

## 原 著

## 酸化還元インジケータ (STC) を用いた抗酸菌迅速培養システム (マイコアシッド) と酸素反応性蛍光センサーを用いた抗酸菌迅速培養システム (MGIT) および新しく開発された 2% 小川培地 (S) の比較検討

<sup>1</sup>阿野 裕美    <sup>1</sup>吉多 仁子    <sup>1</sup>石田智恵子    <sup>1</sup>谷川 信子  
<sup>1</sup>菊井 正紀    <sup>2</sup>高嶋 哲也    <sup>3</sup>露口 泉夫

<sup>1</sup>大阪府立羽曳野病院臨床病理検査科, <sup>2</sup>第一内科,  
<sup>3</sup>大阪府立羽曳野病院院長

COMPARISON OF THE NEWLY DEVELOPED MYCOACID SYSTEM  
 WITH MYCOBACTERIA GROWTH INDICATOR TUBE (MGIT)  
 AND NEWLY DEVELOPED 2% OGAWA MEDIUM (S)  
 FOR RECOVERY OF MYCOBACTERIA IN CLINICAL SPECIMENS

<sup>1</sup>\*Hiromi ANO, <sup>1</sup>Hiroko YOSHIDA, <sup>1</sup>Chieko ISHIDA, <sup>1</sup>Nobuko TANIGAWA,  
<sup>1</sup>Masanori KIKUI, <sup>2</sup>Tetsuya TAKASHIMA, and <sup>3</sup>Izuo TSUYUGUCHI

<sup>1</sup>\*Department of Clinical Pathology, <sup>2</sup>First Department of Medicine, Osaka Prefectural Habikino Hospital,  
<sup>3</sup>President of Osaka Prefectural Habikino Hospital

The detection rate of mycobacteria from patients' specimens and the time required to get positive culture were compared among newly developed MYCOACID SYSTEM, MGIT, Ogawa K medium and 2% Ogawa medium (S). A total of 249 sputum samples taken from patients were used as the study subjects and 124 kinds of mycobacteria were isolated. For 135 cases clinically diagnosed as pulmonary tuberculosis, the detection rate was 44.4% for MYCOACID, 47.4% for MGIT and 38.5% for Ogawa K medium, showing that there are no significant differences in the detection rate between MYCOACID and MGIT, and MYCOACID and Ogawa K medium but the differences was significant between MGIT and Ogawa K medium ( $p=0.02$ ). The mean days needed for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex was 12.3 days for MYCOACID, 13.4 days for MGIT, and 26.8 days for Ogawa K medium, indicating significant differences in the time to get positive culture between Ogawa K medium and either of both liquid media ( $p<0.001$ ). Furthermore, 2% Ogawa medium (S) was used only for the detection of mycobacteria among previously untreated tuberculosis and there were no significant differences in the

\*〒583-8588 大阪府羽曳野市はびきの3-7-1

\* 3-7-1, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583-8588 Japan.  
 (Received 13 Jun. 2001/Accepted 10 Sep. 2001)

detection rate between 2% Ogawa medium (S) and either of both liquid media. The time to get positive culture for 2% Ogawa medium (S) was 18.2 days, which was longer than that for either of liquid media, MYCOACID and MGIT, but it was significantly shorter (7.9 days) than that for Ogawa K medium ( $p=0.003$ ). These results demonstrate that the liquid culture systems both MYCOACID and MGIT were very useful for the detection of mycobacteria compared with Ogawa K medium.

**Key words:** Rapid detection of mycobacteria, MYCOACID, MGIT, 2% Ogawa medium (S), Ogawa K medium

キーワード：抗酸菌迅速検出、マイコアシッド、MGIT、2%小川培地(S)、小川K培地

## はじめに

近年米国においては、HIV陽性者における多剤耐性結核の出現と広がりが社会問題となり、結核症の進行の速さに対応すべく迅速診断法の開発が緊急課題となった。CDC勧告<sup>1)</sup>では、結核菌の検出と同定を15日以内に、薬剤感受性テストを30日以内に報告することを目標としているが、これを受けて日本でも、小川培地に代わるMGIT<sup>2)~7)</sup>やMB Redox<sup>10)</sup>、MB/Bact<sup>11) 12)</sup>等さまざまな液体培地の検討がなされてきた。また一方では、遺伝子を用いた迅速検査法が臨床の場でも比較的簡単に用いられるようになり、結核の診断は格段に迅速化された。しかし、遺伝子増幅検査法の陽性率は液体培養法に劣り、同定できる菌種も限られており、薬剤耐性に関与する遺伝子に関する情報もまだまだ少ない<sup>13)~18)</sup>。原因菌を分離・鑑別・同定するために、より高感度で迅速な培養法の必要性は、ますます大きくなったと言えるだろう。

1997年から日本における結核罹患率が上昇に転じ、中でも大阪市は全国ワースト1の罹患率を示している。この情勢を受けて、当院においても液体培養法導入に向けて、1999年度より様々な液体培地の検討を始めた。本報では、液体培地の試験管底に溶存酸素に鋭敏な蛍光センサーを組み込んだBD Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT: ベクトン ディッキンソン社)と、液体培地に酸化還元呈色色素(2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride)を入れたマイコアシッド(極東製薬)、およびゴムキャップの代わりにスクリュウキャップを用いた小型の卵培地 2%小川培地(S)(極東製薬)を、従来から当院で使用していた小川K培地(極東製薬)の成績と比較し、液体培地の臨床的有用性を治療経過別に検討した。

## 対象および方法

### 1. 対象

2000年11月7日、14日、27日の3日間に当院を受診し、結核菌培養依頼のあった212例を対象とし、これを治療経過に従って以下のように分類した。①未治療結核症(抗結核治療開始から1週間以内の患者を含む): 47例 ②抗結核治療開始2カ月未満の結核症: 24例 ③抗結核治療開始2カ月以降の結核症: 64例 ④非結核性抗酸菌症: 43例 ⑤臨床的に結核ではない症例: 34例。

