

結核菌検査室内 Cross-contamination の 1 事例

¹渡部 厚一 ²守屋 任 ²林原 賢治 ²斎藤 武文
²深井志摩夫 ³高久多希朗 ⁴森本 耕三

要旨：抗酸菌培養検査のため同時に前処理した7検体のうち、結核菌液体培養陽性となった5検体についてRFLP分析を行ったところ、4検体でパターンが一致したことから検査室内 Cross-contamination が判明した。汚染源 (Source) の喀痰検体の症例は治療開始前の肺結核であったが、偽陽性3検体の臨床診断は治療開始間もない活動性肺結核、非結核性肺炎および肺結核治療後であり、後2者が偽陽性判明のきっかけとなった。処理順序、塗抹菌量、症例の以前の検体のRFLPパターンとの比較から最初に処理された検体を Source と判断した。検査室内 Cross-contamination の原因として、検体処理段階での喀痰溶解液、NALC-NaOH 液、緩衝液分注の際の混入など人為的要因が強く考えられた。検査室内 Cross-contamination による偽陽性は、液体培地でようやく陽性となる程度のきわめて少量の菌量で生じることが報告されている。偽陽性から不必要な治療や誤った治療変更へとつながる可能性があり、偽陽性が示唆される場合、臨床診断との照合はもちろんのこと、検体処理過程中に起きえた可能性を振り返って検討できるよう一括連続処理した検体やその処理順序を記録保存しておくべきであり、さらにはRFLP分析等で同一菌株かどうかの検討ができるよう、ある一定期間、陽性検体を保存しておくべきである。

キーワード：Cross-contamination, 結核菌, 偽陽性, RFLP分析, 液体培養

はじめに

高い検出率、培養陽性までの期間短縮化から抗酸菌培養検査に使用される培地は、小川固形培地から液体培地へ切り替わりつつある。しかし、この優れた培養法は感度の高さに加え、処理手技の手順増加および複雑化により検査室内の Cross-contamination (以下 C/C と略) を引き起こす可能性を内在する。本邦での最近の事例を伊藤ら¹⁾が報告しているように、C/C による結核菌培養偽陽性は一定の頻度で起こる避けられない事象である。しかしながら、同事象から不必要な治療や誤った治療変更につながる可能性があることから、同事象を早い段階で発見する必要がある。今回、液体培養陽性検体から検査室内 C/C が明らかとなり、RFLP 分析から証明しえた事例を経験したので考察を加え報告する。

事例呈示

担当医からの問い合わせを契機に、同日に同時に前処理された7検体 (A → B → C → D → E → F → G の順に処理) のうち、結核菌液体培養陽性となった5検体 (A, B, C, D, E) についてRFLP分析を行ったところ、4検体 (A, B, C, D) が同一パターンであることが判明した (E は異なるパターンであった)。最初に検体処理され、菌量も多かった活動性結核症例の A および B についてまず汚染源 (以下 Source) の可能性を考え、A と B の以前の菌株 A', B' についても RFLP 分析を行ったところ、A' が A ~ D の4検体と一致し、B' はいずれにも一致しなかったことから、最初に検体処理された A 検体が、臨床経過の情報と併せて Source と結論し、B, C, D の偽陽性が判明した (Fig. 1)。

C/C 判明の契機となった偽陽性 C 検体の臨床経過は、

¹⁾筑波大学大学院人間総合科学研究科, ²⁾国立病院機構茨城東病院, ³⁾日本医科大学附属病院第四内科, ⁴⁾日本赤十字社医療センター呼吸器内科

連絡先: 渡部厚一, 筑波大学大学院人間総合科学研究科,
〒305-8574 茨城県つくば市天王台1-1-1
(E-mail: perowan@taiiku.tsukuba.ac.jp)
(Received 8 Mar. 2007 / Accepted 27 Jun. 2007)

30歳の女性で6カ月前より上気道炎症状あり、4カ月前に胸部異常陰影を指摘され近医で右肺炎として治療されるも改善なく、38℃台の発熱が出現し当院に紹介入院となった。肺結核も疑われたが、入院後の喀痰塗抹陰性で、無治療ながら胸部画像および血液炎症所見の改善を認め、マイコプラズマ肺炎が疑われ退院となった。また、ほぼ同時に偽陽性となったD検体症例は、65歳の男性

で、同居の家族（妻）がGaffky 3号の肺結核と診断された2年前に結核疑いで初診、外来経過観察中の1年前より右上葉の陰影が出現し、気管支鏡洗浄液培養陽性で肺結核と診断された。慢性C型肝炎、糖尿病網膜症の合併症があり外来でisoniazid, rifampicin, levofloxacinの抗結核薬が開始されたが、全剤感性菌、治療後の経過も良好で画像上の変化を認めず、略治の転帰となるころであったため、外来担当医が検査室に問い合わせることとなった。

