

原 著

喀痰以外の臨床検体中の結核菌の MTD による検出

— 検体前処理法の基礎検討および臨床評価 —

豊田 丈夫・大角 光彦・青柳 昭雄

国立療養所東埼玉病院内科

阿部 千代治

結核予防会結核研究所

倉島 篤行・片山 透

国立療養所東京病院呼吸器科

藤野 忠彦

国立療養所南横浜病院

受付 平成 8 年 3 月 19 日

受理 平成 8 年 6 月 18 日

DETECTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN CLINICAL SPECIMENS
OTHER THAN SPUTUM BY THE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DIRECT
TEST (MTD)

— Assessment of Sample Preparation Methods and Clinical Evaluation —

Takeo TOYODA*, Mitsuhiko OSUMI, Teruo AOYAGI, Chiyoji ABE,
Atsuyuki KURASHIMA, Touru KATAYAMA, Tadahiko FUJINO

(Received 19 March 1996/Accepted 18 June 1996)

The Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (MTD) has been widely used as a rapid test for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples, and several research groups have verified its clinical usefulness. However, most of the specimens they tested were sputum, and there have been few reports on other specimens. In particular, there have been no reports on assessments of methods of preparing samples other than sputum for the MTD.

We assessed methods of preparing samples other than sputum and the influence of a local anesthetic and an anticoagulant that may be present in samples, and also evaluated

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

the MTD as a means of detecting *M. tuberculosis* in pleural fluid, bronchial lavage fluid, cerebrospinal fluid, urine and ascitic fluid.

1. Assessment of three sample preparation methods, i.e., the NALC-NaOH method, the GuSCN-Diatom nucleic acid extraction method, and the ultrasonication method, revealed that the combination of the NALC-NaOH method and the ultrasonication method, widely used to prepare sputum samples, is also a valid method of preparing other samples.

2. The local anesthetic and the anticoagulant used clinically and remained in specimens did not affect the results of the MTD.

3. Seven (36.8%) of 19 pleural fluid samples from patients diagnosed as tuberculous pleurisy were positive for *M. tuberculosis* by the MTD, while five (27.8%) of 18 pleural fluid samples cultured for bacteria were positive for *M. tuberculosis* complex. None of the 20 pleural fluid samples from patients diagnosed as non-tuberculous pleurisy were positive for *M. tuberculosis* complex either by MTD or culture.

4. Eight (32.0%) of 25 bronchial lavage samples from patients diagnosed as pulmonary tuberculosis were positive for *M. tuberculosis* complex by the MTD, while 3 (12.0%) were positive by culture. None of the 18 bronchial lavage samples from patients diagnosed as non-tuberculous disease were positive for *M. tuberculosis* complex either by the MTD or culture.

Based on these results, it is concluded that the MTD is a very useful method of detecting *M. tuberculosis* in clinical samples other than sputum because it is more sensitive than culture on Ogawa's egg medium in detecting *M. tuberculosis* complex in pleural fluid samples, bronchial lavage samples, and so on, with the same preparation method as used for sputum.

Key words : Pleural fluid, Bronchial lavage fluid, MTD, Sample pretreatment, Local anesthetic, Anticoagulant

キーワード : 胸水, 気管支洗浄液, MTD, 検体の前処理法, 局所麻酔, 抗凝固剤

はじめに

結核症の迅速診断法として, DNAプローブ「中外」-MTDが開発され, 実際に臨床検体中の結核菌の検出に使用されるに至っている。この検査法は, 核酸(結核菌リボソームRNA)増幅法と核酸ハイブリダイゼーション法を応用したものであり, 結核菌の同定を検体採取日に行うことを可能にした。すでにその有用性に関しては多数報告がなされている^{1)~5)}。しかしながら, その多くは喀痰を検体として用いたものであり, 喀痰以外の検体の報告は少なく⁶⁾⁷⁾, とくに, 喀痰以外の検体の前処理に関する検討報告はなされていない。喀痰以外の胸水, 気管支洗浄液等は喀痰と成分が異なり, 前処理法については個々に検討すべきである。

