

小川法 INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株のプロスミック MTB-1 法を用いた検討

¹吉多 仁子 ¹阿野 裕美 ¹石田智恵子 ¹谷川 信子
¹菊井 正紀 ²高嶋 哲也 ³露口 泉夫

要旨：旧結核菌検査指針による結核菌薬剤耐性試験で INH は、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ の 3 濃度を用いられ、1 $\mu\text{g/ml}$ が耐性基準濃度とされていた。耐性基準濃度以下での 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株は、臨床的に耐性か感受性か一定の見解がなかった。そこで、われわれは小川法 INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株についてプロスミック法による MIC 値を測定し検討を行ったので報告する。対象菌株として 1999 年 1 月より 2000 年 3 月までに臨床分離された任意に抽出した 115 株を用いた。被検 115 株の MIC 値を小川法分類により分布を示すと、被検菌株は感受性、低濃度耐性、高濃度耐性の 3 グループに分かれた。小川法 INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株は MIC 値分布図において低濃度耐性のグループに属していた。小川法 INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株の MIC 値は、平均 4.53 $\mu\text{g/ml}$ であり、プロスミック法で耐性であった。小川法 INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株の区間推定値は、95% の信頼区間で 3.21~5.85 $\mu\text{g/ml}$ となった。この値はプロスミック法の耐性であった。以上から小川法 INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株をプロスミック法からみた場合に耐性を示し、臨床的に耐性として扱われていたことを裏付ける結果であった。

キーワード：BrothMIC MTB-1 法、INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性結核菌

旧結核菌検査指針による小川法薬剤感受性試験で INH の濃度は、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ の 3 濃度を用いられ、1 $\mu\text{g/ml}$ が耐性基準濃度であった。基準濃度以下の INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性菌株については、臨床的に感受性か耐性か一定の見解はなかった。そこで、われわれは微量液体希釈法¹⁾であるプロスミック MTB-1 法 (以下、プロスミック法)²⁾³⁾を用いて MIC 値を測定し、MIC 値分布から INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株が測定株の中でどのような位置を占めるかを調査し、その解釈について検討したので報告する。

対象菌株は 1999 年 1 月から 2000 年 3 月までに本院で臨床分離され、アキュプロープ法で結核菌群と同定された 115 株を用いた。その内訳は INH 感受性 42 株 (37%)、INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性 36 株 (31%)、INH 1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性 21 株と INH 5 $\mu\text{g/ml}$ 耐性 16 株の耐性合計 37 株 (32%) であった。治療歴は初回治療 52 株 (45.2%)、再治療 63 株 (54.8%) であった。INH 1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株で 76% が再治療

で、5 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株で 87% が再治療であり、耐性株で再治療が多くを占めていた。

感受性試験の判定は小川法ではコントロールと比較して 75% 以上の発育が認められたものを耐性とする。プロスミック法の判定は、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下を感受性、1 $\mu\text{g/ml}$ と 2 $\mu\text{g/ml}$ を判定保留域、4 $\mu\text{g/ml}$ 以上を耐性とする。

小川法により分類した MIC 値の分布を Fig. に示した。115 株は感受性、低濃度耐性、高濃度耐性の 3 グループに分かれた。この結果は、従来から INH が低濃度と高濃度の耐性に分かれるという報告⁴⁾と一致していた。小川法 INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株は低濃度耐性のグループに属していた。INH の高濃度耐性株は、*Kat G* 遺伝子欠損株で MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ を示したという報告⁵⁾とも一致していた。

Fig. より小川法とプロスミック法の相関を検討した。小川法感受性株はプロスミック法の低濃度 6 管に分布した。小川法感受性株の中で 3 株は判定保留域の 1 $\mu\text{g/ml}$

¹大阪府立羽曳野病院臨床病理検査科、²第一内科、³大阪府立羽曳野病院院長

連絡先: 吉多仁子, 大阪府立羽曳野病院臨床病理検査科, 〒583-8588 大阪府羽曳野市はびきの 3-7-1 (E-mail: ZUM11464@nifty.ne.jp)

(Received 20 Feb. 2002/Accepted 7 May 2002)

