

[原 著]

ATP 法を用いた非結核性抗酸菌の薬剤感受性試験の検討

堀川晶行¹⁾・西 功¹⁾・豊川真弘¹⁾・佐藤直樹²⁾・岡沢 豊²⁾・浅利誠志¹⁾¹⁾ 大阪大学医学部附属病院臨床検査部微生物検査室²⁾ 極東製薬工業株式会社高萩工場研究開発部

(平成 16 年 4 月 8 日受付, 平成 16 年 9 月 7 日受理)

生菌が菌体内に保有する adenosine triphosphate (ATP) を生物発光で測定することにより Nontuberculous Mycobacteria (NTM) の薬剤感受性試験を行う新たな方法 (ATP 法) を開発し, その基礎的検討ならびに微量液体希釈法 (MB 法) との比較検討を ATCC 標準株 4 株と臨床分離株 45 株を用いて行った。ATP 測定方法については検討の結果, 前処理は室温にて, 30 分間処理, 抽出条件は 60°C にて, 10 分間が適当であることが確認された。ATP 法はプレートを 5 日間培養後に Relative light units (RLU) ratio を測定し, 7 日間培養の MB 法と比較検討した。streptomycin, ethambutol, kanamycin, isoniazid, levofloxacin, ethionamide, amikacin の 7 薬剤の発育陽性値を RLU ratio ≥ 0.1 , rifampicin および clarithromycin を RLU ratio ≥ 0.03 とした ATP 法と, MB 法との一致率は *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478 は 84.4% とやや低い値であったものの, 他の標準株 3 株については 97.8~100% (4 株では 95%) と良好な結果が得られた。また臨床分離株についても *Mycobacterium intracellulare*: 92.2%, *Mycobacterium avium*: 97.2%, *M. kansasii*: 100% で, 全株では 95.3% と良好な一致率を示した。以上より ATP 法は NTM の薬剤感受性試験として有用な方法であると評価された。

Key words: nontuberculous mycobacteria (NTM), adenosine triphosphate (ATP), minimum inhibitory concentration (MIC), bioluminescence

わが国の非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria; NTM) 症の約 70% は *Mycobacterium avium* complex (MAC) によるもので多くは肺に慢性病変を形成する肺 MAC 症である。これまで MAC 症は陳旧性肺結核, 気管支拡張症, 肺線維症, 塵肺, 気腫性病変などの肺に器質的障害を有する患者に二次的に感染したと考えられる症例が多かったが, 最近では基礎疾患の特になく中高年の女性に発症し, 多発性の小結節や気管支拡張を示す症例が急増している。MAC 症の診断は結核症の診断とは異なり菌の検出のみでは不十分である。このため日本結核病学会非定型

抗酸菌症対策委員会は 2003 年 4 月に“肺非結核性抗酸菌症診断に関する見解—2003 年”を提言し新たな診断基準を作成した¹⁾。MAC 症は症例のすべてが薬剤治療の対象となるわけではないとの考えがわが国では一般的であるが, 本症を積極的に治療しようとする傾向もしだいに強くなっている。しかしながら MAC は細胞壁に多糖体からなる外膜を有し, 抗結核薬や抗菌薬に対して低感受性を示すため, 本菌による肺感染症や AIDS 患者での全身播種性感染症は極めて難治性である。また MAC に次いで多く検出される *Mycobacterium kansasii* も 1997 年ごろより顕著な増加傾向にあり, MAC 症に比べやや若年層の患者が多いとされている。*M. kansasii* は比較的毒力が強く, 基礎疾患のない健常肺にも結核類似の病変を作りやすいが, rifampicin (RFP) を中心とする化学療法に対して良好な反応を示すことから RFP をはじめとする各種抗菌薬の感受性試験を実施することが重要とされている。現在, NTM 症に対し治療効果が期待できる抗菌薬として clarithromycin (CAM), azithromycin など

著者連絡先: (〒565-0871) 大阪府吹田市山田丘 2-15
大阪大学医学部附属病院臨床検査部微生物検査室
堀川晶行
TEL: 06-6879-6680
FAX: 06-6879-6683
E-mail: horikawa@hp-lab.med.osaka-u.ac.jp

のニューマクロライド系抗菌薬や、ニューキノロン系抗菌薬、アミノグリコシド、RFPなどの薬剤が使用されているため、臨床からはこれらの薬剤に対する迅速な薬剤感受性検査法の開発が望まれている。

微生物検査の迅速化のために開発された方法の一つに微生物の保有する adenosine triphosphate (ATP) 量を測定し生菌数を測定する方法がある。この方法は生菌数と ATP 量の間で極めて良好な相関関係があり、さらに、この発光効率が高いため極めて高感度で測定可能な方法である。この ATP 量測定により薬剤感受性試験を行う方法は、一般細菌については吉田²⁾、井田³⁾らの報告、また結核菌については山崎^{4)~6)}らによる報告があるが、NTMにこの方法を用いた報告は見られない。そこで、我々は ATP 測定を用いた薬剤感受性試験法（以後 ATP 法と略す）の基礎検討を行い、従来法の微量液体希釈法（以後 MB 法と略す）との比較検討を行った。

I. 材料と方法

A. 供試菌株

供試菌としては American Type Culture Collection (ATCC) 標準株として *M. avium* ATCC 700898, *M. avium* ATCC 25291, *M. kansasii* ATCC 12478 および *Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950 の 4 株を用いた。また、臨床分離株としては大阪大学医学部附属病院にて患者の呼吸器由来材料から分離・同定された 45 株を供試した。その内訳は、*M. avium* 20 株、*M. intracellulare* 20 株および *M. kansasii* 5 株であった。なお、臨床分離株の同定は DDH (DNA-DNA hybridization) マイコバクテリア（極東製薬工業）にて行った。

