

結核菌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

¹比嘉美也子 ²齊藤 宏 ³山根 誠久 ¹仲宗根 勇
³宮城 知佳

要旨: 日本結核病学会が提案する結核菌薬剤感受性試験, 小川培地での比率法を, 微量液体希釈法を原理とする BrothMIC MTB-1 (極東製薬工業, 東京) と比較評価した。評価では streptomycin, ethambutol, kanamycin, isoniazid, rifampicin を試験対象にした。これらの薬剤に対し, 3株の標準株を反復試験して再現性を評価したが, いずれの試験方法も高い再現性を示した。BrothMIC MTB 法で測定された最小発育阻止濃度 (MIC) は, すべて±1 管, $3 \log_2$ に分布したが, 計11件の MIC が判定保留の判定となった。他方, 小川培地での比率法ではすべての試験結果が期待される判定となった。しかし48件の試験のうち, 3件が菌発育対照培地での不十分な菌発育から, 判定不能となった。127株の臨床材料由来の結核菌が試験され, 判定一致率は89~90%に評価された。BrothMIC MTB 法で7.1~9.4%が判定保留に, まったく乖離した判定は0.8~3.1%に観察された。

結論として, これら2つの試験方法には高い再現性と互換性が示された。それぞれの試験方法のもつ長所と短所を考察した。

キーワード: 結核菌薬剤感受性試験, 判定互換性, 小川培地比率法, 微量液体希釈法, BrothMIC MTB

はじめに

既にわれわれは, Middlebrook 7H9 broth 液体培地を用いた微量液体希釈法を測定原理とし, 結核菌を試験対象とする薬剤感受性試験, BrothMIC MTB を開発し, 実用化してきた^{1,2)}。その開発にあたっては, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) の勧告する米国における標準法³⁾, Middlebrook 7H10 寒天培地での比率法 (以下, NCCLS 法) との判定互換性から, 感性・耐性を区分するための判定ブレイクポイントを, 測定された最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) から設定し, 提案した²⁾。一方わが国では1997年になり, 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会より小川培地での比率法が提案された⁴⁾。この試験方法は, 1%小川培地を用いた試験管培養を測定原理とし, “卵培地を薬剤感受性試験に用いない” とする

NCCLS 法とは基本的に異なる測定条件をもつ。その結果, わが国の検査施設では BrothMIC MTB での MIC 測定を採用する施設と日本結核病学会の提案する小川培地での定性試験を採用する施設が混在し, 相互に得られた成績を比較解析することができない現状にある。今回われわれは, 日本結核病学会が勧告する小川培地での比率法 (以下, 小川培地比率法) と, NCCLS 法と互換性をもつ BrothMIC MTB での MIC 判定を比較解析し, 感性 (S) および耐性 (R) のカテゴリー判定における互換性を評価することで, わが国における結果判定の不統一性を解消し, 相互の比較を可能にしたので報告する。

材料および方法

1. 検討施設

九州地区の結核病床をもつ国立療養所および琉球大学医学部附属病院の7検査施設で評価試験を実施した。

¹琉球大学医学部附属病院検査部, ²国立都城病院研究検査科, ³琉球大学医学部臨床検査医学講座

連絡先: 比嘉美也子, 琉球大学医学部附属病院検査部, 〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原 207 (E-mail: miyako-ryk@umin.ac.jp)

(Received 16 Aug. 2001/Accepted 8 Nov. 2001)

2. 対象菌株

対象菌株は各検査施設で分離、同定された臨床検体由来の *Mycobacterium tuberculosis* complex とし、計 127 株を試験した。また各検査施設における精度管理には、*M. tuberculosis* ATCC 27294 株、施設内菌株 *M. tuberculosis* H-17 株、*M. tuberculosis* H-55 株の 3 株を用いた。

