

原 著

抗結核剤耐性による抗酸菌の鑑別

正 井 秀 雄

関東中央病院臨床検査科

受付 昭和 53 年 11 月 8 日

DIFFERENTIATION OF MYCOBACTERIA BY THE RESULTS OF
SENSITIVITY TESTS FOR ANTITUBERCULOSIS DRUGS

Hideo MASAI*

(Received for publication November 8, 1978)

The sensitivity tests of Mycobacteria against various drug concentrations most vital for determining drugs for choice, but here in this report the author studied whether it is possible or not to differentiate the species of Mycobacteria by observing the results of routine drug sensitivity tests and thereby intended to establish resistance pattern of each species without having the aid of any specific reagent or implementation of other procedures.

Observation was made on the results of sensitivity tests on 6 different species frequently isolated at clinical laboratories in Japan: namely, *M. tuberculosis* (55 strains), *M. kansasii* (7 strains), *M. scrofulaceum* (14 strains), *M. gordonae* (4 strains), *M. avium-intracellulare* complex (24 strains) and *M. fortuitum* (7 strains) for the following 8 kinds of drugs at various concentrations; SM, PAS, INH, KM, CS, TH, EB and RFP, on the commercial 1% Ogawa egg media.

As a result, 2 to 5 different resistance patterns peculiar to each species were established by selecting 8 different concentrations of 5 kinds of drugs which showed conspicuous difference in the results of sensitivity tests on the following combinations of various drugs: PAS 1 ($\mu\text{g/ml}$), INH 0.1, 1 and 5, SM 20, EB 2.5, CS 20 and 40. The possibility of differentiating each species thus obtained were: *M. tuberculosis* 70.1%, *M. kansasii* 100%, *M. scrofulaceum* 42.9%, *M. gordonae* 100%, *M. avium-intracellulare* complex 78.2% and *M. fortuitum* 100%. Among the strains tested, those misidentified or unidentified accounted for 29.7%.

The above-given resistance pattern for 5 different kinds of drugs proved that they were fully acceptable as a preliminary method for differentiating 6 species of Mycobacteria frequently isolated in Japan.

緒 言

抗酸菌の鑑別および同定を行なうには、抗酸菌の生物学的、生化学的性状等の総合的な検査を必要とする。ま

た、抗酸菌種の抗結核剤に対する耐性も抗酸菌鑑別の情報の一つとなりうる。即ち、耐性検査は治療効果を予測するものとして重要であるが、また特別な試薬や器材を用いることなく、抗結核剤に対して発育の有無を肉眼で

* From the Kanto Chuo Hospital, 6-25-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158 Japan.

観察するだけでよく、それら各菌種の薬剤耐性パターンを設定することによつて、抗酸菌種鑑別の情報として活用しようというものである。

このことはまた臨床的にも患者の管理、治療を迅速かつ的確に行なうために有用である。

実験方法および成績

関東中央病院臨床検査科で分離した抗酸菌ですでに菌種同定がなされている、*Mycobacterium tuberculosis* 55株、*M. kansasii* 7株、*M. scrofulaceum* 14株、*M. gordonae* 4株、*M. avium-intracellulare* complex 24株、*M. fortuitum* 7株の計111株を用い、市販の1%小川耐性培地に培養し、1~4週間後に判定した。耐性について東村²⁾は詳細に述べているが、ここでは対照と同じ発育状態を示した完全耐性をもつて耐性とした。

使用した抗結核剤名および培地中に含まれた薬剤濃度は($\mu\text{g/ml}$)で次のごとくである。SM20, 200, PAS1, 10, INH0.1, 1, 5, KM25, 100, CS20, 40, TH(1314)25, 50, EB2.5, 5, RFP10, 50の8剤17濃度である。

各抗酸菌種に関する抗結核剤耐性検査の成績を耐性率で示すと表ようになる。これら薬剤に対する各菌種の耐性態度を観察し、菌種間における耐性率の差の著しいものを選びだした。はじめにSM20 $\mu\text{g/ml}$ で*M. fortuitum*および*M. avium-intracellulare* complexは全株耐性、あるいは高い耐性率を示し、*M. tuberculosis*や*M. gordonae*は低い耐性率、あるいは感受性を示し

