

## バクテック MGIT 960 による薬剤感受性検査 における接種菌量の検討と検査の再現性

<sup>1</sup>富田 元久   <sup>1</sup>竹野 華   <sup>1</sup>鈴木 克洋   <sup>1</sup>坂谷 光則  
<sup>2</sup>木下 幸保   <sup>3</sup>小林 郁夫

**要旨：**〔目的〕結核菌の迅速薬剤感受性検査であるミジットシリーズでは分離用 MGIT が陽性になってから、1～2 日後はそのまま、3～5 日後は 5 倍希釈液を接種菌液とすることになっており、菌量が安定せず、薬剤感受性検査の結果が変動する危険性が考えられた。今回われわれは、分離用 MGIT 陽性チューブから調製した接種菌液を用いて、主要 5 薬剤 (INH, RFP, SM, EB, PZA) の感受性結果を比較した。〔対象・方法〕当院で結核の治療中に依頼された 19 例の検体を用いた。分離用 MGIT が陽性を示した後 1 日目、3 日目、5 日目の菌液での再現性とミジットシリーズと従来法との比較を行った。〔結果・考察〕分離用 MGIT が陽性を示した後 1 日目、3 日目、5 日目のチューブから調製した接種菌液の平均菌量 (CFU/ml) はそれぞれ  $3.6 \times 10^6$ ,  $1.6 \times 10^6$ ,  $3.1 \times 10^6$  であった。3 接種菌でミジットシリーズの結果は完全に一致した。さらに主要 5 薬剤についてミジットシリーズと従来法の全体の一致率は 90% 以上であった。これらの結果は、バクテック MGIT 960 システムは薬剤耐性結核の迅速診断に有用であることを示している。

**キーワード：**結核菌, バクテック MGIT 960, ミジットシリーズ, 薬剤感受性検査, 再現性

### はじめに

1993年に米国の疾病対策予防センター (CDC) は、結核菌検査に携わる施設に対して薬剤感受性検査結果を 15日～30日以内に臨床医に報告するように勧告した<sup>1)</sup>。わが国では2000年の結核菌検査指針改訂で、世界で広く用いられている卵培地による比率法を採用したが<sup>2)</sup>、この方法では判定までに最長4週間を費やすため、迅速性においてCDCの勧告を満足するものではない。結核菌検査指針を改訂した時点では、液体培地を用いる感受性検査法としてMGIT (日本ベクトン・ディッキンソン) 培地によるマニュアル法 (目視判定) が発売されていたが、あまり普及していなかった。2000年以降は分離用MGITへ添加するサプリメントに界面活性剤 (ステアリン酸ポリオキシエチレン) を加えたことで、分離用MGITから別途菌液の調整をせずに薬剤感受性検査に移行できるようになった<sup>3)</sup>。さらに2002年には、結果判定

が自動化されたバクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (以下ミジットシリーズ) が発売された。ミジットシリーズでは、ストレプトマイシン (以下 SM), イソニアジド (以下 INH), リファンピシン (以下 RFP), エタンプトール (以下 EB) の 4 薬剤 (以下 SIRE) とピラジナミド (以下 PZA) を加えた計 5 薬剤の検査が可能であり、今後 CDC の勧告を満足する薬剤感受性検査としてわが国でも普及していくものと思われる。

ミジットシリーズによる薬剤感受性検査の有用性について、保存菌株を用いた成績はすでに多数報告されているが<sup>4)~11)</sup>、臨床検体から直接分離した菌液を用いての検討報告は少ない。また、ミジットシリーズの取扱説明書では分離用 MGIT が陽性を示してから 1～2 日後はそのままの培養液を、3～5 日後では培養液を滅菌生理食塩水で 5 倍希釈したものを接種菌液として薬剤感受性検査に用いることとされている。しかしこの方法では菌量

<sup>1</sup> 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター, <sup>2</sup> 独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター, <sup>3</sup> 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社福島ラボラトリー

連絡先: 富田元久, 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター研究検査科, 〒591-8555 大阪府堺市長曾根町 1180 (E-mail: mhtomita@kch.hosp.go.jp)

(Received 7 Jul. 2004 / Accepted 4 Oct. 2004)

が一定せず、ひいては薬剤感受性結果に影響を与える恐れがあると考えられた。今回われわれは上記諸点を解明すべく次の項目について基礎的検討を試みたので報告する。①分離用 MGIT が陽性を示してから、1日後、3日後、5日後のチューブから調製した接種菌液の菌数とそれらを用いたミジットシリーズでの薬剤感受性検査の一致率、②ミジットシリーズの薬剤感受性結果と小川培地による比率法、極東結核菌感受性ビットスペクトル-SR、極東結核菌感受性 PZA 液体培地、ピラジナミダーゼ試験の結果の比較。

