

## 日本の慢性排菌結核患者におけるMDR-TB・XDR-TBの薬剤感受性試験結果

<sup>1</sup>鹿住 祐子   <sup>1</sup>板垣 信則   <sup>1</sup>大森 正子   <sup>1</sup>和田 雅子  
<sup>1</sup>星野 齊之   <sup>1</sup>御手洗 聡   <sup>1</sup>菅原 勇   <sup>1</sup>石川 信克  
<sup>2</sup>森 亨

**要旨:**〔目的〕平成12年度(2000年)結核緊急実態調査時の慢性排菌患者におけるMDR-TBとXDR-TBの頻度を調べる。〔対象および方法〕平成12年度結核緊急実態調査時の慢性排菌者1234例における結核菌434株を用いて薬剤感受性試験(小川培地使用の比率法, MGIT法, プロスミックNTM)を行い, MDR-TBとXDR-TBを決定した。被検株の条件は, 1999年末現在保健所に登録されている結核患者のうち1999年の1年間に菌陽性であり, 1998年1月1日以前に登録された患者とした。少なくとも登録されてから2年以上経過し, 培養陽性だった患者である。〔結果・考察〕薬剤感受性試験が実施された434株のうちINHとRFPに耐性でMDR-TBと判定された株は321株(74.0%), そのうちの180株(56.1%)がLVFX耐性, かつ, KMあるいはAMKのどちらか(または両方)に耐性のXDR-TBであった。MDR-TB 321名のうち, 初回登録患者が165名, 再登録患者は143名, 不明が13名であった。XDR-TB 180名の内訳は初回登録患者が95名, 再登録患者は78名, 不明は7名であった。初回登録患者では1990年代がMDR-TB 94名(57.0%)とXDR-TB 49名(51.6%)ともに半数以上をしめ, 再登録患者では1960年代と70年代がMDR-TB 62名(43.4%)とXDR-TB 41名(52.6%)であった。日本で使用の少ないAMKの耐性頻度が高率だったのはAMKの使用によるものかSM・KMの交差耐性か解明できなかったが交差耐性を否定できない。

**キーワード:**多剤耐性結核菌(MDR-TB), 超多剤耐性結核菌(XDR-TB), 全国実態調査, 交差耐性

### はじめに

1992年にアメリカ・ニューヨークにて大規模な結核の集団感染<sup>1)</sup>が発生し, 中でも多剤耐性結核(Multi drug-resistant tuberculosis: MDR-TB)とよばれるイソニアジド(INH)とリファンピシン(RFP)の両方に耐性の結核菌の存在が広く知られた。これに加えて2006年, Centers for Disease Control (CDC)<sup>2)</sup>が, MDR-TBであり, かつ, 二次抗結核薬に含まれる6つの区分のうち3つ以上に耐性をもつ結核菌を超多剤耐性結核菌(Extensively drug-resistant tuberculosis: XDR-TB)として発表した。この6つの区分とはアミノ配糖体系(aminoglycosides), ポリペプチド(polypeptides), フルオロキノロン系(fluoro-

quinolones), チオアミド系(thioamides), サイクロセリン(cycloserine), パラアミノサリチル酸(para-aminosalicylic acid: PAS)である。その後, 世界保健機関(WHO)<sup>3)</sup>がMDR-TBであり, かつ, フルオロキノロン(レボフロキサシン: LVFXなど)と注射二次薬(カプレオマイシン: CPM, アミカシン: AMK, カナマイシン: KM)の1つ以上に耐性をもつ結核菌をXDR-TBと定義した。

日本で行われた平成12年度結核実態調査<sup>4)5)</sup>の中で保健所に登録されている慢性排菌結核患者を対象とした調査も行われた。これは日本の慢性排菌患者の実態を明らかにし, 発生予防と治療およびその生活内容を改善する基礎資料を得ることを目的に行われた。対象は1999年

<sup>1</sup>結核予防会結核研究所, <sup>2</sup>国立感染症研究所ハンセン病研究センター

連絡先: 鹿住祐子, 結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター病理検査科, 〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: kazumi@jata.or.jp)

