

「抗酸菌検査について」 菌種同定と非結核性抗酸菌の薬剤感受性試験を中心に

Mycobacterial examinations: Species identification and drug susceptibility testing for non-tuberculosis mycobacteria

み たら い さとし
御 手 洗 聡
Satoshi MITARAI

はじめに

既に1年ほど前になってしまったが、2020年に「抗酸菌検査ガイド2016」を2020年版に改訂した¹⁾。改訂の主な目的は2016年版の再校正、この4年程度の間新規に上市された検査法の追記、米国 Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) M24 3rd ed に従った非結核性抗酸菌の薬剤感受性試験法(基本的には最小発育阻止濃度、Minimum Inhibitory Concentration: MIC 測定)の記載である²⁾。PZAの外部精度評価の実施による精度保証関連の追記も含んでいる。総じて言えば、世界的に周回遅れの感がある日本の抗酸菌検査を多少ともアップデートすることが主な目的と言える。

I. 世界の抗酸菌検査の今

世界の抗酸菌検査と言っても、基本的には発展途上国における結核菌検査が主流であり、非結核性抗酸菌の検査は一部の先進工業国で実施されているものに限る。現在、結核高まん延国では従来の喀痰塗抹検査を中心とした検査法から脱却し、遺伝子検査を中心とした方法に移行している。世界保健機関(World Health Organization: WHO)の報告に依れば、2019年には約1,000万人の新規結核患者が発生し、約140万人(20万人はHIV陽性結核患者)が死亡したと推定されている³⁾。新規患者数のうち、細菌学的に診断されているのは57%に過ぎないとされており、検査の効率化が進められている。

では、具体的には何が行われているのかというと、

WHOが最初に承認した核酸増幅法検査であるXpert MTB/RIF (Cepheid, GeneXpert上で作動)の使用拡大である。多くの国で喀痰塗抹検査を徐々に廃止し、Xpert MTB/RIFを最初から使用して診断を行っている。Xpert MTB/RIFの利点はrifampicin (RFP)の耐性が同時に検出されることであるが、初回治療時の多剤耐性結核菌の割合が比較的高い地域では有用性が高い。Xpert MTB/RIFによってRFP耐性が診断された場合、その患者はRR-TBというカテゴリーに分類され、基本的に多剤耐性結核(Multidrug-resistant tuberculosis: MDR-TB)と同じに扱われる。RR-TBとされても、最初のXpert MTB/RIFの結果がScanty positive (WHOではTraceと表現する)の場合は、確定のためXpert MTB/RIFによる再検を行う。その後は、Fluoroquinolone (FQ)耐性を主に判断するため、Line Probe Assayが行われる。ここで使用されるのはMTBDRsl (Hain Lifescience, 現在はブルカー社の一部)であり、FQと注射剤の耐性を遺伝子変異から判定する。それらの情報を元に、治療レジメンを決定する仕組みである⁴⁾。日本では未だに表現型検査を中心に行っていることを考えると、精度は別にしても迅速性では遙かに発展途上国に劣っている。検査室のISO15189の取得率も高い。日本は結核菌検査の迅速化・効率化の面で大幅に遅れている。

II. 抗酸菌感染症の現状

既に多くの雑誌や論文で示されているとおり、先進工業国では結核の罹患率が低下するに従って、非結核性抗酸菌症が増加している。南宮らは2014年

の非結核性抗酸菌症の罹患率を14.7/10万と見積もっているが⁵⁾、その後の森本らの検査室データからの研究⁶⁾や泉らのレセプトデータの研究⁷⁾を総合すると、非結核性抗酸菌症の罹患率は10～20/10万程度であると考えられる。2019年の結核の罹患率が11.5であるから⁸⁾、少なくとも結核の罹患率は超えているであろう。このような状況で重要なのは、抗酸菌検査陽性時の結核菌の陽性適中率が低下しているという事実である。つまり適切な菌種同定検査と非結核性抗酸菌の薬剤感受性推定法の必要性が増していることを示している。

