

ポリアクリルアミドを用いた人工痰の長期保存と塗抹鏡検所見の再現性

¹山田 博之 ²松本 宏子 ¹御手洗 聡 ³藤木 明子

要旨:〔目的〕ポリアクリルアミド, THP-1細胞, BCG Pasteur株を材料として調製される人工痰の長期保存安定性と鏡検における陽性度の再現性を検討した。〔方法〕人工痰を室温, 冷蔵(4℃)および冷凍(-20℃)で9カ月まで保存した後, 塗抹標本を作製し, 染色前後の肉眼所見と染色標本の顕微鏡所見を検討した。また, 一定レベルの塗抹検査習熟技術をもつ技師により作製された4種類の陽性度の塗抹標本でその再現性を検討した。〔結果〕長期保存安定性については, 顕微鏡所見で線維成分にわずかな変化が認められることがあったが, いずれの温度条件で保存された場合でも9カ月まで当初の陽性度を保って利用可能であることが示された。また, 塗抹検査習熟技術をもつ技師により作製された標本は, 陽性度±の標本36枚中3枚が陰性と判定され一致率が92%であったが, 残りの異なる陽性度の人工痰標本はすべて100%の一致率であった。〔考察〕本人工痰は, 作製後最低半年は保存可能であり, 一定レベルの塗抹検査習熟技術を有する技師による標本作製によって陽性度の高度な再現性を有することが実証され, 塗抹検査技術の精度管理や鏡検訓練での有用性が期待される。

キーワード: 塗抹検査, 人工痰, 長期保存, 再現性

はじめに

抗酸菌塗抹検査, 特に直接塗抹による検査は, 喀痰1ml中に約10,000個以上の菌, すなわち, 喀痰標本を採取, 塗抹する1白金耳(約10 μ l)あたり100個以上の菌が存在すれば, 検査対象標本中の抗酸菌の存在を確認できることがわかっており, 顕微鏡の他に白金耳, スライドガラスと染色試薬一式があれば実行可能な安価かつ迅速な検査である。しかも, 結核菌塗抹陽性の結果は他への感染性とも相関し, 接触者検診や入退院の際の重要な基準となる。したがって, この検査そのものの精度管理および検査にかかわる技術者のトレーニングはきわめて重要である。

これらの目的には, 既知量の結核菌を含む痰を用いて作製されるパネルテストスライドが有効である。しかしながら, これまで, これらの目的を遂行するに当たっては, 結核患者由来の喀痰を使うことが一般的であり, そ

の場合, 用いられる喀痰に含まれる結核菌数を正確に把握することは困難で, 高度に再現性をもったパネルテストスライドセットを作製することはさらに困難であった^{2)~5)}。

そこでわれわれは, 実際の喀痰の性状に類似した人工的な痰(以下, 人工痰)を, 培養細胞(THP-1細胞), 培養抗酸菌(BCG Pasteur株)およびポリアクリルアミドを原材料として作製することに成功し⁶⁾, その有用性を検証してきた。今回, この人工痰の有用性をさらに検討するため, その長期保存における安定性について検討した。また, 同じ人工痰を用いて作製された塗抹標本の鏡検所見の再現性について, 複数の技師により詳細に検討した。

材料と方法

(1) 人工痰作製方法⁶⁾

(i) 175 cm²の培養用フラスコに10%ウシ胎仔血清,

penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) を含む 2 mM L-glutamine 含有 RPMI 1640 (Invitrogen) を約 180 ml 入れ、ここにヒト単球由来の THP-1 細胞を 5×10^6 cell 添加して 3~4 週間培養後、細胞培養液を 50 ml ポリプロピレンディスポーザブル遠心管に移して、1,200 rpm で 15 分間遠心した。Stericup (pore size 0.2 µm, Millipore) で濾過した 0.1 M リン酸緩衝液 (PB, pH.7.4) で細胞ペレットを洗浄、1,200 rpm で 15 分間遠心し、これを 3 回繰り返した。1 フラスコ分の細胞を最終的に 4 本の遠心管に等分した。最後のペレットは、上清を捨てた後、安全キャビネット内で遠心管をペーパータオル上に傾倒して余剰の水分を除去し、約 10 分間乾燥させた。

