

[原 著]

Mycobacteroides abscessus complex におけるクラリスロマイシン誘導耐性株の予測と
各種薬剤に対する感受性の検討

木原実香¹⁾・富田元久¹⁾・吉田志緒美²⁾

¹⁾ 独立行政法人国立病院機構近畿中央呼吸器センター臨床検査科

²⁾ 独立行政法人国立病院機構近畿中央呼吸器センター臨床研究センター

(平成 31 年 1 月 23 日受付, 令和元年 5 月 9 日受理)

Mycobacteroides abscessus complex に対する薬剤感受性検査は治療薬剤の選択において欠かせない。今回、DDH マイコバクテリアにて「*M. abscessus*」と同定された 49 株に対し 9 種類の薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定と亜種鑑別及び *erm* (41), *rri* 変異の確認を行った。CAM の 3 日目の MIC 値が 8 µg/mL 以上であった 8 株のうち *M. abscessus* subsp. *massiliense* (*M. massiliense*) 4 株は *rri* 変異 (A2057G) を認め、*M. abscessus* subsp. *abscessus* (*M. abscessus*) 4 株はすべて野生型であった。*M. abscessus* sequevar. T28 は 1 株を除いて CAM 誘導耐性を示し、*M. massiliense* と *M. abscessus* sequevar. T28C はすべて示さなかった。また、CAM 誘導耐性株のアジスロマイシン (AZM) に対する 3 日目の MIC 値は 2 µg/mL 以上、非誘導耐性株は 0.5 µg/mL 以下を示したことから、AZM の MIC 値により CAM 誘導耐性株の推測が可能であると考えられた。同じ系統薬剤間の MIC₅₀ 及び MIC₉₀ は、マクロライド系では CAM, カルバペネム系ではイミペネム, キノロン系ではシタフロキサシンが低値を示し、MIC 値の情報が抗菌薬選択において有用となる可能性が示唆された。

Key words: *Mycobacteroides abscessus*, *Mycobacteroides massiliense*, *erm* (41), CAM 誘導耐性, 薬剤感受性

序 文

近年、わが国の肺非結核性抗酸菌の分離頻度は増加傾向にあり、迅速発育抗酸菌は *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Mycobacterium kansasii* に次いで多いとされている¹⁾。迅速発育抗酸菌による肺感染症のうち臨床的に問題となるのは *Mycobacteroides abscessus* complex (MABC), *Mycobacteroides chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* の 3 種であり、なかでも肺 *M. abscessus* subsp. *abscessus* (*M. abscessus*) 症は進行が速く治療に難渋することが多い。したがって、肺 *M. abscessus* 症の早期診断と早期治療は重要である。

MABC は *M. abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* (*M. massiliense*), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (*M. bolletii*) に分類され、その中でも *M. massiliense* はマクロライド系薬剤に対して感受性であることに加え、肺 *M. massiliense* 症はマクロライド系薬剤を主とした多剤併用療法による治療の予後が肺 *M. abscessus* 症に比べて良好であることから、亜種レベルでの同定がこれらの疾患の診断および治療レジメンの作成の上で必要であるとされている²⁾。また、2007 年の

米国胸部疾患学会 (ATS) 及び米国感染症学会 (IDSA) のガイドライン³⁾でも肺 MABC 症の治療レジメンの作成には薬剤感受性検査に基づいて複数の治療薬を選択することを提唱している。これらの亜種はマクロライドの誘導耐性能が異なり、*M. abscessus* はクラリスロマイシン (CAM) の誘導耐性を有するのに対し、*M. massiliense* は欠いている⁴⁾。また、CAM の誘導耐性能は微量液体希釈法による薬剤感受性検査の 14 日目での最小発育阻止濃度 (MIC) 値の上昇により確認でき、誘導耐性を発現する遺伝子である *erm* (41) の遺伝子型との相関性が高いとされている⁵⁾。また、3 日目に耐性を示す獲得耐性の確認には 23S rRNA のドメイン V 領域にある 2057 から 2059 位の点変異解析 (*rri*) が有効である⁴⁾⁶⁾。しかし、亜種同定や *erm* (41), *rri* 解析は保険適用外の検査であることから一般的な病院では経済的な負担が大きいに、製品化されていないためルーチン検査に適用されにくい。米国臨床・検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) では、MABC に対する感受性の判定基準が設定されている薬剤は限られ、新しい薬剤に対する感受性率の検討が必要とされている。特に、アジスロマイシン (AZM) を含んだ多剤併用療法は CAM と同等の治療奏効性が望めることから、抗菌薬の治療効果を予測するための判定基準の設定が求められている⁷⁾。また、同系統の薬剤である CAM との交差耐性についての検討は少なく、臨床的に有用性が高いとされているキノロン系、カルバペネム系薬剤に対しても同様の検討が必要である。したがって、今回われわれは当院にて DDH マイコバクテリア (DDH: 極東

