

[原 著]

ブロスミック NTM で測定した *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* Complex に対する最小発育阻止濃度の再現性後藤美紀¹⁾・市川真由美¹⁾・渡邊真博¹⁾・渋谷俊介¹⁾・人見重美²⁾¹⁾ 筑波大学附属病院検査部²⁾ 筑波大学臨床医学系

(平成 17 年 8 月 29 日受付, 平成 18 年 2 月 9 日受理)

Mycobacterium avium と *Mycobacterium intracellulare* 臨床分離株それぞれ 6 株に対する各種薬剤の MIC を, ブロスミック NTM で測定し, その再現性と, 判定者の経験および判定方法のガイダンスの有無が MIC 値の再現性に及ぼす影響を検討した。1 株当たり 3 枚のプレートに接種し, ブロスミック NTM での判定経験がある者 (有経験者) とない者 (未経験者) それぞれ 5 名が, 判定方法のガイダンスの前後に MIC 値を判定した。有経験者がガイダンス後に判定した MIC 値を集計したところ, *M. avium* の 1 株がカナマイシンで, *M. intracellulare* の 1 株がイソニアジドで, MIC 値に 2 管差を超える差が生じた。ガイダンス前に判定した MIC 値の再現性が, 未経験者群より有経験者群の方で良好だったのは, *M. avium* ではストレプトマイシン・エタンブトール・カナマイシン・リファンピシン・レボフロキサシン・クラリスロマイシン・エチオナミドで, *M. intracellulare* ではストレプトマイシン・エタンブトール・カナマイシン・アミカシンだった。未経験者群でガイダンス後に再現性が向上したのは, *M. avium* でエタンブトールだけであり, 他の菌種と薬剤の組み合わせでは, 有意差がないか逆に悪くなった。ブロスミック NTM の使用に当たっては, MIC 値を目視で再現よく判定するためのガイダンスを, 事前に十分行うことが必要である。

Key words: ブロスミック NTM, MAC, MIC

序 文

Mycobacterium avium-*Mycobacterium intracellulare* complex (MAC) は, 非結核性抗酸菌のうち日本で最も分離頻度が高い菌である¹⁾。後天性免疫不全症候群 (AIDS) の流行前は, 主に呼吸器感染症やリンパ節炎の起原菌だったが, 最近では, AIDS に合併する全身播種性感染症が世界的に問題になっている²⁾。

もともと MAC 感染症の治療には, 結核の標準的治療法に準じて選ばれた薬剤を使用していた³⁾。現在は, ニューマクロライド系薬剤のクラリスロマイシン (CAM) あるいはアジスロマイシン (AZM) が有効なこ

とがわかっている。しかし, MAC 感染症をニューマクロライド系薬剤単剤で治療すると, 耐性菌が生じるため, エタンブトール (EB) やリファマイシン系薬剤などを併用するのが一般的である²⁻⁴⁾。これらのことから, MAC 感染症の治療に当たって, ニューマクロライド系薬剤が有効かどうか, また併用薬に何をを用いるべきか, 事前に *in vitro* で判定できることが望ましい。このため, MAC に対するさまざまな薬剤感受性試験法が検討されてきた⁵⁻¹⁰⁾。しかし, 測定方法が標準化できた薬剤は, 現在のところ CAM と AZM のみである¹¹⁾。

ブロスミック NTM (極東製薬工業, 東京) は, MAC を含む非結核性抗酸菌に対する各種薬剤の MIC を, 微量液体希釈法で測定できるようにしたマイクロプレートである¹²⁾。このプレートの各ウェルに所定の蒸留水を添加すると, Middlebrook 7H9 培地を溶媒とした 9 種類の薬剤の 2 倍希釈系列 (ストレプトマイシン [SM], EB, カナマイシン [KM]: 0.06~128 $\mu\text{g/L}$;

著者連絡先: (〒305-8576) 茨城県つくば市天久保 2-1-1
筑波大学附属病院検査部
後藤美紀
TEL: 029-853-3684
FAX: 029-853-3720
E-mail: tmgoto-tuk@umin.net

