

原 著

Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)  
 による結核菌の迅速薬剤感受性検査

鈴木克洋・露口一成・松本久子  
 新実彰男・田中栄作・村山尚子  
 網谷良一・久世文幸

京都大学胸部疾患研究所感染・炎症学、呼吸器感染症科

受付 平成8年12月16日

受理 平成9年1月31日

EVALUATION OF MYCOBACTERIA GROWTH INDICATOR TUBE (MGIT) FOR  
 DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLATES

Katsuhiro SUZUKI\*, Kazunari TSUYUGUCHI, Hisako MATSUMOTO,  
 Akio NIIMI, Eisaku TANAKA, Takako MURAYAMA,  
 Ryoichi AMITANI and Fumiyuki KUZE

(Received 16 December 1996/Accepted 31 January 1997)

Fifty six clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were tested for drug susceptibility in Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) containing 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of INH, 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of RFP, 3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of EB and 0.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SM. These results were compared with those obtained by testing the same *M. tuberculosis* isolates by the absolute concentration method using 1% Ogawa egg slant containing 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of INH, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of REP, 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of EB and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SM. Fifty six isolates consisted of 18 pansensitive strains, 27 multidrug resistant strains and 11 single drug resistant strains. The results for individual drugs showed excellent agreement between the MGIT and the Ogawa methods, and overall agreement rate of the two methods were 96.4%. The results were just the same for all drugs in 48 out of 56 strains studied. The drug resistance could be observed much earlier by the MGIT method (mean 5.9 days) than by the Ogawa method (more than 21 days). In conclusion, the MGIT system could be a promising new drug susceptibility test which might become available in Japan replacing the Ogawa method.

**Key words** : *Mycobacterium tuberculosis*,  
 Drug susceptibility test, MGIT, Absolute  
 concentration method

キーワード : 結核菌, 薬剤感受性試験, MGIT,  
 固定濃度法

\* From the Department of Infection and inflammation, Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.

## はじめに

結核症が治癒可能な病気になったのは強力な抗結核薬剤が開発されたためであり、薬剤耐性菌の出現はこの状況を大きく脅かすものである。特にイソニアジド (INH) とリファンピシン (RFP) 両薬剤に耐性を示す多剤耐性結核症の治療は現在でも難渋を極める。わが国における耐性菌の出現頻度を調べた1996年の Hirano らの報告では、INH・RFP・エタンブトール (EB)・ストレプトマイシン (SM) の主要4薬剤のいずれかに耐性を示した菌の割合は、初回治療例で5.5%、既治療例で25%であった<sup>1)</sup>。米国 Center for Disease Control and Prevention (CDC) は初回耐性率が5%を超える地域では全結核症例に薬剤感受性検査を実施すべきであると勧告している。

このように、結核症治療において薬剤感受性を知ることは極めて重要であるが、現在本邦で多用されている小川培地を用いる方法では結果判明まで3週間以上かかるため、進展の急速な例えば HIV 陽性症例等には対応できない。欧米で従来より汎用されている BACTEC460 システムを用いるとより迅速な結核菌の検出と薬剤感受性検査が実施可能であるが、放射性同位元素を用いるため使用後の廃棄物の処理の問題もあり、わが国で普及することは困難と考えられる。

最近米国ベクトン・ディッキンソン社で開発された BBL<sup>®</sup> Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) は非放射性液体培地を用いながら、従来の卵培地と比べ抗酸菌の検出感度・検出所用日数ともに優れ、結果の判定も簡便・明解であると内外で報告されている<sup>2)~5)</sup>。またこのシステムを用い迅速な結核菌の薬剤感受性検査も実施可能と言われている<sup>6)</sup>。そこでわれわれは MGIT を用い臨床分離結核菌株の上記主要4薬剤に対する感受性検査を実施し、雑菌による汚染の頻度と結果判定までの日数を調べるとともに、従来の1%小川培地を用いた方法の結果と比較検討したので以下報告する。