B. ATP 前処理法

前処理の検討では ATCC 標準株を Middlebrook 7H9 broth 培地（マイコプロス、極東製薬工業）で前培養後、菌液濃度を McFarland No. 0.5（波長 530 nm, 吸光度 0.08~0.10）に調製した後に、Middlebrook 7H9 broth 培地で 1/2, 1/10, 1/100 に希釈した菌液を用いた。前処理は前処理液 A (2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) と前処理液 B (adenosine phosphate deaminase) を使用時に混和し、菌液の入ったウェルに前処理液 50 μ l を添加し、室温で 0, 30, 60, 90, 120 分間放置した後に ATP 測定を行い、培地中の遊離の ATP や発光に影響を及ぼす成分を減少させることができるかの検討を行った。なお、MIC 測定用の培地（プロスミック NTM プロス、極東製薬工業）の前処理時間の検討については 0, 30 分間で測

定した。

C. ATP 抽出法

菌体からの ATP 抽出の検討については菌液濃度を McFarland No. 0.5 に調製した菌液を用い、抽出試薬 (benzalkonium chloride) を 50 μ l 添加し、抽出温度は室温、60°C, 70°C, 80°C で、さらに抽出時間は 0, 5, 10, 15, 20 分間で処理した後に常温に戻してから ATP 測定を行った。

D. ATP 測定法

ATP 測定法は上記に示した ATP 前処理ならびに ATP 抽出を行った後に、マイクロプレート冷蔵し常温に戻してから、マイクロプレートリーダー (LP-5000-kyokuto-1) にて自動的に発光試薬 (ルシフェリン・ルシフェラーゼ) を各ウェルに 100 μ l 添加するとともに発光量 (Relative light units; RLU) を測定した。

E. 薬剤感受性試験

1. 微量液体希釈法での MIC 測定 (MB 法)

MIC 測定には streptomycin (SM), ethambutol (EB), kanamycin (KM), isoniazid (INH), RFP, levofloxacin (LVFX), CAM, ethionamide (TH), amikacin (AMK) の 9 薬剤を 2 倍濃度希釈系列 (SM, EB, KM は 0.06~128 μ g/ml の 12 段階, INH, RFP, LVFX, CAM は 0.03~32 μ g/ml の 11 段階, TH, AMK は 0.5~16 μ g/ml の 6 段階) に調製した MIC 測定用プレートであるプロスミック NTM（極東製薬工業）を用いた。

接種菌液の調製方法は、1% 小川培地で培養した 4 週間以内の標準株ならびに臨床分離株を Middlebrook 7H9 broth 培地に菌液の濁度を、波長 530 nm, 吸光度 0.03~0.05 の条件に接種後、37°C にて 3~5 日間培養し McFarland No. 0.5（吸光度 0.08~0.10）以上に増殖した培養液を用いた。次にこの培養液を滅菌蒸留水にて McFarland No. 0.5 に正確に希釈調製した。さらに、調製した菌液 110 μ l を滅菌蒸留水 11 ml に加えチューブミキサーで攪拌後、プロスミック NTM の各ウェルに 100 μ l ずつ接種し、シールをしたプレートを 37 \pm 1°C にて 7 日間培養後に、肉眼的に菌発育が認められない最小薬剤濃度を MIC 値とした。

2. ATP 測定による薬剤感受性試験法 (ATP 法)

ATP 測定用の薬剤固着プレートは MIC 測定用プレートの試験薬剤と同じ濃度となるように調製した。なお、プレートは ATP を生物発光で測定するためにホワイトプレートとした。接種菌液の調製方法ならびに接種方法は MB 法と同様に行った。

ATP の測定による MIC 測定は 5 日間培養後に実

施した。測定方法は検討結果より、前処理時間は室温で30分間とし、抽出方法は60°C、10分間加温した。抽出後、常温に戻した後にATP測定を行った。判定は、RLU ratio (薬剤含有培養ウェルのRLU値を薬剤不含コントロールウェルのRLU値で除した値)を求めRLU ratio ≥ 0.1 , ≥ 0.03 の二つのポイントで菌発育の判定を行った。なお、コントロールウェルのRLU値はCAMを除く8薬剤については薬剤不含コントロールウェル(3ウェル)の平均RLU値とし、CAMについては試験培地pHが他剤と異なるためCAM用コントロールウェルのRLU値とした。

II. 結 果

A. ATP測定方法の検討

Table 1に、前処理時間の検討結果を示した。菌液接種時の菌液濃度であるMcFarland No. 0.5の1/100の菌量では発光量は低く、RLU値は302~506であり測定値に影響を及ぼす発光量ではないこと、菌増殖期の菌液濃度である1/10, 1/2では30~60分間処理で安定したRLU値が得られることが確認された。また前処理によって培地中のATP測定時に発光に影響を与える成分のRLU値は、72,074であったのが30分間で384に効果的に処理されていることが確認された。Table 2には、抽出条件について示した。*M. avium*, *M. intracellulare*については室温を除いて60~80°Cでは発光量に差は見られなかったが、*M. kansasii*については温度が高くなるとRLU値が低くなる傾向にあり、60°Cで最も高いRLU値を示した。

