

抗酸菌 PCR 検査の前処理法の新たな工夫

^{1,2}正木 孝幸 ²江崎 孝行

要旨：迅速検査である Amplicore Mycobacterium 法はその検体の前処理法が短時間で終わるように工夫されている。そのため喀痰の溶解や PCR 反応阻害物質の除去が不完全な場合がある。著者らは、喀痰の溶解に semi-alkaline protease を使用することでその問題を解決した。2001 年 4 月から 2001 年 8 月までに TB-PCR 検査の依頼があった 261 検体の検討結果は 21 件 8.0% が PCR 反応陽性であり、このすべての検体の間接塗抹法は陽性であり、培養・同定検査では *M. tuberculosis* であった。PCR 法陰性で培養陽性であった 27 例のすべての株は *M. tuberculosis* 以外の抗酸菌であった。

キーワード：結核菌 PCR, セミアルカリプロテアーゼ, PCR 前処理法

はじめに

今日、Amplicore Mycobacterium 法（以下、AM 法）は結核症の迅速な診断のために必要不可欠な検査となっている。

AM 法は、検体の前処理、遺伝子増幅および目的遺伝子の検出の各パートに分けられ、それぞれの正確な操作により感度ならびに信頼性を維持することが可能となる。検体の前処理以降の操作はほぼ機械的であるために、検体の前処理、すなわち集菌操作が十分に実施されているか否かにより本検査の成否が左右されると考えられる。

現行における喀痰の前処理法は、N-Acetyl-L-Cysteine NaOH 法（以下、NALC-NaOH 法）であり、NALC は喀痰の粘着性の原因であるジスルフィド結合を開裂させ可溶化する働きを持ち、NaOH の高いアルカリ性は喀痰の可溶化と雑菌を殺傷する働きを有する。しかし、NALC の喀痰溶解作用は短時間ですべての喀痰を完全に漿液化するものではない。このことは微量排菌例が多い今日、喀痰中の菌分布が一様でないことを考え合わせると問題となる。既に、Sato et al.¹⁾ は Amplicore 法と MTD 法の比較検討に液体培養法である Septi-Check（日本 BD）を用い各々の偽陰性が 5/37（13.5%）、6/37（16.2%）見られたことを示した。また、古賀ら²⁾ は LCR 法の検討において

小川培地法との比較で LCR 法偽陰性が 20/179（11.2%）あり、今後の検討課題としている。さらに、膿性喀痰では漿液化が不十分となりやすく、PCR 阻害が起きる場合も散見されている³⁾。

これらの各論文の考察により、遺伝子増幅検査は感度的には十分であるものの、ルーチン検査に使用する際の前処理法が喀痰の条件により十分に機能していないことが示唆された。すなわち、NALC-NaOH 法では検体の 1 ml を使用することになっている。このことは、喀痰中の菌量が少ない場合、検体中の結核菌が増幅用検体の中にうまく入らず増幅がかからない場合が考えられる。

従って、今回はこの欠点を喀痰の全量溶解均一化により補うこととした。そのため、本法の重要なポイントである全量使用という点を活かすために検体の一部しか必要としない NALC-NaOH 法との直接的な比較はできなかったが、塗抹検査成績と Gold Standard である培養検査成績との一致率で今回の評価を実施した。

材料および方法

（1）供試材料

2001 年 4 月から 8 月までに AM 法依頼のあった喀痰のみの検体 261 件を供試した。

（2）Amplicore Mycobacterium 法

結核菌群 PCR 法は日本ロッシュ(株)の AMPLICOR

¹⁾(財)化学及血清療法研究所臨床検査センター、²⁾岐阜大学大学院医学研究科・独立専攻、再生医科学再生分子統御学講座、微生物・バイオインフォマティク部門

連絡先：正木孝幸，〒860-8568 熊本県熊本市大窪 1-6-1 (E-mail: masaki@infobears.ne.jp)

(Received 11 Nov. 2002/Accepted 28 Jan. 2003)

Mycobacterium kitを用いた。喀痰の前処理法以外については説明書どおり使用した。

今回の変更点はFig. に示す。すなわち、供試された喀痰の全量と同量の semi-alkaline protease であるスプータザイム（極東製薬）を加え、よく混和後1晩以上冷蔵庫の中に放置し、その溶解液を喀痰の濃性が強ければ0.5 ml、そうでなければ1.0 ml 採取して、その10倍量の滅菌生理食塩水を加えた。その遠心沈渣に1 ml の滅菌生食水を加えたものを前処理喀痰として使用した点である。

(3) 塗抹, 分離培養および同定検査

すべての検体について Ziehl-Neelsen 染色による材料の直接塗抹標本鏡検ならびに再浮遊する前の遠心沈渣を用い作成した間接塗抹標本鏡検を実施した。

分離培養は被検材料の遠心沈渣に塩化セチルピリジニウム法による培養前処理を施し、4% NaOH aq にて中和した検体⁴⁾の0.1 ml を工藤 PD 培地 (BCG サプライ (株)) に接種して8週間37℃で培養を実施した。

