

総 説

結 核 菌 培 地

斎 藤 肇

広島県環境保健協会

LABORATORY MEDIA FOR THE CULTIVATION OF
TUBERCLE BACILLUS

Hajime SAITO*

A variety of different media for the cultivation of mycobacteria have been described but a few of them are in use today. Those currently used can be characterized by three basic types. The first is egg-based media represented by Ogawa and Löwenstein-Jensen. The second type is agar-based media; the most common one are Middlebrook 7H10 and 7H11. The third type is liquid media such as Middlebrook 7H9.

Several weeks of incubation may be required for the isolation of *M. tuberculosis* on solid media. Substantial improvement in the time to detection and the recovery rate was realized by using broth-based culture system such as the BACTEC 460TB, Septi-Chek AFB, MGIT and BACTEC 9000.

In the BACTEC 460TB system, the mycobacteria is detected radiometrically. The processed specimen is added to a modified 7H9 medium (BACTEC 12B) containing ^{14}C -labeled palmitic acid and an antibiotic complex, PANTA. Mycobacterial growth can be ascertained by the liberation of $^{14}\text{CO}_2$ and detected by BACTEC 460TB instrument.

The Septi-Chek AFB is a biphasic medium which combines broth and solid media. The liquid medium is a modified Middlebrook 7H9 in a carbon-dioxide-enriched culture bottle. After inoculation of the sample, the bottle is capped with a slide consisting of three solid media; a non-selective Middlebrook 7H11 agar, an egg-based medium, and chocolate agar.

A novel system is the MGIT, which is a nonradiometric broth method for the detection of mycobacteria from clinical specimens. The MGIT consists of a modified Middlebrook 7H9 broth and a sensor embedded in silicone on the bottom of a tube. The appearance of orange-colored fluorescence in the sensor when excited indicates the growth of mycobacteria.

MB Redox is a modified, serum-supplemented Kirchner medium containing *p*-indonitrotetrazolium violet (INT) as an indicator of microbial growth. The INT is reduced by the redox system of the mycobacteria to deep violet-colored formazan. This substance is water insoluble and is reduced to the cell surface, by which bacterial clumps can be easily detected by their violet color.

At present, the egg-based media are the first choice for the culture of clinical samples. However, there are advantages to each type of medium and not all strains of mycobacteria

別刷り請求先:

斎藤 肇

広島県環境保健協会

〒730-8631 広島市中区広瀬北町9-1

* From the Hiroshima Environment and Health Association, 9-1 Hirosekita-machi, Naka-ku, Hiroshima 730-8631 Japan.

(Received 26 Jan. 1998)

can be recovered on a single medium. Therefore, it is recommended that one representative of each type of medium be used for primary isolation; one example in Japan may be Ogawa egg medium in combination with Middlebrook 7H11 and MGIT.

Key words : Culture media, Rapid diagnosis, MGIT, BACTEC 460 system, MB Redox

キーワード : 培地, 迅速診断法, MGIT, BACTEC 460 システム, MB Redox

はじめに

第二次世界大戦後、順調に減少し続けてきた先進国の結核は1980年代後半以降、減少の鈍化あるいは国によっては増加の傾向がみられるようになり、再興感染症の一つとして学界の関心をひくに至っている¹⁾。さらに米国(ニューヨーク、ニュージャージー、フロリダ)において主として HIV 陽性者における多剤耐性結核の集団発生の報告²⁾もあり、憂慮すべき事態もみられた。

結核症の確定診断は、原因菌を分離し、鑑別・同定することによる。したがって、検出感度が高く、早期に検出できる、すぐれた培地の開発が患者の早期診断・治療・疫学上極めて重要であることは言うをまたない。近年これに応えるべく結核菌(抗酸菌)の新規培養システムの開発が、なかんずく米国を中心として鋭意進められており、それらの中にはわが国にも導入され、すでに臨床検査にとり入れられているもの、あるいはその途上にあるものもある。

結核菌培地についてはすでに多くの専門書^{3)~10)}に記載されているのでそれらを参照されたく、本稿ではその開発の経緯を踏まえながら、新しい結核菌培地・培養システムについて解説してみたい。

I. 培地の種類

1. 卵培地

1) 特徴

卵をベースとした培地には、下記のような利点・欠点がある。

(1) 利点: ①栄養に富み、臨床検体中の毒性物質を結合・中和するホスホリビッドや蛋白を含み、ほとんどの抗酸菌の良好な発育を支持する。②試験管へ分注後凝固滅菌するため、培地調製過程中に雑菌による汚染のおそれはない。③低温で長期保存が可能である。

