

抗結核療法中の喀痰検体における BACTEC MGIT 960 システムの菌検出日数測定の意味

➤発育結核菌量の定量と培養成績の予測◀

山本 泰司 藤内 智 山崎 泰宏 武田 昭範
西垣 豊 藤田 結花 藤兼 俊明 清水 哲雄

要旨：〔目的〕MGIT法の治療効果判定への応用の可能性を評価する。〔対象と方法〕新規肺結核患者114名の喀痰検体に対して小川法とMGIT法にて同時に抗酸菌培養を施行した。MGIT法の検出日数（Time to detection; TTD）を化学療法の前で測定し、化学療法中のTTDから培養菌量を半定量化した。また、TTDに対する小川法累積陽性率およびROC曲線解析からMGIT法の至適判定日数を求めた。〔結果〕TTDは固形培地用定量スケールの増加に従って短縮し、コロニー数と負に相関した（化学療法開始前 $\rho = -0.606$ ，開始後 $\rho = -0.636$ ， $P < 0.01$ ）。MGIT法の観察期間を28日とすると、小川法陽性検体の累積陽性率は98%に達し、ROC曲線における小川法陽性率は98.3%であった。一方29日以降にMGIT陽性化したのは全MGIT陽性検体の3%であった。〔結論〕化学療法中における、小川法の定量スケール値はMGIT法の培養所用日数より推測可能であった。28日目のMGIT法培養成績は小川法の陰性・陽性をほぼ正確に反映し、肺結核症患者の治療効果はMGIT法単独でも判定できる可能性が示唆された。

キーワード：結核菌，Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 法，小川培地，培養

はじめに

Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 法は液体培地を用いた迅速抗酸菌培養法であり、抗酸菌感染症の早期診断^{1)~5)}や迅速薬剤感受性検査⁶⁾に対する有用性が報告されている。

MGIT法の欠点として、定性的判定システムのため、定量的評価が困難な点が挙げられる。そのため、肺結核症の治療効果判定には定量が可能な固形培地の使用が推奨されている⁷⁾⁸⁾。MGIT法による発育菌量のスケール化が可能になれば、治療効果を早期に判定し退院時期を決定できる等の利点がある。

当院では2002年より固形培地とMGIT法を併用して抗酸菌培養検査を施行している。本研究では、特に化学療法開始後の検体に注目してMGIT法の菌検出日数から培養成績を半定量的に解析し、治療効果判定に対する

MGIT法応用の可能性について考察する。

対象と方法

対象：国立道北病院にて、2002年3月から2004年2月の2年間に診断され化学療法を受けた肺結核患者114例（男性75例，女性39例，平均年齢70歳）の喀痰検体。治療方式は2HRE(S)Z/4HRが46例，6HRE(S)/3~6HRが63例，その他が5例であった。薬剤感受性試験の結果、INH耐性が1例，INHおよびSM耐性が1例，多剤耐性菌4例を認めた。

方法：喀痰は化学療法開始前に3日間連続で、開始後は2週間おきに採取し、小川法およびMGIT法の培養検査を同時に行った。喀痰検体にN-acetyl-L-cystein (2% NaOH含有) 溶液を加え溶解後、遠心分離した。沈査を再溶解し、2%小川培地（日本ビーシージーサプライ製）とBACTEC MGIT 960 tube (Becton-Dickinson社製) に接

種した⁹⁾。小川培地は最長8週間観察し、陽性検体は米国胸部疾患学会ガイドラインの定量スケール⁷⁾に従い発育菌量を1+から4+まで定量した。MGIT法はBACTEC MGIT960システムにより、紫外線照射時の蛍光の有無から菌発育を判定した。最長6週間自動モニターリングし、菌検出日数 (Time to detection; TTD) を測定した。

(1) MGIT法培養成績の半定量化

小川法発育菌量は50コロニーまでは実測値を用い、1+のコロニー数を75, 2+を150, 3+を350とし、TTDとのSpearman順位相関係数を算出した。さらに単回帰分析によりMGIT法培養成績を半定量化した。

(2) 化学療法開始後のMGIT法判定日数の決定

TTDに対するMGIT法累積陽性率を小川法陽性例と陰性例で比較し、小川法陽性例の累積陽性率が100%に近くなるTTDを求めた。さらにTTDのカットオフ値を連続的に変化させた際の感度 (小川法陽性例におけるMGIT陽性率) および偽陽性率 (1-特異度; 小川法陰性例におけるMGIT陽性率) をプロットしたReceiver operating characteristic (ROC) 曲線を作成し、小川法とMGIT法の一致率を検討した。