著者連絡先: (〒591-8555) 大阪府堺市北区長曾根町 1180
独立行政法人国立病院機構近畿中央呼吸器センター
臨床研究センター
吉田志緒美
TEL: 072-252-3021
FAX: 072-251-1372

Table 1. Antimicrobial agents and MIC breakpoints for rapidly growing mycobacteria

| | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | |
|----------------------|--------------------------|--------------|-----------|
| | Susceptible | Intermediate | Resistant |
| Clarithromycin (CAM) | ≤ 2 | 4 | ≥ 8 |
| Moxifloxacin (MFLX) | ≤ 1 | 2 | ≥ 4 |
| Ciprofloxacin (CPFX) | ≤ 1 | 2 | ≥ 4 |
| Imipenem (IPM) | ≤ 4 | 8-16 | ≥ 32 |
| Meropenem (MEPM) | ≤ 4 | 8-16 | ≥ 32 |
| Amikacin (AMK) | ≤ 16 | 32 | ≥ 64 |
| Linezolid (LZD) | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 |

MIC: minimum inhibitory concentration

製薬工業)により「*M. abscessus*」と同一とされた臨床分離株を対象に、AZMを含む各種薬剤に対するMIC値と感受性率を計測し、CAMの誘導耐性とAZMのMIC値との関連性及び同じ系統薬剤間でのMIC値を比較検討した。

材料と方法

1 検査材料

当院にて2016年1月から2017年12月までの期間に、肺非結核性抗酸菌症を疑い抗酸菌検査を依頼された喀痰および吸引痰の17,475検体のうち、小川固形培地(セロテック)及びMGIT分離剤(ベクトン・ディッキンソン)を用いた抗酸菌培養により3~5日の間で陽性とされ、且つDDHマイコバクテリア(DDH:極東製薬工業)にて*M. abscessus*と同一とされた49株を対象とした。これらを排菌した患者49名はすべて肺*M. abscessus*症と診断され、同じ患者から期間中に重複して提出された場合は初回分離株を採用した。

2 方法

2-1 MIC測定

CLSI M24 3rd Editionに準拠し⁴⁾、まず、小川固形培地に発育したコロニーを釣菌し、精製水を用いてMcFarland0.5に調製した。続いて、菌液60 μL を2価陽イオン(カルシウムイオンおよびマグネシウムイオン)の濃度を調整したミュラーヒントンプロス(pH7.2-7.4;極東製薬工業)に接種した。さらに、2倍希釈系列濃度の抗菌薬をマイクロプレートのウエルに分注、乾燥させた96穴ドライプレート(栄研化学)に、上記の菌液を100 μL 接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で3日間培養した。コントロール培地で十分に菌が発育したのを確認した後、CAM、AZM、モキシフロキサシン(MFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、シタフロキサシン(STFX)、アミカシン(AMK)、リネゾリド(LZD)、クラブラン酸カリウム(CVA)を添加していないイミペネム(IPM)及びメロペネム(MEPM)についてのMIC値を測定した。

CAM誘導耐性を確認するため、CAMのみ14日目のMIC値を計測した。今回、3日目で耐性を示さず、14日目でMIC値の3管(希釈濃度 2^3 ;以下同様)以上の上昇があり且つ8 $\mu\text{g/mL}$ 以上のMIC値を示した株を誘導耐性株とした。CLSI M24 3rd Editionの判定基準⁴⁾に準拠して耐性を判定し、AZMとSTFXの2剤は設定されていないためMIC値のみ採用した(Table 1)。各種薬剤に対するMIC値の分布からMIC₅₀とMIC₉₀を求め、中間領域の株(Intermediate)を含まない

感受性株(Susceptible)のみの占める割合を感受性率とした。

2-2 亜種の同一と *erm* (41), *rhl* 変異の確認

DNAの抽出

滅菌精製水1mLを添加した1.5mLマイクロチューブに、DDHにて検査された49株のコロニーを採取し、12,000rpmで15分間遠心後、上清を除去した。残った沈渣に滅菌蒸留水100 μL を添加し、95 $^{\circ}\text{C}$ で15分間処理を施した。急冷後vortexを行い、12,000rpmで1分間遠心後、上清を別のチューブに移し替えて、サンガーシーケンス解析と*erm*(41)決定のDNAテンプレートとして用いた。

