を上回る回収を得た。これらのうち自施設内で抗酸菌検査を実施している施設は、447施設(44.5%)であった。以下この447施設を解析の対象とした。447のうち病院は350施設(78.3%)、検査センターは97施設(21.7%)であった。回答の単純集計では、全国で月間172,465検体の抗酸菌検査依頼があり、これは年間にとすると約200万検体以上にのぼる。このうち約57

%が検査センターで施行されている。以下アンケート項目に沿って病院(左列)と検査センター(右列)に分けて回答結果を提示する。

項目	病院	検査センター
	350施設	97施設
・抗酸菌検査に携わる専任人員1人以上	175施設	65施設
・毎日検査実施	288施設	81施設
・自施設検査実施内容		
塗抹	348施設	95施設
培養	346施設	84施設
ナイアシン	243施設	68施設
感受性	271施設	65施設
・生化学的菌種同定	109施設	38施設
・DNA菌種同定	137施設	31施設
・RNA, DNA増幅	28施設	25施設
・月間依頼検体数		
平均	218検体	1,067検体
この内新技術法平均	19.9検体	247.9検体
・陽性検体比率		
従来法	6.8%	3.7%
新技術法	19.0%	7.3%
・検体数傾向		
従来法	不変	不変
新技術	増加	増加
・採取から検査開始までの時間		
従来法		
平均	9時間	16.8時間
条件	室温	冷蔵
新技術法		
平均	48.4時間	32.9時間
条件	冷蔵	凍結
・喀痰の占める率		
従来法	87.3%	84.9%
新技術法	79.5%	81.8%

・検体(喀痰)良否報告		
する	15施設	28施設
・塗抹方法		
チール	274施設	91施設
蛍光	110施設	41施設
・培養前処理		
NaOH	260施設	71施設
4%	133施設	37施設
平均時間	16分	20分
他方法	129施設	21施設
・培地		
3%小川	153施設	38施設
1%小川	128施設	25施設
工藤 PD	84施設	17施設
K 培地	49施設	19施設
2%小川	43施設	6施設
ビット	41施設	1施設
小川変法	22施設	
MB	12施設	
・培地本数		
3本	11施設	3施設
2本	281施設	60施設
1本	50施設	24施設
・2本以上の場合の組み合わせ		
同一	159施設	52施設
異なる	141施設	14施設
・S, R 報告		
する	68施設	16施設
・菌種同定		
極東	95施設	41施設
DDH	88施設	28施設
・感受性検査		
試験管法	145施設	32施設
マイクロタイター法		39施設
ウェルバック法	19施設	2施設
・一般抗菌薬感受性		
する	26施設	1施設
・新技術法専任1人以上	17施設	17施設
・新技術法現在体制で可能1日検体数		
平均	12.6検体	63検体
・核酸増幅法依頼検体種別		
喀痰	73.2%	84.3%
他の体腔液	24.0%	9.5%
・今後の動向		

従来法確実	15施設	0施設
併用必要	175施設	44施設
全面移行	15施設	8施設

考 察

今回(95年2月)の調査からは、月間約17万件にのぼる抗酸菌検査の57%が臨床検査施設で行われていることが分かった。病院では50%、検査施設では68%が専任担当者をおき、塗抹培養はほぼすべての施設で行われている。月間依頼検体数で見ると病院は平均218検体に対し検査施設は平均1,067検体であった。病院では、検体採取から室温保存、平均9時間以内に検査開始されているが、検査施設では、冷蔵保存、平均32.9時間で開始されている。従来法の代表的な形態は、上記条件の検体をチールネルセン染色で塗抹、報告を行い、培養は、4%NaOHで16ないし20分前処理後2本の3%小川培地に分離培養する、というものであるが病院では検査施設に比べバリエイションが大きい。一部には8%NaOH30分という前処理も見られた。感受性検査は病院の77.4%、検査施設の67%で行われ、試験管法、マイクロタイター法がほぼ同数で行われている。菌種同定は病院検査施設とも39%で行われているが、この分野ではDNAハイブリダイゼーション法を用いる施設が生化学的同定法を用いる施設に匹敵してきている。