今回われわれは, 検体の前処理法の基礎検討およびその方法を用いた際の結果の臨床的有用性を評価し, 前処理法の妥当性を検討する目的で, 共同研究を実施したので成績を報告する。また, 検体採取の際に使用される局

所麻酔剤⁸⁾および同一検体を細胞診で使用する施設で検体採取後に添加される可能性のある抗凝固剤⁹⁾の測定結果への影響も検討したので, それも併せて報告する。

材料と方法

1. 検体前処理および核酸の抽出

1) 使用菌株の調製

実験には *Mycobacterium bovis* BCG 日本株 (BCG) 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14日目の全培養から McFarland No.0.5 の濁度の菌液を調製し, 超純水にて希釈系列を作製した。

2) 前処理法および抽出の基礎検討

実験には, 培養で結核菌陰性であるが, 肺結核を合併し, 抗結核剤で改善がみられたため結核性胸膜炎と診断された症例の胸水, および培養で結核菌陰性であるが肺結核に特徴的な画像所見があり, 抗結核剤で改善がみられたため肺結核と診断された症例の気管支洗浄液, それ

ぞれ1検体を用いた。いずれの検体もMTDキットで指示されている操作方法に従い測定し、陰性であった。検体0.5mlに希釈菌液を添加し、前処理終了後の最終菌濃度が $10^5 \sim 10^2$ CFU/mlとなるように作製した。また、対照としては菌液を添加していない超純水を用いた。

MTDキットで指示されているN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム法(NALC-NaOH法)¹⁰⁾、グアニジニウムチオシアネートとダイアトム(Sigma)を用いた核酸抽出法(GuSCN-Diatom法)¹¹⁾およびMTDキットの操作に含まれる超音波法のいずれか1法またはこれら3法の組み合わせで前処理法および抽出の基礎検討を行った。

①NALC-NaOH法は、調整液検体0.5mlに等量のNALC-NaOH溶液(2%NaOH, 1.45%クエン酸ナトリウム, 0.5%NALC)を加え、混和後室温で15-20分放置した。この処理液に0.067Mリン酸緩衝液(pH6.8)14mlを加え転倒混和し、4℃で3,000gにて20分間遠心した。上清を注意深く除去後、沈渣を超純水に懸濁した。

②GuSCN-Diatom法は、検体100 μ lにGuSCN試薬(500mM GuSCN, 50mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 0.1mM Triton-X 100)900 μ lおよびダイアトム懸濁液(diatomaceous earth 10g/H₂O 50ml, 32% HCl 500 μ l)20 μ lを添加し、直ちに5秒間攪拌後10分間室温で放置し、再度攪拌した後12,000gで15秒間遠心し上清を除去した。沈渣を洗浄液(GuSCN 120g/0.1M pH6.4 Tris-HCl 100ml)で2度洗浄し、ついで70%エタノールで2度、アセトンで1度洗浄した。アセトン上清を除去した後56℃で10分乾燥した。チューブに緩衝液(1mM EDTA/10mM pH8.0 Tris-HCl)100 μ lを添加し56℃に10分間保温し核酸を溶出した。

③超音波法は、MTDキットの操作法に従い行った。MTDキットに添付されている溶菌チューブに検体希釈液200 μ lを分注後、検体50 μ lを加えキャップをし、ボルテックスミキサーで3秒間攪拌、溶菌チューブを超音波洗浄器にて15分間処理した。

上記3法の組み合わせにより、前処理および核酸抽出法を検討した。NALC-NaOH法のみ行ったものをA、NALC-NaOH法とGuSCN-Diatom法を組み合わせたものをB、NALC-NaOH法と超音波法を組み合わせたものをC、GuSCN-Diatom法のみ行ったものをD、超音波法のみ行ったものをEとし、それぞれ処理済検体をMTDに供した。使用した4検体のうち1例を表1に示した。