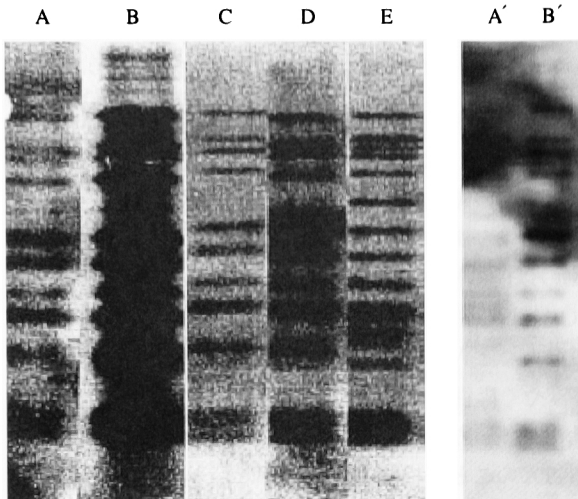


Fig. 1 RFLP pattern showed that B, C, D and A' are identical to A. A' and B' are results of RFLP examined before.

当院における検体処理過程について

NALC-NaOH法は抗酸菌のみを選択的に培養するのに適した前処理法であり、培養のみならず塗抹検査および核酸増幅法にも用いられる²⁾。当院でも採用しているプロテアーゼNALC-NaOH法を用いた検査材料の前処理過程をFig. 2に示す。すなわち、①50 ml/スクリーキャップ付き滅菌容器に採取された喀痰に2～3倍量の喀痰溶解液を滅菌スポイトで加え、よく転倒混和した後、自動攪拌装置ナルクマン®（以下、自動攪拌装置）で10分間攪拌する。その後、事前に準備した滅菌済みリン酸緩衝液を300 cc 蓋付き滅菌コップで遠心チューブの上部50 ml/目盛まで添加・転倒混和したのち、冷却遠心分離（3000G・20分・5℃）する、②遠心後、上清を廃棄ボトルに捨て、沈査を集菌塗抹標本作製に用いる。残った沈

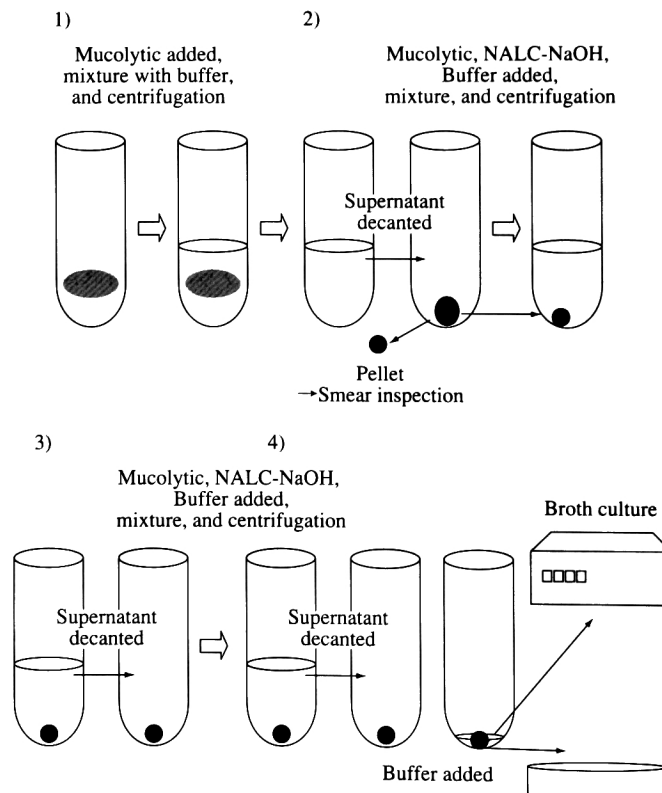


Fig. 2 Flowchart of the process of manipulating specimen before broth-based culturing

査に2 mlのリン酸緩衝液を加えて再浮遊させ、NALC-NaOHおよび喀痰溶解液各2 mlを添加・よく転倒混和し自動攪拌装置で10分間攪拌したのち、緩衝液を50 mlまで加えて冷却遠心分離する、③上清を廃棄ボトルに捨て、その沈査にリン酸緩衝液2 mlを加えて再浮遊させ、NALC-NaOH 4 mlを添加、転倒混和ののち自動攪拌装置で10分間攪拌し、攪拌後10分間静置する。これにリン酸緩衝液を50 mlまで加えて冷却遠心分離する、④上清を捨て、沈査にリン酸緩衝液2 mlを加えて培養前処理済み検体とする。培養前処理済み検体を1 ml注射筒でBACT/ALERT3D MPボトルに0.5 ml、工藤PD培地に0.1 ml接種し、それぞれ液体培養と固形培養を行う。上記処理法では、通常の一般的な処理法³⁾と比較してNALC-NaOHを2回添加するが、当院で検討・改良を行い現在使用している方法であり、2003年の処理検体5099件のうち、雑菌汚染率は年平均4.75%と良好であった。

