

令和3年度結核研修会 2022年2月26日
南京都病院大会議室

結核菌の検査

南京都病院 臨床検査科

五十嵐 なつみ



結核診断に関する検査

- 血液検査(免疫学的検査)
 - インターフェロン γ 遊離試験(IGRA)
 - QFT
 - T-SPOT
- 病理検査
- 細菌検査

本日の内容

1. 検体の採取と保存
2. 塗抹検査
3. 遺伝子増幅検査
4. 培養検査
5. 薬剤感受性検査
6. 検査結果の解釈

検体の採取と保存

検体の種類

・肺結核

喀痰

→ 喀痰で検出できない時は

胃液

気管支洗浄液や気管支擦過物

・肺外結核

骨髓液

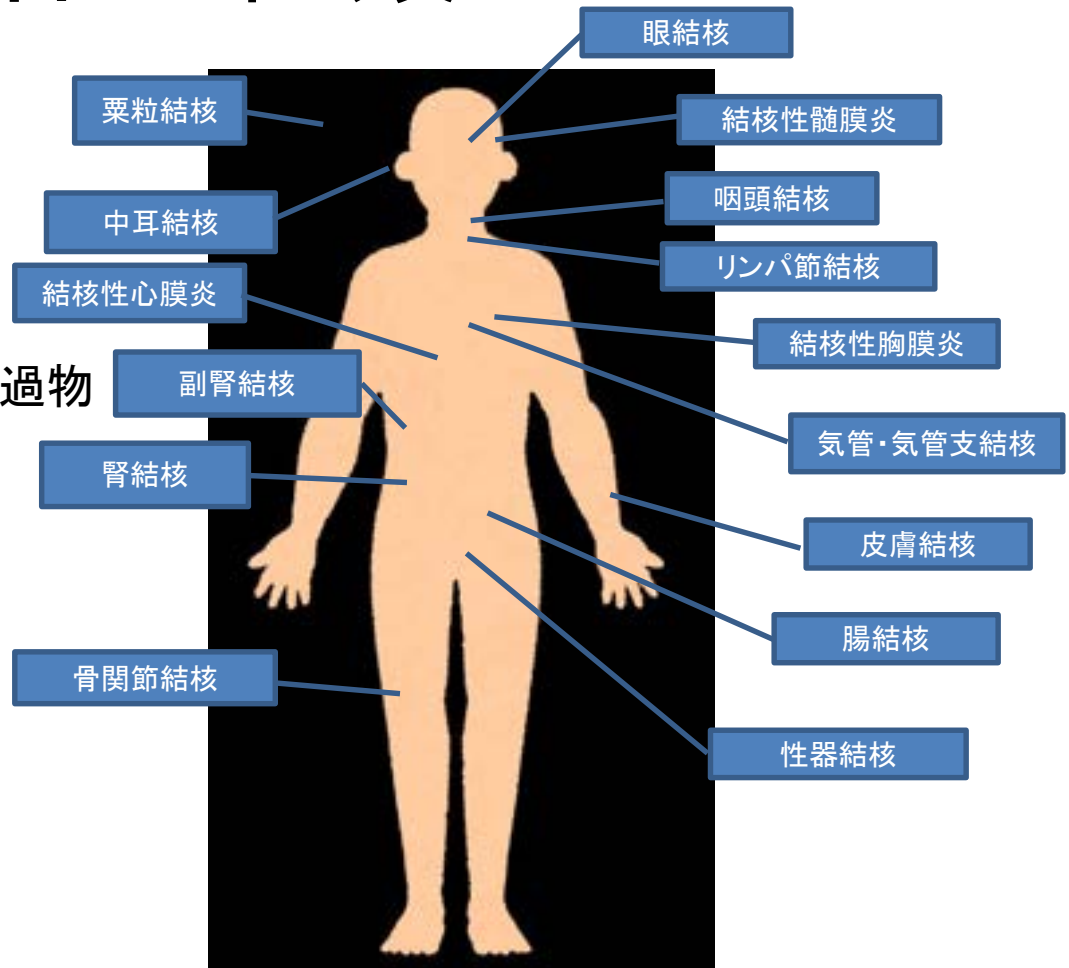
血液

胸水・腹水

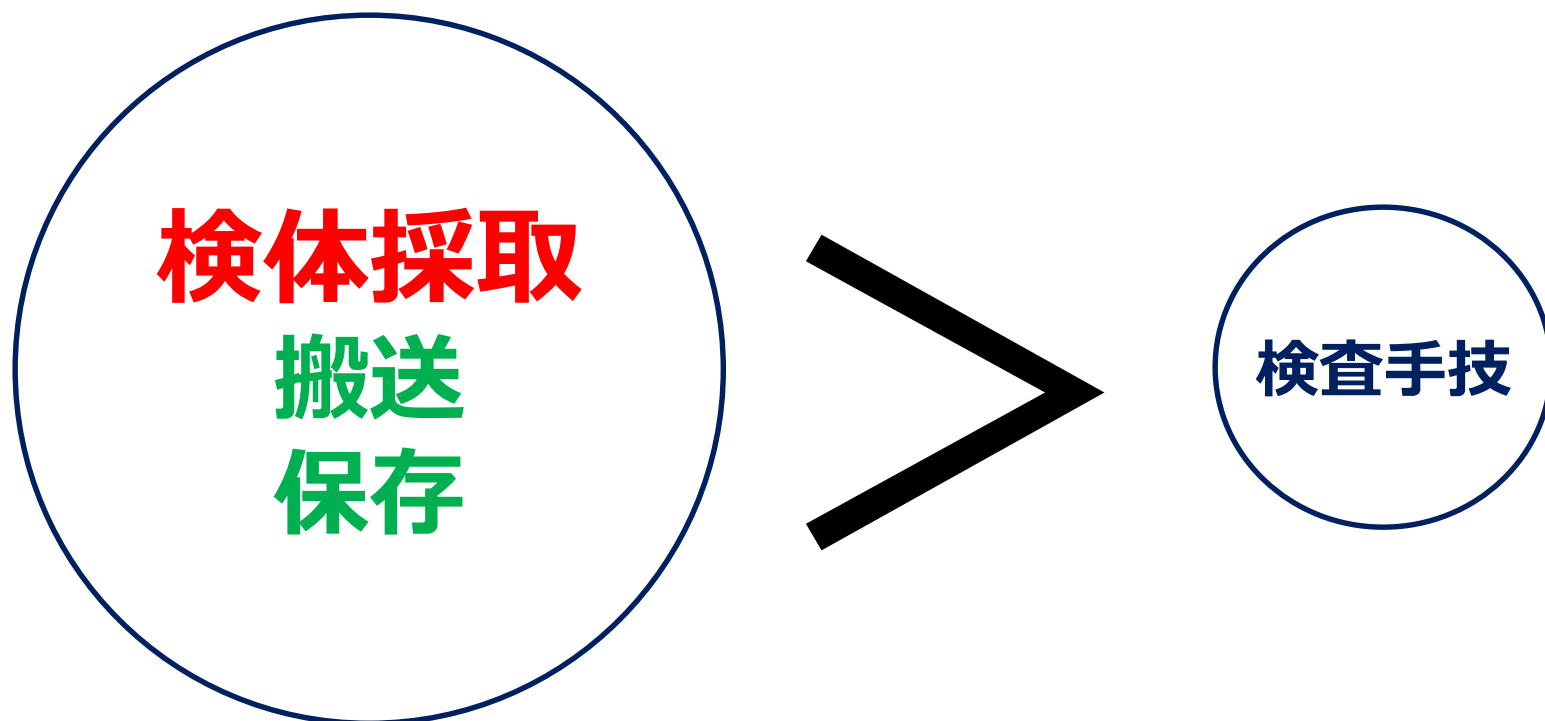
尿

糞便

・臓器や組織の生検材料



適切な検体採取・搬送・保存の重要性



微生物検査に提出される検査材料が、**適切に採取・搬送・保存**されたかによって、微生物検査の結果が左右される！

結核菌検査に適した採痰法

- ① 起床時に採痰*1)。
- ② 滅菌容器に3mL以上痰を取る。
- ③ 膿性部分がある「良質の痰」が採れたか確認する。
- ④ 容器の蓋をしっかりと閉め、できるだけ速やかに提出する。