イソニアジド [INH], リファンピシム [RFP], レボフロキサシム [LVFX], CAM: 0.03~32 µg/L; エチオナミド [ETH], アミカシム [AMK]: 0.5~16 µg/L; 最終 pH = 6.6 [CAMのみ 7.4]) を作成することができる。このプレートで MAC の American Type Culture Collection (ATCC) 標準株に対する MIC 値を測定し、そのときの再現性について検討した報告がある¹²⁾。しかしこの報告では、臨床分離株を用いた再現性の検討を行っていない。そこで今回私たちは、プロスミック NTM で MAC 臨床分離株に対する MIC 値を測定し、その再現性について検討した。同時に、MIC 値の判定に当たり、判定の経験および判定方法のガイダンスの有無によって、MIC 値の再現性がどう異なるかを検討した。

材料と方法

被験株

M. avium および *M. intracellulare* 臨床分離株それぞれ 6 株ずつを被験株とした。これらの株は、2003 年 11 月から 2004 年 11 月に、異なる患者の喀痰 (*M. avium* 1 株のみ深部膿) から分離したものである。菌種の同定には、コバサンプリコアマイコバクテリウム (ロシュ・ダイアグノスティクス、東京) を使用した。

MIC 値の測定と判定

プロスミック NTM の添付書に従って、次のように行った。それぞれの被験株を 1% 小川培地 (極東製薬工業) で 30 日間培養した後、滅菌綿棒でガラスビーズ入り Middlebrook 7H9 液体培地 (マイコビーズ: 極東製薬工業) に接種し、およそ McFarland No. 0.5 の濁度に相当する菌浮遊液を作製した。この菌浮遊液を 35°C で 3 日間培養した後、注射用蒸留水で OD_{530 nm} = 0.08~0.10 に調整し、さらに注射用蒸留水で 100 倍に希釈した後、マイクロプレートの各ウェルに 0.1 ml ずつ接種した。その後、各プレート上面にシールを貼って密閉し、35°C で 7 日間培養した後、MIC 値を目視判定した。今回の実験では、1 株当たり、3 本の菌浮遊液を作製し、3 枚のプレートを作成した。

MIC 値の判定は、それぞれ 5 名ずつ 2 群の判定者群 (細菌検査の経験があり、かつプロスミック NTM を扱ったことがあるもの [有経験者群]、および細菌検査の経験はあるが、プロスミック NTM を扱った経験がないもの [未経験者群]) が行った。各判定者は、まずプロスミック NTM の添付書を各自で読んだ後、MIC 値を判定 (ガイダンス前判定) した。その後、熟

達者より、実際に菌を培養させたプレートを使って MIC 値の判定基準 (沈殿の色、厚み、直径など) の説明を受け、再度判定し直した (ガイダンス後判定)。熟達者とは、ウェル内の生菌数が陽性コントロールの 5% 未満であること¹²⁾を、菌の沈殿を目視することで判定できるようトレーニングした者である。

MIC 値の再現性

MIC 値の再現性は、MIC 値の最小値と最大値の管差数 (分布幅: $\log_2 \{[\text{最大 MIC 値}]/[\text{最小 MIC 値}]\}$) を用いて評価した。例えば、判定された MIC 値の最小値が 0.25、最大値が 4 の場合、分布幅は 4 である。MIC 値がプロスミック NTM での測定可能な最大値を超えた場合および最小値以下の場合、それぞれ最大値の 2 倍の値および最小値を MIC 値として、分布幅を計算した。分布幅が 2 以下の場合、再現性は許容範囲にあるとした。

実験 1) 被験株の MIC 値と再現性の評価

各被験株に対する MIC 値は、有経験者群の判定者 5 名がガイダンス後に判定した MIC 値 (15 データ: 1 株につき 3 枚のプレートを 5 名が判定) の中央値とした。次に MIC の再現性を調べるために、上記のデータから MIC の分布幅を調べた。

