

結核菌薬剤感受性試験における小川法 kanamycin および amikacin 精度の検討

¹青野 昭男 ¹近松 絹代 ¹五十嵐ゆり子 ¹村瀬 良朗
¹山田 博之 ¹高木 明子 ^{1,2}御手洗 聡

要旨：〔目的〕結核菌の小川法における kanamycin (KM) について、L-J法と比較しその精度を検証した。amikacin (AMK) はL-J法を参考に濃度を設定し、小川法のAMKの精度を評価した。〔方法〕多剤耐性結核菌92株を含む結核菌114株を対象とし、KMは小川法20 µg/ml (小川KM20) および30 µg/ml (小川KM30) の成績をL-J法30 µg/ml (L-J KM30) と比較した。AMKは小川法30 µg/ml とL-J法30 µg/mlの成績を比較した。結果の解析にはMcNemar検定を用いた。〔結果〕検定結果はL-J KM30 vs. 小川KM20が $p = 0.0133$, L-J KM30 vs. 小川KM30が $p = 0.134$ であった。AMKについてはL-J法と小川法は100%一致していた。〔考察〕小川法のKMは30 µg/mlを用いることで、よりL-J法に近い精度を得ることが可能であった。AMKの小川法は30 µg/mlを用いることでL-J法と同等の精度が得られると考えられた。KMおよびAMKの濃度設定は諸外国との疫学データの比較においても重要と思われた。

キーワード：結核菌, 薬剤感受性試験, Kanamycin, Amikacin

はじめに

わが国の2016年の新登録結核患者数は17,625人で、結核罹患率(人口10万人対)は13.9であった¹⁾。結核罹患率の減少率は前回の6.5%から3.6%へ縮小し、減少率の鈍化が顕著となっている。また若年層における外国出生患者数の増加が大きく、特に20歳代では外国出生患者が占める割合は57.7%と半数以上に達する。Isoniazid (INH) およびrifampicin (RFP) の両剤に耐性を示す多剤耐性結核患者数は49人で、前年の48人からほぼ横ばいであった。しかし多剤耐性結核患者に占める外国出生患者の割合は33%と高率で、今後の外国出生患者の増加に伴い多剤耐性結核患者の増加が懸念される。多剤耐性結核菌の治療において二次抗結核注射薬の役割は大きく、わが国で使用可能な薬剤²⁾はkanamycin (KM) とenviomycin (EVM) のみである。このためKMの薬剤感受性試験の精度は超多剤耐性結核菌の判定に影響する。現在の小川培地を用いた比率法(小川法)は、1996年に設置された結核病学会薬剤耐性検査検討委員会が、薬剤感受性試験

について諸外国で実施されている方法との差異を解消するため、試験濃度や判定方法について検討がなされ、1997年に委員会より提案された³⁾。小川標準法のKMの試験濃度は、導入された際に諸外国で広く用いられていた、Löwenstein-Jensen (L-J) 法の試験濃度⁴⁾の20 µg/mlを参考に設定された。しかし現在諸外国におけるKMの試験濃度はL-J法の30 µg/ml⁵⁾が広く用いられており、わが国の小川法の20 µg/mlと異なる。今回われわれはKMについて、小川法とL-J法を比較しその精度を検証した。また、同様に二次抗結核注射薬であるamikacin (AMK) は、わが国において抗結核薬として認可されていないものの、世界的には広く用いられており多剤耐性結核の治療や超多剤耐性結核の診断において重要な役割を果たしている³⁾。今回AMKについては小川法への適応を目的にL-J法を参考に濃度を設定し、その結果をL-J法と比較することで小川法のAMKの精度を評価した。

今回の研究の目的は、現行の薬剤感受性試験において必要性が高いと思われるKMとAMKの試験方法の適正性の評価である。多剤・超多剤耐性結核の診断や治療の

¹公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部, ²長崎大学大学院医歯薬学総合研究科基礎抗酸菌症学

連絡先: 青野昭男, 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部, 〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24

(E-mail: aono@jata.or.jp)

(Received 7 Jul. 2018/Accepted 16 Nov. 2018)

