

[短 報]

喀痰材料を対象とした抗酸菌用液体培養におけるアルカリ前処理の改良

富田元久<sup>1)</sup>・吉田志緒美<sup>2)</sup>・木原実香<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床検査科

<sup>2)</sup> 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター

(平成 27 年 10 月 13 日受付, 平成 28 年 1 月 13 日受理)

抗酸菌液体分離培養に用いる除菌前処理の過程は煩雑である。今回、アルカリ処理後の遠心操作を省略した方法（以下：改良法）の有用性を検証した。2014 年 7 月から 8 月までの抗酸菌培養検査依頼があった喀痰 206 件と喀痰 206 件中、PCR 検査依頼があった 26 件を対象とし、SAP-NALC/NaOH 処理した試料と改良法で処理した試料を各々 TaqManPCR（ロシュ・ダイアグノスティックス）と MGIT（日本ベクトン・ディッキンソン）を用いた培養の結果を比較した。PCR 検査陽性数は SAP-NALC/NaOH 法で 18 件、改良法で 19 件に認められ、両検体間の陽性一致率は 96.2% となった。MGIT 培養における陽性数は SAP-NALC/NaOH 法 39 件、改良法 46 件となり、一致率は 95.6% であった。また、雑菌汚染率は SAP-NALC/NaOH 法 1.5%、改良法 2.4% であった。PCR 陽性数、液体培養陽性数、雑菌汚染数の有意差は得られなかった。以上により、改良法は、SAP-NALC/NaOH 法に比べて簡便であり、且つ雑菌汚染の軽減と菌体回収は同等の精度を有した。迅速抗酸菌に対しても良好な発育を可能としたため、抗酸菌液体分離培養の除菌前処理に有用な方法と考えられる。

**Key words:** MGIT, NALC/NaOH, セミアルカリプロテアーゼ, 冷却遠心操作, 2 ml マイクロチューブ

培養により分離できないらい菌の感染症診断を除いて、臨床検体から培養により抗酸菌属の菌株を分離することは、感染症を診断する上で非常に有用である。そのため患者の早期発見・早期治療の目的において菌を迅速に検出することは重要である。分離培養ボトルを用いた MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 法は、固形培地による培養法に比べて検出時間の短縮と検出率の向上を図ることができると報告されており、全国で幅広く普及するに至っている<sup>1)~3)</sup>。喀痰材料を検体とした場合、MGIT 培養の前処理法として推奨される SAP-NALC/NaOH 法（以下：従来法）

は雑菌汚染を効果的に抑えて有用であるが<sup>4)~6)</sup>、NALC が用事調製を必要とすることによる試薬保存性の悪い点や、煩雑な手技による検体汚染の危険性が指摘されてきた。加えて、冷却高速遠心機など的高額な専用設備を必要とする点も機器管理上負担となっている。一方、われわれは、NALC/NaOH 法における試薬保存の非効率性の解消を目的とした 2%NaOH 法の高い雑菌除去能を既に証明しており、現在、院内のルーチン法として運用している<sup>7)</sup>。今回さらに、従来法の煩雑性の解消と、処理工程中に生じる検体汚染の危険性を軽減することを目的として、検体と反応試薬容量を減量させ、尚且つ遠心操作を省略した新しい改良前処理法（改良法）を考案した。今回、本改良法と従来法との間で MGIT 培養における菌検出までに要する日数及び検出率、並びに TaqManPCR 法の成績について比較検討したので報告する。

対象は 2014 年 7 月から 8 月までの液体培養依頼の喀痰 206 件を用いた。また、この内、*Mycobacterium tuberculosis* complex (TBC, *Mycobacterium avium*,

著者連絡先：(〒591-8555) 大阪府堺市北区長曾根町 1180  
独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床検査科  
富田元久  
TEL: 072-252-3021  
FAX: 072-251-1372  
E-mail: mhtomita@kch.hosp.go.jp

