

千葉県内の患者から分離された結核菌の薬剤感受性について

岸田 一則, 内村真佐子

Drug Sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* in Chiba Prefecture

Kazunori KISHIDA and Masako UCHIMURA

I. はじめに

わが国の結核罹患率は1997年より3年連続の上昇が認められ、1999年に厚生労働省より結核緊急事態宣言により結核対策についての提言がなされた¹⁾。その後罹患率は、2000年から3年連続で低下が認められている。千葉県においても罹患率は同様の傾向であるが、都道府県別に高い順に並べると1997年49位、2000年31位、2002年22位と悪化している¹⁾。そのため結核の完全治癒支援、感染拡大防止、早期発見等目標に結核対策千葉方式（平成14年4月千葉県健康増進課）として重点対策を実施している。われわれは、結核菌のRFLP分析による型別、薬剤感受性試験等実施し保健所等の行う結核対策を支援している。

近年、患者に対する不適切あるいは不完全な治療による結核菌の薬剤耐性化が問題となっている。特にイソニアジド（INH）、リファンピシン（RFP）2剤同時に耐性をもった結核菌は多剤耐性結核菌と呼ばれ、治療が非常に困難で、致命率も高い²⁾。適正な医療による菌の薬剤耐性獲得防止、早期発見による感染防止対策等がますます重要な課題となっている。

われわれは千葉県内で分離された結核菌の抗結核薬に対する最小発育阻止濃度（MIC）を測定することにより、薬剤耐性化の動向を調査し治療方式との関連を検討したので報告する。

II. 方法

菌株：千葉県内の患者から分離された結核菌137株について検査した。

菌液調整：2%小川培地に発育した培養2週間以内の結核菌を、

ブロス（マイコピース、極東製薬）に接種し3~7日間培養、攪拌後500回転10分遠心して均一な菌液とした。

薬剤感受性試験：菌液を吸光度0.16~0.20（530nm）に調整した後ストレプトマイシン（SM）、エタンブトール（EB）、カナマイシン（KM）、イソニアジド（INH）、リファンピシン（RFP）、レボフロキサシン（LVFX）、スパルフロキサシン（SPFX）、シプロフロキサシン（CPFX）の8薬剤について微量液体希釈法（プロミックMTB-1：極東製薬）を使用して7日培養後MICを測定した。必要に応じて比率法（ウェルパック培地S：日本ビーシージー）を併用して14日培養後感受性を判定した。

薬剤感受性判定：得られたMICは山根らの報告³⁾により感受性、中間域（検討が必要な判定保留域）、耐性の3つに判定した。（表1）

表1 結核菌が各薬剤に示すMICに対する薬剤感受性判定基準³⁾

薬 剤	感 受 性	中 間 域	耐 性
SM	≤4.0	8.0~16	16<
EB	≤1.0	2.0~4.0	4.0<
KM	≤4.0	8.0~32	32<
INH	≤0.5	1.0~2.0	2.0<
RFP	≤0.03	0.06~2.0	2.0<
LVFX	≤0.5	1.0	1.0<
SPFX	≤0.25	0.5	0.5<
CPFX	≤0.5	-	0.5<

数値はMIC（μg/ml）

III. 結果

137株の各薬剤に対するMIC別菌株数と薬剤感受性判定成績を表2から表9に示した。

表2 SMの最小発育阻止濃度別菌株数と薬剤感受性の判定

MIC(μg/ml)	≤0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128<
2002年菌株数				7	40	4					1	128	3
2003年菌株数			1	6	60	10	2	1					2
判 定	感受性						中間			耐性			
判定菌株数	130(94.8%)						1(0.7%)			6(4.3%)			

表3 EBの最小発育阻止濃度別菌株数と薬剤感受性の判定

MIC(μg/ml)	≤0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128<
2002年菌株数				2	26	25	2						3
2003年菌株数				11	55	13	2	1					2
判 定	感受性						中間			耐性			
判定菌株数	94(68.6%)						12(30.7%)			1(0.7%)			

千葉県衛生研究所
(2004年1月16日受理)

表4 KMの最小発育阻止濃度別菌株数と薬剤感受性の判定

MIC (μg/ml)	≤0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128<
2002年菌株数					15	38	2						3
2003年菌株数			2	12	60	7							1
判定	感受性						中間			耐性			
判定菌株数	136(99.2%)						0			1(0.7%)			

表5 INHの最小発育阻止濃度別菌株数と薬剤感受性の判定

MIC (μg/ml)	≤0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	32<	128<
2002年菌株数			38	8	5	2		1	1				3
2003年菌株数		5	43	21	1	2	4	1	4			1	2
判定	感受性					中間			耐性				
判定菌株数	121(88.3%)					8(5.8%)			8(5.8%)				

