

## コバス®TaqMan48の基礎的評価と臨床検体による検討

<sup>1</sup>日暮 芳己   <sup>2</sup>佐藤 高彰   <sup>2</sup>平井 鉄三   <sup>1</sup>森屋 恭爾  
<sup>1</sup>小池 和彦

**要旨:**〔目的〕結核は感染対策上重要な疾患であり、特に、塗抹検査陽性の場合、結核菌か否かを迅速に鑑別する必要がある。私達はコバス®TaqMan48とコバスアンプリコア®との比較検討を行った。〔方法・対象〕*M. bovis* (ATCC19210)の菌液(5×10<sup>4</sup>cfu/mL)を用い、10倍希釈系列を作成後、添付文書に従い、最小検出感度を求めた。従来法との一致率の評価は、NALC-NaOH処理済凍結保存検体73件〔結核菌群は34件、NTMは39件〕を対象として行った。〔結果〕コバス®TaqMan48は、コバスアンプリコア®と同等の検出感度であり、最小検出感度は5×10<sup>2</sup>cfu/mL、再現性も良好であった。培養法との一致率はコバス®TaqMan48は58.8%、コバスアンプリコア®は67.6%で両者に有意差はなかった。試薬分割の検討では、試薬分割後、16日まで安定であった。〔結論〕コバス®TaqMan48の使用により、結核菌群の同定に時間短縮が図られ、迅速な感染対策の実施が可能となった。

**キーワード:** COBAS®TaqMan 48, 結核菌群

### 序 文

結核は世界的に蔓延する感染症で、公衆衛生学的に重要な細菌のひとつである。世界保健機構(WHO)は、2006年の統計結果として、新規感染者920万人のうち、410万人が塗抹検査陽性、HIV陽性者は70万人、結核による死亡者は170万人<sup>1)</sup>と報告している。

2006年に集計された日本国内における結核の状況は([http://www.jata.or.jp/rit/rj/data\\_tp.html/2008.8.22](http://www.jata.or.jp/rit/rj/data_tp.html/2008.8.22)), 26,384人の新規登録患者のうち、61.5%が60歳以上、23.8%が80歳以上で、1950年以前に生まれ青年期までに結核に感染した集団で、糖尿病、悪性腫瘍や免疫抑制剤使用等の内因的要因を基礎疾患として、結核を発症していると予測される。20~30歳代は、不規則な生活様式が発病リスクを高め、20歳代の結核発病者の多くは、最近の新しい感染であり、発病者には外国人結核患者も含むことから、その動向に注意が必要である。

結核菌の感染は、結核菌を排菌している患者の咳により飛散する飛沫に含まれる結核菌を吸入して成立することから<sup>2)</sup>、医療関連施設における感染対策の対象として

重要な病原菌であることは周知のとおりである。

HIV感染流行国では、塗抹検査陰性の肺結核および肺外結核が増加し、HIV感染を伴う結核菌群感染者は、HIV感染を伴わない結核菌感染者に比較して死亡率が高い<sup>3)</sup>。

結核症の診断は、臨床症状、画像検査、ツベリクリン反応、細菌学的検査、遺伝子増幅検査、血清学的検査があり、細菌学的検査の塗抹検査と培養検査は必須の検査である。塗抹検査は、培養検査に比べ感度は低いが、検査材料中の「抗酸菌の有無」を迅速に確認することが可能であり、排菌量の把握、治療経過の評価、退院時期の判断など患者の管理において、必須の検査である<sup>2)</sup>。しかし、新規患者の半数が塗抹検査陰性であり、初期治療の遅れも指摘されている<sup>4)</sup>。

塗抹検査陽性率、同定される菌種の分離頻度は、医療施設により異なり、特に、喀痰塗抹検査陽性の場合、患者の管理および有効な感染対策を実施するうえで、結核菌群とNTMの鑑別が早急に必要であり、検体の入手後1~2日で結果が得られる核酸増幅法による検査は有用である<sup>5)</sup>。

<sup>1</sup>東京大学医学部附属病院感染制御部、<sup>2</sup>ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

連絡先: 日暮芳己, 東京大学医学部附属病院感染制御部, 〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1  
(E-mail: HIGURASHI-LAB@h.u-tokyo.ac.jp)  
(Received 9 Jul. 2008/Accepted 16 Jan. 2009)

