

原 著

病院検査室における結核菌培養の Cross-contamination

¹伊藤 邦彦 ¹高橋 光良 ¹吉山 崇 ¹和田 雅子
²中園 智昭 ²尾形 英雄 ²水谷 清二 ²杉田 博宣

¹結核予防会結核研究所, ²結核予防会複十字病院呼吸器科

CROSS-CONTAMINATION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CULTURE
IN CLINICAL LABORATORIES

¹*Kunihiko ITO, ¹Mitsuyoshi TAKAHASHI, ¹Takashi YOSHIYAMA, ¹Masako WADA,
²Tomoaki NAKAZONO, ²Hideo OGATA, ²Seiji MIZUTANI, and ²Hironobu SUGITA

¹*Research Institute of Tuberculosis, JATA, ²Department of Pulmonary Medicine, Fukujiji Hospital, JATA

For many years, it has been thought that positive culture of *M. tuberculosis* is a definitive diagnostic evidence of tuberculosis and cross-contamination of *M. tuberculosis* culture in clinical laboratories is rare. However recently introduced RFLP analysis has enabled us to identify a strain of *M. tuberculosis*, and many cases of the cross-contamination in clinical laboratories confirmed by RFLP analysis have been reported.

In this report, we present the first case of the cross-contamination confirmed by RFLP in Japan. In our case, 5 patients without any personal link to each other were suspected based on clinical findings to have cross-contaminated results of *M. tuberculosis* culture. All their specimens were processed on the same day, and were smear negative and culture positive with only a small number of colonies (less than 8 colonies). The sputum from the suspected source of contamination processed on the same day was strongly positive for AFB smear and heavily culture positive. The RFLP patterns of these 6 patients were identical, so it was concluded that the positive cultures of the sputum from the 5 patients who were not expected to be culture positive on clinical findings were caused by the cross-contamination in our hospital laboratory. We review all the charts of patients with *M. tuberculosis* culture positive results in the same year of this case, but we didn't find no other cases suspected of the cross-contamination.

Then we reviewed the literature of *M. tuberculosis* culture cross-contamination. The patterns of the cross-contamination are divided into two. One is associated with malfunction of a sampling needle in the BACTEC 460 system and the other associated with the initial processing of the specimens, mostly involving reagents such as NaOH solution. Cross-contaminated specimens are usually smear negative with only a few colonies (less than 5), and processed just after the source specimen of the contamination in most

*〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24

* 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533
Japan.

(Received 10 Jun. 1999/Accepted 16 Aug. 1999)

reported cases, but not in all. In almost half of them the cross-contamination results had significant influence on the clinical management. The frequency of the cross-contamination is estimated around 1% of the patients with *M. tuberculosis* culture positive results.

For early detection of the cross-contamination, not only clinicians but also laboratory staffs have important role and close cooperation between them is mandatory. To prevent the contamination, it is advisable to process smear positive and probable culture positive specimens separately from others, and not to use a large same container of reagents for processing of different specimens.

Key words : Cross-contamination, *M. tuberculosis*, False-positive, RFLP analysis

キーワード : クロスコンタミネーション, 結核菌, 偽陽性, RFLP 分析

1. はじめに

従来, 結核の診断を下す一番確かな診断根拠は培養検査であると考えられてきた。しかし臨床の場において培養検査では, 偽陽性があり得ることが以前より想定されてきたものの, 多くの場合決定的な証拠が欠け, また, 感染症である結核症への配慮から, たとえ臨床的に偽陽性が疑われても, 結核症として治療されることが多かったと考えられる。

個々の結核菌株の異同の判定にファージタイプによる方法が用いられていたが, その判定能力等に限界もあり, 広く普及していなかった。しかし最近では Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法が開発され, かなり正確な菌株の同定が可能になってきた。この RFLP 法を使って, 検査室内での Cross-contamination (以下 C/C と略) による結核菌培養偽陽性を証明した例が海外で近年いくつか報告されている。培養検査が結核臨床において根幹となる検査だけに, この C/C の問題は臨床的にもまた公衆衛生的にも重大な問題となり得るものと思われる。

本稿は結核臨床での C/C の位置づけを明らかにすることを目的とする。最初にわれわれの施設において検査室内での C/C が臨床的に疑われ, RFLP 法で確認された本邦初の事例を紹介し, 次に文献のレビュー^{1)~18)}に基づいての C/C の実情を述べる。これらに基づき, 結核臨床での位置づけとその予防および対策につき考察する。

2. 複十字病院 (以下当院) での事例

2.1 調査開始の経緯と患者一覧

表 1 に調査対象者の一覧をあげる。胸部レ線像の正常な患者 No. 5 の結核菌培養陽性が報告され, CT 等の画像所見を再検討したが, 結核を示唆する所見はなかった。