(Received 10 Jul. 2007 / Accepted 1 Oct. 2007)

末現在登録されている結核患者のうち、1999年の1年間に菌陽性であり、1998年1月1日以前に登録された患者である。したがって、少なくとも登録されてから2年以上経過し、菌陽性だった患者である。なお、2001年に実施した薬剤感受性試験はINH, RFP, エタンブトール (EB), ストレプトマイシン (SM), KM, エチオナミド (TH), エンビオマイシン (EVM), PAS, サイクロセリン (CS), LVFXであったが、今回は特にWHOのXDR-TBの定義に合わせてAMKを追加した。

### 材料と方法

#### (1) 被検株

平成12年度結核実態調査・慢性排菌患者調査(対象者1582例)<sup>4)</sup>は記入済みの調査票が返送され、そのうち非結核性抗酸菌を除く1,234例について疫学的分析が行われた。この1,234例のうち、513株の培養された菌株の送付があった。その中で結核菌として薬剤感受性試験が行いえたのは434株で、他に非結核性抗酸菌13株と、送付された段階で培養菌が古かったなどの原因によって非発育のため薬剤感受性試験を行うことができなかった66株が含まれていた。この薬剤感受性試験の行われた434株を今回の研究に使用した。

#### (2) 1%小川培地を用いた比率法(以下、小川法)<sup>6)</sup>

菌液の調製と培地への接種は新結核菌検査指針に従い、Middlebrook7H9液体培地にて培養し、McFarland No. 1の2倍希釈菌液を原液とし、この100倍希釈と10,000倍希釈菌液を準備した。薬剤含有培地として1%小川培地にTable 1に示した薬剤濃度を加えて作製した。その薬剤含有培地に100倍希釈菌液を接種、対照培地には10,000倍希釈菌液を接種した。判定は培養3週間後と4週間後に行った。判定方法は10,000倍希釈菌液を接種した対照培地に発育した菌数と薬剤含有培地に発育した耐性菌数を比較し、耐性菌数が対照培地におけるコロニー数を上回る場合を耐性とした。判定は小川法を優先し、小川法にて判定不可のものをMGIT法・プロスミックNTMで行った。

**Table 1** Comparison of drug concentration among Ogawa's slant culture, MGIT and BrothMIC for *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility testing ( $\mu\text{g/ml}$ )

Anti-TB drug	Ogawa	MGIT	BrothMIC NTM
Isoniazid	0.2 (1.0)	0.1	—
Rifampicin	40	2.0	—
Streptomycin	10.0	2.0	—
Ethambutol	2.5	5.0	—
Levofloxacin	1.0	—	$\geq 2.0$
Kanamycin	20	—	$\geq 64$
Amikacin	—	—	$\geq 8.0$

#### (3) MGIT法: 用手法 (Mycobacteria Growth Indicator Tube)<sup>7)</sup>

菌液の調製と培地への接種は、日本ベクトンディッキンソン社の使用説明書に従った。

#### (4) プロスミックNTMを用いたMIC測定法<sup>8)</sup>

菌液の調製と接種は、極東製薬(極東製薬工業:東京)の使用説明書に従った。通常、多剤耐性結核菌の薬剤感受性試験にはプロスミックMTB-Iが使われるが、今回はLVFX・KM・AMKを目的としたため非結核性抗酸菌用のプロスミックNTMを用いた。判定時のブレイクポイント<sup>9)</sup>はLVFX 2.0  $\mu\text{g/ml}$ 以上、KM 64  $\mu\text{g/ml}$ 以上、AMK 8  $\mu\text{g/ml}$ <sup>9)</sup>以上とした。

#### (5) SM and/or KMとAMKの薬剤感受性試験を比較

SMの薬剤感受性試験はINH・RFPと同様に小川法(10  $\mu\text{g/ml}$ )とMGIT法(2.0  $\mu\text{g/ml}$ )を行い、KMは小川法(20  $\mu\text{g/ml}$ )とプロスミックNTM( $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$ )を行った。さらにAMKのプロスミックNTM( $\geq 8.0$   $\mu\text{g/ml}$ )の結果と比較した。

