

原 著

Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)  
 による抗酸菌の迅速検出法

齋 藤 肇 ・ 柏 原 嘉 子

国立多摩研究所

佐 藤 紘 二 ・ 片 山 透

国立療養所東京病院

権 赫 僩 ・ 富 岡 治 明

島根医科大学微生物・免疫

受付 平成8年2月9日

受理 平成8年3月29日

RAPID DETECTION OF ACID-FAST BACILLI WITH MYCOBACTERIA  
 GROWTH INDICATOR TUBE (MGIT)

Hajime SAITO\*, Yoshiko KASHIWABARA, Kohji SATO,  
 Tohru KATAYAMA, Hyuk-Han KWON  
 and Haruaki TOMIOKA

(Received 9 February 1996/Accepted 29 March 1996)

The BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup> Mycobacteria Growth Indicator Tube is a novel broth based culture system for the detection of mycobacteria from clinical specimens. The tubes consist of a fluorescent indicator embedded in silicone on the bottom of a 16×100mm round-bottom tube, filled with 4ml of an enriched BBL<sup>®</sup> Middlebrook 7H9 broth base, with 0.25% glycerol. Actively growing mycobacteria consume the oxygen dissolved in the medium and fluorescence will occur when the tubes are observed with a 365nm transilluminator.

The purpose of this study is to evaluate comparatively MGIT with 1% Ogawa egg medium by using two hundred and forty-five clinical specimens. The samples were digested, decontaminated and concentrated for culture using N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide method. Fifty-nine of 245 (24%) clinical samples were culture positive for mycobacteria (43 *M. tuberculosis* complex, 12 *M. avium* complex and 4 other species) by one or both test systems. The MGIT detected 4 isolates of *M. tuberculosis* complex and 6 isolates of *M. avium* complex not recovered by the Ogawa egg medium, respectively.

\* From the National Institute for Leprosy Research, 4-2-1, Aoba-cho, Higashimurayama-shi, Tokyo 189 Japan.

The mean time of detection of *M. tuberculosis* complex was 13 days (range : 2–26 days) and 19 days (range : 8–31 days) for MGIT and Ogawa egg medium, respectively, and that of *M. avium* complex was 5 days (range : 2–8 days) and 16 days (range : 6–22 days) for the MGIT and Ogawa egg medium, respectively.

Overall, the MGIT is a sensitive culture system for the detection of mycobacteria from clinical specimens, is easy to use and may be applicable to clinical laboratories.

**Key words :** Mycobacteria, Rapid diagnosis, Culture, MGIT

**キーワード :** 抗酸菌, 迅速診断, 培養, MGIT

## はじめに

AIDS 患者における結核症は進行が極めて早く、かつ予後も不良であるため早期診断、早期治療が望まれる。このような背景もあってか、近年、臨床抗酸菌学の領域において抗酸菌、なかんずく結核菌の迅速診断法が国際的に重要な研究課題の一つとしてとりあげられ、活発な研究が行われている。

ところで、わが国において、すでに日常の臨床検査に導入されている抗酸菌の迅速診断用キットとしては、検体中の菌の直接検出・同定のための MTD<sup>1)</sup> および Amplicor<sup>2)</sup>、迅速培養のためのセプティチェック AFB システム (MB チェックシステム)<sup>3)</sup>、また培養菌の迅速同定のための AccuProbe<sup>4)</sup> および DDH マイコバクテリア<sup>5)</sup> がある。

これらのうち、抗酸菌の迅速培養法についてみると、セプティチェック AFB システムは菌の検出率および検出所要日数において BACTEC 460 TB System<sup>6)</sup> にほぼ匹敵し、卵培地を用いた従来法よりも遥かに優れた方法であるが、培地容器そのものが大きいために、取扱いが不便であり、ふらん器の収容能力にも問題があるように思われる。また、BACTEC 460 TB System は供試培地 (7H12B) に <sup>14</sup>C-パルミチン酸が含まれているため、わが国においては取扱い施設の問題や使用済み培地の廃棄処理上の問題などがあって許可されるに至っていない。

最近、Becton Dickinson 社 (Sparks, M. D., US A) により開発された BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup> Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) は非放射性液体培地で菌の検出率・検出所要日数において卵培地よりも優れ、かつ発育陽性・陰性の判定も簡便であるといわれている。そこで、今回われわれは MGIT の喀痰検体中よりの結核菌 (抗酸菌) の検出率並びに検出所要日数を 1% 小川培地におけるそれらと比較検討したので以下報告する。