このため結核菌培養検査偽陽性が疑われ, 当該患者の陽性検体の培養当日の検査台帳が調査された。

当日の抗酸菌培養検体は 102 検体あり, 喀痰はそのうち 99 検体であった。喀痰以外の検体は別に処理されていた。この 99 検体のうち, 受付番号 6 の患者 No. 1 の G7 号の検体処理以降, 結核菌の培養陽性検体が 8 検体見られた。患者 No. 1 以前の受付の 5 検体は塗抹, 培養とも陰性であった。結核菌培養陽性の 8 検体のうち 3 検体は, 別の日の培養検査等により結核と確定されている患者の検体であった。残りの 5 検体において C/C が疑われた。1 例は結核の確定診断がなされ, PZA を含んだ化学療法開始後 3 カ月で 1 度菌が陰性化した後, 2 カ月を経過した時点での検体であった (患者 No. 6)。残りの 4 例は臨床上結核の診断が予想されていなかった患者であった (患者 No. 2~5)。患者 No. 1 から No. 6 までの検体は受付番号の順に処理されていた。これら患者 No. 2~5 の検体並びに, 患者 No. 6 からの検体およびこの患者の治療開始前の検体を含めた計 6 検体と, 汚染源 (以下 Source) と考えられた患者 No. 1 の G7 号の検体を用い, 検査室内での C/C を疑い, RFLP 法による検索を行った。RFLP は IS 6110 を利用した標準的方法に沿って施行された¹⁹⁾。

2.2 当院での抗酸菌培養検査手順

喀痰の容器は直径 2.5cm, 高さ 10cm のスクリュウキャップの付いた先細のものである。検査室に集められた検体は数検体ずつ安全キャビネット内で塗抹される。塗抹操作では 1 検体ごとにキャップの開閉がなされる。その後検体は受付番号順に 1 列 4 検体で 2 列の検体立てを計 3 個ずつ合計 24 検体ごとにまとめられた後, 安全キャビネット内に移される。受付番号の順に 1 検体ごとにキャップを開閉しながら 4% NaOH を同一の洗浄瓶から等量から倍量添加され, ボルテックスで混和した後

表1 調査患者

患者 No. 1/受付番号 6/女. 68歳/主婦

3週培養^(注2) 卍/卍 (塗抹 Gaffky 7号): 病棟にて入所の翌日検痰

小児期に結核にて人工気胸術施行。1998年4月糖尿病にて前医入院インスリン使用。2カ月前より咳嗽出現し近医で Gaffky 8号検出され転院入所し HREZ 開始。病型 bII2。

患者 No. 2/受付番号 9/男. 51歳/団体職員

8週培養 +₁/- (塗抹陰性): 健康管理科にて初診時採痰

職場健診での右肺門下部の不明影にて健康管理科(別棟)を初診。胸部単純写真は正常と判断。9月10日のCTでは左S6に径2mmの石灰化巣および同底区に線状影があるのみ。6HR 開始。

患者 No. 3/受付番号 13/男. 68歳/自営

8週培養 +₁/- (塗抹陰性): 初診時外来にて検痰

高熱を主訴に初診。糖尿病および網膜症の合併あり。CTにて肺炎疑われ入院。抗生剤投与にて約1週間で陰影は完全に消失しマイコプラズマ肺炎を疑われた。その後多発性胃潰瘍を合併し消化器科転科。抗結核薬の投与はないが現在まで発病なし。

患者 No. 4/受付番号 17/女. 33歳/事務員

8週培養 +₂/+₈ (塗抹陰性): 初診時外来にて検痰

前医にて微熱の際ツ反 22×18/60×54(水疱)と強陽性のため初診, 胸部単純写真は正常と判断される。培養陽性判明後CT施行, 中葉の極めて淡い濃度上昇を認めるのみ。6HR 開始。

患者 No. 5/受付番号 21/女. 65歳/主婦

8週培養 +₁/+₆ (塗抹陰性): 初診時外来にて検痰

住民健診での右肺門部異常影を主訴に初診。胸部単純写真は正常と判断。CTでは舌区末梢に径1センチ程度の陰影あるも無気肺様で結核病巣とは考えにくい。6HR 開始。

患者 No. 6/受付番号 34/男. 57歳/会社勤務

8週培養 +₂/+₃ (塗抹陰性): 結核治療開始3カ月後定期受診時外来にて検痰

健診にて異常影指摘され初診, 検痰にて Gaffky 2号検出され命令入所。全剤感性。HREZ 開始。1カ月後のG6/培養+(15コロニー)を最後に菌陰性化。開始約3カ月後外来定期受診。同日の胸部レントゲンでは悪化を認めず。その後再排菌なく治療終了後も再発なし。

(注1) 培養菌はすべて結核菌と同定されており薬剤には全剤感受性であった。

(注2) 培養結果は2本の培地での結果を両者記載した(スラッシュで区切りを入れた)。培養 卍 はコロニー数 500~2000, 培養 + は 200 個以下で実数を付す。

(注3) 検体はすべて同じ日に提出されており, 受付番号は当日の受付順の通し番号である。

10分放置される。この後の小川培地への接種は, 培地の凝固水をアルコール綿に吸わせた後, ディスポーザブルのピペットで行われる。接種の終わった検体はピペットを差し込んだまま安全キャビネット内で処理される。

2.3 結果

図のように RFLP の結果, 患者 No. 6 の治療開始前の検体を除くすべての検体で RFLP パターンが一致した。バンドは 5 個以上検出されており, 菌株同定の信頼性は高いものと考えられた。臨床所見および画像所見か

ら, また, これらの患者群での個人的つながりも否定されたため, 患者 No. 2 から No. 6 までの当日の培養陽性検体は患者 No. 1 の検体からの実験室内 C/C によるものと判断した。