(ii) 菌の調製：抗酸菌は病原性が低く、結核菌と形態学的に類似している *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 株を用いた。7H9 液体培地で約 2 週間培養し、十分増菌が確認されたところで、Acrodisk filter (#4650, pore size 5.0 µm, Pall Corporation, Cornwall, UK, 日本ジェネテイクス株式会社) で濾過して菌の集塊を除去し、分散した単個菌を得た。単個菌の再凝集・集塊形成を防ぐために、この濾過菌液は直ちに氷上に置いた。濾過菌液を 1% 小川培地に接種、4 週間後に CFU をカウントし、 5×10^7 CFU/ml 以上の菌濃度であることを確認した。今回用いた菌液の原液は 1×10^8 CFU/ml で、3+ 用にはこの菌液の 3 倍希釈液を、2+ 用には冷 PB にて 50 倍希釈液を、1+ 用には 500 倍希釈液を、± 用には 5,000 倍希釈液を用いた。

(iii) ポリアクリルアミドの調製：22.2 g アクリルアミド、0.6 g N, N'-メチレンビスアクリルアミドを蒸留水に溶解後、100 ml にメスアップした。これを原液として、遮光して 4℃ で保存した。ポリアクリルアミドの調製は、このアクリルアミド原液 1.75 ml に、0.2 µm フィルターで濾過した蒸留水 6.25 ml、同じく 0.2 µm フィルターで濾過した 5×TBE 2 ml、直前に調製した 10% ペルオキシ二硫酸アンモニウム (過硫酸アンモニウム) 0.1 ml を加え、攪拌し、氷上に置いた。

(iv) 人工痰の調製と保存：前記の乾燥 THP-1 細胞遠心筒 2 本分のペレットに菌液 200 µl を混合した後、上記アクリルアミド混合液に重合加速剤である N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) を 8 µl 加えよく攪拌し、速やかに 200 µl を上記の細胞と菌の混合液に加え、十分に攪拌する。1~2 日実験台の上で通常の光 (昼間の間接太陽光または室内照明) が当たる状態で放置して粘性と曳糸性を与えた。陽性度の再現性の検討では、4 種類 (±, 1+, 2+, 3+, Table 1) の陽性度の人工痰を調製し、長期保存安定性の検討には、2+ の人工痰を計 9 本の 50 ml 遠沈管に調製し、これを 3 本ずつに分け、ジップロックバッグに入れて、室温 (実験室内)、

冷蔵 (4℃ 冷蔵庫内)、冷凍 (-20℃ 冷凍庫内) に置き、3 カ月、6 カ月、9 カ月間保存した。これらの人工痰の保存後の性状、肉眼所見を Fujiki の方法⁹⁾により評価した。

(2) 塗抹標本作製、染色、鏡検

上記のとおり作製、保存した人工痰の粘性の高い部分から 1 白金耳分 (約 10 µl) をとり、シランコートスライド (S8443, 松浪硝子工業株式会社) に 2×3 cm の楕円形に塗抹し、常法に従い、乾燥、火焰固定の後、Ziehl-Neelsen (ZN) 染色を行った。乾燥後、カバーガラスで封入し、対物 100 倍の油浸レンズで鏡検、写真撮影を行った。各保存条件、保存期間について、最低 3 枚の塗抹標本作製し、100 視野観察し、ZN 染色陽性菌数を計数した。各条件における 1 視野あたりの平均陽性菌数を算出し、新鮮人工痰塗抹標本の値と比較し、独立 2 試料無作為化検定法⁷⁾により有意差検定を行った。