## 対象と方法

### (1) 試験検体

今回の基礎検討には薬剤耐性菌が必要なことから、当院で薬剤感受性検査が既に終了し入院治療中の患者19例(うち薬剤耐性結核8例)の喀痰を用いた。また感受性検査の標準株として結核菌 H37Rv (ATCC 27294)、結核菌 INH 高度耐性株 (ATCC 35822)、結核菌 SM 高度耐性株 (ATCC 35820)、結核菌 EB 高度耐性株 (ATCC 35837) を用いた。

### (2) ミジットシリーズによる検査

喀痰を CCE 液 (日本 BCG サプライ) で雑菌処理し、一定量を3本の分離用 MGIT チューブに接種し、バクテック MGIT 960 で培養した。陽性となった分離用 MGIT について塗抹検査で抗酸菌の確認を行った。雑菌混入の除外は滅菌綿棒を用いてチョコレート寒天培地に培養液の一部を塗布することで実施した。非結核性抗酸菌の混在は PNB 培地 (極東製薬) 上にコロニーの形成がないことで除外した<sup>12)13)</sup>。結核菌の同定はキャピリア TB (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて行い<sup>14)15)</sup>、菌数の定量はミドルブルック 7H10 寒天培地を用いて菌数 (CFU) の定量を行った。ミジットシリーズの取扱説明書に従い分離用 MGIT が陽性を示した後1日目はそのまま、3日目と5日目の培養液は滅菌生理食塩水で5倍に希釈し接種菌液とし、0.5 ml を薬剤含有 MGIT 培地に、さらに100倍希釈した接種菌液0.5 ml を Growth Control 培地に接種した。ミジットシリーズの判定はバクテック

MGIT 960 で行った。

### (3) 他の方法による検査

陽性になった分離用 MGIT の培養液をマイコブロス (極東製薬) に接種し、マックファーランド0.5に達するまで培養した菌液を用い、極東結核菌用感受性一濃度培地 (以下、小川比率法)、極東結核菌感受性ビットスペクトル-SR 培地 (以下ビットスペクトル)、極東結核菌感受性 PZA 液体培地 (以下、極東 PZA) による薬剤感受性検査を実施した。ピラジナミダーゼ試験は、分離用 MGIT 陽性の菌液を小川培地で純培養し、発育したコロニーを用い、Wayne により記述された方法<sup>16)</sup>に従って実施した。薬剤感受性検査に用いた各培地の薬剤濃度は Table 1 に示すとおりである。

### (4) 結果の統計解析

平均値の差の検定は Student の t 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意と考えた。

## 結 果

### (1) ミジットシリーズの菌液調整についての検討

19例の患者検体の培養で3本の分離培地のすべてが陽性であったのは17例であり、2例は分離培地3本のうち1本が陰性であった。分離用 MGIT 陽性後1日目、3日目、5日目の培養液から調製した菌液を接種した17例中3接種菌液のいずれでも判定可能であったのが15例、3種のうちいずれかの Growth Control 培地の発育がみられず判定不能となったのが2例であった。これら4例のうち3例は MDR-TB であった。今回の比較には3接種菌液いずれでも判定できた15例を用いた。

Table 2 に示すように1日後の菌量は  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 、3日後 (5倍希釈) では  $8 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 、5日後 (5倍希釈) では  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$  の範囲であった。それらの平均菌量はそれぞれ  $3.6 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $3.1 \times 10^6$  であり、3接種菌の菌量に有意の差は認められなかった ( $p > 0.1$ )。次にミジットシリーズに接種してから判定までに要した日数を比較した (Table 3)。ミジットシリーズ SIRE (SM, INH, RFP, EB 薬剤感受性) で1日後の菌液を用いた場合、その中央値は6日、3日後の菌液で

Table 1 Drug concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) used for susceptibility testing

Drug	BACTEC MGIT 960 AST	Proportion method <sup>a</sup>	Modified <sup>b</sup> proportion method	Kyokuto PZA test
Isoniazid	0.1	0.2, 1.0	0.2, 1.0	
Rifampin	1.0	40	40	
Streptomycin	1.0	10	10	
Ethambutol	5.0	2.5	2.5	
Pyrazinamide	100			100

<sup>a</sup>Proportion method on Ogawa egg slant.

<sup>b</sup>Modified proportion method using a 48-well microplate.