2. 検体採取時に用いる試薬の影響の検討

1) 局所麻酔剤の影響

気管支洗浄液の採取の際に一般に広く用いられている、

2%塩酸リドカインを用いて行った。

2%塩酸リドカイン2mlで麻酔後に生理食塩水10mlを用いて気管支洗浄液を採取した場合を想定し、MTDキットに添付の増幅陽性コントロール液(AP)を用いて検討した。2%塩酸リドカイン2mlに生理食塩水10mlを添加し攪拌の後、その1mlを上記NALC-NaOH法で処理した。その処理液を用いAPの10倍希釈系列を作り、MTDキットで3回測定した。対照としてMTDキットに添付の検体希釈液によるAPの10倍希釈系列を用いた。

2) 抗凝固剤の影響

抗凝固剤として用いられているヘパリン-ナトリウム(ヘパリン-Na, Sigma)およびエチレンジアミン四酢酸-二ナトリウム(EDTA-2Na, 和光純薬)を用いて検討した。一般に使用されているヘパリン-Na(90IU)あるいはEDTA-2Na(10.5mg)の入った容器に胸水1mlを採取した場合を想定し、APを用いて検討した。リン酸緩衝液および検体希釈液で、上記NALC-NaOH法を行う場合と同様な濃度にヘパリン-NaあるいはEDTA-2Na溶液を調製し、この液を用いAPの10倍希釈系列を作り、MTDキットでそれぞれ3回測定した。対照としてヘパリン-NaおよびEDTA-2Naを含まない液を調製し、この液によるAPの10倍希釈系列を用いた。

また、ヘパリンおよびEDTA塩が含まれるアンチクロット/ET(アスカ純薬)の影響も検討した。

検体1mlにアンチクロット/ET1滴を添加した場合を想定し、APを用いて検討した。

精製水1mlにアンチクロット/ET1滴を添加し上記NALC-NaOH法で処理、その処理液でAPの10倍希釈系列を作り、上と同様にMTDキットで3回測定した。対照としてAPの検体希釈液による10倍希釈系列を用いた。

3. 臨床検体

臨床検体は、1994年7月から95年4月の間に国立療養所東埼玉病院、国立療養所東京病院および国立療養所南横浜病院で採取された、入院ならびに外来患者の気管支洗浄液44検体、胸水39検体、髄液3検体、尿2検体および腹水1検体を用いた。

気管支洗浄液を採取する場合は、区域枝ないし亜区域枝にスコープ先端をウェッジし、生理食塩水20mlを注入した後回収した。スコープ先端をウェッジする前に、必要に応じて2%塩酸リドカイン(2%キシロカイン：藤沢)1~3mlを表面麻酔剤として当該気管支分岐部に使用しているが、すみやかに吸引、回収し、粘膜からの吸収、気管支洗浄液への混入は最小限になるようにし

表1 検体前処理および核酸抽出の違いによる MTD の感度への影響

菌量	MTD 測定値 (RLU)				
	A	B	C	D	E
10 ⁵ CFU/ml	511,138	1,298,542	1,154,100	1,234,265	37,623
10 ⁴ CFU/ml	19,235	305,979	168,814	463,780	6,862
10 ³ CFU/ml	5,284	30,191	34,724	32,147	1,002
10 ² CFU/ml	916	3,862	960	1,102	952

A: NALC-NaOH 法 B: NALC-NaOH 法, GuSCN-Diatom 核酸抽出法
 C: NALC-NaOH 法, 超音波法 D: GuSCN-Diatom 核酸抽出法
 E: 超音波法

た。胸水、尿、腹水は10~20mlを採取、遠心分離した後 MTD に供した。気管支洗浄液は5~10ml、髄液は2~3mlを遠心分離した後 MTD に供した。また、胸水検体材料の一部にはヘパリンおよび EDTA 塩が含まれる抗凝固剤（アンチクロット/ET: アスカ純薬）を用いた。

