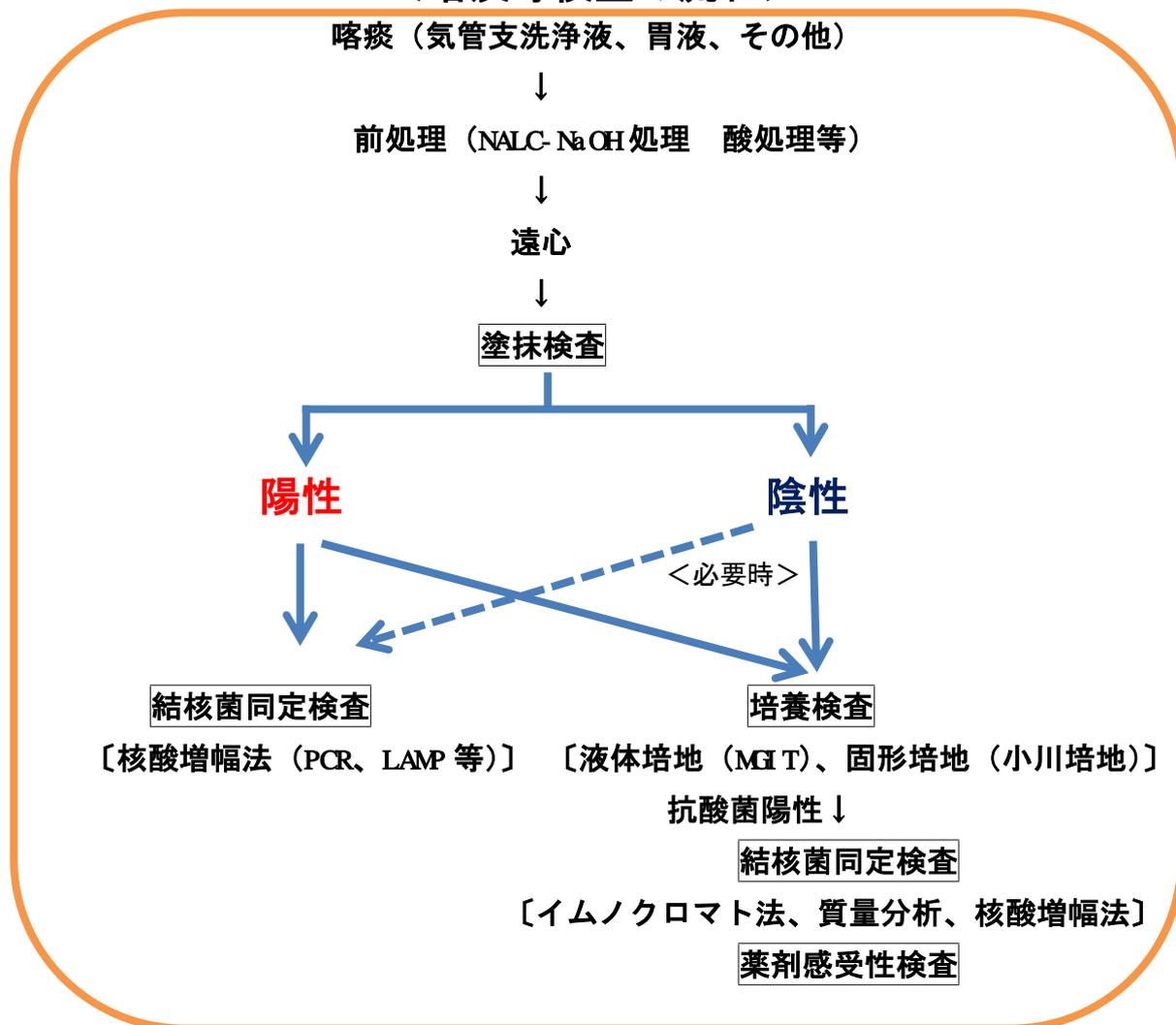


喀痰検査

患者の喀痰中に結核菌がいるかどうかを調べる検査です。喀痰の排出が困難な患者の場合は、気管支洗浄液や胃液を用います。検査を確実にを行うため 3日連続で喀痰を採取するのが望ましいです。

