

第77回総会シンポジウム

新しい結核診断技術とその臨床応用

座長 ¹阿部千代治 ²高嶋 哲也

キーワード：新しい診断技術，アンケート調査，精度管理，MGIT，キャピリアTB，核酸増幅法検査

はじめに

近年，結核菌検査は技術革新によって，遺伝子学的手法を応用した結核菌の迅速検出・同定法（DNA・DNAハイブリダイゼーション法，DNAプローブ法，核酸増幅法検査等），液体培地を用いた迅速培養法ならびに迅速感受性試験法（MGIT等），免疫学的手法による結核菌群の同定法など，新しい結核診断技術が次々と開発され，これらの一部は既に日常の検査に取り入れられている。そして，新しい結核診断技術の迅速性と正確さは，「診断の遅れ」を改善し感染の拡大を防ぐことによって，結核対策に大きく寄与するものと期待される。しかし，新しい検査を一般検査室に導入したときは研究報告と同様の成績を得ることは難しく，またその使用具合についても問題が指摘されることが多い。そこで，本シンポジウムは新しい結核診断技術の検査室への導入状況や検査側の取り組みについて調査するとともに，新しい結核診断技術の臨床的有用性と問題点について検討を行った。

1. 検査室で用いている検査法について，アンケート調査

倉島篤行（国立療養所東京病院）

近年，抗酸菌検査は著しい技術革新の中にあり，1993年，米国CDCは抗酸菌検査の新たな勧告を発表した。1996年，第71回結核病学会総会シンポジウムで，全国の病院，検査センターを含めた網羅的な抗酸菌検査アンケート調査結果が報告されたが，当時のわが国の現状は，米国CDC勧告にはとうてい達し得ないレベルであった。6年後，今回はこの米国CDC勧告と20年ぶりに改訂さ

れたわが国の「新結核菌検査指針2000」に示される目標をどれだけ達成したかを前回と同規模の調査により検討した。アンケート発送対象は，すべての大学付属病院および20床以上の結核病床を有する病院および日本衛生検査所協会所属検査センターとし，病院は260施設に送付，172施設から回答（66.2%），抗酸菌検査実施施設は170施設，検査センター312施設に送付，109施設から回答（34.9%），抗酸菌検査実施施設は59施設であった。月当たり約12万3500検体の抗酸菌検査が行われ，そのうち64.8%が検査センターで行われた。塗抹検査では集菌法，国際標準表示法の普及はまだ少ないが，病院群では24時間以内報告がほぼ達成された。また病院群では44%に喀痰品質管理が行われるようになった。培養では，特に病院群で42%に液体培地が導入され，培養結果の14日以内報告に近づいている。感受性検査については，病院，検査センター双方とも45%が新濃度設定に対応していた。検査室バイオハザード対策は特に病院群で81%に安全キャビネットが装備され充実してきた。1995年当時より各面において大幅な充実，進歩が見られたが，CDC勧告達成には更なる努力が必要である。

2. 菌検査における精度管理のキーポイント—排痰指導から前処理集菌操作まで

樋口武史（結核予防会大阪府支部大阪病院）

近年の抗酸菌検査技術の開発には目覚ましいものがあり，迅速で精度の高い報告を臨床に提供することが可能となった。しかし，菌検査に用いる検査材料の多くは喀痰であり，これは血液などと違い不均質であるため，確実に患者の病態を反映した材料がサンプリングされてい

¹結核予防会結核研究所，²大阪府立羽曳野病院連絡先：高嶋哲也，大阪府立羽曳野病院，〒583-8588 大阪府羽曳野市はびきの3-7-1（E-mail: tetsuya@hbkc.pref.osaka.jp）
（Received 9 Sep. 2002）

なければ精度の高い検査を行うことは難しい。当院では、精度の高い検査を行うために、まず患者に喀痰を出す意義を十分理解させた上で、患者に排痰運動を指導し、自分で排痰できるように努力させている。この結果、良質の喀痰が得られ、それを用いることで菌検査の精度が保持できるようになった。また、患者自身で排痰できるようになれば呼吸が楽になりQOLが向上し、その結果、自発的に排痰運動を継続することになる。このように、排痰指導は患者自身と検査側の両面で大きな効果をもたらした。良質の材料がサンプリングできれば、次はいかに効率よく前処理・集菌できるかということになる。標準法としては、N-アセチルL-システイン水酸化ナトリウム法を用いるが、煩雑で処理時間が長く迅速な対応が難しいこともあり、外来至急塗抹検査などには不適切である。集菌剤（セントラップMB：日水製薬、抗酸菌前処理剤：日本BCGサプライ）を用いると、大幅に処理時間の短縮が可能で、外来至急時でも集菌塗抹の結果を報告することができるため、塗抹検査の精度向上に有用である。