当院は結核病棟をもたず、陰圧病室の効率的利用および迅速な感染対策の実施のため、喀痰塗抹検査陽性患者に対し、結核菌群か否かの鑑別をより迅速に行うことを目標に掲げ、従来から導入されているコバスアンプリコア®(以下：従来法)と比較し、「①核酸抽出操作に大きな変化がない。②感度、特異度は大幅な変化がない。③診療報酬点数に収載されている検査法」の3項目に重点をおき、核酸抽出後、約2.5時間で検査結果を得ることが可能であるコバス®TaqMan48(以下：TaqMan法)を導入した。私達はTaqMan法の導入に先立ち、基礎的検討を行ったので結果を報告する。

### 対象と方法

従来法およびTaqMan法での測定は、添付文書に従い下記の検討を行った。

(1) 最小検出感度および異なるサンプル使用量での検出

最小検出感度は *Mycobacterium bovis* (ATCC19210) の菌液  $5 \times 10^4$  cfu/mL を作成し、4°C で保冷した滅菌生理食塩水で、 $5 \times 10^3$  cfu/mL から 5 cfu/mL の希釈菌液を作成した。作成した希釈菌液は、臨床検体と同様に扱い、3回の反復測定を行った。

また添付文書<sup>6)</sup>では、核酸抽出時に使用するNALC-NaOH処理済検体は100  $\mu$ Lと指示されるが、異なるサンプル量(150  $\mu$ L, 125  $\mu$ L, 75  $\mu$ L, 50  $\mu$ L)での検出感度の検討を菌量  $5 \times 10$  cfu/mL の希釈菌液をサンプルとし、2回の反復測定を行った。

(2) 臨床検体を用いた培養検査、従来法との一致率

2001年から2006年に検査依頼があり、-20°C以下で凍結保存された、喀痰、胃液、気管洗浄液等に由来するN-acetyl-L-cysteine (NALC)-NaOH処理済凍結保存検体73件〔結核菌群：34件、Non-tuberculosis mycobacteria (NTM)：39件〕を用いた。核酸抽出後、従来法とTaqMan法による測定を1回行い、測定時の結果を比較した。なお、培養検査は、NALC-NaOH処理済検体を固形培地(工藤PD培地：日本BCG)に100  $\mu$ Lを接種後、培養を開始し、1回/週の頻度で目視にて、菌の発育を確認した。液体培地(バクテアラート®3D)は、同様のNALC-NaOH処理済検体500  $\mu$ Lを接種後、培養を開始し、陽性シグナルの有無により、菌の発育を確認した。なお、培養温度はいずれも35°Cで行い、発育菌の抗酸性は、チール・ネールゼン染色で確認した。培養検査の結果は、いずれか1法または両方で抗酸菌の発育を確認した場合を抗酸菌培養陽性とした。

(3) 従来法とTaqMan法の結果の検証

測定結果が不一致であった検体は、再度核酸抽出を行い、Master Mix試薬(MMX試薬)と核酸抽出検体との混和を十分に行った後(ピペットにて3回の混和)、各々の方法で4回の反復測定を行った。なお、再度核酸抽出を行うまでの期間、NALC-NaOH処理済凍結保存検体は、-20°C以下にて凍結保存を行った。

(4) 試薬を分割した場合の安定性 (Fig.)