実験 2) 判定者およびガイダンスが MIC 値の再現性に及ぼす影響

次に、判定者群およびガイダンスの有無で、MIC 値の再現性がどの程度異なるかを調べた。各群の判定者にガイダンス前後で判定させた各プレートの MIC 値 (1 プレート当たりそれぞれ 5 データ) から、プレートごとに MIC 値の分布幅を計算した。この値を、菌種ごとに集め (合計 18 データ: 各菌種 6 被験株、1 株当たり 3 枚のプレート)、抗菌薬別に比較した。統計学的解析には、Wilcoxon 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

被験株の MIC 値と再現性

被験株 12 株は、すべて CAM の MIC 値が 2 mg/L 以下であり、CAM 感受性株¹¹⁾だった。MIC 値がプロスミック NTM の薬剤濃度設定範囲を上回っていた株は、*M. avium* では INH で 1 株、*M. intracellulare* では ETH で 2 株、設定範囲を下回っていたのは、*M. avium* では RFP で 3 株、*M. intracellulare* では RFP で 6 株、CAM で 1 株、AMK で 3 株だった。その他の薬剤と菌株の組み合わせでは、MIC 値は設定範囲内だった (Table 1A)。分布幅が再現性の許容範囲を超えていたのは、*M. avium* では KM で 1 株、*M. intracel-*

lulare では INH で 1 株だった (Table 1B)。

判定者およびガイダンスが MIC 値の再現性に及ぼす影響

未経験者群が MIC 値を判定した場合、ガイダンス前に分布幅が許容範囲を超えていた薬剤は、*M. avium* では EB・KM・INH・ETH、*M. intracellulare* では SM・EB・KM・INH・LVFX・ETH だった。ガイダンス後には、*M. intracellulare* で ETH が許容範囲に入ったが、*M. avium* では SM と AMK、*M. intracellulare* では CAM でも分布幅が許容範囲を超えた。有経験者群では、ガイダンス前に MIC 値の分布幅が許容範囲を超えていたのは *M. avium* で KM・INH・AMK、*M. intracellulare* では INH のみであった。ガイダンス後には *M. avium* では AMK で許容範囲に入り、*M. intracellulare* では許容範囲を超える薬剤はなくなった。

未経験者群および有経験者群の間で、ガイダンス前に判定した MIC 値の分布幅を比較したところ、*M. avium* では SM・EB・KM・RFP・LVFX・CAM・ETH で、*M. intracellulare* では SM・EB・KM・AMK で、未経験者群の分布幅が有意に大きかった。また、未経験者群で、ガイダンス前後での MIC 値の分布幅に差があるかどうか解析したところ、ガイダンス後に分布幅が有意に低下した薬剤は、*M. avium* での EB のみだった。逆に、*M. avium* では SM・KM・LVFX・CAM・AMK で、*M. intracellulare* では SM・INH・LVFX・CAM で、ガイダンス後の MIC 値分布幅が有意に増加した (Table 2)。

考 察

本研究で私たちは、ブロスミック NTM で MAC 臨床分離株に対する MIC を測定し、MIC 値の再現性を調べた。その結果、ほとんどの臨床分離株と薬剤との組み合わせで、MIC 値の再現性が許容範囲であった。次に MIC 値の判定に当たり、判定経験および判定方法のガイダンスの有無によって、MIC の再現性がどう異なるかを調べた。その結果、ブロスミック NTM の判定経験がない者が MIC 値を判定すると、経験のあるものが判定する場合より MIC 値の再現性が悪くなること、未経験者にガイダンスを 1 回だけ行っても、再現性は向上しないこと、がわかった。