抽出時間については3株ともに10分間以上の抽出でほぼ平衡になることから、ATP抽出条件は60°C、10分間とした。

B. 薬剤感受性試験

1. ATCC標準菌株でのMB法とATP法の一致率

プレートを7日間培養後、MIC判定を行ったMB法の結果と、5日間培養後にATP測定を行い、RLU ratioでの判定を行ったATP法での結果の一致率を、前培養の段階から各々5回反復試験を行い検討した。なお、一致率は ± 1 管以内は許容範囲とした。Table 3に、MB法を基準にしてATP法でRLU ratio ≥ 0.1 およびRLU ratio ≥ 0.03 を陽性とした場合の一致率を示した。RLU ratio ≥ 0.1 を陽性とした場合、*M. avium* ATCC 700898についてはINHで1回2管低くかったものの、他剤についてはすべて ± 1 管以内で一致率は97.8%であった。また*M. intracellulare* ATCC 13950についても全薬剤 ± 1 管以内の良好な一致率を示した。*M. avium* ATCC 25291についてはATP法での値がRFP, CAMで2管以上の低い値を示したが、他7薬剤については ± 1 管以内であった。*M. kansasii* ATCC 12478についてはKM, AMKとEBで低い値を示す傾向にあり84.4%の一致率であった。RLU ratio ≥ 0.03 とした場合は、*M. avium* ATCC 700898についてはEBとLVFXで高い値を示し88.9%の一致率であった。*M. avium* ATCC 25291については、RLU ratio ≥ 0.1 で低い値であったRFP, CAMが高い一致率を示した。しかしKMとAMKが

Table 1. Effect of treatment time on the exogenous ATP.

Strain	Dilution of organisms suspension	Treatment time (min)				
		0	30	60	90	120
<i>M. avium</i> ATCC 25291	blank	95	48	41	49	76
	1/100	265	329	302	292	345
	1/ 10	2636	3981	4129	3779	4412
	1/ 2	13052	26015	25566	26225	30611
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	blank	165	51	54	46	114
	1/100	329	506	499	476	461
	1/ 10	1774	3987	4462	4133	4313
	1/ 2	15867	40746	44716	54015	57430
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	blank	155	50	43	41	117
	1/100	306	414	506	399	377
	1/ 10	1284	3176	2720	3219	3382
	1/ 2	18574	22077	24503	24090	23905
BrothMIC NTM	blank	72074	384	NT	NT	NT

NT: not tested

Table 2. Effect of the temperature and incubation time on the extraction of ATP from nontuberculous mycobacteria.

Strain	Temperature	Extraction time (min)				
		0	5	10	15	20
<i>M. avium</i> ATCC 25291	room temperature	5643	7909	8949	9178	9483
	60°C	5643	26090	26223	23592	30892
	70°C	5643	24440	23807	28471	25906
	80°C	5643	26967	26795	25016	24740
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	room temperature	972	7359	7467	7323	7773
	60°C	972	15368	17435	16998	17525
	70°C	972	16982	18784	17432	18888
	80°C	972	18823	18386	17160	18246
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	room temperature	661	1125	1321	1245	1211
	60°C	661	8756	8608	8730	9305
	70°C	661	6249	7178	5938	6579
	80°C	661	5945	5945	5441	5472

2 管以上の高値を示すことから一致率は低かった。*M. kansasii* ATCC 12478 については RLU ratio ≥ 0.03 とした方が RLU ratio ≥ 0.1 としたよりも一致率は高く、KM を除いた 8 薬剤で ± 1 管以内であった。*M. intracellulare* ATCC 13950 については LVFX で 1 回 2 管以上を示すものの、RLU ratio をどちらで判定しても高い一致率を示した。

標準株 4 株を薬剤別に RLU ratio ≥ 0.1 での一致率を見てみると、SM, TH と LVFX は 100%, EB と INH は 95% で良好な一致率であった。AMK と KM は 85% とやや低い傾向にあり、CAM と RFP については 75% の低い一致率であった。RLU ratio を ≥ 0.03 で見てみると、CAM, TH は 100%, SM, INH と RFP は 95% と良好な一致率であった。LVFX は 90%, EB は 85% とやや低い傾向にあり、AMK は 80%, KM は 70% と低い一致率であった。薬剤別で見ると CAM と RFP の RLU ratio を ≥ 0.03 とすることにより一致率が上昇したが、EB, KM と AMK は減少する傾向にあった。

Table 4 に、MB 法で 5 回反復測定したときの MIC 分布と ATP 法で SM, EB, KM, INH, LVFX, TH, AMK の 7 薬剤については RLU ratio ≥ 0.1 で判定し、菌株によって不一致例の多く見られた RFP, CAM の 2 薬剤については、判定を RLU ratio ≥ 0.03 で行ったときの一致率を示した。*M. avium* ATCC 700898 については、ATP 法での結果が INH で 1 回 $8 \mu\text{g/ml}$ を示し、MB 法での測定値に比し低かったものの、他 8 薬剤は ± 1 管以内であった。*M. avium* ATCC 25291 については、ATP 法で RFP が低い傾向にあるものの、

他 8 薬剤は ± 1 管以内であった。*M. kansasii* ATCC 12478 については、ATP 法で KM, AMK と EB が MB 法に比し低い値を示し、一致率は 84.4% と低く、全薬剤を RLU ratio ≥ 0.03 で判定したときの 97.8% より低い一致率であった。*M. intracellulare* ATCC 13950 では、すべての薬剤で ATP 法と MB 法は ± 1 管以内で良好な一致率を示した。標準株 4 株では 95% の一致率であった。

2. 臨床分離株での MIC 法と ATP 法の一致率と MIC 分布

Table 5 に、臨床分離株での MB 法と ATP 法の検討の結果を示した。RLU ratio ≥ 0.1 を陽性とした場合に *M. avium* は 93.9% と高い一致率を示した。薬剤別では、RFP と CAM が標準株と同様に低い値を示す傾向にあり、INH も 2 管以上低い値を示す株が 4 株見られた。RLU ratio ≥ 0.03 で判定を行ったときの一致率は、MB 法に比し高い値を示す傾向にあり 78.3% と低いが、RFP と CAM については ± 1 管以内と一致率は上昇した。*M. kansasii* については、RLU ratio ≥ 0.1 では全薬剤が ± 1 管差以内であり、RLU ratio ≥ 0.03 で判定しても 1 管高く出る傾向にあるものの良好な一致率を示した。*M. intracellulare* は 90.6% とやや低い一致率であり、SM, KM, INH, RFP と CAM で MB 法に比し低い値を示した。しかし RLU ratio ≥ 0.03 で判定すると高く出る傾向にあり、特に EB については RLU ratio ≥ 0.1 判定で 1 管差に入っていたが、RLU ratio ≥ 0.03 では 3 管差を示すものが 20 株中 11 株で見られた。しかし CAM についてはすべて ± 1 管差以内の値を示し、RFP について

Table 3. Concordance rate of the ATP method when the Microdilution (MB) method for reference strains is set as a basis.