①事前の試薬分割

1バイアル12検体分のMMX試薬を、1バッチあたり

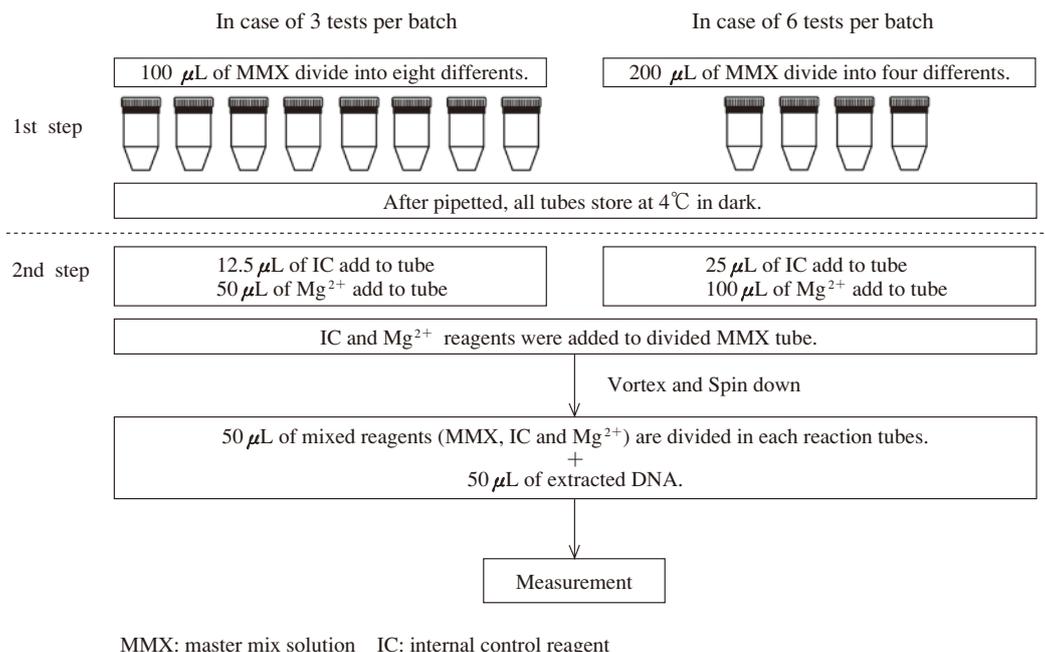


Fig. Procedure of reaction reagents divide

3 検体分の分割（検体1テスト，陰性・陽性コントロール各1本）に必要な分量とした。また，MMX 試薬を1 バッチあたり6 検体分の分割（検体4テスト，陰性および陽性コントロール各1本ずつを合わせた計6テスト分）に必要な分量とした。

3 検体分は MMX 試薬 100  $\mu\text{L}$  を，6 検体分は MMX 試薬 200  $\mu\text{L}$  を，それぞれ遮光チューブに分割し，アルミ箔で遮光した後，測定日まで冷蔵（4℃）保存した。

#### ②測定日の試薬分注

3 検体分の MMX 試薬を分注したチューブは内部コントロール（IC）試薬 12.5  $\mu\text{L}$ ，マグネシウム試薬（Mg）50  $\mu\text{L}$  を添加した。6 検体分の MMX 試薬を分注したチューブは，IC 25  $\mu\text{L}$ ，Mg 100  $\mu\text{L}$  を加え，測定を行った。

#### ③試薬の安定性および同時再現性

MMX 試薬は分割後，7日，14日および16日目まで遮光状態（4℃）で保存した。測定に用いた検体は，キットに付属の陽性コントロール DNA を，5 copy/1 反応相 当に希釈した21 検体，陰性コントロール検体2 検体および陽性コントロール検体1 検体について行った。

## 結 果

#### （1）最小検出感度および異なるサンプル使用量での検出

5  $\times 10^4$  cfu/mL は従来法と TaqMan 法の両方で検出されたが，同時再現性に不一致があった。しかし，5  $\times 10^2$  cfu/mL では従来法と TaqMan 法ともに3 回の反復測定中3 回で陽性となり，同時再現性が良好であった。よって，最小検出感度は，5  $\times 10^2$  cfu/mL とした（Table 1）。

また，同時再現性に不一致を示した5  $\times 10^4$  cfu/mL の菌液を用い，核酸抽出時に使用する検体量を150  $\mu\text{L}$  から50  $\mu\text{L}$  まで変化させた。従来法は150  $\mu\text{L}$  から75  $\mu\text{L}$  の検体量で半数が陽性となり，50  $\mu\text{L}$  では陰性であった。また，TaqMan 法は検体量が150  $\mu\text{L}$  と75  $\mu\text{L}$  で半数が陽性となり，100  $\mu\text{L}$  と50  $\mu\text{L}$  では陰性であった（Table 2）。

#### （2）培養法との一致率

培養法との一致率は，従来法で67.6%，TaqMan 法で58.8%であった。塗抹検査陽性群11 例の一致率は，従来法で90.9%，TaqMan 法で81.8%であった。塗抹検査陰性群23 例の一致率は，従来法で56.5%，TaqMan 法で47.8%であった。NTM 培養陽性例では，従来法および TaqMan 法はともに陰性であった（Table 3）。