*1) 採取するタイミングは、「良質の痰」が採れるならいつでもよい。

<注1>感染の危険性（空気感染） ⇒ 人がいない部屋で窓を開けて採痰
（採痰ブースがよい）

<注2>雑菌汚染 ⇒ 食後などに採痰する場合は、「うがい」などで食物残渣を除く

喀痰の肉眼的品質評価

Miller & Johnsの分類

良い痰

※膿性部分がある、新鮮であることが、良い痰の条件です。



P1

膿性痰で
膿性部分が1/3以下*¹



P2

膿性痰で
膿性部分が1/3~2/3*¹

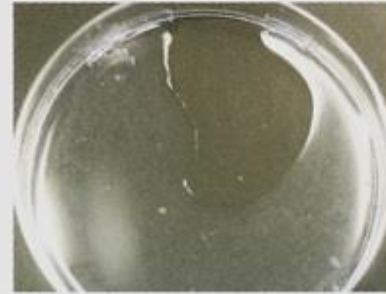


P3

膿性痰で
膿性部分が2/3以上*¹

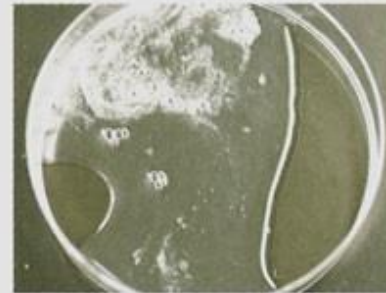
良くない痰

※このような痰では、正しい結果が得られない可能性があります。



M1

唾液、
完全な粘液痰*¹



M2