目的には capreomycin (CPM) も重要であるが、日本では薬剤の販売そのものが中止されており、利用できない。また、EVMは国内では広く使用されるものの、諸外国ではほとんど使用されず、海外での臨床効果データが参照しづらい。これらの点を考慮し、本研究では対象薬剤を KM と AMK のみとした。

対象と方法

わが国で分離され、L-J法にて多剤耐性結核菌と判定された92株を含む、結核菌114株を対象とした。薬剤感受性試験は抗酸菌検査ガイド2016⁶⁾に従い、1%小川培地およびL-J培地についてKMおよびAMK用培地の作製、菌液の調整および接種を行った。接種した培地は37℃で小川培地は4週間、L-J培地は6週間培養後に比率法⁶⁾の基準に従い判定を実施した。作製した培地は結核菌基準株H37Rv (ATCC27294) にて、KMおよびAMKが共に感受性と判定され、作製した培地の妥当性を確認した。

KMは小川法が濃度20 µg/ml (小川 KM20) および30 µg/ml (小川 KM30)、L-J法が濃度30 µg/ml (L-J KM30) とし小川 KM20 および小川 KM30 の成績を L-J KM30 の成績と比較した。AMKは小川法の濃度30 µg/ml と L-J法の濃度30 µg/ml を作製しその成績を比較した。結果の解析には McNemar 検定を用いた。

結 果

KMの薬剤感受性試験：L-Jおよび小川培地での濃度差

に関する検討 (Table 1-1, 2, 3)

KMの耐性株数と感受性株数はL-J KM30で24株 (21.1%) と90株 (78.9%)、小川 KM20で32株 (28.1%) と82株 (71.9%)、小川 KM30で28株 (24.6%) と86株 (75.4%) と判定された。耐性率に関する方法相互の検定結果は L-J KM30 vs. 小川 KM20 が $p = 0.0133$ で、L-J KM30 vs. 小川 KM30 が $p = 0.134$ 、小川 KM30 vs. 小川 KM20 が $p = 0.134$ であった。

AMKの薬剤感受性濃度設定に関する検討

AMKについてはL-J法と小川法は100%一致しており、耐性株は16株 (14.0%)、感受性株は98株 (86.0%) であった。

対象株のL-J法におけるKMとAMKに対する感受性の比較 (Table 2)

対象株のKMとAMKに対する感受性を、L-J KM30とL-J AMK30の成績で比較をした。L-J AMK30に耐性を示した16株の全ての株がL-J KM30に耐性であるのに対し、L-J KM30に耐性を示した24株のうちの8株はL-J AMK30に感受性を示していた。

考 察

KMの薬剤感受性試験：L-Jおよび小川培地での濃度差に関する検討

WHO⁵⁾はL-J培地を用いた場合のKMの薬剤感受性試験濃度を30 µg/mlとしており、小川培地を用いた場合の薬剤感受性試験濃度を定めていない。諸外国において鶏

Table 1 Comparison of kanamycin susceptibility between L-J and Ogawa

1. L-J KM30 vs. Ogawa KM20 (N=114)			
	L-J Resistant (30 µg/ml)	L-J Susceptible (30 µg/ml)	
Ogawa Resistant (20 µg/ml)	24	8	32
Ogawa Susceptible (20 µg/ml)	0	82	82
	24	90	114
McNemar's Test	$p = 0.0133$		
2. Ogawa KM30 vs. Ogawa KM20 (N=114)			
	Ogawa Resistant (30 µg/ml)	Ogawa Susceptible (30 µg/ml)	
Ogawa Resistant (20 µg/ml)	28	4	32
Ogawa Susceptible (20 µg/ml)	0	82	82
	28	86	114
McNemar's Test	$p = 0.134$		
3. L-J KM30 vs. Ogawa KM30 (N=114)			
	L-J Resistant (30 µg/ml)	L-J Susceptible (30 µg/ml)	
Ogawa Resistant (30 µg/ml)	24	4	28
Ogawa Susceptible (30 µg/ml)	0	86	86
	24	90	114
McNemar's Test	$p = 0.134$		