## 実験材料と方法

1. 供試材料 : 国立療養所東京病院の主として入院患者、一部外来患者の早朝喀痰計 271 例について検討した。しかし、それらの中には同一患者材料について 2–3 回検査した例が含まれており、培養成績に差のみられたものはなかったため最初の検査例のみを採用したため供試材料は計 245 例ということになった。

2. 喀痰前処理法 : Falcon 遠心管 (50 ml ; Becton Dickinson) に採取した早朝喀痰 1 ml を新しい同種遠心管に移し、変法 N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) 法<sup>7)</sup> で前処理した。すなわち、NALC-NaOH 法の原法では消化不十分な喀痰も少なくなく、小川培地の汚染率が高いため、私たちは NALC 含量を 1% (原法は 0.5%) とした NALC-NaOH 液を喀痰の 2 倍量 (原法は等量) 加える方法を用いたが、それでもなお喀痰の消化が不十分な場合には 3–4 倍量加えた場合もあった。そして、Vortex ミキサーで 20 秒間攪拌し、遠心管を逆にして管内を NALC-NaOH に曝した後 15 分間室温に放置した。次いで、滅菌 M/15 リン酸緩衝液 (pH6.8) を遠心管の 50 ml のマークのところまで加えて攪拌し、3,000 rpm, 15 分遠心後、沈渣を 1 ml の同種緩衝液に浮遊し、その 0.5 ml を MGIT へ、また 0.1 ml を 1% 小川培地へ接種し培養した。また、一部の検体については塗抹染色標本作製し、鏡検に供した。

3. MGIT<sup>®</sup> : 日本 Becton Dickinson 社の好意により提供を受けた BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup> Mycobacteria Growth Indicator Tube に BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup> OADC 0.5 ml と BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup> PANTA<sup>™</sup> の水溶液 (凍結乾燥粉末バイアルに蒸留水 3 ml を添加) 0.1 ml を加えたものを完全培地として用いた。

4. 判定法 : 上記処理喀痰を接種した小川培地、MGIT とも 8 週間にわたって毎日観察した。小川培地では肉眼的に観察可能な集落の出現をもって発育陽性とした。

一方、MGITではテスト試験管をUVランプ（波長365 nm）上に立てて観察すると、菌発育陰性では蛍光はほとんど、あるいは全く検出されないが、菌発育陽性の場合には管底に明るいオレンジ色とその培地メニクスへの反射が観察される。菌発育陽性の場合には必ず抗酸菌染色をして抗酸菌であることを確かめると同時に菌の形態、コード形成の有無をも観察した。

5. 同定法：MGITまたは小川培地発育菌について *Mycobacterium tuberculosis* complex および *Mycobacterium avium* complex の各 AccuProbe によるこれら菌群の同定を行い、これらのいずれとの反応も見られなかった場合には、さらに DDH 法<sup>5)</sup> を行って菌種の同定を行った。なお、発育菌の染色所見も同定の参考とした。

## 結 果

### 1. MGIT および小川培地による抗酸菌の分離成績

Table 1 に示すように、供試 245 検体中抗酸菌分離陽性例は MGIT では 59 検体 (24.1%) であったのに対して小川培地では 48 検体 (19.6%) であり、MGIT において小川培地におけるよりも 11 検体 (4.5%) 多く分離された。今これを菌種別にみると、*M. tuberculosis* complex (MTC) では MGIT で 43 株、小川培地で 39 株、また *M. avium* complex (MAC) は MGIT で 12 株、小川培地で 6 株であり、その他の菌種として *M. kansasii* 2 株、*M. chelonae* subsp. *abscessus* 1 株が両種培地で分離された他、rapid grower の 1 菌種が MGIT でのみ分離された。

今、上述した MTC および MAC の MGIT 陽性・小川培地陰性であった菌株が分離された喀痰の塗抹検査成績および発育所要日数 (Table 2) についてみると、MTC では 4 例中 1 例のみが塗抹陽性 (Gaffky 1 号) であり、MGIT での発育所要日数は 29-42 日 (平均 35 日)、また MAC では全例が塗抹陰性であり、発育所要

**Table 1** Isolation of Mycobacteria from 245 Clinical Samples by MGIT and Ogawa Egg Medium

Medium	Number of positive cultures					Total
	<i>M. tuberculosis</i> complex	<i>M. avium</i> complex	<i>M. kansasii</i>	<i>M. chelonae</i> ( <i>abscessus</i> )	<i>M. sp.</i> *	
MGIT	43	12	2	1	1	59
Ogawa	39	6	2	1	0	48

\* Scotochromogenic rapidly growing mycobacteria.