また、卵培地で分離できても液体培地で分離できない菌株もあることが報告されている<sup>6) 9)~11) 20)</sup>。当院でも以前に多剤耐性結核菌で数例の経験があることから、2000年10月から12月までの間に結核菌培養依頼のあった多剤耐性結核菌37例についても、別途検討を加えた。

以下、培養陽性率や平均培養日数などを算出する場合には、結核菌群として上記の①から③までの合計135例を分母とし、非結核性抗酸菌は④の43例、多剤耐性結核菌は37例を分母として計算した。

### 2. 方法

喀痰は、倍量の酵素(スプタザイム: 極東製薬)を加え室温15分放置して均質化した後、4℃3000G、15分間遠心して沈渣をチールネルゼン染色し、これを2等分して半量で液体培養、残り半量で小川K培地を実施した。

液体培養は、沈渣の2倍量のNALC-NaOHを加え室温15分放置した後、5倍量のPBSを加えRT. 3000rpm、20分間遠心し、この沈渣の半量にPBS 0.6mlを加えて再浮遊させたものの0.5mlをMGITに接種した。残り半量の沈渣に2倍量のアシッドプラス(酸処理剤: 極東製薬)を加え室温15分放置後、マイコアシッドに0.2mlと2%小川培地(S)(以下小川S培地とする)に0.1ml接種した。小川S培地は、未治療結核症と多剤耐性結核症のみに実施した。

小川K培養は、沈渣に2倍量のスプタメントゾル(酸処理剤: 極東製薬)を加え室温15分放置後、その0.1mlを小川K培地に接種した。

### 3. 結果の判定

MGITは365 nmのトランスイルミネーターを用いて蛍光を発した時点で、マイコアシッドは液体下部が紫色を呈した時点で、小川S培地はコロニーを認めた時点で陽性と判定し、8週間毎日観察した。小川K培地は3日毎に判定した。いずれの培地においても培養陽性時にチールネルゼン染色を行い、抗酸菌であることを確認した。

未治療症例に限り、両液体培地が陽性となった時点で試験管底の0.1 mlを小川S培地と小川K培地に接種して、コロニーを得るまでの培養日数を測定した。

#### 4. 雑菌汚染の有無の確認

液体培地の雑菌汚染率については、培養陽性時にチールネルゼン染色して検鏡し、視野の中に抗酸菌以外の菌が存在していた時に雑菌ありとしている場合が多いが、この時の雑菌は生菌か死菌か判定できない。本来雑菌汚染が問題となるのは、抗酸菌が存在していないにもかかわらず雑菌その他の原因で陽性のシグナルが出る場合と、薬剤感受性試験のために抗酸菌の純培養が必要となる場合であろう。雑菌汚染については様々な判定方法が想定されることから、本実験では、培養陽性時の検鏡による雑菌の確認に加えて、培養終了の8週目に培養陽性例も陰性例も含めたすべての液体培地を3000 rpm、20分間遠心し、沈渣を塗抹してチールネルゼン染色を行い、抗酸菌と雑菌の存在を確認した。さらにこの沈渣を、2%小川培地・Middlebrook 7H10寒天培地・羊血液寒天培地に接種して、抗酸菌と雑菌の発育の有無を確認した。

そこで本報では、液体培地の雑菌率を次のように定義

した。(1)液体培地の中に抗酸菌は存在せず、雑菌その他の原因で陽性のシグナルが出た場合を培養雑菌率とした。(2)陽性シグナルを発した時点で検鏡した時に、視野の中に抗酸菌と雑菌が混在していた場合を検鏡雑菌率とした。(3)培養終了時点で、液体培地から2%小川培地に継代培養した時に生育した雑菌を小川培養雑菌率とした。

#### 5. 分離菌の鑑別同定

結核菌群はアキュプロブテスト(極東製薬)で、非結核性抗酸菌はDDHマイコバクテリア法(極東製薬)で同定した。

#### 6. 統計学的解析

得られた成績の有意差の解析は、培養陽性率はChi-square for independence test, 培養日数はnon-paired t-testを用いた。

### 結 果

#### 1. 培養陽性率

各培地の培養陽性率は、結核菌群では、MGIT 47.4%、マイコアシッド44.4%、小川K培地38.5%となり(Table 1)、MGIT対マイコアシッド、マイコアシッド対小川K培地の培養陽性率に有意差はなかったが、MGIT対小川K培地の培養陽性率は、有意にMGITの方が高かった( $p=0.02$ )。非結核性抗酸菌では、MGIT 48.8%、マイコアシッド37.8%、小川K培地30.2%となり、非結核性抗酸菌の場合にも、MGIT対小川K培

Table 1 Recovery rate of mycobacteria in different media

Case (n)	Clinical pass (n)	No. (%) of isolates detected by:			
		MGIT	MYCOACID	Ogawa K	Ogawa S
MOTT* (43)		21 (48.8)	16 (37.2)	13 (30.2)	nd***
MDR-TB** (37)		31 (83.8)	32 (86.5)	28 (75.7)	28 (75.7)
<i>M. tuberculosis</i> complex (135)		64 (47.4)	60 (44.4)	52 (38.5)	nd
	No treatment (47)	36 (76.6)	34 (72.3)	33 (70.2)	35 (74.5)
	Less than 2 month treatment (24)	8 (33.3)	11 (45.8)	9 (37.5)	nd
	2 month treatment or more (64)	20 (31.3)	15 (23.4)	10 (15.6)	nd

