

原 著

アンプリコア® マイコバクテリウムキットの評価に関する共同研究

阿 部 千代治

結核予防会結核研究所

斎 藤 由美子・本 山 禎 二

株式会社エスアールエル

宇田川 宏 和・小 林 郁 夫

株式会社大塚東京アッセイ研究所

矢 島 秀 章・土 屋 香 織

株式会社ビー・エム・エル

松 嶋 広・鵜 木 恵 美

株式会社保健科学研究所

芦 原 義 久・塚 原 美由紀

株式会社三菱化学ビーシーエル

岡 澤 和 恵 塩野義製薬株式会社シオノギバイオメディカル東京ラボラトリー

下 田 勇 治・速 永 淳 住友金属バイオサイエンス株式会社

林 邦 彦・花 澤 誠

日本ロシュ株式会社

受付 平成8年12月13日

受理 平成9年1月30日

RELIABILITY OF AMPLICOR MYCOBACTERIA TEST FOR DETECTION OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX, *M. AVIUM* AND *M. INTRACEL-
LULARE*: A COOPERATIVE STUDY AMONG 9 LABORATORIESChiyoji ABE*, Yumiko SAITO, Teiji MOTOYAMA, Hirokazu UTAGAWA,
Ikuko KOBAYASHI, Hideaki YAJIMA, Kaori TSUCHIYA, Hiroshi MATSUSHIMA,Emi UNOKI, Yoshihisa ASHIHARA, Miyuki TSUKAHARA, Kazue OKAZAWA,
Yuji SHIMODA, Jun SOKUNAGA, Kunihiro HAYASHI,
AND Makoto HANAZAWA

(Received 13 December 1996/Accepted 30 January 1997)

The Amplicor Mycobacteria, a PCR-based assay, is a rapid test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in clinical samples. To estimate the reliability and reproducibility of the method, a cooperative blind study was conducted among 9 laboratories. Materials used for testing consisted

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

of 105 sputum and 30 water samples containing known numbers of *M. bovis* BCG, *M. avium*, *M. intracellulare*, and samples without bacteria. Only 2 out of the 9 laboratories correctly identified the presence or absence of mycobacterial DNA in all 135 samples. In sputum samples, 6 out of the 9 laboratories detected mycobacterial DNA in all positive samples, and 4 out of the 9 laboratories correctly reported the absence of DNA in the negative samples, indicating the need for good laboratory practice and development of reference reagents to monitor the performance of the whole study, including pretreatment of clinical samples. The main problem was lack of specificity rather than lack of sensitivity. From about half of the laboratories, false-positive results were reported, however, the ratio was below 6%; 1% (1/105 sputum samples) in 3 laboratories, 1.9% (2/105) in 2 laboratories, and 5.7% (6/105) in one laboratory, respectively. These results indicate that the Amplicor Mycobacteria is quite useful for a rapid diagnosis of tuberculosis.

Key words : Amplicor, Polymerase chain reaction, Detection of *M. tuberculosis*, Co-operative blind study

キーワード : アンプリコア, polymerase chain reaction, 結核菌の検出, 盲検共同研究

はじめに

結核菌を含む抗酸菌の検査は、従来、塗抹染色法と培養法を用いて行われてきた。近年液体培地を基礎とした培養法が開発され臨床検査に導入されるようになり、患者材料からの結核菌の分離率をあげることができるようになり、さらに検出までの時間も短縮可能となった¹⁾²⁾。しかしそれでも検出までには2週間以上を要する。ここ数年の間で遺伝子を用いた診断に関する研究が目覚ましく進歩した。抗酸菌の検出においても核酸を用いた方法が開発され^{3)~10)}、日常検査に使われてきている。これらの検査法を用いることにより、検出までの時間が短縮可能になり、早期診断早期治療に貢献できるようになった^{7)~10)}。しかし一方では偽陽性や偽陰性の結果も報告されており、日常検査への導入について多くの研究者により議論されてきている^{11)~13)}。

