

# 臨床検体からの抗酸菌培養成績の比較

## Comparison of Mycobacterial culture results from clinical specimens

○松本 英伸, 中田 隆三, 河嶋 睦子

北海道社会保険病院 検査部

Key Words :

抗酸菌 PCR MGIT 培養成績の比較

### 要 旨

臨床検体からの抗酸菌培養は、MGIT 法等の液体培地を用いる方法が現在広く普及するに至っている。我々は染色結果別に、PCR 法と MGIT 法を中心に培養法を検討したところ MGIT 法が小川法に比べ検出率が高かった。菌別・染色結果別に PCR 法と MGIT 法を比較した場合 *M. tuberculosis* については、染色陽性検体では PCR 法が、陰性検体では MGIT 法の検出率が高かった。*M. avium* complex に関しては、染色陽性検体では有意差が認められず、陰性検体では MGIT 法の検出率が高かった。MGIT 法の検出率が高かったにも関わらず、PCR 法で陽性になり培養で陰性の検体が存在した。これらの原因は、生菌・死菌の問題、集菌の技術的問題、検体の品質管理等が絡んで結果に影響があったと推測される。

### はじめに

臨床検体からの抗酸菌培養は、小川培地が使用されてきたが、「新 結核菌検査指針2000」以降は MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 法等の液体培地を用いる方法が、従来の固形培地 (小川) による培養法に比べ検出時間の短縮、検出率の向上を図ることが出来ると報告され広く普及するに至っている。今回我々は、外来・入院初診時実施される PCR 法依頼患者検体を中心として MGIT 法等を比較検討したので報告する。

### 方 法

対象は2002年1月～2005年3月までの間に当院に受診した入院、外来患者で、PCR・培養の依頼があり両方またはどちらかが陽性になり *Mycobacterium* (以下M.と略記) *tuberculosis*, *M. avium* complex と同定された延べ585検体である (*M. tuberculosis* 322検体 *M. avium* complex 263検体)。検体はNALC-NaOH 処理を行った後、小川培地に接種し、3000G 15分遠心後、沈査に1mlのbuffer添加後一部をMGITに接種、さらにPCR法、抗酸菌染色(蛍光

法)を実施した。PCR法はロシュ社のコバスアンプリコアを使用した。MGIT法の陽性検体は抗酸菌であることを確認後DDH等で同定検査を施行した。得られた結果を染色結果(染色±以上を陽性とした)、PCR法、MGIT法、小川法と比較した。

検出率の比較には McNemar の  $\chi^2$  検定 (記載のない場合危険率1%)、検出までの日数の比較には t 検定を用いた。

### 結 果

#### (1) 菌種別各培養法での検出率

PCR法を実施した患者で、いずれかの培養法で陽性になったものを陽性検体とし、培養陽性検体全体に対する染色結果別にそれぞれの検出率を算出した(表1)。

*M. tuberculosis* では培養陽性286検体中MGIT法で284検体(99.3%)小川法で220検体(76.9%)が陽性であった。染色結果別では染色陽性では、培養陽性151検体中MGIT法で151検体(100.0%)小川法で140検体(92.7%)が陽性であり、染色陰性では、陽性135検体中MGIT法で133検体(98.5%)小川法で80検体(59.3%)が陽性でありともにMGIT法の

表1 染色結果別 MGIT 法と小川法の比較

<i>M.tuberculosis</i>	培養陽性検体数 (2 法or)	MGIT	(%)	OGAWA	(%)	p
染色結果	286	284	( 99.3)	220	( 76.9)	< 0.01
Positive	151	151	( 100.0)	140	( 92.7)	< 0.01
Negative	135	133	( 98.5)	80	( 59.3)	< 0.01
<i>M.avium complex</i>	培養陽性検体数 (2 法or)	MGIT	(%)	OGAWA	(%)	
染色結果	260	258	( 99.2)	153	( 58.8)	< 0.01
Positive	95	95	( 100.0)	89	( 93.7)	< 0.05
Negative	165	163	( 98.8)	64	( 38.8)	< 0.01