2.4 当院における結核菌培養検査偽陽性率の検討

当院での結核菌培養検査偽陽性の頻度を推定し, C/C の状況を把握するため, 同年の新規結核菌培養陽性患者のカルテが調査された。レントゲンが正常で結核菌培養で 20 コロニー以下の患者の検索が行われたが, 上記以

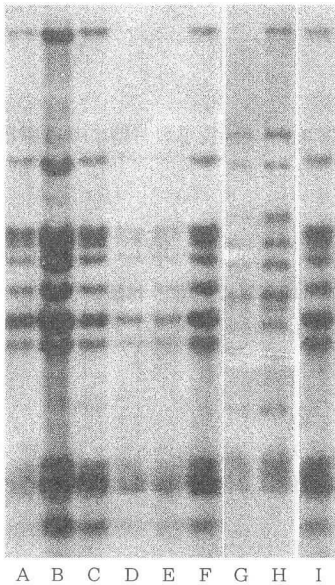


図 RFLPの結果(A～Fは各々患者No. 1～6の培養陽性検体のRFLPパターンで、すべて一致している。GおよびHは患者No. 6の治療開始前および開始後1カ月の検体からの結核菌のRFLPパターンで同一、Iは同患者No. 6の治療開始後3カ月のC/Cのあったと疑われた日の検体のRFLPパターンでGおよびHと異なっている)

外にC/Cの疑われる症例はなかった。本事例の観察された年における喀痰培養は11,516(うち喀痰以外1,314)検体、また、結核菌培養陽性検体(このうち約半数で塗抹陽性)は喀痰で1,192(喀痰以外で117)検体、新規結核菌陽性患者は305人(表1の患者も含む)であった。したがって、総喀痰検体数に占めるC/C検体の頻度は0.04%、結核菌陽性喀痰検体数に占めるC/C検体の頻度は0.42%、結核菌陽性新規結核とされた患者におけるC/Cを受けた患者の割合は1.64%である。

2.5 当院の事例に対する考察

結核菌培養の偽陽性の原因としては大きく分けて①検体採取段階における結核菌の混入(内視鏡等の汚染を含む)、②検体の取り違えもしくは報告書の間違い、③実験室内での他検体からの結核菌の混入(C/C)、④検査技師が排菌陽性の肺結核であった、の4つの可能性が考えられる。

本事例では検査台帳や検体搬入経路の再検討から②は考えがたいと思われた。また、検査技師のその後の定期健康診断の結果から④も考えがたい。①の機序による偽陽性が疑われた事例は、内視鏡以外ではこれまで報告さ

れていないが、理論的には考え得る事態であろう。例えば換気の良くない場所で複数の患者が採痰を行う場合、ある患者の検体に他患者の結核菌が混入する可能性は否定できない。しかし、実際にこれが起き得るかどうかは不明である。本事例では患者No. 5については別の場所で検痰が行われており、他の患者No. 3～6の採痰は、院内感染防止のための換気装置を備えた外来の採痰ブースで行われている。また、Sourceと考えられる患者No. 1の採痰は病棟にて行われている。以上から本事例においては、①の機序によるものではないと判断される。

本事例でのC/Cの原因にはいくつかの可能性が考えられる。器具類を介して菌が混入したとすると、凝固水を処理する際のアルコール綿も疑われるが、アルコール綿は適宜取り換えられており、加えて混入が検体処理の組の違う患者No. 6にまで及んでいるため、少なくとも単一の原因とは考えにくい。また、患者No. 1の検体への4% NaOH添加の際に、洗浄瓶の注入口が汚染された可能性もあるが、この試薬の注入は受付番号順に行われており、もしそうなら直後の検体により多くの偽陽性が見られるものと思われるが、本事例ではそうっていない。菌の混入が検体処理の組の違う患者No. 6にまで及んでいることから、患者No. 1の検体処理の段階で発生した結核菌を含んだエアゾルが関与している可能性が考えられる。しかし、エアゾルの発生する可能性のある操作はすべて安全キャビネット内で行われており、本事例でのC/Cの機序を確定することはできず、推測の域を出ない。

3. 文献的事例考察

3.1 Cross-contaminationの概観

Cross-contamination(C/C)を主題としたり、疫学的研究の一部としてC/Cについて報告している文献は20近くあり、特にRFLP法の登場以降増加している。報告されている事例のうち詳細のはっきりしているものの概要を表2に示す^{1)～18)}。ほかにBACTECシステムでのC/Cを論じた報告が2つある²¹⁾²²⁾。これらの臨床報告以外では、実験的に、オートクレイブした痰と稀な耐性パターンを示す結核菌陽性の検体を混ぜた数百の検体を各検査室に送る、などの手段で、偽陽性率を調査した報告がある²³⁾。

RFLP法の登場以前のC/Cの判断は臨床的判断であったり、フェージ型や稀な生化学的性質によるものがある。RFLP法によってC/Cを証明した事例は1993年のSmallらの報告⁷⁾が最初であり、これ以降報告数が増えている。