培養法と従来法または TaqMan 法の結果が不一致となった症例のうち，追跡が可能であった1 例は，塗抹検査陰性，従来法および TaqMan 法で「結核菌群陰性」と判定した。培養検査の結果，発育コロニー数は5 cfu/100  $\mu\text{L}$  であった（Table 4）。

#### （3）従来法と TaqMan 法の結果の検証

従来法と TaqMan 法の結果に不一致が生じた5 例のうち4 例が，従来法が陽性，TaqMan 法は陰性であった。1 例は従来法で陽性と判定されたが，TaqMan 法は IC が検出されず再測定の対象となった。再測定の結果，すべての測定で IC は検出され，2 例は両者で4 回の測定が陽性となり，他3 例は両者の結果に不一致がみられた（Table 5）。

#### （4）試薬を分割した場合の安定性の検討

3 検体分/1 バッチに分割した試薬および6 検体分/1 バッチに分割した試薬ともに，試薬分割後，16 日後ま

**Table 1** Minimum detection of colony forming unit per mL COBAS Amplicor® vs COBAS®TaqMan48

CFU/mL	COBAS Amplicor®				COBAS®TaqMan48			
	Abs at 660 (nm)		Result	Positive rate (No. of positive /No. of test)	Ct value		Result	Positive rate (No. of positive /No. of test)
	MTB	IC			MTB	IC		
5 $\times 10^4$	3.754	3.453	Positive	3/3	33.5	37.4	Positive	3/3
	3.754	4	Positive		34.2	37.6	Positive	
	3.453	4	Positive		33.4	37.8	Positive	
5 $\times 10^3$	3.453	3.754	Positive	3/3	37.5	38	Positive	3/3
	3.578	4	Positive		36.6	37.7	Positive	
	3.754	3.578	Positive		37.4	38.3	Positive	
5 $\times 10^2$	3.754	4	Positive	3/3	41	38.4	Positive	3/3
	1.761	4	Positive		40.7	38.4	Positive	
	4	4	Positive		42.5	38.6	Positive	
5 $\times 10$	3.453	4	Positive	1/3	44.8	38.4	Positive	2/3
	0.02	4	Negative		–	38.4	Negative	
	0.02	4	Negative		44.9	37.6	Positive	
5	0.02	4	Negative	0/3	–	38.2	Negative	0/3
	0.02	3.357	Negative		–	38.1	Negative	
	0.03	4	Negative		–	38.1	Negative	

MTB: *M.tuberculosis* complex, IC: Internal control, Abs: Absorbance

**Table 2** Comparison of target gene detection to each volume *M. bovis* solution, COBAS Amplificor® vs COBAS®TaqMan48

5×10 CFU/mL	COBAS Amplificor®				COBAS®TaqMan48			
	Abs at 660 (nm)		Result	Positive rate (No. of positive /No. of test)	Ct value		Result	Positive rate (No. of positive/ No. of test)
	MTB	IC			MTB	IC		
150 (μL)	1.030	4.000	Positive	1/2	43	37.7	Positive	1/2
	0.001	3.750	Negative		-	38.7	Negative	
125 (μL)	0.004	4.000	Negative	1/2	43.5	38.1	Positive	2/2
	0.842	3.574	Positive		43.5	39.4	Positive	
100 (μL)	0.003	3.574	Negative	1/2	-	38.8	Negative	0/2
	1.364	3.750	Positive		-	38.2	Negative	
75 (μL)	0.001	3.750	Negative	1/2	-	38.2	Negative	1/2
	1.692	3.750	Positive		44	38.0	Positive	
50 (μL)	0.003	3.750	Negative	0/2	-	38.2	Negative	0/2
	0.002	3.574	Negative		-	38.3	Negative	

**Table 3** Comparison of COBAS Amplificor® and COBAS®TaqMan48 to detect for *M. tuberculosis* complex gene with culture, smear test and identification

