

[短 報]

抗酸菌培養におけるアシッドプラスを用いた検体前処理法の有用性

早川絵里・中野 学

国立病院機構三重中央医療センター臨床検査科

(平成 24 年 10 月 4 日受付, 平成 25 年 1 月 28 日受理)

当院では、抗酸菌培養における雑菌汚染を軽減する為の対策として、N-acetyl-L-cysteine (NALC)-NaOH 処理法に酸処理剤アシッドプラス (極東製薬) を加えた、NALC-NaOH-酸処理法を行っている。今回、酸処理剤の有効性を評価するために、NALC-NaOH 処理のみと NALC-NaOH 処理にアシッドプラスを添加した NALC-NaOH-酸処理との間で、Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT, 日本ベクトン・ディッキンソン, 以下日本 BD) 法による培養結果をもとに比較検討した。抗酸菌培養陽性率は、NALC-NaOH 処理、NALC-NaOH-酸処理ともに 20.3% (130/640) で、一致率は 95.6 (612/640) %であった (w.s.)。雑菌汚染率は、NALC-NaOH 処理のみでは 12.5% (80/640)、酸処理剤を加えた場合 0.9% (6/640) であった。抗酸菌培養陽性日数は、NALC-NaOH 処理のみでは平均値 11 日 (1~40 日)、酸処理剤を加えた場合平均値 14 日 (1~48 日) であった。以上より、アシッドプラスを用いた酸処理法は、抗酸菌発育に及ぼす影響を最小限に抑え、雑菌汚染を大幅に軽減することが可能であり、効率のよい抗酸菌培養検査を行う上で有用な前処理法の 1 つとなり得ることが示唆された。

Key words: 抗酸菌, N-acetyl-L-cysteine, アシッドプラス, MGIT, 前処理法

抗酸菌分離培養検査において、検体に混在する雑菌を除去し抗酸菌のみを選択的に培養するために、検体の前処理が必要である。我が国での抗酸菌の分離培養における検体前処理法は、粘液溶解剤である N-acetyl-L-cysteine (NALC) を用いた NALC-NaOH 法¹⁾が広く一般的に使用されている。NALC-NaOH 法は、前処理剤による消化均等化と遠心による集菌を組み合わせることで抗酸菌に対するアルカリの影響を極端に少なくした方法であり、結核菌検査指針や米国の Centers for Disease Control and Prevention (CDC) でも推奨されており²⁾³⁾、諸外国でも用いられている前処理法である⁴⁾。NALC は、喀痰粘液の S-S 結合を分断して-SH -SH-に還元し、喀痰を溶解・均質化して NaOH

を効率よく作用させる。さらに現在ではタンパク分解酵素、セミアルカリプロテアーゼ (SAP) を前処理剤に先立って使用することが推奨されており³⁾、当院での抗酸菌の液体培養に用いる Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT, 日本 BD) の前処理法も、SAP を使用する、SAP-NALC-NaOH 法とされている⁵⁾⁶⁾。しかし、被検者の中には、良質痰の採取に難渋する 경우가多く、喀痰の品質管理が非常に難しいため、SAP を用いても NALC-NaOH の効果が十分に発揮されず、雑菌汚染が問題となることが多いのが現状である。NALC-NaOH による殺菌が不十分で、MGIT に雑菌が混入すると、BACTEC MGIT 960 システム (日本 BD) が偽陽性のシグナルを出力するため、正しい培養判定を行うためには検体の再処理を行わなければならない。当院では、雑菌汚染による検体再処理操作を抑制するため、SAP-NALC-NaOH 処理法に酸処理剤アシッドプラス (極東製薬) を加えた SAP-NALC-NaOH-酸処理法を実施している。アシッドプラスはコハク酸とセチルピリジニウムクロライドから成る、酸と界面活性剤を組み合わせた前処理液であり、アルカリ処理法では汚染を阻止できなかった雑菌に対して