## 実験材料と方法

### 1. 菌株

京都大学胸部疾患研究所付属病院呼吸器感染症科並びに関連病院で最近4年以内に56人の肺結核症患者検体から小川培地または工藤 PD 培地で分離された56結核菌株を用いた。全剤感受性の株はナイアシンテスト陽性であれば結核菌と判定し、1薬剤でも耐性を示した株は DNA プローブ法 (アキュプローブ) を実施し、結核菌との同定並びに *Mycobacterium avium* complex 混入の除外を行った。

### 2. 小川培地による薬剤感受性検査

厚生省監修結核検査指針に準じ、各薬剤含有1%小川培地上のコロニー数を薬剤を含まない対照の培地と比較することで判定した。

薬剤濃度は以下のとおりである。INH: 0.1, 1, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , RFP: 10, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , EB: 2.5, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SM: 20, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (下線は臨床耐性基準濃度)。今回の比較検討では不完全耐性も耐性と判定した。

### 3. MGIT による抗酸菌の培養

日本ベクトン・ディッキンソン社 (B・D 社) より提供を受けた MGIT に BBL<sup>®</sup> MGIT OADC 0.5ml を加えたものを完全培地として用いた。MGIT は、酸素に鋭敏なルテニウム金属複合体を含むシリコンを底部に埋め込んだ丸底試験管中に、Middlebrook 7H9 液体培地が4ml分注されているもので、発育促進物質を含む OADC の共存下で結核菌が旺盛に増殖し溶存酸素が消費され、底部の金属複合体が蛍光を発するようになることで結核菌の増殖を感知するシステムである。上記卵培地上の1-2コロニーを MGIT 完全培地中に混入し、37℃で培養、経時的に波長365nmのトランスイルミネーターを用い、蛍光の有無を菌を含まない MGIT を陰性対照として判定した。菌が発育すると、試験管の底に明るいオレンジ色の蛍光と、その培地メニスカスへの反射が明確に観察される。

### 4. MGIT による薬剤感受性検査

上記 MGIT で菌の増殖が確認されてから7日以内に薬剤感受性試験を実施した。菌の増殖が確認された MGIT をよく攪拌後、菌を含む液体培地を1.0ml 採取し、滅菌生理食塩水4.0ml 中に混入し、5倍希釈菌液を作製した。OADC を含む新しい MGIT 5本に上記5倍希釈菌液を0.5mlずつ混入し、4本には所定濃度の各薬剤を加え、残りの1本はコントロールとしてそのままの状態ですべて37℃で培養した。

MGIT 用の各薬剤は、凍結乾燥した状態で4℃で保存し、使用時滅菌蒸留水4ml で溶解し (INH: 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , RFP: 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , EB: 175  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SM: 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、各0.1ml を液体培地中に混入した。蒸留水溶解後の薬剤は-70℃で保存し、必要時溶解し一度のみ使用可能とした。

各薬剤の MGIT 中の最終濃度は次のとおりである。INH: 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , RFP: 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , EB: 3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SM: 0.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。感受性試験の結果判定は B・D 社のマニュアルに従い、以下のとおり行った。つまり薬剤を含まないコントロールのチューブが蛍光を発してから2日以内に薬剤含有チューブが蛍光を発した場合当該薬剤に耐性と判定し、2日以内に蛍光を発しなかった場合は当該薬剤に感受性と判定した。

### 5. 雑菌混入の有無の確認

MGITに希釈菌液を混入時、BBL<sup>®</sup>トリプチケース血液寒天培地上に同菌液0.1mlを同時に接種し37℃で5日間培養することで雑菌の有無を判定した。雑菌混入が認められた場合は、MGITによる薬剤感受性検査を再施行した。