図1. 改良法のプロトコール

1. Using aerosol-free 2.0 ml micro centrifuge tube, add 100 µl of the SAP-digested specimen
2. Add equal amount of 2% NaOH (1 : 1)
3. Vortex well for 20 seconds and spin down, and the dispersed first liquid was left at rest
4. Take place even after 15 minutes since left at rest (room temperature)
5. Add 0.8 ml phosphate buffer solution (pH 6.8)
6. Vortex well and spin-down
7. Inoculate the processed sediment onto the culture media of MGIT (0.5 ml) and use for the DNA extraction in TaqManPCR (0.1 ml)

表1. PCRの結果を両法で比較した表

		SAP-NALC/NaOH		
		positive*	negative	total
Modified SAP-NaOH	positive*	18	1**	19
	negative	0	7	7
	total	18	8	26

\* : TBC, *M. avium*, *M. intracellulare*\*\* : *M. avium*

表2. 培養結果の培養陽性日数, 培養陽性数, 雑菌数を両法で比較した表

	Range of time to detection (mean)	p*	Number of isolates in mycobacteria (%)	p*	Number of isolates in others (%)	p*
SAP-NALC/NaOH	3.42 (10.8)	NS	39 (18.9)	NS	3 (1.5)	NS
Modified SAP-NaOH	3.42 (12.1)	NS	46 (22.3)	NS	5 (2.4)	NS

\* : For comparison with t test

NS : not significant

*Mycobacterium intracellulare* の PCR 検査と培養検査の依頼と同時にあった 26 件すべてを, PCR 検査の結果も比較とした。まず, セミアルカリプロテアーゼ (SAP) で喀痰を均質・液状化し, 3,000 g, 20 分間の冷却遠心の後, デカントした沈渣に滅菌蒸留水を用いて 200 µl に調整したものを試料とし, 各 100 µl を改良法と従来法に用いた。雑菌除去の従来法のプロトコールは結核検査指針 2007<sup>6)</sup> ならびに既論文<sup>7)</sup> に準じ, 改良法のプロトコールは図 1 に示すように, SAP 集菌した喀痰 100 µl を 2 ml のマイクロチューブに取り, 2%NaOH 液を 100 µl 加え, ボルテックス, スピンドアウンし 15 分間作用させる。15 分後 phosphate buffer solution (PBS) を 800 µl 加え, ボルテックス, スピンドアウン後, 500 µl を液体培養に用い, 100 µl を PCR 検査である TaqManPCR (ロシユ・ダイアグノスティックス) に用いた。液体培養は BACTEC MGIT 960 (日本ベクトン・ディッキンソン) で測定し最終 42 日まで培養した。また, 42 日間内の培養で蛍光を

示さない, もしくは陰性と BACTEC MGIT960 が判定された場合でも, 管底に小さな顆粒等があるものをチールネルゼン染色で陽性と確認した場合は培養陽性と判定した。この場合の陽性日数を 42 日とした。MGIT 培養で陽性となった菌液はすべて Middlebrook 7H11 培地に接種し, 37°C, CO<sub>2</sub> 培養にてコロニーを分離した。得られた菌株の菌種同定は, まず, TBcID (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて TBC と non-tuberculous mycobacteria (NTM) を鑑別し, NTM の場合, TaqManMAI (ロシユ・ダイアグノスティックス) を用いて *M. avium*, *M. intracellulare* を同定した。*M. avium*, *M. intracellulare* 陰性の場合, DDH マイコバクテリア (極東製薬工業) を実施した。統計学的手法は t-検定を用い,  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

PCR 検査結果は表 1 に示した。従来法が TBC 陽性 10 件, *M. avium* 陽性 7 件, *M. avium* + *M. intracellulare* 陽性 1 件, 3 菌種 (TBC, *M. avium*, *M. intracellulare*)