Strain	RLU ratio	Drug	Discrepancy of MICs						Concordance rate (%)		
			≤ -3	-2	-1	0	+1	+2		≥ +3	
<i>M. avium</i> ATCC 700898	0.1	Streptomycin				5				97.8	
		Ethambutol					5				
		Kanamycin				4	1				
		Isoniazid		1	3	1					
		Rifampicin			1	3	1				
		Levofloxacin					5				
		Clarithromycin				2	3				
		Ethionamide				4	1				
		Amikacin				3	2				
	0.03	Streptomycin					5			88.9	
		Ethambutol					2		2		1
		Kanamycin					5				
		Isoniazid		1	1	2	1				
		Rifampicin			1	2	2				
		Levofloxacin				3	1	1			
		Clarithromycin			1	4					
		Ethionamide				4	1				
		Amikacin				4	1				
<i>M. avium</i> ATCC 25291	0.1	Streptomycin				1	4			77.8	
		Ethambutol				1	1	3			
		Kanamycin				1	3	1			
		Isoniazid				1	4				
		Rifampicin		5							
		Levofloxacin				3	2				
		Clarithromycin		3	2						
		Ethionamide				4	1				
		Amikacin				1	1	3			
	0.03	Streptomycin					1	3	1	75.6	
		Ethambutol					1	4			
		Kanamycin							1		4
		Isoniazid					5				
		Rifampicin		1	3	1					
		Levofloxacin				3	1	1			
		Clarithromycin				2	3				
		Ethionamide				4	1				
		Amikacin					1	3	1		
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	0.1	Streptomycin					5			84.4	
		Ethambutol		1			4				
		Kanamycin		3	1	1					
		Isoniazid				1	4				
		Rifampicin				3	2				
		Levofloxacin				1	4				
		Clarithromycin				4	1				
		Ethionamide				1	4				
		Amikacin		3	2						
	0.03	Streptomycin					5			97.8	
		Ethambutol				1	3	1			
		Kanamycin				2	1	1	1		
		Isoniazid				1	4				
		Rifampicin					5				
		Levofloxacin					5				
		Clarithromycin				1	4				
		Ethionamide					5				
		Amikacin				1	4				

Table 3. continued

Strain	RLU ratio	Drug	Discrepancy of MICs						Concordance rate (%)
			≤ -3	-2	-1	0	+1	+2	
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	0.1	Streptomycin			1	4			100
		Ethambutol			2	3			
		Kanamycin			1	4			
		Isoniazid			4	1			
		Rifampicin				5			
		Levofloxacin				5			
		Clarithromycin			2	3			
		Ethionamide			1	4			
	Amikacin				5				
	0.03	Streptomycin			1	4			97.8
		Ethambutol				5			
		Kanamycin				1	4		
		Isoniazid			2	3			
		Rifampicin				5			
Levofloxacin					4	1			
Clarithromycin					5				
Ethionamide				1	4				
Amikacin				5					

も1株を除いて±1管差以内の値を示した。

臨床分離株45株を薬剤別での一致率を、RLU ratio \geq 0.1で見るとEMとAMKは100%、THとLVFXは97.8%の良好な一致率を示した。SM、CAMとKMは91.1%、RFPは86.7%、INHは82.2%とやや低い一致率であった、RLU ratioを \geq 0.03で見ると、CAMは100%、RFPは97.8%、SMは95.5%、AMKも93.3%と良好な一致率を示し、LVFXとTHは84.4%、KMは82.2%、INHは80%とやや低い傾向にあり、EBは44.4%と低い一致率であった。薬剤別に見てもCAMとRFPはRLU ratioを \geq 0.03で判定することにより一致率が上昇することが示された。

Table 6には、今回検討を行った臨床分離株のMB法と、ATP法でのMIC分布を示した。ATP法での判定はSM、EB、KM、INH、LVFX、TH、AMKの7薬剤についてはRLU ratio \geq 0.1を陽性とし、RFP、CAMはRLU ratio \geq 0.03を陽性としたときの一致率を示した。*M. avium*については、INHとTHではMB法に比しATP法は低い傾向にはあるが97.2%と良好な一致率を示した。*M. kansasii*はすべての薬剤が±1管差以内であり良好な一致率を示した。また*M. kansasii*のMIC分布についてはRFP、CAMで、全株0.25 μ g/ml以下、LVFXに0.25 μ g/ml以下であったがKMには8 μ g/ml以上のMICを示した。*M. intracellulare*についてはATP法でSM、KMおよびINHが低い傾向があり、一致率は92.2%とやや低い傾向にあった。臨床分離株で検討を行った45株でのATP

法とMB法との一致率は95.3%と良好であった。標準株での*M. kansasii* ATCC 12478でやや一致率は低いものの、その他の標準株および臨床分離株の結果から、ATP法での5日間培養での判定基準はSM、EB、KM、INH、LVFX、TH、AMKの7薬剤についてはRLU ratio \geq 0.1を陽性とし、RFP、CAMはRLU ratio \geq 0.03を陽性と判定することが適当であると思われる。

