

【原著・基礎】

液体培地を用いた自動結核菌感受性測定法に関する検討

従来法および NCCLS 法との比較

長谷川美幸¹⁾, 三次 典男¹⁾, 小山 悦子¹⁾, 佐藤 弓枝¹⁾, 小林 寅詰¹⁾, 西園寺 克²⁾¹⁾三菱化学ピーシーエル化学療法研究室*²⁾防衛医科大学校検査部

(平成 16 年 4 月 12 日受付・平成 16 年 5 月 25 日受理)

液体培地を用いた抗酸菌検出装置 Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT960[®], 日本ベクトン・ディッキンソン) に対応した迅速自動結核菌感受性測定 kit である MGIT960 SIRE[®] (以下 MGIT960 SIRE) を従来法である 1% 小川培地法および proportion method (NCCLS 法) と比較検討を行った。検討薬剤は streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol の 4 薬剤とし, 未治療結核患者から分離した *Mycobacterium tuberculosis* 52 株を試験菌株とした。

感受性成績比較では 3 法すべてで成績が一致した例は 92.3% から 96.2% と薬剤により若干異なったものの良好な一致率を示した。isoniazid および rifampicin に耐性を示す Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) を疑う株は MGIT960 SIRE において最も多く 3 株 (5.8%) 認められ, NCCLS 法では 1 株 (1.9%), 1% 小川培地法では検出されなかった。感受性測定所用時間の比較では MGIT960 SIRE は平均 7.8 日, 1% 小川培地法は 10.1 日, NCCLS 法では 21.0 日と MGIT960 SIRE は迅速に薬剤感受性成績を得ることが可能であった。

MGIT960 SIRE は国内で多用されている 1% 小川培地法および NCCLS 法と感受性成績はよく一致し, 迅速に結果が得られることから結核菌の薬剤感受性測定に有用である。また MDR-TB の迅速検出が可能となり結核対策に寄与するものと考えられた。

Key words: automatic susceptibility test, liquid medium, *Mycobacterium tuberculosis*

結核は国内外を問わず重要な感染症の一つであり, 世界保健機関 (WHO) の推定によれば 2002 年には全世界で 880 万人が結核を発病し, 結核発生率は前年比で約 2.4% 増加している。結核抑制のための政策戦略 DOTS が示されたものの社会的, 経済的貧困, 人口増加, 不十分な医療システムなど社会的基盤の脆弱さが, 新感染患者の 95% を占める開発途上国の結核対策を困難にしている。

また近年, 多剤耐性結核菌 (MDR-TB) は増加傾向にあり, 日本国内でも集団感染例が報告されている^{2,3)}。欧米諸国では HIV 感染患者における MDR-TB の集団感染が発生し, その死亡率の高さ, 診断から死亡までの期間の短さ⁴⁾ から重大な社会問題となっている。MDR-TB 感染症は治療薬の選択に細心の注意が必要で, 結核対策に対する脅威となるため迅速な検出が必要である。

Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 は抗酸菌の迅速培養システムで, 従来, MGIT 法による感受性測定は用手法に限られていたが, 自動培養判定装置 MGIT960 に対応する感受性測定試薬 SIRE kit が 2001 年 11 月に体外診断用医薬

品に承認された。

今回われわれは, 抗酸菌自動培養判定装置 MGIT960 に対応する感受性測定試薬 SIRE kit の有用性について, 現在においても国内で最も一般的に使用されている 1% 小川培地法および NCCLS proportion method⁵⁾ との一致率および所要期間について検討し有用な結果を得たので報告する。

I. 材料と方法

1. 検討薬剤と測定方法

検討薬剤は結核治療の第一選択薬である streptomycin (SM), isoniazid (INH), rifampicin (RFP), ethambutol (EB) の 4 薬剤とした。測定法は Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) を用いた感受性自動測定 kit の MGIT960 SIRE[®] (以下 MGIT960 SIRE, 日本ベクトン・ディッキンソン), 1% 小川培地を基礎培地とし, 2,3-diphenyl-5-thienyl(2)-tetrazolium chloride (STC) を添加したピットスペクトル SR[®] (以下ピットスペクトル SR, 極東製薬) および Middlebrook 7H10 agar を用いた NCCLS 法⁵⁾ の proportion method (以下 proportion me-