4. 臨床材料の細菌学的検査

1) 塗抹検査

検体を3,000gにて15分遠心し上清を除去し、その沈渣をチール・ネールゼン法と蛍光染色法に供した。

2) 培養検査

塗抹検査に供した残りの材料は小川法で培養した。また、菌種の鑑別同定はアキュプローブ結核菌群（中外）、アキュプローブ・マイコバクテリウム・アビウム・コンプレックス（中外）または DDH マイコバクテリア‘極東’（極東）を用いて行った。

3) MTD

MTD キットの操作法に従い測定した。なお、前処理済検体が測定値に影響を与えるかどうかを確認する目的で、10⁴ CFU の BCG 菌を含む検体を調製し、これもあわせて測定した。

結 果

1. 検体前処理および核酸の抽出法の検討

10倍階段希釈菌液を用い菌濃度が10⁵ ~ 10² CFU/ml

表2 2%塩酸リドカインの MTD 測定結果への影響

AP* 希釈倍率	MTD 測定値 (RLU)	
	塩酸リドカイン	コントロール
×10	2,190,936	2,474,359
×100	2,250,204	2,518,644
×1,000	2,267,207	1,890,467
×10,000	775,489	145,132
×100,000	82,609	14,064

* AP: 増幅陽性コントロール

となるように材料を作製し、検体の前処理および核酸抽出法の検討材料とした。

表1に示すように、NALC-NaOH 法と GuSCN-Diatom 法と組み合わせた B、NALC-NaOH 法と超音波法を組み合わせた C および GuSCN-Diatom 法のみ行った D では菌量10³ CFU/ml まで測定値が MTD のカットオフ値である30,000 RLU (Relative Light Unit) 以上と陽性となり、検出感度に差がみられなかったが、NALC-NaOH 法のみ行った A および超音波法のみ行った E では、菌量10⁴ CFU/ml で測定値がそれぞれ19,235RLU、6,862RLU とすでに陰性となり、検出感度が明らかに低かった。なお、菌液を添加していない対照は、いずれの方法でも陰性であった。

操作の実用性を考慮し、以後の臨床検体を用いた検討では MTD キットの添付文書で示された方法と同様の、NALC-NaOH 法と超音波法を組み合わせた方法を探

表3 ヘパリン/EDTA の MTD 測定結果への影響 1

AP* 希釈倍率	MTD 測定値 (RLU)		
	ヘパリン-Na	EDTA-2 Na	コントロール
×10	2,737,077	2,675,581	2,810,619
×100	2,911,620	2,737,246	2,909,433
×1,000	2,215,333	2,608,714	2,812,248
×10,000	247,278	73,498	706,423
×100,000	1,047	13,624	11,476

* AP: 増幅陽性コントロール

表4 ヘパリン/EDTAのMTD測定結果への影響2

AP* 希釈倍率	MTD測定値 (RLU)	
	アンチクロット/ET	コントロール
×10	2,432,531	2,474,359
×100	2,269,502	2,518,644
×1,000	2,329,808	1,890,467
×10,000	759,369	145,132
×100,000	3,504	14,064

* AP: 増幅陽性コントロール

用することとした。

局所麻酔剤である塩酸リドカインで調製したAPのMTD測定結果への影響を表2に示した。コントロールはAPの100,000倍希釈で14,064RLUであり、また塩酸リドカインを加えたAPは100,000倍希釈で82,609RLUであった。なお、本検討ではMTDをそれぞれ3回測定したが、コントロールのAP、リドカイン添加APとも10,000倍希釈で1回陰性、100,000倍希釈で2回陰性となった。通常臨床に用いる塩酸リドカインの使用量ではMTD測定に影響を与えないことがわかった。

抗凝固剤であるヘパリン-NaあるいはEDTA-2Naで調製したAPのMTD測定結果への影響を表3に示した。コントロールは10,000倍希釈で706,423RLUと陽性、100,000倍希釈で11,476RLUと陰性、ヘパリン-Naは10,000倍希釈で247,278RLUと陽性、100,000倍希釈で1,047RLUと陰性、EDTA-2Naは10,000倍希釈で73,498RLUと陽性、100,000倍希釈で13,624RLUと陰性といずれの場合も同様な感度であった。通常用いられるヘパリン-NaおよびEDTA-2Naの使用量ではMTDの測定値に影響を与えないことが確認された。