検体直接核酸増幅は1995年2月の時点では、病院では8%であるが、検査施設では既に26%が導入している。月当たりの全検体172,465検体中15,020検体(8.7%)が核酸増幅法で行われている。依頼検査の傾向で見ると従来法は不変ないし微減であるが、核酸増幅法は明らかに急速な増加傾向を示している。しかし病院で専任の担当者をおくところは17施設(4.9%)であり、現在の体制、測定キットでは1日可能な検体数は病院で平均12.6検体、検査施設で平均63検体となっている。今後の動向では、圧倒的な施設が、従来法との併用の必要性を答えており、その最大の理由は感受性検査での培養の必要からきている。

抗酸菌検査の特徴の一つは陰性確認検体が多いことであり、今回の調査でも陽性比率は、病院で6.8%、検査施設で3.7%である。極めて危険な病原体検出検査であるからこれ自身重要な意義を持っているが、スクリーニングとして大量検体に迅速簡便に行える検査として塗抹法は依然高く評価されており、また感染危険を評価できる定量性は核酸増幅法にない決定的な利点であり今後も必須検査と考えられた。

培養は比較的鋭敏とされてきた検査法であるが、固形培地の感度の低さ、8週間にも及ぶ培養期間は現代医療の要求する感度、迅速性にそぐわないものであるが、感

受性検査を前提とするとどうしても必要であり培養法、感受性検査そのものの技術革新が求められているが、現実にはコスト問題が主要と考えられるが圧倒的に小川固形培地が用いられている。

1996年2月、既述アンケート回答施設にさらに検体核酸直接増幅法についてのみの追加アンケート調査を行った。95年2月では全施設の12%に導入されていたが、96年2月では、27.8%の施設に導入された。導入施設のうち60%がアンプリコ法、33.8%がMTD法、6.2%が独自のPCR法であった。これらにより全検体の11.6%が核酸増幅法により行われるようになった。

検体直接核酸増幅法は、迅速性は高く評価されているが、コストの高さ、人員設備の必要性、前処理技術の複雑さは改善を求められており、臨床検査の現場で用いるにはいっそうの自動化が期待されている。感度については他の多くの研究で明らかにされると思われるが、現行のシステムではおおむね従来法を上回るものの培養法に達しない場合もあり診断上留意すべきである。これら従来法との不一致、あるいは臨床像との不一致に関し臨床側の学会、文献データの蓄積が未だ不十分で、結果の解釈に時に混乱が生じている。したがって核酸増幅法の実施に当たっては、従来法にまして臨床側と検査側の密接な協力が要請されている。多くの施設では、核酸増幅法実施の適応を含め、これらの問題に対する適切なガイドラインを期待している。

現時点では抗酸菌検査にトータルに応えるには従来法と新技術の異なった2系統の技術を維持せざるを得ず、人員、コストの面で多くの施設が苦慮している。しかし、現代の医療は感染症診断においても従来にない迅速性が要求されている。HIV感染合併結核では診断に4週待つことも許されない。抗酸菌検査技術もあらゆる点で見直しが必要であり、今後、核酸増幅法ではさらに新しい手法の登場、また培養法でも種々の高感度液体培地の登場が予想されており臨床、検査双方のいっそうの努力が要求されるであろう。

結 論

抗酸菌検査は、現在全国で年間約200万検体以上が実施されており、そのうち約57%が検査施設で行われている。塗抹、培養検査法は、種々のバリエーションはあるものの大多数で検査指針に準じた方法で行われている。依頼側、検査側双方に急速に核酸増幅法が期待され、全検体の11.6%が本法で行われているが、従来法や臨床像との不一致例等の新たな問題が生じており、データの集積、解析と臨床側と検査側双方のよりいっそうの協力が求められている。なお本研究は、厚生省厚生科学研究健康政策調査研究「結核の診断技術評価に関する研究」研