た。またSM200 $\mu\text{g/ml}$ では高い耐性率を示した菌種は認めなかつた。

PAS1 $\mu\text{g/ml}$ では*M. tuberculosis*を除いては、どの菌種においても全株が耐性であつた。PAS10 $\mu\text{g/ml}$ では*M. kansasii*が全株耐性を示した。

INH0.1 $\mu\text{g/ml}$ では*M. tuberculosis*を除いては、どの菌種も全株耐性や極めて高い耐性率を示し、またINH1 $\mu\text{g/ml}$ では*M. kansasii*が感受性に変化をみせた。INH5 $\mu\text{g/ml}$ は*M. fortuitum*のみが全株耐性を示し、*M. gordonae*が感受性に变化した。

KM25 $\mu\text{g/ml}$ では*M. avium-intracellulare* complexが高い耐性率を、*M. tuberculosis*と*M. gordonae*が低い率と感受性を示した。KM100 $\mu\text{g/ml}$ は*M. avium-intracellulare* complexのみがやや高い耐性率であつた。

CS20 $\mu\text{g/ml}$ では*M. fortuitum*と*M. avium-intracellulare* complexが全株耐性や高い耐性を、また*M. kansasii*のみが感受性を示し、CS40 $\mu\text{g/ml}$ では*M. fortuitum*のみが全株耐性であつた。

EB2.5 $\mu\text{g/ml}$ は*M. avium-intracellulare* complexと*M. scrofulaceum*が全株耐性や高い耐性率を示し、*M. kansasii*と*M. gordonae*は感受性を示した。EB5 $\mu\text{g/ml}$ では*M. avium-intracellulare* complexが全株耐性であつた。

TH(1314)は25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ とも各菌種間に耐性率の著しい差は認めなかつた。

Table. Prevalence of Resistance of Various Species for Different Drugs with Different Concentrations (%)

Species	No. of strains	SM		PAS		INH			KM	
		20	200	1	10	0.1	1	5	25 ($\mu\text{g/ml}$)	100
<i>M. tuberculosis</i>	(55)	7.3	5.5	16.4	5.5	25.4	16.4	9.0	5.5	3.6
<i>M. kansasii</i>	(7)	14.7	0	100.0	100.0	100.0	0	0	42.9	0
<i>M. scrofulaceum</i>	(14)	35.7	0	100.0	42.9	92.9	78.6	14.3	35.7	7.1
<i>M. gordonae</i>	(4)	0	0	100.0	50.0	100.0	100.0	0	0	0
<i>M. intracellulare</i>	(24)	95.9	50.0	100.0	83.4	95.9	79.3	16.6	91.7	76.1
<i>M. fortuitum</i>	(7)	100.0	28.5	100.0	85.7	100.0	100.0	100.0	71.4	57.5

Species	No. of strains	CS		EB		TH(1314)		RFP	
		20	40	2.5	5	25	50	10 ($\mu\text{g/ml}$)	50
<i>M. tuberculosis</i>	(55)	40.0	7.3	3.6	1.8	53.7	21.8	23.0	8.3
<i>M. kansasii</i>	(7)	0	0	0	0	42.7	42.7	80.0	20.0
<i>M. scrofulaceum</i>	(14)	43.9	14.3	86.7	28.6	57.1	42.3	50.0	25.0
<i>M. gordonae</i>	(4)	75.0	25.0	0	0	75.0	50.0	50.0	50.0
<i>M. intracellulare</i>	(24)	91.7	37.5	100.0	100.0	87.5	79.3	100.0	95.9
<i>M. fortuitum</i>	(7)	100.0	100.0	42.9	42.9	85.3	57.1	100.0	100.0

* *M. intracellulare* = *M. avium-intracellulare* complex.

