

原 著

BACTEC 460 TB System と小川法による喀痰からの  
抗酸菌の分離培養の比較

佐藤 勝昌

島根医科大学微生物・免疫学

受付 平成4年8月26日

COMPARISON OF BACTEC AND OGAWA MEDIA FOR CULTURE OF  
MYCOBACTERIA FROM SPUTUM SPECIMENS

Katsumasa SATO \*

(Received for publication August 26, 1992)

The BACTEC system and the Ogawa method were compared for recovery rates and detection times of mycobacteria from sputum specimens. From the 179 specimens, 78 (43.6%) and 56 (31.3%) isolates were detected with the BACTEC and Ogawa methods, respectively. Of the 78 mycobacterial isolates in the BACTEC method, 53 (67.9%) were *M. tuberculosis* complex strains, 23 (29.5%) were *M. avium* complex strains, and others (2 strains) (2.6%) were *M. kansasii* and *M. scrofulaceum* strains. Of the 56 isolates in the Ogawa method, 37 (66.1%) were *M. tuberculosis* complex strains, 18 (32.1%) were *M. avium* complex strains, and 1 (1.8%) was *M. kansasii* strain. The difference in the recovery rates between the BACTEC (26 *M. tuberculosis* complex strains, 13 *M. avium* complex strains) and Ogawa (23 *M. tuberculosis* complex strains, 12 *M. avium* complex strains) methods was not significant in the smear-positive specimens. In the case of smear-negative specimens, the BACTEC method detected 27 *M. tuberculosis* complex and 10 *M. avium* complex isolates, on the other hand, the Ogawa method detected 14 and 6 of *M. tuberculosis* complex and *M. avium* complex, respectively. The mean detection time for *M. tuberculosis* complex was 15 days with the BACTEC method, and 26 days with the Ogawa method. For *M. avium* complex, the mean detection times were 5 and 24 days, respectively. These results indicate the usefulness of the BACTEC system in the rapid diagnosis of mycobacteria.

**Key words** BACTEC, Rapid diagnosis, *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex

キーワードズ : BACTEC, 迅速診断, *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex

---

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

## はじめに

臨床材料，特に喀痰からの結核菌の早期検出は肺結核症を診断し，その治療方針を決定する上に極めて重要であることは言を待たないところであるが，わが国で結核菌の分離に広く用いられている小川法は長期間を要する上に，発育困難な菌の存在も知られていることもあって，より優れた培地・培養法の開発が望まれてきた。

Middlebrook 法<sup>1)</sup>は<sup>14</sup>Cでラベルしたパルミチン酸含有 7H12 培地中で菌の増殖に伴って生じる<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を測定するラジオメトリック法によって、Lowenstein-Jensen (LJ) 培地や 7H10 培地を用いた従来法よりも菌検出率の向上と検出所要日数の短縮のできることを報告した。その後、培地並びに測定機器の改良が重ねられ、近年では BACTEC 460 TB System<sup>2)</sup> (Becton Dickinson Co., Towson, Md., USA) (以下、BACTEC 法) による方法が米国を中心として広く普及し、その優れた点が諸家によって報告されている<sup>4)~7)</sup>。

ところで、わが国においては抗酸菌分離標準法として広く用いられている小川法と BACTEC 法による抗酸菌分離培養法の優劣の比較についての報告は未だ少なく、わずかに我々<sup>8)</sup>並びに Abe 氏<sup>9)</sup>の報告がみられるにすぎないが、ともに BACTEC 法が検出感度の点において小川法よりも優れているという。

今回は、先の報告 (45 例)<sup>8)</sup>に引き続き、さらに検査喀痰を 134 例増やし、計 179 例として、両法による抗酸菌の分離成績を比較検討したので以下報告する。

## 材料と方法

## 1. 喀痰

国立療養所 3 施設 (広島病院，松江病院，南岡山病院) に入院中の抗酸菌症患者 159 名並びに島根県環境保健公社の実施した集団検診によって肺に異常陰影が認められた 20 名より抗酸菌検査のために採取された喀痰の計 179 検体を供試した。

