

原 著

MTD 検査における偽陽性および偽陰性検体についての臨床的検討

^{1,2}宮本 潤子 ¹橋本 敦郎 ¹水兼 隆介 ¹佐々木豊裕
¹木谷 崇和 ¹中富 昌夫 ³河野 茂

¹国立療養所長崎病院内科, ²現 公立みつぎ総合病院内科, ³長崎大学医学部第2内科

THE CLINICAL EVALUATION OF MTD FALSE-POSITIVE & FALSE-NEGATIVE RESULTS

^{1,2*}Junko MIYAMOTO, ¹Atsuro HASHIMOTO, ¹Ryusuke MIZUKANE, ¹Toyohiro SASAKI,
¹Takakazu KIYA, ¹Masao NAKATOMI, and ³Shigeru KOHNO

¹Department of Medicine, Nagasaki National Hospital, ^{2*}Department of Medicine, Mitsugi Public General Hospital,
³Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine

The usefulness of MTD (Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test) for a rapid diagnosis of tuberculosis was evaluated. A total of 400 clinical samples obtained from July, 1995 to June, 1997 were tested by MTD, direct microscopy and culture. The results of MTD and smear/culture were coincident in 387 out of 400 samples. Eight samples (2%) were MTD false-positive (i. e. they were MTD positive but smear and culture negative), and 5 (1.25%) were MTD false-negative (i. e. MTD negative but smear and/or culture positive). Despite a careful review of the clinical data of those patients whose samples showed discrepant results, the reasons of discrepancy were not clear in 2 (0.5%) of the 8 false positives and 3 (0.75%) of the 5 false negatives. In the other cases, the MTD false positives may be accounted for the presence of previous *M. tuberculosis* infection, the influence of anti-tuberculous medication and so on, and the MTD false negatives are most likely due to the presence of inhibitors (blood, for example) or to the small number of organisms in the specimens. It can be concluded that adequate samples should be obtained, and that MTD should be repeated in case of discrepant results.

Key words : MTD, Clinical specimens, False positive, False negative

キーワード : MTD, 臨床検体, 偽陽性, 偽陰性

はじめに

近年, 核酸増幅法による抗酸菌の迅速な検索が盛んに

行われるようになり, 一般の検査室においてもキットによる簡便な検査法が普及している。当院では1995年より Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tubercu-

*〒722-0393 広島県御調郡御調町大字市124

* 124 Ichi, Mitsugi-cho, Mitsugi-gun, Hiroshima 722-0393 Japan.

(Received 8 Feb. 1999/ Accepted 26 May 1999)

losis Direct Test (以下 MTD) を導入しているが、MTD の検査結果に関しては、明らかに臨床所見と矛盾した結果が得られる場合も少なくない。今回私たちは、従来から行われている塗抹・培養法と MTD の結果を比較することにより、MTD 偽陽性または偽陰性と判定された症例についての臨床的な検討を行い、その原因についての究明を試みたので報告する。

対象と方法

当院に MTD が導入された 1995 年 7 月から 97 年 6 月までに、MTD 検査に提出された喀痰 329 検体、胸水 25 検体、採痰あるいは BALF 21 検体、胃液 11 検体、尿 6 検体、ドレーンガーゼ付着の膿 3 検体、腹水 2 検体、肺吸引物 1 検体、髄液 1 検体、および関節液 1 検体の計 400 検体を対象とした。これらの検体に関して、同時に行われた抗酸菌の塗抹・培養検査 (2% 小川変法培地を使用) の結果と MTD の成績を照合した。その結果から、MTD と塗抹・培養検査の陽性あるいは陰性の結果が一致しなかった検体に関して、個々の症例の臨床像や画像所見を詳細に検討した。本論文では、培養結果を基準として MTD と培養結果が一致しなかった場合を「MTD 偽陽性」あるいは「MTD 偽陰性」と定義することとした。

なお、分離された菌の同定は DDH マイコバクテリア (極東製薬株式会社) で行った。DDH 法は、被検菌の全 DNA を用い、放射性物質を用いずに DNA を標識し、マイクロプレート内に固定された標準株 DNA との間で定量的に DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行うことにより菌種を同定する方法である¹⁾。