抗凝固剤であるアンチクロット/ETで調製したAPのMTD測定結果への影響を表4に示した。コントロールでは10,000倍希釈で145,132RLUと陽性、100,000倍希釈で14,064RLUと陰性、またアンチクロット/ETでも10,000倍希釈で759,369RLUと陽性、100,000倍希釈で3,504RLUと陰性となり、どちらも同様な感度であった。通常用いられるアンチクロット/ETの使用量ではMTD測定に影響を与えないことが確認された。

2. 喀痰以外の臨床検体の検討

喀痰以外の89検体について、従来の塗抹検査、小川培地を用いた培養検査の結果およびMTDの結果を表5に示した。

1) 前処理済検体の測定結果への影響

前処理済検体に 10^4 CFUのBCG菌が含まれるように調製した検体の測定値はすべてMTDのカットオフ値である30,000RLUを超える値であった。しかしなが

ら、その測定値は47,890~1,399,008RLUと幅が広く、検体の種類が同じでもMTDの結果に与える影響がさまざまであることが確認された。なお、本検討に使用したリーダーIでは、通常測定値約1,300,000RLUが最大であった。

2) 喀痰以外の検体の従来法およびMTDの結果の臨床的評価

①胸水

胸水39検体についてまとめた結果を表6に示した。39検体中19検体の症例が結核性胸膜炎と診断され、20検体の症例が非結核性疾患と診断された。なお、胸水の培養で結核菌陽性または同時に肺結核を伴うか胸水ADA高値のいずれかの所見があり、心不全や悪性腫瘍などの他疾患が除外でき、抗結核剤で改善がみられた場合に結核性胸膜炎と診断した。結核性胸膜炎19検体中MTD陽性は7検体(36.8%)、結核性胸膜炎19検体のうち培養が施行してあった18検体中培養陽性は5検体(27.8%)であった。非結核性疾患症例の20検体はすべてMTD、培養共に陰性であった。

②気管支洗浄液

気管支洗浄液43検体についてまとめた結果を表7に示した。43検体中25検体の症例が肺結核と診断され、18検体は非結核性疾患と診断された。なお、喀痰あるいは気管支洗浄液の培養で結核菌陽性または画像で肺結核に特徴的な所見があり、抗結核剤で改善がみられた場合に肺結核と診断した。肺結核25検体中MTD陽性は8検体(32.0%)であった。肺結核25検体すべてに培養が行われ、培養陽性は3検体(12.0%)であった。非結核性疾患の18検体はすべてMTD、培養共に陰性であった。

③髄液

髄液は3検体あったが、いずれも髄液所見に異常がみられず、髄膜炎の存在は否定された症例であった。この3検体は、MTD、培養共にすべて陰性であった。

④尿

尿は尿路結核1症例の2検体があり、そのうち1検体はMTD、培養共に陽性であり、残り1検体は治療後のものでMTD陰性、培養は未施行であった。

⑤腹水

腹水は2検体あり、1検体は、他の時期に採取した腹水の培養により結核性腹膜炎と診断された症例、残り1検体は癌性腹膜炎の症例のもので、いずれもMTD、培養共に陰性であった。

考 案

リボソームRNAを増幅するMTDによる結核症の迅速診断については、喀痰では既に多数の臨床例で行われており高い評価が得られている。喀痰以外の検体に

いても、理論的には非常に有用と考えられるが、実際の臨床例について十分な検討が必要である。前処理については、検体の種類によって性状がかなり異なるため、できるだけ鋭敏に結核菌のリボソーム RNA を検出でき、

かつ、操作が煩雑にならない方法を見いださねばならない。また、気管支洗浄液、胸水、腹水などの検体では、その採取の際あるいは検体保存の際などに混入する可能性のある麻酔液や抗凝固剤などの影響も検討する必要がある