3. 試験方法

微量液体希釈法を測定原理とする BrothMIC MTB-1 (極東製薬工業、東京) および日本結核病学会の提案する 1% 小川培地での比率法⁴⁾を原理とする結核菌感受性 1 濃度培地 (極東製薬工業) を用い、それぞれの使用説明書を遵守して各検査施設にて試験を行った。評価対象薬剤は、streptomycin (SM), ethambutol (EMB), kanamycin (KM), isoniazid (INH), rifampicin (RFP) の 5 剤とした。

(1) BrothMIC MTB-1: Middlebrook 7H9 broth 培地を入れるマイコプロス (極東製薬工業) に被検菌を接種し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ の通常大気で培地濁度が McFarland no. 1 相当に達するまで 5~7 日間培養した。得られた菌液を光学的に McFarland no. 1 濁度に正確に調製し、その菌液 0.21 ml を変法 Middlebrook 7H9 broth 培地 21 ml を入れる接種用培地に加え、よく混和した後、薬剤乾燥固着マイクロプレートの各ウェルに 0.2 ml ずつ分注、接種した。次いでマイクロプレートに蓋をし、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、5~10% CO_2 存在下で 7 日間培養した。判定は菌発育が観察されない最小薬剤濃度を含むウェルを菌発育阻止終末点とし、MIC 値で表示した。実測された MIC 値から、既報の判定ブレイクポイント²⁾に基づき感性 (S)、耐性 (R) を区分した。それぞれの試験薬剤での判定ブレイクポイントを Fig. 1 に示した。

(2) 1% 小川培地での比率法: マイコプロスに被検菌を接種し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ の通常大気で培地濁度が McFarland no. 1 相当に達するまで 5~7 日間培養した。得られた菌液を光学的に McFarland no. 1 濁度に正確に調製し、その菌液 0.1 ml を滅菌蒸留水 10 ml を入れた滅菌試験管に加え、よく混和して“100倍希釈菌液”とした。さらに、調製した“100倍希釈菌液” 0.1 ml を滅菌

蒸留水 10 ml を入れた滅菌試験管に加えて混和し、“10,000 倍希釈菌液”とした。

調製した“100倍希釈菌液”を薬剤を含まない対照培地と薬剤含有培地にそれぞれ 0.1 ml ずつ接種し、“10,000 倍希釈菌液”は対照培地だけに 0.1 ml 接種した。菌接種した小川培地は、まず接種した菌液が培地斜面全体に広がるように傾けて、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、通常大気で培養し、培養 7 日目に培地試験管を立て、培養を継続した。培養 4 週間目に、“100倍希釈菌液”を接種した対照培地に十分菌発育した時点 (++++~++++) で判定を行った。薬剤含有培地で発育した菌コロニー数が、“10,000 倍希釈菌液”を接種した対照培地での菌コロニー数と比べ、同じか多い場合を耐性 (R)、逆に少ない場合は感性 (S) と判定した。

4. 精度管理

各検査施設において、*M. tuberculosis* ATCC 27294 株、H-17 株、H-55 株を 1 週間以上の間隔をおいて 2~3 回、臨床分離株を試験する日に BrothMIC MTB-1 および小川培地比率法で反復試験した。

結 果

1. 精度管理用菌株での施設間再現性

あらかじめ選定した ATCC 27294 株および 2 株の施設内菌株を精度管理用菌株とし、それぞれの評価施設にて BrothMIC MTB 法で試験して得られた MIC 値の成績を Table 1 にまとめた。すべての MIC 値は ± 1 管 ($3 \log_2$) 以内に分布し、高い施設間再現性が確認された。ATCC 27294 株は試験対象とした 5 剤のうち、EMB を除く 4 剤に感性 (S)、H-17 株は SM, KM の 2 剤に感性 (S) で、残る 3 剤には耐性 (R)、H-55 株は 5 剤すべてに耐性 (R) の判定結果であった。しかし ATCC 27294 株での EMB、H-17 株での SM と EMB、H-55 株での SM においては、MIC 値の再現性は高いものの、感性・耐性のカテゴリー判定ではそれぞれ 3 件、2 件、5 件、1 件が判定保留 (indeterminate; I) に判定された。その結果、カテゴリー判定の評価では、感性 (S) あるいは耐性 (R) のうち、数