(2) 欠点: ①出来上がり培地が、卵成分の質の違いや培地の凝固温度の影響などによって再現性に乏しい。②検出の感度・日数において液体培地よりも劣る。③薬剤感受性検査用卵培地は、薬剤によっては培地調製時の加熱、あるいは卵蛋白との結合によって力価が低下する。

2) 代表的卵培地

古くは Petroff 培地(1915)、Petragnani 培地(1927)、Löwenstein 培地(1931)、Löwenstein-Jensen 培地(1932)、岡・片倉培地(1940)、ATS 培地(1946)などが用いられていたが、その後、わが国では小川培地^{4)5)7)~9)}、欧米諸国では Löwenstein-Jensen 培地^{6)8)~10)}が広く用いられるようになり、今日に至っている。

3) 組成

(1) 基液: 古くは牛肉浸出液、牛乳、馬鈴薯澱粉、ペプトンなどが用いられたが、Löwenstein 培地の報告以来、無機塩類が用いられるようになり、その組成もだんだんとシンプルになった。

(2) 卵液: 古くは基液と卵液の量比は多くの場合 1:2 あるいは 3:4 で、全卵を用いたもの、全卵と卵黄を用いたものとあったが、これらの中で特に結核菌の発育、培地 pH に顕著な差はなく、現在一般に用いられている小川培地や Löwenstein-Jensen 培地では全卵液を用い、基液と卵液の量比は各 1:2 および 1:1.66 となっている。

(3) グリセリン: 古くはグリセリン量は培地の種類によってかなり異なっていた(0.8~6%)。現在では Löwenstein-Jensen 培地は 0.8%、2% 小川培地は 1.3%、1% および 3% 小川培地は 2% となっている。

(4) 色素: 雑菌の発育を阻止し、集落の観察を容易にするために加えられている。古くはコンゴ赤、ゲンチアナ紫なども用いられたが、現在ではマラカイト緑が用いられ、現在の使用量(0.04~0.025%)では結核の発育にさしたる影響はなく、かつ雑菌発育阻止力も強い。

(5) 培地凝固滅菌法: 古くは間歇滅菌(2~3回)されたが、培地により加熱の温度と時間を異にした。小川が岡・片倉培地を用いての検討成績³⁾によれば、80℃70分、90℃50分、95℃30分で培地は十分固まり、85~90℃1時間、1回の凝固滅菌で十分であるという。

2. 寒天培地

1) 代表的寒天培地

Dubos オレイン酸・アルブミン寒天培地(Dubos 寒天培地)、Middlebrook 7H10寒天培地、Middlebrook

7H11寒天培地といったものがある。

Dubos寒天培地はDubos Tween・アルブミン培地(Dubos培地)のTween 80を控除し、アルブミン・コンプレックス中のグルコースをオレイン酸にかえ、寒天を加えた培地である¹⁰⁾。

Middlebrookは臨床検体中の傷害された菌を修復し、検出率を高めるためにDubos寒天培地に修飾を加えた培地(7Hシリーズ)を開発した。現在広く用いられている培地としては、7H10寒天培地¹¹⁾¹²⁾と7H11寒天培地¹³⁾がある。7H11寒天培地は、7H10寒天培地にカゼインのパンクレアチン消化物を加えてINH耐性結核菌の発育を促進するように改変されたもので、最近では7H10寒天培地よりも広く用いられている。

2) 特徴

寒天培地の利点・欠点は下記のようなものである。

(1) 利点: ①組成が卵培地よりも明らか、かつシンプルであり、培地汚染率が卵培地よりも低い。②卵培地よりも菌の発育は早く、5~10% (O₂環境下で培養すると3~4週内に発育する。③培地が透明であるため、ミクロコロニーでも解剖顕微鏡(30~60倍)で検出可能である。また集落の形態観察が可能であり、菌同定の一助となる(例:結核菌のコード形成)。さらに混入雑菌や混合感染菌の鑑別も可能である。④正確な力価の薬剤感受性検査用培地を調製することが出来る。

(2) 欠点: ①平板培地では長期保存、あるいは培養によって乾燥するため、プラスチックの袋に入れておく必要がある。②曝光によりホルムアルデヒドが遊離し、菌の発育を阻止する。③マラカイト緑の含有量が低い(0.0025%)ため、培地調製時に厳重な無菌操作が要求される。