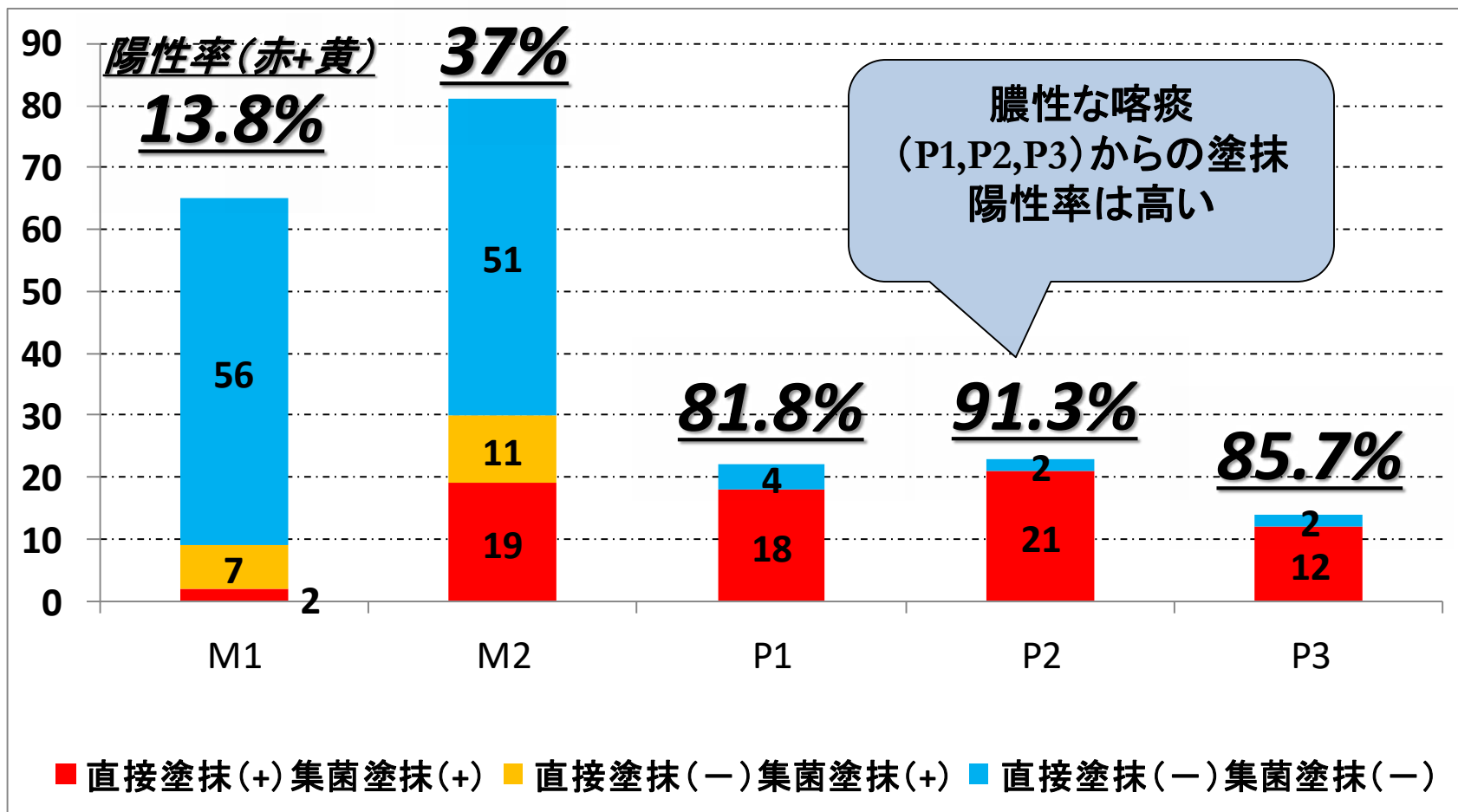
粘液痰の中に
膿性痰が少量含まれる*¹



血痰

肉眼的品質分類による 抗酸菌塗抹検査の成績 (n=205)

(n)



結核菌検査に適した痰の保存法

- ① 冷蔵保存（*ただし3日以内）。
- ② 乾燥させない。

* **室温（暖かいところ）に長時間放置** ⇒ 結核菌以外の細菌が繁殖し、結核菌の培養が困難になる。

* **冷凍保存** ⇒ 結核菌が死滅し、培養できなくなる可能性がある。
⇒ 遺伝子増幅検査のみを行うなら可能。

採痰間隔

診断目的

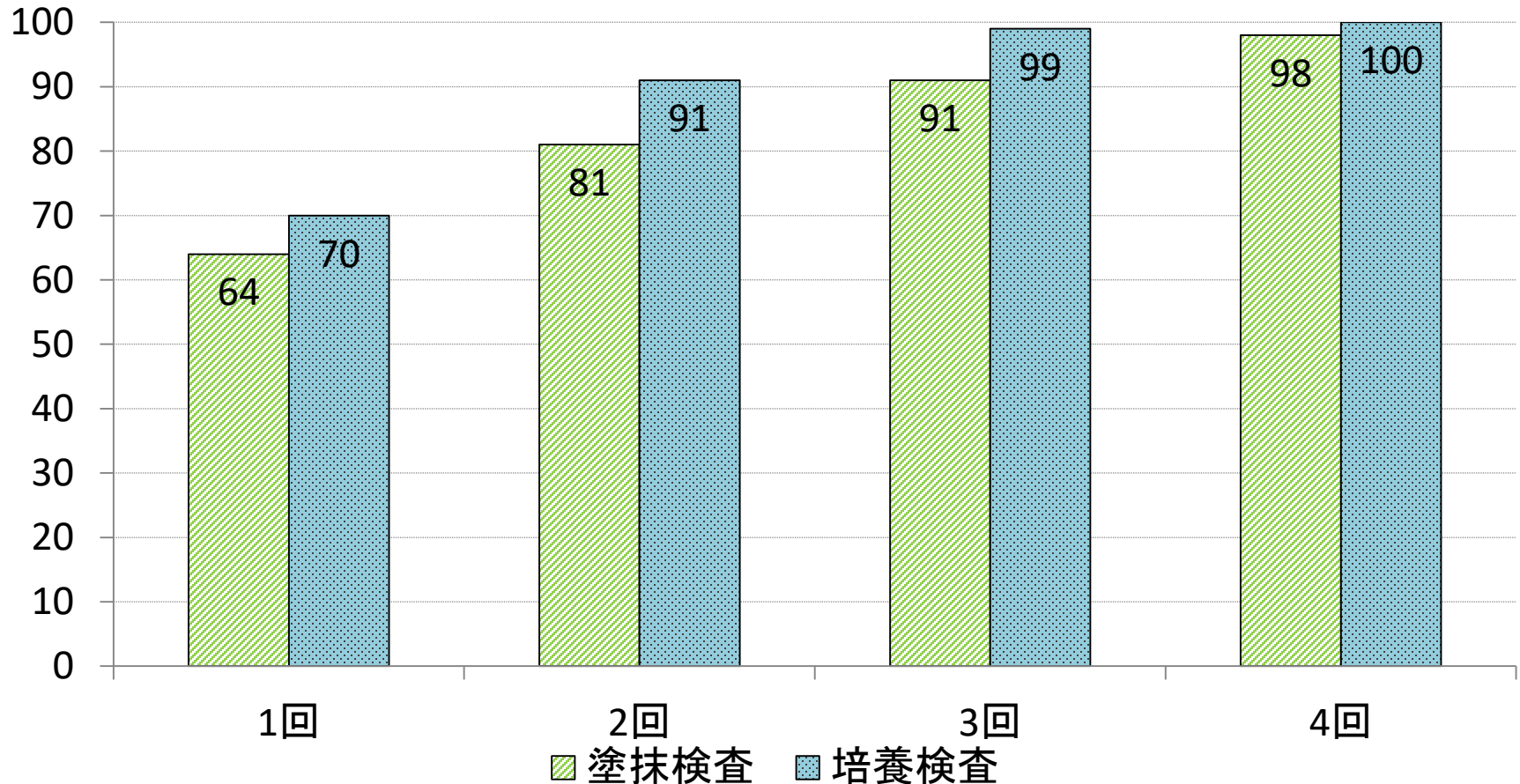
- **3連痰**（1日1回/3日間）
培養⇒**液体培養**
- ★良質な採痰が困難な場合
- **誘発喀痰** 超音波ネブライザー
（3～5%高張食塩液）
- **胃液**採取（早朝空腹時に採取）