## 2. 培地

BACTEC 法には Middlebrook 7H9 培地にカゼイン消化物，<sup>14</sup>C-パルミチン酸，PANTA (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim, Azlocillin) および POES (Polyoxyethylene-stearate) が添加された BACTEC 12B 培地<sup>2)</sup> (Becton Dickinson) 並びに自家製の 3% 小川培地を用いた。

## 3. 検査法

喀痰処理法の詳細は既報<sup>8)</sup>に準じて概説以下のようにして行った。すなわち、50ml スクリューキャップ付き遠心管に採取された喀痰は冷蔵して送られ、南岡山病院では翌日、他の 3 施設よりのものは採取日に受領した。喀痰材料は塗染染色後、4 倍量の 4% NaOH を加えて

ミキサーで約 2 分間混和し、直ちにその 0.1ml を 3% 小川培地へ接種した。そして、残りの処理喀痰にはフェノールレッド (8 μg/ml) 含有 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を 10~20ml 加え、直ちに 1 N HCl で中和後、遠心管のトップリングまで同種緩衝液を加え、3,000 rpm, 20 分遠心し、得られた沈渣に 1~1.5ml のリン酸緩衝液 (フェノールレッド非含有) を加え、その 0.5 ml を BACTEC 12B バイアルへ接種した。

小川培地並びに BACTEC バイアルとも 37°C で培養し、小川培地では肉眼的集落発生の見られたものを陽性、また、BACTEC バイアルでは Growth Index (GI) が 50 以上になり、かつそれよりの抗酸菌塗抹陽性であったものをもって陽性と判定した。両培地とも菌接種後最初の 3 週間は週 3 回、その後は、小川培地では週 1 回、5 週間にわたって、また BACTEC バイアルでは週 1 回、3 週間にわたって菌増殖の有無を観察または測定した。

## 4. 分離菌の鑑別・同定法

既報<sup>8)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、*M. tuberculosis* complex (MTC) と非結核抗酸菌の鑑別は、上記 GI ≥ 50 の培養菌の 1 ml を NAP (*p*-nitro-*α*-acetylamino-*β*-hydroxy-propiophenone) 5 μg 含有ディスクの入った BACTEC NAP 感受性試験バイアルに加え、GI の変動を 3~6 日間にわたって毎日測定し、その値が対照 (元の培養バイアル) と同様に増加の見られたものは NAP 抵抗性 (非結核性抗酸菌)、減少あるいは変化の見られなかったものは NAP 感受性 (MTC) と判定した。また、3% 小川培地上の初代分離抗酸菌集落より 0.05% Tween 80 水溶液による McFarland No.1 の濃度の菌液を調製し、その 0.1ml を BACTEC 12B バイアルに接種して GI を毎日測定し、GI ≥ 50 になったものについても同様に NAP 試験を行った。

さらに、3% 小川培地初代分離菌並びに BACTEC 発育陽性バイアルからの 1% 小川培地継代菌について、集落性状の観察並びに MTC, *M. avium* complex (MAC) あるいは *M. kansasii* の DNA プローブ (AccuProbe<sup>TM</sup>: Gen Probe Inc., San Diego, USA) との反応性の検討<sup>10)</sup>、またこれらプローブとの反応陰性の菌株については *α* 抗原分析<sup>11)</sup> を行い、これらの成績を勘案して分離菌の同定を行った。

