

胃液・気管支鏡・胸水などの検体を用いた核酸増幅検査 Loopamp 結核菌群検出試薬キット (TB-LAMP) の検討

¹吉多 仁子 ¹小野原健一 ¹松井 謹 ²高田 宏宗
²新井 剛 ²釣永 雄希 ²韓 由紀 ²橋本 章司
²永井 崇之 ^{1,2}田村 嘉孝

要旨：〔目的〕 喀痰以外の検体を用いた核酸増幅検査 Loopamp 結核菌群検出試薬キット (TB-LAMP) を検討したので報告する。〔対象〕 2014年8月から2018年3月の間にTB-LAMPを実施した喀痰以外の検体は996検体。このうちMGITが結核菌群 (結核菌) 陽性の胃液29検体, 気管支鏡検体 (BAL) 10検体, 胸膜組織3検体, 肺組織2検体, 胸水6検体, 腹水2検体, 膿3検体, 耳漏1検体の計56検体と, TB-LAMP陽性・MGIT陰性の胃液1検体, 胸水2検体, 膿4検体, 肺組織1検体の計8検体を対象とした。〔結果〕 MGIT陽性56検体中のTB-LAMPの陽性率は83.9% (47/56検体), 平均陽性検出時間は18分55秒。塗抹別では塗抹陽性が陽性率100% (12/12検体), 平均陽性検出時間は14分51秒。塗抹陰性陽性率は79.5% (35/44検体), 平均陽性検出時間は19分41秒。MGIT培養陰性8検体の平均陽性検出時間は17分05秒で活動性結核と診断された患者からの検体であった。〔まとめ〕 TB-LAMPは喀痰以外の検体に対しても有用であることが分かった。

キーワード： 胃液検体, 気管支鏡検体, 胸水検体, 結核菌核酸増幅法, TB-LAMP, MGIT陽性検体, NALC処理

緒 言

Loopamp 結核菌群検出試薬キット (TB-LAMP, 栄研化学) は^{1)~4)}, 発売当初診療保険の対象が喀痰に限られていた。しかし, 2014年8月に対象の検体種が拡大され全検体種で適応になった。われわれは, 喀痰を用いたTB-LAMPの結果を本学会で報告してきたが⁵⁾⁶⁾, 今回は, 喀痰以外の検体でNALC処理を行い測定した後に Mycobacteria Growth Indicator Tube (日本ベクトン・デッキンソン株式会社) 培養 (MGIT)⁴⁾で結核菌群 (結核菌) 陽性となった検体と, TB-LAMP陽性・MGIT陰性の検体について後ろ向きに検討したので報告する。

対象と方法

1. 対象

2014年8月から2018年3月の期間でTB-LAMPの測定

をしたのは1,676検体あり, そのうちの喀痰以外の検体数は996検体 (59.4%) であった。喀痰以外の検体で診断時のMGIT陽性56検体とMGIT陰性・TB-LAMP陽性の8検体を対象とし, 1週間以上治療された検体のMGIT陰性・TB-LAMP陽性2検体は対象外とした。残りの930検体はMGITとTB-LAMPが共に陰性であった。

MGIT陽性のうちわけは胃液29検体, 気管支鏡検体 (BAL) 10検体, 組織5検体, 胸水6検体, 腹水2検体, 膿3検体, 耳漏1検体。組織は胸膜組織3検体と肺組織2検体で, 膿は頸部リンパ節2検体と腸腰筋膿瘍からの膿であった。

MGIT陰性・TB-LAMP陽性のうちわけは胃液1検体, 胸水2検体, 膿4検体, 肺組織1検体であった。膿は頸部リンパ節であった。

2. 方法

(1) 検体の処理

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪はびきの医療センター
¹臨床検査科, ²感染症内科

連絡先：吉多仁子, 大阪はびきの医療センター臨床検査科, 〒583-8588 大阪府羽曳野市はびきの3-7-1

(E-mail: yoshidahi@opho.jp)

(Received 13 Aug. 2018/Accepted 12 Nov. 2018)

胃液は50 mLの採取容器に採取され提出された。検体中の喀痰を溶解するため検体中の喀痰を等量から3倍のセミアルカリプロテアーゼ (SAP)⁴⁾を加え室温で15分間放置後、全体量が45 mL程度になるように冷滅菌リン酸緩衝液 (pH 6.8)を加えた。バイオハザード対策機能付冷却遠心器で3,000×g、20分間遠心した。