**Table 2** Specimens of Positive MGIT and Negative Ogawa Egg Medium

Specimen No.	Smear (Gaffky)	Day MGIT positive	Identification
130	0	29	<i>M. tuberculosis</i> complex
165	1	36	<i>M. tuberculosis</i> complex
201	0	34	<i>M. tuberculosis</i> complex
218	0	42	<i>M. tuberculosis</i> complex
32	0	22	<i>M. avium</i> complex
39	0	16	<i>M. avium</i> complex
107	0	17	<i>M. avium</i> complex
121	0	13	<i>M. avium</i> complex
123	0	17	<i>M. avium</i> complex
178	0	15	<i>M. avium</i> complex
193	0	13	<i>M. sp.</i> *

\* Scotochromogenic rapidly growing mycobacteria.

**Table 3** Ability of MGIT and Ogawa Egg Medium to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Clinical Specimens

Specimen No.	Day MGIT positive (A)	Day Ogawa positive (B)	(B-A)
16	9	16	7
35	20	29	9
36	18	21	3
48	11	14	3
53	22	26	4
54	26	31	5
58	3	11	8
69	13	20	7
77	20	28	8
82	15	18	3
85	14	18	4
86	4	10	6
87	14	18	4
122	19	26	7
147	16	21	5
168	17	25	8
169	10	17	7
176	18	29	11
187	2	19	17
189	4	8	4
190	2	11	9
200	19	25	6
206	11	13	2
209	11	11	0
213	13	16	3
215	16	21	5
219	10	13	3
226	15	22	7
230	7	12	5
232	17	19	2
237	7	15	8
238	2	8	6
240	24	25	1
245	7	15	8
248	10	15	5
267	13	17	4
269	13	23	10
270	7	15	8
271	13	23	10
Average	13	19	6

日数は13-22日(平均17日)であった。なお、未同定の1菌株は塗抹陰性であり、MGITでの発育所要日数

は13日(小川培地継代で3日)であった。

2. 分離菌のMGIT並びに小川培地における集落初

**Table 4** Ability of MGIT and Ogawa Egg Medium to Detect *Mycobacterium avium* Complex

Specimen No.	Day MGIT positive (A)	Day Ogawa positive (B)	(B-A)
11	4	17	13
17	4	19	15
51	6	13	7
90	8	18	10
135	2	6	4
204	6	22	16
Average	5	16	11

**Table 5** Ability of MGIT and Ogawa Egg Medium to Detect Mycobacteria Other Than *Mycobacterium tuberculosis* Complex and *Mycobacterium avium* Complex

Specimen No.	Day MGIT positive (A)	Day Ogawa positive (B)	(B-A)	Identification
27	6	10	4	<i>M. kansasii</i>
202	14	19	5	<i>M. kansasii</i>
181	3	6	3	<i>M. chelonae</i> ( <i>abscessus</i> )

## 発所要日数

## 1) MTC

Table 3 に示すように、供試 245 検体中 MTC と同定された計 39 株の集落初発所要日数は MGIT では 2-26 日 (平均 13 日) であったのに対して小川培地では 8-31 日 (平均 19 日) であった。したがって、MGIT において小川培地におけるよりも平均 6 日間早く検出されたことになる。

## 2) MAC

Table 4 に示すように、MAC と同定された計 6 菌株の集落初発所要日数は MGIT では 2-8 日 (平均 5 日)、小川培地では 6-22 日 (平均 16 日) であった。したがって、MGIT において小川培地におけるよりも平均 11 日間も早く検出されたことになる。

## 3) その他の菌種

Table 5 に示すように、*M. kansasii* および *M. chelonae* subsp. *abscessus* の MGIT 並びに小川培地における集落初発所要日数は *M. kansasii* では 2 株中 1 株は各 6 日および 10 日、他の 1 株は各 14 日および 19 日であり、また、*M. chelonae* subsp. *abscessus* では各 3 日および 6 日であった。したがって、これらの

いずれの菌株においても MGIT において小川培地におけるよりも 3-5 日間早く検出されたことになる。

## 3. 培地汚染率

供試 245 検体において MGIT では 6 例 (2.4%)、1% 小川培地では 8 例 (3.3%) であった。

## 考 察

先に私たち<sup>9)10)</sup>は Middlebrook 7H-12 培地に <sup>14</sup>C パルミチン酸、PANTA (選択複合抗菌剤) 並びに POES (発育促進物質) を添加した BACTEC 12B 培地に前処理検体を接種、培養し、結核菌 (抗酸菌) の増殖に伴って培地中に遊離する <sup>14</sup>C<sub>2</sub> を BACTEC 機器で測定することにより、菌増殖の有無を知ろうとする抗酸菌の迅速培養法である BACTEC 460 TB System について報告した。それによれば本法は菌の検出率並びに検出所要日数において小川法よりも遥かに優ったが、放射性同位元素 (<sup>14</sup>C) を含んだ培地を用いるために処理上にさまざまな制約があり、その導入が困難であったために、断念せざるをえなかった。

