

肺結核診断時の結核菌検出率から見た液体培地/ 小川培地併用の意義

^{1,3}伊藤 邦彦 ²青野 昭男

要旨：〔目的〕結核菌検出率の観点から肺結核診断時に MGIT (Mycobacterium growth indicator tube/ベクトン・ディッキンソン社) に小川培地を併用する意義を検討する。〔対象と方法〕2002年1月1日～2003年9月30日の間、著者らの病院 (以下、当院) で、肺結核疑い時の喀痰培養検査を MGIT と小川培地 (1本) の両方で行った。この間に当院を受診した肺結核患者を対象とし、これらの患者の診断時検痰に対する後ろ向き検討を行う。〔結果〕喀痰結核菌培養陽性肺結核370症例/1103検痰を対象とした。このうち MGIT 陽性86.0%、小川陽性79.5%で、MGIT で有意に高い ($p < 0.001$)。MGIT で雑菌汚染検体中の小川陽性率は56.1% (23/41)、MGIT 陰性検体中の小川陽性率は2.7% (3/113) で、この3検体は各々別の患者から提出されており、3例中2例では他の検痰で MGIT 陽性であった。小川培地でしか培養しえない結核菌株は多くとも0.27% (1/370) であった。MGIT で雑菌汚染をきたした41検体中15検体で再処理が行われており、このうち小川陽性は46.7% (7/15)、MGIT 再処理による培養陽性は73.3% (11/15) で、両者で有意差はなかった ($p = 0.289$)。〔考察と結論〕結核菌検出率の観点から見た場合、MGIT に小川培地を併用する意義のほとんどは MGIT での雑菌汚染の場合のバックアップにある。MGIT 雑菌処理時の MGIT 再処理を前提とすれば、菌検出率の観点から検体単位で見た場合、MGIT に小川培地を併用する意義は乏しいと推測された。

キーワード：肺結核、診断、喀痰培養検査、小川培地、液体培地

1. 緒言

近年の抗酸菌培養検査における MGIT (Mycobacterium growth indicator tube/ベクトン・ディッキンソン社) 等液体培地の導入は、菌検出までの時間を短縮しただけでなく、菌検出感度をも向上させた。結核病学会の検査指針でも、これら液体培地を積極的に導入していくべきであると述べられている¹⁾。

しかし、現在でも液体培地使用時には固形培地の併用が望ましいといわれている¹⁾²⁾。すなわち、液体培地への検体接種時には、同じ検体を小川培地等の固形培地に同時接種すること (これを以下、“液体培地と小川培地の併用”ないし単に“併用”と呼ぶ一稿では“併用”という語句では同一症例の異なる検体に対してそれぞれ液体培地と小川培地を使い分けることを含意しないものと

する) が推奨されている。これには以下の2つの理由が挙げられている。

第一に、液体培地は富栄養培地であり、雑菌抑制に優れた小川培地に比して相対的に雑菌汚染率が高い傾向にある。また液体培地には発育せず小川培地でのみ培養可能な結核菌株が存在する。このため液体培地のみで培養検査を行った場合、結核菌が検出できない検体が出てしまう。

第二に、液体培地ではコロニー形態の観察が直接には不可能である。したがって、結核菌と非結核性抗酸菌の混合培養の場合、その発見が遅れやすい。

しかし、上記の理由に挙げられた事態が臨床に与える影響についてはこれまで理論的に言及されるにとどまり、実際例での検討はほとんどなされていない。

本稿の目的は、上記に挙げた第一の理由について検討

¹結核予防会結核研究所研究部、²結核予防会複十字病院臨床検査科、³呼吸器科

連絡先：伊藤邦彦，結核予防会結核研究所研究部，〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: ito@jata.or.jp)
(Received 28 Nov. 2005 / Accepted 26 Jan. 2006)

することである。すなわち、肺結核診断時の結核菌検出率から見た液体培地と小川培地併用の意義についての検討である。

2. 対象と方法

喀痰結核菌培養陽性の肺結核診断時の喀痰検査において、MGITに小川培地（1本）を併用した場合の、結核菌検出率について後ろ向きに検討する。

2002年1月1日～2003年9月30日に著者らの所属する結核病棟を有する病院（以下、当院）を受診した患者で、主治医によって臨床的に肺結核が疑われた者すべてを対象とし、連続検痰の各培養を原則的にMGITと小川培地（1本）の両者で行った（以下、併用研究と呼ぶ）。この併用研究対象者中、喀痰結核菌培養陽性の肺結核患者を分析対象とした。