< 喀痰等検査の流れ >



< 検出感度 >

培養検査 (液体>固形) ≒ 核酸増幅検査 > 塗抹検査

第4章 結核の検査

塗抹検査が陽性でも結核菌以外の抗酸菌等の場合もあるので塗抹陽性になった検体は核酸増幅法による同定を実施する必要があります。核酸増幅法で結核菌陽性となっても死菌である場合があります。

塗抹検査で陽性となる検体では、ほぼ100%核酸増幅法でも陽性になりますが、塗抹陰性の検体の場合は、液体培養検査で陽性になる検体でも50~70%程度しか核酸増幅法陽性になりません。ですので、塗抹検査陰性、喀痰の核酸増幅法陰性になった場合でも培養検査で陰性にならないければ「結核菌陰性」とはいえません。

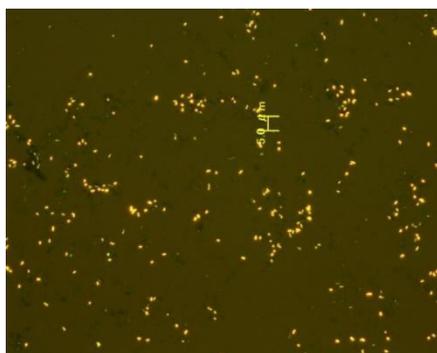
○喀痰採取の注意点

1. 雑菌混入をさけるため、必ず専用の滅菌容器を使用する。
 - * 結核の疑いが強い場合、他人への2次感染を防ぐためにできるだけ専用の採痰ブース（陰圧室）を利用する。
2. 培養に適した喀痰か肉眼的外観を観察し、唾液様の痰は検査に不適切であることを説明し、再提出を促す。
3. 1日1回、連続して3日間塗抹・培養検査を行うことが望ましい。

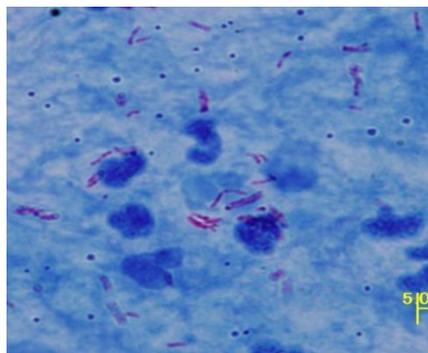
《塗抹検査》

○喀痰検査の方法

1. 喀痰全処理：喀痰の膿性部分に、結核菌が均一に分布しているわけはでないので、均等化集菌材料を作成して結核菌検査を行います。
2. 顕微鏡検査：均等化集菌処理した検体をスライドグラスに薄く広げ塗抹標本を作製し、蛍光顕微鏡や光学顕微鏡で検鏡します。



蛍光染色 200 倍鏡検



チールネルゼン染色 1000 倍鏡検

蛍光染色標本を 200 倍拡大で 30 視野、チールネルゼン染色法は 1000 倍拡大で 300 視野を観察し明確な蛍光を発する桿菌または赤色桿菌のみを陽性とします。

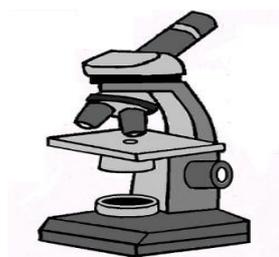
鏡検における検出菌数記載法

| 記載法 | 蛍光法 (200 倍) | チールネルゼン法 (1000 倍) | 備考 (相当するガフキー号数) * |
|-----|----------------|----------------------|----------------------|
| — | 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 |

*ガフキー号数は現在では使用しない

(抗酸菌検査ガイド 2020 より引用)

陽性度±で検体 1mL あたり抗酸菌
5,000~10,000 個と推測されます。



(注意)

感染防止策上、塗抹標本の作成は原則安全キャビネット
(規格：クラスⅡ以上) 内で行ってください。

《培養検査》

培養検査は塗抹検査よりも抗酸菌の検出感度が高いので抗酸菌検査では必須の検査です。また分離菌を用いて、菌種の鑑別・同定や薬剤感受性検査などを行います。

喀痰の均等化集菌材料を酸やアルカリで処理し抗酸菌以外の細菌を殺して、抗酸菌のみを選択的に培養し、37°Cに保って3~8週間観察します。抗酸菌の発育があれば培養陽性とし、発育してきた菌が結核菌か非結核性抗酸菌かは同定検査で判断します。