究費によった。

多忙中、煩雑なアンケート調査に協力して頂いた全国の抗酸菌検査担当者、特に時期的に一致した阪神震災地区からも多くの協力を頂き深謝する。

〔添付資料〕

以下に検査現場の実態、検査担当者の意識などより明らかに反映していると思われる自由意見記載の内容を要約、列挙する。

- 1日検体数からいって全部核酸増幅に切り替えるのは困難。DDHは導入する予定だがBCG投与泌尿器検体ではTB complex+となるため困る。
- G(+)で転院してきても当方で否定多い。臨床細菌学をきちんと出来る技師が育てられていない、検査依存で結果の真偽を検証出来ない医師等問題あり。採算重視で結核症検査がきちんと出来ない現状は驚くばかり。従来法でも融解後集菌操作を加える等まだ陽性率をあげる方法があるが目下細菌室ではMRSAに振り回されている。
- すべて塗抹と増幅法同時に出されるのは疑問。
- すべて請求がとおるか不明。
- 従来法でも早ければ2週で陽性化、検体をプールし週1回PCRと現実的にどれだけの差か？結核病棟での浮遊菌でのクロスコンタミ可能性は？過去にTB、現在非定型抗酸菌症で、PCRではTB+otherAFBの結果もあり。従来法で37度のみの培養はTBしか考えず問題。7H9でも発育しないのはどうするか？
- 時代の移行はそうであるが。
- 検体がある程度集めてからでないロス多い、結果を判定できる専門医が少ない、人員要、試薬単価高く保険点数あまりつりあわない。
- 細菌検査依頼の多くは特定感染症疑いで出されるのではなくスクリーニングとして全項目チェックでくる。MRSAにすぐVCM投与計画するDr.も少なくないという臨床側の感染症に対する無理解の中では核酸増幅法は保険医療費増大の危険性有り検査対象を明確に制限した方がよい。
- 臨床側が迅速希望時のみ対応で可。
- 死菌の問題、臨床側の統一見解要、人員が増えないと迅速性活かせない。
- MTDで入院早くなった。月1、1患者のしほりあり。
- 臨床からの要望強い、コスト人員要、併用すると点数赤字？結果を臨床側が絶対診断としてしまう問題がある。
- 核酸菌検査標準化望まれる。