併用研究での検痰は、入院外来を通じて合計3回を標準としたが、実際の検痰回数は主治医の裁量によった。採痰の方法（早朝痰/随時痰/ネブライザーによる誘発喀痰/吸引痰）は主治医の裁量によった。

当院以外で行われた検痰や、当院での最初の検痰から数えて7回目以降の検痰は除外した。気管支鏡検体や胃液検体は除外した。また、既に7日以上（中断日はカウントしない）の化学療法を受けた時点での喀痰検査は除外した³⁾。

塗抹および小川培地の施行と結果判定は基本的に結核病学会の推奨¹⁾に従って行った。前処理も基本的に結核病学会の推奨に従いNALC-NaOH法で行ったが、これにスプータザイムを併用した。MGITによる培養はBACTEC MGIT 960を用い、ベクトン・ディッキンソン社による既定のマニュアルに従って行った。MGIT雑菌汚染時の再処理は、培養液を遠沈した後チェックスクリーナーで再び前処置を行った後に再びMGITに接種する方法をとった。検査は当院の細菌検査科のスタッフ3人前後（時期によって異なる）で行われた。各検査技師の抗酸菌培養検査の経験年数は様々であるが、経験年数10年以上の技師の指導下で行われた。

MGITで雑菌汚染が起こった場合の再処理培養の結果は、一次的に分析対象外とする。小川培地では培養継続不能例のみを雑菌汚染とする。以下では、結核菌培養陰性とは雑菌汚染がなくかつ結核菌培養陰性を指す。

小川培地（2本）で2本の培養結果が異なる場合には、その患者の当院ID番号末尾数字により〔ID番号が偶数の場合、1本のみが結核菌培養陽性の例では陽性を小川培地（1本）の結果とし、1本が結核菌培養陰性で他が雑菌汚染の場合には陰性を小川培地（1本）の結果とする/ID番号が奇数の場合にはもう一方の小川培地の結果を小川培地（1本）の結果とする〕、2本法の結果を1本法

の結果に変換する。

塗抹結果は集菌法による蛍光染色（オーラミン染色）による結果のみを採用する。集菌法による蛍光染色で塗抹土の場合には、Ziehl-Neelsen染色により抗酸菌が確認された場合のみ塗抹土として塗抹陽性に分類し、それ以外は塗抹陰性とする。

併用研究にエントリーされた症例は計685例であった。このうち非抗酸菌性肺疾患ないし診断不明（67例）、肺非結核性抗酸菌症（101例）、抗酸菌混合感染症（14例/疑いを含む）、肺外結核のみ（12例/喀痰結核菌培養陽性でも画像陰性であればこのカテゴリーに含め、肺病変を有する粟粒結核は肺結核とする）、慢性穿孔性膿胸合併肺結核（8例）を除外し、肺結核症例483例が残った。さらにすべての検痰が化学療法開始後7日以降（78例/転院が主）、結核菌培養陰性（21例）、前医でのみ結核培養陽性（11例）、結核菌核酸増幅法のみ陽性（1例）、胸水のみ結核菌培養陽性（1例）、資料不備による詳細不明（1例）を除外して、370例（初回320例、再治療50例）の喀痰結核菌培養陽性肺結核症例が残った。これら1例あたりの診断時検痰回数は1～7回で、96.8%（358/370）で3回以上の検痰が施行されていた。370例で対象基準に合致した検痰は1197検体であった。このうちMGITによる培養なし（または結果不明）84検体、MGIT培養のみで小川培地による培養なし10検体を順に除外し、最終的に1103検体を分析対象とした。1103検体中小川培地が2本用いられていた検体は15検体であった。

統計処理ソフトにはSPSS 9.0Jを使用し、カイ2乗検定、マクネマー検定、フィッシャーの正確確率テストを適宜用いた。有意確率は5%で判断した。

3. 結果

分析対象1103検痰での培養結果の概要を全検体/塗抹陰性検体/塗抹陽性検体のカテゴリー別にTable 1に示す。

塗抹土、1+、2+、3+の検体はそれぞれ86、141、237、314検体であった。いずれのカテゴリーでも結核菌培養陽性率は小川培地（1本）よりもMGITで有意に高い（ $p < 0.001$ ）。この差は塗抹陰性検体でより顕著であった。