3. 液体培地

1) 合成培地

(1) 組成

代表的な培地としてSauton培地、Long培地がある。ともにリン酸塩、クエン酸塩、硫酸マグネシウム、グリセリン、アスパラギン、鉄を含む。また、これらの成分中に不純物として痕跡程度に含まれているミネラルが菌の増殖上必須であるといわれている¹⁴⁾。

(2) 用途

①大量の菌体や代謝産物(例:ツベルクリン)をえるため。②結核菌のビルレンス保持に合成培地での培養早期の薄い菌膜の継代培養が望ましい。

2) 新しい半合成培地の開発

上記の合成培地並びに血清を含むKirchner培地やProskauer-Beck培地などの半合成培地では、結核菌は菌塊発育をするため定量試験には困難を伴う。この難

点は1940年代、Dubosらによって界面活性剤やアルブミンを用いることによって解決され^{15)~17)}、Dubosオレイン酸・アルブミン培地¹⁰⁾、さらにはMiddlebrook 7H9培地およびBactec 7H12B培地¹⁸⁾の開発へと至った。

最も一般的に用いられている界面活性剤はTween 80(polyoxyethylene derivative of sorbitan monooleate)で、これを含む培地中での発育菌塊は振ることによって容易に分散し、単孤菌あるいは小菌塊となる。Tween 80は自然水解あるいはある種の抗酸菌の水解酵素によって脂肪酸を遊離するが、なかでもオレイン酸は結核菌に対して毒性があり、発育阻止作用を示す。この毒性は牛血清アルブミンを添加することによってオレイン酸・アルブミン結合物が作られ、代謝されて、失われる。

上記液体培地中なかでも7H9培地は増菌、薬剤感受性試験、諸種*in vitro*テストなどに用いられ、その用途は広い。さらに最近では変法7H9培地や変法Kirchner培地に複合抗菌剤、菌の迅速検出物質が加えられた新規培養システムが開発されている(Ⅲ.新規培養システム参照)。

Ⅱ. 培地の作り方

以下、培地調製の手順を記載するとどめるので、詳細は文献3)~10)を参照されたい。

1. 卵培地

新鮮な鶏卵の殻を清拭→全卵を均等化・濾過→基液、グリセリン、2%マラカイト緑水溶液、卵を混和・濾過→試験管へ分注→90℃、1時間凝固滅菌。

2. 寒天培地

Middlebrook 7H10 Agar Base (Difco) 19gまたはMiddlebrook 7H11 Agar Base (Difco) 21gをグリセリン5ml加蒸留水900mlに加える→加熱・溶解、高圧滅菌→50~55℃保温→OADC Enrichment (Difco)(必要に応じてPANTA*)添加→シャーレに分注。

*PANTA Plus Kit (Difco):凍結乾燥PANTA (polymycin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim, azlocillin) 試薬1バイアルをPANTA還元液5mlに溶解・添加(培地:PANTA溶液=10:0.25)。

3. 液体培地

Dubos培地はDubos Broth Base (Difco) 6.5gを、またMiddlebrook 7H9培地はMiddlebrook 7H9 Broth Base 4.7gをグリセリン5gまたはTween 80 5g加蒸留水900mlに加える→加熱溶解・高圧滅菌→45℃まで冷却→Middlebrook ADC Enrichment (Difco) 100ml添加→試験管へ分注。

III. 新規培養システム

近年、臨床材料から結核菌（抗酸菌）を感度よく、かつ迅速に検出しようとする培養システムが開発され、あるいはその途上にある。それには以下のようなものがある。

1. BACTEC 460 TB system¹⁸⁾

1) 目的

結核菌の迅速な検出・鑑別・薬剤感受性試験を併せ行う。

2) 培地

Middlebrook 7H9 培地にカゼインのパンクレアチン消化物、¹⁴C 標識パルミテート、PANTA ならびに発育促進物質 POES (polyoxyethylene stearate) を添加した BACTEC 12B 培地を用いる。

3) 原理

検体中の結核菌が増殖し、培地中の¹⁴C 標識パルミテートの脱カルボキシル化により産生され、BACTEC 12B バイアルのヘッドスペース中に放出された¹⁴CO₂の放射活性を BACTEC 460 機器で測定する。Growth Index (GI) で表し、GI ≥ 10 をもって陽性とする。

なお、上記の BACTEC 12B 培養菌 (GI ≥ 50) を NAP (p-nitro- α -acetylamino- β -hydroxy-propiophenone) 5 μ g 含有ディスク入り BACTEC 感受性試験バイアルに入れ、GI の変動値より NAP 感受性の結核菌と、耐性の非結核性抗酸菌との鑑別が 3 ~ 5 日で出来る (NAP テスト)。

