

当院における臨床細菌検査 第12報

PURE-LAMP-TB 法を用いた抗酸菌検査の現状 および感染対策における有用性の検討

小川 由実 清水 里美 蛎屋 俊
栗村 尚史 林 久美 渡部八重子
高野 孝江 西阪 隆

I. はじめに

結核菌は病原性が高く感染が成立する病原体の数は10個以下とされ¹⁾, 空気感染(飛沫核感染)によりヒト-ヒト感染を起こす。感染症法では二類感染症に指定されており, 直ちに結核発生届の届出が必要である。呼吸器領域を中心とする全身の感染症を引き起こすことで知られ, 喀痰などの検査材料から結核菌群を証明することにより診断できる。結核菌群の検出には, 従来から塗抹検査, 培養検査などが行われている。塗抹検査は迅速性には優れるものの, 陽性となるには検査材料中に 10^4 /mL 個程度の菌量を必要とし, 仮に陽性であったとしても, それが結核菌群か, 非結核性抗酸菌群かの区別はつかない²⁾。一方, 培養検査は感度が優れるものの, 結核菌の発育が極めて遅いため, 発育支持力の高い液体培地を用いても菌体の可視までには約2週間を要する^{2,3)}。結核菌群の検出に時間を要することにより, 診断が遅れ, さらなる感染者の増加を招くことに繋がる。こうした問題点を解決した検査法として, 結核菌群核酸増幅法, いわゆる遺伝子検査が迅速診断に応用されている。遺伝子検査は, 従来から polymerase chain reaction (PCR 法) や real-time PCR 法が使用されてきたが^{4,5)}, 結果が判明するまでには数時間を必要とした。そこで, DNA の迅速抽出に Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE 法) を取り入れた Loop-mediated isothermal amplification (LAMP 法) による Loopamp 結核菌群検出試薬キット (PURE-LAMP-TB 法: 栄研化学株式

会社) が2011年6月より発売され^{6,7)}, PCR 法に比べ極めて短時間で結核菌群の検出が可能となった。

今回, PURE-LAMP-TB 法の導入により, 当院における抗酸菌検査体制を見直し, より迅速な抗酸菌検査体制(新体制)を構築したので, 感染対策を含めその効果について報告する。

II. 対象および方法

1. 対象

2009年1月から2015年12月までに, 細菌検査室に抗酸菌検査を目的として提出された7,539検体を対象とした。

2. 方法

塗抹検査は, 石炭酸フクシン(極東製薬株式会社)を使用した Ziehl-Neelsen 染色法にて直接塗抹法および集菌塗抹法を行った^{2,3)}。培養検査の前処理には, 喀痰の溶解・均質化を目的にスプタザイム(極東製薬株式会社)を用い, 消化・汚染除去には Myco Prep-NALC-NaOH(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を使用した。N-acetyl-L-cysteine-NaOH (NALC-NaOH) 法³⁾にて集菌を行い, 2%小川培地(極東製薬株式会社)に接種し, 培養開始後8週目を最終判定とした。遺伝子検査は, スプタザイム-NALC-NaOH 法処理後の検体を用いてコバス TaqMan MTB⁸⁾ およびコバス TaqMan MAI (いずれもロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)による PCR 法で実施し, 2012年7月以降の結核菌群遺伝子検査についてはスプタザイム処理後の検体を用いて PURE-LAMP-TB 法