Ⅲ. 抗酸菌種同定検査の重要性

結核と非結核性抗酸菌症の罹患率が同程度であると仮定すると、有病期間の違いから検査室内で検出される抗酸菌は主に非結核性抗酸菌ということになる。非結核性抗酸菌は現在190種程度あり⁹⁾、頻繁に分離されるものから極めて稀少なものまで様々である。それでも、一般的に*Mycobacterium avium*と*Mycobacterium intracellulare*の分離頻度が合わせて90%程度を占めており、続いて*Mycobacterium gordonae*がよく分離される。ただし、*M. gordonae*は殆どが汚染であり、病原性がある場合はほとんどない(ただし時に病原性があるので注意は必要)。次に頻度が高いのは*Mycobacterium abscessus* complex (MABC)であろう。よく知られている通り、MABCは3種の亜種に分類され、*M. abscessus* subsp. *abscessus* (*M. abscessus*)、*M. abscessus* subsp. *bolletii* (*M. bolletii*) および *M. abscessus* subsp. *massiliense* (*M. massiliense*) の3亜種が臨床的に同定される。日本では*M. abscessus*が6割程度、*M. massiliense*が4割程度分離され、*M. bolletii*は5%以下である。その後には*Mycobacterium kansasii*や*Mycobacterium fortuitum*などが続くが、これは地域によっても異なると考えられる。

過去には誤同定も多く、かつてDDH(極東製薬工業)で*Mycobacterium nonchromogenicum*と同定されていた株の多くが*Mycobacterium kumamotoense*であったり¹⁰⁾、COBAS amplicor(ロシユ・ダイアグノスティクス)で*M. intracellulare*と同定されていたものに*Mycobacterium lentiflavum*が多く含まれていたことが示されている¹¹⁾。稀少菌種の分離も増

加しており、*Mycobacterium shinjukuense*や*Mycobacterium genavense*は近年よく分離されている。これらの菌種のうち、比較的簡単に同定できるのは核酸増幅法キットが利用可能な結核菌群と*M. avium*および*M. intracellulare*のみである。他は分離頻度自体が低いいため、キットの対象となりにくい。

以上のような背景から、抗酸菌検査ガイド2016でも記載したが、2020年版では質量分析による抗酸菌種同定法を主要な菌種同定法として推奨している。質量分析(mass spectrometry)は分子をなんらかの方法で気体状のイオンとし、電磁気力を用いて真空中で運動させ、飛行時間差などによりそれらイオンを質量電荷比に応じて分離・検出する方法である。イオン化の方法としてはレーザー照射が用いられることが多く、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)がよく利用される(最近ではマトリックスを使用せず、イオン化支援基板を使用する方法もある)。これにイオンの質量電荷比に応じた分離法である飛行時間型質量分析法(Time of Flight Mass Spectrometry, TOF MS)を組み合わせることによってマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)が成立する。現在日本国内では、臨床検査用にブルカー・ダルトニクス社のバイオタイパーとバイオメリュエ社のバイテックMSがある。ブルカー・ダルトニクス社のホームページによると、現在のデータベースver. 6.0を使用すると178菌種の抗酸菌を同定することが可能とされている。同様にバイテックMSでは37菌種と2菌群の抗酸菌を同定可能である。

同定アルゴリズムには「菌株」をベースとするものと、「菌種」をベースにするものがあり、バイオタイパーは前者、バイテックMSは後者である。菌株をベースとする場合は、同一菌種の株ごとにデータベースが登録されており、検体から得られたマススペクトルをそのライブラリーと比較し、パターンマッチングに基づくアルゴリズムで最も近いと判断された菌株の菌名を同定結果とする。一方菌種をベースとする場合、株毎のバリエーションを考慮し、その菌種に必ず確認される共通の特徴がデータとして保存され、検体から得られたマススペクトルと各菌種の特徴となるピークの有無をデータベースに含まれる全菌種と比較し、その特徴となるピークを持

つ菌種を同定結果とする。前者は株のマススペクトルを直接登録していくのでデータのアップデートが早い、バリエーションの影響を受ける可能性がある。後者は菌腫の特徴を確定するため多数の株のデータを様々な条件で取得する必要があり、データベース作成に時間が掛かるが、普遍性が高いのが特徴である。いずれにしても MALDI-TOF MS の同定精度はデータベースの充実度に依存しているので、新たなデータベースがリリースされた際は速やかにアップデートすることが勧められる。

IV. 非結核性抗酸菌の薬剤感受性試験

結核菌の感受性試験の基準法は現在比率法であり、各薬剤 1 濃度 (Isoniazid のみ 2 濃度。ただし基準濃度は $0.2 \mu\text{g/ml}$) でのブレイクポイントテストが実施される。これは「全ての野生型結核菌は薬剤感受性である」という前提に基づいており、基本的に正しい。しかし、非結核性抗酸菌は同じ種であっても MIC 値にばらつきがある場合が多く、1 濃度によるブレイクポイントテストでは十分な耐性と感受性の分別能 (Discrimination Power) が得られない。このような背景から、一般的に非結核性抗酸菌の感受性試験では MIC 測定を実施することになる¹²⁾。