\* Mycobacteria other than *M. tuberculosis*

\*\* multidrug resistant *M. tuberculosis*

\*\*\* no designed

For detection of MOTT; MGIT vs MYCOACID:  $p=0.27$

For detection of MOTT; MYCOACID vs Ogawa K:  $p=0.26$

For detection of MOTT; MGIT vs Ogawa K:  $p=0.02$

For detection of MDR-TB; MGIT vs MYCOACID:  $p=0.74$

For detection of MDR-TB; MYCOACID vs Ogawa K:  $p=0.87$

For detection of MDR-TB; MGIT vs Ogawa K:  $p=0.74$

For detection of *M. tuberculosis* complex; MGIT vs MYCOACID:  $p=0.27$

For detection of *M. tuberculosis* complex; MYCOACID vs Ogawa K:  $p=0.26$

For detection of *M. tuberculosis* complex; MGIT vs Ogawa K:  $p=0.02$

地間の培養陽性率にのみ有意差があった ( $p=0.02$ )。多剤耐性結核菌では、MGIT 83.8%、マイコアシッド86.5%、小川K培地75.7%、小川S培地75.7%となり、全体に高い培養陽性率を示し、各培地間に有意差はなかった。

他の文献資料と比較するために、いずれかの培地で陽性となった69例を分母として培養陽性率を計算すると、結核菌群では、MGIT 92.8%、マイコアシッド87.0%、小川K培地75.4%となり、非結核性抗酸菌では、MGIT 87.5%、マイコアシッド66.7%、小川K培地54.2%となった。

次に、結核菌群を臨床経過別にみると、①未治療：MGIT 76.6%、マイコアシッド72.3%、小川K培地70.2%、小川S培地74.5% ②治療開始2カ月未満：MGIT 33.3%、マイコアシッド45.8%、小川K培地37.5% ③治療開始2カ月以降：MGIT 31.3%、マイコアシッド23.4%、小川K培地15.6%となった。未治療の場合にはMGITの方がマイコアシッドより培養陽性率が高く、治療開始2カ月未満や多剤耐性結核菌では、マイコアシッドの方がMGITより高くなる傾向が認められた。また未治療において、小川S培地はMGITに次いで高い培養陽性率を示した。

## 2. 培養日数

平均培養日数は、結核菌群ではMGIT 13.4日(2~42日)、マイコアシッド12.3日(2~36日)、小川K培地26.8日(12~56日)となり(Table 2)、MGITとマイコアシッドの培養日数間に統計学的有意差はなかったが、MGIT対小川K培地間、マイコアシッド対小川K培地間では、有意に液体培地の培養日数の方が短かった ( $p<0.001$ )。非結核性抗酸菌では、MGIT 10.3日(2~33日)、マイコアシッド10.6日(3~39日)、小川K培地

21.7日(6~39日)となった。多剤耐性結核菌は、MGIT 8.4日(2~29日)、マイコアシッド9.1日(2~25日)、小川K培地26.2日(6~49日)、小川S培地16.2日(7~34日)となり、非結核性抗酸菌や多剤耐性結核菌の場合にも、MGIT対マイコアシッド間の培養日数に有意差はなく、MGIT対小川K培地間、マイコアシッド対小川K培地間では、液体培地の培養日数が有意に短かった ( $p<0.001$ )。

結核菌群を治療経過別にみると、①未治療：MGIT 10.9日(2~30日)、マイコアシッド11.1日(4~28日)、小川K培地26.2日(13~49日)、小川S培地18.2日(9~33日) ②治療開始2カ月未満：MGIT 15.3日(5~32日)、マイコアシッド13.9日(2~36日)、小川K培地26.2日(13~36日) ③治療開始2カ月以降：MGIT 17.1日(2~40日)、マイコアシッド14.0日(3~39日)、小川K培地29.4日(13~56日)となった。

小川S培地の平均培養日数を他の培地と比較すると(Fig. 1)、未治療結核症の場合、マイコアシッドよりは7.1日長い ( $p<0.001$ )、小川K培地よりは7.9日短くなっており ( $p=0.003$ )、これらの間には有意差が認められた。多剤耐性結核菌の場合にも、小川S培地の培養日数は、マイコアシッドよりは7.0日長いが小川K培地よりは10.0日短く、これらの間にも有意差が認められた ( $p<0.001$ )。

## 3. 累積培養陽性率

未治療結核症の累積培養陽性率は、3週間でMGIT 97.2%、マイコアシッド97.0%、小川S培地82.9%、小川K培地48.4%となり、4週間ではMGIT 97.2%、マイコアシッド100.0%、小川S培地91.4%、小川K培地54.5%となった。小川K培地の累積培養陽性率が90

Table 2 Mean time for detection of mycobacteria in different media

Case (n)	Clinical pass (n)	Average days (range) for detection			
		MGIT	MYCOACID	Ogawa K	Ogawa S
MOTT (43)		10.3 (2-33)	10.6 (3-39)	21.7 (6-39)	nd
MDR-TB (37)		8.4 (2-29)	9.1 (2-25)	26.2 (6-49)	16.2 (7-34)
<i>M. tuberculosis</i> complex (135)		13.4 (2-42)	12.3 (2-36)	26.8 (12-56)	nd
	No treatment (47)	10.9 (2-30)	11.1 (4-28)	26.2 (13-49)	18.2 (9-33)
	Less than 2 month treatment (24)	15.3 (5-32)	13.9 (2-36)	26.2 (13-36)	nd
	2 month treatment or more (64)	17.1 (2-40)	14.0 (3-39)	29.4 (13-56)	nd

Mean time for detection of MOTT; MGIT vs MYCOACID:  $p=0.24$

Mean time for detection of MOTT; MGIT or MYCOACID vs Ogawa K:  $p<0.001$

Mean time for detection of MDR-TB; MGIT vs MYCOACID:  $p=0.40$

Mean time for detection of MDR-TB; MGIT or MYCOACID vs Ogawa K:  $p<0.001$

Mean time for detection of *M. tuberculosis* complex; MGIT vs MYCOACID:  $p=0.59$