(3) 人工痰の鏡検所見の再現性の検討

4 段階の人工痰陽性度が塗抹、染色、鏡検するスタッフごとに再現性をもって維持されるかどうかを調べるため、当研究所の国際研修結核対策細菌検査マネジメントコースに参加した研修生のうち、研修中の試験で塗抹標本の作製、鏡検に関して Fujiki の方法⁹⁾による評価で合格点を獲得した研修生 4 名と、その指導者 1 名の計 5 名に、4 段階の陽性度の人工痰の塗抹、染色、鏡検を依頼し、陽性度の再現性を調べた。

結 果

(1) 人工痰の長期保存安定性

陽性度 2+ 相当の人工痰を室温、冷蔵、冷凍の 3 段階の温度条件で、3 カ月、6 カ月、9 カ月間保存して、各時点で人工痰そのものの肉眼所見、さらに、常法に従い、塗抹標本作製し、染色、鏡検して、塗抹標本の肉眼所見と顕微鏡観察による陽性度の検証を行った。長期保存人工痰の肉眼所見は Fig. 1 に示すとおりである。室温、冷蔵で保存された人工痰は最長 9 カ月までの保存で、変化は見られなかったが、冷凍保存した人工痰の肉眼所見は、細胞成分を含む白色ゲル状部分とそれ以外の液体部分が明瞭に分離していた。

次に、塗抹染色標本の肉眼所見、顕微鏡所見を Fig. 2

Table 1 Definition of the positivity grades by IUATLD scale

Grade	Definition
- (negative)	No AFB found in at least 100 fields
±	1-9 AFB/100 fields
1+	10-99 AFB/100 fields
2+	1-10 AFB/field in at least 50 fields
3+	>10 AFB/field in at least 20 fields

AFB: Acid-fast bacilli

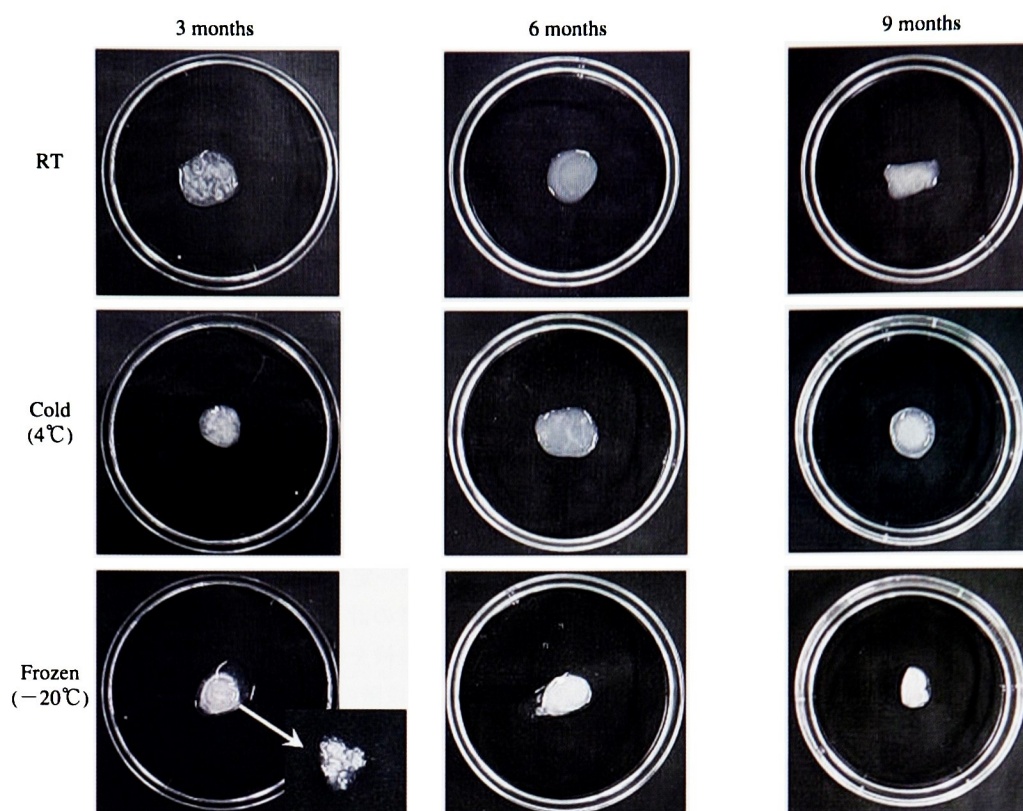


Fig. 1 Macroscopic appearance of long-term stored artificial sputa at different conditions. RT: room temperature. Inset in 3 months of frozen sample shows appearance after loosening cell clump.