表6 RFPの最小発育阻止濃度別菌株数と薬剤感受性の判定

MIC (μg/ml)	≤0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	32<	128<
2002年菌株数	54				1								3
2003年菌株数	78										1	3	1
判定	感受性		中間					耐性					
判定菌株数	132(96.4%)		1(0.7%)					4(2.9%)					

表7 LVFXの最小発育阻止濃度別菌株数と薬剤感受性の判定

MIC (μg/ml)	≤0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	32<	128<
2002年菌株数			2	16	33	1		2	1				3
2003年菌株数			2	35	44	1						1	2
判定	感受性					中間		耐性					
判定菌株数	132(96.4%)					2(1.5%)		3(2.2%)					

表8 SPFXの最小発育阻止濃度別菌株数と薬剤感受性の判定

MIC (μg/ml)	≤0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	32<	128<
2002年菌株数	1	2	24	24	1	1	1	1					3
2003年菌株数		3	51	27	1							1	2
判定	感受性				中間			耐性					
判定菌株数	132(96.4%)				2(1.5%)			3(2.2%)					

表9 CPFXの最小発育阻止濃度別菌株数と薬剤感受性の判定

MIC (μg/ml)	≤0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	32<	128<
2002年菌株数			2	14	35	1		2		1			3
2003年菌株数			1	29	52							1	2
判定	感受性						耐性						
判定菌株数	133(97.1%)						4(2.9%)						

SM感受性 (表2) : 感受性は130株 (94.9%), 中間域は1株 (0.7%), 耐性は6株 (4.4%) と判定された。感受性株はMIC 1 μg/mlを示した株が100株 (72.9%) と最も多かった。耐性と判定された6株のうち5株がMIC 128 μg/ml以上を示す高度耐性菌であった。

EB感受性 (表3) : 感受性は94株 (68.6%), 中間域は12株 (30.7%), 耐性は1株 (0.7%) と判定された。感受性株はMIC 1 μg/mlを示した株が81株 (59.1%) と最も多かった。耐性と判定された1株はMIC 8 μg/mlを示した。この株はINH, RFP, KMにも耐性と判定された。中間域に判定された株でMIC 2 μg/mlを示した株が38株 (27.7%) と多かった。

KM感受性 (表4) : 感受性は136株 (99.3%), 耐性は1株 (0.7%) と判定された。感受性株はMIC 2 μg/mlを示した株が98株

(71.5%) と最も多く、耐性株はMIC 128 μg/ml以上を示した高度耐性株が1株 (0.7%) であった。

INH感受性 (表5) : 感受性は121株 (88.3%), 中間域は8株 (5.8%), 耐性は8株 (5.8%) と判定された。感受性株の中でMIC 0.125 μg/mlを示した株が81株 (59%) と最も多かった。耐性株はMIC 4 μg/mlを示した株が2株 (1.4%), 8 μg/mlが5株 (3.6%), 32 μg/ml以上を示した高度耐性株が1株 (0.7%) であった。中間域と判定された8株 (5.8%) はすべて比率法で感受性と判定された。

RFP感受性 (表6) : 感受性は132株 (96.4%), 中間域は1株 (0.7%), 耐性は4株 (2.9%) と判定された。感受性株はMIC 0.03 μg/mlを示した株が132株 (96.3%) と最も多かった。耐性株はMIC 32 μg/mlを示した株が1株 (0.7%), MIC 32 μg/ml以上の高度耐

性株が2株(2.1%)であった。耐性と判定された株はすべて2003年後半に分離された株で、INHにも耐性と判定された多剤耐性結核菌であった。中間域と判定されたMIC 0.5 μ g/mlを示した1株(0.7%)は比率法でRFP感受性、INHとSM耐性と判定された。

フルオロキノロン(LVFX, SPFX, CPFX)感受性(表7, 表8, 表9): LVFX感受性は132株(96.4%), 中間域は2株(1.5%), 耐性は3株(2.1%), SPFX感受性は132株(96.4%), 中間域は2株(1.5%), 耐性は3株(2.1%), CPFX感受性は133株(97.1%), 耐性は4株(2.9%)と判定された。LVFX耐性と判定された3株は、SPFX, CPFXにも耐性であった。CPFXのみ耐性と判定された1株は、LVFX, SPFXに対して判定保留域と判定された。この株のMICは1 μ g/mlと感受性との境界に近い値を示したため、フルオロキノロン耐性獲得状況を詳細に検討する必要があると考えられた。