Table 1 Precision of BrothMIC MTB when the three reference strains of *Mycobacterium tuberculosis* were repeatedly tested

Antimycobacterial agent	Strains of <i>M. tuberculosis</i> tested		
	ATCC 27294	H-17	H-55
Streptomycin	0.5~2.0 (100)	2.0~8.0 (86.7)	16~64 (92.9)
Ethambutol	1.0~2.0 (81.3)	4.0~8.0 (66.7)	32~128 (100)
Kanamycin	1.0~4.0 (100)	0.5~2.0 (100)	>128 (100)
Isoniazid	0.125~0.5 (100)	4.0~16 (100)	4.0~16 (100)
Rifampicin	<0.03 (100)	≥ 16 (100)	4.0~>32 (100)

Each value represents MIC range observed.

In parenthesis, % frequency for the more interpretation no. of either susceptible or resistant/no. of testing.

Table 2 Precision of egg-based Ogawa proportion test method when the three reference strains of *Mycobacterium tuberculosis* were repeatedly tested

Antimycobacterial agent	Strains of <i>M. tuberculosis</i> tested		
	ATCC 27294	H-17	H-55
Streptomycin	16/16	15/15	0/14
Ethambutol	16/16	0/15	0/14
Kanamycin	16/16	15/15	0/14
Isoniazid (0.2 μ g/ml)	16/16	0/15	0/14
Rifampicin	16/16	0/15	0/14

Each value represents no. of susceptible interpretation/no. of testing.

Of 48 testings, one for H-17 and two for H-55 did not sufficiently grow on the growth control media.

Table 3 Interpretive compatibility between egg-based Ogawa proportion test method and BrothMIC MTB when clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex were tested

Antimycobacterial agent	Agreed with			Indeterminate by BrothMIC MTB		Discrepant results	
	(S)	(R)	Subtotal	Ogawa (S)	Ogawa (R)	BrothMIC (S)	BrothMIC (R)
						Ogawa (R)	Ogawa (S)
Streptomycin	78.0	11.0	89.0	0.8	7.9	2.4	0
Ethambutol	75.6	13.4	89.0	3.1	5.5	0	2.4
Kanamycin	85.0	4.7	89.8	0.8	6.3	3.1	0
Isoniazid	67.0	22.6	89.6	1.9	7.5	0.9	0
Rifampicin	76.4	13.4	89.8	2.4	7.1	0	0.8

Each value represents % frequency in the testings.

Isoniazid susceptibility was determined at the concentration of 0.2 μ g/ml by Ogawa-proportion test method.

の多い判定頻度を試験件数に対する%比率で示したが、SMとEMBについては66.7~100%の再現性に算出された。

Table 2には、小川培地比率法で3株の精度管理用菌株をそれぞれの施設で反復試験した時の判定結果をまとめた。ATCC 27294株ではすべて感性(S)、H-17株ではEMB、INH (0.2 μ g/ml)、RFPの3剤が耐性(R)、SMとKMは感性(S)に判定された。またH-55株では試験した5剤すべてが耐性(R)の判定結果であった。またH-17株で1件、H-55株で2件が対照培地に有意の菌発育が観察されなかったため、判定不能となり、施設間再現性の評価から除外された。しかし小川培地比率法とBrothMIC MTB法でのカテゴリー判定を比較すると、高い互換性が認められ、BrothMIC MTB法で判定保留(I)となった11件を除き、両者の判定結果はすべて一致した。

2. 臨床分離株での検討

各評価施設で分離同定された臨床材料由来の*M. tuberculosis* complex 127株について、小川培地比率法とBrothMIC MTB法でのカテゴリー判定を比較解析した成績をTable 3にまとめた。試験対象とした5剤において、感性(S)あるいは耐性(R)で両者の判定が一致した頻度は89~90%に算出された。BrothMIC MTB法では、