胸水、腹水、BALは滅菌15 mL試験管に採取され提出された。検体を冷却遠心器で3,000×gで20分間遠心した。

肺組織は50 mLの採取容器に採取され提出された。滅菌した乳鉢に移し、すり潰しSAPを2 mL入れ、15 mL滅菌試験管に移した。滅菌綿棒で採取された膿、耳漏は、15 mL滅菌試験管に入れSAP 2 mLで洗浄した。それぞれの検体は攪拌の後、冷却遠心器で3,000×gで20分間遠心した。

遠心後の検体は上清を静かに捨て検体とした。

(2) NALC-NaOH処理 (NALC処理)⁴⁾

検体は塗抹に用いた後、ニチビー法 (日本ビーシーエー製造)を用い前処理を行った (NALC処理)。検体の約0.5 mLを15 mL滅菌試験管に採取し、等量のCC-E液とCC-E助剤1滴を加え攪拌し、8分間静置後pH 6.8のリン酸緩衝液を15 mL滅菌試験管の上から約1 cmまで加え攪拌後3,000×gで20分間遠心した。上清を捨てリン酸緩衝液1.8 mLを加え再懸濁し検体とした。

(3) TB-LAMP

NALC処理済み検体を1,000×g、1分間遠心し、その沈渣を検体として用いた。核酸抽出はLoopamp PURE DNAキットを用い、専用のピペット-60セット (栄研化学)で検体と陰性コントロールの各60 μLを検体処理チューブに添加した。検体処理チューブは3~5回転倒混和、ヒートブロックで90℃ 5分間加熱後、2分間室温で静置し、3~5回の転倒混和後、吸着剤チューブに装着し、直ちに上下と左右に10回激しく振り十分混和し、水平に静置した。滴下注入キャップを吸着剤チューブの滴下側にねじり固定し、中央部を押し出した溶液をDNA溶液として用いた²⁾⁴⁾。

作製したDNA溶液と陽性コントロールの30 μLをLoopamp 結核菌群検出試薬キットのTB-LAMP試薬が蓋の内側に固着した反応チューブに滴下し、蓋を閉め反応チューブを転倒させDNA溶液と陽性コントロールを蓋に移動し2分間倒立させ静置した。反応チューブを5回転倒混和後スピンドウンし、リアルタイム濁度測定装置Loopamp EXIA (栄研化学)で測定した。測定には約1時間を要した²⁾⁴⁾。

(4) MGIT

培養は混和したNALC処理検体の0.5 mLをMGIT培地に接種しBACTEC MGIT 960システムで培養した⁴⁾。

結 果

結果をTable 1に塗抹陰性・MGIT陽性、Table 2に塗抹陽性・MGIT陽性、Table 3にTB-LAMP陽性・MGIT陰性の結果を示した。

(1) TB-LAMP陽性

塗抹陰性・MGIT陽性44検体のTB-LAMPの陽性は35検体で陽性率は79.5%であった。塗抹陽性・MGIT陽性12検体のTB-LAMPの陽性は12検体で陽性率は100%であった。

検体別の陽性率は、腹水2検体、膿3検体、耳漏1検体がすべて陽性で100%、BAL検体は90% (9/10検体)、胃液は86.2% (25/29検体)、胸水は66.7% (4/6検体)、組織は60% (3/5検体)でNo. 8とNo. 9の胸膜組織が陰性であった。

(2) TB-LAMPの陽性検出時間

MGIT陽性56検体の陽性検出時間はNo. 56のBALの10分54秒からNo. 34の腹水の34分12秒の範囲にあり、平均陽性検出時間は18分55秒。塗抹別にみると、塗抹陰性の平均陽性検出時間は19分41秒、塗抹陽性の平均陽性検出時間は14分51秒で、その差は4分50秒あった。

MGIT陰性8検体の陽性検出時間はNo. 57の胃液の14分54秒からNo. 63の膿の19分48秒の範囲にあり、平均陽性検出時間は17分05秒であった。

考 察

1. TB-LAMPの検体について

TB-LAMPは発売当初の診療報酬の対象は喀痰のみであった。2014年途中で検体種が拡大されたが、院内では結核菌核酸増幅試験としてコバスTaqMan MTB (ロシユ)⁴⁾⁵⁾も同時に採用していたため2015年以前にTB-LAMPを測定した検体は主に喀痰の塗抹陽性の検体であった。TB-LAMPは直接喀痰からの方法で検体提出から約1時間半程度で報告可能で外来患者にも対応が可能であり、NALC処理検体では直接検体を用いる方法より約1時間半程度過剰な時間がかかるが、ほとんどの検体で提出当日に結果が報告できるため、2016年度からは結核菌の核酸増幅検査はTB-LAMPのみを実施した。2016年以降は検体数が657検体、2017年は903検体と増加した。