Mean time for detection of *M. tuberculosis* complex; MGIT or MYCOACID vs Ogawa K:  $p<0.001$

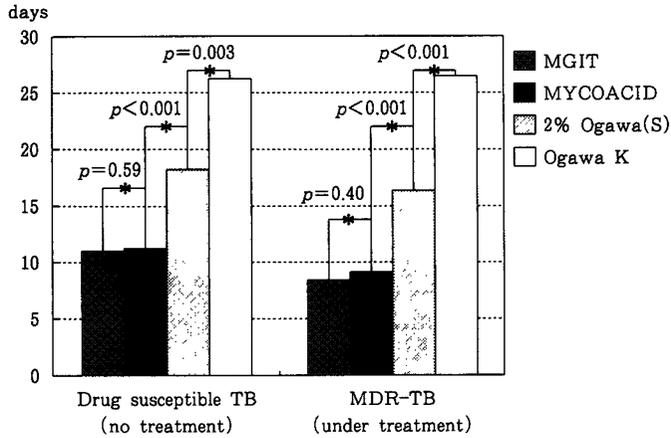


Fig. 1 Mean days for detection of a positive culture in different media

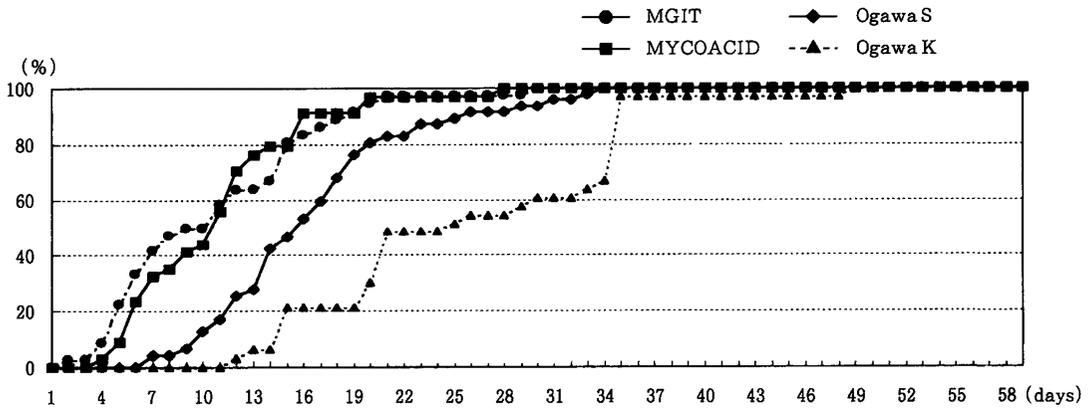


Fig. 2-1 Cumulative recovery rates of *M.tuberculosis* complex in clinical specimens from untreated patients

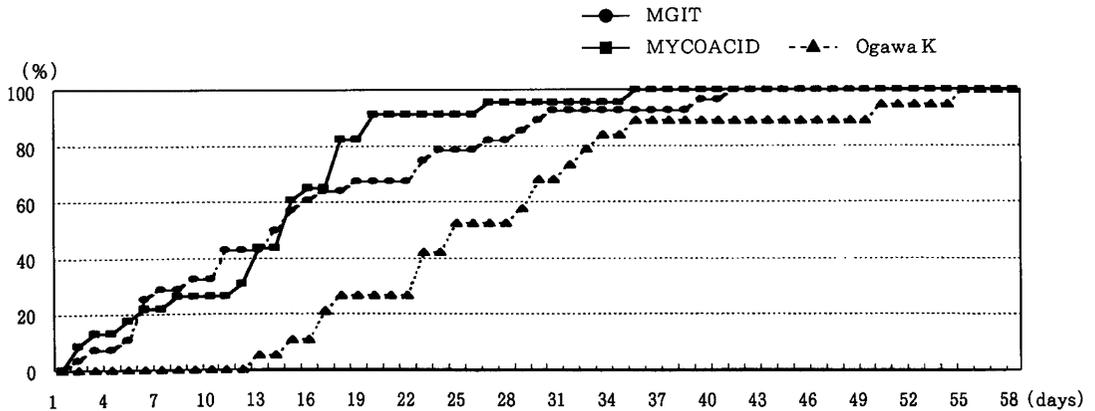


Fig. 2-2 Cumulative recovery rates of *M.tuberculosis* complex in clinical specimens from patients under treatment

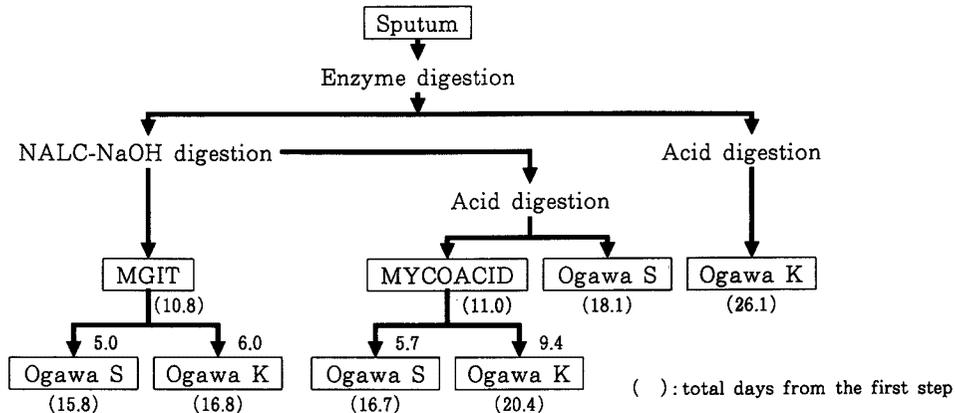


Fig. 3 Mean days to obtain *M. tuberculosis* colony in the solid medium; re-cultivated from liquid medium