表1 7年間に於ける抗酸菌培養数および分離菌種の推移

	培養数	培養陽性数 (陽性率)	分離菌種 (陽性率)			
			<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	その他
2009年	632	39 (6.2%)	8 (1.3%)	12 (1.9%)	13 (2.1%)	6 (0.9%)
2010年	844	58 (6.9%)	12 (1.4%)	26 (3.1%)	12 (1.4%)	8 (0.9%)
2011年	804	52 (6.5%)	9 (1.1%)	19 (2.4%)	16 (2.0%)	8 (1.0%)
2012年	1,011	74 (7.3%)	16 (1.6%)	22 (2.2%)	22 (2.2%)	14 (1.4%)
2013年	1,103	69 (6.3%)	17 (1.5%)	26 (2.4%)	17 (1.5%)	9 (0.8%)
2014年	1,434	66 (4.6%)	4 (0.3%)	31 (2.2%)	23 (1.6%)	31 (2.2%)
2015年	1,667	72 (4.3%)	5 (0.3%)	26 (1.6%)	26 (1.6%)	15 (0.9%)
計	7,495	430 (5.7%)	71 (0.9%)	162 (2.2%)	129 (1.7%)	91 (1.2%)

にて実施した。

3. 検討内容

抗酸菌検査を目的に、期間中に提出された7,539検体について抗酸菌培養数、培養陽性数、遺伝子検査依頼数の推移について調査した。また、PURE-LAMP-TB法導入以降の2012年7月から2014年5月までに塗抹検査、培養検査、遺伝子検査3法を同時実施した1,047名を対象に結核患者に対する初動感染対策に及ぼした効果を考察した。さらに新体制による遺伝子検査依頼数の変化についても推察した。

Ⅲ. 結 果

1. 抗酸菌検査の現状

2009年1月から2015年12月までの抗酸菌培養数、培養陽性数および分離菌種を表1に示した。対象とした期間中に提出された抗酸菌検査7,539件のうち培養数は7,495件であった。2009年から2011年までは632~844件で推移したが、2012年以降増加し、2015年には2011年の2倍まで増加した。培養陽性率は4.3~7.3% (平均5.7%) であった。検出された菌種の内訳は *Mycobacterium tuberculosis* が0.3~1.6% (同0.9%), *Mycobacterium avium* が1.6~3.1% (同2.2%), *Mycobacterium intracellulare* が1.4~2.2% (同1.7%), その他の非結核性抗酸菌が0.8~2.2% (同1.2%) であった。

遺伝子検査依頼数および遺伝子検査陽性率の推移を表2に示した。*Mycobacterium tuberculosis* (TB) の遺伝子検査依頼数は、2010年から2013年はほぼ横ばいであったが2014年から急激に増加し2015年には2013年の2倍以上まで増加した。*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* (MAC) の遺伝子検査依頼数は2011年以降減少したが、TBと同様に2014年から急激に増加し、2015年には2013年の3倍まで増加した。また、遺伝子検査におけるTBの陽性率は0.7~3.5% (平均1.6%), *Mycobacterium avium* が2.7~6.6% (同4.7%), *Mycobacterium intracellulare* が2.2~4.6% (同3.5%) であった。

2. PURE-LAMP-TB法導入前の抗酸菌検査体制

通常は毎日塗抹検査、培養検査を一括処理で行い、至急対応が必要な塗抹検査はその都度実施する。抗酸菌塗抹陽性と判明した場合、従来の抗酸菌検査体制では、まず塗抹陽性の結果のみを主治医へ報告する。入院患者の場合には主治医に加えて病棟師長、感染制御認定看護師 (ICN) へ抗酸菌塗抹陽性者が発生したことを報告する。この時点では結核菌群か非結核性抗酸菌群かは分からないため、引き続いて遺伝子検査依頼の有無に関わらず結核菌群のPCR法を直ちに開始するが、測定に約5時間かかるため検査終了が夜間となることが多く、結核菌群か否かの報告が翌朝となることがほとんどであった。一方、抗酸菌塗抹陰性の検体については、コスト、作業効率の面から結核菌群およびMAC-PCR法を一括して週2回測定していた。