Tables 7~8には、今回検討を行った臨床分離株のうち、*M. avium*と*M. intracellulare*のMB法とATP法でのMIC分布を示した。*M. avium*については低いMICを示したのはRFP、CAMで、全株2 μ g/ml以下であり比較的感性であることが認められた。次いでLVFXが低く全株4 μ g/ml以下であった。*M. intracellulare*についてはRFP、CAMのMICは低く、全株0.25 μ g/ml以下で高い感性傾向が認められた。次いでLVFXが全株2 μ g/ml以下の比較的低いMICであった。

考 察

抗酸菌の薬剤感受性試験法については1997年に結核菌の試験法が日本結核病学会に承認されている。ここで提案された試験法は小川培地を用いる比率法であり、結果は培養4週以内で対照培地上の菌の発育が十分になった時点で判定することになっており、時間を要する点は改善されておらず、しかも結核菌に限定されたものであった。そこでより迅速で正確な薬剤感受性試験法として液体培地を用いた、MGIT法⁷⁾(ベク

Table 4. Concordance rate of the ATP method when the Microdilution (MB) method for reference strains is set as a basis.

Strain	Drug	RLU ratio	MIC range of MB method ($\mu\text{g/ml}$)	Discrepancy of MICs						Concordance rate (%)
				≤ -3	-2	-1	0	1	2	
<i>M. avium</i> ATCC 700898	Streptomycin	0.1	2-4				5			
	Ethambutol	0.1	4-8					5		
	Kanamycin	0.1	2				4	1		
	Isoniazid	0.1	32->32		1	3	1			
	Rifampicin	0.03	0.06-0.125				1	2	2	97.8
	Levofloxacin	0.1	0.5						5	
	Clarithromycin	0.03	0.25				1	4		
	Ethionamide	0.1	2-8				4	1		
	Amikacin	0.1	1-2				3	2		
<i>M. avium</i> ATCC 25291	Streptomycin	0.1	8				1	4		
	Ethambutol	0.1	4-8				1	1	3	
	Kanamycin	0.1	8				1	3	1	
	Isoniazid	0.1	>32				1	4		
	Rifampicin	0.03	2		1	3	1			97.8
	Levofloxacin	0.1	2-4				3	2		
	Clarithromycin	0.03	0.5				2	3		
	Ethionamide	0.1	4-8				4	1		
	Amikacin	0.1	4-8				1	1	3	
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	Streptomycin	0.1	>128					5		
	Ethambutol	0.1	4-8		1			4		
	Kanamycin	0.1	4-8		3	1	1			
	Isoniazid	0.1	4-8			1	4			
	Rifampicin	0.03	0.25					5		84.4
	Levofloxacin	0.1	0.25				1	4		
	Clarithromycin	0.03	0.125				1	4		
	Ethionamide	0.1	1				1	4		
	Amikacin	0.1	2-4		3	2				
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	Streptomycin	0.1	0.25				1	4		
	Ethambutol	0.1	1				2	3		
	Kanamycin	0.1	0.25-0.5				1	4		
	Isoniazid	0.1	4-8				4	1		
	Rifampicin	0.03	≤ 0.03					5		100
	Levofloxacin	0.1	0.25					5		
	Clarithromycin	0.03	$\leq 0.03-0.06$					5		
	Ethionamide	0.1	16->16				1	4		
	Amikacin	0.1	≤ 0.5					5		

トン・ディッキンソン) やプロスミック MTB-1 法⁸⁾ (極東製薬工業) あるいは生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法であるルシミック MTB-SR (極東製薬工業) が開発されている。しかし NTM においてはようやく微量液体希釈法であるプロスミック NTM (極東製薬工業) が実用化に至っているが、試験条件や判定基準が確立されていないのが現状である。そこで我々は NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) の承認している薬剤

感受性試験である微量液体希釈法⁹⁾に基づいた方法であるプロスミック NTM を用いた MB 法と、同じ試験薬剤の濃度となるようにプレートを作成し培養後に菌体内の ATP 量を測定し、この値から MIC 値を求めた ATP 法との評価を試みた。

NTM の薬剤感受性試験を行うにあたり、測定精度を上げるための問題となるのは菌液調製方法であると思われる。供試するときは対数増殖期の菌液を用いることが原則であり、保存状態あるいは菌液調製方法に

Table 5. Concordance rate of the ATP method when the Microdilution (MB) method for clinical isolates of *M. avium*, *M. kansasii* and *M. intracellulare* is set as a basis.