化学療法開始後

- 最初の4週間⇒1回/2週間
 - それ以降⇒1回/月
- 培養⇒**小川培養**

3連痰は必要？

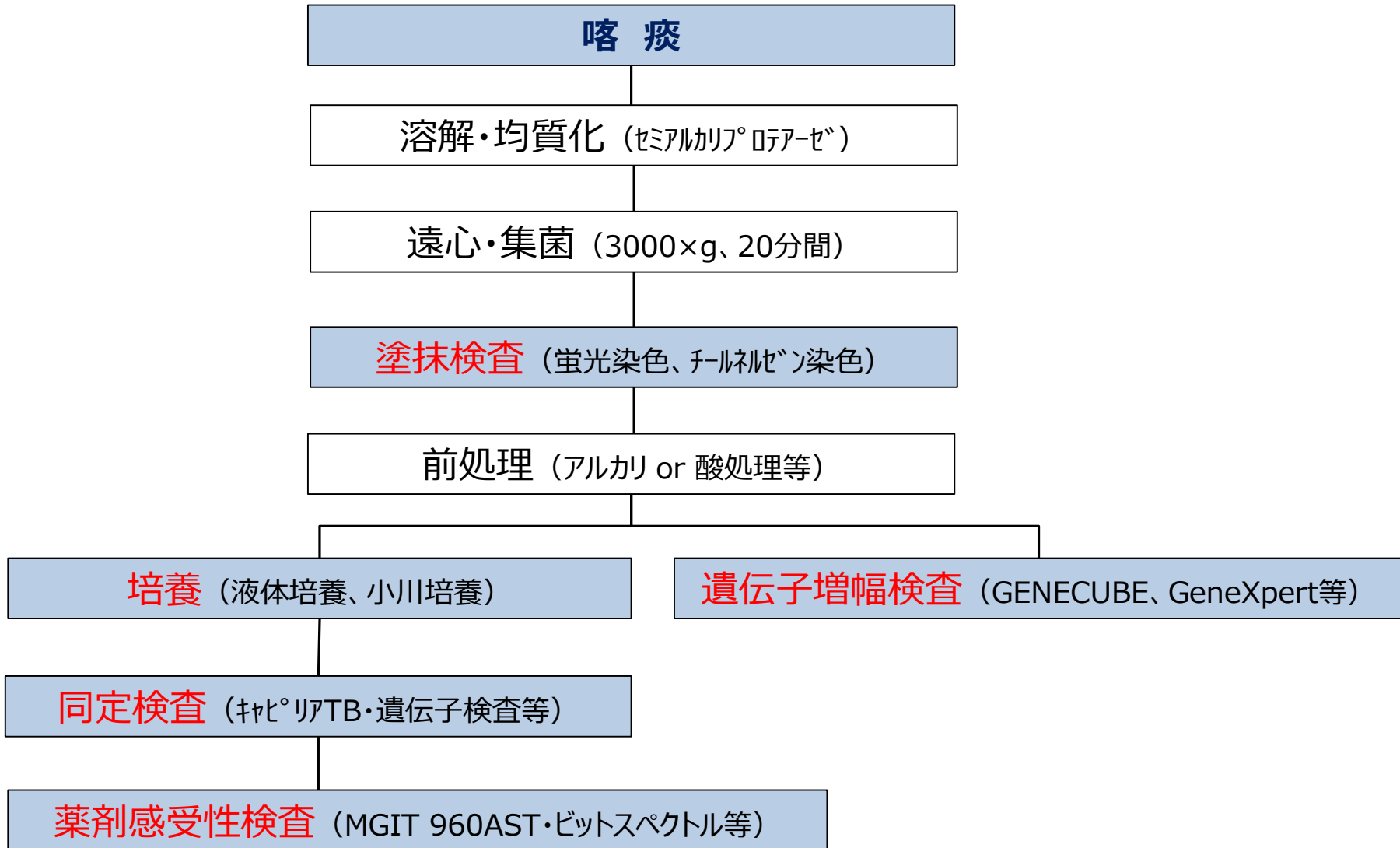
(%) 喀痰の採取回数と抗酸菌塗抹および培養累積陽性率 *1)



