

Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 法による 臨床検体からの抗酸菌培養成績の検討

— MGITでの菌量定量の可能性について—

^{1,2}露口 一成 ¹池田 雄史 ¹中谷 光一 ¹坪井 知正
¹佐藤 敦夫 ¹倉澤 卓也

要旨：液体培地を用いた抗酸菌培養法である Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 法は、小川固形培地による培養法に比して感度、迅速性に優れており、わが国でも近年普及しつつあるが、一方で菌量の定量ができないという短所もある。今回われわれは、当院における MGIT 法の培養成績を小川法と比較するとともに、MGIT 法での培養所要日数と菌量との関係につき検討した。対象は245人の患者から得られたのべ413呼吸器検体で、それぞれに対し両培養法を施行した。127検体から結核菌、42検体から *M. avium* complex (MAC)、6検体から *M. kansasii* を検出した。結核菌、MACにおいて、MGIT法が小川法に比して有意に検出率が高く、有意に培養所要日数が短かった。また、MGIT法での培養所要日数は、結核菌、MACとも、塗抹陰性例に比して菌量が多いと考えられる塗抹陽性例で有意に短かった。そして、結核菌において、小川培地上のコロニー数判明例に限ると、コロニー数とMGIT法での培養所要日数の間には有意な負の相関があった。以上より、MGIT法の優れた感度、迅速性を再確認するとともに、MGIT法での培養所要日数による菌量の定量化の可能性が示唆された。

キーワード：MGIT、抗酸菌培養法、菌量の定量

はじめに

わが国の臨床検体からの抗酸菌培養は、これまでもっぱら小川培地が用いられてきたが、培養陽性が判明するまでに長期間を要するという欠点があった¹⁾。MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 法は液体培地を用い酸素蛍光センサーで検出するシステムで、従来の固形培地による培養法に比べて検出時間の短縮、検出率の向上を図ることができると報告されており^{2)~5)}、全国で幅広く普及するに至っているが、菌量の定量ができないことなどの欠点もある。当院では平成11年4月よりMGIT法を導入し従来の小川法と併用している。今回2つの方法を比較検討するとともに、MGITでの検出までに要する日数と小川法での菌量の相関を調べMGIT法での菌量推定の可能性につき検討を加えたので報告する。

方 法

対象は平成11年4月から平成12年2月までの間に国立療養所東京都病院呼吸器科を受診した入院、外来患者245名から得られたのべ413呼吸器検体である。内訳は喀痰316、気管支洗浄液52、気管支ブラシ洗浄液45であった。

検体はまず等量のスプータザイム処理を行って均質化したのち、3000 rpmにて15分間遠沈し、この沈渣の一部を用いてチール・ネールゼン法による塗抹検査を行った。さらにこれにNALC-NaOH処理を行ったのちに、小川培地とMGITに接種した。266検体ではアンプリコア™によるPCR検査を実施した。なお、MGITは試験管底のシリコン中に溶存酸素に感受性の化合物が埋め込まれており、菌の発育により溶存酸素が消費されると蛍光を発生し、紫外線ランプにより検出することによって発

¹国立療養所東京都病院呼吸器科、²(現)国立療養所近畿中央病院臨床研究センター

連絡先：露口一成、国立療養所近畿中央病院臨床研究センター、〒591-8555 大阪府堺市長曾根町1180 (E-mail: tsuyuguchi@kch.hosp.go.jp)

(Received 26 Jun. 2002/Accepted 28 Feb. 2003)

育を確認するようになっている。培養陽性検体については、抗酸菌染色を行って抗酸菌であることを確認した後、アキュプローブ法・DDH法による同定検査を施行した。ただし、診断確定患者からの発育菌については同一菌種であるとみなした。

検出率の比較には McNemar の χ^2 検定、検出までの日数の比較には t 検定を用いた。また、発育までの日数と菌量の相関は、Spearman の相関係数の検定により検討した。いずれも $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