			<i>M. tuberculosis</i> complex gene detection				p value
			Positive		Negative		
			No.	(%)	No.	(%)	
<i>M. tuberculosis</i> complex (n=34)	Culture positive (solid and/or liquid)	COBAS Amplificor®	23	(67.6)	11	(32.4)	N.S.
		COBAS® TaqMan48	20	(58.8)	14	(41.2)	
	Smear positive (n=11)	COBAS Amplificor®	10	(90.9)	1	(9.1)	N.S.
		COBAS® TaqMan48	9	(81.8)	2	(18.2)	
Smear negative (n=23)	COBAS Amplificor®	13	(56.5)	10	(43.5)	N.S.	
	COBAS® TaqMan48	11	(47.8)	12	(52.2)		
NTM (N=39)	Culture positive (solid and/or liquid)	COBAS Amplificor®	0	(0)	39	(100)	N.S.
		COBAS® TaqMan48	0	(0)	39	(100)	

A p value of less than 0.05 was considered statistically significant used by Fisher's exact probability test.  
NTM: Non-tuberculosis mycobacteria

**Table 4** Microbiological datas for discrepancy of culture and gene amplification test result

Case	Specimen	Culture (cfu/100 μL)	Smear	COBAS Amplificor®			COBAS®TaqMan48		
				Abs at 660 (nm)		Result	Ct value		Result
				MTB	IC		MTB	IC	
	Lymph node	Positive (5)	Negative	0.002	4.000	Negative	-	40.4	Negative

で、サンプル、陰性コントロールおよび陽性コントロールの検出は良好であった (Table 6)。

## 考 察

核酸増幅検査は、臨床検査の分野でも広く用いられ、結核菌群か否かの迅速な鑑別は、適切な治療法の選択や感染対策に有効である。現在、市販される各種核酸増幅法、培養法および臨床症状との検討では、感度53.6~100%、特異度99.2~100%と報告されている<sup>7)</sup>。従来法の感度や特異度は検査材料の種類や質により異なり、各種生検材料や体液を検体とした場合は、感度76.4%、特

異度99.8%<sup>8)</sup>、喀痰は感度83%、特異度99%<sup>9)</sup>、小児に由来する検体では、感度44%、特異度93.7%<sup>10)</sup>と報告されている。また、PCR陽性は塗抹検査陰性例で31.4%、塗抹陽性例で92.9%、PCR検査と塗抹検査、培養検査との一致率は、塗抹検査と培養検査ともに陽性例では94.4%、塗抹検査と培養検査ともに陰性例では16.7%と一致率に差がある<sup>2)</sup>。私達の検討では、培養検査の結果より結核菌群と同定された34例を対象に、従来法とTaqMan法の判定一致率は87%で、両者に有意差はなかった。

従来法の特徴は、ICの採用により検査材料中に存在

**Table 5** The results of re-tested for disagree with COBAS Amplicor® and COBAS®TaqMan48 in initial trial

Sample ID	Specimen	Smear	Result in initial trial			COBAS Amplicor®			COBAS®TaqMan48		
			COBAS Amplicor®	COBAS® TaqMan48	Test No	Abs at 660 (nm)		Result	Ct value		Result
						MTB	IC		MTB	IC	
0106-112	Gastric juice	Negative	Positive	Invalid	1	1.401	3.563	Positive	-	37.6	Target not detected
					2	2.738	3.739	Positive	-	37.7	Target not detected
					3	0.002	3.379	Negative	-	38.2	Target not detected
					4	0.002	3.739	Negative	44.5	38.5	>1 Detected
0107-297	Sputum	Negative	Positive	Target not detected	1	2.861	4.000	Positive	-	37.6	Target not detected
					2	0.002	3.736	Negative	-	38.1	Target not detected
					3	0.001	4.000	Negative	-	38.1	Target not detected
					4	0.001	3.338	Negative	-	38.1	Target not detected
0109-98	Sputum	Positive	Positive	Target not detected	1	1.388	4.000	Positive	42.8	38.9	>1 Detected
					2	2.082	3.736	Positive	41.8	37.7	>1 Detected
					3	0.619	3.736	Positive	43.8	38.2	>1 Detected
					4	1.405	3.736	Positive	41	37.8	>1 Detected
0112-264	Other	Negative	Positive	Target not detected	1	0.830	3.736	Positive	41.1	38.4	>1 Detected
					2	2.210	3.736	Positive	42	37.6	>1 Detected
					3	2.365	4.000	Positive	42.6	37.5	>1 Detected
					4	3.434	4.000	Positive	41.4	38.7	>1 Detected
0607-276	Sputum	Negative	Positive	Target not detected	1	1.278	4.000	Positive	-	38.2	Target not detected
					2	2.548	3.739	Positive	43.2	37.6	>1 Detected
					3	0.001	4.000	Negative	-	38.0	Target not detected
					4	0.002	4.000	Negative	-	38.3	Target not detected

Abs value  $\geq 0.35$  was considered as positive.