感性(S)あるいは耐性(R)を明確には区分できないMIC値の範囲を判定保留(I)としているが、この判定となった頻度が7.1%(KM)~9.4%(RFP)に観察された。これらBrothMIC MTB法で判定保留(I)となった試験の多くは、小川培地比率法では耐性(R)に判定されていた(5.5~7.9%)。2つの試験方法でまったく異なる判定が得られた頻度は0.8%(RFP)~3.1%(KM)の範囲にあり、SMとKM、頻度は低いもののINHの3剤ではBrothMIC MTB法が感性(S)、小川培地比率法が耐性(R)に、逆にEMBと頻度は低いもののRFPではBrothMIC MTB法が耐性(R)、小川培地比率法が感性(S)に判定される傾向が認められた。

Fig.には、今回検討した5剤について、BrothMIC MTB法で測定されたMIC値の分布と、それぞれのMIC値における小川培地比率法の判定結果を示した。SMでは、1.0および4.0 μ g/mlのMIC値に測定された3株が小川培地比率法で耐性(R)に判定された。SMと同系統薬剤であるKMにおいても、2.0および4.0 μ g/mlのMIC値を示した4株が小川培地比率法で耐性(R)に判定されている。EMBでは逆に、64 μ g/mlのMIC値の1株と8.0 μ g/mlのMIC値の2株が小川培地比率法で感性(S)に判定された。INHは両法で高い判定互換性を示し、0.5 μ g/mlのMIC値を示した1株のみが小川培地比