(1) 培地の汚染率

雑菌繁殖による培地汚染のため判定不能となった検体は、小川法では413検体中4検体(1.0%)、MGIT法では16検体(3.9%)であった。

(2) 検出菌種別各培養法での検出率

今回の検討で検出されたのは、結核菌、*M. avium* complex (MAC)、*M. kansasii* の3菌種のみであった。いずれかの培養法で陽性となったものを陽性検体とし、陽性検体全体に対するそれぞれの培養法の検出率を算出した(Table 1)。結核菌では陽性127検体中、小川法で106検体(83.5%)、MGIT法で119検体(93.7%)が陽性であり、MGIT法の検出率が有意に高かった。同様にMACでは陽性42検体中小川法が30検体(71.4%)、MGIT法が41検体(97.6%)が陽性とMGIT法の検出率が有意に高く、*M. kansasii*では陽性6検体中小川法が4検体(66.7%)、

MGIT法が6検体(100%)で陽性であった(*M. kansasii*では検体数が少なく有意差検定は行えなかった)。

さらに塗抹陽性検体と陰性検体に分けてみると、塗抹陽性検体ではいずれも90%以上の検出率であったが、塗抹陰性例においてMGIT法の検出率が優れていた(Table 1)。

なお小川法でのみ陽性であったのは9検体であったが、うち4検体はMGIT法が陰性、5検体はMGIT培地汚染のため判定不能となったものである。また、MGIT法陰性・小川法陽性となった4検体は、結核菌3検体(小川法での菌量1コロニー、25コロニー、3+)、MAC1検体(同6コロニー)であった。

(3) PCR法との比較について

次にPCR法との比較につき検討した。PCR法を行った266検体中、結核菌陽性が58検体、*M. avium*または*M. intracellulare*陽性が21検体あった。そこでこの266検体につき結核菌、MACそれぞれについて、小川法、MGIT法のいずれかの培養法にて陽性となったものを陽性検体として全陽性検体に対する検出率を比較した。なお結核菌でPCR法陽性、両培養法陰性となったものが1検体存在した。これは別の日の検体で排菌が確認できている結核患者の検体であり、真の陽性と考えるかどうか判断が困難であったが、ここではこの検体は除外して検出率を算出した。Table 2に示すとおり、MGIT法はMACにおいてPCR法より有意に優れた検出率を示した。結核菌においては有意差はなかった。小川法とPCR法の検

Table 1 Detection of mycobacteria according to smear results in the Ogawa egg medium and MGIT system

Species and smear results	Total no. of isolates recovered in all media	No. of isolates (% of total) recovered in:		p*
		Ogawa	MGIT	
<i>M. tuberculosis</i>	127	106 (83.5)	119 (93.7)	0.026
Positive	68	65 (95.6)	64 (94.1)	NS
Negative	59	41 (69.5)	55 (93.2)	0.003
<i>M. avium</i> complex	42	30 (71.4)	41 (97.6)	0.0055
Positive	12	11 (91.7)	12 (100.0)	NS
Negative	30	19 (63.3)	29 (96.7)	0.002
<i>M. kansasii</i>	6	4 (66.7)	6 (100.0)	ND
Positive	2	2 (100.0)	2 (100.0)	ND
Negative	4	2 (50.0)	4 (100.0)	ND

*NS, not significant ; ND, not done

Table 2 Positivity rate of Ogawa egg method, MGIT system and Amplicor PCR method

Species	Total no.	No. of isolates (% of total) in:				
		Ogawa	p*	MGIT	p*	PCR
<i>M. tuberculosis</i>	65	52 (80.0)	NS	60 (92.3)	NS	57 (87.7)
<i>M. avium</i> complex	29	20 (69.0)	NS	28 (96.6)	0.046	21 (72.4)