REP 10 μ g/ml, 50 μ g/ml とも *M. fortuitum* と *M. avium-intracellulare* complex に全株耐性と高い耐性率を認めた。

(RFP 耐性測定株は *M. tuberculosis* 48株, *M. kansasii* 5株, *M. scrofulaceum* 12株である。)

考 察

抗結核剤に対して、抗酸菌種の感受性が異なるという多くの報告²³⁾¹⁶⁾があり、またその他にも抗結核剤についての交叉耐性、非定型抗酸菌に対する有効薬剤の検索等、広い意味で耐性を論じている報告^{14)~9)}もまた多い。

薬剤耐性検査の目的は治療効果を予測するものであるから、本来の抗酸菌種の鑑別、同定に用いられる生物学的、生化学的性状検査とは異なり、鑑別力は劣るものと考えられるのは当然である。ただ耐性を観察することで充分というものでなく、あくまでも抗結核剤耐性を一つの情報群として、抗酸菌鑑別の緒口に活用しようとするものである。

すなわち、どの薬剤耐性を利用するのが適当であるのか、またどのような耐性パターンを設定することで抗酸菌種をより鑑別しやすくするかを検討した。

各抗酸菌種の鑑別に有効と認めた薬剤は、SM 20 μ g/ml, PAS 1 μ g/ml, INH 0.1, 1, 5 μ g/ml, CS 20, 40 μ g/ml および EB 2.5 μ g/ml の5薬剤8濃度であった。これらを棒グラフにして示したのが図1と図2である。

KM, TH, RFP を採らなかつたのは次の理由による。KM では SM と同じアミノグリコシド系であり、よく似た耐性率を示したが、SM の方がよくわかる成績を認めたためである。また TH では各菌種に対する耐性の差異を認めなかつたことによる。RFP については1%小川耐性培地を使用した場合、各菌種の RFP に対する感受性が低かつたことによる。

抗酸菌の大多数を占める *M. tuberculosis* と他の菌種を選別できるものとして、PAS 1 μ g/ml を選んだ。PAS 1 μ g/ml に対する *M. tuberculosis* の耐性率は 16.4% に止まっているのに対して、他の菌種はいずれも 100% の耐性率を示し、両者の間で最も著しい差を認めた。このことから PAS 1 μ g/ml に感受性を示す菌株は *M. tuberculosis* であると推測しうる。また *M. tuberculosis* をより確認する意味で、INH 0.1 μ g/ml の感受性を追加した。すなわち *M. tuberculosis* は INH 0.1 μ g/ml での耐性率は 25.4% と低いが、他の菌種はいずれも 92~100% と高い耐性率を認めたので、PAS および INH に感受性を示す菌株は *M. tuberculosis* といえよう、その場合 *M. tuberculosis* 菌株中の 70.1% がここにふくまれた。

次に、*M. tuberculosis* 以外の菌株は PAS 1 μ g/ml に耐性であるので、PAS 1 μ g/ml 耐性株のもので INH に対する耐性を検討した。

INH 0.1 μ g/ml のみに耐性を示して、INH 1 μ g/ml に感受性であった菌株には *M. kansasii* 全株がふくまれていたのが大きな特徴であった。

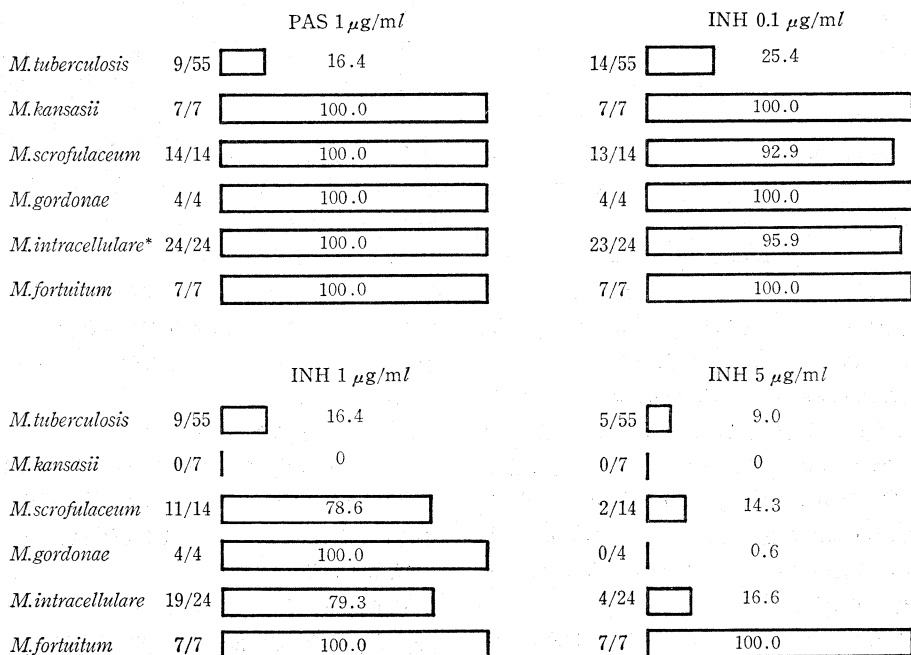


Fig. 1. Resistance Pattern of Various Species for PAS and INH (%)

* *M. intracellulare* = *M. avium-intracellulare* complex.