液体培地 (MGIT) での発育



陰性

陽性

固形培地 (小川培地) での発育



M tuberculosis

M kansasii

M gordonae

結核菌

非結核性抗酸菌

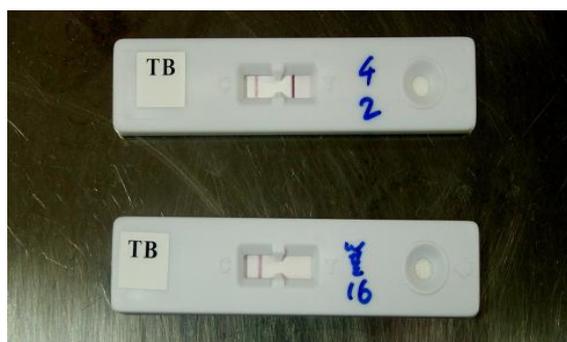
《同定検査》

結核菌群のうち主要なものは *M tuberculosis* (結核菌) で、ヒトからヒトへの強い感染性があります。これに対して、非結核性抗酸菌の主要なものは *M avium*、*M intracellulare*、*M kansasii*、および *M abscessus* で、ヒトからヒトへの感染性はないとされています。

○主な同定検査法

培養検査において、発育してきた抗酸菌の同定方法には以下のものがあります。

- ・ DNA プローブ (アキュプローブ) テスト
- ・ MALDI-TOF MS
- ・ 各種遺伝子検査製品 (コバス TaqMan, TRC, Xpert MTB/RIF 「セフィエド」、ジーンキープ等)
- ・ キャピリア TB 試験 (下写真)



→ 陽性 結核菌群

→ 陰性 非結核菌性抗酸菌

《薬剤感受性検査》

薬剤感受性検査は結核菌を対象とし、結果は治療薬選択の根拠となります。患者死亡のケースでも潜在性結核感染症や続発患者の治療のため、薬剤感受性検査は必要となります。

薬剤感受性検査法は、1%小川培地での比率法、小川培地を用いた簡便法であるビットスペクトルSR法、液体培地を用いたMGIT法、ブロスミックMTB-1などがあります。それぞれ判定までの時間や薬剤の種類に違いがあります。薬剤耐性の基準はINH以外の薬剤は1濃度ですが、INHでは2濃度が採用されています。INHの耐性判定には通常は0.2 μg/mLの成績を用いますが、多剤耐性株で使用可能な薬剤が少ない場合に限り1.0 μg/mLの成績を参考にします。

薬剤感受性検査用培地と薬剤濃度（例）

単位 μg/mL

| 薬剤 | 1%小川培地 | ビットスペクトルSR | BACTEC MGIT | ブロスミックMTB-1 |
|-------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| 耐性の判定 | 下記の濃度での発育で判定 | 下記の濃度での発育で判定 | 下記の濃度での発育で判定 | MCが下記の濃度以上 |
| INH | 0.2, 1.0 | 0.2, 1.0 | 0.1 | 2 |
| REP | 40 | 40 | 1 | 4 |
| PZA | — | — | 100 | — |
| SM | 10 | 10 | 1 | 32 |
| EB | 2.5 | 2.5 | 5 | 8 |
| LVFX | 1 | 1 | — | 2 |

＜検査用培地について＞

- ・試験管での結核薬剤感受性試験用1%小川培地
結核菌検査指針での標準法ですが、現在市販されていません。
- ・ビットスペクトルSR
小さなプレートに薬剤含有1%小川培地を入れた1濃度比率法です。EM、SMに対して、感受性（S）があるのに耐性（R）と出てしまう場合があります。
- ・BACTEC-MGIT
1濃度判定の液体培地です。INH、SMに対して感受性（S）があるのに耐性（R）と出てしまう場合があります。
- ・ブロスミックMTB-1
微量液体希釈法による薬剤感受性試験です。標準法によく一致した結果が出ますが、MCによる判定ですので、感受性（S）とも耐性（R）の中間値である判定保留（I）が発生することがあります。
- ・遺伝子による薬剤感受性試験
薬剤の耐性に関与する遺伝子の変異を検出する方法。いくつかのキットがあり、ジェノスカラーではREF、INH、PZA、cobas® MTB-RIF/INHではRFPとINH、Xpert MTBではRFPに対する耐性変異検出が可能です。

