

MGITの前処理液BBLマイコプレップと2%NaOH 処理との比較

¹富田 元久 ¹竹野 華 ²吉田志緒美 ²鈴木 克洋
³坂谷 光則

要旨：〔目的〕 喀痰の雑菌処理法を改善する目的で、患者喀痰をKT式喀痰容器で物理的に潰し、プレソルブで酵素処理をして得られた検体を用いてBBLマイコプレップと自家性の2%NaOHとの間で培養陽性日数、陽性率、雑菌汚染率について比較を行った。〔方法〕 当院結核菌検査依頼の喀痰113例を使用した。喀痰はSAP集菌法で処理をした後2等分し、マイコプレップと自家製2%NaOHの各方法で前処理を行った。〔結果〕 培養陽性日数は、マイコプレップでは4日～20日（平均値11日）、2%NaOHでは4日～40日（平均値8日）であった（ $p>0.5$ ）。培養陽性数はマイコプレップ19例（16.9%）、2%NaOH 18例（16.0%）、一致率は97.0%であった（ $p>0.5$ ）。雑菌汚染率はマイコプレップ7例（6.2%）、2%NaOH 1例（0.9%）であった（ $p>0.5$ ）。〔結語〕 液状化した喀痰を用いた場合、マイコプレップ処理と2%NaOH処理で十分に雑菌処理ができるか否かの検討を行った結果、両方法の培養陽性率、雑菌汚染率、培養陽性日数には有意な差がなく、2%NaOH処理は有用な方法であると考えられた。

キーワード：MGIT, NALC/NaOH, 2%NaOH, セミアルカリプロテアーゼ, 前処理法

目 的

現在、抗酸菌培養検査は迅速性に優れている液体培地が主流となり、当院もMGIT（日本ベクトン・ディッキンソン）を用いている。MGITに用いる検体の除菌処理方法はNALC/NaOH法¹⁾²⁾であるが、この方法は喀痰の粘液を溶解する時間が15分間しかなく、溶解が不十分になることがあるため、雑菌汚染率を抑えるには熟練を必要とする。われわれは、喀痰をまずセミアルカリプロテアーゼ（SAP）集菌法で処理をする。SAPは、NALC（N-アセチル-L-システイン）と同じ作用で喀痰の粘液を溶解する。この方法は喀痰の粘液を溶解する時間が十分にとれ、集菌するための遠心操作は洗浄効果があるので、雑菌汚染率、PCRの阻害の軽減につながる。次にNALC/NaOHによる雑菌処理へ移行している^{2)~4)}。本研究では、われわれが考案した喀痰を採取容器の内側に突起物を付けた改良型容器（KT式喀痰容器：アジア器材）⁵⁾

で物理的に潰しながらセミアルカリプロテアーゼ（プレソルブ：日水製薬）で酵素処理をして得られた喀痰を用いて、NALC/NaOHと同じ濃度の2%NaOHのみで除菌処理を試みた。比較する前処理液は、NALC/NaOHであるBBLマイコプレップ（日本ベクトン・ディッキンソン：以下マイコプレップ）を用いた。マイコプレップは2%NaOH-citrate solution溶液のボトルに、NALCの入ったアンプルを割り混和して、NALC/NaOH液が調製できる製品である。このマイコプレップと自家性の2%NaOHとの間で培養陽性日数、陽性率、雑菌汚染率について比較検討した。

対象・方法

2004年11月に当院で結核菌検査依頼があった喀痰113例を使用した。喀痰の塗抹結果の内訳は、（-）104例、（2+）5例、（3+）4例である。喀痰はルーチンに実施しているSAP集菌法で処理後2等分し、マイコプレップ

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹研究検査科²臨床研究センター、³内科

連絡先：富田元久，独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター研究検査科，〒591-8565 大阪府堺市北区長曾根町1180（E-mail: mhtomita@kch.hosp.go.jp）