MGITで結核菌が検出できなかった（結核菌培養陰性ないし雑菌汚染）が、小川培地（1本）で結核菌が培養された検体は26検体であった。MGITないし小川培地（1本）の少なくともどちらかで結核菌培養陽性の検体に対するMGITの感度（結核菌培養陽性率）は全体で97.3%（949/975）であり、小川培地（1本）併用により結核菌検出感度は2.7%（26/975）上昇する。上記26検体のうちMGITで雑菌汚染の検体が23検体、MGITで結核菌培養

Table 1 Summary of sputum culture results by MGIT and Ogawa

	N			Ogawa culture				MGIT + % of total	Ogawa + % of total	McNemar test (p)	Ogawa + among MGIT - sputum %	Ogawa + among MGIT contami.
				-	Contami.	+	Total					
Smear negative	325	MGIT culture	-	86	2	0	88	67.1%	53.5%	<0.001	0% (0/88)	63.2% (12/19)
			Contamination	6	1	12	19					
			+	53	3	162	218					
Total				145	6	174	325					
Smear positive	778	MGIT culture	-	22	0	3	25	94.0%	90.4%	<0.001	12.0% (3/25)	50.0% (11/22)
			Contamination	1	10	11	22					
			+	26	16	689	731					
Total				49	26	703	778					
All	1103	MGIT culture	-	108	2	3	113	86.0%	79.5%	<0.001	2.7% (3/113)	56.1% (23/41)
			Contamination	7	11	23	41					
			+	79	19	851	949					
Total				194	32	877	1103					

Table 2 Sputum culture results of patients whose sputums were MGIT negative and Ogawa positive

	Age	Sex	No. of sputum	Days of chemotherapy before sputum test	Smear	MGIT culture (days to positive)	Ogawa culture	
							Ogawa culture (colony count)	Weeks to positive in Ogawa
Case 1	75	F	1st	0	2+	not done	6 colonies	4 weeks
			2nd	0	2+	-	3+	3 weeks
			3rd	1	3+	+ (9 days)	3+	3 weeks
Case 2	63	F	1st	0	±	-	3 colonies	8 weeks
			2nd	0	-	-	neg.	
			3rd	0	-	-	neg.	
			4th	0	-	-	neg.	
Case 3	60	M	1st	2	±	-	neg.	
			2nd	3	2+	-	15 colonies	8 weeks
			3rd	4	1+	+ (12 days)	53 colonies	3 weeks

陰性の検体が3検体〔MGITで結核菌培養陰性の検体中、小川培地（1本）で結核菌培養陽性は2.7%（3/113）〕であった。MGITで結核菌培養陰性だが、小川培地（1本）で結核菌培養陽性の3検体はそれぞれ別の患者から提出されていた。すべて異なる日に処理されており、短期間への集中もなかった。これら3例の患者におけるすべての診断時検痰の結果をTable 2に示す。3例とも初回治療で病型はCase 1がbII3, Case 2がI II1, Case 3がI II2であった。

MGITで雑菌汚染をきたした検体を除外して検討した場合、MGITと小川培地（1本）の少なくともどちらか一方で結核菌培養陽性であった検体に対するMGITの感度は全検体で99.7%（851/854）、塗抹陰性検体で100%（162/162）、塗抹陽性検体で99.6%（689/692）であった。

MGITでの雑菌汚染率は3.7%（41/1103）、小川培地（1本）では2.9%（32/1103）であった。雑菌汚染率はMGITと小川培地（1本）で有意差はなかった（ $p=0.263$ ）。MGITで雑菌汚染をきたす場合には小川培地（1本）でも有意に雑菌汚染をきたしやすい〔26.8%（11/41） vs. 2.0%

（21/1062）, $p<0.001$ 〕。MGITまたは小川培地（1本）のいずれかの培地で雑菌汚染をきたした62検体中両者とも雑菌汚染をきたしたのは17.7%（11/62）であった。MGIT雑菌汚染検体における小川培地（1本）結核菌培養陽性率は、全検体/塗抹陰性検体/塗抹陽性検体の各カテゴリーとも50.0~63.2%であった。

MGITで雑菌汚染をきたした41検体中15検体で再処理によるMGITでの再培養が行われていた。これらの再処理によるMGITでの培養結果と、もともとの検体での小川培地（1本）での培養結果の対応をTable 3に示す。MGITの再処理による結核菌培養陽性の割合は73.3%（11/15）で、小川培地（1本）（46.7%）との間に有意差はなかった（ $p=0.289$ ）。MGIT雑菌汚染検体中、MGIT再処理の行われた検体における小川培地（1本）での結核菌培養陽性率は46.7%（7/15）、再処理の行われなかった検体においては69.2%（18/26）であり、両者で有意差はなかった（ $p=0.159$ ）。MGIT再処理で結核菌培養陽性であった11検体での、初回培養開始から雑菌汚染による培養中止までの期間は平均4.1日（1~11日）、再処理か