*For comparison with Amplicor PCR ; NS, not significant

出率は MAC, 結核菌いずれにおいても有意差を認めなかった。

(4) 迅速性について

次に, 小川法, MGIT法いずれも陽性となった, 結核菌 98 検体, MAC 29 検体, *M. kansasii* 4 検体について, 培養陽性となるまでの所要日数を比較した (Table 3)。結核菌, MAC とともに MGIT 法が小川法に比して有意に所要日数は短かった。*M. kansasii* でも平均所要日数は MGIT 法のほうが短かったが, 検体数が少ないため有意差検定は行えなかった。

(5) MGIT 法での発育速度と菌量の関係

小川法では培地上に発育した菌のコロニー数の定量が可能であるが, MGIT 法では発光の有無のみによるため定量が不可能である。そこで, MGIT 法で培養陽性となるまでの日数と, 菌量との間の相関につき検討した。

まず, 結核菌と MAC それぞれについて, 塗抹陽性検

体と陰性検体との間で培養陽性となるまでの所要日数を比較した (Table 4)。いずれも, 菌量がより多いと考えられる塗抹陽性検体が, 陰性検体に比して所要日数は有意に短かった。

次に, 小川培地, MGIT とともに陽性の検体のうち小川培地でコロニー数が測定できているものにつき, MGIT 法で陽性となるまでの日数と小川培地上のコロニー数との相関係数の検定を行った。結核菌では, 所要日数とコロニー数の間に有意な負の相関がみられたが, MAC では有意な相関はみられなかった (Fig.)。

考 察

抗酸菌の分離培養にあたっては, わが国では現在に至るまで, 凝固卵培地である 1% あるいは 3% 小川培地, あるいはその変法である工藤培地が広く用いられてきており, その有用性は確立されている。しかしこれら卵培

Table 3 Detection time in the Ogawa egg medium and MGIT system

Species	Mean no. of days to detection (range)		p*
	Ogawa	MGIT	
<i>M. tuberculosis</i>	20.2 (10-52)	10.4 (3-28)	< 0.001
<i>M. avium</i> complex	18.3 (5-32)	4.9 (2-8)	< 0.001
<i>M. kansasii</i>	11.3 (8-16)	7.3 (6-8)	ND

*ND, not done

Table 4 Comparison of detection time in the MGIT system according to smear results

Species	Mean no. of days to detection (range)		p
	Smear positive	Smear negative	
<i>M. tuberculosis</i>	9.6 (3-31)	14.4 (6-38)	< 0.001
<i>M. avium</i> complex	4.6 (3-8)	7.9 (2-31)	0.0069

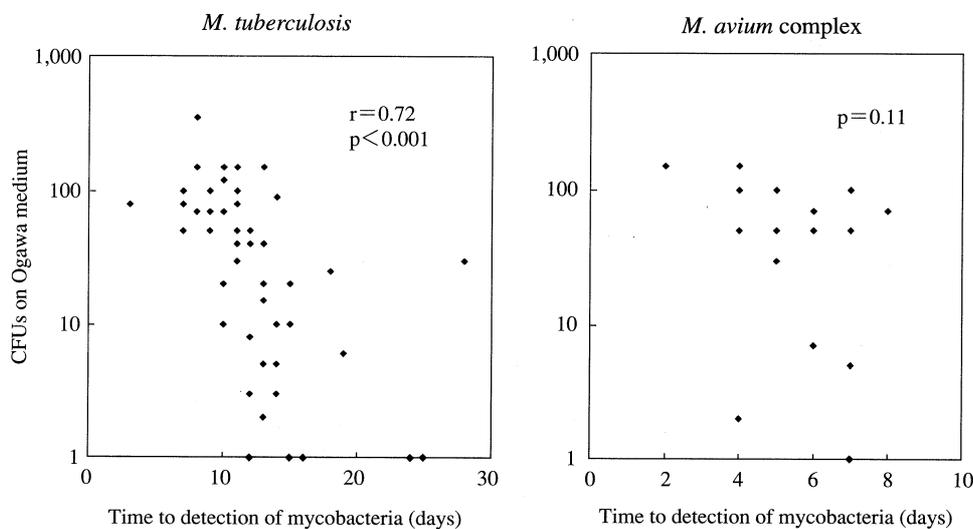


Fig. Correlation between CFUs on Ogawa egg medium and detection time of mycobacteria in the MGIT system