これらによると、C/Cの機序はBACTEC 460での

表2 Cross-contamination (C/C) 文献報告

報告年度 報告者 ^(文献)	培養	判断法	調査の きっかけ	状況	C/Cの頻度	コメント
1975 MacGregor ¹⁾	Solid	Clinical	臨床医の疑いから18カ月間の培養検査を調査	12人の患者12検体がC/Cと判断。12検体のうち9検体は同日に塗抹陽性の検体を処理。	結核菌陽性239検体中12検体(5%)	
1984 Maurerら ²⁾	Solid	Clinical 5例で フージ型	臨床医の疑い	1. 週間の培養検査のうち4日間9患者9検体でC/Cが疑われ(1日1~3検体/平均2.3), うちフージ typing 可能な5例はすべてフージ型が一致。この前後で他の陽性検体はないが, control 用陽性検体を扱っている。前処置段階の試薬の容器が原因?	1年間の培養見直しでさらに2例がC/Cと判断。33人の培養陽性者中11人(33%)	
1988 Jones Jr ³⁾	不明	フージ型	臨床医もしくは検査室より疑われた	異なる31の実験室からC/Cを疑われてCDCに検体を送られフージ型を調査。1事例当たり2~13検体(平均5.8)が同一のフージ型で偽陽性と判断された。一部はC/Cではなく他の原因による偽陽性が疑われた。		
1991 Smithら ⁴⁾	Solid	Nitrate reductase 欠損	2日間で左記の稀な性質の菌が5例あり検査室より疑い	2日間の Nitrate reductase 欠損菌5検体5患者のうち2人は親子で塗抹陽性かつ臨床的に結核。他の3検体(1日目2人, 2日目1人)はC/Cと判断。いずれも同日の親子の結核患者の塗抹陽性検体からの contamination と判断。		
1991 Murray ⁵⁾	BACTEC 460	Clinical	臨床医の疑い	結核患者の培養陽性の検体から8番目, 11番目の検体で培養陽性, 臨床的にC/Cと判断。BACTECの Sampling needle による Carry-over が原因と判断された。		
1992 Fischelら ⁶⁾	BACTEC 460	Clinical		HIV(+)の結核菌陽性患者の調査の一部としてC/Cの頻度が言及されている。詳細は不明。	HIV(+)結核菌陽性者140人中23人がC/Cと判断(16.4%)	C/Cと判断された23人中15人はMDRによるC/C。
1993 Smallら ⁷⁾	BACTEC 460	RFLP		時間的に離れた2事例。1つは4患者5検体, 他は2患者3検体でC/Cと判断。いずれも同時に処理された塗抹陽性検体より混入。原因は Sampling needle による Carry-over もしくは検体の前処置中のC/C。	全約3,600検体中8検体がC/C(0.2%)	

(次ページに続く)

報告年度 報告者 ^{文献}	培養	判断法	調査の きっかけ	状 況	C/Cの頻度	コメント
1994 Allandら ⁸⁾	不明	Clinical	ニュー YORKにおける結核の疫学調査の一部としてC/Cについて言及している。一部はC/C以外の偽陽性?	ニュー YORKにおける結核の疫学調査の一部としてC/C以外がC/C (2.3%)	結核菌陽性患者130人中3人がC/C (2.3%)	
1994 Smallら ⁹⁾	不明	RFLP	サンフランシスコにおけるRFLPを利用した疫学調査の一部としてC/Cについて言及。	RFLP可能な結核菌陽性患者496人中9人がC/C (1.1%)	RFLP可能な結核菌陽性患者496人中9人がC/C (1.1%)	
1995 Dunlapら ¹⁰⁾	Solid	RFLP	公共衛生の側より疑いが持たれた	異なる3施設の3事例(3患者3検体)。コロニー数はそれぞれ3コロニー、2コロニー、多数。いずれもRFLPパターンが同一の多量の結核菌を含む検体と同日に処理。その後さらに3例が発見された。	この地域で結核として報告された487人中6人がC/C (1.2%)	結核の診断のため1人が失職
1996 Wurtzら ¹¹⁾	Solid	RFLP	MDR-TBの多発によりC/Cが疑われた	4事例12検体12患者。RFLPパターンの同じ塗抹陽性検体(Source)と同じバッチで処理。1) 1人のMDR-TBの塗抹陽性検体から7カ月間に6人の患者にC/C。うち1人はすでに薬剤感受性のTBと診断治療されていた。2) 他の3事例は塗抹陽性検体から3人、2人、1人の患者へC/C。このうち1人は薬剤感受性結核治療中の再排菌と思われたものがC/C。どの事例も同じ新人の技師が処理。試薬の注入容器の注入口の汚染が原因?	全4,075検体中12例がC/C (0.33%)。結核菌陽性検体441検体中12例がC/C (2.7%)	
1997 Bardenら ¹²⁾	Solid + ?	RFLP		RFLPを利用したアーカーサンサスでの疫学調査の一部として調査。9患者がC/Cと判断された。このうちコロニー数の分かっていない5人では、1個のみが3人、2個/3個がそれぞれ1人。	RFLP可能な結核菌陽性者259例中9人がC/C (3.5%)	
1997 Brumanら ¹³⁾	Solid + BACTEC 460	RFLP		著者らの施設で約5.5年間の培養結果を調査。8患者8検体が偽陽性、うち7例がC/C。1~2例はBACTECのCarry-over、5~6例は前処理段階でのC/Cと判断。これら7例中6例はSourceと同日に処理。 他の3施設からさらに3事例5患者5検体の追加報告あり。1事例3患者3検体は試薬そのものの汚染、他の1検体は前処理段階でのC/Cが疑われ、残りの1例BACTECのみで陽性。	結核菌陽性患者199人中7人がC/C (3.5%)。結核菌陽性検体696検体中7検体がC/C (1.0%)	