本報の対象は胃液、BAL、胸水などの喀痰以外の検体で、検体はすべてNALC処理を行った。これは以前報告したように、PCR反応では血液成分の多い検体は増幅阻害を起こすため、当検査室ではこのような検体はNALC処理を最低2回行い血液成分の除去を行っていた。TB-LAMPは内部コントロールが含まれないことから、血液成分を含む対象では検査精度の向上のためNALC処理を行うべきと考えた。

2. 対象の診断

対象となったMGIT陽性およびTB-LAMP陽性・MGIT陰性の検体を得た患者はすべて活動性結核と診断されていた。

(1) MGIT陽性の検体について

No. 32の胸水は結核性胸膜炎, No. 35の膿は頸部リンパ節結核, No. 42の胸膜組織は結核性胸膜炎で肺外結核は3例のみであった。

No. 5, 6, 8, 9, 30, 31は結核性胸膜炎, No. 33とNo.

34は結核性腹膜炎, No. 36は結核性腸腰筋膿瘍, No. 44は中耳結核, No. 54は頸部リンパ節結核で肺結核を伴っていた。

(2) MGIT陰性・TB-LAMP陽性の検体について

No. 57は結核性胸膜炎, No. 58は結核性空洞穿破による膿気胸, No. 59は肺結核, No. 60は右鎖骨上リンパ節結核, No. 61~63は頸部リンパ節結核, No. 64は肺結核であった。

TB-LAMP陽性・MGIT陰性の8検体のうちNo. 59, 60,

Table 1 Result of smear negative samples both LAMP and MGIT positive

No. of	Materials	Smear	LAMP-TB	Tt	Days to detected MGIT
1	Gastric aspiration	—	—		15
2	Gastric aspiration	—	—		17
3	Gastric aspiration	—	—		18
4	Gastric aspiration	—	—		18
5	Pleura effusion	—	—		16
6	Pleura effusion	—	—		17
7	BAL	—	—		14
8	Pleura	—	—		17
9	Pleura	—	—		44
10	Gastric aspiration	—	+	27:42	9
11	Gastric aspiration	—	+	31:24	9
12	Gastric aspiration	—	+	18:42	10
13	Gastric aspiration	—	+	18:48	10
14	Gastric aspiration	—	+	19:24	11
15	Gastric aspiration	—	+	14:00	12
16	Gastric aspiration	—	+	15:48	12
17	Gastric aspiration	—	+	26:24	13
18	Gastric aspiration	—	+	16:54	14
19	Gastric aspiration	—	+	15:36	15
20	Gastric aspiration	—	+	16:36	15
21	Gastric aspiration	—	+	17:36	15
22	Gastric aspiration	—	+	24:24	15
23	Gastric aspiration	—	+	17:00	17
24	Gastric aspiration	—	+	27:24	15
25	Gastric aspiration	—	+	23:18	19
26	Gastric aspiration	—	+	23:42	19
27	Gastric aspiration	—	+	28:54	19
28	Gastric aspiration	—	+	17:24	38
29	Pleura effusion	—	+	19:18	16
30	Pleura effusion	—	+	23:00	16
31	Pleura effusion	—	+	21:12	17
32	Pleura effusion	—	+	19:30	24
33	Abdominal dropsy	—	+	17:36	14
34	Abdominal dropsy	—	+	34:12	14
35	Lymph	—	+	16:18	14
36	Iliopsoas	—	+	14:42	24
37	BAL	—	+	32:00	12
38	BAL	—	+	25:30	14
39	BAL	—	+	16:06	19
40	BAL	—	+	17:54	19
41	Lung	—	+	17:18	13
42	Pleura	—	+	14:30	16
43	Lung	—	+	15:36	18
44	Ear discharge	—	+	15:06	16

Tt: Threshold time

Table 2 Result of smear positive samples both LAMP and MGIT positive

No. of	Materials	Smear	LAMP-TB	Tt	Days to detected MGIT
45	Gastric aspiration	±	+	18:30	13
46	BAL	±	+	16:30	12
47	Gastric aspiration	1+	+	12:30	7
48	Gastric aspiration	1+	+	14:00	12
49	BAL	1+	+	15:06	9
50	BAL	1+	+	16:36	15
51	Gastric aspiration	2+	+	15:18	11
52	Gastric aspiration	2+	+	16:42	11
53	BAL	2+	+	12:18	19
54	Lymph	2+	+	13:48	10
55	Gastric aspiration	3+	+	16:00	19
56	BAL	3+	+	10:54	32