#### (6) 被検株の同定と単一菌であることの確認

薬剤感受性試験の培養開始から1週間で対照培地を観察し、この時点で菌の発育の認められた株は迅速菌を疑い、DDH法による同定試験を行った。そして3週間・4週間後判定時に対照培地と薬剤含有培地上のコロニー形態を観察し、スムーズ型はAccu Probe法にてMACと*M. tuberculosis* complexを調べた。さらに全株について対照培地に光を1時間当て、再度1日培養し、非結核性抗酸菌のPhotochromogens(光発色菌)ではないことを確認し、コロニーがラフ型の株を8週間以上培養後にナイアシンテストを行った(2001年)。次に結核菌と他の抗酸菌が同時に感染している可能性を調べるため、XDR-TBと判定された株からランダムに選択した60株(180株のうち33%)について抗酸菌の*rpoB*遺伝子をPCRし、電気泳動を行うPCR-Restriction Analysis法(PRA)<sup>10)</sup>を行った(2006年)。

(7) 菌株と同時に送付された434の調査票を薬剤感受性試験結果と照合した。

## 結 果

薬剤感受性試験を行った434株のうち小川法で判定が可能だった株は355株で、小川法において薬剤を含まない対照培地で、発育困難(劣性発育: dysgenic growth)、判定不可(対照培地において培養4週以内に菌の発育が認められなかったなど)であった74株についてはMGIT法にて判定し、MDR-TBを決定した。小川法、MGIT法ともに判定不可は5株あった。そしてXDR-TBの定義はWHOに従った<sup>3)</sup>。

434株のうち判定不可の5株を除いた429株のうち、

INH耐性は372株 (86.7%), RFP耐性は345株 (80.4%), EB耐性は279株 (65.0%), SM耐性は268株 (62.5%)であった。434株のうち321株を小川法あるいはMGIT法によってMDR-TBと判定した。さらにこの321株のうち195株 (60.7%)がLVFX (小川法, プロスミックNTM)耐性, 110株 (34.3%)が感性, 16株 (5.0%)については発育が悪く2方法においても判定不可であった。MDR-TBであり, LVFX耐性の195株についてさらにKM (小川法・プロスミックNTM)の薬剤感受性試験を行った。KM耐性は120株, 感性は75株であった。このKM感性75株についてAMK (プロスミックNTM)を検査した。その結果, AMK耐性は60株, 感性は12株, 不明は3株であった。したがって, MDR-TB 321株におけるLVFX耐性, なおかつKMあるいはAMKに耐性のXDR-TBは180株 (56.1%)であった。この180株中, KM耐性は120株 (66.7%), KM感性であったがAMK耐性によってXDR-TBと判断したのは60株 (33.3%)であった。

薬剤感受性試験を行うにあたって, 菌の発育状況が大きく関係することがある。通常結核菌は小川培地において3~4週間培養で十分な発育を示すが, 中にはコロニーの形態を作らず, 培地の表面の色が黄色く変色するだけの株や, 小川培地のような卵で作られた培地に発育困難な株, また, 対照培地に4週以降に発育してくる菌などがある。小川法では判定期限を最終4週間とし, 薬剤の培地内での力価の低下を考慮した。また, MGIT法でも通常は薬剤を入れない対照培地に7日で発育可能で

あるが, 判定可能期間内に発育してこない菌もある。このような事情から今回の研究には小川法とMGIT法そしてプロスミックNTMにて総合判断した。

MDR-TBと判断された321例とその中のXDR-TB 180例の調査票を調査した。MDR-TB (XDR-TB)患者は全国に分布し, MDR-TBとXDR-TBともに男:女=3.5:1であった。Table 2に登録年代を初回登録患者と再登録患者別に示す。再登録患者については前回の登録における最初の治療開始を治療開始年代の集計として用いた。1999年末時点で, MDR-TBでは初回登録患者は165名, 再登録患者は143名, 初回・再登録患者不明が13名であった。XDR-TBの内訳は初回登録患者が95名, 再登録患者は78名, 不明は7名であった。

