

発光ダイオードを使用した蛍光顕微鏡による抗酸菌塗抹検査精度

¹水野 和重 ¹近松 絹代 ²青野 昭男 ²東 由桂
¹山田 博之 ¹御手洗 聡

要旨：〔目的〕近年開発された発光ダイオード（LED）を光源とする蛍光顕微鏡について、従来型の蛍光顕微鏡との性能比較を実施した。〔方法〕抗酸菌症疑いあるいは抗酸菌症経過観察中の患者から分離された検体について集菌法による処理を実施してから塗抹標本を作製し、オーラミンOによる蛍光染色を実施した後、従来型の水銀灯蛍光顕微鏡とLEDとの判定を比較した。また、検体はBACTEC MGIT 960（日本ベクトン・ディッキンソン）および2%工藤培地（極東製薬）で培養し、抗酸菌培養結果との相関についても検討した。〔結果〕結核予防会複十字病院において検査された1,324検体について、蛍光染色による抗酸菌塗抹検査の結果を比較したところ、陽性一致334検体、陰性一致966検体で総合的一致率は98.2%であった。培養検査結果を標準とした場合の水銀灯とLED蛍光顕微鏡での陽性感度はそれぞれ67.7%と69.4%で、統計的有意差は認められなかった。〔考察〕LED蛍光顕微鏡は安価、省電力、長寿命など水銀灯に比べてメリットが大きい。蛍光染色による抗酸菌検査の効率化を考慮すると、今後の臨床応用が期待される。

キーワード：蛍光染色，塗抹，発光ダイオード

日本国内での結核罹患率は減少を続けており、2007年には19.2となっている。そのうち塗抹陽性の罹患率は8.0である。塗抹陽性の肺結核患者が約1万人発生することになるが、これらの患者は主な結核感染源となる。抗酸菌塗抹検査は迅速性や感染性の判断の点から現在でも重要な臨床検査である。2007年に改訂された結核菌検査指針では感度と精度の観点から集菌法による検体を蛍光染色にて検査することを勧めているが、水銀灯を光源とする従来の蛍光顕微鏡は本体が高価であり、さらに水銀灯が高価で寿命も短いため臨床検査への導入が進んでいない。近年新たに発光ダイオード（Light emitting diode：LED）を光源とした蛍光顕微鏡が開発され、海外では導入が進んでいる。LEDは長寿命・省電力という特性があり、従来の蛍光顕微鏡の欠点を補うことが期待されている。LED蛍光顕微鏡の精度を確定するため、臨床検体を用いて検討を行った。

結核予防会複十字病院において、2008年9月から10

月までに抗酸菌感染症疑いあるいは抗酸菌症経過観察目的で提出された1,324検体を対象とした。検体の内訳は、喀痰（吸引痰含む）1,192件、胃液22件、胸水23件、気管支洗浄液46件、その他の気道由来検体18件、その他23件であった。検体は結核菌検査指針に従って雑菌処理後集菌し¹⁾、これも検査指針に従ってオーラミン染色を実施したあと、水銀灯蛍光顕微鏡にて200倍で観察した。鏡検済みの検体は遮光・室温保存し、結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科でLED蛍光顕微鏡（FluoLED with royal blue unit, 450nm, FRAEN, Italy）を用いて3日以内に同じ倍率で再検し、BACTEC MGIT 960（日本ベクトン・ディッキンソン）あるいは2%工藤培地（極東製薬）にて培養を実施した。水銀灯蛍光顕微鏡による観察とLED蛍光顕微鏡による観察は別の検査者がそれぞれ独立して実施し、最終的な結果が得られた時点で相互比較を行った。

水銀灯蛍光顕微鏡とLED蛍光顕微鏡による塗抹検査

¹ 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科、² 結核予防会複十字病院医療技術部臨床検査科

連絡先：水野和重，結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科，〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24
(E-mail: hirano@jata.or.jp)
(Received 22 Apr. 2009/Accepted 10 Jun. 2009)

Table 1 Comparison of mercury vapour lamp and LED fluorescent microscopy

Positivity	Mercury vapour lamp					Total	
	—	±	1 +	2 +	3 +		
LED	—	966	13	0	0	979	
	±	11	35	14	0	60	
	1 +	0	20	83	7	113	
	2 +	0	0	5	83	96	
	3 +	0	0	0	21	55	76
	Total	977	68	102	111	66	1324

Table 2 Comparison of fluorescent smear and culture result

		Mercury vapour lamp		LED		Total
		Positive	Negative	Positive	Negative	
Culture	Positive	252	120	258	114	372
	Negative	78	791	72	797	869
	Total	330	911	330	911	1241

結果を Table 1 に示した。陽性一致数は 334 件、陰性一致数は 966 件であり、最終的な結果の一致は 1,300 件 (98.2%) となった。これに対して水銀灯蛍光顕微鏡陽性・LED 蛍光顕微鏡陰性は 13 件 (1.0%) で認められ、逆に水銀灯蛍光顕微鏡陰性・LED 蛍光顕微鏡陽性は 11 件 (0.8%) であった。これらの結果の齟齬は±と判定された検体でのみ認められた。また、陽性度の差が 2 段階以上で認められたのは 3 検体のみであり、その他の検体ではすべて 1 段階以内の差であった。さらに塗抹陽性で一致した 334 検体のうち 256 検体 (76.6%) では陽性度も一致していた。