(次ページに続く)

報告年度 報告者	培養	判断法	調査の きっかけ	状 況	C/Cの頻度	コメント
1997 CDC ⁽¹⁴⁾	不明	RFLP	臨床医により疑 われた	4施設11患者11検体につき報告(Wisconsin) 1患者1検体。Sourceの直後に検体を前処理。 この段階でのC/Cと判断。	左記11患者の報告のあった 際の Wisconsin での結核登 録は125例(最低8.8%がC/ C)	
	BACTEC 9000	RFLP	検査技師が結核 菌陽性率が高い ことに気づき調 査開始	5日離れた2事例7患者7検体。最初の事例は3 検体。Sourceはコントロール用の結核菌陽性検 体で、これより2, 3, 5番目の検体でC/C。ほか は4検体でSourceは塗抹陽性、これより3, 4, 7, 15番目の検体でC/C。前処理段階でのC/C と判断。		
	BACTEC 460	RFLP	検査室および公 衆衛生側より (MDR-TB統 発)	2日間にわたる2患者2検体。Sourceは塗抹陽 性のMDR-TB患者。BACTECの Carry - overもしくは前処理でのC/C。		
	Broth	Clinical		1検体1患者のサブカルチャーより。初回培養の 際の隣の検体が結核菌陽性。		
1997 Bauer ⁽¹⁵⁾	Solid + BACTEC 460	RFLP		1年間で18事例46患者47検体がC/Cと判断。 37検体でBACTEC, Solid両方で培養陽性で、 前処理段階でのC/Cと判断。47検体中約90%は 1人の左利きの検査技師によるもの。1人の患者 は異なる検体で異なるSourceより2回のC/C あり。また1検体のRFLPは2菌株の混合パター ンを示し一方は患者自身の結核菌。	結核菌陽性1,439検体中49検 体がC/C(3.4%)(これ以外 の年では例年推定で0.2%~)	
1998 Van Duinら ⁽¹⁶⁾	Solid	RFLP	1日のうちに培 養陽性が続発し たため検査室よ り疑い、調査開始	2日間17検体17患者。コロニー多数のものあり。 2日間にナイアシントテストを施行した6菌株のう ち3菌株よりC/C。1検体は RFLP上混合パ ターンを示し、異なる2つの菌株からC/Cを受 けたと判断。前処理段階での試薬等を介してのC /Cと考えられた。		臨床的にC/Cが 疑われRFLPの パターンが一致し なかった1例は治 療されず、その後 結核を発症
1998 Bhattacharya ⁽¹⁷⁾	Solid + BACTEC 460	RFLP		2事例3検体につき報告。1検体はSolidのみ、 1検体はBACTECのみ、1検体は両方で陽性。 直前にSourceと思われる塗抹陽性検体を処理。 前処理段階でのC/Cと考えられた。	陽性検体を処理した日の総検 体数2,350検体中289検体が 培養陽性、うち3検体がC/C (1.0%)	
1999 De C Ramosら ⁽¹⁸⁾	Solid	RFLP + Spoligo- type (20)	結核菌陽性検体 の続発から検査 室より疑われた	約3週間にわたり60検体が同一の菌株によりC/C。 大量の菌を含む検体により試薬の大きなボトルご と汚染されたことによるものと判断された。		

Sampling needleの Carry-overによる C/C と、培養前処理段階での C/C の2つに大別される。しかし、BACTEC 460はラジオアイソトープを使用した検出系であるため日本では導入が困難とされており、この種の C/C は、現在のところ日本では問題になることはないと思われる。しかし将来、新規の自動抗酸菌培養検出系が導入されるようなことがある場合には心にとめておく必要がある。以下では主に、日本で起き得ると考えられる、後者の前処理段階での C/C を中心に文献的な考察を述べる。

3.2 C/Cの頻度

C/Cの頻度は以下の3通りの方法で述べることができる。

- ① 総検体数当たりの C/C 検体の頻度は2報告⁷⁾¹¹⁾で、それぞれ、0.2%、0.33%、平均0.26%。われわれの施設で0.04%であった。
- ② 結核菌培養陽性検体当たりの C/C 検体の頻度は5報告6事例^{1)11)13)15)〈Van Embdenの私信報告あり〉17)}で、1.0~5%、平均2.7%。われわれの施設で0.42%であった。
- ③ 総結核菌培養陽性者当たりの C/C 患者の割合は7報告^{2)6)8)~10)12)13)}で、1.1~33%、平均4.9%、われわれの施設で1.64%であった。

これらの頻度は各施設の性格、結核患者の頻度や検体提出数、C/Cの判断基準や検索方法等に左右され、また、報告そのものが特にC/Cの多い時期をピックアップしている可能性も高く、一般的な頻度を述べることには意義が少ないかもしれない。しかし、結核菌培養陽性患者におけるC/Cの頻度は、疫学研究の一部としてのバイアスのかかりにくい報告⁹⁾¹⁰⁾などから、1%前後と推定され、この数字はわれわれの施設の頻度にも近く、想像されるよりもはるかに高い頻度となっている。臨床ベースの細菌検査である限り、C/Cはいずれの検査室でも起き得るものと考えらるべきであろう。