%を超えるのは35日目以降であった (Fig. 2-1)。

一方、治療開始以降の検体では、3週間でMGIT 67.8%、マイコアシッド 91.3%、小川K培地 26.3%となり、MGITと小川K培地の累積培養陽性率が低くなった。MGITが90%を超えるのは31日以降、小川K培地が90%を超えるのは51日以降であった (Fig. 2-2)。

多剤耐性結核菌の累積培養陽性率は、3週間でMGIT 96.7%、マイコアシッド 93.7%、小川S培地 87.5%、小川K培地 65.6%となった。小川K培地の累積培養陽性率が90%を超えるのは35日以降で、未治療結核症と同じ傾向を示した。

#### 4. 液体培地から固形培地へ接種した場合の培養日数

未治療結核症について、液体培養陽性検体から卵培地に植え継いで、コロニーを得るまでの培養日数を測定した。

MGITから小川K培地に継代培養した場合の平均培養日数は6.0日 (2~10日)、MGITから小川S培地では5.0日 (2~10日)、マイコアシッドから小川K培地では9.4日 (4~18日)、マイコアシッドから小川S培地では5.7日 (3~10日)となった (Fig. 3)。最初に喀痰を前処理して液体培地に接種した日からトータルして計算すると、MGITから小川K培地に継代培養した場合の平均培養日数は16.8日となり、MGITから小川S培地では15.8日、マイコアシッドから小川K培地では20.4日、マイコアシッドから小川S培地では16.7日となった。喀痰から直接小川K培地に接種した場合の平均培養日数は26.1日、小川S培地に接種した場合は18.1日なので、いずれの場合も、卵培地に直接接種するよりも、一度液体培養して陽性になってから卵培地に継代培養した方が、早くコロニーを得ることができた。

#### 5. 雑菌汚染

各培地の雑菌汚染率を比較すると、結核菌群では、MGITの培養雑菌率は5.2%、検鏡雑菌率は11.9%、小川培養雑菌率は6.7%となった (Table 3)。一方マイコアシッドは、培養雑菌率は1.5%、検鏡雑菌率は0.7%、小川培養雑菌率は3.0%と、MGITに比べていずれも低い値であった。また小川K培地は0.6%、小川S培地では0.6%と、卵培地の雑菌汚染率も非常に低いものであった。非定型抗酸菌では、MGITの培養雑菌率は9.3%、検鏡雑菌率は14.0%、小川培養雑菌率は4.7%となり、マイコアシッドの培養雑菌率は0%、検鏡雑菌率は11.6%、小川培養雑菌率は2.3%となった。

継代培養でMiddlebrook 7H10寒天培地や血液寒天培地に生育した雑菌は、2%小川培地に生育した雑菌よりも2~3例多く、Middlebrook 7H10寒天培地は抗酸菌の発育が早く平面であるため菌株の分離能も良いが、カビに汚染されやすいという弱点があった。

#### 6. 液体培地陰性で小川K培地陽性の例と8週目の検鏡で抗酸菌が確認された例

液体培地陰性で小川K培地が陽性の例と、液体培地陽性のシグナルが出なかったにもかかわらず、8週目の検鏡時に抗酸菌が認められた例をTable 4に示した。

症例1~3は、小川K培地が陽性で、MGITの陽性シグナルが出なかった例である。特に症例1は、初診時に提出された喀痰であり、3連痰はすべて塗抹陽性でマイコアシッドも小川K培地も陽性であった。

症例4と5は同一患者の検体で、持続排菌多剤耐性結核症例であった。症例4は小川K培地陽性でMGITもマイコアシッドも陰性、症例5はMGITと小川K培地陽性でマイコアシッドのみ陰性であった。

Table 3 Rate of contamination in both MGIT and MYCOACID

Case (n)	Bacteria other than mycobacteria (MGIT)		
	culture positive % (n)	smear positive % (n)	culture positive in 2% Ogawa medium
<i>M. tuberculosis</i> (135)	5.2 (7)	11.9 (16)	6.7 (9)
MOTT (43)	9.3 (4)	14.0 (6)	4.7 (2)

Case (n)	Bacteria other than mycobacteria (MYCOACID)		
	culture positive % (n)	smear positive % (n)	culture positive in 2% Ogawa medium
<i>M. tuberculosis</i> (135)	1.5 (2)	0.7 (1)	3.0 (4)
MOTT (43)	0	11.6 (5)	2.3 (1)

Table 4 Cases of Ogawa K medium positive or smear positive at 8 weeks among MGIT and/or MYCOACID negative cases

Case	Clinical pass	MGIT		MYCOACID		Ogawa K culture
		smear	re-cultivate to 2% Ogawa	smear	re-cultivate to 2% Ogawa	
1. TB	no treatment	+	+			+
2. TB	4 week treatment	+	+			+
3. TB	3 week treatment	-	-			+
4.* MDR-TB	2 month treatment or more	-	-	-	-	+
5.* MDR-TB	2 month treatment or more			+	+	+
6. TB	6 week treatment	+	+			-
7. TB	2 month treatment or more	+	-			-
8. TB	2 month treatment or more	+	-			-
9. TB	2 month treatment or more	+	-	+	-	-
10. TB	2 month treatment or more			+	-	-
11. TB	2 month treatment or more			+	-	-
12. TB	2 month treatment or more	+	-			-
13. MDR-TB	2 month treatment or more	+	-			-
14. MDR-TB	2 month treatment or more	+	-	+	-	-
15. MOTT	2 month treatment or more	+	-			-
16. MOTT	2 month treatment or more	+	-			-
17. MOTT	2 month treatment or more	+	+			-
18. MOTT	2 month treatment or more			+	-	-

\* From same patient

症例6から18までの13例は、8週目の検鏡時に初めて液体培地中に抗酸菌の存在が認められた例である。これらの症例はすべて治療開始から6週以降で、塗抹・小川K培養が陰性化した後の検体であった。この中には症例6と17のように、8週目に2%小川培地に継代培養した結果陽性になった例もあるが、残り11例は継代培養も陰性であった。