なお、上記の試薬添加の際の手技として、検体容器口部から約2 cm離れたところより、容器の管壁に沿って試薬が入るようにし、複数検体を処理する際には、蓋の開閉動作を試薬添加のたびに行い、複数検体の蓋が同時に開口しないよう当院では工夫していた。試薬添加に使用するピペットについては、検体1件ずつで交換を行わず、処理手順1行程に1回の交換を行っていた。滅菌コップは終日使用していた。

考 察

Cross-contaminationの原因

C/Cの可能性を含んだ処理過程として次の3つが考えられる。①検体に試薬を加える際に生じる飛沫によりピペット先端部がごく微量の検体で汚染され、ピペット操作により他の検体に菌が持ち込まれる可能性が考えられ、これにより結核菌陽性検体ピペット処理後の検体が汚染されることになる。②緩衝液50 mlを加える際に起こる菌液の跳ね返り。この操作では緩衝液を目盛り付き蓋付き滅菌コップで加えていくが、コップに菌液が混入した場合は、同一処理を3回実施するためすべての検体に汚染が広がる可能性がある。③安全キャビネット内エアロゾルの層流による浄化処理不十分が挙げられるが、この原因では①と同様処理順に影響される。このうち、最初に処理されたAをSourceと同定したことより、処理順に強く影響される①がまず考えられた。滅菌コップを1日を通して使用していたにもかかわらず、同時処理した検体や同日に並行して処理していた検体で汚染例を認めなかったことから②は①より考えにくいと判断した。①と③では、直接的に影響を受けやすい①がC/Cの原因として断然考えやすい。さらに、当日検査処理を行った検査技師が当院勤務2日目ということもあり、検

体処理技能や熟練度の欠如による人為的な要因が大きく影響したと考えられる。

Cross-contaminationの生じる頻度

本事例を契機に、当院における検査室内C/Cの頻度を調査した。液体培地および従来の小川固形培地双方により処理された11,241検体のうち、結核菌陽性検体は606検体(5.4%)であり、32検体は喀痰塗抹陰性かつ単回培養陽性であった。これらのうちRFLP分析により5検体が検査室内C/Cと同定され、その頻度は全検体中0.04%、結核菌陽性検体中0.8%であった。胸部X線正常で結核菌培養20コロニー以下の検体を対象とした伊藤ら¹⁾のC/Cの推計頻度は、総喀痰検体中0.04%、結核菌陽性喀痰検体中0.42%とほぼ当院の結果と同様であった。1事例あたり偽陽性検体数は、液体培地を用いた本事例では4検体であった。固形培地でも伊藤ら¹⁾により1~5検体程度と指摘されており、検査室内C/Cが比較的高い頻度で必然的恒常的に生じていることを臨床医、検査室ともに十分認識する必要がある。また、本事例偽陽性3検体は、無治療でかつ、液体培地陽性、小川固形培地陰性であった。液体培養陽性検体の6%が偽陽性というNivinら⁴⁾の報告もあり、感度が高い液体培養での少量のC/Cによる偽陽性が比較的高頻度で起こる可能性があると考えられる。Jasmerら⁵⁾は検査室内C/Cの前向き多施設研究で単一回培養陽性例の22%でC/Cを認めており、単一回のみ培養陽性例でもC/Cの可能性を十分考慮する必要がある。

Cross-contamination発見の動機

本事例の発見動機は、検査結果に不審を抱いた主治医からの報告であった。伊藤ら¹⁾のまとめでも発見動機は臨床側と検査室側が約半数であったことから、臨床医と検査室の連携は特に重要である。本事例でも医師と検査室との連携が不十分だった場合、Aが耐性菌であった場合には獲得薬剤耐性や治療反応性不良の判断から治療が変更された可能性(B例)、誤診からの不必要な抗結核薬治療や接触者検診の可能性(C例)、再発や外来性再感染と判定される(D例)など患者にとって不利益が及んだ可能性がそれぞれ考えられた。

Cross-contamination予防策

Northrupらの3事例の検討⁶⁾で、検査室内C/Cに伴う医療費の影響が1人あたり\$10,873であったことから、医療経済面からもC/Cの予防は重要である。本事例は、塗抹陽性検体を最初に処理したことがC/Cにつながったが、Burmanら⁷⁾は、塗抹陽性検体が陰性検体よりもC/Cを起こしやすいことを示しており、複数検体を同時前処理する際には、菌陽性の可能性の少ない検体を先に、既知の塗抹陽性検体を最後に処理する必要がある。同様に、培養陽性ボトル、薬剤感受性試験等の培養陽性株検