今回、*M. avium* 1 株が KM で、*M. intracellulare* 1 株が INH で、MIC 値の分布幅が 2 を超えており、再現性の許容範囲を逸脱していた。これに対し山根らは、MAC 標準株を用いて施設間の再現性を検討し、*M. avium* (ATCC25291) では RFP で、*M. intracellu-*

lare (ATCC13950) では INH で、分布幅が再現性の許容範囲を逸脱することが多かったと報告している¹²⁾。今回の実験では、MIC 値が測定限界以下の場合、すべて測定範囲の最小値を MIC 値として分布幅を計算したため、MIC 値の分布幅が実際の値より小さくなる。今回検討した *M. avium* は、RFP に対する感受性が標準株よりもかなり良く、半数の株で MIC が測定限界以下だった。このことが、今回の実験で *M. avium* に対する RFP の MIC の再現性が良くなった理由の一つと考えた。

今回の実験では、両菌種とも多くの薬剤で、未経験者群が判定した MIC 値の再現性が、有経験者群が判定したものより有意に悪かった。実験に参加した未経験者は、全員細菌検査の経験があった。それにもかかわらず再現性が悪かったことは、ブロスミック NTM を目視で再現よく判定するためには、細菌検査のための通常のトレーニングでは不十分であることを示すと考える。また、未経験者に対し判定ガイダンスを行った結果、再現性が有意に向上した薬剤は、*M. avium* での EB のみだった。逆に、両菌種とも多くの薬剤で、ガイダンス後に再現性が有意に悪化した。ガイダンス後に再現性が悪くなった明確な理由は不明である。しかしその理由の一つとして、各判定者は一般細菌検査における菌の沈殿の管底像に対する独自の判定基準もっているものの、これがブロスミック NTM での判断基準と異なっているため、ブロスミック NTM 操作未経験者では、ガイダンスによりかえって判断基準に混乱が生じ判定のばらつきを増強させた可能性がある。以上のことから、ブロスミック NTM を使用する際には、事前に判定のためのガイダンスを繰り返し行うておくことが必要と考える。

ブロスミック NTM で使用している薬剤の多くは、MAC に対する最小殺菌濃度と MIC の比が大きい。このため、液体希釈法で MAC に対する MIC を測定すると、薬剤濃度が上がるに従って管底に生じる沈殿が漸減する tailing 現象が起こる³⁾。ブロスミック NTM の添付書には、菌の発育を全く認めないか、ピンホール状の微量発育しか認めないウェルの最終濃度を MIC とするとある。しかし、tailing 現象が起こった場合、どのウェルを微量発育とするのか、判定者の主観により判断が分かれる可能性が高いと考える。菌液をプレートに接種する時には、吸光度計を用いて増殖期にある菌液を一定の濃度に調整するため、各ウェルに一定量の生菌を再現良く接種できる。同様に、MIC 値の判定も単純な目視判定で行うのではなく、濁度計を用いる、あるいは空いたウェル内にあらかじめ比較

Table 1. The numbers of strains exhibiting corresponding MICs (A) and distribution ranges of MICs (B).

A															
Bacteria	Agents	MIC (mg/L)													
<i>M. avium</i>		128<	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	≤0.06	
	SM						3	2			1				
	EB					3	3								
	KM						3	1	2						
			MIC (mg/L)												
				32<	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	≤0.03
	INH			1	2	1	1		1						
	RFP											1		2	3
	LVFX						1		4	1					
	CAM								3	2	1				
		MIC (mg/L)													
				16<	16	8	4	2	1	≤0.5					
TH					2	2	1		1						
AMK						3	1	2							
B															
Bacteria	Agents	Distribution ranges of MICs													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8					
<i>M. avium</i>	SM		6												
	EB	1	5												
	KM		4				1								
	INH		4		2										
	RFP	2	4												
	LVFX	3	3												
	CAM	2	4												
	TH														
	AMK	4	2												
	<i>M. intracellulare</i>	SM	2	4											
EB		1	4												
KM		2	4												
INH			4		1	1									
RFP		4	2												
LVFX		3	3												
CAM		3	3												
TH		2	4												
AMK		2	4												

Table 2. The numbers of strains with corresponding distribution ranges of MICs in each group and before and after guidance