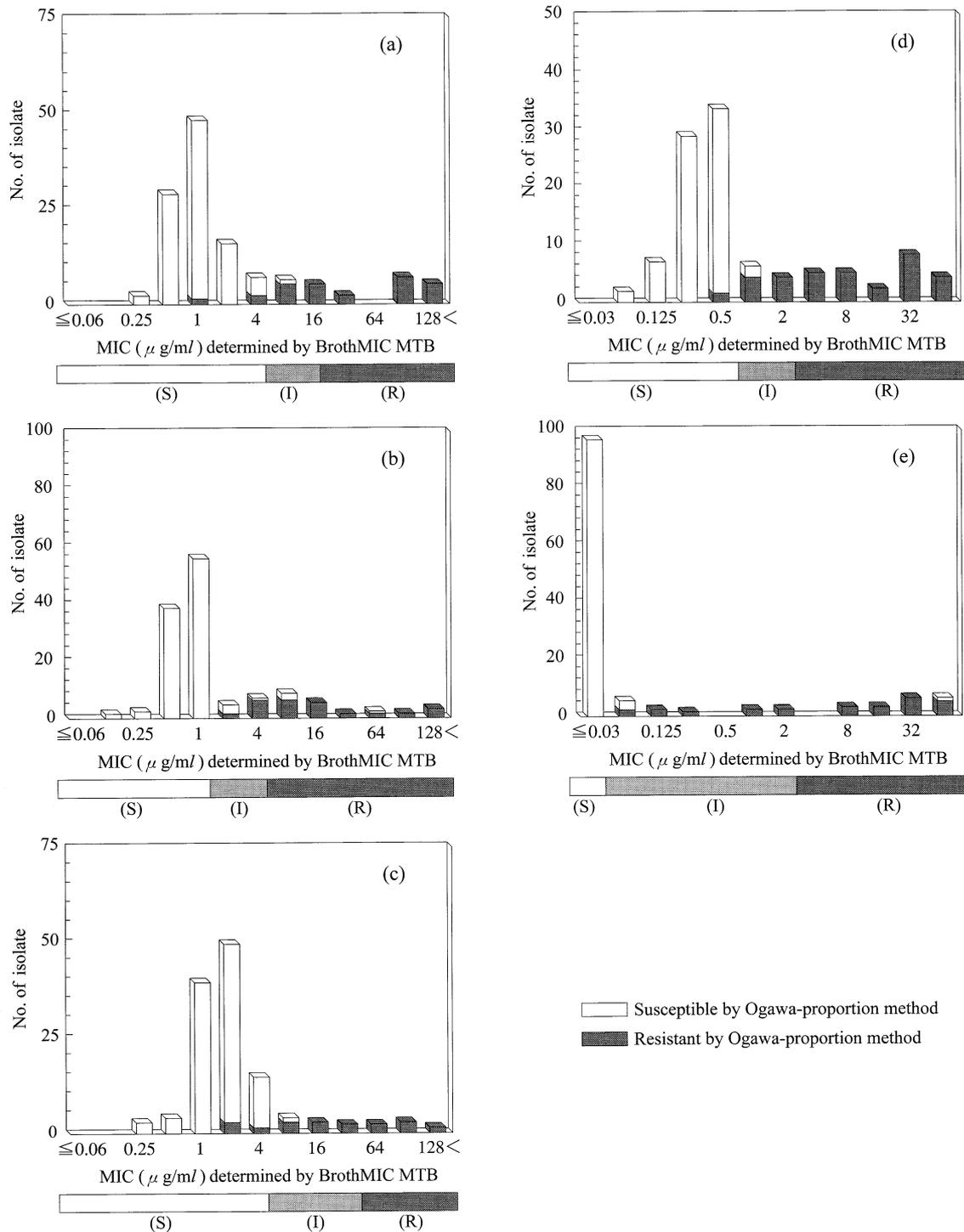


Fig. Distribution of MICs determined by BrothMIC MTB and category interpretation by a proportion test method on egg-based Ogawa media ($n=127$). Isoniazid was tested at the concentration of $0.2 \mu\text{g/ml}$ by a proportion test method on egg-based Ogawa media.
 (a) streptomycin; (b) ethambutol; (c) kanamycin; (d) isoniazid and (e) rifampicin

率法で耐性 (R) に乖離して判定された。BrothMIC MTB 法での RFP は、広い範囲の MIC 値 ($0.06 \sim 2.0 \mu\text{g/ml}$) が判定保留 (I) にあり、この範囲に分布する菌株が 12 株

(9.4%) に達した。RFP で最も乖離した判定は、BrothMIC MTB 法での MIC 値が $>32 \mu\text{g/ml}$ で、小川培地比率法では感性 (S) の判定となった 1 株であった。

考 察

日本結核病学会が1997年に勧告した結核菌を試験対象とする1%小川培地を用いた比率法⁴⁾と、Middlebrook 7H9 broth 液体培地を用いる微量液体希釈法、BrothMIC MTB²⁾の判定互換性について比較解析した。既にBrothMIC MTBの開発にあたっては、NCCLS法³⁾との判定互換性が評価されており、99.4%の高い互換性が確認されている。他方、小川培地を用いる比率法については、酸化還元反応呈色色素、2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride (STC)を添加したマイクロプレート培養法、結核菌感受性ビットスペクトル法(極東製薬工業)をわれわれが開発するにあたって、NCCLS法と比較検討し、INH, SM, RFP, EMBの4剤については76.1 (EMB)~91.3% (SM)の判定一致率が得られることを報告した⁵⁾。

日本結核病学会が提案する小川培地比率法は、基本的に1960年代にCanettiら⁶⁾⁷⁾の報告したLöwenstein-Jensen培地での試験方法に準拠したものであるが、最新のNCCLS法との互換性は明らかではない。E-testとMiddlebrook 7H11寒天培地およびLöwenstein-Jensen培地での比率法を検討したSanicらの報告⁸⁾では、感性・耐性判定ブレイクポイントが明示されていないものの、NCCLS法とLöwenstein-Jensen培地での比率法には、INH, RFP, SM, EMBの4剤について、それぞれ93.9%, 85.1%, 85.4%, 78.7%の判定一致率であったとしている。この報告は、先にわれわれがSTCを添加したマイクロプレート培養法で報告した成績⁵⁾とほぼ一致するものである。従って、今回の評価成績と合わせ、NCCLS法、BrothMIC MTB法でのMIC測定、STCを添加したマイクロプレート培養法での小川培地比率法、日本結核病学会の提案する試験管培養法での小川培地比率法は、それぞれ正確に試験手順と判定条件が遵守されれば、相互に高い判定互換性が期待できると考えられる。