（Received 9 Nov. 2007 / Accepted 14 Feb. 2008）

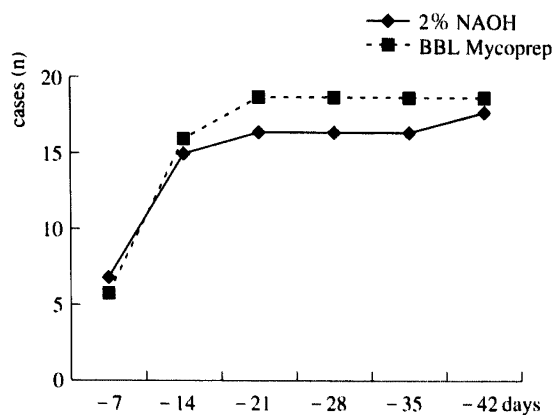


Fig. The cumulative period required for the detection of mycobacteria by two decontamination methods. (n=113)

Table Comparison between 2% NaOH method and BBL Mycoprep in the recovery of mycobacteria

		2%NaOH method		
		Positive	Negative	Total
BBL Mycoprep	Positive	17	2*	19
	Negative	1**	93	94
	Total	18	95	113

**M. fortuitum* and *M. terrae*

***M. intracellulare*

ブと自家製2%NaOHの各方法で雑菌処理を行った。雑菌処理の方法は、条件を同じにするためにマイコプレップの説明書に準じた。培地はMGITを使用し、MGIT 960 (日本ベクトン・ディッキンソン)で最終42日まで培養した。抗酸菌の同定は、キャピリアTB (日本ベクトン・ディッキンソン)、コバス アンプリコア (ロシュ・ダイアグノスティックス)、アキュープロブカンサシ研究用 (極東製薬工業)、DDHマイコバクテリア (極東製薬工業)を用いて行った。統計学的検討にはt検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと考えた。

結 果

培養陽性日数は、マイコプレップが4日~20日 (平均値11日)、2%NaOHは4日~40日 (平均値8日)であり、2法間に有意差は認められなかった ($p > 0.5$)。また、Fig.に示した累積陽性数のグラフから両処理の発育速度に差がないという結果が示された。培養陽性数は、Tableに示すように、マイコプレップ19例 (16.9%)、2%NaOH 18例 (16.0%)となり、一致率は97.0%であった。有意差検定では有意差は認められなかった ($p > 0.5$)。発育した抗酸菌の内訳は、*M. tuberculosis* 14株、*M. intracellulare* 1株、*M. kansasii* 3株、*M. fortuitum* 1株、*M. terrae* 1株であった。雑菌汚染率はマイコプレップ7例

(6.2%)、2%NaOH 1例 (0.9%)となり、ここでも有意差は認められなかった ($p > 0.5$)。

考 察

今回、SAP集菌法を用いてマイコプレップと2%NaOH前処理の比較を行ったところ、培養陽性日数の平均値では2%NaOHが3日短縮したが、有意な差は認められず、また、累積陽性数からも両処理の抗酸菌に対するアルカリの影響も同程度であることが考えられた。培養陽性数はマイコプレップ19例、2%NaOH 18例で1例の差があった。培養陽性数の不一致例の詳細は、マイコプレップ培養陽性、2%NaOH陰性が2例あり、菌種は*M. fortuitum* 1例、*M. terrae* 1例であった。マイコプレップ培養陰性、2%NaOH陽性は1例あり、その菌種は*M. intracellulare*であった。これらの不一致が生じた原因として、塗抹陰性検体で、菌量が少なく、また完全に喀痰を2等分できなかつたことが考えられる。雑菌汚染率はマイコプレップ7例、2%NaOH 1例と2%NaOHの雑菌汚染率が低い結果であった。これは喀痰を2%NaOHで処理する際、新しい容器に分取りして処理したが、マイコプレップのほうは、患者が採痰に用いた容器で処理を行ったため、容器の内側に付着した雑菌が影響を及ぼしたものと考えられる。しかし、有意な差が認められなかったことから、両処理法の雑菌処理能力に違いは見られなかった。