IGRA 検査 (クオンティフェロン[®]TBゴールド プラス) T-スポット[®].TB

「IGRA」とは、インターフェロン γ 遊離試験 (IGRA: Interferon-gamm Release Assays) の略称です。結核菌に特異的な抗原により全血あるいは精製リンパ球を刺激後、産生されるインターフェロン γ (以下「IFN- γ 」) を測定し、結核感染を診断する方法です。

現在 IGRA には 2 種類あり、一つはクオンティフェロン TB ゴールドプラス (QFT-4G) であり、これは全血を検体とし産生 IFN- γ の測定には ELISA を使用します。もう一つは、精製リンパ球を検体として用いる T-スポット. TB であり、産生 IFN- γ の測定法は ELISPOT 法です。使用する刺激抗原は結核菌群に特異的であるため、従来の感染診断法であるツベルクリン検査と比較し、特異度は格段に高くなっています。さらに、IGRA はツベルクリン検査と異なり、医療機関への再診が不要であり、またブースター効果も無いという利点を持ちます。一方、IGRA は活動性結核と潜在性結核感染の区別はできず、また感染時期の特定も困難であるという制限を持ちます。

QFT Gold Plus



T-SPOT



第4章 結核の検査

特異的抗原は、次の図のとおりで、大部分の非結核性抗酸菌には存在せず結核菌群とごく一部の非結核性抗酸菌にのみ存在しています。

図 ESAT-6、CFP-10 および TB7.7 の特異性

| | | ESAT-6 | CFP-10 | TB7.7 |
|---------|-------------------------|--------|--------|-------|
| 菌 核 | <i>M tuberculosis</i> | + | + | + |
| | <i>M africanum</i> | + | + | + |
| | <i>M bovis</i> | + | + | + |
| 非結核性抗酸菌 | <i>M avium</i> | - | - | - |
| | <i>M fortuitum</i> | - | - | - |
| | <i>M goodii</i> | - | - | - |
| | <i>M intracellulare</i> | - | - | - |
| | <i>M kansasii</i> | + | + | - |
| | <i>M marinum</i> | + | + | - |
| | <i>M szulgai</i> | + | + | - |

(現場で役に立つ IGRAs 使用の手引き Ver. 2 より引用)

各検査項目要項

| 検査項目名 | QFT-TBゴールド プラス | | 結核菌特異的 IFN- γ (T-スポットTB) |
|-------|---|--------------------------------|------------------------------------|
| 採血管 | 4本の専用真空採血管 (N1, TB1, TB2, Mtogen) | ヘパリン採血管 (1本) | ヘパリン採血管またはCPT管1本以上 |
| 採血量 | 各1.0mL | 5mL以上 | 5mL以上 |
| 採血後操作 | 上下に5秒間または、 10回振って混合 | 転倒混和 | 転倒混和 |
| 検体搬送等 | 22°C \pm 5°C、16時間以内 | 2°C \sim 8°C、48時間以内に専用採血管に分注 | 8°C \sim 30°C、32時間以内 |
| 使用抗原 | TB1 (ESAT-6, CFP-10の長鎖ペプチド) TB2 (ESAT-6, CFP-10の長鎖ペプチドおよびCFP-10短鎖ペプチド) | | パネルA抗原 (ESAT-6) パネルB抗原 (CFP-10) |
| 検査方法 | ELISA法 | | ELISPOT法 |

第4章 結核の検査

《 測定結果の判定方法 》

1. QFTにおける結果の計算

各検体の測定値は、TB1 チューブ血漿、TB2 チューブ血漿と M t o g e n (陽性コントロール) 血漿中の IFN- γ 濃度 (IU/mL) から、それぞれ N1 値 (陰性コントロール) 血漿中の IFN- γ 濃度 (IU/mL) を減じて求める。これらの測定値を結果の解釈に用いる。

$$\text{測定値 TB1 (IU/mL)} = \text{IFN-}\gamma \text{ TB1} - \text{IFN-}\gamma \text{ N 濃度}$$