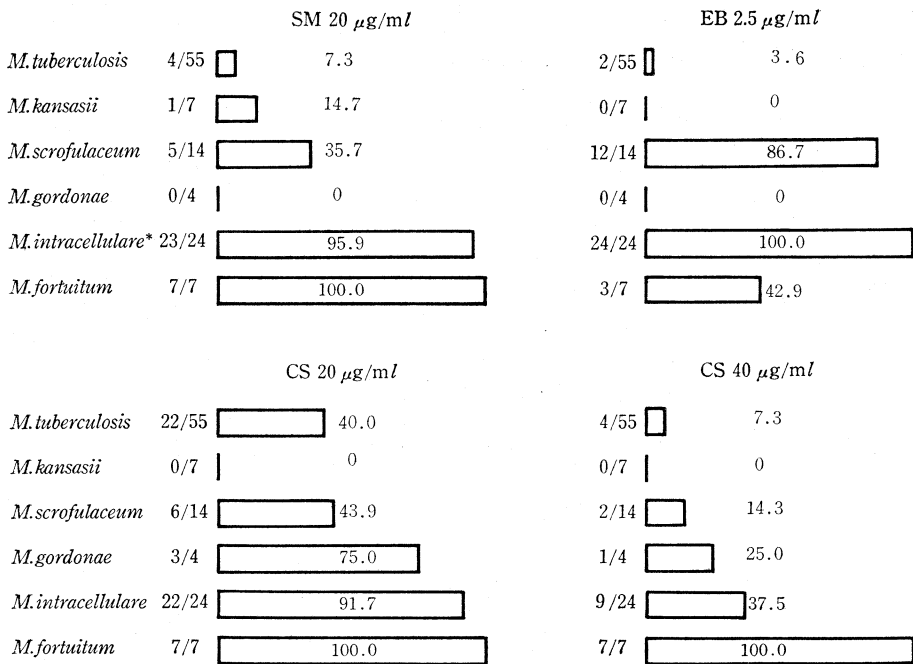


Fig. 2. Resistance Pattern of Various Species for SM, EB and CS (%)

* *M. intracellulare*=*M. avium-intracellulare* complex.

INH 1µg/ml まで耐性で、INH 5µg/ml に感受性の菌株には *M. scrofulaceum*, *M. gordonae* および *M. avium-intracellulare* complex の大多数の株がふくまれていた。

INH 5µg/ml に耐性を示した菌株には *M. fortuitum* 全株がふくまれていた。

以上、抗酸菌全株について、PAS 1µg/ml, INH 0.1, 1, 5µg/ml に対する耐性の有無を観察することで、*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* の各菌種とその他の群 (*M. scrofulaceum*, *M. gordonae* および *M. avium-intracellulare* complex) の四つに大別することがある程度可能であった。

その他の群 (*M. scrofulaceum*, *M. gordonae* および *M. avium-intracellulare* complex) とされたものから各菌種に再分別するのに、SM 20µg/ml に対して *M. avium-intracellulare* complex は高い耐性率を示したのに反し、*M. scrofulaceum*, *M. gordonae* は低い耐性率やあるいは全株が感受性を示し、SM 20µg/ml 耐性で *M. avium-intracellulare* complex のほとんどを分別できる。また *M. scrofulaceum* と *M. gordonae* を分別するのに EB 2.5µg/ml を選んだ。*M. scrofulaceum* は EB 2.5µg/ml に高い耐性率であったが、*M. gordonae* は全株感受性であった。

