

## 短 報

## MB チェックシステムによる抗酸菌の迅速診断法

斎藤 肇 ・ 富岡 治明 ・ 佐藤 勝昌

島根医科大学微生物・免疫学

井上 圭太郎 ・ 重藤 えり子

国立療養所広島病院

受付 平成3年12月18日

RAPID DIAGNOSIS OF MYCOBACTERIA, ESPECIALLY *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AND *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX, USING MB CHECK SYSTEMHajime SAITO<sup>\*</sup>, Haruaki TOMIOKA, Katsumasa SATO,  
Keitaro INOUE and Eriko SHIGETO

(Received for publication December 18, 1991)

Forty-five sputum specimens were subjected to isolation for mycobacteria either MB Check system (MB method ; F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) or 3% Ogawa egg medium (Ogawa method). Test sputum was treated with 4 volumes of 4% NaOH for 1~2 min and 0.1 ml of the resulting mixture was inoculated onto 3% Ogawa egg medium. The remaining portion of the mixture was neutralized with 1N HCl, diluted with 1/15 M phosphate buffer (PB ; pH 6.8), and subsequently centrifuged at 3,000 rpm for 20 min. The sediment was suspended in 1.5 ml of PB and 0.5 ml each was inoculated into MB Check M bottle (20 ml) supplemented with M supplement (1ml). In MB method, bacterial growth was measured on Middlebrook 7H11 agar medium and Middlebrook 7H11 agar medium containing NAP (*p*-nitro- $\alpha$ -acetylamino- $\beta$ -hydroxy-propiofenone).

Among 45 sputum specimens, the number of positive specimens for mycobacterial growth in the above two cultivation methods and time required for growth were as follows : 3% Ogawa egg medium ; 12 specimens (26.7%) gave positive growth, including 7 of *M. tuberculosis* complex strains on 14~35 days (average 22 days) and 5 of *M. avium* complex strains on 14~21 days (average 18 days) ; MB method ; 15 of specimens (33.3%) gave positive growth, including 8 of *M. tuberculosis* complex strains on 7~21 days (average 15 days), 6 of *M. avium* complex strains on 7~14 days (average 11 days) and 1 of *M. scrofulaceum* strain on 28 days. There was no specimen which was positive for mycobacterial growth on 3% Ogawa egg medium but negative on MB medium.

\*From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo 693 Japan.

**Key words :** Rapid diagnosis, *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex, MB Check

**キーワード :** 迅速診断法, *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex, MB チェック

わが国においては喀痰からの抗酸菌の分離培養には NaOH 処理検体を小川培地に接種する, いわゆる小川法が広く用いられており, 分離菌を同定し, 薬剤感受性試験を行って患者の的確な治療を開始するに必要な情報をうるまでにはかなりの長期間を要する。そこで, 菌をより早く, しかもより高率に分離するためにより優れた培地, 培養法の開発が試みられてきた<sup>1)~4)</sup>。

今回, われわれは抗酸菌の迅速診断法を企図して開発された MB チェックシステム「ロシュ」<sup>4)</sup> (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) を入手する機会を得たので, これによる抗酸菌の分離培養成績を小川法におけるそれと比較検討したので以下報告する。

MB チェックシステムは下記の培地よりなる<sup>4)</sup>。すなわち, Middlebrook 7H9 培地をベースとした液体培地と約 20% の CO<sub>2</sub> を含む空気が加えられた培養ボトル (MB チェック M ボトル) にグルコース, グリセリン, オレイン酸, 塩酸ピリドキサル, カタラーゼ, アルブミンおよび polyoxyethylene 40 stearate の発育促進物質とアズロシン, トリメトプリム, ポリミキシン B, アンホテリシン B およびナリジキシン酸の雑菌発育阻止物質よりなる「MB チェック M サプリメント」が加えられている。このボトル内で増殖した菌の分離培養のためのデ IPP スライド (MB チェック M スライド) に 3 種の寒天培地 (変法 Middlebrook 7H11 寒天培地, NAP 含有変法 Middlebrook 7H11 寒天培地, チョコレート寒天培地) が取りつけてある。