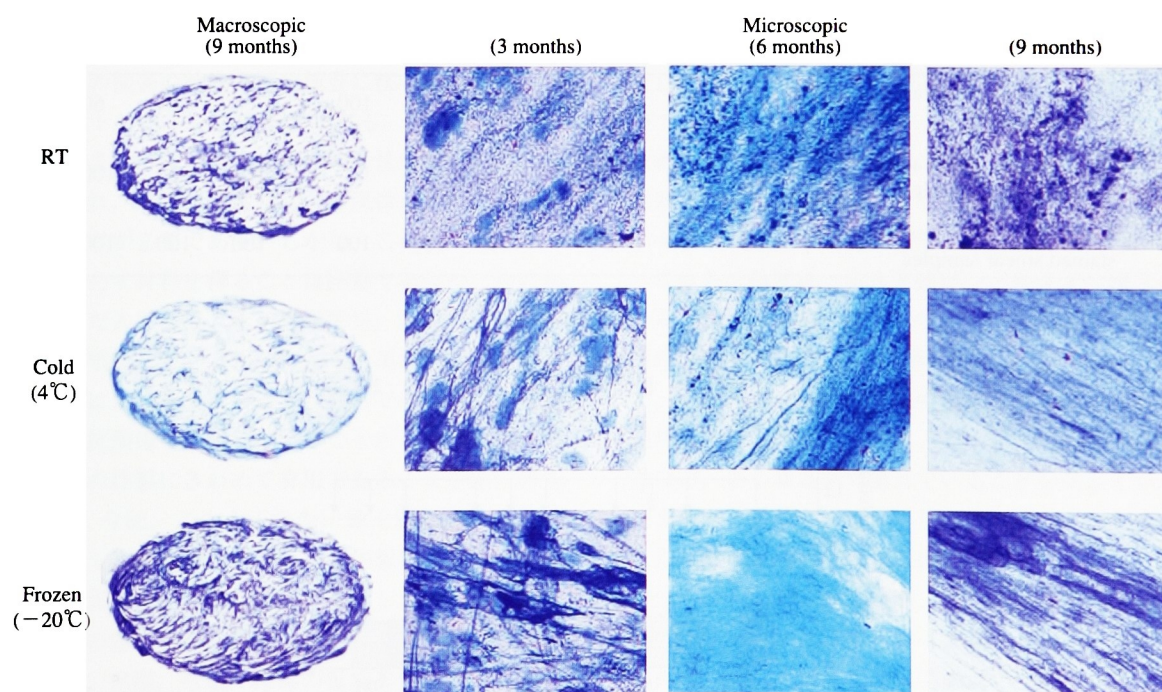


Fig. 2 Macroscopic and microscopic appearance of smears prepared from long-term stored artificial sputa at different conditions. Macroscopic appearance was shown only for 9-month stored samples.

に示す。塗抹染色標本では、肉眼的にはいずれの保存条件、保存期間の標本でも差異は見られなかったが、顕微鏡所見では、室温で6カ月以上保存した人工痰の塗抹標本で線維成分の減少が観察された。しかし、その他の点では人工痰に求められる塗抹および抗酸菌と他の基質成分の染色の再現性について支障はないと考えられた。長期保存人工痰とその塗抹標本の肉眼所見、顕微鏡所見について Fujikiの方法⁶⁾で総合的に評価した結果を Table 2 にまとめた。