体処理を検体前処理と同時にしないことも予防策の1つである。Breeseら⁸⁾はさらに、1名の塗抹陽性患者からの月あたり検体提出数を2回以内として感染源検体数を削減し、一度に開口するチューブを1個にする、個々の緩衝液を用意する、混注に5分時間をあけるなどの工夫によって、4%から0%にC/C頻度を減少できたとしている。一方、塗抹陽性検体が提出されやすい結核病棟と一般の病棟との検体分別処理も1つの方法と考えられるが、本事例で7検体中6検体が結核病棟由来であった一方、発見契機の検体が外来由来であったこと、むしろ混在させることでC/Cを明らかにしやすい可能性から一考の余地があると思われる。

次に、C/Cが疑われた場合でも、臨床医と検査室との緊密な連携のもと十分に結果を検討する必要がある。検体を採取し直し再検することは、結核同士の検体が同時期に同部署から提出され外来性再感染との鑑別が困難な場合にも有用であろう。十分な検討のうえ、C/Cが強く疑われる場合にはRFLP分析等の遺伝子検査での確認作業が必要となる。VNTR (variable number tandem repeat) 法は、液体培養が応用されている現在、短期間での判定が可能であり、より簡便で迅速なC/Cの新しい検出法⁹⁾として期待される。

最後に、本事例では全検体について処理順を詳細に記録していたことがC/Cを容易に推定する手がかりとなった。「記録」の重要性を再認識し今後も継続すべきと考えている。

謝 辞

本事例の検討にあたり、結核菌RFLP分析についてご指導・ご協力賜りました茨城県衛生研究所、故高橋光良

先生をはじめとした(財)結核予防会結核研究所結核菌情報科のスタッフに深謝いたします。

文 献

- 1) 伊藤邦彦, 高橋光良, 吉山 崇, 他: 病院検査室における結核菌培養のCross-contamination. 結核. 1999; 74: 777-788.
- 2) 日本結核病学会治療・社会保険・抗酸菌検査法検討合同委員会: 新しい結核菌検査法の臨床での利用について. 結核. 2000; 75: 681-684.
- 3) Iseman MD: A clinician's guide to tuberculosis. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, 26-28.
- 4) Nivin B, Fujiwara PI, Hannifin J, et al.: Cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*: an epidemiological and laboratory investigation. Infect Control Hosp Epidemiol. 1998; 19: 500-503.
- 5) Jasmer RM, Roemer M, Hamilton J, et al.: A prospective, multicenter study of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. Emerging Infectious Diseases. 2002; 8: 1260-1263.
- 6) Northrup JM, Miller AC, Nardell E, et al.: Estimated costs of false laboratory diagnoses of tuberculosis in three patients. Emerging Infectious Diseases. 2002; 8: 1264-1270.
- 7) Burman WJ, Stone BI, Reves RR, et al.: The incidence of false-positive cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med. 1997; 155: 321-326.
- 8) Breese PE, Burman WJ, Hildred M, et al.: The effect of changes in laboratory practices on the rate of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Pathol Lab Med. 2001; 125: 1213-1216.
- 9) Gascoyne-Binzi DM, Barlow RE, Frothingham R, et al.: Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. J Clin Microbiol. 2001; 39: 69-74.

————— Case Report —————

A CASE OF LABORATORY CROSS-CONTAMINATION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ON THE BROTH-BASED CULTURE SYSTEM

¹Koichi WATANABE, ²Ataru MORIYA, ²Kenji HAYASHIHARA, ²Takefumi SAITO,
²Shimao FUKAI, ³Takio TAKAKU, and ⁴Kozo MORIMOTO

Abstract We experienced a case of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* on the broth based culture system. These false-positive cultures were confirmed by analysis of DNA fingerprinting, RFLP method, which showed the same pattern in three specimens with that of the first manipulated specimen in our laboratory on that day, out of 7 specimens examined. We found possible several process causing cross-contamination where mixture of the foreign body could occur in buffer or NALC-NaOH. False-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* may lead to unnecessary, potentially toxic, costly treatment, and changing the treatment strategy. So we must critically interpret a single positive culture, especially by liquid media.

Key words: Cross-contamination, Tuberculosis, False-positive, RFLP, Broth based culture

¹Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, ²NHO Ibarakihigashi National Hospital, ³Department of Pulmonary Medicine, Infection and Oncology, Nippon Medical School, ⁴Department of Pulmonary Medicine, Japanese Red Cross Medical Center

Correspondence to: Koichi Watanabe, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1, Tennodai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8574 Japan.
(E-mail: perowan@taiiku.tsukuba.ac.jp)