多剤耐性結核菌: 今回検討した8剤いずれかに耐性と判定されたのは15株(10.9%)でそのうち多剤耐性結核菌4株(2.9%)が確認された(表10)。

表10 耐性菌15株が示した各薬剤に対する耐性パターン

薬剤耐性パターン	菌株数
SM	3
INH	2
CPFX	1
SM,INH	2
INH,RFP	2
INH,RFP, KM	1
LVFX,SPFX,CPFX	3
INH,RFP,KM,EB	1

は多剤耐性結核菌

IV. 考 察

薬剤耐性菌分離頻度は、INH, RFP, SMが他の5剤より高く、耐性菌の示すMICも高い傾向があった。INH, RFP, SM, EBは治療によく使われる薬剤であり、治療前の薬剤感受性の確認は重要である。

多剤耐性結核菌4株(2.9%)は、いずれも2003年後半の分離株であり、それぞれの患者の感染状況は結核入院治療中の耐性獲得例1例、施設内での多剤結核患者からの感染例1例、路上生活者感染例2例であった。近年の社会情勢により路上生活者、日雇い労働者など住所不定者の結核罹患率が増加傾向にある¹⁾。早期発見治療は重要な結核対策であるが、その後の患者の服薬支援等継続的管理が完全な治療や薬剤耐性化防止のため重要である。

フルオロキノロン剤は通常結核の治療に使用されていないが、耐性菌や副作用の関係でINH, RFPが使用できない場合second-line drugs²⁾またはフルオロキノロン剤から感受性のある薬剤を選択して使用することが勧められている³⁾。フルオロキノロン剤

耐性と判定された3株が分離された患者はフルオロキノロン剤の投与を受けていなかった。しかしLVFXの投与により分離菌のLVFX, SPFX, CPFXに対するMICの増加が認められた事例⁴⁾もあることから、3株のフルオロキノロン剤耐性菌分離患者は結核と診断される以前にフルオロキノロン剤等の投与を受けていた可能性も示唆される。

結核菌薬剤感受性試験法は、わが国では卵培地を使用した比率法が一般的で、検査室での利便性を考慮した⁵⁾1濃度法(INHのみ2濃度)が各薬剤について感受性、耐性の判定に用いられている。これは臨床治療上有効な方法であるが、疫学調査には得られる情報量が少ない。一方、微量液体希釈法は各薬剤について11~12段階の濃度でMICを測定するため、詳細な成績が得られ判定の精度管理も容易である⁶⁾。また判定は卵培地を使用する方法の半分の期間(7日間)で可能であり、耐性菌の早期発見や発生の動向を探るのに適している。しかし比率法と成績の不一致も報告⁷⁾されており、臨床治療上の判断に役立つ信頼性の高い薬剤感受性成績を得るためには、さらに耐性遺伝子の検索を含めた検査法相互間の検討を行うことが必要である。

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染課監修(2003): 結核の統計2003, 財団法人結核予防会発行
- 2) 阿部千代治(1998): 感受性試験と耐性基準 結核, 73, 649-655
- 3) 山根誠久, 一山智, 川原伸, 飯沼由嗣, 斉藤宏, 霜島正浩, 宇田川宏和, 仲宗根勇(1999): Middlebrook合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験(第3報) 臨床病理, 47, 754-766
- 4) 木村友子, 鈴木公典, 矢部勤, 角南佑子, 志村昭光, 猪狩英俊, 池上宏, 小倉敬一, 佐々木結花, 山岸文雄(2002): 飯場における結核検診の検討 結核, 77, 597-603
- 5) 日本結核病学会治療委員会: 「結核医療の基準」の見直し 結核, 77, 537-538
- 6) 日本結核病学会治療委員会: 「結核医療の基準」の見直し-第2報- 結核, 78, 497-499
- 7) 水口康雄, 岸田一則(1999): 結核菌の臨床分離株を用いたRFLP分析に関する研究 平成11年度厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業) 薬剤耐性結核のサーベイランス, 耐性の分子機構および多剤耐性結核の治療に関する研究 15-20
- 8) 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会(1997): 結核菌の薬剤感受性試験, 特に試験濃度変更と比率法導入への提案 結核, 72, 597-598
- 9) 比嘉美也子, 斉藤宏, 山根誠久, 仲宗根勇, 宮城知佳(2002): 結核薬剤感受性試験に関する小川培地を用いた比率法と微量液体希釈法, BrothMIC MTBの判定互換性 結核, 77, 61-66