表 3. 両法で培養結果を菌種別で表した表

	SAP-NALC/NaOH									
	TBC	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i> + <i>M. intracellulare</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. kansasii</i>	other NTM	Not mycobacteria	Negative	Total
TBC	16									17
<i>M. avium</i>		10								10
<i>M. intracellulare</i>			3							4
<i>M. avium</i> + <i>M. intracellulare</i>				1						1
<i>M. abscessus</i>					5					6
<i>M. kansasii</i>						3				3
other NTM								5		5
Not mycobacteria							2	3		5
Negative			1					153		155
Total	16	10	4	1	5	3	0	3	164	206

lare) 陰性 8 件だった。改良法は TBC 陽性 10 件, *M. avium* 陽性 8 件, *M. avium* + *M. intracellulare* 陽性 1 件, 3 菌種陰性 7 件となり, 両法の結果の一致率は 96.2% であった。乖離した検体は従来法陰性, 改良法 *M. avium* 陽性が 1 件あった。

培養結果は表 2 に示すように, 培養陽性を示した日数は, 従来法 3-42 日 (平均 10.8 日), 改良法では 3-42 日 (平均 12.1 日) であった。次に培養陽性数では従来法は 39 件 (18.9%), 雑菌 3 件 (1.5%), 改良法培養陽性数は 46 件 (22.3%), 雑菌 5 件 (2.4%) であり, 一致率は 95.6% で  $p > 0.05$  で有意差はなかった。また, 培養陽性となった検出株を日別に累積したところ, 検出日数 8 もしくは 9 日の時点で改良法が従来法に比べて 4~5 件多く陽性になったが, 42 日間全体では差はなかった (図 2)。

表 3 に菌種別の培養陽性数を比較したものを示した。従来法では TBC と同定された検体は 16 件, *M. avium* 10 件, *M. intracellulare* 4 件, *M. avium* + *M. intracellulare* 1 件, *Mycobacterium abscessus* 5 件, *Mycobacterium kansasii* が 3 件であり, 改良法は TBC 17 件, *M. avium* 10 件, *M. intracellulare* 4 件, *M. avium* + *M. intracellulare* 1 件, *M. abscessus* 6 件, *M. kansasii* が 3 件, DDH で同定不能の NTM 5 件であった。両法で乖離した菌種は, 従来法陽性, 改良法陰性が 1 件あり, *M. intracellulare* であった。一方, 従来法陰性, 改良法陽性が 8 件で菌種は, TBC 1 件, *M. intracellulare* 1 件, *M. abscessus* 1 件, DDH で同定不能の NTM 5 件であった。

従来法は, 液体培養における喀痰検体の前処理における雑菌汚染除去法の一つとして結核菌検査指針 2007 により推奨されている<sup>6)</sup>。一方, 米国 CDC は, 抗酸菌培養の除菌処理として NALC/NaOH 法を推奨し, 95% の遠心効率を得るためには冷却遠心機を用いた 8~10℃ の条件下での 3,000 g, 15 分間の遠心が必要であるとしているが<sup>8)</sup>, 1 回の遠心操作を行うことで, 未回収の菌体が存在してしまうことを示している。わが国では, 従来法が結核菌検査指針 2007 により推奨されているが, 一検体につき 2 回の高速遠心操作が必要であるため, 1 回の NALC/NaOH 法に比べて菌体の流出が予想され, その後の培養における菌の回収に影響を及ぼしている可能性が考えられる。今回の検討では, 有意差は得られなかったものの, 培養陽性件数の増加が認められた。また CDC は, 正確な時間での遠心操作を必要としているが, それは, 遠心時間が延長すると摩擦熱が生じて遠心機内の温度が上昇するため, 遠心効率の低下と共に培養による菌の回収