表5-1 喀痰以外の臨床検体の従来法と MTD との比較

検体 No	検体	塗抹染色 ¹⁾	小川培地	鑑別菌種	MTD (RLU)	判定	MTD/BCG 菌添加 ²⁾ (RLU)
1*	胸水	—	+	<i>M. tuberculosis</i> complex	1,309	—	1,203,295
2*	胸水	N.D. ³⁾	+	<i>M. tuberculosis</i> complex	167,062	+	741,931
3*	胸水	4	+	<i>M. tuberculosis</i> complex	88,940	+	476,477
4	胸水	N.D.	N.D.		2,309	—	1,352,027
5	胸水	N.D.	N.D.		1,182	—	805,390
6*	胸水	—	—		797	—	681,270
7	胸水	N.D.	N.D.		3,982	—	1,102,095
8	胸水	—	—		954	—	786,832
9	胸水	—	—		1,426	—	473,163
10	胸水	N.D.	N.D.		2,962	—	471,219
11*	胸水	—	—		968	—	532,290
12*	胸水	N.D.	N.D.		1,410	—	532,573
13	胸水	—	—		1,331	—	874,736
14	胸水	N.D.	N.D.		1,540	—	893,976
15*	胸水	—	—		756	—	715,045
16*	胸水	—	—		854	—	839,849
17	胸水	—	—		950	—	686,138
18*	胸水	—	—		911	—	892,543
19	胸水	—	—		1,196	—	572,760
20	胸水	—	—		916	—	702,231
21*	胸水	—	—		941	—	864,716
22*	胸水	—	—		867	—	746,434
23	胸水	—	—		870	—	552,487
24	胸水	—	—		793	—	47,890
25	胸水	—	—		1,110	—	747,751
26*	胸水	—	—		129,859	+	308,362
27*	胸水	—	—		912	—	477,298
28	胸水	—	—		954	—	680,699
29	胸水	—	—		906	—	876,503
30*	胸水	—	—		847	—	74,745
31	胸水	—	—		1,239	—	822,153
32	胸水	—	—		783	—	372,157
33	胸水	—	—		971	—	690,355
34*	胸水	1	—		215,158	+	653,221
35*	胸水	—	—		1,235	—	1,360,894
36	胸水	—	—		2,186	—	195,824
37*	胸水(膿)	—	+	<i>M. tuberculosis</i> complex	31,040	+	154,391
38*	胸水(膿)	—	—		182,998	+	216,800
39*	胸水(膿)	4	+	<i>M. tuberculosis</i> complex	726,587	+	832,320
40	髄液	—	—		934	—	590,234
41	髄液	—	—		1,463	—	357,604
42	髄液	—	—		1,107	—	96,139