今回発売後1年以上たち、多くの施設で日常検査に取り入れている日本ロシュ社のアンプリコア[®]マイコバクテリウムキットの有用性を検討する目的で共同研究を実施した。

材料と方法

1. 共同研究参加施設

アンプリコア[®]キットをすでに検査に導入している検査センター7社、株式会社エスアールエル、株式会社大塚東京アッセイ研究所、株式会社ビー・エム・エル、株式会社保健科学研究所、株式会社三菱化学ビーシーエル、塩野義製薬株式会社シオノギバイオメディカル東京ラボラトリー、住友金属バイオサイエンス株式会社と日本ロシュ株式会社鎌倉研究所および結核予防会結核研究所の

計9施設が共同研究に参加した。

2. 喀痰

非感染性呼吸器疾患患者から得られた誘導喀痰を用いた。喀痰は採取後ただちに塗抹染色、培養、核酸増幅法により結核菌の存在をチェックし、残りは-30℃に保存した。使用時にすべての検査で陰性の喀痰をプールし、マグネチックスターラーで均一化の後連続分注器を用いて200 μ lずつそれぞれの施設指定のスクリーキャップ付きチューブに分注した。血液成分は polymerase chain reaction (PCR) による核酸の増幅を阻害することが知られていることから、肉眼的に血液の混入が観察された喀痰は除外した。喀痰の分注操作は同一条件下に安全キャビネットの中で行った。

3. 使用水

フィルター濾過超純水（オルガノ、ピュアリック R 型）を実験に用いた。超純水は採取後高圧蒸気滅菌を行い使用時まで保存した。

4. 使用菌とサンプルの調製

安全性の点から共同研究には毒力の強い結核菌の使用を避け、*Mycobacterium bovis* BCG 日本株を用いた。また Gen-Probe 社のアキュプローブ DNA 鑑別キットにより同定された臨床分離株 *M. avium* と *M. intracellulare* を評価に用いた。それぞれの菌はミドルブルック 7H9 液体培地で培養された。全培養菌から McFarland No. 0.5 濁度の菌液とその 1:100 希釈液を調製した。連続分注器を用いた12種のサンプルを調製した。それらは、①超純水のみ（1施設当たり10サンプル）、②超純水+10²個のBCG（10サンプル）、③超純水+10⁴個のBCG（10サンプル）、④喀痰のみ（15サンプル）、⑤喀痰+10²個のBCG（15サンプル）、⑥喀痰

+10⁴ 個の BCG (15 サンプル), ⑦ 喀痰+10² 個の *M. avium* (10 サンプル), ⑧ 喀痰+10⁴ 個の *M. avium* (10 サンプル), ⑨ 喀痰+10² 個の *M. intracellulare* (10 サンプル), ⑩ 喀痰+10⁴ 個の *M. intracellulare* (10 サンプル), ⑪ 喀痰+10² 個の BCG+10² 個の *M. avium*+10² 個の *M. intracellulare* (10 サンプル), ⑫ 喀痰+10⁴ 個の BCG+10⁴ 個の *M. avium*+10⁴ 個の *M. intracellulare* (10 サンプル) であった。

材料は調製後ただちに 4℃ に保存され, 1 施設当たり 135 サンプル輸送された。

5. サンプルの前処理

喀痰サンプルの前処理は米国の CDC⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ が喀痰材料の前処理に推奨している N-アセチル-L-システイン・NaOH 法 (NALC-NaOH) で行った。この前処理法は, アンプリコア®キットでも指示されている方法である。

喀痰サンプル (200μl) に 2 倍量の NALC-NaOH を加え 10 秒間チューブミキサーで混和し, 室温に 15~20 分間放置した。10ml の滅菌リン酸緩衝液を加え, 転倒混和後 3,000g で 20 分遠心した。用いた遠心力は施設により異なった。上清を注意深く捨て, 沈渣を 200μl のリン酸緩衝液に懸濁した。超純水材料については NALC-NaOH による前処理を省いた。

6. 検体の調製

検体洗浄液の 500μl に前処理済材料または超純水サンプルの 100μl を加え, 混和後 13,000g で 10 分間遠心洗浄した。沈渣に 100μl の溶菌試薬を加え, 分散後 60℃ で 45 分間保温した。100μl の中和試薬を加え, 増幅のための検体とした。