4) BACTEC 法の評価

Wilson ら¹⁹⁾ は BACTEC 法と固型培地 (Löwenstein-Jensen 培地, 7H11 平板) による抗酸菌検出についての先人の 7 報告例をまとめ、BACTEC 法が固型培地よりも菌検出率において優り、かつ早期検出が可能であったとのべている。

著者²⁰⁾ が患者喀痰 179 検体について検討したところによれば、抗酸菌検出例は小川法では 56 検体 (31.3%)、BACTEC 法では 78 検体 (43.6%) であり、これら両法の結核菌群ならびに *Mycobacterium avium* complex (MAC) の各培養果積陽性率は Fig. に示すようであった。また、Table 1 に示すように、結核菌群、MAC とも塗抹陽性検体では小川法と BACTEC 法間に大差はなかったが、塗抹陰性検体では BACTEC 法で小川法の約 2 倍の検出陽性例がみられた。菌検出平均日数は BACTEC 法が小川法よりも結核菌群では塗抹陽性検体で 14 日 (11 日対 25 日)、陰性検体で 9 日 (19 日対 28 日) 早く、また MAC では塗抹陽性検体で 18 日 (4 日対 22 日)、陰性検体で 20 日 (7 日対 27 日) 早かった。

5) 問題点

(1) BACTEC 法は欧米諸国では臨床検査に取入れられて久しいが、わが国では BACTEC 12B 培地が¹⁴C を含むため廃棄規制が厳しく、普及するに至っていない。(2) 特殊測定機器 (BACTEC 460 機器) を必要とする。(3) 液体培地であるため菌同定上有用な集落の性状観察、光発色性検査が出来ない。(4) PANTA のうち nalidixic acid が *M. kansasii* の発育を抑制する²¹⁾。

2. Septi-Chek AFB (MB Septi-Chek)²²⁾

液体培地と固型培地の二相性 (biphasic) 培養シス

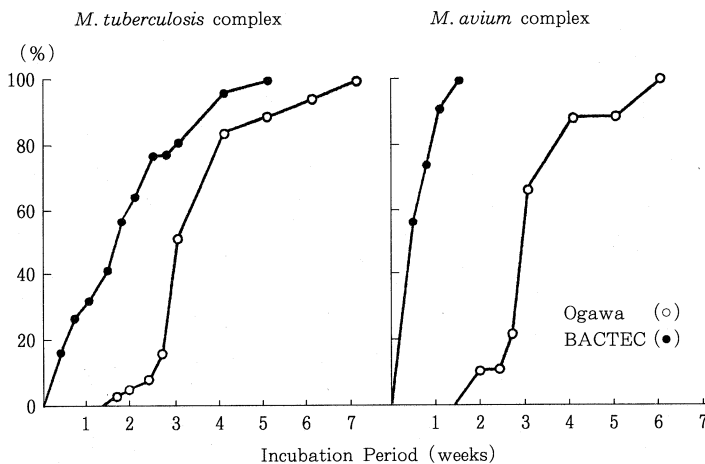


Fig. Cumulative recovery rates of *M. tuberculosis* complex and *M. avium* complex by Ogawa and BACTEC systems²⁰⁾

Table 1 Recovery of mycobacteria from smear-positive and -negative sputum samples by Ogawa and BACTEC 460 TB systems

Organisms	Smear	Number of isolates recovered by :	
		Ogawa (56str.)	BACTEC (78str.)
<i>M. tuberculosis</i> complex	Positive	23	26
	Negative	14	27
<i>M. avium</i> complex	Positive	12	13
	Negative	6	10
Others	Negative	1	2

テムである。旧製品 MB Septi-Chek (F. Hoffmann-LaRoche Ltd., Basel, Switzerland) が改良されて、現在 Septi-Chek AFB (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, U.S.A.) の名で発売されている。

1) 培地

下記のような培地よりなる。

(1) Septi-Chek AFB Mycobacteria Culture Bottle: 変法 Middlebrook 7H9 培地約20ml と CO₂ を充填した培養ボトル。

(2) Septi-Chek AFB Mycobacterial Culture Supplement: 発育促進物質 (オレイン酸, 仔ウシ血清フラクション V, ピリドキサル, カタラーゼ, グリセリン, グルコース) と PANTA。

(3) Septi-Chek AFB Slide: 寒天1 (全抗酸菌発育用・非選択性・変法 7H11寒天培地); 寒天2 (全抗酸菌発育用・非選択性・変法卵含有 7H11寒天培地); 寒天3 (一般細菌培養用チョコレート寒天培地)。