TTDの比較は分散分析、累積陽性率の比較はKaplan-Meier法を用いて行い、 $P < 0.05$ をもって有意とした。ROC曲線は解析ソフトMedCalc[®] (MedCalc Software社) で作成した。

結 果

(1) MGIT法培養成績の半定量化

結核菌培養陽性検体の内訳であるが、小川法またはMGIT法のいずれかで415検体が結核菌培養陽性と判定された。MGIT法は399検体 (96.1%) が陽性を示し、小川法の292検体 (70.4%) と比較して高い検出率を示した。

MGIT陽性検体のうち、小川法陽性例は276検体 (69.2%)、陰性例が123検体 (30.8%) を占めた。MGIT法陰性で、小川法のみ陽性を示したのは16検体 (5.5%) であった。

MGIT法陽性検体の平均TTDをTable 1に示す。小川法陰性例の平均TTDは陽性例に比べ有意に増加した。また、小川法陽性例・陰性例のいずれにおいても、化学療法中に有意な延長を認めた。化学療法中における小川法陰性例の平均TTDは22日であり、陽性例の17日に比較して有意に延長した。

次にTTDと小川法発育菌量との関連性について検討した。TTDは小川法定量スケールが1+から3+まで増加するのに伴い有意に短縮した (Table 2)。また、TTDはコロニー数と有意な負の相関を示した (化学療法開始前 $\rho = -0.606$, 開始後 $\rho = -0.636$, $P < 0.01$)。TTDとコロニー数の単回帰分析でも有意な線形回帰を示した (Fig. 1)。

(2) 化学療法開始後のMGIT法判定日数の決定

化学療法中のMGIT陽性検体におけるTTDと累積陽性率をFig. 2に示す。小川法陽性例は28日までに累積陽性率が98%に達した。一方、小川法陰性例の累積陽性率は有意に低下し、28日時点では85%であった。29日以降に11検体 (15%) がMGIT陽性判定となった。これは全MGIT陽性検体の約3%に相当した。

次に小川法培養成績のROC曲線解析を行った。TTDのカットオフ値に応じたMGIT法陽性率および偽陽性率を示すROC曲線 (Fig. 3) では、TTDカットオフ値が18日の時に陽性率が最大に、偽陽性率が最小となり、MGIT法と小川法の一致率が最大となった。28日をカットオフ値とした場合の陽性率は98.3%であり、累積陽性率とほぼ同様の値となった。カットオフ値の増加に伴い

Table 1 Mean TTD (days) of *M. tuberculosis* in MGIT system

Positive specimens	TTD [range]	No.	TTD [range]		TTD [range]	
			before treatment	No.	during treatment	No.
MGIT total	17 ± 6 [2-39]	399	16 ± 6 [2-37]	208	19 ± 6 [#] [4-39]	191
Ogawa positive	16 ± 6 [2-39]	276	15 ± 6 [2-37]	161	17 ± 5 [#] [4-39]	115
Ogawa negative	21 ± 6* [3-38]	123	19 ± 6* [3-31]	47	22 ± 6** [11-38]	76

Values are expressed by mean ± S.D.

* $P < 0.05$ compared with positive specimens in Ogawa medium.

[#] $P < 0.05$ compared with TTD before treatment.

Table 2 Mean TTD (days) in MGIT system and quantitation scale in Ogawa medium

	Range of quantitation scale in Ogawa medium							
	0	No.	1+	No.	2+	No.	3+	No.
Before treatment	19 ± 6	47	16 ± 5*	134	9 ± 3*	24	10 ± 4*	3
During treatment	22 ± 6	76	17 ± 5*	107	11 ± 4*	7	5	1

Values are expressed by mean ± S.D.

* $P < 0.05$ compared with negative specimens in Ogawa medium.

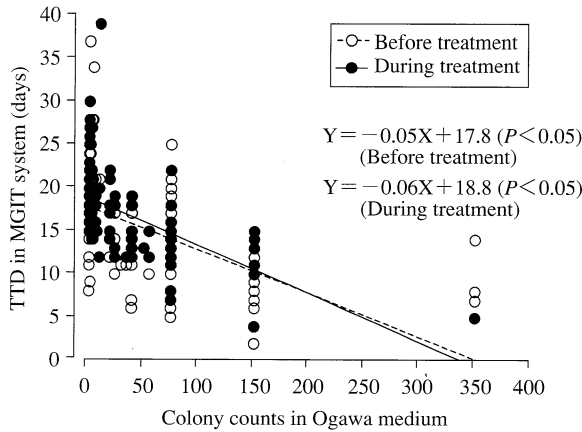


Fig. 1 Linear regression analysis between TTD in MGIT systems and colony counts recovered before (○) and during (●) antituberculosis treatment.