7. アンプリコアによる増幅と増幅産物の検出

キットのマニュアルに従い, 増幅および検出の操作を行った。

結 果

1. 超純水サンプル

増幅および増幅産物の検出の工程の精度を調べるために, BCG を含む超純水サンプルを調製した。試験のために, 超純水のみ 10 サンプルと, BCG を 100 個および 10,000 個含むもの, それぞれ 10 個の計 30 サンプルを用いた。この試験には NALC-NaOH による前処理を要求しなかった。Table 1 に示したように, BCG を含まないサンプルでいずれの施設からも偽陽性の結果は報告されなかった。100 個の BCG を含むサンプルで, 施設 2, 3, 4, 6 は陰性の結果を報告した。特に施設 3 と 4 の陽性率は 50% 以下であった。また施設 3 は, 10,000 個の BCG を含むサンプルでも低い陽性率 (40%) であった。この施設では, 超純水サンプルをリン酸緩衝液で希釈後

に遠心操作を行っていた。しかし施設 3 以外の 8 施設は前処理を省き, 溶菌工程よりキットに指示された方法で増幅操作を行った。施設 2, 4, 6 でみられた偽陰性について, その理由は不明である。残りの 5 施設では, 感度と特異性の両者とも 100% であった。

2. 喀痰サンプル

すべての喀痰サンプルは NALC-NaOH による前処理, 溶菌試薬による検体の調製後に増幅工程にまわされた。喀痰のみ 15 サンプル, 100 個の抗酸菌を含むサンプル 45 と 10,000 個の抗酸菌を含むサンプル 45 の計 105 サンプルを試験に用いた。9 施設から得られた成績を Table 2 と Table 3 に示した。100 個の BCG, *M. avium* または *M. intracellulare* を含むサンプルを試験した時, 4~8% のサンプルに施設 2, 4, 8 から陰性の結果が報告された。施設 8 では 10,000 個の BCG を含むサンプルについても陰性 (2.2%) の報告がみられた。しかし, その他の 5 施設 (施設 1, 3, 5, 6, 7) の検出感度は 100% であった (Table 2)。

各施設から報告された偽陽性例を Table 3 に示した。施設 9 では喀痰のみの 15 サンプル中 1 サンプルに結核菌群 (TB) 陽性の報告をした。施設 1 は 100 個の *M. intracellulare* を含む BCG を含まないサンプルで *M. intracellulare* と TB 陽性, 施設 2 では BCG を含む 1 サンプルを *M. avium* 陽性, *M. avium* を含む 1 サンプルを TB 陽性, 施設 4 は BCG のみを含む *M. avium* を含まないサンプルで TB と *M. avium* 陽性の報告をした。また施設 8 は BCG のみを含む 3 サンプルを TB と *M. intracellulare* 陽性として, さらに *M. avium* のみを含む 3 サンプルを *M. avium* と *M. intracellulare* 陽性として報告した。偽陽性は 3 種の増幅のいずれからみられ, 偏っていなかった。これに対し, 約半数の施設 (施設 3, 5, 6, 7) からは偽陽性の結果は報告されなかった。

Table 1 Numbers of AMPLICOR
Mycobacteria Positive Results

Laboratory	BCG in water (No. sample)		
	0 (10)	10 ² (10)	10 ⁴ (10)
1	0	10	10
2	0	8	10
3	0	0	4
4	0	5	10
5	0	10	10
6	0	8	10
7	0	10	10
8	0	10	10
9	0	10	10

Table 2 Numbers of AMPLICOR Mycobacteria-False Negative Results for Samples Distributed to 9 Different Laboratories

Laboratory	Bacteria in sputum (No. sample)		False negative
	10 ² (45)	10 ⁴ (45)	
1	0	0	
2	2	0	TB, AV
3	0	0	
4	2	0	TB, AV
5	0	0	
6	0	0	
7	0	0	
8	3	1	3IN, TB
9	0	0	

TB: *M. tuberculosis*, AV: *M. avium*, IN: *M. intracellulare*

Table 3 Numbers of AMPLICOR Mycobacteria-False Positive Results for Samples Distributed to 9 Different Laboratories