結 果

検体別の塗抹検査の結果と MTD の成績を表 1 に示した。塗抹検査と MTD の不一致例に注目すると、喀痰では MTD (+) 塗抹 (-) が 15 検体、MTD (-) 塗抹 (+) が 15 検体、胸水では MTD (+) 塗抹 (-) が 3 検体、採痰あるいは BALF では MTD (-) 塗抹 (+) が 1 検体、胃液と尿では MTD (+) 塗抹 (-) が各 1 検体ずつであった。なお、後に菌が分離された検体では、すべて MTD の結果と矛盾しなかった。

表 2 には、MTD (+) 塗抹 (-) の検体が得られた症例の内訳を示した。No.1 から No.15 はすべて喀痰で、このうち No.1 から No.10 の検体は後に培養で結核菌が確認されたため、これらは MTD の感度の良さが早期診断に有用であった症例である。一方、No.11 から No.15 は培養陰性で、MTD の偽陽性が疑われた検体であった。No.16 から No.18 は胸水の検体で、3 検体のうち No.16 と No.17 の 2 検体は後に結核菌が培養され、やはり胸水における MTD の有用性が示された。No.19 と No.20 は、それぞれ胃液および尿の検体で、いずれも培養陰性であった。

表 3 には、MTD (-) 塗抹 (+) の検体の内訳を示した。No.21 から No.35 はすべて喀痰で、このうち No.21 から No.31 では後に培養された菌が各種の非定型抗酸菌であることが確認された。一方、No.32 から No.35 では結核菌が分離培養されたにもかかわらず、MTD は陰性で、MTD 偽陰性検体と考えられた。喀痰以外での MTD (-) 塗抹 (+) の検体は No.36 の BALF 1 検体だけであったが、後に結核菌が分離培養され、これも

表 1 検体別の塗抹検査と MTD の成績

	検体数	MTD (+)		MTD (-)	
		塗抹 (+)	塗抹 (-)	塗抹 (+)	塗抹 (-)
喀痰	329	55	15	15	244
胸水	25	0	3	0	22
採痰・BALF	21	2	0	1	18
胃液	11	2	1	0	8
尿	6	2	1	0	3
ガーゼ・膿	3	3	0	0	0
腹水	2	0	0	0	2
肺吸引物	1	0	0	0	1
髄液	1	0	0	0	1
関節液	1	0	0	0	1
計	400	64	20	16	300

表2 MTD (+)・塗抹 (-) の検体

No.	年齢	性	検体	培養	同定	臨床診断
1	■	64	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 肺結核
2	■	24	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
3	■	66	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
4	■	83	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
5	■	65	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
6	■	52	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
7	■	77	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
8	■	〃	〃	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
9	■	69	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
10	■	57	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
11	■	54	M	喀痰	-	粟粒結核*
12	■	65	F	喀痰	-	細菌性肺炎**, 陳旧性肺結核
13	■	70	M	喀痰	-	陳旧性肺結核
14	■	70	F	喀痰	-	筋萎縮性側索硬化症
15	■	〃	〃	喀痰	-	〃
16	■	26	M	胸水	+	<i>M. tuberculosis</i> 結核性胸膜炎
17	■	78	M	胸水	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
18	■	68	F	胸水	-	癌性胸膜炎, 陳旧性肺結核
19	■	69	M	胃液	-	結核性胸膜炎
20	■	26	M	尿	-	肺結核, 結核性胸膜炎