6. 小川法とMGIT法の比較

各菌株、各薬剤に関して感受性、耐性の結果が2つの方法で一致するかどうかを判定した。小川法では基本的に最低薬剤濃度 (INH: 0.1μg/ml, RFP: 10μg/ml, EB: 2.5μg/ml, SM: 20μg/ml) での結果を用い、不完全耐性も耐性と判断した。1薬剤でも不一致がある場合には両者の方法を再検し、再度不一致の場合を最終的に不一致とした。

結 果

1. 雑菌の混入

56菌株に対して延べ73回のMGITによる薬剤感受性試験を実施したが、雑菌混入は3例(4.1%)であった。雑菌混入が判明した3例はすべて再検時には雑菌を認めずMGIT操作時の混入が疑われた。

2. MGITによる薬剤感受性検査結果判明までの日数

耐性菌38株の検査結果の判明までの期間は2-11日、平均5.2±2.0 (SEM) 日間、全剤感受性菌18株の結果判明までの期間は5-19日、平均7.2±3.2 (SEM) 日間であった。全56株では結果判明まで2-19日間、平均5.9±2.6 (SEM) 日間の日数を要した。

3. 初回検査時不一致株

初回検査時56株中14株で、両感受性検査結果の不一致がみられた。その内訳は、INH不一致2株、RFP不一致3株、EB不一致2株、SM不一致6株、INHとEB不一致1株である。この14株中13株は耐性菌で1株のみが全剤感受性菌であった。この14株に対して両感受性検査を再施行したところ、6株は両検査結果が一致し、残りの8株が最終的に不一致となった(後述)。再検し一致した株の内容は、MGITの結果が変化して一致したのが3株(RFP感受性から耐性へ2株、INH耐性から感受性へ1株)、小川法の結果が変化して一致したのが3株(SM感受性から耐性へ2株、INH感受性から耐性へかつEB耐性から感受性へ1株)であった。

4. 最終結果

各菌株の小川培地を用いた最終的な薬剤感受性パターンを表1に示す。以下、各薬剤ごとにMGIT法と小川法の比較結果を述べる。

1) INH: MGITで耐性であった35株中34株は小川法でも耐性、残り1株は小川法では感受性であった。MGITで感受性であった21株は、全例小川法でも感受性であった(表2)。小川法の結果をgold standardと

表1 菌株の小川培地による薬剤感受性パターン

感受性薬剤	株数
INH+RFP+EB+SM	18
INH+RFP+EB	3
INH+EB+SM	1
RFP+EB+SM	7
EB+SM	3
RFP	2
EB	1
SM	6
全剤耐性	15
総計	56

表2 小川法とMGIT法の比較 (INH)

	小川法	
	INH 0.1μg/ml 耐性株数	INH 0.1μg/ml 感受性株数
MGIT 0.1μg/ml INH 耐性株数	34	1*
INH 感受性株数	0	21

\* 過大評価例

表3 小川法とMGIT法の比較 (RFP)

	小川法	
	RFP 0.1μg/ml 耐性株数	RFP 0.1μg/ml 感受性株数
MGIT 0.1μg/ml RFP 耐性株数	25	0
RFP 感受性株数	1§	30

§ 過小評価例

して計算すると、いわゆる過大評価率(本当は感受性なのに耐性と判定する率)として1.8%、過小評価率(本当は耐性なのに感受性と判定する率)として0%ということである。一致率は98.2%となる。

2) RFP: MGITで耐性であった25株は、全例小川法でも耐性。MGITで感受性であった31株中30株は小川法でも感受性、残りの1株は小川法では耐性であった(表3)。小川法の結果をgold standardとすると、過大評価率が0%、過小評価率が1.8%ということである。一致率は98.2%となる。

3) EB: MGITで耐性であった21株は、全例小川法でも耐性。MGITで感受性であった35株中33株は小川

表4 小川法とMGIT法の比較(EB)