2) 培養操作

詳細は文献²²⁾に譲るとして、以下の手順により行う。

サプリメント(2)をボトル(1)に注入→検体接種・混和→ボトル(1)にスライド(3)接続・スライド表面浸す→培養・観察・判定。

3) Septi-Chek AFB の評価

Isenberg ら²³⁾, D'Amato ら²⁴⁾, Abe ら²⁵⁾, Sewell ら²⁶⁾の液体培養システム (Septi-Chek, BACTEC 460) と固型培地 (Löwenstein-Jensen/小川, 7H11) の抗酸菌検出についての比較評価では、陽性率は Septi-Chek システムは BACTEC 460 システムにほぼ匹敵し、かつ固型培地よりも遥かに優れたものであったが、菌検出日数では BACTEC 460 システムにおいて最も早く、次いで Septi-Chek システム、遥かにおそい固型培地の順であったという。

4) 問題点

特殊な測定機器を必要とせず、非放射性で、二相性の

優れた培養システムではあるが、培地の容器が大きいため、その取扱いやふらん器の収容能力に難点がある。

3. MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube)²⁷⁾

1) 原理

試験管底部のシリコンに、培地中の溶存酸素に感受性の蛍光化合物 (Tris 4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline ruthenium chloride pentahydrate) が埋包されており、化合物からの蛍光は培地中に溶存する大量の酸素によって抑制され、ほとんど検出されないが、結核菌 (抗酸菌) の増殖に伴い活発な酸素消費が行われると紫外線 (365nm) の照射によりオレンジ色の蛍光が観察され、菌の検出が可能となる。

2) 培地

MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube (蛍光指示薬と 4ml の変法 middlebrook 7H9 培地を含む) に MGIT OADC 0.5ml と MGIT PANTA 水溶液 (凍結乾燥粉末バイアルに蒸留水 3ml を添加) 0.1ml を無菌的に加えた完全培地を用いて臨み調製する。そして、NALC-NaOH 法⁷⁾で処理した喀痰 0.5ml を接種し、試験管の蓋栓を固く締めて 37°C で培養する。

3) 判定法

検体接種 2 日目から毎日観察し、陰性試験管は 8 週間まで観察を続ける。判定は試験管をトランスイルミネーター (365nm) あるいは Wood ランプ上に立てて観察すると、菌発育陰性試験管では蛍光はほとんど、あるいは全く検出されないが、菌発育陽性試験管では管底と液面に明るいオレンジ色の蛍光がみられる。なお、この際、陽性並びに陰性コントロールと対比観察する。

最近、自動測定機器 BACTEC MGIT 960 が開発され、酸素蛍光センサーで菌の消費酸素量を検出し、1 時間おきに連続モニタリング出来るようになった。わが国でも、近くその導入が期待されている。

4) MGIT 法の評価

Table 2 Recovery of *M. tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria by MGIT and Ogawa systems³⁴⁾

Organisms	Number of isolates	Number of isolates recovered by :		<i>p</i>
		MGIT	Ogawa	
MTC	237	237 (100%)	187 (78.9%)	<0.0001
NTM	93	92 (98.9%)	63 (67.7%)	<0.0001
Total	330	329 (99.7%)	250 (75.8%)	<0.0001

MTC: *Mycobacterium tuberculosis* complex; NTM: Non-tuberculous mycobacteria.

Table 3 Time to detection of mycobacteria recovered in both MGIT and Ogawa systems³⁴⁾

Species	Number of isolates	Days to detection				<i>p</i>
		MGIT system		Ogawa system		
		Average	Range	Average	Range	
<i>M. tuberculosis</i> complex	187	17.6	4-56	31.6	14-56	<0.0001
<i>M. avium</i> complex	40	7.2	3-19	31.9	14-56	<0.0001
<i>M. kansasii</i>	17	13.7	7-30	22.2	21-42	<0.0001
<i>M. goodii</i>	1	37.0	37	56.0	21-42	*
<i>M. abscessus</i>	1	4.0	4	4.0	4	-
Unclassified	3	9.7	7-14	25.7	21-28	*

*: *p* values were not calculated due to insufficient number of isolates.