培養操作は「MB チェック M サプリメント」加 MB チェック M ボトルへ菌接種後, このボトルに MB チェック M スライドを接続 (M スライド接続後の CO<sub>2</sub> 濃度は約 2~3%) し, ボトルを転倒して M スライド上の寒天培地表面を十分潤した後に培養し, 一定日数毎に寒天培地上の菌の発育の有無を観察する。観察後はその都度ボトルを転倒して M スライドの寒天培地表面を十分潤す。

今回の検討の供試喀痰は国立療養所広島病院に入院中の抗酸菌症患者 45 例より得られたもので, 50ml スクリューキャップ付き遠心管に採取後, 4°C に保って島根医科大学微生物・免疫学教室へ送付された。受領後は直ちに安全キャビネット内で塗抹標本を作製後, 4 倍量の 4% NaOH を加えて駒込ビペットでパンピングし, さらに Vortex ミキサーで混和すること 1~2 分間に及んだ。

この処理喀痰の 0.1ml を直ちに 1 本の 3% 小川培地

へ接種し, 残りには 10~20ml のフェノールレッド (PR) 8μg/ml 含有 1/15M リン酸緩衝液 (PB; pH 6.8) を加え, 1N HCl で中和後, 遠心管のトップリングまで PB を追加し, 3,000 rpm, 20 分遠心した。そして, 得られた沈渣は 1.5ml の PR フリーの 1/15 MPB に浮遊し, 塗抹標本を作成後, 0.5ml を 1 本の MB チェックボトルへ接種した。直接塗抹並びに集菌塗抹のいずれも Ziehl-Neelsen 染色し, 鏡検した。3% 小川培地並びに MB チェックボトルとも 37°C で培養し, 小川培地では集落の発育の有無ないし程度を週 1 回, 8 週間にわたって観察した。

他方, MB 法では菌接種後ボトルを転倒してボトル上部に連結された「M スライド」を潤した後, 培養 1, 3, 5 および 7 日目, その後は毎週 1 回, 8 週間培養し, その都度 M スライド上の菌の発育の有無を肉眼で観察した後, 上述したと同様ボトルを転倒して M スライドを潤した。

そして, MB チェックシステムによる陽性検体については, MB チェックボトル内の液体培地の 0.1ml を 1% 小川培地に移植し, 集落初発所要日数と集落性状の観察後, *M. tuberculosis* complex (MTC) あるいは *M. avium* complex (MAC) の AccuProbe テスト (Gen-Probe 社, U.S.A.)<sup>5)</sup> との反応性を調べ, 場合によってはさらに α 抗原<sup>6)</sup>をも調べて, 分離菌の同定を行った。3% 小川培地発育陽性菌についても上記の点についての観察あるいはテストを行って菌種の同定を行った。

培養並びに同定成績は一括して Table 1 に, またそれぞれの成績を各別にまとめたものを Table 2 並びに Table 3 に示した。抗酸菌培養陽性例 (Table 1, 2) は供試 45 検体中, MB チェックでは 15 例 (33.3%), 小川法では 12 例 (26.7%) であった。直接塗抹陽性・培養陽性例は MB チェック並びに小川法とも 12 例 (26.7%) であり, 両者間に差は見られなかったが, 直接塗抹陰性・培養陽性例は MB チェックでは 3 例 (6.7%) (MTC, MAC および *M. scrofulaceum* 各 1 例) 見られたが, 小川法では皆無であった。また, 集菌塗抹陽性・培養陽性例は MB チェックでは 13 例 (28.9%), 小川法では 12 例 (26.7%) で両者間に大差はなかった。集菌塗抹陰性・培養陽性例は小川法にはなかったが, MB チェックは 2 例 (4.4%) (MAC 並びに *M. scrofulaceum* 各 1 例) 見られた。