3.3 C/Cを疑うきっかけ

C/Cが最初に疑われた部署が報告されている9報告11事例中(重複あり)臨床側5例^{1)~3)5)14)}、検査室6例^{3)4)14)〈2事例〉16)18)}、公衆衛生側2例¹⁰⁾¹⁴⁾であった。疑われた理由が明らかなもののうち臨床像以外の理由は、多剤耐性結核(以下MDR-TB)の多発2例¹¹⁾¹⁴⁾、結核菌培養陽性率の上昇3例¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁸⁾、稀な生化学的性質を持つ結核菌の多発1例⁴⁾であった。これらより、C/Cの発見には、検査室のスタッフの果たすべき役割も臨床医と同等かそれ以上に重要であることが分かる。

3.4 C/Cの特徴

固形培地によるC/Cの報告に見られる特徴として、①1事例当たり複数(1~5検体)の検体へのC/Cが発生、②これらの検体がSourceの検体処理に引き続き、相次いで検体処理されている、③患者から提出された検体は皆、塗抹陰性で培養が1回のみ陽性、④コロニー数はわずかでほとんどが5個以下、があげられる。しかしこれらには例外もあり、どれも除外規定とはなり得ない。いくつかの報告¹¹⁾¹⁵⁾²⁰⁾に見られるように特定の技師が関与しているケースもあり、検査設備等の体制自体よりも重要な因子となり得る²⁰⁾とされている。また、RFLP法による分析では2つのSourceから同時に1つの検体へC/Cを起こした例や、患者自身の結核菌陰性検体にさらに別のSourceからC/Cを起こした例も報告されている。これらの場合ではRFLPのパターンが混合パターンを示す。

3.5 C/Cの原因

BACTEC 460での Carry-over によるものを除くと、原因について言及されている報告の多くでは、正確な原因は不明なものの、前処理段階、特にNaOH等の試薬を検体に加える際での混入を示唆するものが多い。しかし、De C Ramosらの報告¹⁸⁾に見られるような試薬そのものの汚染によるものは少ないと思われる。多くは複数検体で同一の試薬瓶を使用する際に、試薬瓶の注入口が検体や検体容器内側に直接触れたり、溶液注入の際の飛沫が注入口に付着することによって起こるものと推測されている。また、Sourceは塗抹陽性で多量の菌を含んでいるものがほとんどだが、例外の報告⁵⁾もある。

3.6 C/Cの臨床への影響

De C Ramosらの報告¹⁸⁾を除き、C/Cと判断された患者への対応を知り得る報告を集計すると129例である。これらをまとめて表3に示す。全体的に近年になるほど治療開始例が多い傾向にあり、診断が菌検査重視へと変化したことの反映と考えられる。MDR-TBによるC/Cは3報告6例あり⁶⁾¹¹⁾¹⁴⁾、うち3例はMDR-TBとして扱われている。RFLPの結果が臨床に生かされた例は計13例である。

4. C/Cの可能性を考慮した結核臨床

結核菌培養偽陽性の可能性はこれまであまり結核臨床の場で考慮されてこなかったが、上記のごとくRFLP法等の解析により、C/Cが決して稀なものではないことが明らかになりつつある。結核菌培養検査は結核臨床の根幹となる検査であり、したがって、これらの可能性は臨床のいくつかの局面で常に考慮されなければならない

表3 患者への対処^(注1)

文献 No.	1	2	4	7	10	11	12	13	15	16	計
報告年度	1975	1984	1991	1993	1995	1996	1997	1997	1997	1998	
治療せず	12	5		3	1	8	1	2	2	13	47 ^(注2)
治療		4	2	1	1	2	6	6	17		39 ^(注3)
治療開始後中止				2		1	1		6	3	13 ^(注4)
臨床的に結核と診断									7	1	8
結核既診断/影響なし								1	6		7
結核既診断/治療変更						1					1 ^(注5)
早期死亡			1		1			1	4		7
陰性と報告									3 ^(注6)		3
不明/転院							1	2	1		4
計	12	9	3	6	3	12	9	12	46	17	129

(注1) 文献18)を除き対処が集計できるものについてまとめた。

(注2) 多くは臨床判断による(その後の発病者なし)。3例はMDR-TBによるもの。

(注3) 2人はMDR-TBとして治療。

(注4) 10例はRFLPの結果,ほかは副作用その他による。

(注5) MDR-TBとして治療変更。

(注6) RFLPの結果陰性と報告された。

い。

4.1 結核の新規診断におけるC/C

結核を発症していない患者においては、C/Cは無用の治療が行われる可能性が高い。Wurtzらの報告¹¹⁾のように、特にMDR-TBによるC/Cであった場合には副作用の強い二次薬を長期間投与することになりかねない。また、結核の誤診は無用な接触者検診や精神的社会的負担を招く恐れもある。結核の診断においては培養検査の結果を盲信せず、臨床的に矛盾があれば偽陽性の可能性も考え、さらに複数の検体を採取し、場合によってはRFLP法等による調査を考慮すべきであろう。ただし安易な偽陽性との判断は慎むべきである。例えばRFLP法でC/Cが証明されなかったにもかかわらず、臨床的にC/Cと判断され、無治療のままとなった1例¹⁶⁾は、その後明らかな結核症へと進展している。また、胸部レ線の正常な結核確診例についてもこれまでに多くの報告²⁴⁾がある。著者らも、胸部レ線は正常で1回のみわずかなコロニー数の結核菌が検出され、初め偽陽性が疑われたもののCTで鎖骨下に小さな散布を伴う空洞が検出された例を経験している。臨床像と結核菌培養検査結果の間に齟齬のある場合には、偽陽性と判断する前にCTや気管支鏡による検索が望ましい。また、これまで報告はないが、真に抗酸菌培養陽性の場合には、同定検