3. 液体培地の臨床的有用性と問題点

川辺芳子（国立療養所東京病院）

液体培地は迅速性と感度に優れている。塗抹陰性例や非結核性抗酸菌（NTM）でその傾向が著しい。当院での検出までの平均日数は結核菌は小川法19.2日/MGIT 13.5日、NTMでは小川法19.3日/MGIT 9.3日で、感度は塗抹陰性結核では小川法74%/MGIT 91%、塗抹陰性NTMは小川法54%/MGIT 80%であった。感度が優れているが故に、治療2カ月目の培養陰性化率は小川法76%に対しMGITでは48%とMGITでは遅くなっていた。液体培地を使用している国立療養所41施設の調査では治療開始前3回の抗酸菌検査について併用が33施設、液体培地のみが8施設であった。治療開始後は、液体培地と固形培地を併用するところが18施設、原則として固形培地のみが12施設、原則として液体培地が8施設であった。液体培地の前処理法は各施設で工夫されているのが実情である。国立療養所11施設で自施設の方法と、2% NaOHで処理後NALC-NaOHで処理する共通の方法で比較した。計1,137検体で、自施設法での雑菌汚染率は0~13%、共通の方法では0~10%で各施設では2つの方法は同程度の成績であり前処理法の1つとして推奨できる。

4. 抗MPB64モノクローナル抗体を用いた抗酸菌鑑別同定キット“キャピリアTB”の臨床的有用性と問題点

長谷川直樹（慶應義塾大学医学部）

結核菌群の増殖に伴い分泌する結核菌群特異タンパクMPB64を免疫クロマトグラフィー法にて検出する迅速同定法（キャピリアTB™）のMycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT: BACTEC MGIT960)法における有用性と問題点を、AccuProbe法およびDDH法を対照として比較した。結核菌群と非結核性抗酸菌群との混合感染例を除き、BACTEC MGIT960にて陽性シグナル検出と同時にキャピリアTBにて結核菌群を検出可能であった。本検討ではキャピリアTBの感度、特異度も100%で、コロニーを目視できない液体培地の弱点を補い、かつその長所である迅速性を活かす点で有用である。抗結核治療中にいったん培養陰性化後、陽性化した場合、外来検体の迅速同定に臨床的な有用性を発揮する。特別な機器を要せず、雑菌汚染除外後、安全キャビネットの中で培養シグナル陽性菌液を100 mL摘下にて約15分で結果が判明するため安全確保と労力削減が両立する。非結核性抗酸菌を検出できないため、結核菌群と非結核性抗酸菌との混合感染に留意する。抗MPB64抗体の抗原認識部位の変異による擬陰性、コストを考慮した抗酸菌検査における本キットの位置付けは今後の検討課題である。

5. BACTEC MGIT960による迅速薬剤感受性試験の検討

青野昭男（結核予防会複十字病院）

BACTEC MGIT960 (aMGIT)を用いた主要4剤およびPZAの薬剤感受性試験の有用性について検討した。主要4剤については、臨床分離株121株を用いてL-J、小川、7H10、aMGITおよび手法MGIT (mMGIT)について実施した。わが国で用いている小川との一致率は4薬剤すべて95.9%以上であり良好な成績であった。また他の方法との一致率も高い値を示していた。薬剤感受性試験に要する時間は7H10で14~21日、小川とL-Jで21~28日であったのに対しaMGITでは5~12日で平均7日と迅速に結果を得ることができた。

PZAについては、臨床分離株100株を用いてPZase、aMGITおよび極東PZAについて実施した。3方法間での一致率は97.0%と高い値を示していた。また薬剤感受性試験に要する時間は約7日であった。

aMGIT薬剤感受性試験は実施前に薬剤添加等の培地の調整が必要であるが、分離培養で陽性を示した時点で培養液から直接に主要4薬剤およびPZAの薬剤感受性試験を実施可能であり、薬剤耐性菌の迅速診断に有用であると考えられる。また、aMGITは耐性および感受性の判定を自動機器により行うことで常に一定の精度で判定することが可能であり、さらには連続モニタリングにより土曜日、日曜日などの休日も継続して観察できる利点を

持っている。

6. 迅速診断法の有用性

高嶋哲也 (大阪府立羽曳野病院)