菌発育が見られたならば抗酸菌であることを確認後、同定検査としてナイアシンテスト（極東製薬）および抗酸菌同定キット（極東製薬）による生化学的同定検査、またはキャピリア TB（日本 BD）使用による MPB 64 の検出を実施した。いずれのキットも添付の説明書どおりを使用した。

成 績

(1) 喀痰の溶解性

今回のプロトコールによって作成された標本では細菌成分と白血球のみの存在が認められるだけであり、他の残渣物の存在は認められなかった。これは検体のどの部分をとっても同様な所見であった。

(2) AM法と鏡検成績の比較

AM法陽性は261件中21件8.0%であった。

この21件における塗抹検査成績との比較では、直接塗抹鏡検陽性例は10件47.6%が陽性であり、直接塗抹標本陰性例は11件52.4%が陽性であった。

直接塗抹標本陰性例において、今回改良した集菌操作

を実施した間接塗抹標本陽性例では Table に示すように、全視野に少なくとも1個以上の抗酸菌が証明された。

すなわち、PCR法陽性例はすべて直接もしくは間接塗抹染色により抗酸菌陽性であった。

(3) AM法と培養成績の比較

AM法陽性例における培養成績との比較では、直接塗抹標本 Gaffky が1号以上あった10例では1+ (50コロニー) から3+までの多量排菌例であった。しかし、Table に示す集菌法でのみ塗抹陽性11例では平均出現コロニー数が20コロニー（レンジは2~30コロニー）と微量排菌例と考えられた。

(4) AM法と同定成績の比較

AM法で陽性とされた喀痰より分離された抗酸菌21例はいずれかの方法においてすべて *M. tuberculosis* と同定された。また、AM法で陰性と判定された喀痰より分離された抗酸菌27例は、すべて *M. tuberculosis* 以外の抗酸菌であった。

考 察

AM法は既に確立された方法であり、多くの検討成績が報告されている⁵⁾⁶⁾。それによると *M. tuberculosis* 浮遊液を用いた希釈法による本法の感度は約20 cfu/ml とされている⁶⁾。ところがPCR成績と培養成績の比較では必ずしも一致する成績ではなく、さらに、膿性検体の場合PCR法を阻害する報告もなされている⁵⁾。

著者らはこの点に着目し、semi-alkaline protease であるスプータザイムの喀痰溶解性を利用し喀痰の漿液化を図ることにより前処理過程の問題解決が可能と考えた。また、Amplicore Mycobacterium 法の説明書による方法では喀痰の1 ml を使用することになっているが、今日の微量排菌例の増加や喀痰中の菌分布が一樣でない点も考慮して、依頼検体の全量を使用し漿液化した検体を0.5~1 ml 使用することとした。

AM法と塗抹染色の比較では、直接塗抹標本では約半数が塗抹陰性との成績であったが今回改良した喀痰前処理法では少なくとも全視野に1個以上の抗酸菌を観察することができ、AM法陽性で塗抹染色陰性例は観察され

	The standard method	New method
Sputum	1 ml	whole
Lysis reagent	NaLC-NaOH equivalent volume of sputum	Semi-alkaline protease (Sputazyme [®]) equivalent volume of sputum
Bortex mix.	5 min.	5 min. and over night in refrigerator
Use of sample	whole	0.5-1 ml of solved samples
----- add to 0.067 M PBS or saline full top centrifuge 3000 rpm 15 min. -----		

Fig. The point of difference with the standard method

Table Comparison of TB-PCR positive cases with indirect-smear or direct-smear positive cases and culture positive examination in patients

1. Direct-smear positive

Patients	Results of TB-PCR	Direct	Results of culture		Identifications	memo
		Gaffky	Quantity	Colonies		
■	+	1	1+	15	<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	2	2+		<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	2	3+		<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	2	2+		<i>M. tuberculosis</i>	
■*	+	2	2+		<i>M. tuberculosis</i>	before treatment
■	+	2	2+		<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	3	3+		<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	5	3+		<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	7	3+		<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	8	3+		<i>M. tuberculosis</i>	

2. Indirect-smear positive

Patients	Results of TB-PCR	Direct	Indirect	Results of culture		Identifications	memo
		Gaffky	Quantity	Quantity	Colonies		
■	+	0	a few	1+	2	<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	0	a few	1+	30	<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	0	a few	1+	4	<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	0	a few	1+	25	<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	0	a few	2+		<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	0	a few	1+	26	<i>M. tuberculosis</i>	
■*	+	0	a few	1+	2	<i>M. tuberculosis</i>	after treatment
■	+	0	a few	1+	40	<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	0	a few	1+	4	<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	0	a few	1+	30	<i>M. tuberculosis</i>	
■	+	0	a few	1+	19	<i>M. tuberculosis</i>	