* 治療開始後採痰, ** 肺炎の治療で改善

表3 MTD (-)・塗抹 (+) の検体

No.	年齢	性	検体	培養	同定	臨床診断
21	■	69	M	喀痰	+	<i>M. intracellulare</i> 肺非定型抗酸菌症の疑い
22	■	89	F	喀痰	+	<i>M. intracellulare</i> 〃
23	■	〃	〃	喀痰	+	<i>M. intracellulare</i> 〃
24	■	79	M	喀痰	+	<i>M. intracellulare</i> 〃
25	■	〃	〃	喀痰	+	<i>M. intracellulare</i> 〃
26	■	52	M	喀痰	+	<i>M. intracellulare</i> 〃
27	■	71	F	喀痰	+	<i>M. intracellulare</i> 〃
28	■	86	F	喀痰	+	<i>M. avium</i> 〃
29	■	66	M	喀痰	+	<i>M. kansasii</i> 〃
30	■	74	M	喀痰	+	<i>M. kansasii</i> 〃
31	■	67	M	喀痰	+	<i>M. fortuitum</i> 〃
32	■	84	F	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 粟粒結核
33	■	92	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 肺結核
34	■	52	M	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
35	■	69	F	喀痰	+	<i>M. tuberculosis</i> 〃
36	■	67	F	BALF	+	<i>M. tuberculosis</i> 肺癌, 陳旧性肺結核

表4 MTDと塗抹・培養法との比較

		従来法による結核菌検査	
		+	-
MTD	+	76 (67)	8 (5)
	-	5 (5)	311 (273)
感度		93.8%	(93.1%)
特異度		97.5%	(98.2%)
()内は呼吸器由来の検体			

MTD偽陰性検体と考えられた。

以上より、塗抹・培養・同定の結果とMTDの成績とを総合的に比較すると、表4のように、全400検体中、MTD偽陽性は8検体、MTD偽陰性は5検体であった。

次に、これらの不一致症例について個々の臨床的検討を行った。まず喀痰でのMTD偽陽性例を検討した。No.11は粟粒結核で、確定診断後に治療が開始されて他県の病院から転院してきた症例であった。No.12は細菌性肺炎であったが、陳旧性肺結核を合併していた。No.13は1年以上増悪のみられない不活動性肺結核の症例で、治療は行われていなかった。これらの2症例(No.12とNo.13)はいずれもMTDによる結核菌検出の可能性が完全には否定できない症例であった。No.14とNo.15は同一症例からの検体であるが、肺野に結核性の病変はなかった。ちなみに数カ月後の再検ではMTD陰性であった。喀痰以外でのMTD偽陽性例では、胸水、胃液および尿がそれぞれ1検体ずつであった。No.18は癌性胸膜炎の確定診断が得られたが、陳旧性の結核病変も認められた。No.19は胸水から結核菌が分離培養されており、治療開始後に他院から紹介された症例であった。No.20は喀痰と胸水から結核菌が分離培養され、肺結核および結核性胸膜炎の確定診断がついた症例であった。すなわち、No.11~No.15およびNo.18~No.20の8検体のうちNo.14とNo.15の2検体以外は、治療の影響および結核病変の存在によりMTD偽陽性の理由を説明できると考えられた。

次に喀痰でのMTD偽陰性例を検討した。No.32は粟粒結核で、結核菌が培養で分離されており、少量の喀血と膿性痰が続いている症例であった。No.33はMTD陰性と判定されたものの、RLU値はカットオフ値の3万をわずかに下回る21617であった。No.34とNo.35はいずれも喀痰量が少ない症例で、分離培養されたコロニー数も少なく、それぞれ3コロニーと2コロニーであった。これらのMTD偽陰性症例に関しては、特別な薬剤の使用や同時に検出された菌種などの共通点は認められな

かった。一方、喀痰以外でのMTD偽陰性はBALF1検体だけであった。No.36は塊状影の精査のために気管支鏡検査を行い、肺癌の診断とともに結核菌も分離培養されたが、ブラッシング時に出血した後にBALを行ってMTDを施行した症例であった。すなわち、No.32~No.36の5検体のうちNo.32とNo.36の2検体は、阻害物質である血液の影響によりMTD偽陰性の理由を説明できると考えられた。

以上より、臨床所見を加味して判定すると、原因不明のMTD偽陽性は2検体(0.5%)、原因不明のMTD偽陰性は3検体(0.75%)で、合計すると不一致検体は5検体(1.25%)であった。

考 察

従来からの塗抹・培養法と比較したMTDの感度および特異度が、国内外のさまざまな施設から報告されている。呼吸器由来の臨床検体についてみると、およそ、感度86.4~98.4%、特異度92.9~100%^{2)~10)}であり、優れた有用性が認められている。しかし、呼吸器由来以外の検体、例えば髄液や胸水についてみると、特異度は高いものの感度は低く、髄液での感度は33%であった³⁾とされている。今回の検討では、全検体についてみると感度および特異度は、それぞれ93.8%、97.5%で、呼吸器由来の検体(喀痰、採痰およびBALF)では、それぞれ93.1%、98.2%と、従来の報告と同様の成績であった。

