

# アンプリコア®マイコバクテリウムコントロール サーベイ (2000年)

—331施設の集計結果報告—

<sup>1</sup>日暮 芳己    <sup>2</sup>三宅 一義    <sup>1\*</sup>奥住 捷子    <sup>3\*</sup>長沢 光章  
<sup>4\*</sup>渡辺 正治    <sup>5\*\*</sup>立花 勇一

**要旨：**アンプリコア®マイコバクテリウムキットは現在日本で最も多く使用されている PCR 法を用いた測定キットである。私たちは、本キットのユーザー331施設を対象に、日常検査における測定値の信頼性について、模擬検体を配布し調査を行った。

模擬検体はNALC-NaOH処理をした喀痰に、菌数の明らかな *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium intracellulare* の菌液を加えたものを試料として配布、測定を依頼した。

陰性試料を陽性と報告した偽陽性は331施設中6施設(1.8%)であった。陽性試料を陰性と報告した偽陰性は7施設(2.1%)あり、試料ごとの内訳はTB-Hで331施設中1施設、TB-Lで331施設中5施設、MINでは316施設中1施設であった。また、COBAS法とMWP法において正解率に差は見られなかった( $\chi^2$ 検定:P>0.05)。また、不正解の報告をした施設と陽性コントロールが低値であった22施設に対して、検査環境と操作面についてアンケート調査を実施した。その結果、PCRを行う際、基本的操作が守られていないケースが指摘され、これが不正解に結びついた可能性が示唆された。

アンプリコア®マイコバクテリウムキットは抗酸菌の迅速診断キットとして日常検査に十分な精度を有していると考えられた。

**キーワード：**アンプリコア、マイコバクテリウム、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション、盲検共同研究

## はじめに

結核菌感染症は Re-emerging infectious diseases の1つとして、近年注目される疾患の1つである。結核菌は空気感染により感染が拡大するため、感染拡大の防止には迅速な検出が要求される。

結核菌群の遺伝子をターゲットとした核酸増幅法を用いた検出法が臨床検査に導入・実用化され、特に、抗酸菌塗抹検査陽性時には、結核菌であるか否かを迅速に判断することが臨床および感染制御学的にも重要である。しかし、現在の核酸増幅による結核菌検出法には偽陽性、偽陰性の事例が皆無ではない<sup>1)</sup>。本研究会はアンプリコ

ア®マイコバクテリウムキット(以下、本キット;ロッシュ・ダイアグノスティック(株):東京)を日常検査に導入している病院内検査室および検査センターにおいて、精度の高い検査結果を臨床医に報告しているか否かを調査するために同一模擬検体を配布し、測定依頼を行った。また、その測定結果を解析し、日常検査技術の実態を把握し、本キット操作上の注意点などの業務改善を図ることを目的とした。

## 方 法

### (1) 実施内容

全国331施設の参加、協力があつた。測定法はPCR

<sup>1</sup>東京大学医学部附属病院検査部, <sup>2</sup>ロッシュダイアグノスティック(株)PCR製品学術課, <sup>3</sup>防衛医科大学校病院検査部, <sup>4</sup>千葉大学医学部附属病院検査部, <sup>5</sup>順天堂大学医学部附属順天堂医院臨床検査部, \*PCR感染症検査研究会, \*\*PCR感染症検査研究会代表世話人

連絡先:日暮芳己,東京大学医学部附属病院検査部,〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1 (E-mail: HIGURASHI-LAB@h.u-tokyo.ac.jp)

(Received 15 Nov. 2001/Accepted 4 Apr. 2002)

を用いた核酸増幅とマイクロプレートでの検出反応を用手法で行う Micro Well Plate 法 (MWP 法: 吸光度測定 450 nm) 90施設, 核酸増幅から検出までを全自動測定装置 COBAS Amplicor で行う COBAS 法 (吸光度測定 660 nm) 241施設であった。

配布検体は NALC-NaOH 処理済検体を 4 本 (陰性検体, 高濃度結核菌群陽性検体, 低濃度結核菌群陽性検体および *Mycobacterium intracellulare* 陽性検体) を各 150  $\mu$ l 分注し (測定 1 回分), 2000 年 9 月 6 日~14 日に冷凍配布した。同年 9 月 25 日を締め切り日として各検体の吸光度や判定結果, 測定時の陽性・陰性コントロールの吸光度などを解答項目として回収した。