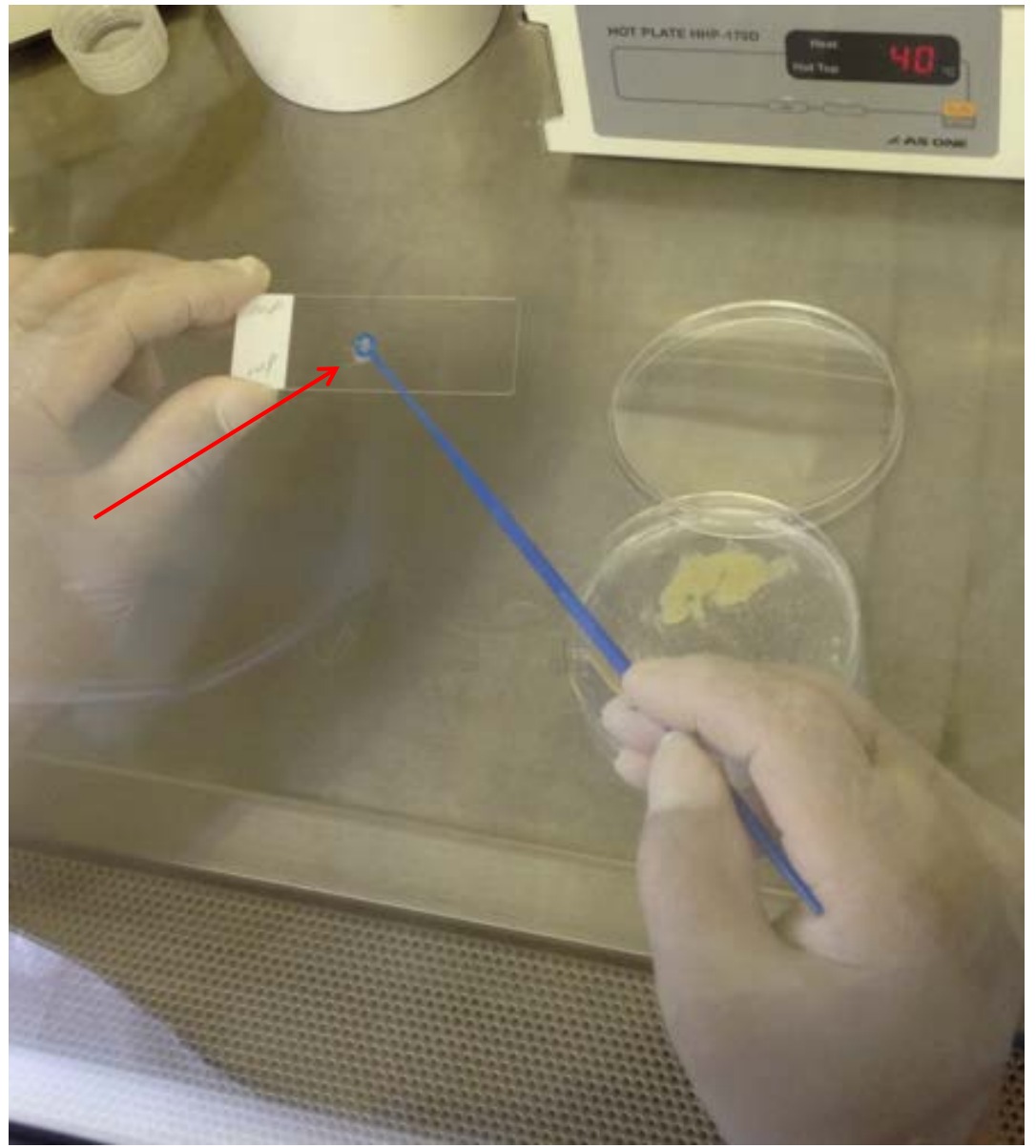
*1) 塗抹検査: 蛍光法、培養検査: BACTEC 460とL-J卵培地

塗 抹 検 査

結核菌検査のフローチャート(喀痰)



直接塗抹



喀痰融解剤

喀痰溶解酵素 250mL
スプタザイム
溶解液
Lot. No. ECBH7101
有効期限 17.5.28
貯法: 2~8℃

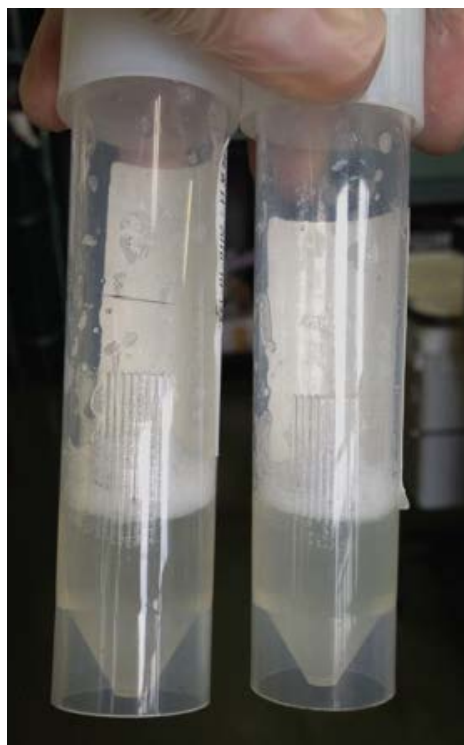
集菌塗抹

① 喀痰を融解

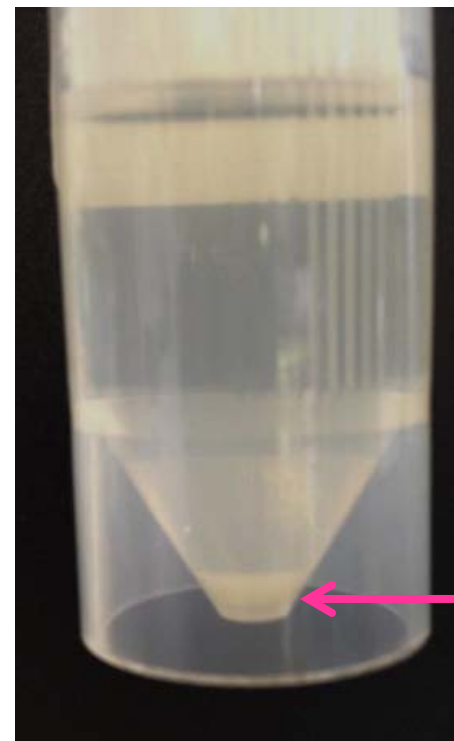
② 遠心・集菌



ミキサー (10分間ぐらい)