**Table 1.** Isolation of Mycobacteria from 45 Sputum Specimens and its Identification

No.	Gaffky scale		Growth		Days required for primary isolation		Colony (1% Ogawa) <sup>b)</sup>		NAP test	DNA probe test		
	Smear		MB check	3% Ogawa <sup>a)</sup>	MB check	3% Ogawa	Photo-chromogenicity	Type		MB check	MB check (1% Ogawa) <sup>c)</sup>	3% Ogawa
	Direct	Concentrated										
6	2	6	+	+	14	21	N <sup>e)</sup>	R	R <sup>e)</sup>	MTC <sup>d)</sup>	MTC	
7	2	3	+	+	14	21	N	R	R	MTC	MTC	
9	6	7	+	+	7	14	N	R	R	MTC	MTC	
20	1	1	+	+	21	35	N	R	R	MTC	MTC	
22	2	7	+	+	14	14	N	R	R	MTC	MTC	
27	0	1	+	-	21	-	N	R	R	MTC	-	
41	1	1	+	+	14	21	N	R	R	MTC	MTC	
45	1	4	+	+	14	28	N	R	R	MTC	MTC	
8	4	6	+	+	7	14	N	S	R	MAC <sup>e)</sup>	MAC	
11	1	1	+	+	14	21	N	S	R	MAC	MAC	
12	1	2	+	+	14	21	N	S	R	MAC	MAC	
25	0	0	+	-	14	-	N	S	R	MAC	-	
26	1	1	+	+	7	14	N	S	R	MAC	MAC	
37	1	5	+	+	7	21	N	S	R	MAC	MAC	
21	0	0	+	-	28	-	Sc <sup>d)</sup>	S	R	-	-	

a) 3% Ogawa medium for primary isolation. b) 1% Ogawa medium for subculture of mycobacteria isolated in MB Check bottle.  
 c) N : Nonphotochromogenic. d) Sc : Scotochromogenic ; This strain was identified as *M. scrofulaceum* by  $\alpha$ -antigen analysis.  
 e) Resistant. f) *M. tuberculosis* complex. g) *M. avium* complex.

**Table 2.** Isolation of Mycobacteria from 45 Sputum Specimens by Ogawa Method and MB Check System

Culture medium	Positive culture			
	Direct smear		Concentrated smear	
	Negative	Positive	Negative	Positive
3% Ogawa	0	12 (26.7%)	0	12 (26.7%)
MB Check	3 (6.7%)	12 (26.7%)	2 (4.4%)	13 (28.9%)

**Table 3.** Days Required for Isolation of *M. tuberculosis* Complex and *M. avium* Complex from 45 Sputum Specimens, Using Ogawa Method and MB Check System

Culture medium	<i>M. tuberculosis</i> complex						<i>M. avium</i> complex					
	Direct smear						Direct smear					
	Total		Negative		Positive		Total		Negative		Positive	
	No. of strains	Recovery days	No. of strains	Recovery days	No. of strains	Recovery days	No. of strains	Recovery days	No. of strains	Recovery days	No. of strains	Recovery days
3% Ogawa	7	14~35(22)	0		7	14~35(22)	5	14~21(18)	0		5	14~21(18)
MB Check	8	7~21(15)	1	21(21)	7	7~21(14)	6	7~14(11)	1	7(7)	5	7~14(10)

In parentheses, mean days are indicated.