表に示すように、冷蔵で長期保存した人工痰およびその塗抹標本は肉眼所見、塗抹標本の顕微鏡所見のいずれにおいても作製直後の人工痰と同様の特徴を保持していた。室温および冷凍保存した人工痰およびその塗抹標本に関しては、室温で長期保存した場合、顕微鏡所見において線維成分の減少が見られた。また、冷凍長期保存人工痰の肉眼所見が細胞成分と液体部分の分離を呈していたが、塗抹標本は新鮮調製標本と同様であった。これらの所見は、保存条件の違いにより生じた変化であるが、人工痰の本来の要件を減じるものではなく、利用者が念頭に置いておけば大きな問題は生じないと考えられる。

さらに、人工痰の塗抹染色標本に見られる抗酸菌の陽性度がこれらの保存条件と保存期間を経た後も再現性を有するかどうかを検討した。Fig. 3に示すように、各

保存条件、保存期間を経た人工痰の塗抹標本3枚でそれぞれ100視野観察し、そこで観察された抗酸菌染色陽性菌数を300で除した1視野あたりの平均陽性度は、ある程度広がりをもっているが、新鮮人工痰の塗抹染色標本と比較して、有意な差を示す条件はなかった。

(2) 陽性度の再現性に関する検討

本人工痰は調製が容易であり、非病原性抗酸菌を用いていることに加えて、最大の長所は、陽性度の調節が任意に可能であることである。しかし、これまでの検討は著者によるものだけであったため、今回実際にフィールドで本人工痰を用いて塗抹標本を作製した場合に、陽性度が再現されるかどうかを検討した。この検討に当たって、当研究所で実施している国際研修結核対策細菌検査マネージメントコースに参加した研修生のうち、研修中の試験で一定レベルの技術を有すると判断された研修生と指導者の計5名に、4段階の陽性度の人工痰の塗抹、染色、鏡検を依頼した。結果は Table 3に示すとおりである。4段階の陽性度(±, 1+, 2+, 3+)について、5人で合計91枚の塗抹標本を作製して、鏡検した結果、±人工痰の一致率のみが92%であったが、残りの陽性度の人工痰では、1+の人工痰では3枚が±と判定され、2+の人工痰では1+, 3+と判定された標本が各1枚ずつあったが3+の人工痰はすべて3+と判定され、1+,

Table 2 Scores of artificial sputum qualities in long-term storage

Condition Term (Months)	RT storage			Cold storage (4°C)			Frozen storage (-20°C)		
	3	6	9	3	6	9	3	6	9
Macroscopic appearance of artificial sputum	100	100	100	100	100	100	60	60	60
Macroscopic appearance of stained smear samples	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Microscopic appearance of stained smear samples	100	90	80	100	100	100	100	100	100

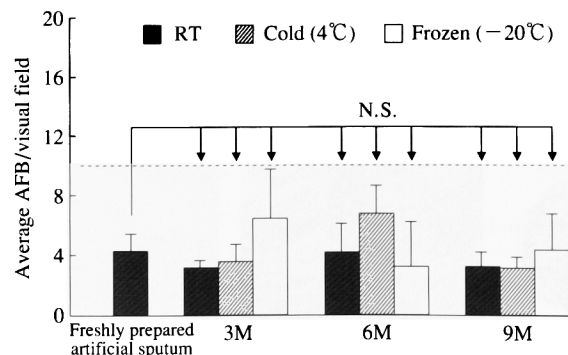


Fig. 3 Reproducibility of positivity in smears prepared from long-term stored artificial sputa. AFB: acid-fast bacilli. Original positivity of the artificial sputum was set as 2+, ie, 1 to 9 AFB per visible field should be observed. Dotted line indicates 10 AFB/field, which discriminates between 2+ and 3+

Table 3 Examination results of smears prepared from the artificial sputum stock specimen with four positive grades

Stock specimen	Smear results*					Total
	—	±	1+	2+	3+	
±	3	33	0	0	0	36
1+	0	3	16	0	0	19
2+	0	0	1	17	1	19
3+	0	0	0	0	17	17
Total	3	36	17	17	18	91

*Correct results were within the bold line.