- ・近い将来、検査 Target としての結核は増加するかもしれない。他の分野では Demand pull と Technology push がうまく関連し新しい検査技術が普及したが感染症検査は例外的に古典的形態を脱皮できない。しかし感受性検査を通じ治療支援機能を発揮してきたことは他の検体検査に無い特徴。結核の場合、新薬の登場がなければ遺伝子増幅法も従来の抗酸菌検査の欠陥を補うだけで治療に与えるインパクトは限定的だろう。コスト低減や自動化が極めて進みスクリーニングに使えるようになれば別だが。
- ・人、設備、部屋で併用困難。増幅法+のみ検体再提出はどうだろうか？
- ・微生物検査最大の課題である迅速化の為に導入すべきだが小規模細菌室では採算性低い。点数改定と結核病棟を有する病院検査室への助成を期待。
- ・検査指針に標準法提示要。新しい液体培地評価要。
- ・陽性検体少なくコストあわない。
- ・塗抹培養が基本。肺外結核の場合は例外。包装単位が大きすぎる。RNA 増幅の陽性数値解釈に問題あり。汚染心配。
- ・臨床医が保険点数有用性を患者に説明要。コスト低下期待。自動化期待。
- ・核酸増幅-培養+1例、その逆2例あり。
- ・極めて優れた方法だが、死菌、汚染、従来法との不一致例解釈などは現在以上に臨床側との密接なコンタクト要になる。
- ・増幅法導入検討したが1人専任要なので外注とした。病院検査室としては非定型分離同定も重要で2系統の検査維持は労力コスト大変で悩む。
- ・迅速性は素晴らしいが1件当たりコスト高く検査に長時間要する。
- ・臨床からの要望は強いが現状ではまだ無理。指針に載り、法的に位置付けられれば病院へ要請強く出来る。
- ・コスト高い、診断迅速化は入院期間の大幅な短縮医療費削減につながる、導入に良い環境、条件を作ってほしい。
- ・臨床側の要望少ない。リストラで増幅法は外注に頼るが外注ラボのデータにばらつきあり。
- ・3日連続でも請求できるのか？ 直接増幅で結果を出し培養菌でDNA同定した場合の請求は？ 臨床側は理解が不十分。
- ・呼吸器系学会はRNA、DNA増幅どちらなのでしょう。か。
- ・臨床側と十分に話し合いはしているので導入予定だが試薬コスト高く保存期間短いのが困る。環境改善も要。
- ・PCRは定量性がなくガフキー号数のほうが良い。発育速度2-3日という研究はないのか。
- ・検体数が少ないと試薬有効期限やコントロールばかり多くなり採算あわない、いろいろなDNAを扱うと汚染が心配。
- ・生化学的同定は時に不安で期待はしている。
- ・PCR陰性が培養陰性と一致するならばPCR法を培養するかどうかの指標になるのでは？
- ・8週という途方もない時間は短縮できるが信頼性まだ不明。
- ・全検体に核酸増幅は不要と考える。施設毎に適応症例ガイドライン設定が重要。
- ・水道水汚染時、コスト、痰以外の検体で問題有り。検査指針で標準法示して欲しい。
- ・陽性検体約100例検討したが全面的にPCRに頼るといふ訳には行かない。ちょうど検討中なので集計結果知りたい。
- ・臨床的には結核疑診例や抗菌剤でdamage受けた例に有効。
- ・予防法申請は増幅法でもOK？ 毎月の経時追跡は併用してもいいのか？
- ・負担大きい結核病棟持つ所では院内実施必要。
- ・培養無し感受性検査法期待。
- ・コスト、人員で採算とれない。偽陽性での入院がありうる。
- ・少数検体に対応して欲しい。
- ・院内塗抹+外注PCRで-再度外注で+の経験あり。安全キャビネット設置は義務づけられていないのか？
- ・まだ日常検査向きでない、手技簡素化、コスト低減期待。
- ・包装単位が大きすぎる。
- ・保険点数の取りかたが複雑、予防法との関連不明、細菌部門はピペット操作不慣れで検査室全体の体制で考えたい。
- ・感受性要、外注では結果2W位かかり核酸増幅メリットない。
- ・感受性のため培養要。死菌の問題。非定型菌用の耐性培地の市販期待。
- ・診断困難例に限定した方が良いと考える。
- ・10年1日の培養からは脱却したいが抗酸菌にかんしては情報不足、培地間の差等や感受性検査等の文献が見つからない。
- ・確立されたら大いに有用、塗抹-PCR+を臨床がどうあつかうか興味あり。
- ・不向きな検体もあり。死菌は臨床側の理解要。
- ・検査指針で新法も示して欲しい。
- ・メリット大きい。ますます広がるだろう。
- ・一部の医師はDNA検査を確定診断として扱っている。