&gt;1 Detected was considered as positive.

Target not detected was considered as negative.

**Table 6** The stability with reaction reagents divided stored

Reagent was divided into 3 tests

Sample	Store at 4°C	0 day		7 days		14 days		16 days	
		No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
		Negative	0	( 0)	0	( 0)	0	( 0)	0
Positive	21	(100)	21	(100)	21	(100)	21	(100)	
Invalid	0	( 0)	0	( 0)	0	( 0)	0	( 0)	
Total	21	-	21	-	21	-	21	-	
Control	Negative control	Target not detected	-						
	Negative control	Target not detected	-						
	Positive control	>1 Detected	-						

Reagent was divided into 6 tests

Sample	Store at 4°C	0 day		7 days		14 days		16 days	
		No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
		Negative	0	( 0)	0	( 0)	0	( 0)	0
Positive	21	(100)	21	(100)	21	(100)	21	(100)	
Invalid	0	( 0)	0	( 0)	0	( 0)	0	( 0)	
Total	21	-	21	-	21	-	21	-	
Control	Negative control	Target not detected	-						
	Negative control	Target not detected	-						
	Positive control	>1 Detected	-						

する核酸増幅阻害因子の有無が確認可能であり<sup>11)12)</sup>, 偽陰性検体の判定に有用である<sup>11)</sup>. 結核菌群, *Mycobacterium avium* および *Mycobacterium intracellulare* のいずれも陰性となり, さらに IC が陰性の場合, 核酸増幅反応阻害因子による偽陰性も疑い, 滅菌水等による NALC-

NaOH 処理済検体の希釈を行った後, 再測定を行うことが推奨されている<sup>10)</sup>. TaqMan 法も同様に, IC が採用され, 従来法と同様の解釈が可能である。

核酸増幅検査は DNA 汚染による偽陽性例と, 材料中に含まれる核酸増幅反応阻害物質による偽陰性<sup>7)</sup>も報告

される。偽陰性の原因は、多くは未知の因子<sup>12)</sup>であるが、検体からの結核菌群 DNA の抽出不良（集菌や溶菌の問題）、核酸増幅反応阻害因子としてヘモグロビンやヘパリン<sup>13)</sup>が知られる。Rajalahti ら<sup>9)</sup>は、従来法の偽陰性は8%であり、偽陰性または核酸増幅反応阻害を示した14例のうち、10例は喀痰採取時に結核菌群以外を目的とした抗菌薬の投与が行われていたと報告している。また、核酸増幅反応阻害因子の除去に検体希釈を行った場合、検体中に含まれる結核菌群が少ない症例では、検出ができず<sup>12)</sup>、偽陰性となる可能性もある。

従来法と TaqMan 法の結果が不一致となった5例は、初回測定および再測定の際は、ICが検出され、核酸増幅阻害を考慮する結果ではなかった。そこで、再測定を行う際に、MMX 試薬と核酸抽出検体の混和にピペットによる3回の十分な混和を行い、4回の測定で陽性となった2例（0109-08, 0112-264）は、従来法の吸光度は0.619~3.434, TaqMan 法の Ct 値は41.0~43.8を示した。他の3例のうち陽性と判定された再測定の結果は、従来法の吸光度値、TaqMan 法の Ct 値ともに、広範な値を示した。MMX 試薬と核酸抽出検体の混和について、添付文書<sup>6)</sup>は、「MMX 試薬に核酸抽出検体を分注」と記載し、反応チューブ内の気泡についてのみ注意喚起があるが、検証の結果から、試薬と核酸抽出検体との混和不足も、偽陰性の原因のひとつとなりうる可能性を示唆する結果となった。これら不一致5例の検討から、検体中の結核菌群が少量<sup>12)</sup>、結核菌群 DNA 抽出不良<sup>13)</sup>に加え、MMX 試薬と核酸抽出検体との混和不足に起因する偽陰性の報告を行う可能性がある。