## (2) 検体の作成方法

### ①陰性検体

本キットにて, 結核菌群, *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* の陰性および内部コントロールの陽性を確認した NALC-NaOH 処理済の喀痰を用いた。

### ②陽性検体

陰性検体 100  $\mu$ l に, 結核菌群として *Mycobacterium bovis*, 非結核菌群として *M. intracellulare* 菌液を 50  $\mu$ l 加え, 陽性検体とした。なお, それぞれの添加菌液の生菌数は, 高濃度結核菌群陽性検体 (TB-H)  $2 \times 10^3$  cfu/ml, 低濃度結核菌群陽性検体 (TB-L)  $2 \times 10$  cfu/ml, *M. intracellulare* (MIN)  $2 \times 10^4$  cfu/ml であった。

### (3) フォローアップアンケート

コントロールサーベイの結果報告で, 偽陰性, 偽陽性および陽性コントロールで低吸光度を報告した 22 施設について検査環境, 操作面等の調査依頼を行い, 回答の

あった施設を対象に集計した。なお, 有意差検定は  $\chi^2$  検定 (Yates の修正による) を用い,  $p < 0.05$  を有意とした。

## 結 果

### (1) 作成模擬検体の確認 (Table 1)

作成した 4 種類の配布試料からランダムに各 20 本ずつ, 計 80 本を抽出し, リファレンスラボにて MWP 法および COBAS 法の 2 法で測定を行い, 吸光度の測定・確認を行った。

### (2) 模擬検体ごとの報告成績 (Table 2)

配布した模擬検体の全体の平均正解率は 99% (98.2~99.7%), また, 不正解率は 1.0% (0.3~1.8%) であった。不正解の内訳は, 陰性検体を結核菌群陽性と報告した偽陽性が 6 施設 (1.8%), 陽性検体を陰性と報告した偽陰性は, TB-L 検体で 5 施設 (1.5%), TB-H および MIN 検体で各々 1 施設 (0.3%) の計 7 施設であった。

### (3) 測定系列の成績 (Table 3)

MWP 法を用いた 90 施設のうち, 正解は 98.6% (97.8~98.9%), 不正解は 1.3% (5 施設) であった。不正解の内訳は, 陰性検体で 2 施設, TB-L, TB-H および MIN 検体でそれぞれ 1 施設であった。また, COBAS 法を用いた 241 施設のうち, 正解は 99.2% (98.3~100%), 不正解は 0.8% (8 施設) であった。その内訳は, 陰性検体で 4 施設, TB-L 検体で 4 施設であった。なお, MWP 法および COBAS 法の測定法による違いで解答に有意差はなかった。 ( $\chi^2$  検定:  $P > 0.05$ )

### (4) 偽陰性報告施設の解析 (Table 4-1, 4-2)

Table 1 Results for each samples determined at the reference laboratory

#### 【MWP method】

Sample	No. of sample	MTB		MIN	
		Optical Density value (450 nm)	Mean	Optical Density value (450 nm)	Mean
		Range		Range	
Negative	10	0.032-0.074	0.048	0.035-0.108	0.048
TB-L	10	2.365-3.441	3.229	0.044-0.077	0.058
TB-H	10	3.562-3.784	3.682	0.043-0.075	0.052
MIN	10	0.036-0.076	0.052	2.903-3.634	3.336

#### 【COBAS method】

Sample	No. of sample	MTB		MIN	
		Optical Density value (660 nm)	Mean	Optical Density value (660 nm)	Mean
		Range		Range	
Negative	10	0.001-0.01	0.006	0.005-0.013	0.011
TB-L	10	2.478-4.000	3.816	0.004-0.014	0.01
TB-H	10	4.000-4.000	4.000	0.009-0.015	0.011
MIN	10	0.004-0.011	0.007	4.000-4.000	4.000

MTB: *M. tuberculosis*, MIN: *M. intracellulare*

TB-L: Low concentration of *M. bovis* suspension is  $2 \times 10$  cfu/ml.

TB-H: High concentration of *M. bovis* suspension is  $2 \times 10^3$  cfu/ml.

MIN: *M. intracellulare* suspension is  $2 \times 10^4$  cfu/ml.