## 結 果

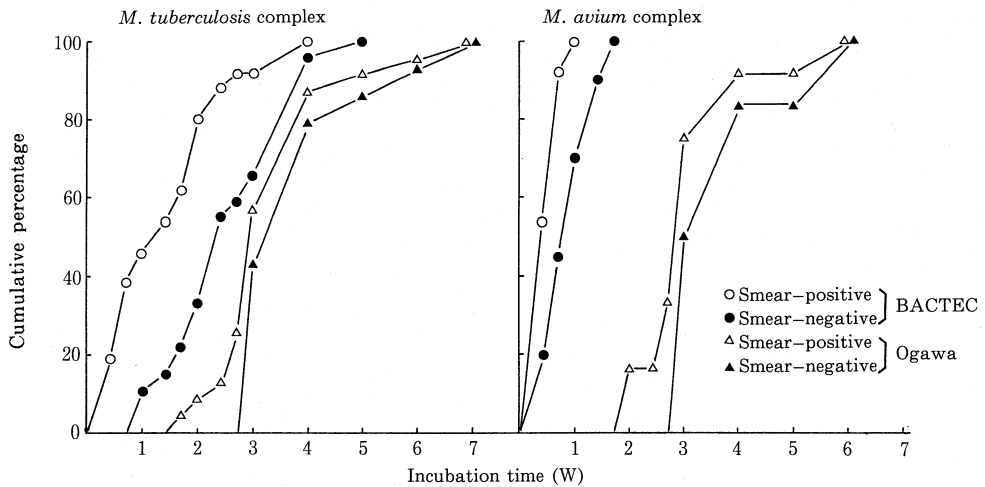
供試 179 喀痰材料より小川法では 56 検体 (31.3%) が、また BACTEC 法では 78 検体 (43.6%) が培養陽性であった。これを分離菌種別にみると、Table 1 に示すように、BACTEC 法での培養陽性 78 検体では、MTC 53 株 (67.9%), MAC 23 株 (29.5%), *M. kan-*

**Table 1** Mycobacterial Species Isolated from 179 Sputum Specimens by Ogawa and BACTEC Methods

Species	No. (%) of isolates recovered in :	
	Ogawa	BACTEC
<i>M. tuberculosis</i> complex	37 (66.1)	53 (67.9)
<i>M. avium</i> complex	18 (32.1)	23 (29.5)
<i>M. kansasii</i>	1 (1.8)	1 (1.3)
<i>M. scrofulaceum</i>	0 (0)	1 (1.3)
Total	56 (100)	78 (100)

**Table 2** Recovery of Mycobacteria from 179 Sputum Specimens by Ogawa and BACTEC Methods

Species	Smear	No. of isolates recovered in :	
		Ogawa (56 strains)	BACTEC (78 strains)
<i>M. tuberculosis</i> complex	Positive	23	26
<i>M. tuberculosis</i> complex	Negative	14	27
<i>M. avium</i> complex	Positive	12	13
<i>M. avium</i> complex	Negative	6	10
Other mycobacteria	Negative	1	2



**Fig.** Cumulative Percentage of Positive Cultures by BACTEC and Ogawa Methods

*sasii* 1株, *M. scrofulaceum* 1株であり, MTC並びにMACが全分離菌の97.4%を占めた。これに対して, 小川法での培養陽性56検体では, MTC 37株(66.1%), MAC 18株(32.1%), *M. kansasii* 1株が分離され, MTC並びにMACが全分離菌の98.2%を占めた。なお, 小川法陽性, BACTEC法陰性例は皆無であった。

Table 2は塗抹陽性あるいは陰性喀痰よりの培養陽性

菌株数を菌種別に示したものである。MTCは塗抹陽性例では, 小川法で23株, BACTEC法では26株分離され, 両法間に大差はなかったが, 塗抹陰性例では, 小川法で14株分離されたのに対して, BACTEC法で27株分離され, BACTEC法は小川法よりも遙かに優れた分離成績を示した。MACについてもMTCにおけると同様な傾向がみられ, 塗抹陽性検体では, 小川法とBAC

**Table 3** NAP Sensitivity Test of Mycobacteria Isolated from 179 Sputum Specimens by Ogawa and BACTEC Methods

Isolated from	NAP test	Number of isolates	Reactivity to DNA probe			
			MTC	MAC	<i>M. kansasii</i>	Negative
Ogawa	Sensitive	37	37	0	0	0
	Resistant	19	0	18	1	0
BACTEC	Sensitive	53	53	0	0	0
	Resistant	25	0	23	1	1 <sup>a)</sup>

a) This strain was identified as *M. scrofulaceum* by  $\alpha$ -antigen analysis.