査の段階でC/Cにより結核と誤診される可能性も考えられることを、非結核性抗酸菌症の患者では一応考慮に入れておくべきであろう。

4.2 結核と診断されている患者におけるC/C

真に結核と診断されている患者においても、報告はないものの、培養に基づく薬剤感受性試験におけるC/Cに留意すべきである。RFLPで混合パターンを示すことにより、2つの菌株が同時に培養されていると判断された例が2例報告されており¹⁵⁾¹⁶⁾、うち1例は患者自身の菌株に他検体の菌が混入した結果と考えられる。この場合、他検体の菌が薬剤耐性を有する場合には、患者自身の菌が全剤感性であっても、薬剤感受性試験の結果は耐性と判断される可能性がある。

治療中もしくは治療終了後のモニタリングとして培養検査がなされる場合には、C/Cにより誤って治療の失敗や再発と判断される可能性も考えられる。表3の集計ではほとんどの例で臨床への影響は見られないが、1例ではMDR-TBによるC/Cで、薬剤感受性試験の結果、二次薬による治療に変更されている。また従来、治療終了後、臨床もしくはレ線上悪化がないにもかかわらず、散発的に少数のコロニーが検出される(Isolated positive culture/以下IPC)ことが知られており、1回みの場合にはほとんどの例で真の再発とは見なされない

とされている。C/Cの特徴や頻度を考慮すれば、これらの微量排菌は実はすべてC/Cであった可能性もある。この問題を調査した報告は2つあり、RFLP法登場以前の報告²⁵⁾ではIPCに占めるC/Cの頻度は推定で10~50%、RFLP法を利用した報告²⁶⁾では治療前の菌株とRFLPのパターン的一致するものは約10%であった(残りの90%がすべてC/Cによるものかどうかは不明)。よって少なくともIPCのすべてをC/Cで説明することは不可能のようである。

4.3 結核臨床研究におけるC/C

C/Cが1%前後の可能性で起き得ることは常識になりつつある。疫学等の研究の際にも考慮すべき事柄であろう^{8) 9) 27) ~29)}。

5. 早期発見と予防

5.1 早期発見

上記のようにC/Cはどの検査室でも起き得ると考えるべきであり、よって常にC/Cの可能性を心にとめておくことが必要である。C/Cを可及的早期に発見し、臨床への影響を最低限度とすることが重要である。このためには臨床側だけでなく検査室や公衆衛生のスタッフも重要な役割を果たすべきであることは3.3項にも述べた。臨床医が気づき得る特徴としては、結核として否定的な臨床像はもちろん、これ以外に3.4項に述べた①、③、④の特徴があげられる。検査室や公衆衛生側からの疑いとしては、疫学的なつながりのない結核菌陽性検体数・患者数の特異な増加があげられ、これらの結核菌が薬剤耐性等の特徴的な性質を有している場合には余計に疑いが濃くなる。検査室の台帳からは、3.4項に述べた①~④の特徴から疑うこともできる。C/Cの疑われる例では、検査室スタッフと臨床医の両者で検討のうえ、必要であればRFLPを施行するのが望ましい。したがって、ほとんどの報告にも述べられているように、C/Cの早期発見のためには検査室と臨床の連絡を密にすることが非常に重要である。そしてC/Cと判断した場合には原因を可及的に追究し、これにより検査過程を改善し、予防に努めることが重要である。

5.2 予 防⁷⁾

RFLP法登場以降C/Cの報告が多くなるに従い、1995年ころ以降の検査マニュアルにおいては、従来にはなかったC/C予防への言及も見られるようになってきている³⁰⁾。

培養の検査台帳では、担当した技師が後から分かるようにしておくことが必要である。理想的には塗抹培養の操作を各検体ごとに全く個別に行うことが望ましいであ

ろうが、効率の面から、少なくとも臨床ベースでは困難であろう。SmallがBACTEC 460でのC/Cの対策で述べているように⁷⁾、Sourceとなり得る塗抹陽性検体や培養陽性になる可能性が高い患者からの検体を個別に処理するのが実際的である。また、3.5項で述べたことから、検体への試薬等の注入には共通の試薬瓶を使用しないことが勧められる³⁰⁾。BACTEC 460のCarry-overに関する技術的な対策は文献^{21) 22)}や製造元のマニュアルに詳しく記載されているので、参照されたい。