Strain	RLU ratio	Drug	Discrepancy of MICs							Concordance rate (%)	
			≤ -3	-2	-1	0	+1	+2	≥ +3		
<i>M. avium</i> (N=20)	0.1	Streptomycin				8	11	1			93.9
		Ethambutol				1	17	2			
		Kanamycin				5	15				
		Isoniazid			4	10	6				
		Rifampicin	1		3	9	7				
		Levofloxacin				4	10				
		Clarithromycin	1		1	8	10				
		Ethionamide			1	9	8	2			
		Amikacin				2	16	2			
	0.03	Streptomycin				2	9	7	2		78.3
		Ethambutol					4	2	1	13	
		Kanamycin					6	9	4	1	
		Isoniazid			1	1	5	8		5	
		Rifampicin				6	14				
		Levofloxacin					11	6	3		
		Clarithromycin				3	11	6			
		Ethionamide					7	7	3	3	
		Amikacin					7	10	2	1	
<i>M. kansasii</i> (N=5)	0.1	Streptomycin				2	3			100	
		Ethambutol					5				
		Kanamycin					5				
		Isoniazid				2	3				
		Rifampicin				1	4				
		Levofloxacin				3	2				
		Clarithromycin				1	4				
		Ethionamide				3	2				
		Amikacin				1	3	1			
	0.03	Streptomycin				1	3	1		97.8	
		Ethambutol					5				
		Kanamycin					1	3	1		
		Isoniazid					4	1			
		Rifampicin				1	4				
		Levofloxacin					4	1			
		Clarithromycin					3	2			
		Ethionamide				3	2				
		Amikacin					2	3			
<i>M. intracellulare</i> (N=20)	0.1	Streptomycin			4	5	11			90.6	
		Ethambutol				1	19				
		Kanamycin			4	7	9				
		Isoniazid	1		3	11	5				
		Rifampicin			2	3	15				
		Levofloxacin				7	12		1		
		Clarithromycin	1		1	10	8				
		Ethionamide				3	17				
		Amikacin				5	15				
	0.03	Streptomycin				5	12	3		87.8	
		Ethambutol					3	6	11		
		Kanamycin			1	3	13	2	1		
		Isoniazid	1		1	3	12	2	1		
		Rifampicin			1	1	15	3			
		Levofloxacin				4	4	8	3		1
		Clarithromycin				7	10	3			
		Ethionamide					14	5	1		
		Amikacin				1	15	4			

Table 6. Concordance rate of the ATP method when the Microdilution (MB) method for clinical isolates of *M. avium*, *M. kansasii* and *M. intracellulare* is set as a basis.

Strain	Drug	RLU ratio	MIC range of MB method ($\mu\text{g/ml}$)	Discrepancy of MICs						Concordance rate (%)
				≤ -3	-2	-1	0	1	2	
<i>M. avium</i> (N=20)	Streptomycin	0.1	1-32				8	11	1	97.2
	Ethambutol	0.1	4->128				1	17	2	
	Kanamycin	0.1	2-32				5	15		
	Isoniazid	0.1	4->32		4	10	6			
	Rifampicin	0.03	0.125-0.2				6	14		
	Levofloxacin	0.1	0.5-4				4	16		
	Clarithromycin	0.03	0.125-2				3	11	6	
	Ethionamide	0.1	4->16		1	9	8	2		
Amikacin	0.1	1-16				2	16	2		
<i>M. kansasii</i> (N=5)	Streptomycin	0.1	4-8				2	3		100
	Ethambutol	0.1	2-4					5		
	Kanamycin	0.1	8-32					5		
	Isoniazid	0.1	2-4				2	3		
	Rifampicin	0.03	0.125-0.25				1	4		
	Levofloxacin	0.1	0.25-0.5				3	2		
	Clarithromycin	0.03	0.125					3	2	
	Ethionamide	0.1	1-2				3	2		
Amikacin	0.1	2-8				1	3	1		
<i>M. intracellulare</i> (N=20)	Streptomycin	0.1	0.5-4		4	5	11			92.2
	Ethambutol	0.1	2-32			1	19			
	Kanamycin	0.1	0.5-4		4	7	9			
	Isoniazid	0.1	2->32	1	3	11	5			
	Rifampicin	0.03	$\leq 0.03-0.25$		1	1	15	3		
	Levofloxacin	0.1	0.5-1			7	12		1	
	Clarithromycin	0.03	0.06-0.25			7	10	3		
	Ethionamide	0.1	4->16			3	17			
Amikacin	0.1	$\leq 0.5-4$			5	15				

よって試験成績が変動することはよく知られている。しかも NTM に対する薬剤は殺菌的な薬剤が少なく静菌的な薬剤が多く、菌の生理活性状態によって抗菌薬の抗菌活性に違いがでるものと思われる。このため今回の検討時には、前培養時に菌を少量接種し、McFarland No. 0.5 以上に培養し対数増殖期の細胞の多い菌液を、薬剤感受性試験に用いた。

ATP 法の培養時間について今回の検討では 5 日間としたが、標準株を用いた 3 日間培養での ATP 法による薬剤感受性試験では、コントロールウエルの平均 RLU 値が 10,000 に達せず、低値を示す場合が多く見られた。その結果としてデータは示してはいないが RLU ratio にばらつきが見られ、3 日間培養では MB 法との一致率は 60~91.1% と低い結果となった。ATP 法を用いて 3 日間培養で薬剤感受性試験を行う場合には、さらなる培地の改良、培養条件、判定値 RLU ratio を含めて検討を行うことが必要であると

思われた。

山崎ら^{4)~6)}は ATP 法で結核菌の薬剤感受性試験を検討しているが、判定は RLU ratio を 0.5 で行っている。我々の今回検討を行った NTM は、結核菌に比して増殖が速く、またそれに伴って ATP 量も多いことから、増殖した点をとらえるということで RLU ratio は ≥ 0.1 で判定を行った。この判定基準で標準株での検討を行ったところ *M. avium* ATCC 700898 と *M. intracellulare* ATCC 13950 は良好な一致率を示したが、*M. avium* ATCC 25291 は低い一致率であった。この株を薬剤別で MB 法と比較すると RFP, CAM が 2 管以上の低い値であった。そこで RLU ratio を変えて MB 法との一致率を見たところ、RLU ratio ≥ 0.03 で MB 法と良好な一致率を示すことが確認された。この傾向は *M. avium* と *M. intracellulare* の臨床分離株でも見られることから、検討した全株を RLU ratio ≥ 0.1 と RLU ratio ≥ 0.03 の 2 ポイントで判定を行うこ

Table 7. Distributions of MICs of nine antibiotics obtained by Microdilution (MB) and ATP method against clinical isolates of *M. avium* (N=20).