**Table 2** MTB and MIN test results for each samples

Result/Sample	Negative	TB-L	TB-H	MIN
MTB (-)* <sup>1</sup>	325/331	5/331	1/331	331/331
MTB (+)* <sup>1</sup>	6/331	326/331	330/331	0/331
MIN (-)* <sup>2</sup>	314/314	295/295	291/291	1/316
MIN (+)* <sup>2</sup>	0/314	0/295	0/291	315/316
Agreement (%)	98.2	98.5	99.7	99.7
Disagreement (%)	1.8	1.5	0.3	0.3

\*<sup>1</sup> 331 laboratories reported *M. tuberculosis* results

\*<sup>2</sup> 316 laboratories reported *M. intracellulare* results

MTB: *M. tuberculosis*, MIN: *M. intracellulare*

TB-L: Low concentration of *M. bovis* suspension is  $2 \times 10$  cfu/ml.

TB-H: High concentration of *M. bovis* suspension is  $2 \times 10^3$  cfu/ml.

MIN: *M. intracellulare* suspension is  $2 \times 10^4$  cfu/ml.

**Table 3** Results for each samples by assay method (MWP and COBAS)

Assay method (No. of laboratories)		Sample				
		Negative	TB-L	TB-H	MIN	
MWP* <sup>1</sup> (n=90)	Agreement	88	89	89	89	P > 0.05
	Disagreement	2	1	1	1	
	Agreement (%)	97.8	98.9	98.9	98.9	
COBAS* <sup>2</sup> (n=241)	Agreement	237	237	241	241	
	Disagreement	4	4	0	0	
	Agreement (%)	98.3	98.3	100	100	

\*<sup>1</sup> MWP: Micro well plate method

\*<sup>2</sup> COBAS: COBAS Amplicore method

MTB: *M. tuberculosis*, MIN: *M. intracellulare*

TB-L: Low concentration of *M. bovis* suspension is  $2 \times 10$  cfu/ml.

TB-H: High concentration of *M. bovis* suspension is  $2 \times 10^3$  cfu/ml.

MIN: *M. intracellulare* suspension is  $2 \times 10^4$  cfu/ml.

Statistical significance between MWP and COBAS disagreement group was determined by use chi-square test (the Yates correction). Value of p < 0.05 was considered significant.

**Table 4-1** Background data from 7 laboratories reported false-negative results

Laboratory	Method	Sample	Optical Density value (450 nm or 660 nm)		Add to Oligotex
			Sample	Positive control*	
FN-1	COBAS	TB-L	0.166	0.666*	×
FN-2	COBAS	TB-L	0.005	Over	No report
FN-3	COBAS	TB-L	0.154	No report	×
FN-4	COBAS	TB-L	0.063	1.293*	○
FN-5	MWP	TB-L	0.247	2.883	×
FN-6	MWP	TB-H	0.104**	2.785	×
FN-7	MWP	MIN	0.234**	1.075*	×

The wavelength for measurement of optical density value used 660 nm with COBAS method and 450 nm with MWP method.

\*Standard value is optical density value  $\geq 2.0$  measured by 450 nm or 660 nm. Originally, the result reported from FN-1, FN-4 and FN-7 are invalid.

\*\*Internal control value of result reported FN-6 and FN-7 was  $\leq 0.34$  measured by 450 nm.

Marked \* and \*\* laboratories predicted the result reported false-negative, if follows a standard procedure for re-examination and the opportunity of the re-examination.

TB-L: Low concentration of *M. bovis* suspension is  $2 \times 10$  cfu/ml.

TB-H: High concentration of *M. bovis* suspension is  $2 \times 10^3$  cfu/ml.

MIN: *M. intracellulare* suspension is  $2 \times 10^4$  cfu/ml.

TB-L, TB-H および MIN 検体を陰性と報告した7施設について報告成績の詳細を調査した。COBAS 法では4施設あり、いずれも TB-L 検体であった。このうち2施設 (FN-1, FN-4) は陽性コントロールの吸光度が基準値以下であった。MWP 法では3施設あり、TB-L, TB-H および MIN 検体での報告であった。陽性コントロールは1施設 (FN-7) で基準値以下であった。さらに、内部コントロールが陰性の施設が2施設 (FN-6, FN-7) あっ

**Table 4-2** The used conditions of Oligotex with laboratories correct and incorrect reported

	No. of laboratory (%)	
	Correct	Incorrect
Used	131 (40.4)	1 (14.3)
	p>0.05	
	193 (59.6)	6 (85.7)
Unused	324	7

Statistical significance between correct and incorrect of unused Oligotex laboratories were determined by use chi-square test (the Yates correction). Value of p<0.05 was considered significant.