### 考 察

1998年から、当院では小川K培養の前処理過程の中にスプタザイム処理を導入し、喀痰の均質化を図ってきた。この均質化と遠心集菌操作により、塗抹・培養の陽性率も上がり、小川K培地への雑菌混入率も格段に減少したと思われる<sup>12) 19)~21)</sup>。今回はスプタザイム処理を前提として、マイコアシッドとMGITと小川S培地

の成績を、従来から当院で行っている小川 K 培地の成績と比較した。さらに、液体培地を適用した場合の臨床的有用性を治療経過別に検討して、当院における結核菌迅速培養法の試案を作成した。

まず培養陽性率についてみると、結核菌群では MGIT > マイコアシッド > 小川 K 培地の順で、MGIT とマイコアシッドの両液体培地間に有意差は認められなかった。マイコアシッドと小川 K 培地の間にも有意差はなかった。MGIT の場合、酵素処理した喀痰の沈渣に PBS 0.6 ml を加えてその 0.5 ml を培養液に添加したが、マイコアシッドの場合には、沈渣に 2 倍量の酸処理剤を加えて、その 0.2 ml しか培養液に添加しなかった。その結果、MGIT に加える喀痰量の方がマイコアシッドより約 5 倍も多くなっていた。MGIT の培養陽性率がマイコアシッドよりも若干高かったのは、液体培地に添加する喀痰量の差も影響したものと思われる。

一方、MGIT と小川 K 培地の間は、結核菌群でも非結核性抗酸菌でも MGIT の方が有意に培養陽性率が高かった。このことは、すでに斎藤・阿部等によって報告されている結果と一致する<sup>2)~9)</sup>。しかし未治療結核症に限ってみれば、すべての培地間で有意差はなかった。さらに、培養陽性率は MGIT > 小川 S > マイコアシッド > 小川 K の順で、小川 S 培地の陽性率は MGIT に次いで高かった。またこれまでの報告では、いずれかの培地で発育した菌株数を分母として計算した場合、小川培地の培養陽性率は 60% 台またはそれ以下のものが多かった<sup>5) 9) 10) 12)</sup>。当院における小川 K 培地の成績が 75.4% の高率を示しているのは、スプタザイムによる遠心集菌操作を加えた結果であると思われる。以上のことから、培養陽性率に限って考えるならば、工夫次第で卵培地でも液体培地に大きく劣ることはないと思われる。

一方平均培養日数では、結核菌群の場合マイコアシッド < MGIT < 小川 K 培地の順で、マイコアシッドで 14 日、MGIT で 13 日小川 K 培地よりも培養日数が短かった。非結核性抗酸菌の場合には MGIT < マイコアシッド < 小川 K 培地の順で、小川 K 培地より MGIT で 11 日、マイコアシッドで 10 日小川 K 培地よりも培養日数が短かった。MGIT についてはすでに多くの報告がなされているが<sup>2)~9)</sup>。今回液体培地にマイコアシッドを加えた検討でも、培養日数における液体培地の卵培地に対する優位性が示された。

次に雑菌混入率について MGIT とマイコアシッドを比較すると、MGIT の場合、培養雑菌率と検鏡雑菌率が高く、頻度が高くて検鏡が困難であった。MGIT の雑菌率については、1~2% 台の低い報告<sup>4)~9)</sup>と BACTEC 460 TB に比べて高く、8.1% を示したという報告<sup>3)</sup>があるが、本報では、検鏡による雑菌率は 12.7% にも及んだ。

MGIT は、複合抗菌剤として PANTA を使用しているが、マイコアシッドは、抗真菌剤のみで口腔内常在菌を抑える薬は使用していない。一方喀痰の前処理過程は、MGIT は NALC-NaOH 処理のみであるが、マイコアシッドは NALC-NaOH 処理の後に 15 分の酸処理も加えている。複合抗菌剤を使用していないマイコアシッドの方が MGIT より雑菌率が低い理由は、この前処理方法の違いにあると思われる。2 回のスプタザイム処理により液体培地 MB/BacT の雑菌率が 40% から 2% に抑えられたとする報告<sup>11) 12)</sup>や、MB Redox で使用説明書の 2 倍量の NALC-NaOH 処理を勧めている報告もあり<sup>10)</sup>。MGIT の場合にも、さらにもう一工夫する必要があるだろう。当院のように、結核専門病院で喀痰の粘度が高く雑菌汚染に悩まされている施設では、マイコアシッドの酸処理は有効であったと思われる。

ただし雑菌混入に関しては、薬剤感受性試験に進む段階で、固形培地に継代培養した時に雑菌が生育してこなければよいとする考え方もある。MGIT の小川培養雑菌率は 6.7% なので、この考え方に基づけば、今の雑菌率でも問題は少ないといえるだろう。MGIT は、陽性検体検出過程が自動化されているという利点もあるので、培養陽性率・培養日数ともに有意差がない以上、マイコアシッドと MGIT どちらの液体培養法を選択するかは、各検査室の物理的・人的条件に拠るところであろう。

液体培地は、培養液中の菌量が不明で、直接 DDH マイコバクテリア試験に進むことができない。また、複数菌感染の可能性や雑菌混入の可能性があり、直接液体培地から薬剤感受性試験に進むと、感受性菌を耐性菌とみなす危険性がある。そこで、なんらかの方法でコロニーを得ることが必要となる。今回未治療結核症で検討した結果、液体培地陽性検体を小川培地に継代培養した方が、直接小川培地に培養するよりも早くコロニーを得られることがわかった。しかしルーチン検査にこの方法を導入するには、培養に要する手間と費用の点で問題がある。その点、今回検討対象となった小川 S 培地は、卵培地であるにもかかわらず培養陽性率も高く、培養日数も小川 K 培地より有意に短かった。平均 18 日でコロニーを得ることができ、4 週間で 90% の累積培養陽性率をあげる小川 S 培地は、CDC 勧告にそって検査を進めていく上で、液体培地と並んで非常に有力な培養手段となるであろう。また小川 S 培地は従来の小川培地の約半分の大きさなので、多くの検体を処理する必要のある場合には保存場所を取らないという利点もある。