Bacteria	Agents	Groups	Guidance	Distribution ranges										p Values†			
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9				
<i>M. avium</i> *	SM	inexperienced	pre-	3	6	8										} <.001	} .029
		experienced	post-	4	12	1											
		EB	inexperienced	pre-	2				5	10						} .003	} .015
			experienced	post-	8	7	2		5								
		KM	inexperienced	pre-	1	10	4	2							} .009	} .020	
			experienced	post-	2	14	1										
		INH	inexperienced	pre-	1	4	6	3	2	1					} N.S.	} N.S.	
			experienced	post-	1	2	7	4	1	2							
		RFP	inexperienced	pre-	8	9									} .007	} N.S.	
			experienced	post-	6	8	3										
		LVFX	inexperienced	pre-	10	6	1								} .010	} .005	
			experienced	post-	13	4											
		CAM	inexperienced	pre-	2	14	1								} .007	} .002	
			experienced	post-	8	9											
	TH	inexperienced	pre-		3	8	5	1						} .001	} N.S.		
		experienced	post-	2	10	4	1										
	AMK	inexperienced	pre-	2	11	4								} N.S.	} .014		
		experienced	post-	8	7	1		1									
	SM	inexperienced	pre-	6	10	1	1							} .027	} .021		
		experienced	post-	1	10	6	1										
	EB	inexperienced	pre-		7	3		2	1	1	1	3		} .027	} N.S.		
		experienced	post-	1	1	13	1		1				1				
		inexperienced	pre-	9	8	1								} .027	} N.S.		
		experienced	post-	9	8	1											

Table 2. (continued)

Bacteria	Agents	Groups	Guidance	Distribution ranges									<i>p</i> Values [†]		
				0	1	2	3	4	5	6	7	8		9	
<i>M. intracellulare</i>	KM	inexperienced	pre-	10	4	3	1							} .001	} N.S.
		experienced	post-	1	3	10	2	2							
			pre-	5	12	1									
			post-	4	13	1									
	INH	inexperienced	pre-	2	11	3	2							} N.S.	} .021
		experienced	post-	8	6	1	1		2						
			pre-	5	12	1									
			post-	10	7	1									
	RFP	inexperienced	pre-	13	5									} N.S.	} N.S.
		experienced	post-	14	4										
			pre-	17	1										
			post-	16	2										
LVFX	inexperienced	pre-	6	8	3	1							} N.S.	} .007	
	experienced	post-	5	11					1		1				
		pre-	9	9											
		post-	8	10											
CAM	inexperienced	pre-	8	9	1								} N.S.	} <.001	
	experienced	post-	2	9	6	1									
		pre-	13	5											
		post-	13	4	1										
TH	inexperienced	pre-	7	5	3	3							} N.S.	} N.S.	
	experienced	post-	2	7	9										
		pre-	9	9											
		post-	7	11											
AMK	inexperienced	pre-	7	9	2								} .006	} N.S.	
	experienced	post-		9	4										
		pre-	15	3											
		post-	11	7											

* The total numbers of plates for *M. avium* were 17 because one plate was contaminated and could not be evaluated.

† N.S.: no significance

参照できる粒子を入れておく、など客観的な判定方法を用いることで、再現性を向上できるかもしれない。

現在日本では、ニューマクロライド系薬剤が AIDS に伴う播種性 MAC 感染症に対してのみ健康保険の適応になっているため、それ以外の MAC 感染症に対しては、SM などのアミノグリコシド系に EB および RFP の 3 薬併用、場合により INH を追加した 4 薬併用が推奨されている¹³⁾。しかしアメリカでは、INH は MAC 感染症の治療に無効として、推奨治療薬に含めていない³⁾。今後日本でも、さまざまな情報が集積されるに従い、推奨される治療方針が変わる可能性がある。その中でも、臨床経過を予測しうる薬剤感受性試

験法の確立は、治療薬を選択するに当たって最も重要な問題の一つと考える。臨床現場で実際に使用できる薬剤感受性試験は、均一な結果を簡便に導くことができる必要がある。プロスミック NTM による MIC 値測定は、一般細菌の薬剤感受性試験と類似した操作で可能なため、多くの細菌検査室で簡便に行うことができる。今後測定値の再現性を向上させることによって、MAC 感染症の治療に重要な情報を提供しうると考える。