	小川法	
	EB 2.5 $\mu$ g/ml 耐性株数	EB 2.5 $\mu$ g/ml 感受性株数
MGIT 3.5 $\mu$ g/ml EB 耐性株数	21	0
EB 感受性株数	2 <sup>§</sup>	33

§ 過小評価例

表5 小川法とMGIT法の比較(SM)

	小川法	
	SM 20 $\mu$ g/ml 耐性株数	SM 20 $\mu$ g/ml 感受性株数
MGIT 0.8 $\mu$ g/ml SM 耐性株数	21	4*
SM 感受性株数	0	31

\* 過大評価例

表6 小川法での臨床耐性を gold standard とした時のMGIT法の結果のまとめ

薬剤	過大評価率	過小評価率	一致率
INH	17.9%	0%	82.1%
RFP	1.8%	1.8%	96.4%
EB	19.6%	1.8%	78.6%
SM	7.1%	0%	92.9%
総計	11.6%	0.9%	87.5%

法でも感受性、残りの2株は小川法では耐性であった(表4)。小川法の結果を gold standard とすると、過大評価率0%、過小評価率3.6%ということである。一致率は96.4%となる。

4) SM: MGITで耐性であった25株中21株は小川法でも耐性であったが、残りの4株は小川法では感受性であった。MGITで感受性であった31株は、全例小川法でも感受性であった(表5)。小川法の結果を gold standard とすると、過大評価率7.1%、過小評価率0%ということである。一致率は92.9%である。

5) 全薬剤のまとめ: 小川法を gold standard とした場合、MGITによる薬剤感受性試験全体では、過大評価率2.2%、過小評価率1.3%となる。4薬剤全体の一致率は96.4%であり、全56株中48株でMGITの結果は、小川法での結果と全薬剤で一致した。残りの8株では各々

1薬剤不一致例で、その内訳はINH 1株・RFP 1株・EB 2株・SM 4株であった。不一致株は全例耐性菌株で、全剤感受性菌に関しては不一致例は1株もなかった。

#### 5. 小川法臨床耐性薬剤濃度での比較

今回の比較では小川法として各薬剤最低濃度の結果を用いて検討した。しかし従来本邦では各薬剤毎に臨床耐性基準濃度を設定し、その濃度で耐性の場合臨床的に薬剤が無効であろうと判定するのが普通である。そこで小川法として臨床耐性基準濃度での結果を用い、再度MGIT法との比較を行った。その結果、小川法最低濃度では各々の薬剤に耐性と判定されたINH 10株、RFP 1株、EB 11株が、臨床的には感受性菌と判断された。SMに関しては、臨床耐性薬剤濃度がもともと最低濃度であるため結果に変化はない。この数値を基に計算すると、表6のような過大評価率・過小評価率・一致率となる。感受性菌18株に関しては、臨床耐性薬剤濃度でも当然感受性であり、全薬剤で両者の結果が完全に一致することには変わりはない。

## 考 察

戦後順調に低下してきたわが国の結核罹患率と死亡率は、近年減少率が鈍化し、また塗抹陽性例の微増または横這い状態が指摘されている<sup>7)</sup>。医療従事者を含む国民全体に結核を過去の病気と考える風潮が根強く、それが発見の遅れ・病状の重篤化を生んでいると推測される。たとえ結核症と診断した場合でも、菌の薬剤感受性検査を怠り、または結果の解釈があいまいなまま、漫然と治療を継続するうちに耐性薬剤を増加させてしまう事例を散見する。米国では、HIV陽性患者を中心とした多剤耐性結核症の集団発生が深刻な社会問題となった。これらの事例では、死亡率が72-89%、発症から死亡までの期間の中央値が4-16週間という驚くべき数字が発表されている<sup>8)</sup>。

さらに、報告された全170症例中に6-9%の医療従事者を含むHIV陰性者がいた点が、多剤耐性結核菌は感染力が弱いと漠然と理解されてきた従来の見解にも一石を投ずる結果となった。結核症が治癒可能な病気になったのはあくまでも有効な薬剤が開発されたためであり、多剤耐性菌の出現は大いなる脅威であることを肝に銘じる必要がある。