先人の報告によれば、MGITは従来法よりも優れ、かつ他の液体培養システム (BACTEC 460並びに Septi-Chek) にはほぼ匹敵するとの評価がえられつつある^{28)~33)}。

最近、われわれ³⁴⁾は、わが国の10施設でMGITの評価に関する共同研究を行う機会をえたので以下にそれを要約、紹介する。

(1) 主として肺結核患者喀痰681検体中、培養陽性はMGIT法で329例 (48.3%)、小川法で250例 (36.7%)、両法で330例 (48.5%)であった。

(2) 検出率は、結核菌群 (237例) ではMGIT法 (237例陽性) が小川法 (187例陽性) よりも50例 (21.1%)、また非結核性抗酸菌 (93例) ではMGIT法 (92例陽性) が小川法 (63例陽性) よりも29例 (31.2%) 多かった (Table 2)。これを塗抹成績別にみると、塗抹陽性結核菌群ではMGIT法 (192例陽性) が小川法 (170例陽性) よりも22例 (11.5%)、また塗抹陰性結核菌群 (45例) ではMGIT法 (45例陽性) が小川法 (17例陽性) よりも28例 (62.2%) 多かった。他方、塗抹陽性非結核性抗酸菌 (64例) ではMGIT法 (64例陽性) が小川法 (53例陽性) よりも11例 (17.2%)、また塗抹陰性非結核性

抗酸菌ではMGIT法 (28例陽性) が小川法 (10例陽性) よりも18例 (62.1%) 多かった。

(3) 検出所要日数は、結核菌群 (187例) ではMGIT法 (平均17.6日) が小川法 (平均31.6日) よりも平均14日、MACではMGIT法 (平均7.2日) が小川法 (平均31.9日) よりも平均24.7日早かった (Table 3)。これを塗抹成績別にみると、塗抹陽性結核菌群 (170例) ではMGIT法 (平均16.5日) が小川法 (平均29.9日) よりも平均13.4日、また塗抹陰性結核菌群 (17例) ではMGIT法 (平均28.0日) が小川法 (平均48.5日) よりも平均20.5日早かった。他方、塗抹陽性MAC (33例) ではMGIT法 (平均6.8日) が小川法 (平均29.9日) よりも平均23.1日、また塗抹陰性MAC (7例) ではMGIT法 (平均9.3日) が小川法 (平均41.0日) よりも31.7日早かった。

5) MGIT法の将来性

MGIT法は菌検出の感度並びに迅速性において従来法よりもすぐれ、かつBACTEC 460およびSepti-Chekにはほぼ匹敵する液体培養システムである。また非放射性培地で、小試験管を使用しているためスペースをとらず、特殊な測定機器を必要とせず、かつ判定も容易

である。このような点を勘案すると、MGIT法はわが国の臨床検査室でも広く用いて然るべき抗酸菌検出法として推奨されよう。

4. MB Redox³⁵⁾

Biotest (Dreieich, Germany) により開発された酸化還元指示薬 (Redox indicator) を用いた新しいタイプの結核菌 (抗酸菌) 培養システムである。

1) 培地

Kirchner 培地に発育促進物質 (馬血清, カタラーゼ, リボ核酸, ビタミン), 複合抗菌剤 PACT (polymyxin B, amphotericin B, carbenicillin, trimethoprim), 酸化還元指示薬 INT (*p*-indonitrotetrazolium violet) が含まれている。

2) 原理

培地中の溶存酸素が菌の発育に伴い消費されると培地の酸化還元電位は低くなる。菌に取り込まれた培地中の INT の酸化還元電位は低く ($-0.09V$), 乳酸脱水素酵素, コハク酸脱水素酵素, イソクエン酸脱水素酵素などが存在すると, 容易に還元されて赤紫色のホルマザンとなり, 菌表層に顆粒状に分泌される。MB Redox 中では結核菌を含めて多くの抗酸菌は管底で菌塊発育し, これがホルマザンの着色によって容易に検出される。

3) 培養

NALC-NaOH 処理検体の $0.1\sim 0.5ml$ を接種し, 固く蓋栓をして $37^{\circ}C$ で培養する。菌接種24時間後, その後は週2回, 4週以降は週1回, 8週間にわたって観察する。

4) 判定法

静置状態で, 次いで軽く振って管底発育したホルマザン着色菌塊を観察する。遅発育菌は $5\sim 20$ 日, 迅速発育菌は $2\sim 5$ 日培養で検出される。雑菌の多くは培養24時間後, 赤ないし紫色の混濁発育としてみられる。