Table 4 Consistency between prepared grades of stock artificial sputum and examined smears

Grade of stock artificial sputum	Number of smears	Consistency	Consistence (%)
±	36	33	92*
1+	19	19	100
2+	19	19	100
3+	17	17	100

*3 smears were determined as negative.

2+, 3+のグレードに関しては100%の一致率であった。陽性度±の人工痰の不一致は36枚中3枚が陰性と判断されたものであった (Table 4)。

考 察

結核菌塗抹検査は、結核患者を検出するための手段として、迅速かつ安価な優れた方法である。抗酸菌塗抹陽性結果は感染性や入院適応の判断に必須である。したがって、この検査の精度保証や検査に携わるスタッフの技術標準化トレーニングは重要である。そのためには、標本内に含まれる抗酸菌染色陽性の菌量が明らかな材料から作製され、陽性度高精度の再現性があるパネルテストスライドが必要である。しかし、これまで、これらの条件を満たす材料を得ることは困難であった。われわれが開発した人工痰は、その肉眼所見、顕微鏡所見が実際の喀痰に類似しているだけでなく、添加する菌量を調節することにより陽性度の設定が容易であり、なおかつ非病原性の抗酸菌を使用していることから、パネルテストスライドの作製にきわめて有用であることを既に報告している⁹⁾。今回、この人工痰が、途上国を含む一般検査室で用いられることを考慮して、作製後いくつかの温度条件で、異なる期間にわたって保存した場合、性状ならびに当初の陽性度が維持されるかどうかを検討した。

その結果、室温、冷蔵、冷凍の温度条件で、最長9カ月まで保存した人工痰の性状、および塗抹標本の顕微鏡所見は、調製直後の人工痰と顕著な差がなく、Z-N染色後の陽性度も維持されていることが明らかになった。

また、今回の人工痰を当研究所で作製し、途上国など

に送付した後、現地のスタッフが塗抹標本を作製、染色した場合に、当初の陽性度が維持され、必要とするパネルテストスライドセットの作製が可能かどうかを調べるために、当研究所国際研修結核対策細菌検査マネージメントコースに参加した研修生と指導者に本人工痰を用いて、塗抹標本の作製、染色、鏡検を依頼し、当初の陽性度に応じた結果が得られるかどうかを検討した。その結果、4段階の陽性度で、±の人工痰で一致率が92%であったが、1+, 2+, 3+の人工痰はすべて100%の一致率であった。このことから、本人工痰は、一定レベルの技術を有するスタッフにより塗抹標本が作製されれば、当初の陽性度が維持され、現地でのパネルテストスライドセットの作製が可能であることを示している。

これらの結果は、本人工痰が、これまでに報告されているメチルセルロース法⁸⁾や、実際の抗酸菌陽性喀痰と陰性喀痰を用いる方法で作製される人工痰⁹⁾と比較して、人工痰そのものの性状のみならず、その陽性度の再現性の高さ、調製の容易さ、バイオハザードレベルの低さなど、あらゆる面で優れていることを示している。本人工痰は、基質がポリアクリルアミドであるため、添加した抗酸菌は調製後数日以内に死滅し、培養技術の評価には用いられないが、反面、室温で保存した場合でも雑菌の増殖、コンタミネーションが生ずる危険がなく、長期保存に適していると考えられる。さらに、NaOH法やNALC法で実際の抗酸菌陽性痰を用いる場合のように⁹⁾、あらかじめ材料をホルムアルデヒドのような毒性の高い試薬により固定する必要がないので、有害な薬品の暴露を受ける危険もない。

本人工痰作製に関する唯一の問題は、細胞培養に必要な培地に添加するウシ胎仔血清が高価な点である。現在、無血清培地を用いて THP-1 細胞を培養する方法を検討中であり、これが可能になれば、われわれの試算で、当初塗抹標本 1 枚あたり約 120 円必要であった経費が、半分以下の 50 円を切ることができる。