私達は最小検出感度の検討に、菌液を滅菌生理食塩水で希釈したことから、臨床材料中に存在する核酸増幅反応阻害因子の影響を明確にしていない。従来法の検出感度は、ヘモグロビン存在下で数十個/mL程度と報告<sup>11)</sup>され、血液や胸水などは核酸増幅反応阻害因子の影響を受けることから、DNA の抽出と精製が必要である<sup>2)</sup>。結核菌群が最小検出感度域である場合は、これらの操作により、検体中に含まれる結核菌群の損失も考慮し、総合的な判断が必要である。特に塗抹検査陰性の検体は結核菌の菌量が少なく、また、検査材料の質、菌の局在により<sup>2)</sup>、結核菌群遺伝子を検出できない可能性がある。TaqMan 法の最小検出感度は  $5 \times 10^2$  cfu/mL であり、培養法での発育コロニー数が10 cfu/mL のオーダーの場合、結果のばらつきや「結核菌群陰性」と判定する可能性もありうることから、検査結果の解釈は従来法と同様、臨床症状等を考慮する必要がある。

核酸抽出時に使用する NALC-NaOH 処理済検体は十分な混和の後、100  $\mu$ L を用いることが、指示されている<sup>6)</sup>。NALC-NaOH 処理済検体の減量は偽陰性の原因に

なる<sup>9)</sup>。検体中に含まれる菌量が少量の場合、NALC-NaOH 処理済検体の増量は、核酸抽出試薬と NALC-NaOH 処理済検体との総量が増減し、核酸抽出への影響も否定できないものの、検査結果を左右する因子ではないことが示唆された。

抗結核薬による治療経過の判定は、塗抹検査と培養法の所見に基づき、核酸増幅法は使用しない<sup>5)14)</sup>と解釈される。また、感染症法は、入院基準や就業制限を実施する場合の検査項目として核酸増幅法を含め<sup>15)</sup>、核酸増幅検査法の検査結果の重要性は、診断から経過観察、行政処置に至る場面で利用される。

TaqMan 法は抗結核薬の存在下（最高血中濃度の1倍および3倍）で測定値に影響を受けず<sup>6)</sup>、治療経過中に臨床的意義の高い検査結果の報告が期待されるが、抗結核薬の治療中は、塗抹検査陰性および培養検査陰性へ経過することから、治療経過中の最小検出感度、塗抹検査および培養検査との一致率等の検討が必要であると考えられる。

TaqMan 法の検出試薬類は1キット96テスト分が梱包されて、最小単位は12テストである。現在、当院では塗抹検査陽性検体や臨床的に結核症を濃厚に疑う検体を対象に TaqMan 法を実施している。しかし、*Mycobacterium avium* および *Mycobacterium intracellulare* の検出が不可能であり、従来法の併用が必要である。

TaqMan 法の使用は、対象となる症例のみ緊急検査を実施した場合、検査試薬の余剰を軽減する目的で、試薬を分割・保存し、試薬安定性や再現性の検討を行った。試薬の分割後、3検体分/1バッチおよび6検体分/1バッチともに、16日までの試薬安定性、良好な再現性が確認された。よって、1検体または2検体の緊急検査検体への対応、12検体以上となった場合に、試薬調製の無駄を軽減することが可能である。

## 結 論

TaqMan 法は従来法と同等の検出感度、再現性があり、核酸抽出後約2.5時間で結果報告が可能となり、陰圧病室の有効利用、迅速な感染対策の実施および適切な治療への移行が可能となる。ただし、検体中に含まれる結核菌群が少量の場合、結核菌群 DNA の抽出不良や MMX 試薬と核酸抽出検体との混和不足による偽陰性が発生する可能性もあり、検査結果は多角的に解釈する必要がある。

## 文 献

- 1) Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008.
- 2) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編：「結核菌検