* 結核性と診断された検体

1) 数値はガフキーに相当する号数を示す

2) 検体に *M. bovis* BCG 菌を添加

3) N.D.: 未実施

表5-2 喀痰以外の臨床検体の従来法とMTDとの比較

検体 No.	検体	塗抹染色 ¹⁾	小川培地	鑑別菌種	MTD (RLU)	判定	MTD/BCG 菌添加 ²⁾ (RLU)
43*	洗浄液	—	—		880	—	698,445
44*	洗浄液	—	—		428,711	+	905,333
45*	洗浄液	—	—		1,045	—	687,901
46	洗浄液	—	—		989	—	743,043
47	洗浄液	—	—		1,003	—	740,519
48*	洗浄液	—	+	<i>M. tuberculosis</i> complex	88,478	+	509,938
49	洗浄液	—	—		886	—	711,169
50*	洗浄液	—	—		1,086	—	748,932
51*	洗浄液	—	—		120,117	+	666,349
52*	洗浄液	—	—		1,527	—	738,708
53	洗浄液	—	—		1,128	—	582,793
54	洗浄液	—	—		1,720	—	638,863
55*	洗浄液	2	—		1,017,184	+	921,380
56	洗浄液	—	—		934	—	694,406
57	洗浄液	—	—		868	—	617,345
58*	洗浄液	—	—		600,302	+	704,142
59	洗浄液	—	—		894	—	684,345
60	洗浄液	—	—		970	—	715,755
61*	洗浄液	—	—		1,306	—	914,236
62	洗浄液	—	—		981	—	732,589
63*	洗浄液	—	—		862	—	772,019
64	洗浄液	—	—		956	—	656,990
65*	洗浄液	—	—		1,132	—	767,090
66*	洗浄液	—	—		1,539	—	857,558
67	洗浄液	—	—		841	—	903,287
68*	洗浄液	—	—		1,097	—	739,449
69*	洗浄液	—	—		1,106	—	864,416
70*	洗浄液	—	—		1,083	—	865,966
71*	洗浄液	—	—		1,014	—	756,297
72*	洗浄液	—	—		1,182	—	1,131,958
73*	洗浄液	—	—		1,255	—	1,388,430
74*	洗浄液	—	—		1,215	—	1,239,215
75	洗浄液	—	+	<i>M. kansasii</i>	1,332	—	1,342,489
76	洗浄液	—	+	<i>M. kansasii</i>	1,535	—	369,723
77*	洗浄液	—	—		269,737	+	1,091,001
78	洗浄液	—	—		1,389	—	1,198,939
79*	洗浄液	—	—		1,523	—	1,003,417
80*	洗浄液	—	—		1,502	—	1,107,178
81	洗浄液	—	—		812	—	1,101,985
82	洗浄液	—	—		840	—	897,471
83*	洗浄液	7	+	<i>M. tuberculosis</i> complex	1,093,623	+	1,354,156
84	洗浄液	—	—		1,037	—	900,701
85*	洗浄液	5	+	<i>M. tuberculosis</i> complex	1,400,760	+	1,375,853
86*	尿	1	+	<i>M. tuberculosis</i> complex	1,111,000	+	896,217
87*	尿	N.D. ³⁾	N.D.		1,010	—	550,245
88	腹水	N.D.	N.D.		1,767	—	1,399,008
89*	腹水	—	—		1,191	—	730,754

* 結核性と診断された検体

1) 数値はガフキーに相当する号数を示す

2) 検体に *M. bovis* BCG 菌を添加

3) N.D.: 未実施

表6 胸水のMTDおよび培養成績

		結核 19		非結核 20	
MTD(+) 7/19		MTD(-) 12/19		MTD(-) 20/20	
培養(+) 4/19	培養(-) 3/19	培養(+) 1/19	培養(-) 10/19	N.D.* 1/19	培養(-) 20/20

*N.D.:培養未実施

表7 気管支洗浄液のMTDおよび培養成績

		結核 25		非結核 18	
MTD(+) 8/25		MTD(-) 17/25		MTD(-) 18/18	
培養(+) 3/25	培養(-) 5/25	培養(+) 0/25	培養(-) 17/25	培養(-) 18/18	

ある。

今回われわれが行った検体前処理法の検討では、NALC-NaOH法とGuSCN-Diatom法を組み合わせた方法、NALC-NaOH法と超音波法を組み合わせた方法、GuSCN-Diatom法のみ行う方法の3方法が検出感度でほとんど差がなく、NALC-NaOH法のみ行った方法および超音波法のみ行った方法では、感度が明らかに低くなった。実際の臨床検査の場では検体によって前処理を変えることは操作が煩雑になるため、検体の種類によらず、喀痰で行われているNALC-NaOH法と超音波法を組み合わせた方法で、前処理および溶出を行うことが妥当であると考えられた。

2%塩酸リドカイン2mlに生理食塩水10mlを添加した検体では測定結果に悪影響を及ぼさないことが示されたが、気管支洗浄液採取の際は、通常麻酔剤として2%塩酸リドカインを1~4ml局所に投与後に生理食塩水20ml以上を注入して回収する。したがって、検体に混入する塩酸リドカインの濃度はせいぜい生理食塩水10mlに対して2%塩酸リドカイン2mlであり、通常の気管支洗浄液採取法でMTDの測定結果には影響がほとんどないと考えられる。