MTDは、臨床検体から、直接結核菌群のリボゾームRNAを増幅し、その増幅産物をDNAプローブにより検出するキットである¹¹⁾。結果はRelative Light Unit (RLU)で示され、3万RLUをカットオフ値とし、カットオフ値以上を陽性、以下を陰性としている。操作は一本の試験管内で進行し、各種のコンタミネーション対策が講じられている。しかし、PCRなどの他の遺伝子診断法と同様に、MTDにおいても偽陽性検体の存在は解決すべき重要な課題である¹²⁾。

今回の検討では、喀痰における偽陽性5検体のうち、1検体は抗結核剤投与を開始した後に採取され、2検体は陳旧性の病変から採取された可能性が考えられた。これら3検体では塗抹・培養法とMTDの感度の差があらわれたものと推測される。残りの2検体は、同一症例から採取されたもので、この2検体の採取時期は2週間以上離れており、さらに数カ月後に再検したときはMTD陰性で、結果的に偽陽性の原因は不明であった。喀痰以外の偽陽性3検体についても治療の影響、陳旧性病変の存在および感度の差などの可能性が強く示唆された。

陳旧性病変が存在する場合、MTDが陽性となること

はよく知られている。以前から、陳旧性の病巣の中で結核菌は代謝の極めて低い状態で生き続けることができる、すなわち生菌が存在すると考えられており、「内因性の再燃」ということばも一般的に使用されている。したがって、陳旧性病変で活動性はないがMTD陽性という結果が得られても矛盾はないと考えられる。

偽陽性の原因として最も避けなければならないのはコンタミネーションである。操作の前に1時間以上のキャビネット内UV照射、操作前後にキャビネット内を10% chloride bleachで清拭、手袋とガウンの着用などの予防措置が有効とされている⁴⁾。また、呼吸器由来の検体に限ると、Della-Lattaらの741検体を対象とした検討では、塗抹陽性・培養陽性検体の90%以上がRLU 100万以上、塗抹陰性・培養陽性検体の83%以上がRLU 100万以上であり、偽陽性5検体はすべてRLU 100万以下であったとしている²⁾。また、Gen-Probe社は、RLU 3万以上50万未満の検体は再検することを推奨しており²⁾、Pfyfferらも、1117検体を対象とした検討でRLU 3万~20万の検体を再検することにより、偽陽性の70%を防ぐことができたと報告している⁷⁾。

今回の私たちの検討はretrospectiveなもので、当院ではMTDの結果はごく一部をのぞいて陽性か陰性かの記録しか残っておらず、RLUの値についての検討ができなかったのが残念であるが、今後はさらに慎重に検討する必要がある。

一方、MTDの偽陰性について検討したFairfaxおよびPfyfferらの報告では、原因として阻害物質の存在、少ない菌数、菌の濃度の偏り、あるいはRNAのviabilityの低さなどが挙げられている⁴⁾⁷⁾。特に阻害物質としてはヘモグロビンがよく知られており、血液が反応液中に5.0%以上の高濃度に存在すると、偽陰性になる可能性が報告されている¹³⁾。今回の検討での偽陰性5検体はすべて呼吸器由来(喀痰4, BALF1)で、2検体は血液混入、2検体は不適切な検体の使用あるいは菌数の不足が偽陰性の理由と考えられ、残りの1検体のRLUはカットオフ値をわずかに下回る値であった。

偽陰性が疑われた場合、検体を採取し直して複数回の検査を行ったり、検体量と試薬を2倍に増量する方法も試みられている⁴⁾。また、血液以外の阻害物質による偽陰性が疑われた場合は、その検体に既知の陽性検体を少量添加してMTDを行い、陰性であれば阻害物質の存在を確かめることもできる⁴⁾。一方、気管支鏡検査を行ったときに混入することが予測される局所麻酔薬と抗凝固薬については、通常用いられる量ではMTDの測定結果にほとんど影響しないことが確かめられている¹⁴⁾。