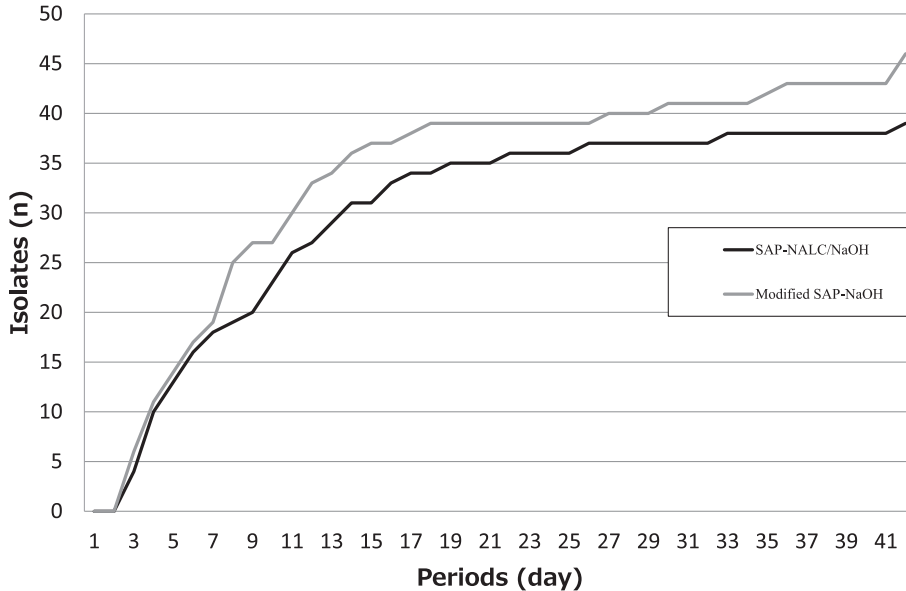


図2. 両法の累積陽性株数と検出日数を表した図

率（菌の生残率）が低下すると報告しているためであり<sup>8)</sup>、均一化・前処理された検体をPBSで希釈した後も前処理剤の作用が持続し抗酸菌へのダメージが生じていることを意味している。したがって、今回われわれは、卓上小型遠心機を用いて遠心時間を大幅に短縮することで、菌体へのダメージを抑え、検査の迅速化と手順の簡略化を可能とした。また、迅速発育菌はアルカリ性溶液に対する抵抗力が弱いことから<sup>9)10)</sup>、雑菌汚染率を向上させる目的でNaOHのアルカリ濃度を上げたり、薬剤の作用時間を延長したりすると抗酸菌に相当なダメージを与えてしまう可能性がある。今回、従来法の試薬の組成や反応時間を変更しない改良法において、迅速発育菌を発育することができた。さらに、従来法の2度の遠心時に伴うデカント操作から、検体への汚染に加えて、検体の流出による菌体損失や、エアロゾルの発生による検体取扱者への感染リスクが高まる。改良法はこれらのリスクを軽減し、安全に処理を行えた上に、雑菌汚染率を従来法と同等に低く抑えることができた。したがって、改良法は有用であると考えられた。特に改良法は、迅速・簡便な業務を可能とし、尚且つ、2mlマイクロチューブ用の卓上遠心機を採用することにより高額機器設備の支出を抑えることができるため、多くの医療機関で実施可能な方法であると考えられるが、喀痰の前処理は非常に危険を伴う操作なので安全キャビネット内で作業を行わなければならない。

現在、遠心時間を短縮または省略できる集菌剤を用いた集菌法が開発されているが、PCR検査に直接使えない等の問題がある。今回、改良法と従来法との間でTaqManPCR法の結果一致率は同程度となり、そのうち結果が乖離した1検体は、TaqManPCR法で同定可能な3菌種のいずれにも陰性であった一方、改良法ではTaqMan-MTB、TaqMan-MINは陰性、TaqMan-MAVは陽性だった。この検体から得られた菌株は*M. abscessus*であったが、この患者の前回提出された検体から*M. avium*が分離され治療が開始された経緯から、培養の発育能力が低いことが考えられた。したがって、PCR検査においても改良法は従来法と同等の感度を有しており、尚且つ、抗酸菌の検出が可能であった。今回の検討では、改良法による前処理検体を検体とした場合26件と母数は少ないので、今後、症例数を増やしての検討をしていきたい。