Table 1. Comparison of susceptibility test results obtained by 3 methods

	MGIT960 SIRE	Ogawa medium ^{a)}	Proportion method	Streptomycin		Isoniazid		Rifampicin		Ethambutol	
				strain	%	strain	%	strain	%	strain	%
Agreement	S	S	S	47	90.4	45	86.5	49	94.2	49	94.2
	R	R	R	3	5.8	3	5.8	1	1.9	1	1.9
	Subtotal			50	96.2	48	92.3	50	96.2	50	96.2
Nonagreement	S	S	R	0		0		0		0	
	S	R	S	0		0		0		1	1.9
	R	S	S	0		4	7.7	0		0	
	S	R	R	0		0		0		1	1.9
	R	S	R	2	3.8	0		2	3.8	0	
	R	R	S	0		0		0		0	
Subtotal			2	3.8	4	7.7	2	3.8	2	3.8	
Total			52	100	52	100	52	100	52	100	

^{a)} ViteSpectrum-SR

thod, 自製)の3法である。各方法はキット能書またはNCCLS標準法に準じ実施した。すなわちMGIT960 SIREでは菌体を滅菌生理食塩水に懸濁し, McFarland No. 0.5の菌液を調製後, 同液にて5倍希釈したものを被検菌液とした。これをさらに100倍希釈し, MGIT960 SIRE 発育陽性対照チューブおよび各試験薬剤チューブに0.5 mL添加した。これら5本のチューブをMGIT960にセットし, 自動培養, 判定を行った。薬剤濃度はSM, INH, RFP, EBの順に1.0, 0.1, 1.0, 5.0 µg/mLである。ピットスペクトルSRは前記同様に菌体を処理, 調製した菌液を能書に従い接種し, 培養後判定を行った。判定は培養後7, 10, 14日目に行い, 発育陽性対照ウエルに十分な菌の発育が認められた時点で最終判定とした。薬剤濃度はSM: 10, INH: 0.2 (low), 1.0 (high), RFP: 40, EB: 2.5 µg/mLである。Proportion methodはSM: 2.0 (low), 10 (high), INH: 0.2 (low), 1.0 (high), RFP: 1.0, EB: 5.0 µg/mLとなるよう抗結核菌薬を含有する10% OADC添加Middlebrook7H10 agarを作製した。菌体をMiddlebrook7H9 brothに懸濁し, McFarland No. 1の菌液を作製した。この菌液を同brothで10², 10⁴倍希釈し, 接種菌液とした。接種用菌液各100 µLを薬剤不含および含有培地に滴下し, コンラージ棒にてまんべんなく塗り広げた。接種後の平板培地は10% CO₂, 37 °C, 遮光条件下で最長3週間まで培養を行い観察した。

2. 試験菌株および精度管理株

未治療結核患者から分離した臨床分離 *Mycobacterium tuberculosis* 52株を試験菌株とした。また同一患者からの重複を避けた。精度管理株として薬剤感受性の異なるATCC 29294 (試験薬剤すべてに感性), ATCC 35820 (SM耐性), ATCC 35822 (INH耐性), ATCC 35828 (RFP耐性), ATCC 35837 (EB耐性)の5株を使用した。またINHおよびRFPの2剤に耐性を示す株を多剤耐性

結核菌とした。

II. 結 果

臨床分離 *M. tuberculosis* 52株の各種薬剤感受性成績比較 (Table 1) では, MGIT960 SIRE, ピットスペクトルSR, proportion methodの3法が感性(S)で一一致した例は, SMで52株中47例(90.4%), INHで45例(86.5%), RFP 49例(94.2%), EB 49例(94.2%)であった。約87%以上の臨床分離株はいずれの測定法においても4剤に感性を示した。反対に3法の成績が耐性(R)で一一致した例はSMおよびINHで3例(5.8%), RFPおよびEBでは1例(1.9%)で, 感性, 耐性の両方でSM, RFPおよびEBの一致率は96.2%でINHは92.3%であった。

一方, いずれかの方法で不一致な成績を示した例はINHの4例(7.7%)が最も多く, MGIT960 SIREの耐性判定に対しピットスペクトルSR, proportion methodではともに感性であった。ピットスペクトルSRでのみ感性, 他2法で耐性となった例がSMおよびRFPで各2例(3.8%)認められた。その他EBでピットスペクトルSRのみ耐性となった例およびMGIT960 SIREでのみ感性となった例が各1例(1.9%)あった。また結果には示さないが精度管理株として用いた薬剤感受性の異なるATCC 5株の成績は3法すべて一致した。