喀痰を直接2%NaOHで処理をすると、粘液中の雑菌にはNaOHの作用が届かず、結果的に雑菌汚染率が上がるため、2%NaOHを用いる場合は、前処理をする前にセミアルカリプロテアーゼで十分に喀痰の液状化を行い、雑菌汚染率を抑えることが重要である。われわれは喀痰容器の改良による物理的作用⁵⁾と酵素的作用の両方の処理により、十分に喀痰の液状化できるSAP集菌法を行った。喀痰の消化汚染除去の処理能力の比較でも、2%NaOHとマイコプレップの間には同程度の効果が観察されたので、2%NaOH処理で問題がないと考えられた。ルーチンでの試薬管理の問題として、NALC/NaOHは使用当日に調整を行い、調整後の使用期限は24時間であるために、試薬調整管理が煩雑なことがあげられる。しかし、2%NaOHは調整後も室温で長期保存が可能のため、管理が容易となり、しかも安価である。したがって、熟練を要するNALC/NaOH法の代わりに、SAP集菌法で喀痰を処理して、2%NaOHでMGITの前処理を行えることは、未経験者でも適切な前処理操作を行える有用な方法であり、特に少数の検体を扱う施設においては在庫負担の軽減という観点からも、2%NaOHの使用は有益であると考えられた。

結 語

SAP集菌法により得た沈査を2等分し、MGITを用いてマイコプレップと2%NaOHの前処理の比較を行った結果、培養陽性日数、培養陽性率、雑菌汚染率すべてに有意差はなく、2%NaOHを前処理に使用できることが示された。

謝 辞

本研究にご協力いただきましたNHO近畿中央胸部疾患センター研究検査科 小池山紀子氏に深謝します。

文 献

1) 日本ベクトン・ディッキンソン：培養固定・抗酸菌キッ

ト (MGIT法) ミジット分離培養剤, 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京, 2007.

2) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：結核菌検査指針2007. 結核予防会, 東京, 2007.

3) 斉藤 宏, 山根誠久：Semi-Alkaline Protease処理を併用したN-Acetyl-L-Cysteine-NaOH (NALC-NaOH) 喀痰前処理法での全自動抗酸菌培養システム, MB/BacTの評価. JARMAM. 1999; 10: 103-110.

4) 木下幸保, 竹野 華, 富田元久, 他：抗酸菌塗抹検査における集菌法の有用性. 医学検査. 2001; 50: 1182-1187.

5) 富田元久, 木下幸保, 入江章子, 他：採痰容器の改良—喀痰の均質化を目指して. 臨床検査. 2001; 45: 447-448.

Short Report

COMPARISON OF BBL MYCOPREP AND 2%NaOH DECONTAMINATION PROCEDURES FOR MGIT

¹Motohisa TOMITA, ¹Hana TAKENO, ²Shiomi YOSHIDA, ²Katsuhiro SUZUKI, and ³Mitsunori SAKATANI

Abstract [Objectives] We compared the BBL Mycoprep (Becton Dickinson Japan) and home-made 2%NaOH decontamination procedures by using an equal amount of expectorated sputum in the aerosol-free 30 ml KT centrifuge tube with the rugged inner surface.

[Method] A total of 113 sputum specimens obtained in NHO Kinki-Chuo Chest Medical Center in November 2004 were subjected to two decontamination methods. All specimens were divided into two equal portions after concentrating the sediments processed by semi-alkaline protease (SAP), then decontaminated, and inoculated into MGIT. The tubes were incubated at 37°C and monitored for up to forty-second days.

[Results] Comparing these decontamination procedures, the time of the recovery of mycobacteria strains in the 2% NaOH (mean 8 days) was significantly faster than in the BBL Mycoprep (mean 11 days). Of these, 19 specimens (16.9%) processed by the BBL Mycoprep were positive for growth of mycobacteria, and similarly 18 specimens (16.0%) processed by the 2%NaOH ($p>0.5$) were positive. The 19 mycobacteria recovered by the BBL Mycoprep were identified as 14 *M.*

tuberculosis strains and 5 NTM strains. The decontamination rate was 0.9% in 2%NaOH and 6.2% in Mycoprep, however the difference was statistically not significant ($p>0.5$).

[Discussion] We verified that the 2%NaOH was an alternative method suitable for the digestion and decontamination procedure, and 2%NaOH was useful for the isolation and detection of mycobacteria as well.

Key words : MGIT, NALC/NaOH, 2%NaOH, Semi-alkaline protease, Decontamination procedure

¹Department of Clinical Laboratory, ²Clinical Research Center, ³Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Motohisa Tomita, Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8565 Japan.

(E-mail: mhtomita@kch.hosp.go.jp)