新しい結核診断技術の1つである核酸増幅法は1994年に保険適応となってから既に7年以上が経過し、一般的な検査として幅広く利用されている。「結核の統計」での肺結核活動性分類の菌所見は1998年から変更され、核酸増幅法陽性例も結核菌陽性として登録されるようになり、「その他の結核菌陽性」の登録例が大幅に増加した。また、核酸増幅法検査の出荷件数の増加にともなって「診断の遅れ」も年々改善するなど、この新しい検査の普及はわが国の結核の動向に大きく影響していた。さらに、2000年に当院を受診した肺結核患者532例の診断根拠の実地調査では、うち79例(14.8%)が核酸増幅法陽性であった。また、この検査を利用した群では「診断の遅れ(医療機関受診1カ月目の未診断率)」が有意に改善し、特に診断困難な非空洞例ならびに塗抹陰性例で顕著であり、その結果として新たな感染者ならびに発病者の減少が見込まれた。核酸増幅法に代表される新しい検査は「患者発見率」の向上ならびに「診断の遅れ」の改善に有用であり、その導入は結核対策に大きく寄与するものと期待される。

ま と め

今回のシンポジウムでは、MGIT 液体培地を用いた迅速培養法ならびに迅速薬剤感受性試験法や、抗MPB64モノクローナル抗体を用いた菌種同定法の臨床成績がそれぞれのシンポジストから報告された。その結果わが国においても「米国CDC勧告」に沿った2週間以内の結核菌分離・同定ならびに1カ月以内の薬剤感受性試験報告が可能であることが示された。アンケート調査からは検査室のバイオハザード対策に不可欠な安全キャビネットの導入も進み、新しい結核診断技術の受け入れ体制が整いつつあることが報告された。また、結核菌検査の精度管理に対する取り組みが行われるなど、「新結核菌検査指針、2000」に沿ってわが国の結核菌検査は革新しつつあることが判明した。そして、代表的な迅速診断法である核酸増幅法検査は、「患者発見率」の向上ならびに「診断の遅れ」の改善につながるなど、結核対策の面でも有用であることが示された。

今、わが国では結核を取り巻く状況の変化に呼応して結核対策の包括的見直しが行われ、「結核の予防・早期発見」や「医療の提供」などに関して具体的な提案が検討されている。結核診断技術は結核対策の根幹である早期発見に関わる手法であり、適正医療普及の観点からも菌検査はきわめて重要である。新しい結核診断技術の導入によって菌検査の近代化を推し進め、活動性結核の早期発見に取り組むことはこれからの結核対策には必須である。

The 77th Annual Meeting Symposium

NEW DIAGNOSTIC METHODS FOR TUBERCULOSIS AND THEIR CLINICAL UTILITIES

Chairpersons: ¹Chiyoji ABE and ²Tetsuya TAKASHIMA

Topics of symposium and Presenters:

1. Result of questionnaire survey on the laboratory diagnostic methods for tuberculosis: Atsuyuki KURASHIMA (National Tokyo Hospital)
2. Key point of quality control of the diagnostic methods for tuberculosis: Takeshi HIGUCHI (Osaka Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association)
3. Usefulness and problems of liquid medium and solid medium in mycobacterium culture: Yoshiko KAWABE (National Tokyo Hospital)
4. Usefulness and problems of Mycobacteria identification kit using anti-MPB64 monoclonal antibodies, "Capilia TB": Naoki HASEGAWA (Keio University School of Medicine)
5. Rapid drug susceptibility testing using BCTEC MGIT 960: Akio AONO (Fukujiji Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association)
6. Clinical utility of nucleic acid amplification assay: Tetsuya TAKASHIMA (Osaka Prefectural Habikino Hospital)

Abstract The clinical utilities of new diagnostic methods for *Mycobacterium tuberculosis*, such as primary isolation and drug susceptibility testing using MGIT, identification using anti-MPB64 monoclonal antibodies and nucleic acid amplification assay, were studied. It was shown that these

new diagnostic methods were more rapid and more accurate than currently available approaches and useful for the early and aggressive case findings. Questionnaire survey indicated that most of the laboratories had been ready to introduce these new diagnostic methods. Thus, the diagnosis for active tuberculosis along the "CDC recommendation in 1993" has become realizable in Japan.

Now, Japanese TB control program is under revision due to the current stagnation of the decline in notification rates. The importance of rapid and accurate diagnosis of active tuberculosis should be declared in the new Japanese TB control program by indicating the guideline of rapid diagnostic methods for *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words: New diagnostic methods, Questionnaire survey, Quality control, MGIT, Capilia TB, Nucleic acid amplification assay

¹Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, ²Osaka Prefectural Habikino Hospital

Correspondence to: Tetsuya Takashima, Osaka Prefectural Habikino Hospital, 3-7-1, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583-8588 Japan. (E-mail: tetsuya@hbk.pref.osaka.jp)