Table 3 Result of samples both LAMP positive and MGIT negative

No. of	Materials	Smear	LAMP-TB	Tt	Measuring year	Pre-treatment (year)
57	Gastric aspiration	—	+	14:54	2017	No
58	Pleura effusion	—	+	15:18	2016	No
59	Pleura effusion	—	+	17:18	2017	Yes (2015)
60	Lymph	—	+	15:18	2017	Yes (2013)
61	Lymph	—	+	15:36	2016	No
62	Lymph	—	+	19:12	2017	Yes (2012)
63	Lymph	—	+	19:48	2015	No
64	Lung	—	+	15:30	2016	Yes (2015)

62, 64は再治療の患者からの検体で以下に詳細を示した。

No. 59の患者は2015年に喀痰から塗抹とMGITが陽性であった。2017年に胸部の異常陰影が増加し胸水のTB-LAMP陽性であったため加療された。胸水のMGITは陰性で喀痰の塗抹とMGITは陰性であった。

No. 60の患者は2013年他院で鼻腔ファイバーでの組織生検で結核の所見が認められ肺結核・鼻腔結核と診断され当院紹介となった。当院の培養で喀痰から結核菌を検出した。2017年に右リンパ節腫大が認められリンパ節穿刺液でTB-LAMP陽性となり鎖骨上リンパ節結核と診断された。

No. 62の患者は2012年他院でMDRが検出され手術が行われたが、2017年頸部リンパ節の膿からTB-LAMP陽性となった。後のMGIT陰性であったが、小川培養からストレプトマイシン、エタンプトール、イソニアジド、リファンピシン、ピラジナミドが耐性、カナマイシン、レボフロキサシン、シプロフロキサシンが感受性の1コロニーを認めた。

No. 64の患者は2015年に喀痰から塗抹とMGITが陽性であった。2016年に喀痰の塗抹陽性、TB-LAMP陽性であった。胸腔鏡による肺組織の塗抹陽性、TB-LAMP陽性であった。喀痰と組織のMGITは陰性であった。

3. MGITとTB-LAMPの一致率

喀痰以外の検体は996検体でMGIT陽性・TB-LAMP

陽性は47検体、MGIT陰性・TB-LAMP陰性は930検体あり、MGITとTB-LAMPの一致率は98.1%であった。

4. MGIT陽性のTB-LAMP陽性率

(1) 各種検体について

腹水、膿、耳漏は検体数を増やし検証する必要があると考えられた。

膿、耳漏は、滅菌試験管にSAPを2mL入れ検体をSAPで洗浄する方法でTB-LAMPが陽性という結果を得ていて、核酸抽出のLoopamp PURE DNAキットは簡便な方法ではあるが核酸抽出が高率に行えていることがうかがえた。

BALの陽性率は90%と高かった。Tamuraら⁷⁾が「喀痰で塗抹陰性・PCR陰性例のBALのPCRは62%であった」と報告していてTB-LAMPはPCRに遜色ない方法と思われた。

胃液の陽性率も86.2%と高かった。胃液とBALを得た患者の喀痰は塗抹がすべて陰性であった患者からの検体で、これらの患者から迅速な診断が得られていたことが分かった。

胸膜結核診断ガイドラインの提案で、「胸水や胸膜を用い核酸増幅検査で結核菌を証明すれば診断が確定するとされているが、確定確率は高くない」とされている⁸⁾⁹⁾。しかし、対象の胸水6検体中TB-LAMPは4検体が陽性となりTB-LAMPは胸水検査で迅速診断の有用性が期待

された。結核性胸膜炎の診断時に採取された胸水と組織の陽性率は、他の検体よりやや低い陽性率であったが有意な差はなかった ($p = 0.067$)。

最も低い陽性率となったのは組織であった。組織は検体を乳鉢ですり潰し用いたが、組織が数ミリと小さく、乳鉢上の検体の回収が十分でない可能性があった。

(2) 前報との比較

2013年の前報⁵⁾の対象は、処理法は本報と同様にNALC処理を用い、「塗抹陰性25検体中20検体(喀痰19検体と膿1検体)が陽性で陽性率は80%であった」と報告した。

本報の対象の喀痰以外の検体の塗抹陰性の陽性率は79.5%で、喀痰と同等な感度を得た。しかし、本報の対象は3例のみが肺外結核患者からの検体で、他の検体は肺結核や肺結核に随伴する疾患の患者からの検体であったため高い陽性率が得られたことも考えられた。