Table 2 Comparison of susceptibility between amikacin and kanamycin on L-J (L-J AMK30 vs. L-J KM30) (N=114)

	L-J Resistant (AMK 30 µg/ml)	L-J Susceptible (AMK 30 µg/ml)	
L-J Resistant (KM 30 µg/ml)	16	8	24
L-J Susceptible (KM 30 µg/ml)	0	90	90
	16	98	114

卵培地を用いた薬剤感受性試験はL-J培地を用いるのが一般的で、小川培地を用いているのはわが国を含めごく限られた国のみである。今回われわれはわが国で用いている小川法⁶⁾によるKMの薬剤感受性の評価方法が、L-J法に比較し妥当であるかを検証するため、小川KM20と小川KM30についてL-J KM30の成績と比較した。結果としてL-J KM30と小川KM30の間には差を認めなかったのに対し、L-J KM30と小川KM20の間には有意な差を認めており、小川KM20と比較し小川KM30はよりL-J KM30に近い値が得られると考えられた。このことから、小川法におけるKM薬剤感受性試験の薬剤濃度は30 µg/mlを用いることで、よりL-J KM30に近い精度を得ることが可能であった。なお小川KM20に耐性であった32株のうち8株(25.0%)でL-J KM30に感受性と判定されている。この8株のうち6株は多剤耐性株であることから、治療においてKM使用の可能性を剥奪するもので、患者の不利益につながりかねない。さらに6株の多剤耐性結核菌がfluoroquinoloneに耐性であった場合、KMが耐性と誤判定されることで超多剤耐性結核菌と誤って判定されることになる。

AMKの薬剤感受性濃度設定に関する検討

AMKにおける小川法は薬剤濃度30 µg/mlを用いることで、L-J法と同等の精度を有すると考えられた。

L-J培地におけるAMKとKMの成績を比較すると、AMK耐性を示した16株全てがKM耐性を示しているのに対して、KM耐性を示した24株中8株(33.3%)でAMK感受性を示した。Ajvaniら⁷⁾は187株のうち21株においてKM耐性でAMK感受性の株を認めたとしており、またRodwellら⁸⁾は*eis*遺伝子のpromoter領域に変異を示した55株のうちKMに耐性は54株(98.2%)で感受性が1株(1.8%)であるのに対して、AMKに耐性は13株(23.6%)で感受性が42株(76.4%)であったと報告している。すなわち*eis*遺伝子のpromoter領域の遺伝子変異はKM耐性に深くかかわるものの、AMK耐性への関与は限定的であり、KM耐性であってもAMK感受性の可能性を残すことを示している。Chanら⁹⁾は多剤耐性結核の治療において二次抗結核注射薬の使用の可否は治療の成功に影響すると報告しており、選択薬剤としてAMKが加わることは多剤耐性結核の治療の選択肢を広げるものであ

り、非常に有益なことと考える。

国際的な感受性試験法の現状

国際的には培地の安定性や薬剤の吸着の問題から、鶏卵培地は疎外される傾向にある。代わりに多用されるのが人工液体培地を用いた薬剤感受性試験であり、最小発育阻止濃度あるいは比率法が利用される。最も多用されているのがMGIT ASTシステム(ベクトン・ディッキンソン)であり、delamanid (DLM) およびbedaquiline (BDQ)を含む最も多くの薬剤の感受性試験に対応している⁵⁾。一方、日本国内ではBDQの感受性試験法はいまだ定まらず、DLMにおいては寒天平板培地による比率法である。MGIT ASTは一次薬には対応しているが、二次薬その他には対応していない。従って二次薬その他については基本的に鶏卵培地に頼らざるを得ず、その精度は重要である。特にKMあるいはAMK(CPMは既に販売中止)は感染症法における特定三種病原体等を同定するために必須であり、さらにKMとAMKの濃度設定は世界とのデータ比較においても重要と思われる。