Table 3 Performance of MGIT re-treatment in contaminated

		Ogawa culture			
		-	Contamination	+	Total
MGIT culture by re-treatment	-	0	0	1	1
	Contamination	2	0	1	3
	+	5	1	5	11
	Total	7	1	7	15

ら培養陽性までは平均18.8日(4~41日)であった。したがって最初の培養開始から結核菌培養陽性までは8~44日(1.1~6.3週),平均22.9日(3.3週)となった。なお, MGIT再処理でも雑菌汚染をきたした検体は再再処理で結核菌培養陽性となっており, 最初の培養開始から結核菌培養陽性までは27日であった。

4. 考 察

MGITに小川培地を併用する場合, 結核菌の検出率は2.7%上昇した。この上昇のほとんどは, MGITでの雑菌汚染時における小川培地のバックアップによるものである。MGITで雑菌汚染をきたした検体が, 同時に小川培地(1本)でも雑菌汚染をきたす可能性は4分の1程度とそれほど高率ではない。これらの検体では, 50%強の確率で小川培地(1本)での結核菌培養陽性が期待しうる。MGITで結核菌培養陰性だが, 小川培地でのみ結核菌陽性である検体はわずかに3検体(症例数にして3例)にすぎなかった。この3例中2例(Case 1とCase 3)では他の喀痰検体でMGIT結核菌培養陽性になっている。残る1例(Case 2)も小川培地(1本)で1回のみ微量の結核菌培養陽性であり, MGIT培養陰性の理由が偶然によるものか菌株の性質によるものかは不明である。よって, 小川培地でのみ培養可能な結核菌株をもつ肺結核患者は多く見積もっても0.27%(1/370)ときわめてわずかであると推測される。

以上から, 結核菌検出率の観点からMGITに小川培地(1本)を併用する意義のほとんどは, MGITで雑菌汚染をきたした場合のバックアップにあると結論される。小川培地でのみ培養可能な結核菌株の存在はきわめて稀である。

しかし, MGIT雑菌汚染時のバックアップの手段は, 小川培地(1本)の併用だけではない。MGIT雑菌汚染時には, 再び前処理を行うことによりMGITでの再培養(再処理)を行うことが可能である。よって, 菌検出率の観点から各検体単位で, MGITに小川培地を併用すべきかどうかについて考察する場合には, MGIT再処理と小川培地併用の比較を行う必要がある。本調査では, MGIT雑菌汚染時の再処理による結核菌培養陽性率(73.3%)は, 統計的有意差に達しなかったものの, バッ

クアップの小川培地(1本)のそれよりも高かった。結核菌培養陽性までの日数も平均3.3週で, 通常の小川培地による培養と遜色はない。本調査ではすべてのMGIT雑菌汚染検体に再処理が行われているわけではなく, 再処理検体は15例と少数である。しかし, 再処理を行う基準は主に併用研究の時期によっており選択バイアスは少ないものと推測される。MGIT再処理の行われている検体では小川培地(1本)での結核菌培養陽性率が低い傾向にあったが有意差はなかった。再処理による結核菌培養陽性率は, MGITで雑菌汚染をきたした全41検体における小川培地(1本)での結核菌培養陽性率(56.1%)と比較しても, より高かった。よって, MGITによる再処理は小川培地(1本)と少なくとも同等か, もしくはそれ以上の有用性を期待しうるものと推測される。

MGIT再処理と小川培地(1本)併用をコスト面で比較した場合, MGIT再処理にかかる材料費(MGITチューブ本体や前処理剤)を1100円とし小川培地のそれを100円とかなりMGITに不利に見積もったとしても, MGITでの雑菌汚染率が9.1%を超えないかぎりMGIT再処理のほうが低コストとなる。この雑菌汚染率は本調査でのMGITでの雑菌汚染率3.7%を大きく上回っている。MGIT再処理と小川培地(1本)併用での検査技師の労力を直接定量的に比較することは困難である。しかし本調査(雑菌汚染率3.7%)では, 小川培地約27本への検体接種および観察にかかる労力と1回のMGIT再処理と観察(BACTECであれば自動)の労力との比較に帰着される。小川培地の本数を考えれば前者が後者よりも労力が少ないとは直ちには言えないであろう。