Table 2に測定法別の薬剤耐性パターンを示した。検討した4剤すべてに耐性を示す菌株はMGIT960 SIREではNo. 22, proportion methodではNo. 35の各1例(1.9%)で, ピットスペクトルSRにおいては4剤耐性となった菌株は認められなかった。検討した4薬剤中いずれかの3剤に耐性を示す株はMGIT960 SIREではNo. 11, No. 35の2例(3.8%)でありピットスペクトルSRではNo. 11, No. 22, No. 35の3例(5.8%), proportion methodではNo. 22の1例(1.9%)のみであった。3測定法のいずれかで耐性を示した8株において4剤とも感性に判定

Table 2. Comparison of patterns in 8 strains resistant to antimycobacterial agents by 3 methods

Strain No.	MGIT960 SIRE				Ogawa medium ^{a)}				Proportion method			
	SM ^{b)}	INH ^{c)}	RFP ^{d)}	EB ^{e)}	SM	INH	RFP	EB	SM	INH	RFP	EB
2	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
8	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S
11	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
20	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
27	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
35	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R
53	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

a) ViteSpectrum-SR, b) Streptomycin, c) Isoniazid, d) Rifampicin, e) Ethambutol

された例が最も多かったのはビットスペクトル SR で 4 例(7.7%), ついで proportion method の 2 例(3.8%), MGIT960 SIRE では認められなかった。また INH および RFP の感受性成績から, 多剤耐性結核菌を疑う菌株は MGIT960 SIRE では 52 株中 No. 22, No. 27, No. 35 の 3 株(5.8%), proportion method は No. 35 の 1 株(1.9%) となり, ビットスペクトル SR では検出されなかった。

薬剤感受性測定所要時間の比較では MGIT960 SIRE は最短 6.1 日から最長で 12.2 日, 平均 7.8 日で結果が得られた。ビットスペクトル SR は 10.0 日から 14.0 日で平均 10.1 日, proportion method は 3 法中では最も時間を要し 19.0 日から 21.0 日, 平均 21.0 日となった。

III. 考 察

感染症において適切な化学療法薬を選択するには起炎菌の薬剤感受性を知ることが必須である。米国の疾病対策予防センター(CDC)は「2 週間以内に抗酸菌の検出を, 4 週間以内に感受性成績を医師に報告すべき⁶⁾と勧告した。近年, 欧米諸国では液体培地を用いた抗酸菌培養の普及により CDC の勧告に準じ約 2 週間で抗酸菌検出を, また約 4 週間で感受性成績を報告できるようになった。しかし国内では抗酸菌の感受性測定は卵培地を用いた従来法(1% 小川培地法)が一般に用いられ, 4 週間以内の薬剤感受性成績の報告は困難なことが多い。海外では放射性同位体を用いる BACTEC 460TB システムがこの勧告内に感受性報告できる唯一の手法として用いられてきた。しかし日本では放射性同位体を使用可能な施設は限られ, 廃棄物処理の問題から広く普及するにはいたらなかった。

今回われわれは, 自動感受性測定システム MGIT940 SIRE について検討を行った。本感受性システムの原理は, MGIT チューブ内の酸素を結核菌が消費した際に発する蛍光強度を 1 時間ごとに自動測定し, 薬剤含有と不含有チューブの蛍光強度の比較により判定するものである。菌液接種後は MGIT960 にセットすれば自動的に感受性結果が出力される。一方, 感受性成績を比較したビットスペクトル SR は, 国内で最も一般的に使用されるマ

イクロプレートを用いた STC 添加 1% 小川培地法のビットスペクトル SR である。これは STC の呈色により判定が明瞭に確認でき, 広い培養スペースおよび専用装置を要しないため抗酸菌検査施設を有する国内の医療機関に普及している。さらに, Middlebrook7H10 agar を基礎培地とし薬剤不含有培地と含有培地上に発育したコロニー数から耐性細胞数を測定する proportion method は NCCLS⁵⁾の標準法で, 新規感受性測定法を評価する際のゴールドスタンダードとされてきた。

測定法の違いにより添加薬剤濃度は異なり, 1% 小川培地を用いる感受性測定法では, 他の 2 法に比べ濃度が高く設定されている薬剤が多い。本法では培地の作製に加熱凝固を行うため, 高温による抗結核薬の分解や卵蛋白質への吸着による力価低下が起こるためと考えられる。しかし培地中の残存薬剤濃度は明らかにされておらず, 海外の感受性成績と直接比較が困難な一因となっている。さらに NCCLS 標準法の proportion method は, 培養期間が長いことに加え手法が煩雑であることから日常検査に導入するのは困難である。