著者連絡先: (〒514-1101) 三重県津市久居明神町 2158 番地 5
国立病院機構三重中央医療センター臨床検査科
早川絵里
TEL: 059-259-1211
FAX: 059-256-2651

表1. NALC-NaOH 処理と NALC-NaOH- 酸処理の MGIT 培養結果の比較

	NALC-NaOH 処理			計
	抗酸菌培養	陽性	陰性	
NALC-NaOH- 酸処理	陽性	116	14*	130
	陰性	14	496**	510
	計	130	510	640
一致率	612/640 (95.6)			

*NALC-NaOH 処理での雑菌汚染 14 例

**NALC-NaOH 処理での雑菌汚染 6 例, NALC-NaOH- 酸処理での雑菌汚染 66 例を含む

の抑制効果が期待できる。しかし、これまで NALC-NaOH 処理の後の酸処理が MGIT における抗酸菌検出率や雑菌汚染率に与える影響について検討した報告がほとんどなく、アシッドプラスを用いた酸処理法の有効性が不明である。今回、NALC-NaOH 処理法と、アシッドプラスを添加した NALC-NaOH-酸処理法の間で、MGIT における培養結果をもとに、抗酸菌培養陽性率、雑菌汚染率、抗酸菌培養陽性検出日数について比較検討を行ったので報告する。

検討には、2010 年 11 月から 2011 年 3 月に当院微生物検査室に提出された、抗酸菌検査の依頼のあった 640 例 (喀痰: 404, 気管支内痰: 89, 気管支洗浄液: 65, 胸水: 23, 糞便: 13, 開放膿: 11, 腹水: 7, 胃液: 7, 髄液: 7, 組織: 4, 閉塞膿: 3, 尿: 2, 気管支吸引物: 2, 胆汁: 1, 心嚢水: 1, 気管支擦過物: 1) を対象として用いた。

提出された検体に SAP (プレソルブ, 日水製薬) を 3 倍量加えて Vortex ミキサーで攪拌し、全量を 50 ml の遠沈管に移した。粘性の極度に強い喀痰の場合、添付文書通りの 10 分間静置では均質化が不十分となることがある。同時に処理する全ての検体を完全に均質化させた状態で塗抹、培養検査を行うために、SAP を十分時間作用させる事を目的として冷蔵庫にて遠沈管を一晩静置し、検体を完全に均質化した。翌日 NALC-NaOH 液 (BBL マイコプレップ, 日本 BD) を 6 ml 加えてボルテックスにてよく攪拌し、15 分間静置した。静置後、0.067 M (pH 6.8) の滅菌リン酸緩衝液 (以下リン酸緩衝液) をトップリングまで加え、4℃ で 3,000×g, 20 分間遠心し、上清を除去して、リン酸緩衝液を 1 ml 加えて NALC-NaOH 処理検体を調整した。NALC-NaOH 処理検体を培養のために 0.5 ml 採取し、残りの検体にアシッドプラスを 0.5 ml 加えてボルテックスし、10 分間静置した。静置後、再度リン酸緩衝液をトップリングまで加え、4℃ で 3,000×

g, 20 分間遠心し、上清除去後、リン酸緩衝液を 1 ml 加えて NALC-NaOH-酸処理検体を調整した。

NALC-NaOH 処理後の検体 0.05 ml を用いて塗抹標本を作製し、火炎固定後、蛍光法 (オーラミン O 染色) にて染色、鏡検した。培養は、MGIT 法で行った。MGIT 法では、NALC-NaOH 処理検体、NALC-NaOH-酸処理検体それぞれを BACTEC MGIT 960 にて 6 週間培養し、陽性シグナルの出た検体は培養液で塗抹標本を作製し、蛍光法にて染色・鏡検した。さらに、培養液を羊血液寒天培地 (日水製薬) に塗布して 3 日間培養し、一般細菌と真菌の有無を確認した。抗酸菌の同定は、コバスアンプリコア (ロシュ・ダイアグノスティックス)、DDH マイコバクテリア (極東製薬) を用いて行った。さらに、菌量の把握と、複数菌の混在や液体培地に発育しない菌の検出を目的として、2% ビット培地 (極東製薬) でも同時に 6 週間培養を行った。