溶解した喀痰



濃縮した喀痰

直接塗抹 vs 集菌塗抹

直接塗抹

- **検査時間が短い（約15分）**
- 膿性な部分を塗抹するため技師の熟練が必要。
- 微量排菌者を見逃す。

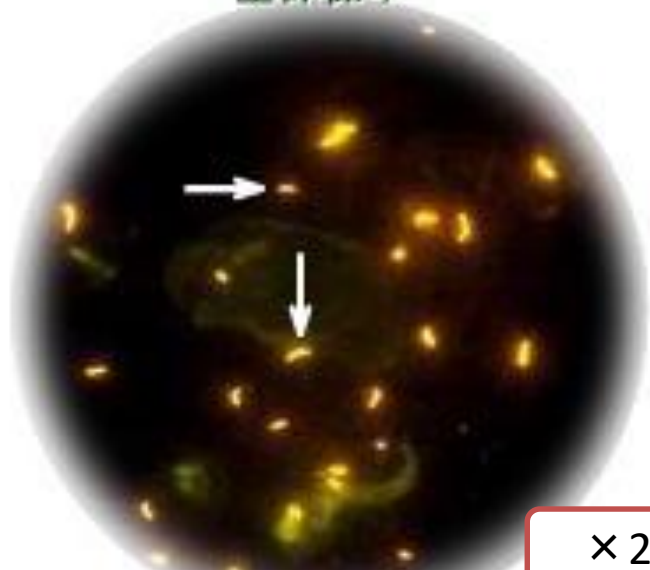
集菌塗抹

- 検査時間がかかる（約60分）
- 喀痰を溶かして均質化後、遠心して菌を集菌（濃縮）するため、技師間差がない。
- **微量排菌者を検出できる。**

蛍光染色 vs チールネルゼン染色

蛍光染色

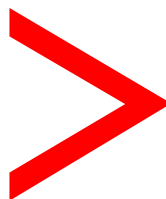
塗抹標本



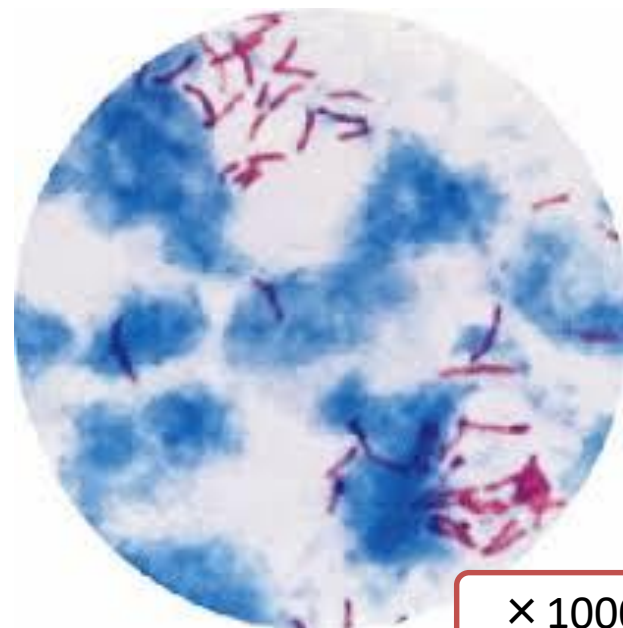
蛍光染色を施し、
蛍光顕微鏡で観察します

感度

(見つけやすさ)



チールネルゼン染色



* 抗酸菌以外でも蛍光染色陽性となることがある！ ⇒ チールネルゼン染色で確認が必要

塗抹結果の報告

鏡検における検出菌数記載法 (結核菌検査指針2007より)

| 記載法 | 蛍光染色 (200倍) | チールネルゼン染色 (1000倍) | ガフキー号数 |
|-----|----------------|----------------------|--------|
| — | 0/30視野 | 0/300視野 | G0 |
| ± | 1~2/30視野 | 1~2/300視野 | G1 |
| 1+ | 1~19/10視野 | 1~9/100視野 | G2 |
| 2+ | ≥20/10視野 | ≥10/100視野 | G5 |
| 3+ | ≥100/1視野 | ≥10/1視野 | G9 |

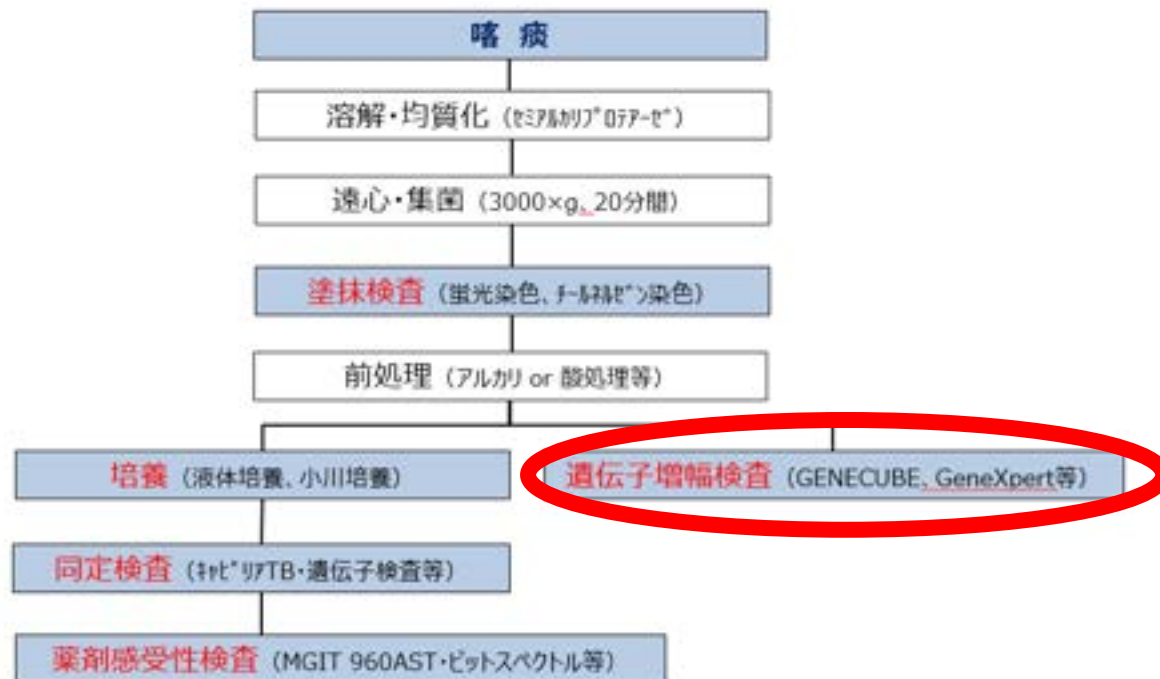
★ 塗抹検査の感度 (検出限界)

喀痰1mL当たり 5,000~10,000個

塗抹検査 まとめ

- 塗抹検査で最も感度が高い方法は
集菌塗抹 + 蛍光染色
ただしチールネルゼン染色で抗酸性の確認が必要
- 塗抹検査での結核菌とNTMの区別は困難

遺伝子増幅検査



特 徴

- ◆短時間で報告可能(数～5時間)
- ◆死菌と生菌の区別はできない
- ◆手技がやや煩雑
- ◆増幅阻害あり
- ◆コンタミネーションに注意

TOYOBO

TOYOBO
GENECUBE
400-800-0000
www.toyobo.com

遺伝子増幅装置の取扱説明書

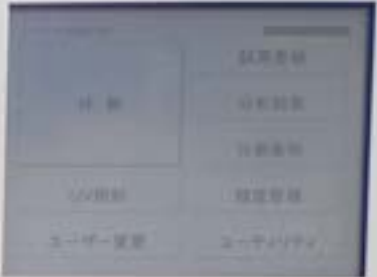
- ① 遺伝子増幅装置の取扱説明書、および付属品を必ずよく読んでください。
- ② 遺伝子増幅装置の取扱説明書、および付属品をよく読んでください。
- ③ 遺伝子増幅装置の取扱説明書、および付属品をよく読んでください。
- ④ 遺伝子増幅装置の取扱説明書、および付属品をよく読んでください。
- ⑤ 遺伝子増幅装置の取扱説明書、および付属品をよく読んでください。