最近、上記 BACTEC に代わる放射性物質非含有液体培地による抗酸菌の迅速検出法 (MGIT) が開発され

た。本法は培地中の溶存酸素に感受性である蛍光化合物 (Tris 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ruthenium chloride pentahydrate) が試験管底上のシリコン中に埋められており、培地中に溶存する大量の酸素によって化合物からの蛍光は抑制、あるいはほとんど検出されないが、活発に呼吸している抗酸菌による酸素消費が行われると 365 nm 紫外線イルミネーターあるいは長波長紫外線 (Wood ランプ) で蛍光が観察される。

今回、われわれは変法 NALC-NaOH 法で前処理した喀痰を MGIT 並びに小川培地に接種し、抗酸菌の検出率並びに発育所要日数について兩種培地の優劣を比較検討した。その結果、供試喀痰 245 検体から MGIT では 59 例 (24.5%)、小川培地では 48 例 (19.6%) に抗酸菌が検出され、MGIT において小川培地におけるよりも 11 例 (4.5%) 多くの抗酸菌が検出された。

今、これを菌種別にみると、結核菌では MGIT (43 株) > 小川培地 (39 株)、MAC では MGIT (12 株) > 小川培地 (6 株)、また未同定菌が MGIT では 1 株分離された他、兩培地で *M. kansasii* 各 2 株、*M. chelonae* subsp. *abscessus* 各 1 株が分離された。

したがって、結核菌では MGIT 陽性・小川陰性菌が 4 株みられたことになるが、それらの発育所要日数は平均 35 日 (29-42 日) で兩種培地上発育菌 39 株の平均 13 日 (2-26 日) の 2.7 倍の日数を要した。他方、MAC では MGIT 陽性・小川陰性菌が 6 株みられたが、それらの発育所要日数は平均 17 日 (13-22 日) で兩種培地上発育菌の平均 5 日 (2-6 日) の 3.4 倍の日数を要した。

Kodsi ら<sup>11)</sup> によれば、NALC-NaOH 法で処理した 138 例の臨床検体について MGIT と BACTEC による抗酸菌の培養成績を比較したところ、菌検出率の点では、両者間に有意差はみられなかったが、菌検出所要日数は塗抹陽性検体では BACTEC で 2-16 日 (平均 7 日)、MGIT で 5-22 日 (平均 9.5 日)、また塗抹陰性検体ではそれぞれ 9-22 日 (平均 13.9 日) および 10-51 日 (平均 20.5 日) で BACTEC > MGIT であったという。これに対して、Neumann ら<sup>12)</sup> は NALC-NaOH 処理臨床検体 500 例のうち MGIT および BACTEC のいずれかあるいは両者で 56 例 (11%) に抗酸菌陽性例がみられたが、うち MGIT のみ陽性 12 例 (21%)、BACTEC のみ陽性 9 例 (16%) で MGIT が BACTEC よりも優れたが、菌検出所要日数では両者間に有意な差はなく、MGIT では 2-64 日 (平均 13 日)、BACTEC では 2-40 日 (平均 12 日) であったという。

他方、Costa ら<sup>13)</sup> は NALC-NaOH 処理した臨床検体について、MGIT、セプティチェック AFB、BACTEC 並びに Löwenstein-Jensen 培地の抗酸菌検出

所要日数を比較検討したところ、BACTEC (12.2 日)、MGIT (12.8 日)、セプティチェック AFB (18.7 日)、Löwenstein-Jensen 培地 (27.3 日) の順であったという。

以上、MGIT は非放射性で、菌の発育によって蛍光物質より生ずる蛍光を特殊な機器を用いることなく検出する抗酸菌の迅速診断法といえよう。

なお、今回のわれわれの検討では喀痰の塗抹検査は一部の検体についてのみ行ったため、塗抹検査成績と MGIT あるいは小川培地での培養成績との比較検討には言及しえなかった。現在、塗抹、核酸増幅、培養 (MGIT、小川培地) の諸検査についての詳細な検討を行っており、これについては追って報告する予定である。

## 結 語

BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup> 並びに小川培地の NALC-NaOH 処理喀痰 245 例についての抗酸菌培養成績を比較検討し、概略以下のような知見を得た。