謝 辞

起稿にあたり協力と助言を頂きました複十字病院細菌検査室のスタッフの皆さんに深謝いたします。

文 献

- 1) MacGregor RR: The Significance of Isolating Low Numbers of *Mycobacterium tuberculosis* in Culture of Sputum Specimens. *Chest*. 1975; 68: 518-523.
- 2) Maurer JR, Desmond EP: False-Positive Cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest*. 1984; 86: 439-443.
- 3) Jones Jr WD: Bacteriophage Typing of *Mycobacterium tuberculosis* cultures from Incidents of Suspected Laboratory Cross-contamination. *Tubercle*. 1988; 69: 43-46.
- 4) Smith WB, Vance Jr DW: Specimen Cross-Contamination by a Strain of *Mycobacterium tuberculosis* Lacking Nitrate Reductase Activity. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1991; 14: 523-526.
- 5) Murray PR: Mycobacterial Cross-Contamination with the Modified BACTEC 460 TB System. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1991; 14: 33-35.
- 6) Fischel MA, Uttamchandani RB: An Outbreak of Tuberculosis Caused by Multiple-Drug-Resistant Tubercle Bacilli among Patients with HIV Infection. *Ann Intern Med*. 1992; 177: 177-183.
- 7) Small PM, McClenny NB: Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis* to Confirm Cross-Contamination in the Mycobacteriology Laboratory and Modification of Procedures to Minimize Occurrence of False-Positive Cultures. *J Clin Microbiol*. 1993; 29: 1677-1682.

- 8) Alland D, Kalkut GE: Transmission of Tuberculosis in New York City. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1710-1716.
- 9) Small PM, Hopewell PC: The Epidemiology of Tuberculosis in San Francisco. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1703-1709.
- 10) Dunlap NE, Harris RH: Laboratory Contamination of *Mycobacterium tuberculosis* Cultures. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152: 1702-1704.
- 11) Wurtz R, Demarais P: Specimen Contamination in Mycobacteriology Laboratory Detected by Pseudo-Outbreak of Multidrug-Resistant Tuberculosis: Analysis by Routine Epidemiology and Confirmation by Molecular Technique. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1017-1019.
- 12) Barden CR, Templeton GL: Retrospective Detection of Laboratory Cross-Contamination of *Mycobacterium tuberculosis* Cultures with Use of DNA Fingerprint Analysis. *Clin Infect Dis.* 1997; 24: 35-40.
- 13) Bruman WJ, Stone BL: The Incidence of False-Positive Cultures for *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 321-326.
- 14) CDC: Multiple Misdiagnoses of Tuberculosis Resulting from Laboratory Error-Wisconsin. 1997. *MMWR.* 1997; 46: 797-801.
- 15) Bauer J: False-Positive Results from Cultures of *Mycobacterium tuberculosis* Due to Laboratory Cross-Contamination Confirmed by Restriction Fragment Length Polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 988-991.
- 16) Van Duin JM, Pijnenburg JEM: Investigation of cross contamination in a *Mycobacterium tuberculosis* using IS 6110 DNA fingerprinting. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 1(5): 425-429.
- 17) Bhattacharya M: Cross-Contamination of Specimens with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Clin Pathol.* 1998; 109: 324-330.
- 18) De C Ramos M, Soini H: Extensive Cross-contamination of Specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a Reference Laboratory. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 916-919.
- 19) Van Embden JDA, Cave MD: Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standard Methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 406-409.
- 20) Kamerbeek J, Scholus L: Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 907-914.
- 21) Vannier AM, Tarrand JJ: Mycobacterial Cross Contamination during Radiometric Culturing. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 1867-1868.
- 22) Conville PS, Witebsky FG: Inter-Bottle Transfer of Mycobacteria by the BACTEC 460. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1989; 12: 401-405.
- 23) Aber VR, Allen BW: Quality Control in Tuberculosis Bacteriology 1. Laboratory Studies on Isolated Positive Cultures and the Efficiency of Direct Smear Examination. *Tubercle.* 1980; 61: 123-133.
- 24) Marciniuk DD: Detection of Pulmonary Tuberculosis in Patients with a Normal Chest Radiograph. *Chest.* 1999; 115: 445-452.
- 25) Mitchison DA, Keyes AB: Quality Control in Tuberculosis Bacteriology 2. The Origin of Isolated Positive Cultures from the Sputum of Patients in Four Studies of Short Course Chemotherapy in Africa. *Tubercle.* 1980; 61: 134-144.
- 26) Das S, Chan SL: Application of DNA fingerprinting with IS 986 to sequential mycobacterial isolates obtained from pulmonary tuberculosis patients in Hong Kong before, during and after short-course chemotherapy. *Tuber and Lung Dis.* 1993; 74: 47-51.
- 27) Small PM, Shafer RW: Exogenous Reinfection with Multiple Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Patients with HIV Infection. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1137-1144.
- 28) Weltman AC: Tuberculosis Susceptibility Patterns, Predictors of Multidrug Resistance, and Implications for Initial Therapeutic Regimens at a New York City Hospital. *Arch Intern Med.* 1994; 154: 2161-2167.

- 29) Nitta AT: Misdiagnosis of Multidrug-Resistant Tuberculosis Possibly Due to Laboratory-Related Errors. JAMA. 1996 ; 276 : 1980-1983.
- 30) Nolte FS, Metchock B: Mycobacteria. In: Murray PR, ed. Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 1995 : 400-437.