た。また、本キットによる核酸抽出の際に、検体の視認性確保のために使用が勧められているオリゴテックスについては、7施設中5施設で未使用であった。TB-L, TB-H および MIN 検体をそれぞれ陽性と報告した施設324施設中、193施設 (59.6%) がオリゴテックス未使用であった。オリゴテックスの使用による結果報告への影響はなかった。(χ<sup>2</sup>検定：P>0.05)

(5) 偽陽性報告施設の解析 (Table 5)

陰性検体を *M. tuberculosis* 陽性と報告した6施設の報告成績の背景を調査した。COBAS 法を用いた4施設では、陰性検体の吸光度が0.499~0.749に分布しており、陰性コントロールの吸光度は全ての施設で基準値0.25以下であった。MWP 法を用いた2施設は、陰性検体の吸光度が0.357および1.550を示し、陰性コントロールはそれぞれ、0.065 (基準値以下) と0.329 (基準値以上) であった。陰性コントロールが基準値以上を示した1施設 (FP-6) については偽陰性同様、本来は再検査の対象となり誤報告は防げたと考えられる。

(6) フォローアップアンケートの集計

①検査環境 (Fig. 1-1)

キット使用経験は1年未満から3年以上に分布し、「3

**Table 5** Background data from 6 laboratories reported false-positive results

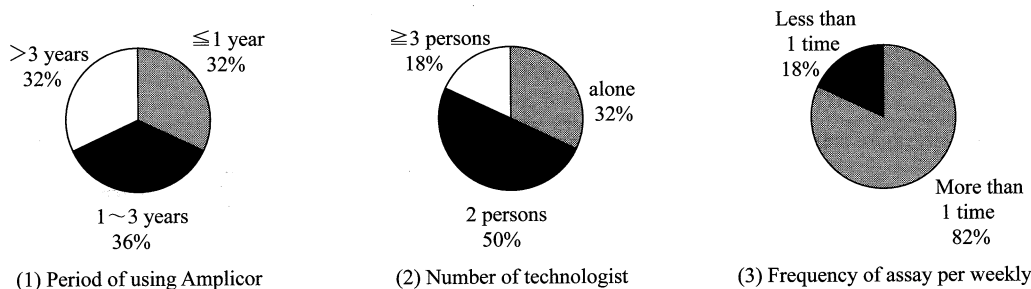
Laboratory	Method	Optical Density value (450 nm or 660 nm)	
		Negative sample*	Negative control**
FP-1	COBAS	0.499	0.005
FP-2	COBAS	0.518	0.019
FP-3	COBAS	0.713	0.006
FP-4	COBAS	0.749	0.004
FP-5	MWP	0.357	0.065
FP-6	MWP	1.55	0.329***

The wavelength for measurement of optical density value used 660 nm with COBAS method and 450 nm with MWP method.

\*The standard value for a decision which should be made positive is  $\geq 0.35$  by measurement of 450 nm or 660 nm.

\*\*The standard value of negative control which should be made negative is  $\leq 0.24$  by measurement of 450 nm or 660 nm.

\*\*\*This laboratory reported negative control with the positivity.



**Fig. 1-1** Results of follow-up questionnaire from the laboratories reported “false-negative”, “false-positive” and “low positive control datas”; Environment (n=22)