改良法による検体前処理はPCR検査においてもより簡便に抗酸菌の検出が可能であった。今後、われわれは対象検体数を増やし、PCR検査を含めたフローチャートの確立と複数の施設間での汎用性の検証を行い、院内日常検査としての改良法の適性を評価する必要がある。将来的に、抗酸菌症の迅速診断法に欠かせない手技として本改良法が認められれば、結核病棟を有する専門医療機関から一般の医療機関までの幅広い施設に普及し、患者の早期発見、感染拡大防止において、一層貢献できると考えられる。

**利益相反**：本論文の研究内容、結論、意義、あるいは意見について他者との利益相反 (conflict of interest) はありません。

## 文 献

- 1) 齊藤 肇, 螺良英朗, 山中正彰, 他. 1997. MGIT の評価に関する 10 施設での共同研究. 臨床と微生物 24: 897-903.
- 2) 小林寅詔, 戸田陽代, 小山悦子, 他. 1999. Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) を用いた自動抗酸菌検出装置の検出能力に関する検討. 感染症雑誌 73: 172-178.
- 3) 入江章子, 南 潔, 小澤浩平, 他. 2001. 液体培養システム MGIT を用いた抗酸菌培養の検討. 医学検査 50: 13-16.
- 4) 日本ベクトン・ディキンソン. 2010. 培養同定・抗酸菌キット (MGIT 法) ミジット分離培養剤. 日本ベクトン・ディキンソン, 東京.
- 5) 齊藤 宏, 山根誠久. 1999. Semi-Alkaline Protease 処理を併用した N-Acetyl-L-Cysteine-NaOH (NALC-NaOH) 喀痰前処理法での全自動抗酸菌培養システム, MB/BacT の評価. JARMAM 10: 103-110.
- 6) 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.
- 7) 富田元久, 竹野 華, 吉田志緒美, 他. 2008. MGIT の前処理液 BBL マイコプレップと 2%NaOH 処理との比較. 結核 83: 471-473.
- 8) 阿部千代治. 2013. 抗酸菌検査マニュアル. 日本ベクトン・ディキンソン, 東京.
- 9) 阿部千代治, 小林郁夫. 2011. 検体前処理液 NALC-NaOH の抗酸菌の生残に及ぼす影響. 結核 86: 368.
- 10) 丸茂健治, 青木良雄. 1983. 抗酸菌に対する NaOH の殺菌作用. 結核 58: 515-520.

## The evaluation of the modified SAP-NaOH decontamination procedure for MGIT

Motohisa Tomita<sup>1)</sup>, Shiomi Yoshida<sup>2)</sup>, Mika Kihara<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center

<sup>2)</sup>Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center

We evaluated the modified semi-alkaline-protease (SAP)-2%NaOH decontamination procedures by using a decreased amount of expectorated sputum in the aerosol-free 2 ml micro-centrifuge tube with high speed refrigerated micro centrifuge. A total of 206 sputum specimens obtained in NHO Kinki-Chuo Chest Medical Center from July to August 2014 were subjected to two decontamination methods (SAP-NALC/NaOH vs modified SAP-NaOH). All specimens were divided into two portions after concentrating the sediments processed by SAP, then decontaminated, and inoculated into MGIT. Any tubes were incubated by BACTEC MGIT-960 and monitored for up to forty-second days. Comparing these decontamination procedures, the time of the recovery of rapid growing mycobacteria strains in the modified SAP-NaOH was significantly more increased. Of these, 39 specimens processed by the SAP-NALC/NaOH were positive for growth of mycobacteria, and similarly 46 specimens processed by the modified SAP-NaOH ( $p > 0.05$ ) were positive. Nineteen specimens in the modified SAP-NaOH and the 18 specimens in the SAP-NALC/NaOH were positive by TaqManPCR. The decontamination rate was 1.5% in SAP-NALC/NaOH and 2.4% in modified SAP-NaOH, however the difference was statistically not significant ( $p > 0.05$ ). We verified that the modified SAP-NaOH was an alternative method suitable for the digestion and decontamination procedure, and was useful for the isolation and detection of mycobacteria as well, including DNA extraction and purification, and offered the increased efficiency and validity in complicated centrifuge operation. This modified decontamination also features an easy-to-use design with time-saving mode by a compact body centrifuge machine.