MGIT960 SIRE は Middlebrook7H9 液体培地を用い, 4 日から 13 日で 4 剤の感受性判定可能な仕様になっている。用手法による MGIT 感受性測定 kit は一部の施設で以前から利用されていたが, 判定は肉眼で行い, 薬剤不含有チューブが陽性になった後 2 日以内に陽性を示さない場合を耐性と判定する。同システム SIRE は規定のアルゴリズムにより自動判定を行い結果も随時出力される。

われわれが実施した臨床分離 *M. tuberculosis* 52 株の各種測定法による薬剤感受性成績の一致率は 92.3% から 96.2% で良好な成績であった。阿部ら⁷⁾も MGIT960 SIRE を用い感受性測定を検討し, われわれと同様従来法との良好な相関性を述べている。また Macondo ら⁸⁾は Lowenstein-Jensen および Middlebrook7H10 agar を用いた proportion method にて得られた成績は MGIT960 SIRE と良好な一致をみたと報告している。さらに Bemer ら⁹⁾は MGIT960 SIRE と BACTEC 460TB の比較

を行い、成績が一致するだけでなく測定時間も同等であると述べている。Tortoliら¹⁰⁾も Bemerら⁹⁾と同様な報告を行っている。両者はEB, INHにおける一致率が他剤よりも低いことを示しているが、われわれの成績においても同様にEBおよびINHはRFPに比較し一致率は同等あるいは低率であった。

今回検討したMDR-TBの検出ではMGIT960 SIREは52株中3株(5.8%), proportion methodは1株(1.9%), 一方、ピットスペクトルSRでは検出されなかった。ピットスペクトルSRおよびproportion methodではINH, RFPのいずれか、あるいは双方が感性を示したことによる乖離が生じている。NCCLS⁵⁾は新しい結核菌感受性測定法を採用する際には十分に従来法と比較し、特に偽感性(耐性を感性に判定)の発生は感染患者の治療にあたり重大な問題になるため避けなくてはならないとしている。阿部ら⁷⁾はRFPおよびINHに対する臨床分離結核菌の感受性はMGIT960 SIREおよびproportion methodでは100%一致したが、1%小川培地ではRFPに対して偽感性および偽耐性、INHに対して偽感性が生じたとしている。本検討の成績ではTable 2に示したようにproportion methodではINHを感性に判定したNo. 22およびNo. 27の2株はMGIT960 SIREでは耐性となり、proportion methodに比較し偽耐性となったが、偽感性になった例は認められなかった。一方ピットスペクトルSRではMDR-TBに該当するRFP, INH双方に耐性を示す株は認められず、これらの株に対しては偽感性となった可能性があった。検討した抗結核薬に対する耐性株は本検討では少数だが、MGIT960 SIREは偽感性を生じない点でNCCLSのガイドラインを満たすものであった。

従来、結核菌の感受性測定に要する培養時間は2~3週間を要した。今回の検討では3法中、MGIT960 SIREが最も短く平均7.8日、1%小川培地では10.1日、proportion methodでは21.0日と各方法により測定所要時間に大幅な差が認められた。MGITシステムは用手、自動判定のいずれにおいても迅速に結果を得られることを多くの研究者が報告している⁷⁻¹¹⁾。

われわれは過去にMGIT960を用いた患者検体からの抗酸菌培養では平均12.5日で抗酸菌を検出可能であること¹²⁾を、また別報¹³⁾ではイムノクロマトグラフィ(キャピリアTB[®], 日本ベクトン・ディッキンソン)を用いた結核菌の迅速同定について報告した。液体培養による迅速検出、イムノクロマトによる迅速同定に加え、MGIT960 SIREによる薬剤感受性を行うことで迅速、正確な検査が可能でCDCの勧告を満たすことができる。

国内の精神科を含む病院、事業所、学校、老人福祉施設および簡易宿泊所などを中心とした結核集団感染事例は毎年多数報告されている²⁾。また結核症対策の重要性からWHOと世界結核肺疾患予防連合(IUATLD)は世界的規模で薬剤耐性結核菌のサーベイランスを1994年に