$$\text{測定値 TB2 (IU/mL)} = \text{IFN-}\gamma \text{ TB2} - \text{IFN-}\gamma \text{ N 濃度}$$

$$\text{M t o g e n 値 (IU/mL)} = \text{IFN-}\gamma \text{ M} - \text{IFN-}\gamma \text{ N 濃度}$$

$$\text{N1 値 (IU/mL)} = \text{IFN-}\gamma \text{ N}$$

2. QFT 結果の解釈

結果の解釈は下記の判定基準によって行います。

診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断することが必要です。

QFT の判定基準

| N1 値 (IU/mL) | TB1 値 (IU/mL) | TB2 値 (IU/mL) | M t o g e n 値 (IU/mL) * 1 | 結果 | 解釈 |
|----------------|--|------------------------------|------------------------------|----------|-------------------------------|
| 8.0 以下 | 0.35 以上かつ N1 値の 25% 以上 | 不問 | 不問 | 陽性 | 結核感染を 疑う |
| | 不問 | 0.35 以上かつ N1 値の 25% 以上 | | | |
| 8.0 を超える *2 | 0.35 未満、あるいは 0.35 以上 かつ N1 値の 25%未満 | | 0.5 以上 | 陰性 | 結核感染し ていない |
| | | | 0.5 未満 | 判定 不可 | 結核感染の 有無につい て判定でき ない |
| | 不問 | | | 判定 不可 | 結核感染の 有無につい て判定でき ない |

*1: QFT M t o g e n (場合によっては QFT TB 抗原) の応答は、通常マイクロプレートリーダーの測定範囲外であっても、試験結果に影響はない。10 IU/mL を超える値は、解析ソフトでは >10 IU/mL と報告される。

*2: N1 値が 8.0 IU/mL を超える場合は、測定範囲外である可能性あり、判定不可とする。

第4章 結核の検査

3. 結核菌特異的 IFN- γ (T-SPOT) の判定基準

以下の計算式を用いて、①および②を算出する。

$$(\text{パネル A ウェルのスポット数}) - (\text{陰性コントロールのスポット数}) \cdots \textcircled{1}$$

$$(\text{パネル B ウェルのスポット数}) - (\text{陰性コントロールのスポット数}) \cdots \textcircled{2}$$

上記で得られた①および②の数値を用いて、以下の判定基準に従い判定をする。

- ・ ①および②の双方、あるいはいずれか一方が6スポット以上の場合：陽性
- ・ ①および②の双方が5スポット以下の場合：陰性
- ・ 陰性コントロールウェルが10スポット超、あるいは陽性コントロールウェルが20未満となる場合：判定不可

※判定不可の場合は、再度血液を採取して検査を行うこと。

※一部の患者のT細胞はPHA溶液に十分な反応性を示さず、陽性コントロールウェルのスポット数が20未満となることがある。そのため、①または②どちらかが陽性結果を示した場合は、陽性コントロールウェルのスポット数が20未満となることがある。そのため、①または②のどちらかが陽性結果を示した場合は、陽性コントロールのスポット数に関わらず「陽性」と判定すること。

※「判定基準」に従い、①および②を算出した際、双方のスポット数の最大値が5～7になった場合、あるいは、数値が5未満となった場合と比較して、結果の信頼性がやや低下する可能性がある。このような結果となった場合、再度血液を採取して検査を行うことが推奨される。

T-SPOTの判定基準

| 測定結果 | 結果 | 解釈 |
|-------------------------|---------|-------------------|
| 陰性コントロールが10スポット超 | 判定不可 | 結核感染の有無について判定できない |
| 陽性コントロールが20スポット未満 | | |
| 特異抗原の反応値のいずれかが高い方が8以上 | 陽性 | 結核感染を疑う |
| 特異抗原の反応値のいずれかが高い方が7または6 | 陽性・判定保留 | 再検査を推奨 |
| 特異抗原の反応値のいずれかが高い方が5 | 陰性・判定保留 | |
| 特異抗原の反応値のいずれも4以下 | 陰性 | 結核感染していない |

注) 再検査の結果が再び「判定保留」であった場合には他の診断方法を用いるか、臨床的・医学症状や患者背景を考慮のうえ、医師の判断のもとで結核感染の状況を総合的に診断する。