地では、検体採取から菌の発育が確認されるまで長期間を要するという欠点がある。特に結核菌では、薬剤感受性検査にも卵培地を用いた場合、検体採取から薬剤感受性検査判明まで最短でも実に2カ月近くを要し、診断の遅れ、入院の長期化にもつながっている¹⁾。

欧米では液体培地を用いた培養法である BACTEC 460 TB system (BACTEC法) がすでに広く臨床現場で使われており、固形培地に比して感度、迅速性ともに優れた結果を得られている⁶⁾。しかし培地に放射性物質 (¹⁴C) を用いているため、わが国での使用は困難であり普及するに至っていない。

MGIT法はベクトン・ディッキンソン社により開発された 7H9 液体培地を用いる抗酸菌培養システムである。固形培地に比して感度、迅速性ともに優れていることが報告されており^{2)~5)}、わが国でも近年急速に普及しつつある。今回のわれわれの検討でも同様に、MGIT法が優れた感度、迅速性を有しており、また核酸増幅法に比べて感度は劣らないことが再確認された。

しかし、MGIT法にもいくつかの問題点があり、その1つとして、菌量の定量ができないことがあげられる。肺結核の治療効果判定や肺非定型抗酸菌症の診断において従来小川培地上での排菌量が重要視されてきた^{7)~9)}。しかし、MGIT法では菌の発育の有無しか判定できず、菌量の多寡は不明である。そこで、MGIT法による菌量の定量化の可能性を探るために、小川法での菌量とMGIT法での発育所要日数との間の相関につき検討した。まず、塗抹陰性検体と、菌量がより多いと考えられる塗抹陽性検体との間で比較したところ、結核菌、MACともに塗抹陽性検体において有意に所要日数が短かった。また、小川培地にて菌量が判明している検体において菌量と所要日数の間の相関を検討したところ、結核菌において有意な負の相関がみられた。以上より、菌量と所要日数の間の相関の存在が示唆され、所要日数をもって菌量を推定できる可能性が示唆された。

Epsteinらは、MGIT法での培養所要日数が抗結核治療に伴って延長していくことが、治療への良好な反応を予測するマーカーとなり得ると報告しており、この所要日数の変化は、菌量および発育速度に抗結核薬が与える影響を反映していると考察している¹⁰⁾。今回のわれわれの結果もこの報告と合致するものと考えられる。

MGIT法のもう1つの問題点としては汚染率が高いことがあげられる。諸外国の報告では、むしろ固形卵培地である Löwenstein-Jensen 培地のほうが汚染率が高いとするものが多い²⁾³⁾が、わが国では、小川培地が汚染に比較的強いいためか、MGIT法のほうが汚染率が高いとする報告が多い¹¹⁾¹²⁾。今回の検討でも、汚染のためにMGIT培養不可能となり小川法のみで陽性となったもの

が5検体あった。培地汚染の許容範囲は2~5%の間であるとされており汚染率が低いほどよいわけではないが、特にMGIT法の場合、培地が汚染されると固形培地と違って抗酸菌のコロニーのみを分離することが困難であるため、検体の処理にあたってはより注意深く行うことが重要である。

小川法とMGIT法の使い分けにつき考えると、まず初期診断時には、感度、迅速性に優れたMGIT法が有用である。しかし、培地汚染検体も含めてMGIT法陰性、小川法陽性検体の存在、結核菌・非定型抗酸菌混合排菌検体の存在も考えると、小川法も併用することが望ましい。次に、経過観察時では、小川培地は、コストおよび定量性においてすぐれている。しかし、MGITに関しては全自動検出器 (BACTEC MGIT960) も開発されており、その使い分けについては、人件費も含めたトータルのコストも考慮に入れ、今後検討する必要がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、当院でのMGIT、PCRを含めた抗酸菌検査を行っていただいている、当院検査科細菌検査室の千賀宏氏に深謝いたします。