謝辞 本研究を行うにあたり、菌株を提供していただきました東京大学医学部附属病院検査部布施文男

副技師長に、深謝申し上げます。

文 献

- 1) 坂谷光則. 1994. 非定型抗酸菌症の疫学. 日胸疾患会誌 32 (増): 211-215.
- 2) Gordin, F. M., C. R. Horsburgh, Jr. 2005. *Mycobacterium avium* complex. p. 2897-2909, In: Principles and Practices of Infectious Diseases, 6th ed. (G. L. Mandell, J. E. Bennett, R. Dolin, et al. ed.), Elsevier, Philadelphia.
- 3) Heifets, L. 1996. Susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1756-1767.
- 4) American Thoracic Society. 1997. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156: S1-S25.
- 5) Yajko, D. M., P. S. Nassos, W. K. Hadley. 1987. Broth microdilution testing of susceptibilities to 30 antimicrobial agents of *Mycobacterium avium* strains from patients with acquired immune deficiency syndrome. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1579-1584.
- 6) Gomez-Flores, R., S. Gupta, R. Tamez-Gurtta, et al. 1995. Determination of MIC for *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. J. Clin. Microbiol. 33: 1842-1846.
- 7) Sison, J. P., Y. Yao, C. A. Kemper, et al. 1996. Treatment of *Mycobacterium avium* complex infection: do the results of in vitro susceptibility tests predict therapeutic outcome in humans? J. Infect. Dis. 173: 677-683.
- 8) Fabry, W., E. N. Schmid, R. Ansorg. 1996. Comparison of the E test and a proportion dilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex. J. Med. Microbiol. 44: 227-230.
- 9) Bownds, S. E., T. A. Kurzynski, M. A. Norden, et al. 1996. Rapid susceptibility testing for nontuberculosis mycobacteria using flow cytometry. J. Clin. Microbiol. 34: 1386-1390.
- 10) 堀川晶行, 西功, 豊川真弘, 他. 2004. ATP法を用いた非結核性抗酸菌の薬剤感受性試験の検討. 日臨微生物誌 14: 36-47.
- 11) The National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes: Approved standard. M24-A. Vol. 23, No. 18.
- 12) 山根誠久, 翁長小百合, 齊藤 宏, 他. 2002. Middlebrook 合成培地での結核菌薬剤感受性試験 (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. 臨病理 50: 3841-391.
- 13) 日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会. 非定型抗酸菌症の治療に関する見解—1998年. 1998. 結核 73: 599-605.

The Reproducibility of MIC Measured with BrothMIC NTM against *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* Complex

Miki Goto,¹⁾ Mayumi Ichikawa,¹⁾ Masahiro Watanabe,¹⁾
Shunsuke Shibuya,¹⁾ Shigemi Hitomi²⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, University of Tsukuba Hospital

²⁾ Department of Infectious Diseases, Institute of Clinical Medicine

We examined the reproducibility of minimum inhibitory concentration (MIC) measured with BrothMIC NTM using six clinical isolates of *Mycobacterium avium* and six of *Mycobacterium intracellulare*. Three plates per isolate were inoculated and MIC were measured in each plate by two groups of examiners, either experienced or inexperienced ones in determining MIC with BrothMIC NTM, before and after guidance for MIC determination. The ranges of MICs measured by the experienced ones after guidance were more than fourfold in kanamycin against one *M. avium* and isoniazide against one *M. intracellulare*. The reproducibility of MIC by the experienced ones was better than that by the inexperienced ones in streptomycin, ethambutol, kanamycin, rifampicin, levofloxacin, clarithromycin, and ethionamide against *M. avium* and in streptomycin, ethambutol, kanamycin, and amikacin against *M. intracellulare*. The reproducibility by the inexperienced group improved only in ethambutol against *M. avium* after guidance. We conclude that prior trainings for optical measurement of MIC are indispensable to use BrothMIC NTM.