検出率が有意に高かった。

同様に、*M. avium complex*では培養陽性260検体中 MGIT 法で258検体 (99.2%) 小川法で153検体 (58.8%)が陽性であった。染色結果別では染色陽性では、培養陽性95検体中 MGIT 法で95検体(100.0%)小川法で89検体(93.7%)が陽性であり、染色陰性では、培養陽性165検体中 MGIT 法で163検体 (98.8%)小川法で64検体(38.8%)が陽性であり、ともに MGIT 法の検出率が有意に高かった。但し、染色陽性では危険率は5%であった。MGIT 法の検出率が有意に高いにもかかわらず MGIT 法陰性、小川法陽性例が存在した。小川法でのみ陽性例の内訳は、*M.tuberculosis* では、小川法でのみ陽性、PCR 法、MGIT 法で陰性例が2検体存在した。*M. avium complex*では、小川法のみ陽性で PCR 法、MGIT 法で陰性例が1検体、小川法、PCR 法で陽性、MGIT 法が

陰性例が1検体存在した。

(2) PCR 法との比較

培養法および PCR 法でいずれか陽性になったものを陽性検体とし、陽性検体全体に対する検出率を算出した。さらに染色結果別にそれぞれの検出率を算出した (表2)。

*M.tuberculosis* では陽性322検体中 MGIT 法284検体 (88.2%)、小川法220検体 (68.3%)、PCR 法265検体 (82.3%)が陽性であり、全体としては、PCR 法と小川法では PCR 法が有意に高く、PCR 法と MGIT 法とで有意差は無かった。染色結果別で比較すると、染色陽性では、陽性164検体中 MGIT 法151検体 (92.1%)、小川法140検体 (85.4%)、PCR 法162検体 (98.8%)が陽性であり MGIT 法、小川法より PCR 法の検出率が有意に高かった。染色陰性では、陽性

表2 染色結果別 MGIT法 小川法 PCR法 の陽性率

<i>M.tuberculosis</i>	陽性検体数 (3 法or)	MGIT	(%)	p	OGAWA	(%)	p	PCR	(%)
染色結果	322	284	( 88.2)	NS	220	( 68.3)	< 0.01	265	( 82.3)
Positive	164	151	( 92.1)	<0.01	140	( 85.4)	< 0.01	162	( 98.8)
Negative	158	133	( 84.2)	<0.01	80	( 50.6)	< 0.01	103	( 65.2)
<i>M.avium complex</i>	陽性検体数 (3 法or)	MGIT	(%)	p	OGAWA	(%)	p	PCR	(%)
染色結果	263	258	( 98.1)	<0.01	153	( 58.2)	< 0.01	189	( 71.9)
Positive	95	95	( 100.0)	NS	89	( 93.7)	NS	93	( 97.9)
Negative	168	163	( 97.0)	<0.01	64	( 38.1)	< 0.01	96	( 57.1)

NS : Not Significant

158検体中 MGIT 法133検体(84.2%)、小川法80検体(50.6%)、PCR 法103検体(65.2%)が陽性であり PCR 法と MGIT 法では、MGIT 法の検出率が有意に高く、小川法と PCR 法では、PCR 法が有意に高かった。

PCR 法で陽性になり培養で陰性になった検体は36検体あり、その内訳は、① PCR 法のみ陽性であったもの20検体(染色陽性7検体・陰性13検体)、②過去に培養が陽性であったもの15検体(染色陽性6検体・陰性9検体)、③前後の検体は培養陽性だが PCR 法実施検体のみが培養陰性になったもの1検体だった(染色陰性検体)。培養陽性になり PCR 法陰性になった検体は57検体(MGIT 法 55検体 小川法2検体)ありその内訳は、①検出が MGIT 法のみか、小川法で100集落以下のもの52検体(染色陽性2検体・陰性50検体)、②前後で PCR 法陽性か小川法で100集落以上のもの5検体だった(染色陰性検体)。