- 診断基準に加えられれば有用。医療費削減効果を考えれば高くない。過大評価されているしやや混乱あり。適切な材料不可欠で採取かく痰の精度管理要。臨床側と consensus 不十分。
- 培地購入が保険点数にならない。従来法でも点数低すぎる。労力を要する細菌検査の存続が危機。
- 検体前処理が精度に影響、試薬が高価、材料別の前処理方法の確立要、操作法簡素化要。
- 新技法が万能かつ絶対との見方が一部に有り問題、コスト体系が reasonable でない、診断薬メーカー主導の印象強い、臨床側検査側の協力要。
- 偽陽性 3%、偽陰性 4% (100例中) あり (BAL, 胸水で) 増幅の感度が良いとは言えない。
- 1日で結果出るので期待するが従来法と不一致もあり危険。
- コスト軽減、前処理簡素化要。
- 一般抗菌剤の感受性検査を点数化希望 (非定型抗酸菌症治療などで)。
- コスト面でかなり検体数がないと利益ない。
- 新技法に対する信頼感定着していない。
- 点数が高く知識ある Dr. は患者負担を多くしてまで増幅法をしない。
- 健保取載で増えるだろう、多量処理困難でコストダウン困難、菌有無だけなので非定型では診断困難だが全体的には有効な情報。
- 結核病棟あり新患多いが増幅法は外注と決まった。組織、便、血液検体からの同定期待。
- 試薬コスト高く集団検診へ参入出来ない。
- 迅速に結果返したいが患者減少の中で高価設備導入ちゅうちょ。
- 迅速法として有用だがデータ蓄積無く結果の解析に慎重重要。
- 臨床細菌として生きた細菌そのものを扱っていないのは不安。
- 前処理に時間要で多数処理困難。汚染心配。検査材料の品質管理、良否が問題だが臨床側が徹底していない。偽陽性、偽陰性の明確な判断基準がない。
- 従来法のなじみ、点数、料金等から思ったほど新技法法依頼増えていない。試薬高価なので今後点数ダウン、しぼり等おきない事を期待。
- 検査センターとしては新技術主体でアピールしたいがコストで苦慮している。
- 情報不足。精度管理はどのようにするのか? 今思案中。
- 外注でも3日で結果出るので臨床ニーズにあっている。メーカーにより処理可能検体が異なるのはやや困る。
- 迅速のみならず病原因子の検出も可能で将来性あるが、汚染による偽陽性の問題、定量不可で治療効果判定出来ない。PCR の場合独占特許で試薬高価、臨床側の過信等種々の問題有るが微生物検査領域で核酸利用は普及努力要。
- 早期に確定診断できるのは臨床側で大変な意義があるが検査科がルーチンとして行うには人員要かつ簡便化が期待される。
- コスト低減、完全自動化期待。
- 遺伝子診断法に関しては何等かの指針必要なのは? 検査結果に対する判断基準も要。臨床からは結核を疑えないが+の報告をどのように解釈するのか? と問い合わせあり。
- 直接核酸増幅法の利点について医師によってかなり理解に開きあり。試薬はもちろん、必要器具、コントロールも含めるとコスト高い。培養+の時核酸同定を勤めているが医師からの依頼受けること少なく結核か否かの確定診断はどうしているのか?
- 感度が良すぎて臨床所見と一致しない事あり。指針の確立早急に望まれる。痰以外の検体からの簡便な核酸抽出法開発期待。

特別発言

各種臨床検体における MTD の成績および MTD による効果判定の可能性についての検討

国立療養所東埼玉病院 大角光彦・豊田丈夫
川城丈夫・青柳昭雄

はじめに

抗酸菌の迅速検査として各研究室レベルで PCR 法が試みられ^{1)~4)}、優秀な成績が報告される一方、精度管

理ができない状況が続いていた⁵⁾。1994年核酸増幅法を応用し、臨床検体より直接抗酸菌を検出する2つのキットが実用化された^{6)~8)}。

演者らは1992年より Gen-Probe Amplified Myco-

bacterium Tuberculosis Direct Test (MTD) の臨床的意義を評価する目的で研究を行ってきた。喀痰225, 胸水36, 髄液9および気管支洗浄液41検体について塗抹検査, 小川培地並びにMB-Checkによる培養検査とMTDを同時に行い, その成績を比較検討した。その中で培養結果とMTDの不一致例が少なからず認められた。かかる不一致例が偽陽性あるいは偽陰性に相当するか否かについて, 臨床的背景を検討した。また肺結核20症例について経過を追って喀痰の塗抹, 培養およびMTDを施行し, MTDが経過判定に使えるか否かについても検討を加えた。

結果/考察

まず喀痰についてであるが, 第69回本総会で報告した如く, 小川で結核菌が検出された54検体中50検体, またMB-Checkで結核菌が検出された65検体中60検体はMTDで陽性を示した。培養で結核菌陽性でMTD陰性例はすべて微量排菌の検体であった。小川, MB-Checkともに結核菌陰性の検体は156(105症例)あり, うちMTD陽性は21(15症例)認められたが, 全例以前に結核菌が証明されている症例であった。小川あるいはMB-Checkで結核菌が検出された検体に対し, MTDの感度は63/69=91%, 同じく特異性は135/156=87%であった。培養陰性・MTD陽性例について臨床的に検討を加えた結果で見ると, MTDの感度は93%, 特異性は99%と考えられた(表1)。