統計学的検討には t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

抗酸菌培養陽性率は表 1 に示すように、NALC-NaOH 処理、NALC-NaOH-酸処理ともに 130 例 (20.3%) で、一致率は 95.6% (612/640) であり、前処理 2 法間に有意差は認められなかった (w.s.)。発育した抗酸菌の内訳は、結核菌群 110 株、*Mycobacterium avium* 21 株、*Mycobacterium kansasii* 8 株、*Mycobacterium intracellulare* 3 株、*Mycobacterium abscessus* 3 株であった。雑菌汚染率は、NALC-NaOH 処理 80 例 (12.5%)、NALC-NaOH-酸処理 6 例 (0.9%) であった。

前処理 2 法間での MGIT 培養結果の不一致例は、表 2 に示すように、NALC-NaOH 処理培養陽性、NALC-NaOH-酸処理陰性が 14 例、NALC-NaOH 処理培養陰性、NALC-NaOH-酸処理陽性も 14 例あった。NALC-NaOH 処理で培養陽性であった 14 例の詳細

表2. NALC-NaOH 処理と NALC-NaOH-酸処理の MGIT 培養結果不一致例の詳細

材料	Gaffky	NALC-NaOH		NALC-NaOH-酸処理		抗酸菌名
		MGIT	2% ビット培地	MGIT	2% ビット培地	
喀痰	0 (-)	陽性	陰性	陰性	陰性	<i>M. avium</i>
胃液	0 (-)	陽性	陰性	陰性	陰性	結核菌群
喀痰	0 (-)	陽性	陰性	陰性	陰性	結核菌群
喀痰	0 (-)	陽性	陰性	陰性	陰性	結核菌群
胃液	0 (-)	陽性	陰性	陰性	陰性	結核菌群
喀痰	0 (-)	陽性	1 コロニー	陰性	陰性	<i>M. avium</i>
気管支内痰	0 (-)	陽性	1 コロニー	陰性	陰性	結核菌群
喀痰	1 (±)	陽性	陰性	陰性	陰性	結核菌群
喀痰	0 (-)	陽性	陰性	陰性	1 コロニー	結核菌群
喀痰	0 (-)	陽性	1 コロニー	陰性	陰性	結核菌群
喀痰	2 (1+)	陽性	陰性	陰性	陰性	結核菌群
喀痰	0 (-)	陽性	陰性	陰性	陰性	結核菌群
喀痰	5 (3+)	陽性	陰性	陰性	陰性	結核菌群
喀痰	0 (-)	陽性	陰性	陰性	陰性	結核菌群
喀痰	0 (-)	汚染	汚染	陽性	1 コロニー	結核菌群
喀痰	0 (-)	汚染	汚染	陽性	14 コロニー	結核菌群
喀痰	5 (3+)	汚染	500 コロニー	陽性	19 コロニー	結核菌群
喀痰	0 (-)	汚染	汚染	陽性	41 コロニー	結核菌群
喀痰	5 (3+)	汚染	1000 コロニー	陽性	500 コロニー	結核菌群
胃液	0 (-)	汚染	500 コロニー	陽性	25 コロニー	<i>M. avium</i>
喀痰	1 (±)	汚染	汚染	陽性	陰性	結核菌群
喀痰	2 (1+)	汚染	陰性	陽性	陰性	結核菌群
喀痰	5 (3+)	汚染	汚染	陽性	1 コロニー	結核菌群
喀痰	2 (1+)	汚染	汚染	陽性	7 コロニー	結核菌群
喀痰	1 (±)	汚染	汚染	陽性	21 コロニー	結核菌群
喀痰	0 (-)	汚染	10 コロニー	陽性	4 コロニー	結核菌群
喀痰	0 (-)	汚染	汚染	陽性	1 コロニー	結核菌群
喀痰	2 (1+)	汚染	8 コロニー	陽性	陰性	結核菌群