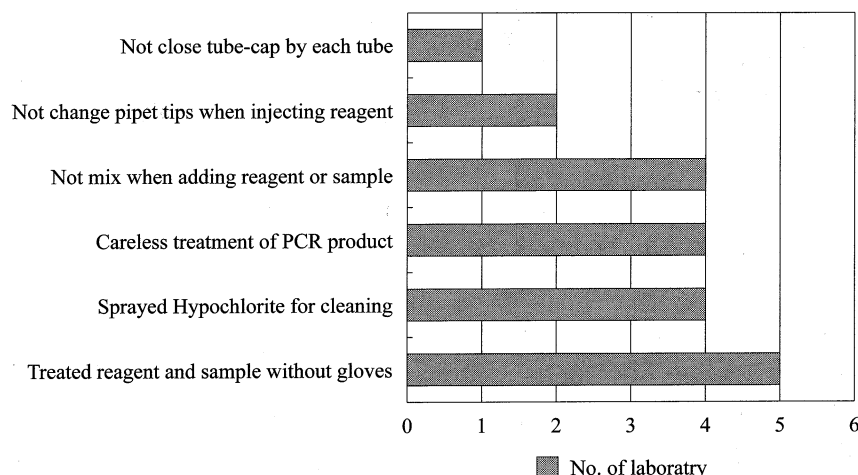


Fig. 1-2 Results of follow-up questionnaire from the laboratories reported “false-negative”, “false-positive” and “low positive control datas”; Operation (n=20)

年未満」が15施設（68%）であった。検査担当者は「1名」から「3名以上」に分布し、「2名以内」が18施設（82%）であった。またキットの使用頻度は「週1回以上」が18施設（82%）であった。

#### ②操作面 (Fig. 1-2)

試験結果に重大な影響を与えたか否かについては不明であるものの、作業台などの清拭の際に「次亜塩素酸をスプレーで使用」（偽陰性、陽性コントロール低値の原因となる可能性がある）、本キット操作時に「手袋を着用せず」、PCR後の「増幅産物の取り扱い不注意」（偽陽性、陰性コントロール高値の原因となる可能性がある）、試薬分注時等の「攪拌操作の未実施」などの基礎的操作が遵守されていないことが不正解の原因となった可能性が示唆された。

### 考 察

遺伝子増幅により目的菌の遺伝子を検出する方法は、研究室レベルから日常の臨床検査の一手法として既に広く導入されている。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や、臨床材料の種類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も同時に報告されている<sup>2)</sup>。私たちは既報<sup>3)</sup>に続き本キットを使用している全国331施設を対象に模擬検体を配布し、各参加施設で行われている方法および手順で測定を依頼した。なお、各施設の現状を正確に把握するため1回のみ測定値を報告してもらい集計した。

臨床的に特に問題となる「偽陽性」は、55施設を対象とした既報<sup>3)</sup>ではCOBAS法およびMWP法の2法で全く認められなかった。しかし、今回の調査では、6施設（1.8%）が陰性模擬検体を陽性と報告した。これら6

施設から報告された模擬検体の吸光度値は、0.357~1.55に分布し、吸光度0.35以上を陽性とする本キットの判定基準に従えば「陽性」の判定に誤りはない。しかし、日常的に経験する陽性臨床検体の多くは、吸光度値が高値を示す場合が多い。今回の調査で「偽陽性」の報告をした6施設のような測定値が得られた場合は、グレーゾーンと考え、積極的に再検査を行い、臨床所見やエックス線所見などを併せた総合的な検討を慎重に行って判断すべきである<sup>1)</sup>。

また、「偽陰性」は7施設から報告され、3種の陽性模擬検体で発生し、MWP法COBAS法ともに見られた。これらのうち、陽性コントロールの吸光度値が基準値以下を示した施設が3施設あり、各検体の吸光度値は0.35未満であった。

核酸増幅法の問題点として、核酸による汚染からくる偽陽性、増幅反応の阻害物質からくる偽陰性がある<sup>4)</sup>。今回の調査では、COBAS法およびMWP法ともに「偽陽性」と「偽陰性」が発生した。本キットは定性試験であり、臨床側への報告は「陽性」または「陰性」の2種類に限られ、その結果に対する検査側の判断過程を考慮されることは少ない。特に、臨床材料を対象とした場合に判断過程が問題となり、勧告<sup>1)</sup>に従い塗抹検査および培養検査を併行して行い、さらに臨床所見やエックス線所見などを併せた総合的な判断の必要性が示唆される結果であった。

また、フォローアップアンケートに回答を得た施設の検査環境に問題を探ることはできなかったが、操作面において基礎的操作が遵守されていないことが不正解の原因となった可能性が示唆された。不正解の施設のうち、希望のあった10施設には試料の再配布を行い、操作を