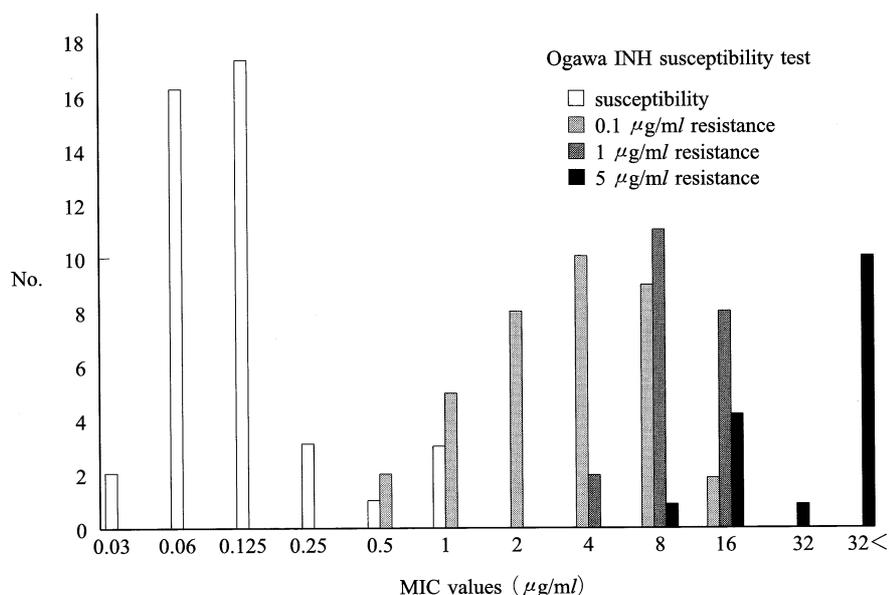


Fig. Distribution of MIC values ($\mu\text{g/ml}$) classed by Ogawa INH susceptibility test

Table Experience of treatment and pattern of drugs resistance of *M. tuberculosis* 16 strains in interpretive standard

No.	MIC values ($\mu\text{g/ml}$)	Treatment history	Pattern of resistant in Ogawa susceptibility test
1	2	yes	inh RFP KM
2	2	yes	inh RFP KM
3	2	yes	inh RFP SM
4	2	yes	inh RFP EB
5	2	yes	inh RFP EB
6	2	yes	inh
7	2	yes	inh
8	2	yes	inh
9	1	yes	inh RFP KM
10	1	yes	SM EM PAS
11	1	yes	inh RFP SM
12	1	no	inh SM
13	1	no	inh
14	1	no	inh
15	1	no	inh
16	1	no	RFP

*inh=INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ resistance

を示した。MIC 値 0.5 $\mu\text{g/ml}$ はプロスミック法感受性の値であるが、3 株中 2 株が小川法 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株であった。比嘉らの報告⁶⁾で、INH 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株 1 株がこの値を示したとされた。プロスミック法での 0.5 $\mu\text{g/ml}$ と 1 $\mu\text{g/ml}$ は 1 管の違いであり、隣接する値で判定が変わるとい問題は微量液体希釈法では避けられない²⁾³⁾と考えられている。

小川法で耐性の 1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株と 5 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株は、すべてプロスミック法で耐性であった。小川法の耐性濃

度が高くなるほどプロスミック法の高濃度に分布し、2 法の相関が良いこと⁶⁾を示していた。

INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株もプロスミック法で、MIC の分布が 6 管に分布した。しかし、プロスミック法の判定では感受性、判定保留域、耐性の値であった。INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株のうちプロスミック法で MIC 値が低濃度を示した株は、新結核菌検査指針の濃度 (0.2 $\mu\text{g/ml}$) で感受性である可能性が考えられる。また、測定方法による結果の違いは臨床検査法全般に存在する。今後、このような株は遺伝子検査により明らかにされていく⁶⁾と思われる。

プロスミック法の判定保留域株は、Fig. で低濃度耐性のグループに属していた。これらの株の治療歴と小川法での薬剤耐性パターンを Table に示した。16 株中の 11 株が再治療であった。14 株は小川法で INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性の株で、残りの 2 株は小川法 INH 感受性であった。この 2 株のうち、1 株は持続排菌症例で、以前の小川法では INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性が認められた。もう 1 株は、小川法の RFP 単独耐性株であった。RFP 単独耐性株は、家族から検出された菌株が、小川法で INH・RFP に耐性が認められた症例であった。プロスミック法で MIC 値 1 $\mu\text{g/ml}$ と 2 $\mu\text{g/ml}$ は、現在判定保留域であるが、Table の治療歴や小川法の薬剤耐性パターンからみても耐性が疑われる株であった。