*M. avium* complex では陽性263検体中 MGIT 法258検体(98.1%)、小川法153検体(58.2%)、PCR 法189検体(71.9%)が陽性であり全体としては、PCR 法と小川法では PCR 法が有意に高く、PCR 法と MGIT 法とでは MGIT 法が有意に高かった。染色結果別では染色陽性では、陽性95検体中 MGIT 法95検体(100.0%)、小川法89検体(93.7%)、PCR 法で93検体(97.9%)が陽性であり PCR 法と MGIT 法、小川法とも有意差はなかった。また、染色陰性では、陽性168検体中 MGIT 法163検体(97.0%)、小川法64検体(38.1%)、PCR 法96検体(57.1%)が陽性であり PCR 法と MGIT 法では、MGIT 法の検出率が有意に高く、小川法と PCR 法では、PCR 法が有意に高かった。PCR 法で陽性になり培養で陰性になった検体は3検体あり、その内訳は、①その後培養(別の検体)で培養陽性になったもの1検体(染色陰性検体)、② PCR 法のみ陽性であったもの1検体(染色陰性検体)、③過去に培養陽性であったもの1検体(染色陰性検体)だった。培養陽性になり PCR 法陰性になった検体は74検体(MGIT 法73検体、小川法1検体)あり、その内訳は、①検出が MGIT 法のみか、小川法で100集落以下のもの68検体(染色陽性1検体・陰性67検体)、②前後で PCR 法陽性か小川法で100集落以上のもの6検体だった(染色陽性1検

体・陰性5検体)。

### (3) 培養陽性になるまでの日数

*M.tuberculosis* *M. avium* complex 各菌について染色陽性検体と陰性検体との間で培養陽性になるまでの所要日数を比較した。但し、培養日数は週数で管理していたため週数を日数に変換して比較した。*M.tuberculosis* では有意差が認められず、*M. avium* complex では、陽性検体が陰性検体に比較して有意に短かった。

## 考 察

従来より抗酸菌の分離培養には卵培地である1%、3%、2%(工藤)培地が広く用いられてきており、その操作の簡便さ、有用性は今までの実績で明かである。しかし結果報告までに時間が必要であるという欠点があり、新結核菌検査指針等に迅速性を要求され、近年卵培地に比べ感度、迅速性に優れた結果が得られる液体培地を使用した MGIT 法等が使用され始め、我国でも急速に普及した。また、PCR 法も検体から迅速に、高感度で検出される事が報告され広く実施されている。今回我々は染色結果別に、PCR 法と MGIT 法を中心に培養法を検討したところ、MGIT 法が小川法に比べ検出率が高かった。染色陰性例では集菌の効果も存在するだろうが、陽性率は著しく向上していた。菌別・染色結果別に PCR 法と MGIT 法を比較した場合、*M.tuberculosis* については、染色陽性検体では PCR 法が、陰性検体では MGIT 法の検出率が高かった。*M. avium* complex に関しては、染色陽性検体では有意差が認められず、陰性検体では MGIT 法の検出率が高かった。このように、MGIT 法の検出率が高かったにも関わらず、PCR 法で陽性になり培養で陰性の検体が存在した。また、*M.tuberculosis* (11.2%) と *M. avium* complex

表3 染色結果別陽性日数  
染色結果(日)

	Positive	Negative	p
<i>M.tuberculosis</i>	12.2	17.1	NS
<i>M.avium</i> complex	9.1	15.8	< 0.01
	NS:Not Significant		

(1.5%)でその率も違っていた(カッコ内は率)。PCR法で陽性になり培養で陰性の検体の原因を考えると、*M.tuberculosis*と*M.avium* complexで薬剤に感受性が高い*M.tuberculosis*でその率が高い事等や、当院では紹介患者も多く、治療開始後の患者の可能性も有り生菌・死菌の問題が考えられ、さらに採取・接種量等の不良、蓋の締付け不良(MGIT法は酸素消費により検知される)やMGITチューブエラー(今回の場合、チューブ内に菌が存在したか確認出来なかったのでチューブのエラーかどうか不明である)、集菌操作時に集菌したものの脱落等、集菌の技術的問題等が絡んで結果に影響があったと推測される。その他の原因として、同一時期の検査で結果に差が認められる事から、検体の品質管理も重要な位置を占めているように思われる。PCR法は保険点数上何度も実施できない為、迅速性を要求される等時間的な制約、喀痰等では患者の努力も必要に

なる等制約もあるが良質の検体が求められる。また、さらなる集菌等の技術の向上の努力が必要と思われる。

#### 参考文献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編：「新 結核菌検査指針2000」，結核予防会，東京，2000
- 2) 露口一成，池田雄史 他：Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)法による臨床検体からの抗酸菌培養成績の検討：結核，2003，78，389-393
- 3) 斎藤 肇，螺良英郎 監修：抗酸菌迅速培養法 (MGIT)に関する研究会，東京，2000
- 4) 斎藤 肇 他 Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)による抗酸菌の迅速検出法：結核，1996，71，399-405