同一検体を細胞診で使用する施設では、検体を抗凝固剤の添加してある容器に、採取あるいは採取後に抗凝固剤を添加した後、MTD用に分注することがある。ヘパリンに関しては、PCR法において核酸増幅を阻害するとの報告があるが¹²⁾、今回抗凝固剤を加えた材料をNALC-NaOH処理した結果、ヘパリンとEDTAはMTDの測定結果に影響しないことが示された。

結核性胸膜炎と診断された症例より得られた胸水19検体について、MTD陽性は7検体(36.8%)、19検体の

うち培養が行われた18検体中培養陽性は5検体(27.8%)であり、MTDは培養よりも検出率が優れていた。非結核性疾患の胸水20検体はすべてMTD、培養共に陰性であり、偽陽性はみられなかった。肺結核と診断された症例より得られた気管支洗浄液25検体について、MTD陽性は8検体(32.0%)、培養陽性は3検体(12.0%)であり、MTDは培養よりも検出率が優れていた。非結核性疾患の気管支洗浄液18検体はすべてMTD、培養ともに陰性であり、偽陽性はみられなかった。

髄液、尿、腹水については、検討した臨床検体数が少なく、その評価は今後の課題である。髄液については、結核性髄膜炎の重篤性、早期治療の必要性から、特に核酸増幅法による迅速診断が期待される。豊田ら⁶⁾は、MTDにより迅速診断された2症例を経験し、その有用性を報告しているが、今後の症例の積み重ねが必要である。

結 論

MTDについて喀痰以外の検体の前処理法および検体に混入する可能性のある局所麻酔剤、抗凝固剤のMTDに対する影響の基礎検討を行うとともに、実際に臨床的に得られた胸水、気管支洗浄液、髄液、尿、腹水の臨床的検討を行った。

1. 前処理法として喀痰と同じNALC-NaOH法と超音波法を組み合わせた方法が妥当であった。
2. 通常使用される量の局所麻酔剤、抗凝固剤はMTDの測定結果に影響しなかった。
3. 胸水、気管支洗浄液の臨床的検討では、MTDは小川培地を用いた培養よりも検出率が優れていた。

以上、MTDは検体の種類によらず喀痰と同じ前処理で胸水、気管支洗浄液などから優れた感度で結核菌を検出することができ、臨床的に有用であると考えられる。

文 献

- 1) Abe C, Hirano K, Wada M, et al. : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified Direct Test. J. Clin. Microbiol. 1993 ; 31 : 3270-3274.
- 2) 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.
- 3) Nancimae M, Sandra GH and Timothy JC : 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.
- 4) Gaby EP, Pascale K, Ruth W, et al. : Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. J Clin Microbiol. 1994 ; 32 : 918-923.
- 5) Thomas B, Andrea G, Kurt W, 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.
- 6) 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.
- 7) Osumi M, Toyoda T, Kawashiro T, et al. : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens other than sputum by a specific DNA probe with amplification of the ribosomal RNA. 感染症誌. 1995 ; 69 : 1376-1382.
- 8) 中岡康, 大畑正昭, 飯田守, 他 : 気管支鏡検査における麻酔法の検討—診断的気管支鏡における麻酔についてのアンケート調査について. 気管支学. 1990 ; 12 : 254-261.
- 9) 金井泉, 金井正光 : 臨床検査法提要, 改訂第29版, 金原出版株式会社, 東京, 1983, 216.
- 10) Kubica GPW, E Dye, ML Cohn, 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.
- 11) Boom R, CJA Sol, MMM Salimans, et al. : Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 495-503.
- 12) Kolk AHJ, Noordhoek GT, De Leeuw O, et al. : *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. J Clin Microbiol. 1994 ; 32 : 1354-1356.