表2 7年間における遺伝子検査依頼数の推移

	<i>M. tuberculosis</i> *		<i>M. avium</i>		<i>M. intracellulare</i>	
	依頼数	陽性数 (陽性率)	依頼数	陽性数 (陽性率)	依頼数	陽性数 (陽性率)
2009年	407	8 (2.0%)	306	17 (5.6%)	302	12 (4.0%)
2010年	573	10 (1.7%)	408	27 (6.6%)	407	9 (2.2%)
2011年	569	8 (1.4%)	413	19 (4.6%)	408	12 (2.9%)
2012年	569	20 (3.5%)	328	9 (2.7%)	324	15 (4.6%)
2013年	578	19 (3.3%)	264	13 (4.9%)	260	11 (4.2%)
2014年	1,055	7 (0.7%)	481	29 (6.0%)	478	15 (3.1%)
2015年	1,207	9 (0.7%)	780	26 (3.3%)	773	28 (3.6%)
計	5,058	81 (1.6%)	2,980	140 (4.7%)	2,952	102 (3.5%)

* : 2009年1月～2012年6月まではPCR法、それ以降はPURE-LAMP法で実施

3. PURE-LAMP-TB 法導入後の抗酸菌検査体制 (新体制)

PURE-LAMP-TB 法は DNA 抽出が約10分、増幅時間が約40分で併せて1時間足らずで結果が得られるため、PURE-LAMP-TB 法導入後は抗酸菌塗抹陽性と判明した場合、直ちにPURE-LAMP-TB 法を開始し塗抹陽性結果と併せて結核菌群か否かの報告が可能となった。また、結核を強く疑う患者の場合は塗抹検査と同時にPURE-LAMP-TB 法を開始し、更なる迅速な対応に努めている。

PURE-LAMP-TB 法は優れた迅速性に加えて操作が非常に簡便であるため、感染拡大防止の観点からも毎日の測定を行っている。その日のうちに結核菌群の遺伝子検査結果が出ることで、塗抹検査での結核菌の見落としのチェックとしても働き、スタッフの心理的負担の軽減に繋がっている。一方で結核菌群に比べて緊急性を要求されないMAC目的のPCR法は、週1回測定とし業務の軽減を図った。

4. 新体制の感染対策への影響

PURE-LAMP-TB 法が導入された2012年7月から2014年5月までに、塗抹検査、培養検査、遺伝子検査3法が同時に実施された1,047名についての結果を表3に示した。塗抹陽性63名のうち、当日の入院を含む入院患者は36名であった。そのうち、PURE-LAMP-TB 法が陽性となったのは9名であった。従来であ

れば、先に述べたように塗抹陽性が判明して直ちにPCR法を測定しても、結果報告は翌朝になることがほとんどであり、結核菌群か否かの結果が判明するまでの数時間から十数時間は、塗抹陽性入院患者36名すべてに空気感染対策を講じる必要があった。しかし、新体制により塗抹陽性結果とあわせて結核菌群か否かの報告が可能となったため、PURE-LAMP-TB 法が陰性であった27名への空気感染対策が不要となった。さらに、今回PURE-LAMP-TB 法が陽性であった結核入院患者9名のうち、3名は喀痰以外からの検出の肺外結核であり暴露の危険性は低いものであった。加えて他の3名は直ちに結核病床を持つ病院へ転院の措置がとられ、実際に当院で結核に対する空気感染対策を必要としたのは残りの3名であった。

表3 新たに構築した抗酸菌検査体制で実施された塗抹検査、TB-LAMP法および培養検査結果

		TB-LAMP法		培養検査	
		(+)	(-)	(+)	(-)
塗抹陽性者数	63				
	入院 36	9*	27	9	27
	外来 27	8	19	6	21
塗抹陰性者数	984	11	973	6	978