Langらは髄液に関して、RLUのカットオフ値を3万と設定すると、培養陽性または診断基準を満たした患

者では特異度は100%であるが、感度が33%であったとし、カットオフ値を1.1万に下げると、特異度は100%、感度も83%に上がったとしている。3万というカットオフ値はもともと呼吸器由来の検体を対象に設定されたものであり、菌が検出されにくい髄液や胸水など、検体によってはカットオフ値を見直す検討も必要であろう³⁾。

治療の影響により、従来法とMTDの結果が一致しない場合も少なくない。アメリカのFDAでは、MTDによる結核の診断には、1週間以上、抗結核薬の投与を受けていない症例の検体、あるいは最近12カ月以内に抗結核薬の投与を受けていないものが適切としている¹⁵⁾。また、従来法とMTDを経時的に行ったいくつかの検討では、MTDは従来法とほぼ同時あるいはやや遅れて陰性化するため、培養法より数週間結果が早くわかるという利点も報告されている⁹⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし、治療経過をみるために遺伝子診断を用いることは今後の慎重な検討が必要であろう。

今回の検討では原因不明の不一致例は1.25%であったが、前述したような検討を新たに試みれば、さらに不一致例を減少させることも可能であろう。遺伝子診断が広く普及し、迅速な診断に役立っているが、あくまでも従来法や臨床所見を加味した総合的診断が重要で、MTD陽性のみを根拠として安易な抗結核療法を開始すべきではない。

なお、本論文の要旨は第73回日本結核病学会(1998年4月、新潟)にて発表した。

文 献

- 1) 山崎利雄, 高橋 宏, 中村玲子: マイクロプレートハイブリダイゼーション法による抗酸菌同定法の検討. 結核. 1993; 68: 5-11.
- 2) Della-Latta P, Whittier S: Comprehensive evaluation performance, laboratory application, and clinical usefulness of two direct amplification technologies for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Am J Clin Pathol. 1998; 110: 301-310.
- 3) Lang AM, Feris-Iglesias J, Pena C, et al.: Clinical evaluation of the Gen-Probe Amplified Direct Test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1998; 36: 2191-2194.
- 4) Fairfax MR: Evaluation of the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct detection test. Am J Clin Pathol. 1996; 106: 594-599.

- 5) Notices to Readers: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1996; 45: 950-952.
- 6) Bradley SP, Reed SL, Catanzaro A: Clinical efficacy of the amplification *Mycobacterium tuberculosis* direct test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 1996; 153: 1606-1610.
- 7) Pfyffer GE, Kissling P, Jahn EM, et al.: Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. J Clin Microbiol. 1996; 34: 834-841.
- 8) Vladspolder F, Singer P, Roggeveen C: Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2699-2703.
- 9) 古賀宏延: 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: 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. 結核. 1996; 71: 687-692.
- 10) 大角光彦, 豊田丈夫, 川城丈夫, 他: 核酸 (ribosomal RNA) 増幅を利用した結核菌検出法の臨床的有用性に関する検討. 結核. 1996; 71: 573-585.
- 11) 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.
- 12) 阿部千代治, 森 亨, 藤井英治, 他: 結核菌検出のための MTD の評価に関する共同研究. 結核. 1995; 70: 467-472.
- 13) 山崎利雄: 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: 2. 新しい抗酸菌検査法の手技上の問題点. 結核. 1996; 71: 684-687.
- 14) 豊田丈夫, 大角光彦, 青柳昭雄, 他: 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. 結核. 1996; 71: 495-503.
- 15) American Thoracic Society Workshop: Rapid diagnostic tests for tuberculosis: What is the appropriate use? Am J Respir Crit Care Med. 1997; 155: 1804-1814.
- 16) Moore DF, Curry JI, Knott CA, et al.: Amplification of rRNA for assessment of treatment response of pulmonary tuberculosis patients during antimicrobial therapy. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1745-1749.
- 17) 豊田丈夫, 青柳昭雄, 大角光彦, 他: Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD) による肺結核患者の経時的観察. 感染症誌. 1995; 69: 303-307.