1. 培養陽性検体は MGIT で 59 例 (*M. tuberculosis* complex, 43 ; *M. avium* complex, 12 ; *M. kansasii*, 2 ; *Mz chelonae* subsp. *abscessus*, 1 ; *Mycobacterium* sp. 1) であったのに対して小川培地では 48 例 (*M. tuberculosis* complex, 39 ; *M. avium* complex, 6 ; *M. kansasii*, 2 ; *M. chelonae* subsp. *abscessus*, 1) であった。

2. 菌検出所要日数は *M. tuberculosis* complex では MGIT で 2-26 日 (平均 13 日)、小川培地で 8-31 日 (平均 19 日)、また *M. avium* complex ではそれぞれ 2-8 日 (平均 5 日) および 6-22 日 (平均 16 日) であった。これに対して、MGIT 陽性・小川陰性の *M. tuberculosis* complex では 29-42 日 (平均 35 日)、*M. avium* complex では 13-22 日 (平均 17 日) であった。

3. 上述の成績より MGIT は小川培地よりも臨床検体中の結核菌 (抗酸菌) の検出率並びに検出所要日数において優れ、かつ成績判定も特殊な機器を必要とせず容易であるなどの諸点より一般臨床検査室でも用いる抗酸菌の迅速検出法となるであろう。

稿を終わるに臨み MGIT を分与頂いた日本 Becton Dickinson 社に深謝します。

## 文 献

- 1) MTD マニュアル：結核菌群直接検出用、DNA プローブ「中外」MTD. 中外製薬、東京、1994.
- 2) Amplicor マニュアル：アンプリコア<sup>™</sup> マイコバクテリウム ツベルクローシス (結核菌群検出用)、

- アビウム (*Mycobacterium avium* 検出用), イ  
 ントラセルラー (*Mycobacterium intracellulare*  
 検出用). 日本ロシュ, 東京, 1994.
- 3) セプテイチェックマニュアル: セプテイチェック  
 AFB, 抗酸菌用培養システム. 日本ベクトン・デ  
 イッキンソン, 東京, 1993.
  - 4) AccuProbe マニュアル: *Mycobacterium*  
*avium* complex Culture Confirmation Test  
 ; *Mycobacterium tuberculosis* Complex Cul-  
 ture Confirmation Test. Gen-Probe, San  
 Diego, U.S.A., 1993.
  - 5) DDH マイコバクテリアマニュアル: DDH マイコ  
 バクテア '小林', 極東製薬, 1992.
  - 6) Siddiqi SH: BACTEC TB System. Product  
 and Procedure Manual, Becton Dickinson  
 Diagnostic Instrument Systems, Towson, U.  
 S.A., 1988.
  - 7) Kent PT, Kubica GP: Public Health Myco-  
 bacteriology. A Guide for the Level III  
 Laboratory. U.S. Department of Health and  
 Human Services, Public Health Service,  
 Centers for Disease Control, Atlanta, U.S.A.  
 1985, 31-55.
  - 8) MGIT マニュアル: BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup> Products  
 for the Detection of Mycobacteria. BBL<sup>®</sup>  
 MGIT<sup>™</sup> Mycobacteria Growth Indicator  
 Tube, BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup> OADC, BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup>  
 PANTA<sup>™</sup>, Becton Dickinson, Cockeysville,  
 U.S.A., 1994.
  - 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. 1992; 67: 89-95.
  - 10) 斎藤 肇: 結核菌 (抗酸菌) の迅速診断法. 公衆衛  
 生. 1993; 57: 162-166.
  - 11) Kodsi SE, Hagemann PA, Douglass JD, et  
 al.: Comparison of the BBL MGIT Myco-  
 bacteria Growth Indicator Tube with the  
 BACTEC TB System using clinical speci-  
 mens. 34th Interscience Conference on Anti-  
 microbial Agents and Chemotherapy,  
 Orlando, U.S.A., 1994.
  - 12) Neumann MA, Rogers J, Williams R, et al.  
 : Comparison of the new Mycobacterial  
 Growth Indicator Tube (MGIT) with the  
 BACTEC 460 TB for the rapid detection of  
 mycobacteria from clinical specimens. 95th  
 General Meeting of the American Society of  
 Microbiology, Washington, D. C., U.S.A.,  
 1995.
  - 13) Costa D, Mandler F, Passerini Tosi C, et al.  
 : Evaluation of Mycobacterial Growth Indi-  
 cator Tube (MGIT), A new rapid non-radi-  
 metric method in mycobacteria diagnosis.  
 16th Annual Meeting, European Society for  
 Mycobacteriology, Pisa, Italy, 1995.