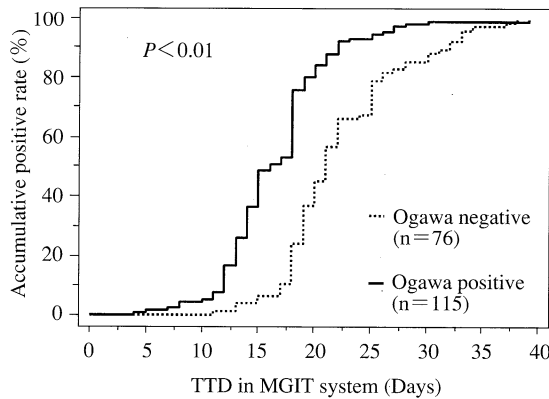


Fig. 2 Accumulative positive rate for MGIT system accompanied with an increase in TTD. $P < 0.01$ was obtained from Kaplan-Meier method comparing Ogawa positive (solid line) with negative (dashed line) specimens.

小川法陰性例が増加したため、偽陽性率は上昇した。

考 案

BACTEC MGIT960は自動判定システムを導入した定性的抗酸菌検出法であり、6～8週を観察期間とすることが多い⁴⁾⁵⁾⁹⁾。MGIT法は定量性⁷⁾や至適判定日数¹⁰⁾等の問題が未解決であり、退院基準への導入が困難である。本研究では前述の問題点を検討し、治療効果判定への応用性について考案した。

近年、MGIT法による増菌を半定量的に評価する試みがなされている¹¹⁾¹²⁾。露口らは培養所要日数と小川法で視認されたコロニー数が負の相関を示すことを報告した¹¹⁾。本検討でもTTDは定量スケールが漸増するのに伴い段階的に減少し、コロニー数と有意な負の相関を示した。概算的にはMGIT法が12～21日で陽性の場合小川法で1+, 10日以内で陽性の場合2+以上の菌数

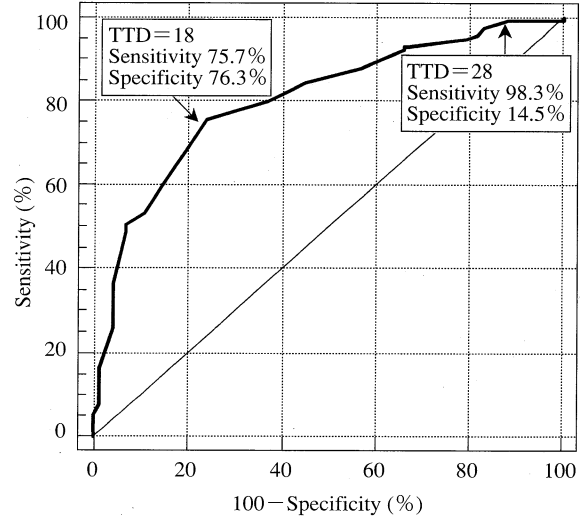


Fig. 3 ROC curve corresponding to the sensitivity and specificity of possible cut-off points for TTD in MGIT system.

が観察された。一方、3週間以上を経過してMGIT陽性となった検体の多くは小川法では分離されなかった。

化学療法の前後でMGIT法の半定量化を検討した報告は少ない。本研究では化学療法中の平均TTDは延長し、抗菌効果による菌量の減少¹³⁾¹⁴⁾を反映していたが、小川法分離菌量との負相関性は保持されていた。従って、化学療法中にもMGIT法の半定量化は可能と考えられた。

現在のところ、定量性の問題から化学療法中の培養成績は固形培地で判定するのが基準である⁷⁾⁸⁾。しかし、MGIT陰性にもかかわらず固形培養が陽性となる率は自験例、過去報告⁴⁾⁵⁾を含めて2～6%と低率であるため、MGIT法陰性と最終的に判定できれば小川法も陰性である可能性が高い。そこでTTDのカットオフ値を検討し、最終判定までの観察期間を求めた。本研究では6週間までMGIT法の観察を行ったが、従来のgolden standardである小川法で陽性を示す検体のほとんどが4週間以内にMGIT法で検出された。反対に、29日以降にMGIT法で検出される検体は少数であり、菌量もTTDとの逆相関性から少ないと予想されることから、最終判定までに必要な観察期間は28日(4週間)と考えられた。