確認した上で再測定を実施した。その結果、再測定を希望した10施設で測定結果の改善が見られ、基礎的操作が重要である旨を再確認する結果であった。

### ま と め

アンプリコア®マイコバクテリウムを日常検査に利用している331施設を対象に疑似試料を用いてサーベイを行った。

(1) 平均正解率は99% (98.2~99.7%)、また、不正解率は1.0% (0.3~1.8%)であり、臨床診断キットとして十分な性能と検査結果に対する信頼性が確認された。この信頼性の保証は陽性、陰性コントロールのほかにPCR増幅反応を確認する内部コントロールを活用することで検体中の阻害物質だけでなく、操作中の次亜塩素酸の混入などによる偽陰性もチェックすることが可能である。

(2) 偽陽性は6施設 (1.8%) から報告された。

(3) 偽陰性は低濃度結核菌群の試料 (TB-L) で5施設 (1.5%)、高濃度結核菌群の試料 (TB-H) および *M. intracellulare* でそれぞれ1施設 (0.3%) 報告された。

(4) 本キットの添付文書を遵守した判定と併せ、施設内での再検基準を設けるなど、臨床所見などと併せて総合的に検討し結果報告を行う必要性が確認された。

(5) 核酸増幅法を操作する際の基本的操作が行われていない施設が見受けられた。検査担当者の引き継ぎ時などには作業手順書などを作成し、基本的操作手技の確実な伝達が望まれる。

### 文 献

- 1) 日本結核病学会予防・治療合同委員会：核酸増幅法による結核菌検査の臨床での利用について。結核。1995；70：711-712.
- 2) 阿部千代治，斎藤由美子，本山禎二，他：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。結核。1997；72：181-186.
- 3) 渡辺正治，上野一郎，奥住捷子，他：アンプリコア®マイコバクテリウムサーベイ・アンケート集計結果報告。医学検査。2000；49：1449-1452.
- 4) 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；70：7-12.

## Original Article

RELIABILITY OF AMPLICOR<sup>®</sup> MYCOBACTERIA KIT FOR DETECTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX AND *MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE*: RESULTS OF COOPERATIVE STUDY AMONG 331 LABORATORIES IN 2000

<sup>1</sup>Yoshimi HIGURASHI, <sup>2</sup>Kazuyoshi MIYAKE, <sup>1\*</sup>Katsuko OKUZUMI,  
<sup>3\*</sup>Mitsuaki NAGASAWA, <sup>4\*</sup>Masaharu WATANABE, and <sup>5\*\*</sup>Yuichi TACHIBANA

**Abstract** Amplicor<sup>®</sup> Mycobacterium Kit (Roch Diagnostics: Japan) is the most widely used kit in Japan for the diagnosis of mycobacteria infections, especially those caused by *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. We evaluated the reliability of the kit in co-operation with 331 laboratories using the kit in routine examination.

We distributed specially prepared 4 test samples to each laboratory. The negative sample was NALC-NaOH treated sputum which showed "negative" when tested by this kit and positive samples were NALC-NaOH treated sputum containing *M. bovis* or *M. intracellulare*.

False-positive results were reported in 6 out of 331 laboratories (1.8%) and false-negative results were reported from 7 laboratories (2.1%). (The details were 1 out of 331 labs for TB-H sample, 5 out of 331 labs for TB-L sample and 1 out of 316 in MIN sample.) Statistical significance between MWP method and COBAS method was not significant.

After receiving and evaluating the test results on the 4 samples, the follow up questionnaires were sent out to 22 laboratories which reported incorrect results and low optical density (O.D.) on positive control. Results of this questionnaire

suggested that it was important to follow the package insert instructions and to follow the correct procedures for PCR assay.

These results suggested that Amplicor Mycobacterium Kit is reliable for rapid diagnosis of Mycobacteria infections.

**Key words:** Amplicor, *Mycobacterium* spp., PCR (polymerase chain reaction), Co-operative blind study

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, University of Tokyo Hospital, <sup>2</sup>PCR product section, Roche diagnostic K.K., <sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, National Defence Medical College Hospital, <sup>4</sup>Division of Clinical Laboratory, Chiba University Hospital, <sup>5</sup>Department of Clinical Laboratory, Juntendo University Hospital, \*Committee of PCR Diagnosis for Infectious Disease, \*\*Chairman for Committee of PCR Diagnosis for Infectious Disease

Correspondence to : Yoshimi Higurashi, Department of Clinical Laboratory, University of Tokyo Hospital, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655 Japan. (E-mail: HIGURASHI-LAB@h.u-tokyo.ac.jp)