次に喀痰以外の臨床検体についての成績であるが, 今回胸水36, 髄液9および気管支洗浄液41検体で検討した。結核性胸膜炎における胸水からの菌の検出率は2.1~28.3%と報告されている⁹⁾¹⁰⁾。したがって診断の多くは, 胸水の性状, 細胞成分, ADA等の生化学的データ, 胸膜生検, 画像検査やツ反および抗結核薬に対する反応を含めた臨床経過等により行われている。胸水36検体(31症例)中, 最終的に結核性と診断され治療されたものは20検体(16症例)あり, うち培養陽性が4(4症例)に対しMTD陽性は7(5症例)と高率であった。

結核性髄膜炎においては髄液よりの菌検出率が低く, しかも診断と治療が緊急性を要する。髄液9検体(9症例)にMTD検査を行ったところ, MTDの結果は臨床診断および培養結果と完全に一致した。粟粒結核で髄膜炎を合併した2症例の髄液でMTDが陽性であったが, その後小川培地あるいはMB-Checkでの培養で結核菌が検出された。結核症であるが髄膜炎が存在しない3例はMTD陰性で, 対照群もMTD陰性であった。

気管支洗浄液41検体(39症例)については, 培養で結核菌陽性の1検体, 塗抹陽性培養陰性の1検体および培養で結核菌陰性の6検体がMTD陽性を示した。これ

らはすべて活動性肺結核として矛盾しなかった。

また, MTDの臨床的応用の一つとして, 治療開始後経過を追ってMTDを施行した場合, 塗抹あるいは培養結果の推移と比較し, 治療効果の判定材料と成りうるかを検討した。肺結核で入院中の20症例(うち初回治療例で入院時より調査したもの10例)について, 定期的に喀痰の塗抹, 培養およびMTD検査を行った。延べ総検体数は105検体であり, MTD陰性の61検体中小川で結核菌陽性は2検体(3.3%)のみで, MB-Checkを含めても培養陽性でMTD陰性は4検体(6.6%)であった(表2)。したがってMTD陰性の場合90%以上は培養陰性と判断が可能である。逆に塗抹培養とも陰性の63検体でMTD陽性は6検体(9.5%)あり, 治療開始時より計算して3カ月後1, 4カ月後2, 5カ月後2, 10カ月後1検体であった。これらのほとんどは入院時大量排菌の重症結核の症例がであった。

まとめ

1. 各種臨床検体について喀痰の場合と同様の方法でMTDを施行したところ, MTDの感度は小川培地より優れ, MB-Checkと比較しても遜色なかった。
2. 培養陰性でMTD陽性を示した検体が喀痰で21検体(15症例), 胸水で4検体(3症例), 気管支洗浄液で7検体(7症例)存在したが, 全例について臨床的検討を行った結果, 明らかな偽陽性は認められなかった。
3. 培養で結核菌陽性でMTD陰性例が喀痰で6検

表1 MTDの感度・特異性に関する検討 (喀痰225検体)

	小川培地 ^{#1}		MB-Check		小川培地 ^{#3} and/or MB-Check		培養+臨床診断 ^{#4}		
	+ ^{#2}	-	+ ^{#2}	-	+ ^{#2}	-	+	-	
M	50	34	60	24	63	21	83	1 ^{#5}	
T	4	137	5	136	6	135	6	135	
D	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 培養結果に関しては結核菌のみを(+)とし, NTMが検出された場合は(-)
 #3 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

表2 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 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(+)

体(6症例)、胸水で1検体(1症例)存在したが、いずれも微量排菌の検体であった。

4. 治療開始後経過を迫ってMTDを施行した場合、MTDにより菌の陰性化を早期に判定できると考えられた。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Vuorinen P, Miettinen A, Vuento R, et al.: Direct Detection of Mycobacterium 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.
- 9) 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.
- 10) 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.