- 査指針2007]. 結核予防会, 東京, 2007.
- 3) Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents. Recommendations for HIV-prevalent and resource-constrained setting. World Health Organization. 2007.
  - 4) Garcia-Quintanilla A, Garcia L, Griselda tudo', et al.: Single-tube balanced heminested PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative sample. J Clin Microbiol. 2000 ; 38 : 1166-1169.
  - 5) 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.
  - 6) マイコバクテリウム核酸キット コバス®TaqMan48 添付文書, 2006年3月改定, 第2版.
  - 7) Piersimoni C, Scarparo C: Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. J Clin Microbiol. 2003 ; 41 : 5355-5365.
  - 8) Sha S, Miller A, Mastellone A, et al.: Rapid diagnosis of tuberculosis in various biopsy and body fluid specimens by AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction test. Chest. 1998 ; 113 : 1190-1194.
  - 9) Rajalahti I, Vuorinen P, Nieminen MM, et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum specimens by the automated Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test. J Clin Microbiol. 1998 ; 36 : 975-978.
  - 10) Pastrana DG, Torronteras R, Caro P, et al.: Comparison of Amplicor, in-house polymerase chain reaction, and conventional culture for the diagnosis of tuberculosis in children. Clin Infect Dis. 2001 ; 32 : 17-22.
  - 11) 大島利夫, 宮地勇人, 増川敦子, 他: 全自動遺伝子検査装置コバスアンプリコア™での結核菌遺伝子増幅検出における陽性コントロールの有用性. 日本臨床検査自動化学会誌. 1997 ; 22 : 145-150.
  - 12) アンプリコアマイコバクテリウムにおける検体処理方法と反応阻害因子の除去. ラボフォーカス. 1998. Vol. 13. No.1.
  - 13) 布施川久恵, 宮地勇人, 大島利夫, 他: 胸水, 胃液からのPCR法による結核菌検出—IS6110遺伝子とアンプリコア™マイコバクテリウムの比較—. 臨床病理. 1995 ; 43 : 941-947.
  - 14) 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.
  - 15) 和田雅子: 結核対策のゆくえ. 臨床と微生物. 2008 ; 35 : 261-265.

## Original Article

THE FUNDAMENTAL EVALUATION OF COBAS®TaqMan48  
USING CLINICAL SPECIMENS

<sup>1</sup>Yoshimi HIGURASHI, <sup>2</sup>Takaaki SATOH, <sup>2</sup>Tetsuzou HIRAI,  
<sup>1</sup>Kyoji MORIYA, and <sup>1</sup>Kazuhiko KOIKE

**Abstract** [Purpose] When smear test is positive for acid-fast bacilli, it is important to differentiate between *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculosis mycobacteria (NTM) in healthcare associated infection (HAI) control. The aim of this study is to evaluate between COBAS® TaqMan48 (TaqMan) and COBAS® Amplicor (COBAS).

[Material and method] Tenfold dilution series of  $5 \times 10^4$  cfu/mL of *Mycobacterium bovis* (ATCC19210) were used for evaluating the limit of detection (LOD) and reproducibility.

73 frozen clinical specimens (34 *M. tuberculosis* complex and 39 NTM) stored at below  $-20^\circ\text{C}$  before its use that were treated with NALC-NaOH were used to determine the agreement between two methods.

Divided reaction reagents (include Master mix solution, Internal control and  $\text{Mg}^{2+}$ ) of TaqMan for 3 and 6 tests per batch used to evaluate reagents stability.

[Result] The LOD of both kits were  $5 \times 10^2$  cfu/mL. Regarding reproducibility, the same result was obtained when tested 3 times.

The agreement rate between TaqMan and culture method was 58.8%, and between COBAS and culture method was 67.6%. When limited to smear positive eleven specimens, the

agreement between TaqMan and culture method was 81.8%, and between COBAS and culture method was 90.9%. Reagents divided for 3 tests and 6 tests and stored at  $4^\circ\text{C}$  in dark, both test reagents stability was confirmed maximum for 16 days.

[Conclusion] As the results of the evaluation of TaqMan, the LOD, reproducibility and the agreement were similar to COBAS results. However, in low colony forming unit of clinical specimen raise the possibility that results may contain false negative.

**Key words:** COBAS® TaqMan48, *Mycobacterium tuberculosis* complex

<sup>1</sup>Department of Infection Control and Prevention, The University of Tokyo Hospital, <sup>2</sup>Roche Diagnostics K.K.

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