無論, 実際の臨床検査において, MGITに小川培地を併用すべきかどうか, またMGITでの雑菌汚染時に再処理を必須とすべきかどうかについて, 本調査から直ちに一般化しうる結論を出すことはできない。これは本調査のいくつかの限界によるものである。第一に, 本調査は菌陽性肺結核の喀痰検査にのみ限定した考察であり, 他の検体での状況は不明である。第二に, 結核菌と非結核性抗酸菌の混合感染の場合における小川培地併用の有用性は直ちには否定できない。特にMGITでの薬剤感受性試験をルーチンとする施設では混合培養の結果多剤耐性と判定されてしまうことがあり, この問題は小さくない

ものと思われる。第三に、実際の肺結核診断時には複数回の検痰が行われるため連続検痰での検討を行う必要がある。第四に、非結核性抗酸菌に関する検討が行われていない。非結核性抗酸菌ではMGITと小川培地での培養陽性の差は結核菌よりも大きく、MGITで優れるとされているため⁴⁾、「MGITで培養陰性だが小川培地では培養陽性」となるような非結核性抗酸菌の分離頻度は結核菌の場合よりも低いものと推測されるが、実際例の調査が必要であろう。第五に本調査は単一施設での検討であり、他施設/多施設での検討が必要である。

以上のような限界はあるが本調査の結論として、結核菌検出率の観点から検体単位で見た場合、MGIT雑菌汚染時の再処理を前提とするかぎり、各喀痰検体で小川培

地(1本)を併用する必要性は乏しいものと推定される。

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) Iseman MD: Clinician's Guide to Tuberculosis. Lippincott William & Wilkins. 2000.
- 3) 伊藤邦彦，青野昭男，吉山 崇，他：肺結核の化学療法は検痰終了後に開始するべきか？ 結核。2005；80：735-741。
- 4) 斉藤 肇，螺良英郎，山中正彰，他：MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) の評価に関する10施設での協同研究。臨床と微生物。1997；24：93-99。

Original Article

THE ROLE OF SIMULTANEOUS COMBINATION CULTURE WITH SOLID AND LIQUID MEDIA FOR DIAGNOSIS OF PULMONARY TUBERCULOSIS

^{1,3}Kunihiko ITO and ²Akio AONO

Abstract [Purpose] To study the usefulness of simultaneous combination culture with egg-based Ogawa medium (1 slant) and MGIT (Mycobacterium growth indicator tube/Becton-Dickinson) for detection of *M. tuberculosis* from sputum in sputum-culture proven pulmonary tuberculosis patients.

[Object and Method] Retrospective study of sputum-culture-positive pulmonary tuberculosis cases in our hospital (with tuberculosis ward) from Jan. 2002 to Sept. 2003.

[Result] In 1103 sputum culture for the diagnosis of 370 sputum-culture proven pulmonary tuberculosis cases, 86.0% were MGIT positive and 79.5% were Ogawa positive. Among sputa contaminated on MGIT, 56.1% (23/41) were positive on Ogawa. Among sputa culture-negative on MGIT, 2.7% (3/113) were positive on Ogawa. Those 3 sputa were obtained from 3 different patients, and in 2 of them, other sputa were positive on MGIT. Frequency of "*M. tuberculosis* strain which can be cultured only by Ogawa" was supposed to be at maximum 0.27% (1/370). Of 41 sputa contaminated on MGIT, 15 sputum specimens were re-treated and re-cultured by MGIT. Of these specimens 46.7% (7/15) were positive on Ogawa, and 73.3% (11/15) were positive on re-treated MGIT,

and the difference was not statistically different.

[Conclusion] From the standpoint of detection of *M. tuberculosis* from sputum in sputum-culture proven pulmonary tuberculosis patients, simultaneous combination culture of Ogawa medium with MGIT is useful, mainly for risk management of MGIT contamination. But, if re-treated MGIT is done for cases of contaminated on MGIT, simultaneous combination culture of Ogawa medium with MGIT is not necessary.

Key words: Pulmonary tuberculosis, Diagnosis, Sputum culture, Ogawa, MGIT (Mycobacterium growth indicator tube)

¹Department of Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), ²Department of Clinical Laboratory, ³Department of Respiratory Medicine, Fukujiji Hospital, JATA

Correspondence to: Kunihiko Ito, Department of Research, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: ito@jata.or.jp)