抗酸菌検査ガイド 2016 の上梓時点では、日本国内に CLSI M24 に準拠した検査キットがなかったため詳述できなかったが、2019 年に極東製薬工業から迅速発育性抗酸菌用 MIC 測定キット・プロスミック RGM が発売されたので、遅発育性抗酸菌の場合も含めて判定基準値も含めた記載を 2020 年版では行った。

CLSI M24 3rd ed には pH を 7.3-7.4 に調製した Mueller-Hinton broth (Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth: CAMHB) を使用した MIC 測定法が記されており、迅速発育菌の場合は CAMHB をそのまま使用するが、遅発育菌の場合は 5% OADC (オレイン酸, アルブミン, デキストロース, カタラーゼ) を追加混合する。基本は Broth microdilution 法であり、コントロールに十分な発育が確認された時点で MIC を判定する。迅速発育菌の場合、MIC は 3 日目から 5 日目までに判定するが、コントロール発育不良の場合は、再検する。ただし、*M. abscessus* subsp. *abscessus/bolletii* では *erm* (41) の発現が clar-

ithromycin (CAM) によって誘導され、CAM の標的である 23S rRNA の結合部位がメチル化されて CAM 耐性となる。耐性誘導に時間がかかるため、最終的な MIC の判定は 14 日目に行う²⁾。ちなみに *M. abscessus* と *M. bolletii* は *erm* (41) を完全な形で保有しているため、基本的に CAM 耐性である。しかし、28 番目の遺伝子が Thymine (T) から Cytosine (C) に変異しているバリエーションが 10 ~ 20% 程度あり、この T28C バリエーションは CAM 感受性である。一方 *M. massiliense* は *erm* (41) 遺伝子の一部が失われている (Truncated) ため、基本的に CAM 感受性である。ただし、*M. massiliense* の *rrl* 遺伝子 (23S rRNA) に特定の変異が入ると高度に CAM 耐性化する。従って、MABC 亜種の遺伝子同定 (MALDI-TOF MS では基本的に現状亜種同定はできない) によって大まかな CAM 感受性の推定は可能であるが、最終的な感受性は MIC 測定を行って決める必要がある。

CLSI M62 に基づいて、表 1 に迅速発育菌の、表 2

表 1 迅速発育菌の MIC 測定対象薬剤とその解釈

薬剤	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	感受性	判定保留	耐性
Amikacin ¹	≤16	32	≥64
Cefoxitin	≤16	32-64	≥128
Ciprofloxacin ²	≤1	2	≥4
Clarithromycin ³	≤2	4	≥8
Doxycycline	≤1	2-4	≥8
Imipenem ⁴	≤4	8-16	≥32
Linezolid	≤8	16	≥32
Meropenem	≤4	8-16	≥32
Moxifloxacin	≤1	2	≥4
Trimethoprim-sulfamethoxazole ⁵	≤2/38	-	≥4/76
Tigecycline ⁶	-	-	-
Tobramycin ⁷	≤2	4	≥8

1. *M. abscessus* complex で MIC 値が $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ の場合は再検するか、*rrs* 遺伝子変異を検索する。
2. Levofloxacin でも可
3. 誘導耐性がありうるため、最終判定は培養 14 日後
4. もしも *M. fortuitum* group, *M. smegmatis* group あるいは *M. mucogenicum* group で MIC $> 8 \mu\text{g/ml}$ の場合は培養 3 日以内で再検する。再検後も同様なら報告しない。これらの菌種は Imipenem に感受性とされているため、薬剤の力価が低下していることが考えられる。
5. MIC は 80% の発育阻害を以て判断する。
6. Tigecycline の MIC と臨床効果との相関は確立されていない。そのため、MIC のみ報告する、とされている。
7. Tobramycin は *M. chelonae* 感染症の治療に使用される。もし MIC $> 4 \mu\text{g/ml}$ の場合は再検する。再検時も同様であれば *M. chelonae* であるか再同定する。

(文献 13) より引用)

に *M. avium* と *M. intracellulare* の MIC と臨床細菌学的判定の関係を示す¹³⁾。表3には *M. avium* と *M. intracellulare* 以外の遅発育菌の判定基準を示している。一般的に解釈上の信頼性が高い (MIC と治療効果との相関が高い) のは CAM と Amikacin のみであり、他は参照程度で考える必要がある。最新の ATS/ERS/ECMID/IDSA による非結核性抗酸菌症治療ガイドラインでは *M. avium* と *M. intracellulare* の治療に関して CAM よりも Azithromycin (AZM) を推奨しているが¹⁴⁾、AZM の MIC 測定自体は推奨していない。現在研究中の MIC プレートには敢えて AZM を CAM と同じ濃度範囲で設定する予定であるが、これは AZM の MIC と臨床効果の関連について不足しているデータを補うためという意味が含まれている。