開始し、結核対策が不十分な国や地域では薬剤耐性結核菌の検出率が高いことを明らかにした¹⁾。特にMDR-TBに感染した患者は治療が非常に困難であるだけでなく、より強力で高コストな治療を要するため、結核菌の検出および薬剤感受性成績を迅速に行う必要がある。MGIT960 SIREは国内従来法またNCCLS法とも成績は良く一致し、迅速に結果が得られることから結核菌の薬剤感受性測定に有用である。また本法を用いることにより国内で脅威となりつつある多剤耐性結核菌の迅速検出が可能となり、迅速かつ正確な結核対策に大きく寄与するものと考えられた。

文 献

- 1) WHO: WHO Report 2003: Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing. World Health Organization, Geneva, 2004
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課 監: 結核の統計 2003. 結核予防会, 東京, 2003
- 3) 佐々木結花, 山岸文雄, 水谷文雄, 他: 中高年を中心に生じた多剤耐性結核菌による集団感染事例. 結核 74: 549~553, 1999
- 4) US Department and Human Service/Public Health Service: Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons. Florida and New York 1989-1992. Morbid Mortal Weekly Rep 40: 585~591, 1991
- 5) NCCLS: Susceptibility testing of mycobacteria, and nocardiae, other aerobic actinomycetes; Approved standard M24-A: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, P.A., 2003
- 6) Centers for Disease Control and Prevention: CDC guidelines for tuberculosis control in health care facilities. Morbid Mortal Weekly Rep 43: 1~13, 1994
- 7) 阿部千代治, 青野昭男, 平田和重: BACTEC MGIT 960 システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験: 固体培地を用いる比率法との比較. 結核 76: 657~662, 2001
- 8) Macondo E A, Ba F, Gaye-Diallo A, et al: Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT AST SIRE). Clin Microb Infect 6: 361~365, 2000
- 9) 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 40: 150~154, 2002
- 10) 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 460TB method and the ager plate method of proportion. J Clin Microbiol 40: 607~610, 2002
- 11) Bergmann J S, Woods G L: Mycobacteria Growth Indicator Tube for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin. Diagn Microbiol Infect Dis 27: 153~156, 1997
- 12) 小林寅詰, 戸田陽代, 小山悦子, 他: Mycobacteria

Growth Indicator Tube(MGIT)を用いた自動抗酸菌検出装置の検出能力に関する検討。感染症学雑誌 73: 172 ~ 178, 1999

13) 長谷川美幸, 小山悦子, 内野卯津木, 他: 免疫クロマトグラフィによる結核菌群迅速同定に関する検討。感染症学雑誌 77: 110 ~ 115, 2003

Evaluation of rapid automated susceptibility testing with liquid medium
for *Mycobacterium tuberculosis*
Comparison of test results by mycobacteria growth indicator tube to those
by conventional method or NCCLS

Miyuki Hasegawa¹⁾, Norio Mitsugi¹⁾, Etsuko Koyama¹⁾,
Yumie Sato¹⁾, Intetsu Kobayashi¹⁾ and Katsu Saionji²⁾

¹⁾Chemotherapy Division, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.,
3 30 1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

²⁾Department of Laboratory Medicine, National Defense Medical College

Susceptibility test results obtained by the Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 SIRE susceptibility test (MGIT960 SIRE, Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.) a kit for rapid automated susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*, for MGIT960 with liquid medium were compared to those by 1% Ogawa medium (conventional) and proportion method (NCCLS) The four drugs tested were streptomycin, isoniazid (INH) rifampicin (RFP) and ethambutol. Fifty-two strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with tuberculosis were used as test strains.

Susceptibility test results obtained by these three methods, all coincided in 92.3% to 96.2% of strains, which showed favorable coincidence although they depended on these drugs. Strains suspected of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) resistant to INH and RFP were three (5.8%) for MGIT960 SIRE and one (1.9%) for NCCLS but none were detected by the 1% Ogawa medium. The mean time required for the susceptibility test was 7.8 days for MGIT960 SIRE, 10.1 days for the 1% Ogawa medium, and 21.0 days for NCCLS method. Susceptibility test results were thus obtained most rapidly by MGIT960 SIRE.

MGIT960 SIRE is useful for determining the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to antibiotics since test results coincide well with those obtained by 1% Ogawa medium and NCCLS, which are used widely in Japan, and test results are rapidly obtained by MGIT960 SIRE. This makes it possible to detect MDR-TB rapidly, speeding up time to treatment.