PAS と INH では分別しえなかつたが、SM 20µg/ml と EB 2.5µg/ml の耐性の有無を観察することで、*M. avium-intracellulare* complex, *M. scrofulaceum*, *M.*

gordonae のそれぞれをかなり分別できる。

菌種をより確実にする意味で CS 耐性をあててみた。すなわち、CS 20µg/ml 感受性株に *M. kansasii* を、また CS 40µg/ml 耐性株に *M. fortuitum* の全株が含まれたので、CS を追加することで両菌種をよりたしかに鑑別できる。

各抗酸菌を鑑別するにあたり、抗結核剤 5 剤、8 濃度の耐性の有無をそれぞれ 2 本から 5 本の耐性培地を用いることによつて、わが国で臨床材料から分離される可能性のある抗酸菌種、*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. avium-intracellulare* complex および *M. fortuitum* の鑑別がある程度可能である。

各抗結核剤の耐性率から抗酸菌種を鑑別するのは困難であるが、順序立てて薬剤を組み合わせると菌種鑑別に有用であるが、このような組合せの大切さを Kubica¹⁷⁾ も報告している。

設定した抗結核剤の耐性パターンを図 3 に示した。

M. tuberculosis に対するパターンは PAS 1µg/ml および INH 0.1µg/ml の 2 本に感受性を示す菌株で、この場合 *M. tuberculosis* の 70.1% を鑑別しえた。

M. kansasii の耐性パターンは PAS 1µg/ml 耐性、INH 0.1µg/ml 耐性、INH 1µg/ml 感受性、EB 2.5µg/ml 感受性、CS 20µg/ml 感受性を示し、このような菌株は *M. kansasii* と鑑別しうる。下出¹⁰⁾ は *M. kansasii* は PAS, KM 耐性、INH, EB 低耐性、CS 感受性と

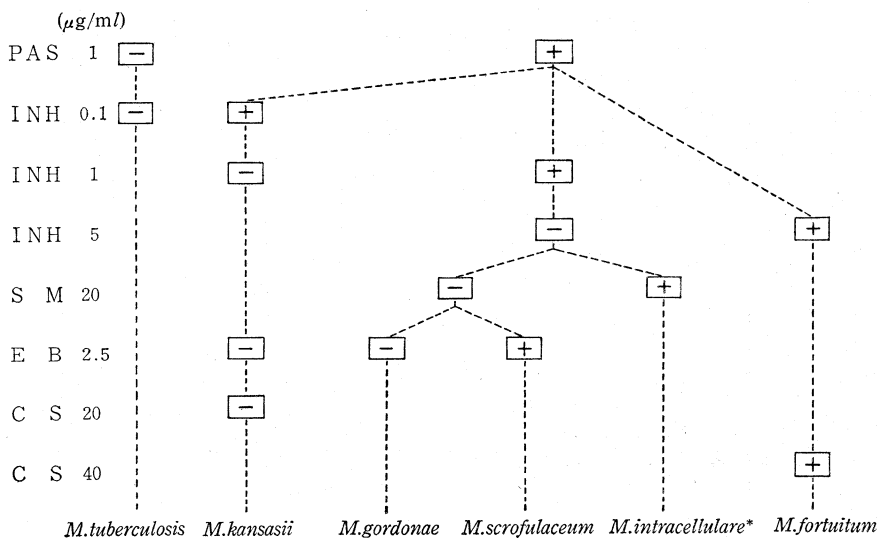


Fig. 3. Differentiation of Species by Resistance Pattern

* *M. intracellulare*=*M. avium-intracellulare* complex.

報告している。

M. scrofulaceum の耐性パターンは PAS1µg/ml 耐性, INH 1µg/ml 耐性, INH 5µg/ml 感受性, SM 20µg/ml 感受性, EB 2.5µg/ml 耐性としたが, このパターンを示す菌株は *M. scrofulaceum* の42.9%であつた。東村¹¹⁾は scotochromogens のうち EB 5µg/ml 耐性であることにより, *M. scrofulaceum* の90%を *M. gordonae* から区別しようとしている。

M. gordonae の耐性パターンを PAS1µg/ml 耐性, INH 1µg/ml 耐性, INH 5µg/ml 感受性, SM 20µg/ml 感受性, EB 2.5µg/ml 感受性と設定したが, *M. gordonae* は全株このパターンに含まれた。