従来、本邦における結核菌の薬剤感受性検査は、中試験管内の1%小川斜面培地を用いた固定濃度法が主流であった。1薬剤に対して2-3濃度を設定しているが、卵による吸着、加熱凝固時や保存時の薬剤力価の低下を見越して、MICや国際的に標準的な固形培地を用いる比率法と比べて、概して高めの濃度設定となっている。判定は薬剤を含まないコントロールの培地の集落数と比較

し、75%以上の集落数があった場合を完全耐性、75%未満5コロニー以上の集落数があった場合を不完全耐性、4コロニー以下の集落数の場合を感受性としている。

各薬剤に対して臨床耐性基準濃度が設定されており (INH 1.0 RFP 50, EB 5, SM 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、この濃度で耐性の場合には臨床的には効果がまずないと判断されている。臨床耐性薬剤濃度以下での耐性の場合も、耐性菌で他に薬剤がない場合には臨床的に使用している現状であるが薬剤効果は劣り、ことにINH 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とEB 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で完全耐性の場合には、臨床的にはほとんど効果が期待できないともいわれている。

このいわゆる小川普通法は長い経験の中で臨床経過とよく相関することが知られているが、近年、以下に示したような問題点が指摘されている。

1) 各薬剤に複数濃度を設定しているため検査室の仕事量とスペースを必要以上に消費する。2) 複数濃度の設定並びに完全・不完全耐性があり慣れない人間には解釈が難しい。3) 結果判定までに培養で結核菌が検出されてから3週間から4週間かかるため進展の急速な症例に対応できない。4) 国際的に一般に用いられている卵培地の濃度設定と異なっているため、諸外国とデータの比較を行う際に不便である。

1) の手間とスペースの問題を解決するためマイクロタイター法等の簡便法が急速に普及しているが、精度管理や判定の難しさから、感受性菌を耐性と判定する過大評価率が22.7%になることが昨年度の結核療法研究協議会の調査でも報告されている<sup>9)</sup>。またこの方法でも他の問題点の解決にはならない。

今回のわれわれの研究結果から、MGIT法は現在の小川法が持っている問題点を解決する有力候補であると考えられる。1 薬剤1濃度で試験管も小さめであり、特にMGITで検出した菌の感受性を行う場合はすべて液体ベースで行えるため、手技的にも比較的簡単である。また結果の判定は明確であり、解釈も用意である。結核菌の検出から結果の判明まで平均約6日間であり、約28日間要していた小川法と比べかなりの時間の短縮が可能である。特に検出にもMGITを用いた場合、小川培地による検出と比べ齋藤ら<sup>3)</sup>は平均6日、阿部ら<sup>2)</sup>は平均5日早く結核菌が検出されたと報告しており、小川法では集落数が少数の場合さらに増菌に時間を要することも考えると、4週間から7週間早く感受性結果が判明すると考えられる。結果判明が早いことは、検査室のスペースの問題の解決にもなるものと思われる。

より迅速に薬剤感受性結果が分かることは臨床に極めて有益なことである。Waltersらは臨床分離結核菌のINHとRFPに対する薬剤感受性をMGIT法と7H10寒天培地に比率法を用いるCDC法で検討し、117株中

114株で結果が一致したと報告している<sup>6)</sup>。またPalaciらは臨床分離結核菌のINH・RFP・EB・SM・Ofloxacinに対する薬剤感受性をMGIT法とLoewenstein-Jensen培地を用いる比率法で比較検討し、25株すべてで両者の結果が一致したと報告している<sup>5)</sup>。この2つの報告のMGITによる薬剤感受性検査は、われわれが今回用いた方法と全く同じであり、MGIT法の結果が国際的に標準的な固形培地を用いる方法の結果とよく一致することを示している。