したがって、MBチェックは菌の検出率において小川法よりもやや優れており、なかでも塗抹並びに小川培養法陰性検体からの菌の分離に試みて価値ある方法かと思われる。

次に、培養陽性検体の発育所要日数 (Table 1, 3) についてみると、MTCは、MBチェックでは7~21日

(平均15日)であったのに対して、小川法では14~35日(平均22日)であり、MBチェックは小川法に比べて1週間早かった。MACについてみると、MBチェックでは7~14日(平均11日)を要したのに対して、小川法では14~21日(平均18日)であり、MBチェックでは小川法に比べて約1週間集落初発所要日数を短縮す

ることができた。

MTC は NAP 感受性であり、非結核性抗酸菌は NAP 抵抗性であるとされており<sup>7)8)</sup>、この点についてはわれわれも BACTEC 460 TB System<sup>3)</sup>での NAP 感受性試験によって同様の成績を得ている<sup>9)</sup>。しかし、今回の MB 法では Table 1 に示すように DNA プローブテストにより MTC と同定されたすべての菌株が NAP 抵抗性と判定され、先人の報告と異なる成績が得られた。これは BACTEC 460 TB System における NAP 感受性試験は 37°C、3～6 日で判定されるのに対して、MB チェックでは 7～28 日の長期にわたる培養のため、その間に NAP の失活が起り、MTC と非結核性抗酸菌との選択性を失うものと思われる。

以上の成績より、MB チェックは小川法よりも菌検出率が多少なりとも高く、集落初発所要日数を約 1 週間短縮することが分かった。最近、Giger ら<sup>10)</sup>と Isenberg ら<sup>11)</sup>は、MB チェックシステムは菌検出率並びに集落初発所要日数の短縮において従来法よりも優れているが、本法での NAP 感受性試験は MTC と非結核性抗酸菌との鑑別上役立つというわれわれの成績と軌を一にする報告をしており、今後その点の改良が必要であろう。

#### 謝 辞

MB チェックシステムを研究する機会を与えられた日本ロシュ株式会社(東京)に謝意を表します。

#### 文 献

- 1) 斎藤 肇 : 抗酸菌の分離と同定の実際, 臨床検査, 34 : 400~404, 1990.
- 2) 斎藤 肇 : 結核菌検査法の進歩, 臨床と研究, 67 : 2341~2346, 1990.
- 3) Siddiqi, S. H. : BACTEC TB System. Product and Procedure Manual, Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Towson, Maryland, U.S.A., 1988.

- 4) MB チェックシステムマニュアル : MB チェックシステム「ロシュ」; 抗酸菌培養システム, 日本ロシュ, 東京, 1990.
- 5) AccuProbe マニュアル : *Mycobacterium avium* Complex Culture Confirmation Test ; *Mycobacterium tuberculosis* Complex Culture Confirmation Test, Gen-Probe Inc., San Diego, CA., U.S.A.
- 6) Tasaka, H., Nomura, T. and Matsuo, Y. : Specificity and distribution of alpha antigens of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and related species of mycobacteria, Am Rev Respir Dis, 132 : 173-174, 1985.
- 7) Eidus, L., Diena, B. B. and Greenberg, L. : The use of *p*-nitro- $\alpha$ -acetyl-amino- $\beta$ -hydroxypropylphenone (NAP) in differentiation of mycobacteria, Am Rev Respir Dis, 81 : 759-760, 1960.
- 8) Collins, T. and Levett, P. N. : Radiometric studies on the use of selective inhibitors in the identification of *Mycobacterium* spp., J Med Microbiol, 30 : 175-181, 1989.
- 9) 斎藤 肇, 佐藤勝昌, 富岡治明他 : BACTEC 460 TB SYSTEM による結核菌(抗酸菌)の迅速診断法, 結核, 67 : 89~95, 1992.
- 10) Giger, T. and Burkhardt, H. J. : Evaluation of a new biphasic culture system for the recovery of mycobacteria, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 9 : 428-431, 1990.
- 11) Isenberg, H. D., D'Amato, R. F., Heifets, L. et al. : Collaborative feasibility study of a biphasic system (Roch Septi-Chek AFB) for rapid detection and isolation of mycobacteria, J Clin Microbiol, 29 : 1719-1722, 1991.