Laboratory	Bacteria in sputum (No. sample)		
	0 (15)	10 ² (45)	10 ⁴ (45)
1	0	1 ^{*b}	0
2	0	2 ^{*c}	0
3	0	0	0
4	0	1 ^{*d}	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	6 ^{*e}	0
9	1 ^{*a}	0	0

* a : No bacteria → TB

* b : *M. intracellulare* → *M. intracellulare* + TB

* c : BCG → *M. avium*, *M. avium* → TB

* d : BCG → TB + *M. avium*

* e : 3 BCG → TB + *M. intracellulare*

3 *M. avium* → *M. avium* + *M. intracellulare*

考 察

核酸の増幅に基づいたキットが発売され、多くの病院で日常の検査に取り入れている。しかし従来の検査法と比べ検出感度が高いことから DNA の汚染による偽陽性例と、臨床材料によっては材料中に含まれる増幅阻害物質による偽陰性例も同時に報告されている。発売後 1 年がたち、キットの取り扱いにも熟練している検査センターを含む 9 施設で、アンプリコア[®]マイコバクテリウムキットの検査精度を調べるために共同研究を計画した。

この研究はキットの精度のみならず施設の検査精度を調べることを目的としていることから、試験サンプルが

特別に扱われることを避けるためサンプル数を多くした。抗酸菌を含まないサンプルも含め合計 135 を調製した。同時に試験サンプルを日常検査と同様の流れで扱うことを条件とした。ここに参加した 7 検査センターは、施設により異なるが毎日 50～300 例の臨床材料をアンプリコア[®]キットまたは MTD キットで試験している。

米国の CDC⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ は、培養のための喀痰の前処理に等量の NALC-NaOH による処理を推奨している。しかし 4 % NaOH 処理と比較して汚染率が高いことから、著者⁽²⁾ は倍量の NALC-NaOH による処理を勧めている。また CDC⁽¹⁵⁾ はアルカリによる処理時間を 20 分以内にとどめることを勧めている。Kolk ら⁽⁵⁾ は核酸増幅の

ためのNALC-NaOHによる前処理は30分を勤めている。多くの場合病院で培養のための材料と核酸増幅法による検査材料を別の容器に採取して、検査センターに検査を依頼しているのが現状である。核酸増幅法による検査のみの依頼の場合には、十分な量のアルカリの使用と十分な処理時間を設定することが感度をあげる上で重要である。

前記CDCのマニュアル¹⁵⁾によると、NALC-NaOH処理後に含まれる抗酸菌の95%以上を回収するためには3,000gで15分の遠心が必要である。これと同等の遠心効力を得るためには2,500gで約25分、2,000gで約30分の遠心が必要である。冷却式の遠心機を用いることにより、ここに示した遠心時間は多少短縮できる。一部の施設を除き、この研究に参加した大部分の検査センターは最大3,000 rpm (2,000~2,200g)の多架遠心機を使用しており、遠心時間は施設により異なっていた。

Table 1に示したように、施設3で得られた超純水サンプルの検出感度は極端に低かった。しかし同じ菌数を含む喀痰材料からは偽陰性が認められなかった。この施設は、他の施設と異なる方法で超純水材料を処理した。すなわち、NALC-NaOH処理は省いたが、その後は喀痰材料と同様にリン酸緩衝液で希釈、3,000 rpmで23分遠心を行った。喀痰材料については同じ遠心力を用いても含まれる物質との共沈作用により、高い遠心力が得られたものと考えられる。しかし、材料により性質が一定でないことから、超純水材料についても効果的な遠心力を確保することが重要である。

施設3以外の8施設は、前処理を省いて超純水サンプルの試験を行った。施設2, 4, 6において、100個のBCGを含むサンプルの中で数%に陰性の結果が得られたことから、アンプリコア[®] TBキットの検出感度は100個前後と考えられる。オランダのグループにより報告されたPCRに関する共同研究¹¹⁾¹³⁾も検出感度については同様の成績であった。これに対し、1995年7施設の参加のもとに著者ら¹²⁾が行ったMTDキットの評価研究では、100個のBCGを含む超純水サンプルのすべてで陽性の結果が報告された。