5. 陽性検出時間

MGIT陰性・TB-LAMP陽性はすべて塗抹陰性で塗抹陰性・MGIT陽性をあわせた43検体の平均陽性検出時間は19分10秒で、塗抹陽性・MGIT陽性12検体の14分51秒より4分19秒遅く、塗抹結果により陽性検出時間に差が認められた。塗抹陽性の結果と陽性検出時間に相関があるのかは、今後検体数を増やし検討したい。

以上の結果より、TB-LAMPは喀痰以外の検体に対しても有用であることが分かった。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特になし。

文 献

- 1) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. 2000 Oxford University Press. *Nucleic Acids Research*. 2000 ; 28 : e63.
- 2) 御手洗聡：LAMPを使った結核迅速診断キット. 複十字. 2011 ; 339 : 11-13.
- 3) Mitarai S, Okumura M, Toyota E, et al.: Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011 ; 15 : 1211-1217.
- 4) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編：「抗酸菌検査ガイド2016」. 南江堂, 東京, 2016.
- 5) 吉多仁子, 小野原健一, 田澤友美, 他：塗抹陰性・MGIT法陽性検体での結核菌群核酸増幅迅速診断におけるコバス®TaqMan法とLAMP法の有用性の比較検討. *結核*. 2013 ; 88 : 727-733.
- 6) 吉多仁子, 小野原健一, 田澤友美, 他：肺結核症例における結核菌群核酸検出検査のためのLAMP法 (Direct TB-LAMP) の有用性の検討. *結核*. 2015 ; 90 : 497-502.
- 7) Tamura A, Shimada M, Matsui Y, et al.: The value of fiberoptic bronchoscopy in culture-positive pulmonary tuberculosis patients whose pre-bronchoscopic sputum specimens were negative both for smear and PCR analyses. *Intern Med*. 2010 ; 49 : 95-102.
- 8) 三木 誠：胸膜結核診断ガイドラインの提案. 第83回総会ミニシンポジウム「肺外結核の診断と治療」. *結核*. 2008 ; 83 : 741-746.
- 9) 三木 誠：結核性胸膜炎診断における胸腔鏡検査の位置づけ. 第86回総会ミニシンポジウム「結核性胸膜炎」. *結核*. 2011 ; 86 : 959-960.

Original Article

STUDY OF TB-LAMP WITH GASTRIC ASPIRATION, BAL,
PLEURA EFFUSION AND OTHER SAMPLES ABOUT EFFICIENCY
FOR RAPID DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

¹Hiroko YOSHIDA, ¹Kenichi ONOHARA, ¹Chika MATSUI, ²Hiromune TAKADA,
²Tsuyoshi ARAI, ²Yuki TSURINAGA, ²Yuki HAN, ²Shoji HASHIMOTO,
²Takayuki NAGAI, and ^{1,2}Yoshitaka TAMURA

Abstract [Objective] We reported the results of our evaluation for rapid diagnosis of tuberculosis of TB-LAMP with samples other than sputum.

[Results] The study was conducted between August 2014 and March 2018. Of 56 samples from gastric aspiration, BAL, pleura, lung, pleura effusion, abdominal dropsy, pus and ear discharge were 29, 10, 3, 2, 6, 2, 3 and 1 samples, MGIT culture positive samples, 47 (83.9%) were judged to be positive by the TB-LAMP assay, with a mean positive detection time of 18 minutes 55 seconds. Of 44 smear-negative samples and MGIT positive samples, 35 (79.5%) were judged to be positive by the TB-LAMP assay, with a mean positive detection time of 19 minutes 41 seconds. The mean positive detection time of 8 samples (gastric aspiration 1 sample, pleura effusion 2 samples, pus 4 samples, tissue 1 sample) with MGIT culture negative and TB-LAMP positive was 17 minutes 05 seconds, from retreatment patients who were active tuberculosis.

[Conclusion] TB-LAMP assay is considered effective tuberculosis diagnosis with samples other than sputum detected positive MGIT negative samples from retreatment patients.

Key words: Gastric aspiration, BAL, Pleura effusion, Molecular-based diagnostic test, TB-LAMP, MGIT positive samples, NALC-treatment sample

¹Department of Laboratory, ²Department of Infection Diseases, Osaka Prefectural Hospital Organization Osaka Habikino Medical Center

Correspondence to: Hiroko Yoshida, Department of Laboratory, Osaka Prefectural Hospital Organization Osaka Habikino Medical Center, 3-7-1, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583-8588 Japan. (E-mail: yoshidahi@opho.jp)