**Table 2** BACTEC MGIT 960 AST set inoculum from positive MGIT culture (n=15)

Positive MGIT day	No. of CFU/ml			
	Median	Minimum	Maximum	Mean
1	$3 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^7$	$3.6 \times 10^6$
3	$1 \times 10^6$	$8 \times 10^4$	$5 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$
5	$1 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^7$	$3.1 \times 10^6$

Specimens were processed with CCE pretreatment solution (Japan BCG Supply, Tokyo). Each of the treated samples was incubated into 3 MGIT tubes, and they were incubated at 37°C. Cultures on day 3 and 5 post positivity were diluted 1 : 5 with saline.

**Table 3** Days required for BACTEC MGIT 960 AST results (n=15)

Positive MGIT day	SIRE test		PZA test	
	Median (range)	Mean	Median (range)	Mean
1	6 (4-6)	5.5	6 (4-8)	6.4
3	7 (6-8)	6.6	8 (5-12)	7.9
5	6 (6-8)	6.4	7 (4-13)	7.6

**Table 4** Comparison of the results with BACTEC MGIT 960 AST with those of other methods

Drug	MGIT vs Proportion method <sup>a</sup>				MGIT vs Modified proportion method <sup>b</sup>				
	MGIT Prop.	S S	R R	Concordance rate (%)	MGIT Mod.	S S	R S	R R	Concordance rate (%)
INH		11	4	100		11	0	4	100
RFP		13	2	100		13	0	2	100
SM		11	4	100		11	1	3	93.3
EB		12	3	100		12	0	3	100

  

Drug	MGIT vs Pzase <sup>c</sup>				MGIT vs Kyokuto PZA <sup>d</sup>			
	MGIT Pzase	S S	R R	Concordance rate (%)	MGIT Kyokuto	S S	R R	Concordance rate (%)
PZA		12	3	100		12	3	100

<sup>a</sup>Proportion method on Ogawa egg slant.

<sup>b</sup>Modified proportion method on Ogawa egg medium using a 48-well microplate.

<sup>c</sup>Pyrazinamidase activity was assayed according to Wayne<sup>9)</sup>.

<sup>d</sup>Kyokuto PZA test medium: 4 ml modified Middlebrook 7H9 broth (pH 6.0).

は7日、5日後では6日であった。それらの平均値は5.5日、6.6日、6.4日であった。ミジットシリーズ PZA (PZA 薬剤感受性) の中央値は、同じく1日後は6日、3日後8日、5日後7日、平均値は6.4日、7.9日、7.6日で有意差はみられなかった ( $p > 0.1$ )。15例の薬剤感受性結果は、INH感受性11例、耐性4例、RFP感受性13例、耐性2例、SM感受性11例、耐性4例、EB感受性12例、耐性3例、PZA感受性12例、耐性3例であり、分離用MGITで陽性後1日目、3日目、5日目の菌液を接種した感受性検査の結果は100%一致した。

#### (2) 他の検査法との比較

ミジットシリーズによる薬剤感受性検査と小川比率法、ビットスペクトル、極東PZA、ピラジナミダーゼ試験の比較成績をTable 4に示した。ミジットシリーズSIREと小川培地比率法の結果は4薬剤すべて一致した。ミジットシリーズSIREとビットスペクトルの比較で、

SMについては93.3%で95%以下であったが、INH、RFPとEBの試験の一致率は100%であった。またミジットシリーズPZAは極東PZAおよびピラジナミダーゼ試験の結果と完全に一致した。なお標準株である結核菌H37Rv、結核菌INH高度耐性株、結核菌SM高度耐性株、結核菌EB高度耐性株を用いた試験では、ミジットシリーズ、小川比率法、ビットスペクトルの成績は100%一致した。

#### 考 察

固形培地を用いる結核菌の薬剤感受性検査では菌液濃度を濁度計で計測し、接種する菌量を一定に調整して検査を行っている。一方ミジットシリーズの取扱説明書では分離用MGITが陽性になってから、1日から2日後ではMGITの培養液をそのまま接種菌液とし、3日から5日後ではMGITの培養液を5倍希釈して接種することに

なっている。これは MGIT 陽性チューブからこのように調製した接種する菌液濃度がほぼ  $2 \times 10^5$  CFU/ml に相当するという成績から設定されたものである。しかしこの菌液調整法では接種菌量が安定せず薬剤感受性結果が変動する危険性が考えられた。今回のわれわれの検討では、菌数は  $8 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$  と有意差はないもののばらつきがみられ、菌数の中央値は 1 日目で  $3 \times 10^6$ 、3 および 5 日目で  $1 \times 10^6$  であり、設定の基となった菌量よりも約 10 倍多い結果となった。しかし、分離培地陽性からの日数によらず主要 5 薬剤で薬剤感受性検査の結果がすべて一致したことは、取扱説明書どおりの方法による菌液調整で問題がないことを示している。