TEC法との間の分離成績に大差はみられなかったが、塗抹陰性例では、BACTEC法は小川法よりも優れた分離成績が得られた。

Fig. は小川法並びに BACTEC 法による分離抗酸菌の累積検出率を塗抹成績別に示したものである。MTC についてみると、塗抹陽性検体では、小川法で 12~49 日 (平均 25 日)、BACTEC 法で 3~28 日 (平均 11 日)、また塗抹陰性検体では、小川法で 21~49 日 (平均 28 日)、BACTEC 法で 7~35 日 (平均 19 日) であった。MAC についてみると、塗抹陽性検体では、小川法で 14~28 日 (平均 22 日)、BACTEC 法で 3~7 日 (平均 4 日)、また塗抹陰性検体では、小川法で 21~42 日 (平均 27 日)、BACTEC 法で 3~12 日 (平均 7 日) であった。

Table 3 は小川法並びに BACTEC 法による分離菌の NAP 感受性試験と DNA プローブ試験の成績とを一括表示したものである。NAP 感受性で MTC と考えられた全菌株は DNA プローブテストによって MTC と同定された。また、NAP 抵抗性で非結核性抗酸菌と考えられた菌株は、DNA プローブによって小川法分離菌 (19 株) は MAC (18 株) および *M. kansasii* (1 株) と同定され、BACTEC 法分離菌 (25 株) は MAC (23 株)、*M. kansasii* (1 株)、同定不能 (1 株) よりなっていた。この DNA プローブ非反応の 1 株は集落性状並びに  $\alpha$  抗原分析によって *M. scrofulaceum* と同定された。

なお、表には示さなかったが、培地汚染率は小川法で 2.8% であったのに対して、BACTEC 法では 1.1% にすぎなかった。

## 考 察

今回の小川法並びに BACTEC 法による 179 喀痰材料よりの抗酸菌の培養陽性成績は、小川法が 56 例 (31.3%) であったのに対して、BACTEC 法では 78 例 (43.6%) であり、BACTEC 法が小川法よりも約 12% 優れた検出率を示した。この BACTEC 法による菌の検出

率は塗抹陽性喀痰でも小川法におけるよりも優れていたが、その優れた検出感度は特に塗抹陰性検体においてみられ、今回の検査では小川法で 21 検体 (MTC 14 株、MAC 6 株、*M. kansasii* 1 株) が培養陽性であったのに対して、BACTEC 法では 39 検体 (MTC 27 株、MAC 10 株、*M. kansasii* 1 株、*M. scrofulaceum* 1 株) が陽性であった。これは塗抹陰性・培養陽性の 39 検体のうちのそれぞれ約 54% 並びに 100% を示しており、Abe ら<sup>9)</sup> の小川法での検出率は約 48% であったのに対して、BACTEC 法では約 87% であったという成績と軌を一にするものである。同様な知見は LJ 培地あるいは 7H10 (7H11) 培地などを用いての比較検討においても報告されているところである<sup>4)5)7)</sup>。

ところで、今回の検討における MTC 並びに MAC の菌検出日数は、小川法ではそれぞれ 12~49 日 (平均 26 日) 並びに 14~42 日 (平均 24 日) であったのに対して、BACTEC 法ではそれぞれ 3~35 日 (平均 15 日) 並びに 3~12 日 (平均 5 日) で BACTEC 法は小川法に比べ、MTC では平均 11 日、また MAC では平均 19 日菌検出所要日数が短縮された。これを塗抹成績別に分けてみた場合、塗抹陽性喀痰では、BACTEC 法は小川法よりも、MTC が平均 14 日、MAC が平均 18 日短縮され、塗抹陰性検体ではそれぞれ 9 日並びに 20 日短縮された。この BACTEC 法が 7H10 (7H11) 培地、LJ 培地あるいは小川培地を用いた従来法におけるよりも、菌検出日数が、MTC では約 2 週間、MAC では約 1 週間短縮されることについては諸家<sup>4)-7)9)</sup>によって報告されているところであるが、われわれもすでに報告しているところである<sup>8)</sup>。