なお本論文の要旨は、第75回日本結核病学会総会(2000年4月、大阪)にて発表した。

文 献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編：「新 結核菌検査指針2000」。結核予防会，東京，2000。
- 2) 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.
- 3) Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, et al. : Comparison of the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. J Clin Microbiol. 1997 ; 35 : 364-368.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Siddiqi SH, Hwangbo CC, Silcox V, et al. : Rapid radiometric methods to detect and differentiate *Mycobacterium tuberculosis* / *M. bovis* from other mycobacterial species. Am Rev Respir Dis. 1984 ; 130 : 634-640.
- 7) 非定型抗酸菌症研究協議会 : 非定型抗酸菌症診断基準についての提案. 結核. 1976 ; 51 : 61.
- 8) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班 : 非定型抗酸菌症(肺感染症)の診断基準. 結核. 1985 ; 60 : 51.
- 9) American Thoracic Society : Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J

- Respir Crit Care Med. 1997 ; 156 : S1-S25.
- 10) Epstein MD, Schluger NW, Davidow AL, et al. : Time to detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum culture correlates with outcome in patients receiving treatment for pulmonary tuberculosis. Chest. 1998 ; 113 : 379-386.
- 11) 鈴木克洋, 露口一成, 松本久子, 他 : Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による結核菌の迅速薬剤感受性検査. 結核. 1997 ; 72 : 187-192.
- 12) 齊藤 宏, 山根誠久 : 抗酸菌の培養検出法の比較検討 (第2報) - 全自動抗酸菌培養システム, BACTEC MGIT 960 System を中心として - . 臨床微生物迅速診断研究会誌. 2000 ; 11 : 19-26.

————— Original Article —————

EVALUATION OF THE MYCOBACTERIA GROWTH INDICATOR TUBE SYSTEM
FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF MYCOBACTERIA
FROM CLINICAL SPECIMENS

^{1,2}Kazunari TSUYUGUCHI, ¹Takeshi IKEDA, ¹Koichi NAKATANI,
¹Tomomasa TSUBOI, ¹Atsuo SATO, and ¹Takuya KURASAWA

Abstract The Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system, a broth system for detection of mycobacterial growth, has been shown to be more sensitive and rapid compared with the egg-based Ogawa solid media, while the lack of ability to quantitate bacterial growth is the problem. We compared mycobacterial growth in the MGIT and the Ogawa systems, and evaluated the relationship between detection time in the MGIT system and bacterial CFU on Ogawa egg medium. A total of 413 respiratory specimens from 245 patients were included in the study, of which *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), *M. avium* complex (MAC) and *M. kansasii* were recovered from 127, 42 and 6 specimens, respectively. Recovery rates were significantly higher and detection time was significantly shorter in the MGIT than in the Ogawa for MTB and MAC. Detection time in the MGIT was significantly shorter in smear positive specimens than in smear negative ones for MTB and MAC. There was a significant negative

correlation between CFUs on Ogawa egg medium and detection time in the MGIT system for the MTB, therefore, this system may have an ability to quantitate live mycobacteria according to the detection time.

Key words: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT), Culture techniques for mycobacteria, Quantification of mycobacteria

¹Department of Respiratory Disease, National Minami-Kyoto Hospital, ²Clinical Research Center, National Kinki-Chuo Hospital for Chest Diseases

Corresponding to: Kazunari Tsuyuguchi, Clinical Research Center, National Kinki-Chuo Hospital for Chest Diseases, 1180 Nagasone-cho, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: tsuyuguchi@kch.hosp.go.jp)