これらの点から、本人工痰は塗抹検査の外部精度評価、検査室のスタッフのトレーニングのためにきわめて有用であり、今後広く応用されることが期待される。

謝 辞

この研究は 2005 年度厚生労働科学研究補助金・新興・再興感染症研究事業「小児結核及び多剤耐性結核の予防、診断、治療における技術開発に関する研究」から研究費の補助を受けて実施された。

文 献

- 1) Toman K: Tuberculosis case-finding and chemotherapy. Questions and answers. WHO, Geneva, 1979, 6-7.
- 2) Lan NTN, Wells CD, Binkin NJ, et al.: Quality control of smear microscopy for acid-fast bacilli: the case for blinded re-reading. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999; 3: 55-61.
- 3) Martinez-Guarneros A, Balandrano-Campos S, Solano-Ceh MA, et al.: Implementation of proficiency testing in conjunction with a rechecking system for external quality assurance in tuberculosis laboratories in Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003; 7: 516-521.
- 4) Tuberculosis Division: Tuberculosis bacteriology-priorities and indications in high prevalence countries: position of the technical staff of the Tuberculosis Division of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005; 9: 355-361.
- 5) Yamada H, Mitarai S, Aguilman L, et al.: Preparation of mycobacteria-containing artificial sputum for TB panel testing and microscopy of sputum smears. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006; 10: 899-905.
- 6) Fujiki A: AFB microscopy training. The Research Institute of Tuberculosis, Tokyo, 2005, 9-38.
- 7) 石居 進: 生物統計学入門. 培風館, 東京, 1975, 151-153.
- 8) de Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, et al.: Laboratory services in tuberculosis control. Organization and management Part I. WHO, Geneva, 1998, 42-43.
- 9) Aziz MA, Ba F, Becx-Bleumink M, et al.: External quality assessment for AFB smear microscopy. Association for public health laboratories, Washington DC, 2002, 1-111.

Original Article

STABILITY FOR LONG-TERM STORAGE AND REPRODUCIBILITY OF POSITIVITY IN THE PANEL TEST SLIDE PREPARED WITH THE POLYACRYLAMIDE-BASED ARTIFICIAL SPUTUM

¹Hiroyuki YAMADA, ²Hiroko MATSUMOTO, ¹Satoshi MITARAI, and ³Akiko FUJIKI

Abstract [Objective] A novel artificial sputum has been developed using polyacrylamide, cultured THP-1 cell and BCG-Pasteur. Smears prepared with this artificial sputum are similar to actual sputum and has feasibility to set any positivity grades. Long-term storage and reproducibility of the positivity was examined to support further availability.

[Method] The artificial sputa were stored for up to 9 months at room temperature, 4°C and -20°C. Then, smears were prepared and their macroscopic and microscopic appearance were examined compared with smears from freshly prepared artificial sputum. Furthermore, smears with different positivities (\pm , 1+, 2+ and 3+) were prepared and examined by several trained technicians, and the reproducibility of the original sputum positivity was determined.

[Results] Macroscopic and microscopic appearance of smears prepared from long-term stored artificial sputum showed little changes compared with smears of freshly prepared artificial sputum. The positivity of these smears fell in their original grade. A total of 91 smears were prepared from artificial sputum with different positivity and examined by trained technicians. Although 3 out of $36 \pm$ smears were

determined as negative, all of the remaining smears were evaluated correctly.

[Discussion] This study confirmed that the artificial sputum and the smears have long-term storage stability and reproducibility in the positivity. These results suggest that the artificial sputum can be widely used to perform external quality assessment in many countries, including high prevalence countries.

Key words : Smear examination, Artificial sputum, Long-term storage, Reproducibility

¹Bacteriology Division, Mycobacterium Reference Center, ²Department of International Cooperation, ³Department of Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

Correspondence to: Hiroyuki Yamada, Bacteriology Division, Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: hyamada@jata.or.jp)