5) MB Redox の評価

Naumann ら³⁶⁾ によれば, 1,512臨床検体から Löwenstein-Jensen 培地, Stonebrink 培地, BACTEC 12B 培地および MB Redox により, それぞれ 36, 39, 45および58株の結核菌を分離し, 所要日数はそれぞれ 25, 22, 19および17日で, 菌検出の感度並びに迅速性において MB Redox が最も優れていたという。

5. BACTEC Myco/F Lytic 培地

1) 特徴

BACTEC 9000システム (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, U.S.A.) に用いられる血中の抗酸菌, 真菌などの好気性菌検出用の非放射性的非選択培地である。本培地中で抗酸菌が増殖す

るときの酸素の減少を, 高感度の酸素特異センサーの蛍光量の変化として測定・判定する。本培地は近くわが国でも入手可能となる予定である。

2) 培地

変法 Middlebrook 7H9 培地で, その組成は, Middlebrook 7H9 プロスペース (リン酸塩控除), BHI, 無機塩類, 発育促進物質 (カゼイン水解物, サプリメントH, イノシット, グリセリン, Tween 80, 塩酸ピリドキシン), ポリアネソールスルホネート (抗凝血剤), サボニン (溶血剤), アンチフォーム (消泡剤) よりなる。

3) 菌検出所要日数

本培地の Quality Control Certificate の記載によれば, *M. tuberculosis* ATCC 25177 = $3\sim 15$ 日, *M. intracellulare* ATCC 13950 = $3\sim 13$ 日, *M. kansasii* ATCC 12478 = $3\sim 12$ 日, *M. fortuitum* ATCC 6841 = $1\sim 4$ 日である。

6. BACTEC Myco/F 培地

Fluorescent BACTEC 9000 MB system (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, U.S.A.) で使用する変法 Middlebrook 7H9 培地である。本システムの原理は, 上述の5と同様である。Griethuysen ら³⁷⁾ によれば, 本システムは塗抹陽性・陰性検体を問わず, Septi-Chek 並びに Löwenstein-Jensen 培地におけるよりも菌の検出率, 検出日数において優れ, なかなく塗抹陰性検体においてより顕著であったという。

むすび

近年, 結核菌 (抗酸菌) の分離培地として液体培地, なかなく変法 Middlebrook 7H9 培地を用いた新規培養システムが開発され, 従来その主流をなしていた卵培地よりも菌の検出感度がよく, 早期検出が可能であることが明らかになってきた。しかし, 液体培地と固型培地にはそれぞれ一長一短があり, わが国の現状では小川培地に加えるに, 必要に応じて, 少なくとも塗抹陰性で結核が強く疑われるような場合には液体培養システムのうちのいずれかを併せ用いるのが望ましいと思われる。なお, 液体培養システムのうちいずれを用いるかについては, 今後その性能もさることながら, 迅速薬剤感受性検査への応用, 価格などについても検討の要があろう。

文 献

- 1) 青木正和: I. 世界的な結核の逆襲, 「ヴィジュアルノート結核. その現状と今後」, 第1版, 財団法人結核予防会, 東京, 1996, 1-11.