Remark* : same patient

なかった。このことは今回の喀痰前処理法は喀痰の漿液化がほぼ完全であり、十分な集菌効果を示したものと考えられた。

青木ら⁵⁾の未治療例167例および既治療例157例についての詳細な検討ではAM法の陽性率は95.8% (68/71), 98.7% (77/78)でありAM法と直接塗抹染色成績の比較では71.0% (66/93), 78.0% (85/109), 同じく液体培養成績の比較では87.1% (81/93), 79.8% (87/109)という成績を示した。また、後藤ら⁶⁾は各種臨床検査材料70検体を用いた検討で、AM法が陽性であった6例以外に25例がAM法陰性にもかかわらず培養で*M. tuberculosis*が分離されたことを報告し、この考察として検体の抗酸菌分布の不均一さが原因と考えられると記している。

また、本法の検体感度は後藤ら⁶⁾が*M. tuberculosis* H37Rv株を用いた検出感度の検討で、AM法は 2.5×10 cfu/mlのOD値が2.233および2.617と陽性であり、10 cfu/mlでは、0.057および0.067と陰性を示し、本法の検出感度を 2.5×10 cfu/mlとしたが、著者らの臨床材料を用いた検討ではAM法陽性検体100 μ l接種時の最小発育コロニー数は2個であり、喀痰中では約20 cfu/ml

が本法の感度の限界と考えられ、後藤ら⁶⁾とほぼ同様の成績であった。

今回の著者らの成績はいずれの項目においても良好な成績であり、NALC-NaOH法による喀痰の前処理に比しスプータザイムを使用した方法が優れていることを示唆するものである。また、AM法における増幅阻害の原因は特定されていないが、今回の方法ではAM法における阻害は認められなかった。これは、喀痰の溶解が十分であるために検体の遠心沈渣作成時に阻害物質が除去されることが推測された。これは、高嶋ら³⁾が培養陽性AM法陰性の5例の材料が膿性であり、溶解した材料の希釈により3例がAM法陽性となったことから裏付けられる。ところが、本法は261例の検討で偽陰性がなく、阻害が認められなかった点は評価できる。ただ、臨床的に迅速性が必要とされる場合は従来のNALC-NaOH法によらなければならない。しかし、従来法による前処理により実施したAM法と臨床的な診断に乖離が見られた場合、また、本邦の大多数の施設が週に1~2回程度PCRを実施される現状⁷⁾では、一晚以上の放置も問題にはならないと考えられる。

今回の方法は簡便かつ費用の負担が非常に少ない方法であるため、多くの施設で検討するに値するものと考えられた。

文 献

- 1) Sato K, Tomioka H, Kawahara S, et al.: Evaluation of Two Commercial Diagnostic Kits for *Mycobacterium tuberculosis* complex Based on Bacterial DNA and rRNA Amplification for Direct Detection of Tubercle Bacilli in Sputum Specimens. *Kansenshoshi*. 1998; 72: 504-511.
- 2) 古賀宏延, 河野 茂, 朝野和典, 他: Ligase Chain Reaction (LCR) 法. *感染症誌*. 1998; 71: 1246-1251.
- 3) 高嶋千恵, 根ヶ山清, 藤田次郎, 他: 未治療症例における AMPLICORE *Mycobacterium* 偽陰性検体についての検討. *日臨微雑誌*. 1996; 6: 27-30.
- 4) 正木孝幸, 梅橋豊蔵: 抗酸菌検査に関する検討 第三報 分離培養の基礎的検討. *医学検査*, 1993; 41: 35-39.
- 5) 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 TM 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.
- 6) 後藤美江子, 奥住捷子, 坂井康郎, 他: 臨床材料から直接検出可能な結核菌増幅法キットの検討. *感染症誌*. 1995; 69: 539-545.
- 7) 第3回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—結果報告—, PCR 感染症検査研究会, 2002.

Short Report

A NEW METHOD OF SPUTUM PRE-TREATMENT FOR PCR PREPARATION

^{1,2}Takayuki MASAKI and ²Takayuki EZAKI

Abstract A rapid sputum processing method was developed for PCR. As a protocol prepared for commercial kit is too much simplified, PCR inhibitor is not completely removed from sputum. We developed a new semi-alkaline protease method to dissolve sputum. From April 2001 to August 2001, 261 sputum samples were treated with our new method. Twenty-one cases (8.0%) were PCR positive and all the results perfectly coincided with the results of the conventional culture method.

Key words: TB-PCR, Semi-alkaline protease, Preparation

of PCR

¹Chemo-Sero Therapeutic Research Institute, ²Department of Microbiology and Bioinformatics, Gifu University Graduate School of Medicine

Correspondence to: Takayuki Masaki, 1-6-1, Okubo, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568 Japan. (E-mail: masaki@infobears.ne.jp)