* : 検査材料：非開放膿 (1件)、小腸粘膜 (1件)、脊椎周囲軟部組織 (1件) および転院処置 (3件) を含む

IV. 考察

結核菌群の検出で最も迅速に結果が得られるのは塗抹検査である^{2,3)}。しかし、塗抹検査は非結核性抗酸菌群も陽性となることから、塗抹陽性のみをもって結核菌群陽性とは言えない。一般に喀痰塗抹陽性は陰性に比べ、他への感染危険性が高いことが指摘されている⁹⁾。2014年の全国統計では、喀痰塗抹陽性結核患者は人口10万人対6.0が記録されている¹⁰⁾。この数字は必ずしも多くはないが、結核の感染拡大防止の目的から、塗抹陽性検体における結核菌群の検索には、極めて緊急性が要求される。これらの諸問題を解決する検査方法として、結核菌群のDNAを直接検出できる遺伝子検査が迅速診断に利用されるに至り、数時間で報告が可能となった⁴⁾。今回開発されたPURE-LAMP-TB法は、さらにDNAの抽出や核酸増幅時間が大幅に短縮された。この方法は、簡易かつ迅速な核酸抽出キットと組み合わせて使用できるように設計され、DNA抽出から結果の報告までが1時間以内で終了する^{6,7)}。また、本法は検出および診断における感度、特異度ともに従来のPCR法と大差はなく^{11,12)}、結核菌群の検出における有用性については多くの報告がある^{13,14)}。

当院では、以前から塗抹検査が陽性となった時点で直ちにPCR法による検査を実施していた。しかし、報告は翌日になることがほとんどであり、結核病床や陰圧室を持たない当院では、結果が判明するまでの数時間から十数時間は、病棟での個室管理、簡易HEPAフィルターの設置、N95マスクの着用などを余儀なくされ、医療スタッフにとっては、業務上のみならず精神的にも大きな負担となっていた。こうした問題を解決するために、従来の検査体制を見直し、結核菌群の検出にPURE-LAMP-TB法を用いた新たな抗酸菌検査体制を構築した。これにより、結核菌群の塗抹陽性患者は当日のうちの転院が可能となった。さらに、新体制導入前は塗抹陽性患者すべてに講じていた空気感染対策が、導入後は約10分の1に減少したことで医療スタッフの負担の大幅な軽減につながった。また、PURE-LAMP-TB法を毎日実施することで、従来、週2回測定していた結核菌群およびMAC-PCR法は、MACのみの検出を目的として週1回の実施に切り替えることができたため、コストの削減や業務改善にもつながった。

通常、PURE法でのDNA抽出には喀痰の前処理が

必要なく、未処理喀痰からでも直接結核菌群の検出が可能とされている。当院では緊急を要するものについては、迅速性を優先し検体から直接PURE-LAMP-TB法を実施する場合もあるが、通常は喀痰溶解・均質化処理後の集菌検体を用いてPURE-LAMP-TB法を実施している¹⁵⁾。これは、塗抹検査が陰性、直接検体でのPURE-LAMP-TB法の結果も陰性であったにも関わらず、集菌操作後に行った再検査により陽性となった例を実際に経験したことにより構築した体制である。これにより、菌量が極めて少なく塗抹陰性と判断されるような結核患者の早期発見も期待できる。

また、新体制導入後の2012年7月からMACを目的としたPCR法の依頼数が漸減傾向を示したため、検査室の塗抹陽性に対する遺伝子検査の対応が臨床側に浸透した結果、過剰な検査に対する抑制が働いた可能性が示唆された。しかし2014年から急激に増加し、約3倍の依頼数となった。以前から、遺伝子検査への過信からか、抗酸菌検査を依頼する際に、遺伝子検査のみを選択されるケースも少なからず見受けられた。日本結核病学会は、結核診断における遺伝子検査の利用における注意点をいくつか挙げている。さらに抗酸菌検査における核酸増幅検査の特異度は90%以上と良好であるものの、感度は塗抹陽性検体ではほぼ100%、塗抹陰性検体では培養検査と感度が同等かやや劣るとされ、結核の可能性が低い検体にむやみに遺伝子検査を実施することは慎むべきであるとしている²⁾。また、診療報酬において核酸増幅法検査は診断時に1回のみ算定が可能であること、MAC-PCR法は結核の遺伝子検査との同時依頼では算定されず審査ではじかれる可能性もあることを念頭に置かなければならない。検査法のそれぞれの特徴を理解し、結核診断における正しい利用法と結果の解釈などの情報を的確に臨床側へ伝えることも感染症診断や感染対策の質の向上に重要であると考えられる。