注意
この装置は、遺伝子増幅装置として使用することを目的として設計されています。他の用途での使用は、保証の対象外です。



注意
この装置は、遺伝子増幅装置として使用することを目的として設計されています。他の用途での使用は、保証の対象外です。



GENECUBE

TOYOBO
GENECUBE
400-800-0000
www.toyobo.com

TOYOBO
GENECUBE
400-800-0000
www.toyobo.com







培養検査

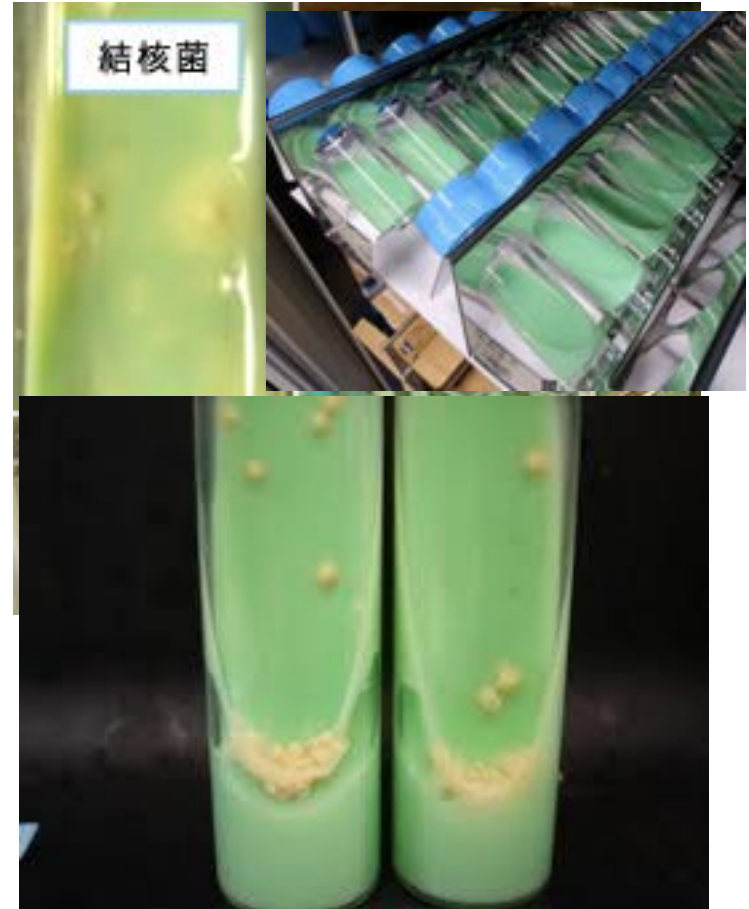


液体培養 vs 小川培養

液体培養 (MGIT960)



小川培養 (2%小川培地)



小川培養と液体培養の比較

集計期間 2015年4月1日～2016年3月31日

集計対象 小川培養と液体培養ともに依頼があった検体 (N=278)

| | | 小川培養 | | 計 |
|------|-----|---------------|----------------|-----------------|
| | | (+) | (-) | |
| 液体培養 | (+) | 49 (17.6%) | 22 (7.9%) | 71 (25.5%) |
| | (-) | 1 (0.4%) | 206 (74.1%) | 207 (74.5%) |
| 計 | | 50 (18.0%) | 228 (82.0%) | 278 (100.0%) |

液体培養 vs 小川培養

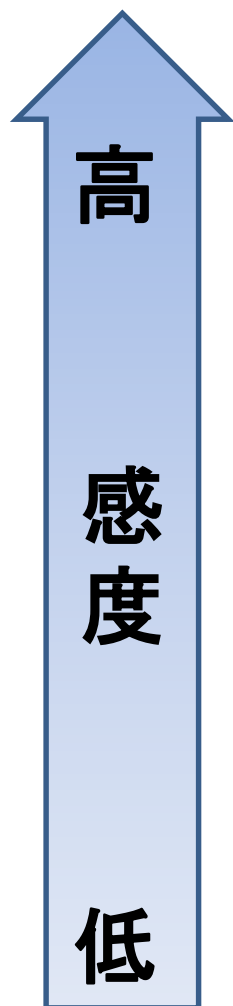
| 液体培養 | VS | 小川培養 |
|----------|---------------|----------|
| 高い | 培養陽性率 | 低い |
| 早い | 発育速度 | 遅い |
| 結核菌の検出困難 | NTMとの混在(一次培養) | 結核菌の検出可能 |
| 初期診断 | 用途 | 治療観察 |
| 280点 | 保健診療点数 *1) | 204点 |



* 1) 液体培養と小川培養を同時に実施しても液体培養分しか申請できない

感度（結核菌の見つけやすさ）

イメージ図



培養検査
(液体培養)

培養検査
(小川培養)

遺伝子増幅
検査
(PCR法)

蛍光染色
(集菌法)