なお, 結核菌として送付された株であったが, これらには *Mycobacterium avium complex* (MAC), *M. fortuitum*, *M. peregrinum* など13株が含まれていた。この中の *M. fortuitum* 1株には結核菌が同時に感染していたが両者を分離することができず, 今回の研究から除いた。さらにXDR-TBのように広域に耐性が確認された場合, 結核菌と同時にMACなど多種の抗結核薬に対して耐性の抗酸菌が感染していることが疑われる。このため60株についてPRAを行ったがすべて結核菌単一で, 他の抗酸菌は含まれていなかった。

## 考 察

抗結核薬の歴史は長く, 1944年 (昭和19)に米国の

Table 2 The number of MDR-TB/XDR-TB cases by type of registration

	MDR-TB	XDR-TB
No previously registered cases**	165 (51.5%)	95 (52.8%)
1940s	0 (0.0%)	0 (0.0%)
1950s	11 (3.4)	7 (3.9)
1960s	12 (3.7)	9 (5.0)
1970s	17 (5.3)	10 (5.6)
1980s	30 (9.3)	20 (11.1)
1990s	94 (29.3)	49 (27.2)
Unknown	1 (0.3)	0 (0.0)
Previously registered cases*	143 (44.5%)	78 (43.3%)
1930s	1 (0.3%)	0 (0.0%)
1940s	9 (2.8)	4 (2.2)
1950s	22 (6.9)	7 (3.9)
1960s	31 (9.6)	17 (9.4)
1970s	31 (9.6)	24 (13.4)
1980s	18 (5.6)	10 (5.5)
1990s	8 (2.5)	3 (1.7)
Unknown	23 (7.2)	13 (7.2)
Unknown	13 (4.0%)	7 (3.9%)
Total	321 (100%)	180 (100%)

\* Year of initial treatment in the previous registration

\*\* Year of initial treatment in the current registration

Waksmanが *Streptomyces griseus* の抽出液から SM を作り、1949年(昭和24)に日本における国内生産を確保、1951年(昭和26)に社会保険適用、結核予防法による公費負担の対象となった。1952年(昭和27)に INH が、1961年(昭和36)には KM、1967年(昭和42)には EB、そして1971年(昭和46)に RFP が結核予防法に採用<sup>11)</sup>された。1950年代から70年代半ばまでは RFP 登場前の長期化学療法期<sup>12)</sup>と言われ、INH/PAS/SM の3者併用療法が行われ、70年代半ば以降の短期化学療法期になってから RFP を含んだ化学療法となった。現在は多剤耐性結核には最低で3剤(可能なら4~5剤)の使用が推奨<sup>13)</sup>されているが、今回、われわれの調査の対象となった慢性排菌結核患者は登録時期が1930年代から90年代と幅広く、初回登録患者では1990年代が MDR-TB 94名(57.0%)と XDR-TB 49名(51.6%)がともに半数以上をしめ、再登録患者では1960年代と70年代が MDR-TB 62名(43.4%)と XDR-TB 41名(52.6%)であった。初回登録患者、再登録患者ともに MDR-TB と XDR-TB において大きな差はなかった。2002年に中谷ら<sup>5)</sup>はこれら慢性排菌結核患者が慢性になった原因として不適切な治療、1剤による治療、糖尿病、深刻な副作用、誤った治療中断を報告したが、今回の対象者が1999年までの間、治療が継続的に行われたのか、または治療からの脱落を繰り返したのか中断されたのか不明であり、病状も継続して結核であったのか、一時完治したが再発したのか、あるいは再感染が明確ではなかった。ただし、今回の調査で長期にわたって結核に苦しむ患者の多いことが明らかとなった(Table 2)。