MIC 値 2 $\mu\text{g/ml}$ は、比嘉らの報告⁶⁾で、すべて INH 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株であった。本法でも、すべて INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株であった。以上から、プロスミック法の MIC 値 2 $\mu\text{g/ml}$ は耐性と判断して良いと思われた。

小川法の分類からそれぞれの MIC の平均値について検討した。0.03 $\mu\text{g/ml}$ \geq は 0.03 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$ < を 64 $\mu\text{g/ml}$ として算定した。MIC の平均値は INH 感受性株の 0.16 $\mu\text{g/ml}$, INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株 4.53 $\mu\text{g/ml}$, INH 1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株 10.55 $\mu\text{g/ml}$, INH 5 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株 46.50 $\mu\text{g/ml}$ であった。MIC の平均値による小川法とプロスミック法の判定が同じであり, 2法の相関の高さを明らかにした。INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株の平均値は 4.53 $\mu\text{g/ml}$ となり, プロスミック法で耐性であった。この値から INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株の区間推定値を算定した。95% 信頼区間で INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株の区間推定値は 3.21~5.85 $\mu\text{g/ml}$ であり, プロスミック法の耐性であった。統計学的にも, 小川法 INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株はプロスミック法で耐性を示した。このことから, 小川法 INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 耐性株は専門家の間で臨床的に耐性として扱われていたことを裏付けた。

文 献

- Wallance RJ, Nash DR, Steele LC, et al.: Susceptibility Testing of Slowly Growing Mycobacteria by a Micro-dilution MIC Method with 7H9 Broth. J Clin Microbiology. 1986; 24: 976-981.
- 山根誠久, 仲宗根勇, 斎藤 宏, 他: Middlebrook 合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験 (第 2 報): 薬剤吸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 9). 臨床病理. 1998; 46: 361-365.
- 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 AgarProportion 法との判定互換性の解析. 臨床病理. 1999; 47: 745-766.
- Yajko DM, Madej JM, Lancaster MV, et al.: Colorimetric method of determining MICs of antibacterial agent for Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiology. 1995; 33: 2324-2327.
- 大野秀明, 河野 茂: Mycobacterium tuberculosis の薬剤耐性遺伝子. 臨床と微生物. 1999; 26: 733-739.
- 比嘉美也子, 斎藤 宏, 山根誠久, 他: 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. 結核. 2002; 77: 61-66.
- 1) Wallance RJ, Nash DR, Steele LC, et al.: Susceptibility Testing of Slowly Growing Mycobacteria by a Micro-

Short Report

A STUDY OF INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ RESISTANT *M.TUBERCULOSIS* STRAINS ASSESSED BY BrothMIC MTB-1 METHOD

¹Hiroko YOSHIDA, ¹Hiroshi ANO, ¹Chieko ISHIDA, ¹Nobuko TANIGAWA,
¹Masanori KIKUI, ²Tetsuya TAKASHIMA, and ³Izuo TSUYUGUCHI

Abstract In the antimycobacterial susceptibility test for INH using the egg-based Ogawa media, 3 concentrations (0.1, 1, or 5 $\mu\text{g/ml}$) of INH were used, and 1 $\mu\text{g/ml}$ was used as a critical concentration for INH resistance. However, it was controversial whether INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ resistant *M. tuberculosis* was clinically significant or not. We investigated the MIC values of INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ resistant strains by using BrothMIC MTB-1 method, and 115 strains of *M. tuberculosis* confirmed by DNA-prove test were used. The distribution of MIC values of 115 strains determined by Ogawa INH susceptibility test was shown in figure. By BrothMIC MTB-1 method, they were classified into 3 groups; susceptible, low resistant and high resistant groups. The mean MIC value of INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ resistant *M. tuberculosis* was estimated to be 4.53 $\mu\text{g/ml}$ with its 95% confidence interval 3.21-5.85 $\mu\text{g/ml}$, and they were determined as "resistant" in BrothMIC MTB-1 method.

These results supported the idea that patients with INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ resistant *M. tuberculosis* strains should be regarded as clinically "resistant".

Key words: BrothMIC MTB-1 method, INH 0.1 $\mu\text{g/ml}$ resistant *M. tuberculosis*

¹Department of Clinical Pathology Laboratory, ²First Department of Internal Medicine, Osaka Prefectural Habikino Hospital, ³The President of Osaka Prefectural Habikino Hospital

Correspondence to: Hiroko Yoshida, Department of Clinical Pathology Laboratory, Osaka Prefectural Habikino Hospital, 3-7-1, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583-8588 Japan. (E-mail: ZUM11464@nifty.ne.jp)