小川培地比率法の問題点は、世界的な標準化が半合成Middlebrook培地(brothあるいはagar)を使用する方向にあり³⁾、これとは明らかに異なっている。培養期間も4週間と長く、迅速性という意味でも臨床的有効性を欠いている。また、ほとんどの薬剤(INHを除く)が1つの薬剤濃度での菌発育の有無から判定される。特にこの点は、試験培地の品質管理と試験手順の精度管理において大きな問題となり、“菌発育なし”という判定は本来感性(S)を意味するが、果たして用いた試験培地が十分な菌発育支持能をもっていたのか否か、正確に必要な菌量が接種されたのか否か、確認する方法がない。事実今回の評価においても、RFPにおいてBrothMIC MTB法でのMIC値が $>32 \mu\text{g/ml}$ 、小川培地比率法では感性

(S) — “菌発育なし”の乖離する判定となった1株が観察されている。また逆に、“菌発育あり”という耐性(R)を意味する判定においても、使用した試験培地に規定濃度の薬剤が正確に添加されていたのか、培地の保存に伴う力価の低下がなかったのか、確認する方法がない。判定方法にも課題があり、判定は対照培地に十分な菌発育(+++~++++)を認めた時点で、対照培地での菌コロニー数と比較して感性(S)、耐性(R)を判定するとされているが、いずれも判定する者に主観的な判断を求めており、判定操作における個人差を生む要因となっている。これに対しBrothMIC MTB法は、Middlebrook 7H9 brothを用いた7日間培養でMIC値を判定する現在最も迅速性に優れた試験方法であり、複数の異なる薬剤濃度での菌発育の有無を判定することで、精度管理、品質管理も容易である。現状のBrothMIC MTB法の課題は、判定保留(I)の発生であろう。精度管理用菌株における判定保留(I)の結果はEMBとSMで観察されたが、これは精度管理に用いた菌株のそれぞれの薬剤に対するMIC値がいずれも判定ブレイクポイントに近接したところに分布するためであり、特に施設間差は認められなかった。しかし一方、臨床分離株の評価試験では、7.1~9.4%の頻度で判定保留(I)の結果が観察された。結核菌における薬剤耐性は、治療経過に伴う点変異の累積に因ると考えられていることから⁹⁾、菌株ごとにMIC値が漸次段階的に上昇し、必ずしも明確な感性(S)、耐性(R)の区分値を設定することはできないが、緩衝帯として設定された判定保留(I)のMIC範囲を、遺伝子変異の解析と平行して、より狭める検討が必要と考えられる。

平野らが報告したわが国における結核菌検査の全国調査においても、特に薬剤感受性試験の標準化が遅れ、施設間の判定互換性の改善が必要であるとされている¹⁰⁾。世界的な標準化への動きを念頭に、わが国においてもより精度の高い、互換性の優れた試験方法の開発、応用が今後とも求められる。

謝 辞

この研究は厚生省科学研究費補助金「薬剤耐性菌による感染症のサーベイランスシステムの構築に関する研究」の援助を受け、九州抗酸菌研究会の共同研究の一部として実施された。評価試験の実施にあたり、柿原由美子(国立療養所大牟田病院)、吉田章子(国立療養所南福岡病院)、師岡津代子(国立療養所福岡東病院)、三木 緑(国立療養所再春荘病院)、金丸和浩(国立療養所西別府病院)、各氏の協力を得た。