表2 *Mycobacterium avium* complex の MIC 測定対象薬剤とその解釈

薬剤	MIC (μg/ml)		
	感受性	判定保留	耐性
1次選択薬剤			
Clarithromycin	≤8	16	≥32
Amikacin (静注)	≤16	32	≥64
Amikacin (リボソーム包埋・吸入)	≤64	—	≥128
2次選択薬剤*			
Moxifloxacin	≤1	2	≥4
Linezolid	≤8	16	≥32

*これらの薬剤の臨床効果は必ずしも証明されていない。

(文献13)より引用)

表3 *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii* 以外の遅発育菌の MIC 測定対象薬剤とその解釈

薬剤	MIC (μg/ml)		
	感受性	判定保留	耐性
Amikacin	≤16	32	≥64
Ciprofloxacin	≤1	2	≥4
Clarithromycin	≤8	16	≥32
Doxycycline	≤1	2-4	≥8
Linezolid	≤8	16	≥32
Minocycline	≤1	2-4	≥8
Moxifloxacin	≤1	2	≥4
Rifabutin	≤2	—	≥4
Rifampicin	≤1	—	≥2
Trimethoprim-sulfamethoxazole	≤2/38	—	≥4/76

(文献13)より引用)

V. MIC 測定における精度保証

MIC 測定は熟練を要する検査法である。適切な菌量を適切な条件で接種し、判定も基本的に目視であるため、適正なトレーニングを行った上で実施する。それぞれの MIC 測定法 (迅速発育菌・遅発育菌) に精度管理株が設定されており、指定された薬剤において精度管理株で実施した MIC が規定範囲に収まる必要がある¹⁵⁾。

おわりに

かつて結核診断の主流であった結核菌の塗抹鏡検査は、発展途上国でさえ過去のものになろうとしている。また、かつて適正なエビデンスを伴わなかった非結核性抗酸菌治療も感受性情報を基礎として薬剤を選択する時代になった。日本は果たして世界の状況に追従していくことが今後可能であろうか。いや増す非結核性抗酸菌症患者数を見るにつけ、抗酸菌検査基盤整備の必要性が強く感じられる。

文 献

- 1) 日本結核・非結核性抗酸菌症学会抗酸菌検査法検討委員会. 2020. 抗酸菌検査ガイド2020日本結核・非結核性抗酸菌症学会. 南江堂.
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae* spp., and Other Aerobic *Actinomycetes*. M24, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
- 3) Global tuberculosis report 2020: executive summary. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 4) WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 5) Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, Hoshino Y, Hasegawa N, Ato M, Mitarai S. Nationwide survey on the epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in Japan. *Emerg Infect Dis* 2016; **22**: 1116-1117.
- 6) Morimoto K, Hasegawa N, Izumi K, et al. 2017. A Laboratory-based Analysis of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in Japan from 2012 to 2013. *Ann Am Thorac Soc* **14**: 49-56.
- 7) Izumi K, Morimoto K, Hasegawa N, Uchimura K, Ato M, Mitarai S. Epidemiology of adults and children treated for

- nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in Japan. *Ann ATS* 2019; **16** (3): 341-347.
- 8) 結核予防会(編): 結核の統計2020, 結核予防会, 2020.
- 9) Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020; 70: 5607-5612; DOI: 10.1099/ijsem.0.004332
- 10) 高木明子, 関口幸恵, 奥村元, 池田将之, 富井貴之, 玉井清子, 中田有希子, 近松絹代, 五十嵐ゆり子, 青野昭男, 村瀬良朗, 山田博之, 御手洗聡. 国内で分離された非結核性抗酸菌のバイテックMSによる同定精度評価. *臨床微生物学会雑誌* 2018; **28** (S1): 425.
- 11) 戸田宏文他. 環境由来 *Mycobacterium lentiflavum* に対するコバス TaqMan MAI 偽陽性反応の検討. *日本感染症雑誌* 2013; **87** (2): 215-217.
- 12) Heifets LB. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections, CRC press, 1991
- 13) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae* spp., and Other Aerobic *Actinomycetes*. 1st ed. CLSI supplement, M62. Wayne, PA.
- 14) Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ, Andrejak C, Böttger EC, Brozek J, Griffith DE, Guglielmetti L, Huitt GA, Knight SL, Leitman P, Marras TK, Olivier KN, Santin M, Stout JE, Tortoli E, van Ingen J, Wagner D, Winthrop KL. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline: Executive Summary. *Clin Infect Dis*. 2020 Aug 14;71 (4):e1-e36.