本実験では、小川 K 培地陽性で MGIT が陰性になった、未治療結核症例と治療開始 3 週目と 4 週目の各 1 例を経験した。特に Table 4 の症例 1 のように、初回 3 連痰の検体が液体培養で見逃される場合もあることを銘

記しておかなければならない。培養陽性率が高く培養日数が短いという理由で、すべてを液体培地だけに頼ってしまうのは危険であろう。また、症例4と5の患者は1996年からの多剤耐性・持続排菌症例で、この場合液体培地よりも小川培地に生育しやすい菌株である可能性が考えられる。

一方、症例6から18までの13例は、すべて治療開始6週目以降で、塗抹・小川K培養が陰性化した後の検体であった。継代培養陽性の2例を除くと、8週目の検鏡では死菌をみていた可能性が高い。MGITの場合にはセンサーの感度を上げれば、このような例も培養陽性となるのかもしれないが、治療によって活性の低下した菌を検出しているだけで、その臨床的な意義は少ないと思われる。今回は検討のために、培養終了時点ですべての液体培地を検鏡し、2%小川培地に継代培養したが、特に目視で菌塊が確認されないかぎり、日常検査に液体培養陰性例の検鏡や継代培養を導入する必要はないであろう。

液体培養は、その感度の良さと培養日数の短さに最大の価値があるが、すべての症例に適用するには時間的・経済的に問題がある。そこでこれまでの結果から、治療経過ごとに液体培養の利点を検討してみた。

未治療症例では、より早く培養結果を知り薬剤感受性試験に進むことが重要である。MGIT マイコアシッド共に平均11日で培養陽性になり、3週間で累積培養陽性率が97%を超えるので、初期診断時に液体培養を導入する臨床的意義は大きい。しかし前述のように未治療症例でも液体培地に生育しない菌株もあるので、すべて液体培地に頼ることなく、初回3連痰のうち1~2回は小川培地を併用することが望ましい。この時小川S培地を用いれば、小川K培地よりも平均8日早くコロニーを得ることができる。

一方確定診断後の検体では、累積培養陽性率は3週間でMGITは67%であり、5週目でようやくMGIT92%、マイコアシッド95%となり、液体培地の持つ培養日数の短さという利点が減少する。また治療開始2カ月未満の場合、MGITより小川K培地の培養陽性率のほうが高い。治療開始2カ月以降では、MGITやマイコアシッドのほうが培養陽性率は高くなるが、これは単に液体培地の方が、化学療法でダメージを受けた菌の発育支持能が高いという現象で、その臨床的意義は少ないと考えられる。培養結果を早く知りたいという特別の要請がなければ、治療経過をみるためには、従来の小川K培地で充分対応し得ると思われる。

当院の多剤耐性結核の場合には、1年以上の持続排菌患者が多い。この場合、小川K培地では発育が悪く培養陽性になるまで常に8週間以上かかる菌や、その逆に液体培地では生育せず小川K培地にのみ生育する菌な

ど、菌株によるばらつきが大きくなる。しかし全体としては、多剤耐性結核菌は薬剤によるダメージを受けていないために、未治療症例と同じ傾向を示した。液体培養の培養日数は短く、累積培養陽性率も3週間で93%を超えたが、両液体培地と小川K培地の培養陽性率に有意差はなかった。多剤耐性結核菌も、小川培地では発育しにくい菌株や、特に培養結果を早く知る必要がある場合を除いて、小川K培地で充分であろう。

次に液体培養の費用の問題を考えると、MGITの場合、MGIT(100検体入り):1本556円、分離検査用剤(PANTA):1検体57円、発育促進剤(OADC):1検体183円、コロニーを得るための2%小川培地:1本190円(またはMiddlebrook7H10寒天培地:1枚300円)の1検体当たり合計986円となった。一方マイコアシッドの場合、最初から液体培地(マイコアシッド)と卵培地(小川S培地)と分離検査用剤がセットになっているので、マイコアシッド+小川S培地+分離検査用剤:1検体700円、酸処理剤(アシッドプラス):1検体10円の合計710円となった。さらに、いずれの培養方法でも、最初にすべての喀痰に対して酵素処理剤(スプタザイム:1検体60円)を加えて遠心集菌処理することは、喀痰を均質化し、塗抹・培養陽性率を上げ、雑菌率を抑えるためになくしてはならないものとする。この時、必ずしも高速冷却遠心機を用いなくても、RT.3000rpm、20分間で充分効果を期待することができる。

今回の検討結果から、当院における結核菌迅速培養法の試案を作成した(Fig.4)。初回3連痰の場合には、液体培地と小川培地を併用することが望ましい。MGITとマイコアシッドでは、培養陽性率・培養日数共に有意差はなかったが、前処理の時間が15分間長くても、マイコアシッドの方が培養雑菌率も検鏡雑菌率も低くて扱いやすく、1検体当たりの費用も安いので、マイコアシッドを推奨したい。マイコアシッド陽性の検体から直接アキュプロープテストを実施すると12~13日以内に同定結果を報告することができる。同時に小川S培地を併用することで、小川K培地よりも平均8日早く固形培地の培養結果が出て、このコロニーからBrothMIC MTB-1<sup>22)</sup>23)法を実施すれば、25~27日で薬剤感受性試験の結果を報告することが可能である。以上、新結核菌検査指針ののっとり、初期診断時にマイコアシッドと小川S培地を導入した場合には、CDC勧告に従って15日以内に培養結果、30日以内に薬剤感受性結果を報告できることが分かった。