- 2) Villarno ME, Geiter LJ, Simone PM: The multidrug-resistant tuberculosis challenge to public health efforts to control tuberculosis. *Public Health Rep.* 1992; 107: 616-625.
- 3) 小川辰次: 培養法, 「結核菌検索の基礎と応用」, 第2版, 保健同人社, 東京, 1951, 41-111.
- 4) 高橋昭三: 結核菌の培地と培養法, 「結核菌の臨床細菌学」, 財団法人結核予防会, 東京, 1970, 132-162.
- 5) 結核菌検査指針編集委員会: 培地の作り方, 「結核菌検査指針」, 厚生省監修, 日本公衆衛生協会, 東京, 1979, 66-68.
- 6) Kent, PT, Kubica GP: Isolation Procedures. In: *Public Health Mycobacteriology. 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, 31-56.
- 7) 工藤祐是, 斎藤 肇, 高橋 宏: 培地および菌液の作り方, 「微生物検査必携. 細菌・真菌検査」, 第3版, 厚生省監修, 日本公衆衛生協会, 東京, 1987, F-125-F-130.
- 8) 阿部千代治: 分離培養法, 「抗酸菌の検査」, 財団法人結核予防会, 東京, 1993, 16-33.
- 9) 斎藤 肇: 分離培養法, 「抗酸菌検査法, 遺伝子技術による迅速診断」, 第1版, 斎藤 肇・阿部千代治監修, 医歯薬出版, 東京, 1997, 13-23.
- 10) Kubica GP, Vestal AL: Culture media. In: *Tuberculosis. Laboratory Methods in Diagnosis.* U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Center, Atlanta, U.S.A., 1960, 56-64.
- 11) Middlebrook G, Cohn ML: Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am J Public Health.* 1958; 48: 844-853.
- 12) Middlebrook G, Cohn ML, Dye WE, et al.: Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta Tuberc Scand.* 1960; 38: 66-81.
- 13) Cohn ML, Waggoner RF, McClatchy JK: The 7H-11 medium for the culture of mycobacteria. *Am Rev Resp Dis.* 1968; 98: 295-296.
- 14) Affronti LF, Porrello V, Gupta S: Trace elements incorporated into the culture medium of *Mycobacterium tuberculosis* promote the presence of tuberculo-protein C in the preparation of purified protein derivatives. *Microbios.* 1990; 63: 101-107.
- 15) Dubos RJ: Rapid and submerged growth of mycobacteria in liquid media. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1945; 58: 361-362.
- 16) Dubos RJ, Davis BD: Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media. *J Exp Med.* 1946; 83: 409-423.
- 17) Dubos RJ, Middlebrook G: The effect of wetting agents on the growth of tubercle bacilli. *J Exp Med.* 1948; 88: 81-88.
- 18) Siddiqi SH: BACTEC TB System. Product and Procedure Manual. Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems. Towson, MD, U.S.A., 1985.
- 19) Wilson ML, Stone BL, Hildred MV, et al.: Comparison of recovery rates for Mycobacteria from BACTEC 12B vials, Middlebrook 7H11-Selective 7H11 biplates, and Löwenstein-Jensen slants in a public health mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2516-2518.
- 20) 斎藤 肇: 結核菌(抗酸菌)の迅速診断法. *公衆衛生.* 1993; 57: 162-166.
- 21) Conville PS, Andrews JWB, Witebsky FG: Effect of PANTA on growth of *Mycobacterium kansasii* in BACTEC 12B Medium. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2012-2015.
- 22) Septi-Chek AFB Manual: BBL[®] Septi-Chek[™] AFB Mycobacteria Culture System. Becton Dickinson Microbiology Systems. Cockeysville, MD, U.S.A., 1994, 1-6.
- 23) Isenberg HD, D'Amato RF, Heifets L, et al.: Collaborative feasibility study of a biphasic system (Roche Septi-Chek AFB) for rapid detection and isolation of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 1719-1722.
- 24) D'Amato RF, Isenberg HD, Hochstein L, et al.: Evaluation of the Roche Septi-Chek AFB system for recovery mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 2906-2908.
- 25) Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al.: Comparison of MB-Chek, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 878-881.
- 26) Sewell DL, Rashad AL, Rourke WJ, et al.:

- Comparison of the Septi-Chek AFB and BACTEC systems and conventional culture for the recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1993 ; 31 : 2689-2691.
- 27) MGIT Manual : BBL[®] MGIT[™] Products for the Detection of Mycobacteria. BBL[®] MGIT[™] Mycobacteria Growth Indicator Tube, BBL[®] MGIT[™] OADC, BBL[®] MGIT[™] PANTA[™]. Becton Dickinson, Cockeysville, MD, U.S.A., 1994.
- 28) Kodsí SE, Hagemann PA, Douglas JD, et al. : Comparison of the BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube with the BACTEC TB system using clinical specimens. 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Orlando, U.S.A., 1994.
- 29) Neumann MA, Rogers J, Williams R, et al. : Comparison of the BACTEC 460TB 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.
- 30) Costa D, Mandler F, Passerini TC, et al. : Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT). A new rapid non-radiometric method in mycobacteria diagnosis. 16th Annual Meeting, European Society for Mycobacteriology. Pisa, Italy, 1995.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 斎藤 肇, 螺良英郎, 山中正彰, 他 : MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) の評価に関する10施設での共同研究. *臨床と微生物.* 1997 ; 24 : 897-903.
- 35) MB REDOX Manual : MB REDOX with PACT. Liquid Culture Medium for Detection of Mycobacteria. Biotest AG, Dreieich, Germany, 1997.
- 36) Naumann L, Jäger H, Lang E, et al. : Evaluierung des MB Redox - Ein neues Flüssingmedium in Vergleich zu festen Medien und dem BACTEC 460TB. *J Lab Med.* 1997 ; 21 : 31-34.
- 37) von Griethuysen AJ, Jansz AR, Buiting AGM : Comparison of fluorescent BACTEC 9000MB system, Septi-Chek AFB system, and Löwenstein-Jensen medium for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1996 ; 34 : 2391-2394.