結 語

今回われわれはKMについて、小川法とL-J法を比較しその精度を検証した。また、同様に二次抗結核注射薬であるAMKは、小川法への適応を目的にL-J法を参考に濃度を設定し、その結果をL-J法と比較し小川法の精度を評価した。KMは試験濃度を20 µg/mlから30 µg/mlに変更することで、よりL-J法に近い値を得ることが可能であった。AMKについては小川法の試験濃度を30 µg/mlにすることでL-J法と100%一致した結果となり、L-J法と同等の精度を得ることが可能であった。

謝 辞

本研究は平成28年度日本医療研究開発機構 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業(JP16fk0108301h)の研究資金支援を受けた。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特になし。

文 献

- 1) 結核予防会編：「結核の統計2017」, 結核予防会, 東京, 2017.
- 2) 日本結核病学会治療委員会：「結核医療の基準」の改訂—2018年. 結核. 2018; 93: 61-68.
- 3) 結核病学会薬剤耐性検査検討委員会：結核の薬剤感受性試験, 特に試験濃度改変と比率法導入の提案. 結核. 1997; 72: 597-598.
- 4) Canetti G, Fox W, Khomenko A, 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.
- 5) World Health Organization: WHO Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. WHO reference number: WHO/CDS/TB/2018.5. http://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_technical_report_concentrations_TB_drug_susceptibility/en/
- 6) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：「抗酸菌検査ガイド2016」, 南江堂, 東京, 2016.
- 7) Ajbani K, Lin SY, Rodrigues C, et al.: Evaluation of pyrosequencing for detecting extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among clinical isolates from four high-burden countries. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59: 414-20.
- 8) Rodwell TC, Valafar F, Douglas J, et al.: Predicting extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* phenotypes with genetic mutations. J Clin Microbiol. 2014; 52: 781-789.
- 9) Chan ED, Stand MJ, Iseman MD: Multidrug-resistant tuberculosis (TB) resistant to fluoroquinolones and streptomycin but susceptible to second-line injection therapy has a better prognosis than extensively drug-resistant TB. Clin Infect Dis. 2009; 48: e50-2.

Short Report

EVALUATION OF KANAMYCIN AND AMIKACIN SUSCEPTIBILITY TESTING ON OGAWA MEDIA AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

¹Akio AONO, ¹Kinuyo CHIKAMATSU, ¹Yuriko IGARASHI, ¹Yoshiro MURASE,
¹Hiroyuki YAMADA, ¹Akiko TAKAKI, and ^{1,2}Satoshi MITARAI

Abstract [Objective] To compare the drug susceptibility testing (DST) results of kanamycin (KM) and amikacin (AMK) between Ogawa and Löwenstein-Jensen (L-J) media.

[Method] Ogawa media containing 20 and 30 µg/ml of KM (Ogawa KM20 and KM30), and 30 µg/ml of AMK (Ogawa AMK30) were prepared, respectively. Similarly, L-J media containing 30 µg/ml of KM (L-J KM30) and 30 µg/ml of AMK (L-J AMK30) were also prepared. A total of 114 clinical *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) isolates including 92 multidrug-resistant ones were tested with each medium, and the results were compared. McNemar test was used for the analyses.

[Result] The McNemar test showed significant difference of DST results between L-J KM30 vs. Ogawa KM20 ($p=0.0133$), but not between L-J KM30 vs. Ogawa KM30 ($p=0.134$). DST of AMK showed 100% concordance between Ogawa and L-J medium.

[Discussion] Ogawa proportion method with 30 µg/ml of KM was almost equivalent to that of L-J method, while Ogawa KM20 detected less resistances. As to AMK, Ogawa method could yield same DST results with L-J method. The

modification of current KM concentration from 20 to 30 µg/ml could make the Ogawa proportion method universally acceptable. It was also evident that Ogawa medium could be used for proportion method of AMK. Those concentration settings of KM and AMK in 1% Ogawa medium will be important to standardize the DST results compared to other countries.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Antimicrobial susceptibility testing, Kanamycin, Amikacin

¹Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, ²Basic Mycobacteriosis, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

Correspondence to: Akio Aono, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan.

(E-mail: aono@jata.or.jp)