Drug	Method	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)												
		≤ 0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Streptomycin	MB method					1		6	7	3	3			
	ATP method					1	3	6	4	4	2			
Ethambutol	MB method							3	2	7	5		1	2
	ATP method							3	2	7	4	1	1	2
Kanamycin	MB method							2	3	6	7	2		
	ATP method							2	1	5	7	5		
		≤ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32	
Isoniazid	MB method								1	8	4	6	1	
	ATP method							1	7	5	5	2		
Rifampicin	MB method			8	2	1	5	4						
	ATP method		3	5	2	4	2	4						
Levofloxacin	MB method					4	6	6	4					
	ATP method					5	6	7	2					
Clarithromycin	MB method			2	1	8	5	4						
	ATP method			2	2	3	9	4						
		≤ 0.5	1	2	4	8	16	>16						
Ethionamide	MB method				7	6	6	1						
	ATP method			5	5	5	3	2						
Amikacin	MB method		1	1	3	9	6							
	ATP method		1	1	5	6	6	1						

ととした。RLU ratio をどの点でとらえるかについては、供試する菌株の菌発育速度の違いによって大きな影響を受けるものと思われる。今回の検討においても *M. kansasii* ATCC 12478 は発育速度が遅いことから、RLU ratio ≥ 0.03 とした方が RLU ratio ≥ 0.1 としたよりも一致率が高くなったものと思われる。また薬剤によって RLU ratio を低くすることによって一致率が上昇した例については、佐野ら¹⁰⁾の *M. avium* に対する抗菌剤の作用発現パターンの比較検討した報告に見られるように、薬剤あるいは薬剤の濃度によって増殖曲線に違いが見られ、RFP および CAM に対して *M. avium* は MIC 値付近での増殖阻害作用が認められ、再増殖が緩徐であったことから ATP 量の上昇が少なく、RLU ratio 値を低くすることによって MB 法との一致率が上昇したものと推察される。

NTM の薬剤感受性検査において、しばしば “trailing” 現象が見られ、MIC 判定時に困惑することがある。我々は MB 法での判定を行うときには、明確な菌発育を抑制した点を MIC 値とし、微小なピンポイント

発育があっても判定しないこととした。“trailing” 現象は、山根ら¹¹⁾も述べているように、NTM では MBC (minimum bactericidal concentration) と MIC の比がほとんどの薬剤で極めて高いことによるとされている。今回の検討で RLU ratio を ≥ 0.03 で判定した場合に、薬剤によっては MB 法に比し高い値を示すものもあり、明確な発育抑制されていてもわずかな生菌数の上昇があるものと推察される。また佐藤らの報告¹²⁾に見られるように MAC には同一菌株由来の集落形態の異なる 3 種の集落変異株が分離され、そのピレンスおよび感受性パターンがそれぞれ異なることが知られている。臨床材料から小川培地で初代培養した MAC 菌株での直接薬剤感受性検査を行う場合には、3 種の集落変異株が混在することも考えられることから “trailing” 現象の一因になるものと思われる。我々は今回の検討時に臨床分離株については Middlebrook 7H10 寒天培地に画線塗抹し、分離培養を行った後に実験に供した。供試菌株の集落形態を知って薬剤感受性試験をすることにより感受性検査成績の精度

Table 8. Distributions of MICs of nine antibiotics obtained by Microdilution (MB) and ATP method against clinical isolates of *M. intracellulare* (N=20).

Drug	Method	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)												
		≤ 0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Streptomycin	MB method				3	8	7	2						
	ATP method			3	4	8	5							
Ethambutol	MB method						9	5	5		1			
	ATP method					1	8	5	5		1			
Kanamycin	MB method				1	2	10	7						
	ATP method				2	4	9	5						
		≤ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32	
Isoniazid	MB method								4	4	5	3	3	1
	ATP method						3	7	7		2	1	1	
Rifampicin	MB method	10		7	3									
	ATP method	10	2	3	5									
Levofloxacin	MB method					6	14							
	ATP method				1	19	8	1						
Clarithromycin	MB method		4	10	6									
	ATP method		5	12	3									
		≤ 0.5	1	2	4	8	16	>16						
Ethionamide	MB method				6	3	7	4						
	ATP method			2	4	4	6	4						
Amikacin	MB method	2	7	8	3									
	ATP method	5	4	10	1									

を上げることも重要となってくる。

NCCLS の精度管理用 ATCC 標準株である *M. avium* ATCC 700898 の CAM に対する判定基準は、培地 pH 7.3~7.4 で 0.5~2 $\mu\text{g/ml}$ とされているが、今回の検討では MB 法で 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 、ATP 法で 0.125~0.25 $\mu\text{g/ml}$ と両方法で低い値を示した。そこで NCCLS の標準法である微量液体希釈法で薬剤含有プレート (pH 7.3 to 7.4) を試験時に調製し、検討を行ったが MIC 値は 0.125~0.25 $\mu\text{g/ml}$ を示し、今回検討を行った MB 法、ATP 法と変わらない値を示した。これが用いた株の影響なのか、あるいはその他の試験方法の影響なのかを現在検討中である。しかし、その他の ATCC 標準株 3 株については、山根らの報告¹¹⁾に見られる 7 施設による BrothMIC NTM の評価された MIC 分布と、我々の今回の検討結果とよく一致していた。

臨床分離株の抗菌活性を試験したが、*M. kansasii* の RFP に対する NCCLS の耐性判定ブレイクポイントが 1 $\mu\text{g/ml}$ であり、今回の検討した株では 0.125~