Table 2 には培養検査と塗抹検査結果の比較を示した。雑菌汚染を除いた培養陽性検体は 372 件であり、水銀灯蛍光顕微鏡塗抹陽性・培養陽性 (感度) は 252 件 (67.7%)、LED 蛍光顕微鏡陽性・培養陽性は 258 件 (69.4%) で有意差は認められなかった (Chi square test : $p = 0.636$)。同様に、塗抹陰性・培養陰性率 (特異度) についても両者の間で統計的有意差は認められなかった (91.0% vs 91.7%, Chi square test : $p = 0.675$)。

本研究では、水銀灯蛍光顕微鏡と LED 蛍光顕微鏡の精度を比較した。塗抹検査結果はほぼ完全に一致しており、陽性あるいは陰性の不一致は 1.8% のみであり、これらはすべて塗抹±検体で認められた。塗抹結果が±となる検体はもともと菌量が少ないため、検査の再現性が低いことが示されており²⁾、抗酸菌塗抹検査の外部精度評価実施基準でも Minor error として認識されている。従って、今回観察された陽性・陰性の結果不一致は蛍光顕微鏡の精度上の問題ではなく、検体の性質に由来するものと考えられた。培養検査結果を標準とした場合の評価でも、水銀灯と LED で感度、特異度に有意差はなく、抗酸菌蛍光染色検体を検査する蛍光顕微鏡として臨床的

に問題ないものと思われた。

海外でも同様の研究が報告されており、Hung らは 489 検体でわれわれと同様の検討を実施し、一致率 98.0% (95% CI 96.3 ~ 99.0%, kappa 0.93) と報告している³⁾。Van Deun らは同じ FluoLED を使用し、461 検体で水銀灯蛍光顕微鏡での検査結果と 99.1% の一致率があったと報告している⁴⁾。

今回評価の対象とした LED 蛍光顕微鏡はオリンパス製の BX-51 光学式顕微鏡に FRAEN 社製 LED 光源ユニットを後付けしたものであり、BX-51 以外にも多くの光学式顕微鏡に適用が可能である。LED 光源は約 40,000 時間と長寿命であり、起動してから光源が安定するまでの時間がきわめて短く、輝度が高いため水銀灯蛍光顕微鏡のような暗室を必要としない⁵⁾。導入コストも水銀灯蛍光顕微鏡に比べて安価であり、広く臨床検査の場で応用されうると考えられる。

謝 辞

本研究に当たり、結核予防会複十字病院医療技術部臨床検査科の桑原龍児技師にご協力頂きました。深謝申し上げます。

文 献

- 1) 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.
- 2) 山田博之，松本宏子，御手洗聡，他：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. 結核. 2008 ; 83 : 65-71.
- 3) Hung NV, Sy DN, Anthony RM, et al.: Fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis. Lancet Infect Dis. 2006 ; 6 : 570-581.
- 4) Van Deun A, Chonde TM, Gumusboga M, et al.: Perfor-

mance and acceptability of the FluoLED Easy module for tuberculosis fluorescence microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008 ; 12 : 1009–1014.

5) Anthony RM, Kolk AHJ, Kuijper S, et al.: Light emitting

diodes for auramine O fluorescence microscopic screening of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006 ; 9 : 1060–1062.

Short Report

CLINICAL EVALUATION OF ACID-FAST SMEAR EXAMINATION WITH LIGHT EMITTING DIODE FLUORESCENT MICROSCOPY

¹Kazue MIZUNO, ¹Kinuyo CHIKAMATSU, ²Akio AONO, ²Yuka AZUMA,
¹Hiroyuki YAMADA, and ¹Satoshi MITARAI

Abstract [Objective] Fluorescent smear microscopy is one of the recommended methods to detect highly infectious tuberculosis (TB) patients. Recently, fluorescent microscopy using a light emitting diode (LED) as a light source has been developed and introduced. The objective of this study is to evaluate the efficiency of LED fluorescent microscopy.

[Method] The clinical specimens were collected from TB suspects and follow-up patients of mycobacteriosis in Double Barred Cross Hospital through Sept. to Oct. in 2008. The specimens were subjected to the ordinary decontamination/concentration process, and the sediments were smeared and stained with auramine O. The slides were examined using an ordinary mercury vapour lamp and a LED fluorescent microscope by at least two laboratory technologists independently. If there was a discrepancy between the first and second reader, the third reader (umpire) judged the result. The treated specimens were also cultured using BACTEC MGIT or 2% Kudoh medium. The smear and culture results were compared with the results of LED fluorescent microscopy.

[Results] A total of 1,324 specimens, including 1,192 sputa and 23 pleural fluid, were collected from TB suspects and patients. The overall agreement, smear positive versus smear negative, occurred in 1,300 of 1,324 specimens (98.2%). Among the mutually positive readings, the agreement on grading was 256 out of 334 (76.6%), and disagreement beyond two grades was observed only in 3 specimens. The

smear positive/culture positive rates were not statistically different between two smear methods.

[Discussion] The overall efficiency of LED fluorescent microscopy was similar to that of ordinary fluorescent microscopy with a mercury vapour lamp. The LED costs less than mercury vapour lamp, and has a usable life of more than 40,000h. It does not require either a dark room for observation, or a long waiting time for stabilization. It was expected that the LED fluorescent microscopy would be utilized widely for the efficient detection of acid-fast bacilli in clinical practices.

Key words: Fluorescent staining, Smear microscopy, Light emitting diode

¹Bacteriology division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, ²Department of Clinical Microbiology, Double Barred Cross Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Kazue Mizuno, Bacteriology division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: hirano@jata.or.jp)