#### ま と め

液体培養MGIT SYSTEMとマイコアシッドシステムを比較検討した結果、結核菌群・非結核性抗酸菌多

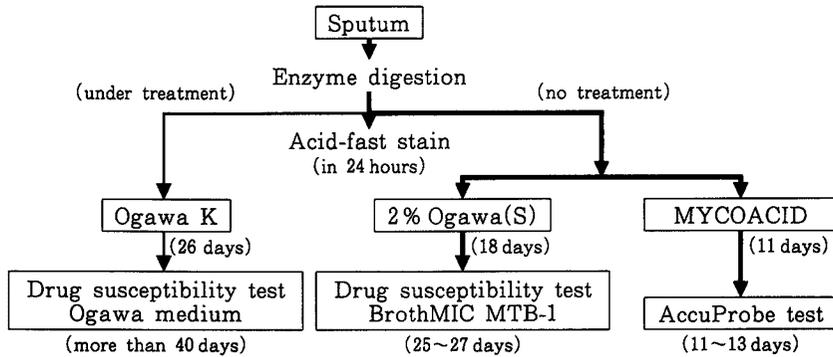


Fig. 4 A proposal of rapid culture method of mycobacteria

剤耐性結核菌とともに、培養陽性率にも培養日数にも有意差はなかった。

両液体培地は、小川S培地と小川K培地に比較して、有意に培養日数が短かった。

マイコアシッドは、酵素処理とNALC-NaOH処理に加えて酸処理も行うため、MGITよりも前処理時間が15分長くなるが、培養雑菌率や検鏡雑菌率が低く検鏡が楽であった。

MGITは、陽性検体検出過程が自動化されており、大量の検体を処理するためには便利であるが、1検体当たりの費用はマイコアシッドの方が約276円安価であった。

小川S培地は、小川K培地に比べて、未治療結核症例の培養日数が有意に8日短く、累積培養陽性率も液体培養に次いで高く、また容器が小さいため保存場所を取らないという利点があった。

## 文 献

- Centers for Disease Control and Prevention: CDC guidelines for tuberculosis control in health care facilities. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1994; 43: 1-13.
- 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.
- Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al.: Multicenter Evaluation of the BACTEC MGIT 960 System for Recovery of Mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 748-752.
- 斎藤 肇, 相原嘉子, 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.
- 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培養システムの検討. *感染症学雑誌*. 1996; 70: 360-365.
- 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; 6: 93-99.
- 斎藤 肇: 結核菌培地. *結核*. 1998; 73: 329-337.
- 青野昭男, 桑原龍児, 光田昌江: MGIT 抗酸菌システムと従来法の比較. *日本臨床微生物学雑誌*. 1998; 18: 269-273.
- 三浦隆雄, 長谷川直樹, 鈴木喜久雄, 他: MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 抗酸菌検査システムの検出率と迅速性の評価. *日本臨床微生物学雑誌*. 2000; 10: 13-18.
- 阿部千代治, 平野和重, 和田雅子, 他: 酸化還元インジケーターを用いた抗酸菌迅速培養システム MB Redox の評価. *結核*. 1999; 74: 707-713.
- 斎藤 宏, 山根誠久, 金田光穂, 他: 抗酸菌の培養検出法の比較検討—全自動抗酸菌培養システム, MB/Bact を中心として— *日本臨床検査自動化学会会誌*. 1998; 23: 783-787.
- 斎藤 宏, 山根誠久: Semi-Alkaline Protinase 処理を併用した N-Acetyl-L-Cysteine-NaOH (NALC-NaOH) 喀痰処理法での全自動抗酸菌培養システム, MB/Bact の評価. *JARMAM*. 1999; 10: 103-110.
- 青木正和, 片山 透, 山岸文雄, 他: PCR 法を利用した抗酸菌 DNA 検出キット (アンプリコアマ

- イコバクテリウム)による臨床検体からの抗酸菌迅速検出. 結核. 1994; 69: 59.
- 14) Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al.: Tuberculosis direct test and Roshe PCR-microwell plate hybridization method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for direct detection of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1996; 34: 130-133.
  - 15) D'Amato RF, Wallman AA, Hochstein LH, et al.: Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis PCR test. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1832-1834.
  - 16) 一山 智: 肺結核症の診断プロトコル. Medical Technology. 2000; 28: 1324-1330.
  - 17) 宮本潤子, 橋本敦郎, 水兼隆介, 他: MTD 検査における偽陽性および偽陰性検体についての臨床的検討. 結核. 1999; 74: 611-616.
  - 18) 日本結核病学会予防・治療合同委員会: 核酸増幅法による結核菌検査の臨床での利用について. 結核. 1995; 70: 711-712.
  - 19) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 「新結核菌検査指針」, 結核予防会, 東京, 2000.
  - 20) 日本結核病学会治療・社会保険・抗酸菌検査法検討合同委員会: 新しい結核菌検査法の臨床での利用について. 結核. 2000; 75: 681-684.
  - 21) 坂本雅子, 東堤 稔, 牧園和枝, 他: 抗酸菌分離培養時における雑菌汚染対策—特に *pseudomonas aeruginosa*. 第18回臨床抗酸菌研究会. 1995: 5-9.
  - 22) 山根誠久, 仲宗根勇, 斉藤 宏, 他: Middlebrook 合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験 (第2報): 薬剤吸着マイクロプレートを用いた微量液体希釈法での最小発育阻止濃度の測定 (国内3施設における共同評価9). 臨床病理. 1998; 46: 719-727.
  - 23) 山根誠久, 一山 智, 河原 伸, 他: Middlebrook 合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験 (第3報): 微量液体希釈法を原理とするBrothMIC MTBの多施設評価—施設間再現性とAgarPropotion法との判定互換性の解析. 臨床病理. 1999; 47: 745-766.