MGIT法の最終判定時期については8週間が推奨されている⁹⁾¹⁰⁾。しかし近年のMGIT法の報告では、ほぼ100%近い結核菌検出率を30日以内に達成できることが示されている⁴⁾⁵⁾¹¹⁾。28日目のMGIT法培養成績は小川法の陰性・陽性を正確に反映する可能性が高く、MGIT法単独でも治療効果判定に応用できる可能性が示唆された。

近年、適正な退院基準による入院期間の短縮化が結核医療の課題とされている¹⁰⁾。現在のMGIT法臨床応用の

指針⁸⁾では、退院時期は塗抹および小川法培養結果で決定することを推奨している。米国では外来治療が一般的であり¹⁵⁾、最近の本邦報告¹⁶⁾でも塗抹陰性化を確認後、外来治療への早期移行も試みられている。退院基準にMGIT法を導入することにより在院日数の短縮を期待する意見もあり¹⁵⁾、今後は塗抹検査に観察期間を短縮したMGIT法を追加することの影響(医療費や在院日数)を検討する必要がある。

結 論

MGIT法は半定量的評価が可能であり、28日目の培養成績に準拠して、肺結核症患者の治療効果を判定できる可能性が示唆された。(本論文の趣旨は第78回日本結核病学会総会で発表した。)

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 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) 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.
- 5) Lu D, Heeren B, Dunne WM: Comparison of the Automated Mycobacteria Growth Indicator Tube System (BACTEC 960/MGIT) with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. Am J Clin Pathol. 2002; 118: 542-545.
- 6) Palaci M, Ueki SY, 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.
- 7) Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161: 1376-1395.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 柳澤直志, 島田尚登, 林 志文, 他: 肺結核患者の退院基準の現状—関東地区の結核病棟における退院基準に関するアンケート調査—. 結核. 2004; 79: 375-380.
- 11) 露口一成, 池田雄史, 中谷光一, 他: 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—. 結核. 2003; 78: 389-393.
- 12) 小倉 剛: 臨床からみた喀痰検査への BACTEC MGIT 960 導入の利点. 日呼吸会誌. 2004; 42: 469-474.
- 13) 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.
- 14) Wallis RS, Perkins MD, Phillips M, et al.: Predicting the outcome of therapy for pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161: 1076-1080.
- 15) 増山英則, 青木正和: 結核治療における米国行政担当者の対応と認識—日本の臨床医との相違. 結核. 2000; 75: 413-422.
- 16) 井上哲郎, 田中栄作, 種田和清, 他: 活動性肺結核患者の在院日数(入院期間)の推移についての検討. 結核. 2003; 78: 79-82.



VALIDITY OF MEASURING TIME TO DETECT GROWTH OF M. TBC
BY BACTEC MGIT960 SYSTEM FOR
QUANTITATION AND PREDICTION OF MYCOBACTERIAL GROWTH

Yasushi YAMAMOTO, Satoru FUJIUCHI, Yasuhiro YAMAZAKI, Akinori TAKEDA,
Yutaka NISHIGAKI, Yuka FUJITA, Toshiaki FUJIKANE, and Tetsuo SHIMIZU

Abstract [Study design] Time to detect growth of M. tbc by BACTEC MGIT 960 system was examined in sputum specimens collected from 114 patients with active pulmonary tuberculosis before and during antituberculosis therapy. By measuring TTD under chemotherapy, we tried to quantify mycobacterial growth and determine the sensitivity of MGIT system.

[Results] The mean TTD significantly decreased in response to an increment in the range of the quantitation scale for solid media. Moreover, the TTD negatively correlated with colony counts ($\rho = -0.636$, $P < 0.01$). When automated monitoring continued until Day 28 after incubation, MGIT system had been capable of detecting 98% of Ogawa-positive specimens. The receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted to determine the sensitivity and specificity in MGIT system, indicating the sensitivity of 98.3% corresponding cutoff level for TTD of Day 28.

[Conclusion] Measuring TTD in MGIT system could allow estimating the mycobacterial growth in similarly quantitative manner. The appropriate endpoint of monitoring could be decided as 4 weeks, accurately reflecting an outcome of cultivation with solid media.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system, Ogawa medium, Culture

Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Douhoku National Hospital

Correspondence to: Yasushi Yamamoto, Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Douhoku National Hospital, 7 Hanasaki, Asahikawa-shi, Hokkaido 070-8644 Japan. (E-mail: yasushiy@asahikawa.hosp.go.jp)