7H12B 培地中より <sup>14</sup>C-パルミチン酸を控除した培地を用いて BACTEC 法に準じた方法での抗酸菌の検出率は小川法よりも優れ、BACTEC 法よりも若干劣るものであることが知られている<sup>12)13)</sup>。今後、非 isotopic な液体培地を用いた検出感度の良い検査法の開発が望まれる。

## 結 語

喀痰 179 検体について小川法と BACTEC 法による抗酸菌の分離培養成績について比較検討し、次の知見を得た。

1) 抗酸菌培養陽性例は小川法では 56 検体 (31.3% : MTC 37 株, MAC 18 株, *M. kansasii* 1 株) であつたのに対して BACTEC 法では 78 検体 (43.6% : MTC 53 株, MAC 23 株, *M. kansasii* 1 株, *M. scrofulaceum* 1 株) であつた。

2) 塗抹陽性検体よりの検出率は小川法と BACTEC 法間に大差なかったが、塗抹陰性検体では BACTEC 法の検出率が小川法よりも優れていた。

3) 最小菌検出所要日数は MTC では、小川法で平均 26 日であつたのに対して BACTEC 法で平均 15 日、また MAC ではそれぞれ 24 日および 5 日であつた。

4) NAP テストは MTC と非結核性抗酸菌との鑑別上極めて有用な方法である。

5) BACTEC 法は菌検出率、菌検出所要日数、培地汚染率のいずれの面においても小川法よりも優れた方法であるといえる。

## 謝 辞

御指導いただきました斎藤肇教授並びに富岡治明助教授に、また  $\alpha$  抗原分析をしていただきました広島大学医学部田坂博信助教授に深謝いたします。

BACTEC 12B 並びに NAP 感受性試験バイアルを分与いただいた日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、AccuProbe を分与いただいた中外製薬株式会社、喀痰を分与いただいた国立療養所広島病院の重藤えり子先生、国立療養所松江病院の穴戸眞司先生、国立療養所南岡山病院の河原伸先生、および財団法人島根県環境保健公社の槇野長蔵先生に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Middlebrook G, Reggiardo Z and Tigertt W D : Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media, Am Rev Respir Dis. 1977 ; 115 : 1066-1069.
- 2) Siddiqi SH : BACTEC TB System. Product and Procedure Manual, Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Towson, Maryland, U.S.A., 1988.
- 3) 斎藤 肇 (監修) : Siddiqi, SH 著, BACTEC 460 TB System, 抗酸菌迅速検査装置, 製品及び操作説明書, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京, 1991.

- 4) Morgan M, Horstmeier CD, DeYoung DR et al. : Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. J Clin Microbiol. 1983 ; 18 : 384-388.
- 5) Roberts GD, Goodman NL, Heifets L : Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J Clin Microbiol. 1983 ; 18 : 689-696.
- 6) Kirihara JM, Hillier SL, and Coyle MB : Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. J Clin Microbiol. 1985 ; 22 : 841-845.
- 7) Anargyros P, Astill DSJ, and Lim ISL : Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1990 ; 28 : 1288-1291.
- 8) 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. 1992 ; 67 : 89-95.
- 9) Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y et al. : Comparison of MB-check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 878-881.
- 10) 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.
- 11) Tasaka H, Nomura T and Matsuo T : Specificity and distribution of alpha antigens of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and related species of mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1985 ; 132 : 173-174.
- 12) 阿部千代治, 細島澄子 : 7H-12 液体培地による患者材料からの結核菌の分離, 結核. 1990 ; 65 : 663-666.
- 13) 富岡治明 : *Mycobacterium avium* complex 症の現況と将来. 臨床細菌学の進歩と今後の展望, 結核 (投稿中).