M. avium-intracellulare complex の耐性パターンは PAS1µg/ml 耐性, INH 1µg/ml 耐性, INH 5µg/ml 感受性, SM 20µg/ml 耐性としたが, この4本の耐性培地を観察すると, わが国の代表的な非定型抗酸菌である *M. avium-intracellulare* complex の79.3%を他から区別することができた。久世ら¹²⁾もⅢ群は概して抗結核剤に対する耐性が高いと報告している。

M. fortuitum の耐性パターンは PAS1µg/ml 耐性, INH 5µg/ml 耐性, CS 40µg/ml 耐性と設定したが, これによつて *M. fortuitum* の全株がこのパターンを示す群に含まれた。久世ら¹³⁾も rapid growers は薬剤耐性が極めて高いと, また木下ら¹⁴⁾もどの抗結核剤にも高い耐性を有すると述べている。東村¹⁵⁾は *M. fortuitum* を鑑別するのに CS 500µg/ml 耐性であることから利用できるとしている。

抗酸菌 111 株のうち, 今まで述べた各菌種特有の性状を示さず, 他の菌種に見誤つたものが16株, 14.4%みら

れ, また途中でどの耐性パターンにも属さず, 判定不能になつた菌株は17株, 15.3%認められ, 両方を合せると33株, 29.7%が抗結核剤耐性の観察では菌種の区別ができなかつた。

なお, 菌の接種量を培地面に数えられる程度を少なくしたり, あるいは5(+)位に増量して耐性の変化を観察したが, 接種菌量の差による耐性の変動は認められなかつた。

以上, 抗結核剤5剤の耐性の有無を観察し, 耐性パターンを設定することで, わが国の臨床材料から分離される可能性のある, 抗酸菌6菌種の分離株中42.9~100%は他菌種から鑑別が可能と思われ, 抗酸菌鑑別の緒口に活用しようものと考えられた。

結 論

抗結核剤耐性の観察による抗酸菌鑑別の情報として, SM, PAS, INH, EB および CS の5薬剤8濃度の耐性培地を応用し, 各菌種の耐性パターンを設定した。

薬剤耐性パターンにしたがつて分類したとき, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. fortuitum* の全株, *M. avium-intracellulare* complex の79.3%, *M. tuberculosis* の70.1%, *M. scrofulaceum* 42.9%が他の菌種から鑑別された。

この判定法で誤つて他菌種と判定されるもの, 判定不能のものが29.7%にみられた。

しかし, 日常行なわれる薬剤耐性検査の成績を観察することにより, 抗酸菌鑑別のために, かなり有用な情報が得られることを示した。

本論文の要旨は第53回日本結核病学会総会において発表した。

この研究を終るにあたり、結核予防会結核研究所 高橋昭三先生に御指導、御校閲を賜わり心から感謝いたします。また本論文を推薦していただいた国立公衆衛生院 川村達先生、ご後援いただいた東京通信病院 古家堯先生、当院の野坂謙二部長にお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 東村道雄：結核，52：17，1977.
- 2) 福原徳光：結核，51：477，1976.
- 3) 久世文幸・武田貞夫・前川暢夫：結核，49：189，1974.
- 4) 合田忠：日本胸部臨床，28：613，1969.
- 5) 東村道雄：結核，52：47，1977.
- 6) 東村道雄：結核，52：171，1977.
- 7) 豊原希一：結核，48：405，1973.
- 8) 田村昌敏・山崎彰・田村敏行・高野了・山崎将宏・桑山芳子：結核，48：427，1973.
- 9) 外間政哲：結核，51：287，1976.
- 10) 下出久雄：結核，52：577，1977.
- 11) 東村道雄：結核，45：237，1970.
- 12) 久世文幸・武田貞夫・前川暢夫：結核，49：151，1974.
- 13) 久世文幸・内藤祐子・武田貞夫・前川暢夫：結核，52：505，1977.
- 14) 木下三枝子・妹尾浩一・稲田修一・小笹正三郎・斎藤肇・山岡弘二：日本皮膚科学会雑誌，87：315，1977.
- 15) 東村純雄・東村道雄・水野松司：日本細菌学雑誌，22：18，1967.
- 16) 山本正彦：非定型抗酸菌症：金原出版，1970.
- 17) Kubica, G. P.: Amer. Rev. Resp. Dis., 107：9，1973.