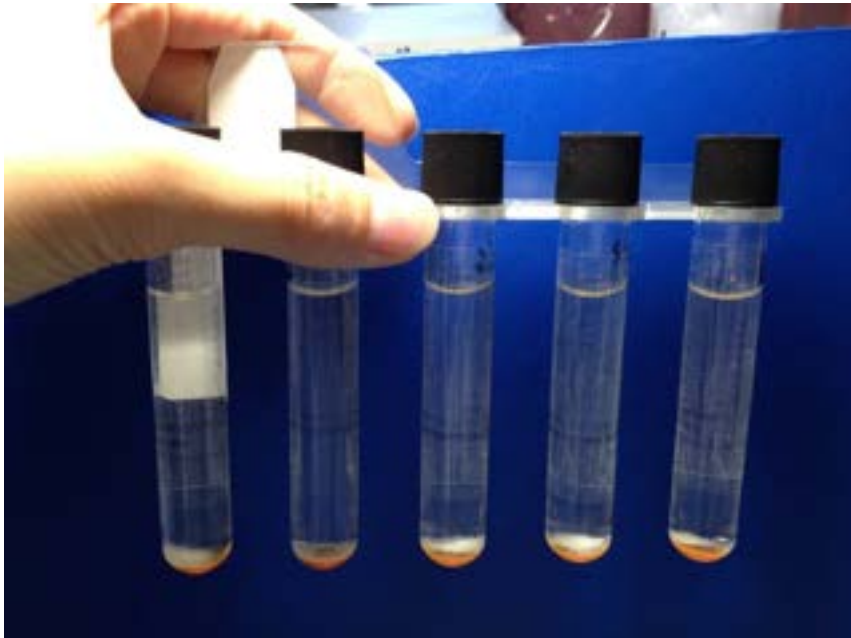
チールネルゼン染色
(直接法)

薬剂感受性検査



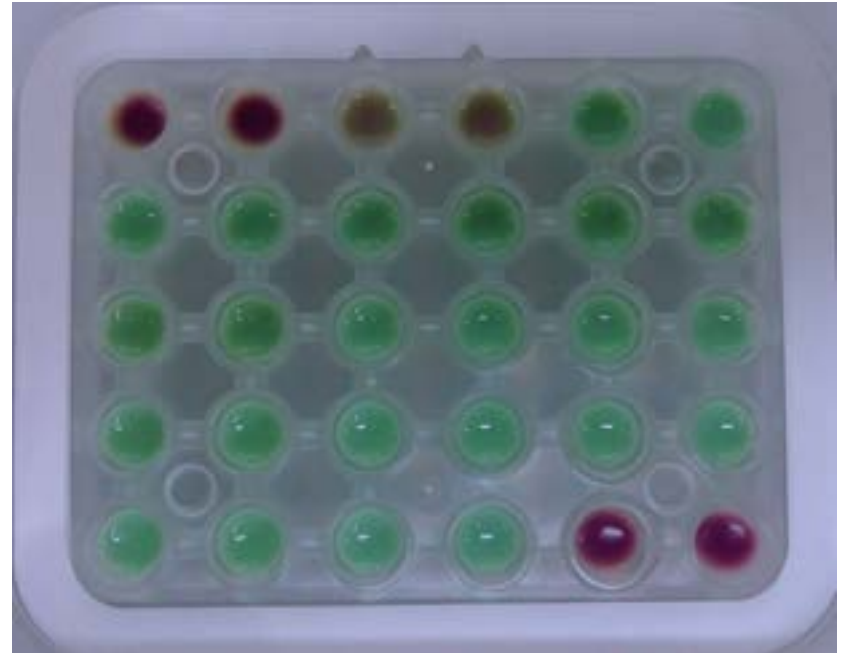
薬剤感受性検査

MGIT-AST(液体培地)



- ・測定薬剤5剤(INH,RFP,SM,EB,PZA)
- ・結果報告が速い(10日から14日)
- ・**NTM(結核菌以外の抗酸菌)の混入が判定できない⇒耐性菌と報告される**

ビットスペクトル(小川培地)



- ・測定薬剤10剤
(INH,RFP,SM,EB,KM,TH,EVM,PAS,CS,
LVFX)
- ・結果報告に日数がかかる(30日ぐらい)

主要4薬剤の耐性率*1)

| 薬剤名 | 初回治療 | 既治療 |
|-----------------------|------|-------|
| INH | 2.8% | 18.9% |
| RFP | 1.0% | 11.0% |
| SM | 7.0% | 14.4% |
| EB | 0.9% | 8.4% |
| INH,RFP,SM,EBいずれか耐性 | 8.2% | 22.8% |
| 多剤耐性(INH,RFPともに耐性)*2) | 0.7% | 9.8% |

結核の適切な治療には薬剤感受性検査が不可欠
特に既治療例では、正確かつ迅速な結果報告が必要

*1) 結核療法研究協議会2004年調査報告書

*2) 基準値変更(平成27年5月21日施行) INH,RFPが耐性、且つフルオキノロン系薬剤が1剤以上耐性
且つカマイシン(KM)、アミカシン(AMK)、カ°レマイシン(CPM)の3剤中1剤以上耐性

検査結果の解釈

1. 塗抹（集菌蛍光法）
2. 遺伝子増幅検査（結核菌）
3. 液体培養
4. 培養菌同定（遺伝子増幅検査：結核菌）

1～4の結果の
組み合わせについて
説明できますか？



塗抹検査

一番早く結果が出る
感度は良くない
結核菌とNTMの区別は困難

遺伝子増幅検査

数時間程度で結果が出る
感度は良い
死菌と生菌の区別はつかない
菌種の同定ができる

培養検査

時間がかかる
感度は良い
生菌のみ検出

検査結果の解釈

| 塗抹検査 集菌 蛍光法 | 遺伝子増幅検査 結核菌 | 培養検査 液体培養 | 液体培養菌 同定 遺伝子増幅検査：結核菌 | 解釈 |
|-------------------|----------------|--------------|----------------------------|---------------------------|
| (-) | (-) | (-) | | 結核菌 (-) |
| (-) | (-) | (+) | (-) | 結核菌以外の抗酸菌（非結核性抗酸菌：NTM） |
| (+) | (-) | (+) | (-) | |
| (-) | (-) | (+) | (+) | 結核菌 (+) : 菌量少量 |
| (-) | (+) | (+) | (+) | |
| (+) | (+) | (+) | (+) | 結核菌 (+) |
| (+) | (+) | (+) | (-) | 結核菌 (+;菌量少量) + NTMの混在 |
| (+) | (+) | (-) | | 死菌 or 不適切な培養 or コンタミネーション |
| (-) | (+) | (-) | | |

まとめ

- i. 採取された喀痰の質、保存方法によって検査結果が左右される。
- ii. 自施設（外注先）の塗抹検査法と培養検査法の感度、特異度を把握しておく。
- iii. 結果の解釈（塗抹、遺伝子増幅検査、培養、培養同定）ができることが必要。