今回のわれわれの検討でも、小川法として各薬剤最低濃度の結果を用いた場合、MGIT法の結果との一致率は96.4%と極めて良好であった。しかし小川法として現在通常用いられている臨床耐性濃度での結果を用いると、RFPは一致率が96.4%と良好のままであるが、INHとEBの過大評価率が各々17.9%、19.6%となり、一致率も各々82.1%、78.6%に低下してしまう。SMは基準濃度と最低濃度が一致しており、結果に変化はない。

INHの過大評価株10株のうち8株は0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の完全耐性株であり、先述したように臨床的にはほとんど薬剤効果が期待できないと考えられる。仮にこれらの株も臨床耐性として計算し直すとINHの過大評価率は3.6%、過小評価率は0%、一致率は96.4%に向上する。一方、EBの過大評価株11株中やはり臨床的に効果が期待できないと考えられている2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の完全耐性株は1株のみで、仮にこの株も臨床耐性株として計算し直しても一致率は80.3%である。先に述べたとおりMGIT法の結果は固形培地に比率法を用いる国際的に標準的な方法とはよく一致すると報告されており、本邦で小川培地に用いている薬剤濃度が国際的に標準的な方法と比べ概して高めに設定されていることをあわせて考えると、むしろ従来の臨床耐性基準では、INH・EBに関して過小評価 (本当は耐性なのに感受性と判定) している例が多いとも解釈できる。今後臨床経過との詳細な照合を行うとともに、国際的なharmonizationも考慮し、かつわが国の医療状況にもマッチした薬剤感受性試験と薬剤濃度を設定していく必要があると思われる。

MGITの問題点として、小川培地と比べて雑菌混入に弱い点が考えられる。今回の研究では、雑菌の混入は延べ73例中3例と少数であったが、一般の検査室で多数の検体を扱う場合、雑菌混入の頻度が高まるのが危惧される。雑菌汚染のないように清潔操作に注意を払うとともに、精密管理に十分留意する必要があるだろう。

## 謝 辞

抗酸菌の保存と薬剤耐性検査に尽力されている本間トキエ技官に感謝いたします。文献等でお世話になった秘書の片岡和美さん、上田友子さんに感謝します。菌株を

提供していただいた国立療養所東京都病院佐藤敦夫先生、倉澤卓也先生、国立療養所千石荘病院中田益美先生、加藤元一先生、西神戸医療センター藤山理世先生に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Hirano K, Kazumi C, Abe T, et al.: Resistance to antituberculosis drugs in Japan. *Tubercle Lung Dis.* 1996; 77: 130-135.
- 2) 阿部千代治: 酸素反応性蛍光センサーを用いた新しい抗酸菌迅速培養システムの検討 *感染症学雑誌.* 1996; 70: 360-365.
- 3) 斎藤 肇, 柏原嘉子, 佐藤紘二, 他: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による抗酸菌の迅速検出法. *結核.* 1996; 71: 399-405.
- 4) Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S, et al.: Comparison of Mycobacteria Growth Indicator Tube with BACTEC 460 for detection and recovery of Mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 2236-2239.
- 5) Palaci M, Ueki SYM, Sato DN et al.: Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 762-764.
- 6) Walters SB and Hanna BA: Testing of susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampin by Mycobacteria Growth Indicator Tube method. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1565-1567.
- 7) 「結核の統計1995」, 厚生省保健医療局エイズ結核感染症科監修, 財団法人結核予防会, 東京, 1995.
- 8) US Department of Health and Human Service/Public Health Service: Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons. *Florida and New York 1989-1991, Morbidity and Mortality Weekly Report.* 1991. 40: 585-591.
- 9) 鹿住祐子, 平野和重, 阿部千代治, 他: 入院時薬剤耐性に関する研究: 1992年度の各施設の成績と結研判定の比較. *結核.* 1996; 71: 29-38.