V. 結 語

PURE-LAMP-TB法を導入した抗酸菌迅速検査体制は、結核菌群の即日報告が可能となったことで、結核感染患者の増加防止に加え結核疑いの状態で入院する患者の減少につながり、結核感染対策における医療スタッフや患者の負担が軽減された。今後は、検査精度の向上はもちろん、臨床側にも抗酸菌検査に対する認識の向上を図り、適切な検査項目の選択を推進していく。

文 献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：抗酸菌検査ガイド2016. 17-4 南江堂. 2016.
- 2) 日本結核病学会教育委員会：結核症の基礎知識（改訂第4版）. kekkaku 89（4）：521～545. 2014.
- 3) 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.
- 4) 大楠清文, 江崎孝行：遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応. 日化療会誌 59（5）, 441～453. 2011
- 5) 御手洗聡：医学検査の歩み -21 結核菌群遺伝子の臨諸検査の進歩. モダンメディア 59（7）：194～199. 2013.
- 6) 高野 弘：「新しい検査法」新規に保険収載された検査法—TB-LAMP 法による結核菌群核酸検出検査, マイコプラズマ核酸検査, レジオネラ核酸検査について. モダンメディア 58（8）：246～251. 2012.
- 7) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. : Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28（12）：E63. 2000
- 8) 赤松紀彦, 柳原克紀, 松田淳一ほか：結核菌群遺伝子増幅検査におけるコバス TaqMan MTB の有用性. 日臨微誌 19（2）：84～89. 2009.
- 9) 厚生労働省：感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引き（改訂第5版）. 2014.
- 10) 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター：結核統計. 2014. (<http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/toukei>)
- 11) 小林昌弘, 青木貞男, 小池勝人ほか：Loopamp PURE DNA 抽出キットを用いた Loopamp 結核菌群検出試薬キットの有用性の検討. 日臨微誌 25（2）：106～110. 2015
- 12) 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 15（9）：1211～1217. 2011.
- 13) 百田隆祥：TB-LAMP 法を用いた微生物検査の臨床応用. 臨床検査 57（4）：371～378. 2013.
- 14) 大栗田香織, 藤木 誠, 諏訪 浩：結核菌群検出における LAMP 法の日常検査への導入と有用性の評価. 岐阜県臨床検査技師会誌 43（2）：17～19. 2014.
- 15) 栄研化学株式会社：マイコバクテリウム核酸キット Loopamp® 結核菌群検出試薬キット 検体種別 処理方法マニュアル, Rev1.0.

Efficacy of the PURE-LAMP method for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex on infection control

Yumi Ogawa, Satomi Shimizu, Syun Kakiya, Naofumi Awamura,
Kumi Hayashi, Yaeko Watanabe, Takae Takano, Takashi Nishisaka

Department of Clinical and Pathological Laboratory,
Hiroshima Prefectural Hospital

Summary

We established a rapid acidophilic bacteria inspection system (new system) using the Loopamp Tuberculosis Complex Detection Reagent kit (PURE-LAMP-TB method) which combines the Procedure for Ultra Rapid Extraction kit to extract DNA (PURE method) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP method). We targeted 7,539 specimens for which an acidophilic bacteria inspection was requested from 2009 to 2015 and examined them including the effect of the new system on infection control. As a result, following the introduction of the PURE-LAMP-TB method, airborne infection control, which was applied to all smear-positive patients in advance, was decreased to approximately one-tenth. The reason for this was that quickly reporting the tuberculosis-positive test results allowed us to quickly move on to the initial action response for the patients. This led to a reduction in the burden placed on medical staff and patients when undergoing airborne infection control due to the introduction of the new system. Moreover, although the number of requests for the *Mycobacterium avium* complex-polymerase chain reaction (MAC-PCR method) was on a downward trend, a sudden increase was observed after 2014. In order to improve the quality of infection diagnoses and infection control, it is also important to accurately provide information such as the correct usage and interpret the results of diagnosis to the clinical side.