生物学的検査に100%を期待することはできない。核酸増幅法も診断のための補助手段の1つである。しかし他の細菌学的検査と比べ検出感度が高いことから、核酸増幅法の結果が確定診断に用いられる例がある。それゆえ、検査の特異性がより重要である。この研究で、9施設のなかで5施設から偽陽性(945喀痰サンプルの11)の結果が報告された。DNAの汚染による偽陽性を防ぐために、種々の注意が払われている。それぞれの施設はアンプリミックスの調製室、材料の前処理室、増幅および検出室を別の部屋にするか、または部屋が同じでも扱

う場所を定めて行った。またアンプリミックスの調製と材料の前処理は、クリーンベンチまたは安全キャビネットの中で行った。作業場所を清潔に保つために終了後に次亜塩素酸ナトリウム溶液で拭き、さらに一定時間紫外線灯照射を行った。いくつかの施設では、作業前にも次亜塩素酸ナトリウム液による清掃を行った。もちろん、作業着などはそれぞれの部屋専用としていた。

このように十分な注意が払われたにもかかわらず、施設1, 2, 4, 8, 9から偽陽性の結果が報告された。偽陽性はTB, *M. avium*, *M. intracellulare*の3者でみられたことから、汚染は試験の操作中に起こったものと考えられる。しかし4施設においては105喀痰サンプルのいずれからも偽陽性の結果は報告されなかった。このことは、キットの特異性の点に問題はないことを示している。同様に調製されたサンプルを同じキットを用いて試験しても、施設により感度と特異性に差がみられた。偽陰性の結果を報告した施設から、同時に偽陽性の結果も報告された。このことは、これらの施設においては施設設備または検査の操作の上で改良の余地があることを示している。また精度管理のために内部チェックを定期的に行うことが必要である。検査センターでは独自の再検査システムを作り、これらの問題に対処しているのが現状である。

キットについては、増幅のための陽性および陰性コントロールは添付されているが、材料中の増幅阻害物質の存在をチェックするための内部コントロールはまだ開発されていない。また、血液などのように阻害物質を含むと考えられている臨床材料の簡便な前処理法の開発も早急に求められている。このようにまだ改良の余地は残されているが、アンプリコア[®]キットの導入は結核の診断のための補助手段として有効であろう。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Pao CC, Lin SS, Wu SY, et al.: The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical specimens with cloned *Mycobacterium tuberculosis* DNA as probes. Tubercle. 1988; 69: 27-36.
- 4) Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, et al.: Rapid diagnosis of tuberculosis by

- amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet. 1989; ii: 1069-1071.
- 5) Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and nonradioactive detection system. J Clin Microbiol. 1992; 30: 2567-2575.
- 6) Abe C, Hirano K, Wada M, et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test. J Clin Microbiol. 1993; 31: 3270-3274.
- 7) 青柳昭雄, 豊田丈夫, 大角光彦, 他: 核酸 (rRNA) 増幅を応用した結核菌直接検出法 (Gen-Probe; MTD) の臨床的検討—小川培地と液体培地 (MB-チェック) との比較を中心として—. 結核. 1994; 69: 7-14.
- 8) 青木正和, 片山 透, 山岸文雄, 他: PCR 法を利用した抗酸菌 DNA 検出キット (アンプリコア™ マイコバクテリウム) による臨床検体からの抗酸菌迅速検出. 結核. 1994; 69: 593-605.
- 9) Ichiyama S, Inuma Y, Tawada Y, et al.: Evaluation of Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test and Roche PCR-microwell plate hybridization method (Amplicor *Mycobacterium*) for direct detection of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1996; 34: 130-133.
- 10) 豊田丈夫, 大角光彦, 青柳昭雄, 他: 咯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—. 結核. 1996; 71: 495-503.
- 11) Noordhoek GK, 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.
- 12) 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: 467-472.
- 13) Noordhoek GT, van Embden JDA and Kolk AHJ: Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2522-2525.
- 14) Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, et al.: Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. Am Rev Respir. Dis. 1963; 87: 775-779.
- 15) Kent PT and Kubica GP: Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. US Department of Health and Human Service, CDC, Atlanta, 1985.