2006年3月の CDC<sup>2)</sup>によると MDR-TB に加えて二次薬に耐性が広く拡大し、アメリカの U.S. national TB surveillance data<sup>14)</sup>では169,654例の薬剤感受性試験の結果、1993年から2004年の間に2,689例(1.6%)の MDR-TB があり、そのうちの1,814例について二次薬の検査が行われ、74例(4.1%)が XDR-TB であった。そして2000年から2004年の間、世界49カ国17,690例の結核患者から MDR-TB が20%、その MDR-TB の中には10%の XDR-TB (全体の中では2%となる)が含まれていた<sup>14)</sup>。しかし、これらのデータは CDC の定義によるもので、今回、われわれは WHO の定義に従ったが、慢性排菌例1,234

例のうち、434例の薬剤感受性試験を行い、321株(74.0%)が MDR-TB、さらにその中の180株(56.1%)が XDR-TB であった。上記の CDC 定義データと比較して、MDR-TB と XDR-TB が高率だったのは今回対象とした患者が少なくとも登録されてから2年以上経過し、しかも培養で結核菌が発育してきた慢性排菌結核患者であったことによると考えられる。

世界各国、薬剤感受性試験方法は使用する培地の種類、薬剤濃度、ブレイクポイントなど国と施設によって異なり、さらに XDR-TB の定義も共通ではない。これから世界標準が確立される必要がある。

今回の研究では日本で使用頻度の低い AMK が高率に耐性となった。XDR-TB と判定した180株の中の KM 感性・AMK 耐性60株中39株(65%)は SM に耐性であったため AMK と SM (あるいは KM) の交差耐性の可能性を考え、MDR-TB 321株のうち SM、KM と AMK の結果のある149株について比較した(Table 3)。AMK 耐性117株のうち、SM and/or KM 耐性は88(75.2%)、感性は29株(24.8%)であった。今回の研究では AMK 耐性が AMK の使用によるものか、SM や KM のようなアミノ配糖体系の抗菌薬が、同じ系統の AMK と化学構造が似ているため交差耐性を引き起こしたのか解明できなかったが、AMK は日本での使用が少ないが、SM と KM の使用の歴史は長く、交差耐性を否定できないと思われる。

海外では病院の中の HIV 感染者における XDR-TB のアウトブレイクを Edlin ら<sup>15)</sup>が報告し、日本国内の例として露口<sup>16)</sup>らが院内集団感染事例を報告している。今後、MDR-TB だけでなく XDR-TB のアウトブレイクに対する監視が必要で、そのためにフルオロキノロンと注射二次薬の使用実態調査も重要になってくると思われる。

本研究は厚生労働省健康局結核感染症課の示唆によって、(財)結核予防会結核研究所が平成19年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)「結核菌に関する研究」(主任研究者:加藤誠也)によって調査を担当・報告した。

## 謝 辞

平成12年度結核緊急実態調査の企画・実施に尽力された厚生労働省健康局結核感染症課の当時の課長 中谷比呂樹先生(現 WHO 事務局長補:エイズ・結核・マラリア担当)に感謝致します。

## 文 献

- 1) Moss AR, Alland D, Telzak E, et al.: A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1997; 1: 115-

**Table 3** Cross-resistance of SM and/or KM against AMK in 149 isolates (MDR-TB)

	SM and/or KM-resistant	SM and KM-sensitive	Total
AMK-resistant	88	29	117
AMK-sensitive	18	14	32
Total	106	43	149