は、塗抹陰性が 11 例、Gaffky 1 号、2 号、5 号がそれぞれ 1 例ずつであった。菌種は、結核菌群 12 例、*M. avium* 2 例で、このうち 3 例が 2% ビット培地にて 1 コロニー検出し、11 例は陰性であった。一方 NALC-NaOH-酸処理で培養陽性であった 14 例は、NALC-NaOH 処理のみの場合全例が MGIT 培養で雑菌汚染しており、うち 5 例は 2% ビット培地で培養陽性、9 例は雑菌汚染または培養陰性であった。塗抹陰性が 6 例、Gaffky 1 号が 2 例、2 号、5 号がそれぞれ 3 例ずつであり、菌種は、結核菌群 13 例、*M. avium* 1 例であった。

MGIT における、抗酸菌の培養陽性日数は、図 1 に示すように NALC-NaOH 処理が 1 日～40 日（平均値 11 日）、NALC-NaOH-酸処理が 1 日～48 日（平均値 14 日）で、前処理 2 法間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。

MGIT 培養における汚染菌の内訳は、Coagulase

Negative Staphylococci (CNS) が最も多く (32 例)、次いで *Corynebacterium* spp. (17 例)、MRSA (12 例) と続き、抗菌薬に高度耐性を示す菌が上位を占めた。

今回、640 例の臨床検体を用いて NALC-NaOH 処理のみと、NALC-NaOH 処理にアシッドプラスによる酸処理を加えた場合の前処理効果の比較を行なったところ、前処理 2 法間の抗酸菌培養陽性率に有意な差は認められず、培養結果の全体一致率も 95.6% (612/640) と良好であった。雑菌汚染率は、NALC-NaOH 処理では 12.5% であったのに対し、NALC-NaOH-酸処理では 0.9% に抑えられた。結核菌検査指針では、抗酸菌培養における培地の雑菌汚染率の許容範囲は 2～5% の間であり、汚染率が 2% 以下の場合過度な汚染除去により検体中に含まれる抗酸菌までも殺菌する恐れがあるとされている³⁾。本検討では、MGIT における抗酸菌の培養陽性検出日数の平均値は、NALC-

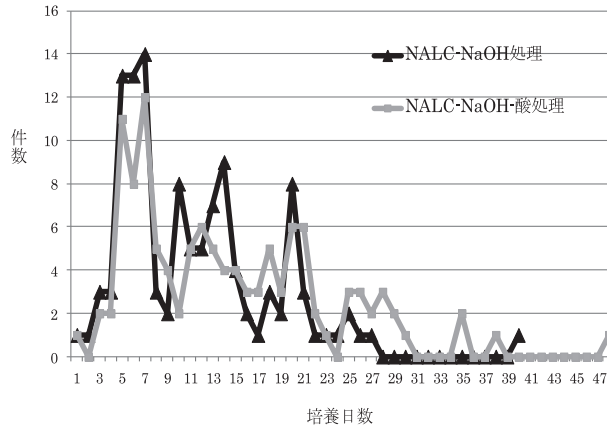


図1. MGIT 培養陽性検出日数

NaOH 処理が 11 日、NALC-NaOH-酸処理が 14 日であり、有意差ありという検定結果であったものの、検出日数の差はわずか 3 日であり、酸処理を加えたことによる極端な発育速度の遅延は認められなかった。また、MGIT において NALC-NaOH 処理で培養陽性、NALC-NaOH-酸処理では陰性となった不一致例が 14 例あり、11 例は塗抹陰性、塗抹陽性の 3 例は、2% ビット培地では培養陰性であった。これらは検体中の菌量が少ないか、もしくは化学療法により低活性化した抗酸菌であり、多少酸処理剤の影響があったと考えられる。また、NALC-NaOH-酸処理では、リン酸緩衝液による希釈操作を 2 回行うため、この操作による若干の菌体回収率の低下の影響があったことも否定できない。しかし、この不一致 14 例の中に未治療で新規陽性患者の例はなかったため、これらの不一致例については検出の限界であると考えられる。これらの結果から、NALC-NaOH 処理にアシッドプラスによる酸処理を加える前処理法は、抗酸菌発育に及ぼす影響を最小限に抑え、NALC-NaOH 処理で問題となっていた MGIT の雑菌汚染による偽陽性を大幅に減少させることが明らかとなった。