0.25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示し感性にあることが確認された。また佐藤ら¹²⁾が *M. intracellulare* は *M. avium* に比して RFP, SM そして KM に対する感受性が高いこと、一方、キノロン薬に対しては *M. avium* の方が *M. intracellulare* に比し感受性が高いと報告している。我々の今回の結果でも RFP, SM そして KM において、*M. intracellulare* は *M. avium* に比して低い値を示し感性傾向にあった。しかし、キノロン薬については 2 菌種共にほぼ同等の MIC 分布を示し *M. avium* の方の感受性が高いことは認められなかった。また、MAC に対する感性・耐性の判定ブレイクポイントが Heifets¹³⁾ によって提案されているが、これによって判定すると *M. intracellulare* は RFP と CAM に全株感性であった。*M. avium* は CAM には全株感性であったが、RFP はやや低い感性率 (MB 法; 55%, ATP 法; 70%) であった。その他の薬剤では MAC 症に併用薬剤として使用される SM, EB, AMK については (MB 法; 22.5~47.5%, ATP 法; 22.5~60%) の感性率であった。

NTM に対して殺菌的な抗菌薬が少ない現状では、NTM に対して新しく開発され有望視されている新 rifamycin 誘導体、caprazamycin-B、ketolides 剤などの薬剤感受性試験およびチェッカーボード法などでの併用薬剤での評価も必要となるものと思われ、今後ますます臨床に反映される薬剤感受性試験が望まれる。ATP 法は標準株・臨床分離株で検討した従来法の MB 法ともよく関連し、しかも迅速化可能であることから、NTM の薬剤感受性試験法として有用であると評価された。また、菌発育終末点の判読が難しい NTM の薬剤感受性試験に、ATP 法を用いることにより、数値化された客観的な判定を行うことが可能であり、判定者の経験に影響されない方法として有用である。

文 献

- 1) 日本結核病学会非定型抗酸菌対策委員会. 2003. 肺非結核性抗酸菌症診断に関する見解—2003年. 結核 78: 569-572.
- 2) 吉田正樹, 他. 1997. 菌体内 ATP 測定による抗菌薬感受性検査 (第二報). 日化療会誌 (第 45 回日本化学療法学会抄録集): 146.
- 3) 井田博久, 他. 1997. ATP 法の迅速薬感受性試験への応用 (その 3) 臨床分離株を用いた実用性の評価. 日化療会誌 (第 45 回日本化学療法学会抄録集): 147.
- 4) 山崎利雄, 佐藤直樹, 岡沢 豊, 他. 1998. 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法—*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv を用いた基礎的検討. 臨床病理 46: 834-840.
- 5) 山崎利雄, 佐藤直樹, 山下研也, 他. 1999. 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法 (第 II 報): 薬剤濃度の検討および現行法との比較. 臨床病理 47: 170-175.
- 6) 山崎利雄, 佐藤直樹, 山下研也, 他. 2000. 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法 (第 III 報)—filamentous cell treatment による ATP 法の改良. 臨床病理 48: 167-173.
- 7) Palaci M, et al. 1996. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. J. Clin. Microbiol. 34: 762-764.
- 8) 山根誠久, 中曾根 勇, 斉藤 宏, 他. 1998. 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 46: 719-727.
- 9) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard M24-A, NCCLS, Wayne, USA.
- 10) 佐野啓介, 佐藤勝昌, 富岡治明. 2001. Rifalazil, clarithromycin および levofloxacin の 7HSF 液体培地中の結核菌および *Mycobacterium avium* に対する抗菌作用発現パターン. 日化療会誌 49: 649-652.
- 11) 山根誠久, 翁長小百合, 斉藤 正, 他. 2002. Middlebrook 合成培地での抗酸菌薬剤感受性試験 (第 4 報): Nontuberculous Mycobacteria を試験対象とする微量液体希釈法, BrothMIC NTM の開発評価. 臨床病理 50: 381-391.
- 12) 佐藤勝昌, 富岡治明, 佐野千晶, 他. 2002. *Mycobacterium intracellulare* の異なる集落変異株の各種抗菌剤に対する感受性について. 日化療会誌 50: 232-235.
- 13) Heifets. 1996. Susceptibility Testing of *Mycobacterium avium* Complex Isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1759-1767.

Evaluation of Microdilution Susceptibility Test for Nontuberculous Mycobacteria Using the ATP Method

Masayuki Horikawa¹⁾, Isao Nishi¹⁾, Masahiro Toyokawa¹⁾, Naoki Sato²⁾,
Yutaka Okazawa²⁾, Seishi Asari¹⁾

¹⁾ Clinical Laboratory, Osaka University Hospital

²⁾ Kyokuto Pharmaceutical Industrial CO., LTD.

We have developed a broth microdilution susceptibility test method for nontuberculous mycobacteria (NTM); in this test method, adenosine triphosphate (ATP) is measured through bioluminescence, with viable count as the indicator. We have conducted the basic analysis of the method and compared the method with the broth microdilution method (MB method) using four ATCC reference strains and 45 clinical isolates. As a result of the examination of the ATP-measuring method (ATP method), it has been shown that 30-minute pre-processing at room temperature and extraction at 60°C for 10 minutes were appropriate steps. For the ATP method, judgment was made by measuring the relative light unit (RLU) ratio after culturing the microplate for 5 days, and comparison was made with the MIC value after culturing for 7 days. When the positive values for growth were set to an RLU ratio of ≥ 0.1 for 7 drugs, that is, streptomycin, ethambutol, kanamycin, isoniazid, levofloxacin, ethionamide and amikacin, and to an RLU ratio of ≥ 0.03 for rifampicin and clarithromycin, the rate of concordance with the MB method was rather lower (84.4%) for *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478, whereas 97.8–100% concordance rates were obtained for 3 ATCC reference strains. Regarding clinical isolates, the concordance rates obtained for *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium avium*, and *M. kansasii* were 92.2%, 97.2% and 100%, respectively. From the above results, we have concluded that the ATP method is useful as a method of testing drug susceptibility of NTM.