- 121.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention: Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to secondline drugs-worldwide, 2000-2004. MMWR. 2006 ; 55 : 301-305.
- 3) Bulletin of the World Health Organization. December 2006 ; 84 (12) : 924-925.
- 4) 厚生労働省：平成12年度結核緊急実態調査報告書。平成13年3月。
- 5) Nakatani H, Fujii N, Mori T, et al.: Epidemiological transition of tuberculosis and future agenda of control in Japan—results of the Ad-Hoc National Survey of tuberculosis 2000. Int J Tuberc Lung Dis. 2000 ; 6 : 198-207.
- 6) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編：新結核菌検査指針。2000。
- 7) 鈴木克洋，露口一成，松本久子，他：Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による結核菌の迅速薬剤感受性検査。結核。1997 ; 72 : 187-192.
- 8) 山根誠久，一山 智，川原 伸，他：Middlebrook 合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験（第3報）：微量希釈法を原理とする Broth MIC 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.
- 9) Kruuner A, Jureen P, Levina K, et al.: Discordant Resistance to Kanamycin and Amikacin in Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2003 ; 47 : 2971-2973.
- 10) Kim BJ, Lee KH, Park BN, et al.: Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 2102-2109.
- 11) 島尾忠男：「新しい結核の化学療法」。金原出版，東京他，1982，5-9。
- 12) 伊藤邦彦：「結核治療入門」，結核予防会，東京，2002，36-37。
- 13) 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。2003 ; 78 : 497-499。
- 14) Raviglione M: XDR-TB—entering the post-antibiotic era? Int J Tuberc Lung Dis. 2006 ; 10 : 1185-1187.
- 15) Edlin BR, Tokars JJ, Grieco MH, et al.: An outbreak of Multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med. 1992 ; 326 : 1514-1521.
- 16) 露口一成：外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例について。複十字。2003 ; 8-11 : 293.

## Original Article

## FREQUENCY OF MDR-TB/XDR-TB STRAINS ISOLATED FROM CHRONIC PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS IN JAPAN

<sup>1</sup>Yuko KAZUMI, <sup>1</sup>Nobunori ITAGAKI, <sup>1</sup>Masako OHMORI, <sup>1</sup>Masako WADA,  
<sup>1</sup>Hitoshi HOSHINO, <sup>1</sup>Satoshi MITARAI, <sup>1</sup>Isamu SUGAWARA, <sup>1</sup>Nobukatsu ISHIKAWA,  
and <sup>2</sup>Toru MORI

**Abstract** [Purpose] To observe the frequency of MDR-TB/XDR-TB strains isolated from chronic pulmonary tuberculosis patients in Japan.

[Object] Ad hoc National Tuberculosis Survey 2000 on frequency of MDR-TB and XDR-TB strains.

[Materials and method] Four hundred and thirty four clinical isolates were collected by the Ad hoc National Tuberculosis Survey 2000, the drug susceptibility testings (proportion method, MGIT Middlebrook, and BrothMIC NTM) were conducted on these strains. These clinical isolates were obtained from patients registered at Health Centers in Japan by the end of 1999 who were culture-positive in 1999 and were registered before January 1st, 1998. The isolates used in this study were selected from patients who were culture-positive at shortest 2 years after the registration.

[Result] The clinical isolates resistant to both INH and RFP were 321 out of 434 (74.0%). The 180 MDR-resistant clinical isolates were also resistant to levofloxacin and amikacin and/or kanamycin. These phenotypes are XDR-TB. No previously registered cases were 165, and previously registered cases were 143 and unknown cases were 13 out of 321 MDR-TB. In 180 XDR-TB cases, no previously registered cases were 95, previously registered cases were 78 and unknown cases were 7. In no previously registered cases, more than 50%

cases started treatment in 1990s. Approximately 50% of previously registered patients started treatment in 1960s and 1970s.

[Conclusion] We performed drug susceptibility testing for 434 clinical isolates which were culture-positive at shortest 2 years after registration. No. of MDR-TB patients was 321 and that of XDR-TB patients was 180. The treatment outcome of these patients have to be followed up carefully at Health Centers. The frequency of amikacin resistance was relatively high. This may be due to either common use of amikacin or cross-resistance against streptomycin and kanamycin.

**Key words** : Multi drug-resistant tuberculosis : MDR-TB, Extensively drug-resistant tuberculosis : XDR-TB, National survey, Cross-resistance

<sup>1</sup>Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), <sup>2</sup>National Hansen Disease Research Center

Correspondence to : Yuko Kazumi, Pathology Division, Mycobacterium Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: kazumi@jata.or.jp)