入院患者や高齢者では、喀痰排出困難例もあり、良質痰の採取には難渋することが多い。MGIT の雑菌汚染の原因菌はグラム陽性菌であることが多く、MRSA、CNS、グラム陽性桿菌などが認められるといわれている⁷⁾。本検討においても、MGIT 培養における汚染菌は CNS、*Corynebacterium* spp.、MRSA といった抗菌薬に高度耐性を示すグラム陽性菌がほとんどであった。MRSA などの検体材料からの分離頻度は、雑菌汚染率に影響するため、雑菌汚染率は検査

材料の性質や患者背景の違いによって各施設である程度の差が生じると考えられている⁷⁾。当院においては、結核患者のように長期間入院加療を行なっている患者では、MRSA 保菌者や抗菌薬投与による薬剤耐性菌を保有している患者が多い傾向がみられ、丁寧に処理を行なっても、雑菌汚染を減らすことは難しいのが現状であるといえる。さらに、雑菌汚染の際の再処理についても、科学的な根拠に基づく再処理法が確立されていないため、再処理後の正しい培養判定が実施可能であるか疑問が残る。したがって、当院のように抗酸菌検査の依頼数が比較的多い施設では、雑菌汚染による検体再処理操作を抑制し、患者の病態を反映した正確な結果を、効率良く臨床側にフィードバックするためには、前処理法としてアシッドプラスを用いた NALC-NaOH-酸処理法を選択することも一法であると考えられた。

謝辞：本研究にあたり、ご助言を賜りました当院呼吸器内科、藤本源先生に深謝します。

文 献

- 1) Kubica, GP, E Dye, ML Cohn, et al. 1963. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir. Dis.* 87: 775-779.
- 2) Kent, P.T., G.P. Kubica. 1985. *Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory*. USDHHS, Centers for Disease Control, Atlanta.
- 3) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 2007. 結核菌検査指針 2007, 結核予防会, 東京.

- 4) American Society for Microbiology (ASM). 1994. Section 3. Mycobacteriology. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook, ASM, Washington, D.C.
- 5) 日本ベクトン・ディッキンソン. 2009. 培養同定・抗酸菌キットミジット分離培養剤, 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京.
- 6) 斎藤 宏, 山根誠久. 2001. 最近の抗酸菌培地とその使い方. 臨床と微生物 28: 277-285.
- 7) 青野昭男. 2001. MGIT. 臨床と微生物 28: 253-261.

Usefulness of ACID PLUS decontamination procedure for MGIT

Eri Hayakawa, Manabu Nakano

Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Mie-Chuo Medical Center

In order to reduce various-germs contamination, we used ACID PLUS (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.) decontamination procedure for Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT, Becton Dickinson Japan). This decontamination procedure is the method which added ACID PLUS to the N-acetyl-L-cysteine (NALC)-NaOH processing method. We compared the NALC-NaOH and ACID PLUS decontamination procedures by using MGIT system. The positive ratio for acid-fast culture of NALC-NaOH and ACID PLUS were both 20.3% (130/640) and coincidence rate was 95.6% (612/640) (N.S.). The decontamination rate was 12.5% (80/640) in NALC-NaOH and 0.9% (6/640) in ACID PLUS. The mean time of the recovery of mycobacteria strains in the NALC-NaOH was 11-days and in the ACID PLUS was 14-days. As mentioned above, minimizing the influence of acid-fast-bacilli growth and reducing various-germs contamination sharply and efficient, it was suggested that this ACID PLUS decontamination procedure can be set to one of the useful pre-treating methods.