文 献

1) 山根誠久, 仲宗根勇, 斉藤 宏, 他: Middlebrook 合

- 成培地での抗酸菌薬剤感受性試験(第2報): 薬剤固着マイクロプレートを用いた微量液体希釈法での最小発育阻止濃度の測定(国内3施設における共同評価). 臨床病理. 1998; 46: 719-727.
- 2) 山根誠久, 一山 智, 河原 伸, 他: Middlebrook 合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験(第3報): 微量液体希釈法を原理とする BrothMIC MTB の多施設評価—施設間再現性と Agar Proportion 法との判定互換性の解析. 臨床病理. 1999; 47: 754-766.
 - 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Antimycobacterial Susceptibility Testing for *Mycobacterium tuberculosis*; Tentative Standard M24-T, NCCLS, Wayne, USA, 1995.
 - 4) 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会: 結核菌の薬剤感受性試験, 特に試験濃度改変と比率法導入への提案. 結核. 1997; 72: 597-598.
 - 5) 山根誠久, 大岩 雄, 清田敏幸, 他: 酸化還元反応呈色色素を用いたマイクロプレート法での結核菌薬剤感受性試験の検討: NCCLS M24-P を参照法とした複数施設での共同評価. 臨床病理. 1996; 44: 456-464.
 - 6) Canetti G, Froman S, Grosset J, et al.: Mycobacteria: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull WHO. 1963; 29: 565-578.
 - 7) Canetti G, Fox W, Khomenko HT, et al.: Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull WHO. 1969; 41: 21-43.
 - 8) Sanic A, Gunaydin M, Coban AY, et al.: A comparison of the E-test and proportion methods for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Chemother. 2000; 12: 491-494.
 - 9) Heifets LB, Good RC: Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: Tuberculosis, 1st Ed Bloom BR, American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, DC, 1994, 85-110.
 - 10) 平野和重, 和田雅子, 阿部千代治, 他: 入院時薬剤耐性に関する研究: 1997年度の各施設と結研の成績の比較. 結核. 2001; 76: 461-471.

— Original Article —

INTERPRETIVE COMPATIBILITY OF ANTIMYCOBACTERIAL SUSCEPTIBILITY FOR
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DETERMINED BY PROPORTION TEST METHOD
ON EGG-BASED OGAWA MEDIA AND BROTH MICRODILUTION TEST, BrothMIC MTB

¹Miyako HIGA, ²Hiroshi SAITOH, ³Nobuhisa YAMANE, ¹Isamu NAKASONE, and ³Chika MIYAGI

Abstract The antimycobacterial susceptibility test method newly proposed by the Japanese Society for Tuberculosis, a proportion method on egg-based Ogawa media, was evaluated in comparison with microdilution test for *Mycobacterium tuberculosis* complex, BrothMIC MTB-1 (Kyokuto Pharmaceutical Inc., Tokyo). In the evaluation, five antimicrobial agents, streptomycin, ethambutol, kanamycin, isoniazid and rifampicin were included. Through repeated testings of the three reference strains against five antimicrobial agents, both test methods were found to be highly precise. All the minimum inhibitory concentrations (MICs) determined by BrothMIC MTB fell within 3 log₂ dilutions, however a total of 11 MICs resulted in indeterminate(I) interpretations. Whereas, all the test results by a proportion method on Ogawa media were comparable to the expected interpretations. However, three of 48 testings resulted in undeterminable interpretations due to insufficient growth on the growth control media. A total of 127 clinical isolates of *M. tuberculosis* complex were tested by both methods, and 89 to 90% of the test results were comparable with each other in category interpretations. However, 7.1 to 9.4% of MICs determined by BrothMIC MTB resulted

in indeterminate(I), and 0.8 to 3.1% of discrepant interpretations were observed.

In conclusion, both test methods were highly precise and comparable in determining antimycobacterial susceptibility for *M. tuberculosis* complex. Several advantages and disadvantages in each test method were discussed.

Key words: Antimycobacterial susceptibility test, Interpretive compatibility, Proportion test method on Ogawa media, Microdilution susceptibility test, BrothMIC MTB

¹Clinical Laboratories, University Hospital School of Medicine, University of the Ryukyus, ²Clinical Research Laboratories, National Miyakonojo Hospital, ³Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

Correspondence to: Miyako HIGA, Clinical Laboratories, University Hospital School of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa 903-0215 Japan. (E-mail: miyako-ryk@umin.ac.jp)