次にミジットシリーズの薬剤感受性結果と、従来法の結果との比較を試みた。検体数は 15 例と少数ではあったが、現在の標準法である小川比率法の結果とミジットシリーズ SIRE は 100% 一致した。また PZA の薬剤感受性結果も、現在の標準法であるピラジナミダーゼ試験および極東 PZA 培地の結果と完全に一致した。そのうえミジットシリーズ SIRE の結果判明までに要した日数の中央値は 6 日、PZA の結果判明までの中央値は 7 日と従来の小川培地を用いる方法に比べて大幅な迅速化が可能であった。以上の結果は、ミジットシリーズが迅速、簡便なうえに従来の方法の結果とよく一致する薬剤感受性検査であることを示している。今回は取扱説明書どおりの方法による菌液調整を重点に検討したため、現行の標準法との比較には例数が少なかった。今後例数を増やした追加検討が必要である。

指定期日以内に Growth Control 培地に発育がみられず判定不能になった 2 例は、INH, RFP, SM, EB の 4 薬剤耐性であり、小川培地での薬剤感受性検査でも対照培地に発育せず判定不能であった。当院で 2002 年 8 月から 2004 年 3 月までにミジットシリーズで薬剤感受性検査を実施した 850 例中 (重複なし) Growth Control に発育せず判定不能となったのはミジットシリーズ SIRE で 4 例 (0.4%)、PZA で 7 例 (0.8%) のみであった。これらの結核菌の背景は長期治療中の多剤耐性菌で入院治療中に薬剤感受性検査の依頼があった例と当院に初入院した時点で治療がすでに他院で開始されていた例であった。このことから未治療の結核例で判定不能になる例はなく、薬剤感受性検査用ミジットシリーズを日常検査に使用して問題ないと考えられる。

ミジットシリーズでは分離から薬剤感受性検査まですべて液体培地で行うことから、一般細菌や非結核性抗酸菌の混入により起こる間違った薬剤感受性成績の報告を避けるためにこれまで以上に注意を払わねばならない。今回の検討では PNB 培地試験<sup>12)13)</sup>により非結核性抗酸菌混在の除外を行ったが、同培地の判定には 3 週間を要

するため迅速性に欠けてしまう。従来から欧米で用いている BACTEC 460TB では、NAP 試験<sup>13)17)</sup>により結核菌群と非結核性抗酸菌を迅速に鑑別しているが、MGIT 960 では今のところ NAP 試験を採用していない。今後非結核性抗酸菌の混在を迅速に確認できる方法の開発に期待したい。

また、技術的に習熟することが重要であり、定期的に精度管理を行うことが必要である。

使用直前にサプリメントや各薬剤を MGIT チューブに添加する作業が煩雑であること、小川培地と比べてコストが高い点が問題点となる<sup>18)</sup>。

いくつかの問題点はあるものの、分離用 MGIT の菌液をそのまま用いることで薬剤感受性検査に移行する時間が短縮され、結果判定が自動化されているバクテック MGIT960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズは、従来の標準法とよく一致する結果が迅速に得られ、臨床的にきわめて有用な方法である。

## 謝 辞

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社の高橋洋氏の御協力に深謝いたします。

なお本論文の趣旨は、第 79 回日本結核病学会総会 (2004 年 4 月 21 日、名古屋) で発表した。

## 文 献

- 1) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: Guest Commentary. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 1993; 1: 767-770.
- 2) 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.
- 3) 富田元久, 元田博子, 竹野 華, 他: バクテック 960 専用サプリメントの基礎的検討. 機器・試薬. 2002; 25: 265-267.
- 4) 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.
- 5) 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重: BACTEC MGIT 960 システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験: 固形培地を用いる比率法との比較. 結核. 2001; 76: 657-662.
- 6) 阿部千代治: 薬剤感受性検査. 臨床と微生物. 2001; 28: 311-321.
- 7) Bemer P, Palicova F, Rüscher-Gerdes S, et al.: Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002; 40: 150-154.
- 8) Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, et al.: Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC

- 460 TB method and the agar plate method of proportion. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 607-610.
- 9) Kontos F, Maniati M, Costopoulos C, et al.: Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs: a multicenter study. J Microbiol Methods. 2004 ; 56 : 291-294.
- 10) Aono A, Hirano K, Hamasaki S, et al.: Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA): compared with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 ; 44 : 347-352.
- 11) Pfyffer GE, Palicova F, Rüschi-Gerdes S: Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 1670-1674.
- 12) Tsukamura M, Tsukamura S: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by *p*-nitrobenzoic acid susceptibility. Tubercle. 1964 ; 45 : 64-65.
- 13) Rastogi N, Goh KS, David HL: Selective inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by *p*-nitro- $\alpha$ -acetyl-amino- $\beta$ -hydroxypropiophenone (NAP) and *p*-nitrobenzoic acid (PNB) used in 7H11 agar medium. Res Microbiol. 1989 ; 140 : 419-423.
- 14) Abe C, Hirano K, Tomiyama T: Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1999 ; 37 : 3693-3697.
- 15) Hirano K, Aono A, Takahashi M, et al.: Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 2004 ; 42 : 390-392.
- 16) Wayne LG: Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1974 ; 109 : 147-151.
- 17) Laszlo A, Siddiqi SH: Evaluation of a rapid radiometric differentiation for the *Mycobacterium tuberculosis* with *p*-nitro- $\alpha$ -acetyl-amino- $\beta$ -hydroxypropiophenone. J Clin Microbiol. 1984 ; 19 : 694-698.
- 18) 入江章子, 木下幸保, 富田元久, 他: 新しい抗酸菌検査導入に伴う諸問題(1) —抗酸菌液体培養法(MGIT)を導入した時のコスト—. 医療の広場. 2001 ; 11 : 34-39.

## ← Original Article →

A STUDY ON INOCULUM DENSITY AND REPRODUCIBILITY OF  
DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING BY BACTEC MGIT 960

<sup>1</sup>Motohisa TOMITA, <sup>1</sup>Hana TAKENO, <sup>1</sup>Katsuhiro SUZUKI, <sup>1</sup>Mitsunori SAKATANI,  
<sup>2</sup>Yukiyasu KINOSHITA, and <sup>3</sup>Ikuo KOBAYASHI

**Abstract** [Objective] The BACTEC MGIT 960 drug susceptibility system (MGIT AST) has been recently introduced in Japan. The issue of discordant MGIT results compared with the conventionally used Ogawa method has been raised. It has been speculated that discordant results might be due to MGIT inoculum density since there is no standardization step other than dilution of growth for tubes beyond 2 days after MGIT turns out to be positive. In this study, we examined the reproducibility of the MGIT AST system.

[Materials and Methods] Nineteen sputum specimens from drug-resistant and susceptible pulmonary tuberculosis patients were processed with CCE pretreatment reagent (Japan BCG), inoculated into 3 MGIT tubes, and loaded into the MGIT 960. Inocula for MGIT AST were prepared 1, 3, and 5 days after MGIT tubes became positive. Cultures on day 3 and 5 were diluted 1 : 5 with saline. Ten-fold dilutions from each positive culture were plated on Middlebrook 7H11 agar plates for CFU determination. MGIT AST results were compared with those of the conventional proportion method on Ogawa egg and Vite-spectrum (Kyokuto), or Pyrazinamidase (Pzase) assay and Kyokuto PZA test.

[Results and Conclusion] A total of 15 specimens were culture positive in all 3 tubes. Four of 19 cases were removed from the analysis because of negative cultures in one or more

tubes. Three of 4 culture negative cases were MDR-TB. Colony counting showed the mean CFU/ml of inocula prepared from tubes 1, 3, and 5 days after MGIT tube became positive were  $3.6 \times 10^6$ ,  $1.6 \times 10^6$ ,  $3.1 \times 10^6$ , respectively. There was no significant difference although the CFU range was wide ( $8 \times 10^4 - 2 \times 10^7$ ). MGIT AST results were consistent among 3 inocula. Moreover, overall concordance rates between MGIT AST and the conventional methods were over 90% for 5 first-line antituberculosis drugs. These results indicate that the BACTEC MGIT 960 system is very useful for rapid diagnosis of drug resistant tuberculosis.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, BACTEC MGIT 960, MGIT series, Drug susceptibility testing, Reproducibility

<sup>1</sup>National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, <sup>2</sup>National Hospital Organization Osaka-Minami Medical Center, <sup>3</sup>Fukushima Laboratory, Becton Dickinson Japan

Correspondence to: Motohisa Tomita, National Hospital Organization Kinki-Chuo Medical Center, 1180, Nagasonecho, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan.  
(E-mail: mhtomita@kch.hosp.go.jp)