*rpoB*領域、*hsp65*領域、16S-23SITS領域のサンガーシーケンス解析

*hsp65*と*rpoB*領域の塩基配列の決定にはDevulderらの報告⁸⁾に準じて実施し、プライマーセットは順にHSP_Tb11(5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT)とHSP_Tb12(5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT)、GrpB1(5'-ATCGACCACTTCGGCAACCGCC)とGrpB2(5'-GGTACGCGTCTCGAGAASCCG)を用いた。16S-23SITS領域はRothらの方法⁹⁾に準じ、16S-1420F(5'-TGGGCTTTGAGACAACAGG)と23S-23r(5'-TCGCCAAGGCATCCACC)のプライマーセットを用いた。

erm (41), *rhl* 解析

Kimらの方法¹⁰⁾に準じて、*erm*(41)の確認を行った。増幅されたPCR産物はGenetic Analyzer(Applied Biosystems, USA)を用いて解析し、得られたデータはBrown-Elliottらが報告しているデータベース¹¹⁾と比較した。また、Rubioらの方法⁷⁾に準じて*rhl*遺伝子における変異の有無を確認した。

2-3 統計解析

同系統間の各種薬剤におけるMIC値の平均値の比較をWilcoxonの符号付順位検定でおこない、MIC値が試験プレート内の薬剤濃度を下回るもしくは上回る場合は最も近い濃度を採用した。感受性率はFisherの正確確率検定を用いて比較した。これらの検定で、有意水準5%の場合を有意差ありとした。

結 果

今回、対象とした49株は、亜種同一により*M. abscessus* 29株、*M. massiliense* 20株に分別され、*M. bolletii*は検出

Table 2. Comparison of MICs, percentage of isolates susceptible, and MIC₅₀s, MIC₉₀s, to nine antimicrobial agents for clinical *M. abscessus* and *M. massiliense* isolates by broth microdilution

| Subspecies (No. of isolates tested) | Antimicrobial agents | Number of isolates distributed at MIC (µg/mL) of: | | | | | | | | | | | | suscepti- bility rate (%) | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
|--|-------------------------|---|------|------|------|-----|----|---|----|----|----|----|----|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| | | <0.06 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | | | |
| <i>M. abscessus</i> (29) | Clarithromycin (3days) | 1 | 4 | 5 | 4 | 6 | 3 | 2 | 2 | 1 | | 1 | | 79.3 | 1 | 8 |
| | Clarithromycin (14days) | | 1 | 1 | 2 | 2 | | 2 | 4 | 9 | 1 | 7 | | 20.7 | 32 | >64 |
| | Azithromycin | | 1 | 3 | 2 | 6 | 2 | 5 | | 4 | 1 | 3 | 2 | - | 4 | 64 |
| | Sitafloxacin | | 1 | | 5 | 14 | 8 | 1 | | | | | | - | 1 | 2 |
| | Moxifloxacin | | | | | | 3 | 8 | 13 | 3 | 2 | | | 0.0 | 8 | 16 |
| | Ciprofloxacin | | | | | | 2 | 3 | 6 | 8 | 8 | 2 | | 0.0 | 16 | 32 |
| | Imipenem | | | | | | 2 | 6 | 7 | 13 | 1 | | | 27.6 | 8 | 16 |
| | Meropenem | | | | | | | | 5 | 6 | 4 | 10 | 4 | 0.0 | 32 | 64 |
| | Amikacin | | | | | | 11 | 9 | 8 | 1 | | | | 100.0 | 4 | 8 |
| | Linezolid | | | | | | | 8 | 13 | 7 | 1 | | | 72.4 | 8 | 16 |
| <i>M. massiliense</i> (20) | Clarithromycin (3days) | 2 | 5 | 8 | | 1 | | | | | | 4 | | 80.0 | 0.12 | 0.12 |
| | Clarithromycin (14days) | 1 | 2 | 9 | 3 | 1 | | | | | | 4 | | 80.0 | 0.12 | 0.25 |
| | Azithromycin | | 2 | 1 | 4 | 8 | 1 | | | | | 4 | | - | 0.5 | 0.5 |
| | Sitafloxacin | | | 1 | 3 | 1 | 7 | 5 | 2 | 1 | | | | - | 1 | 4 |
| | Moxifloxacin | | | | 1 | | 1 | 2 | | 6 | 7 | 1 | 2 | 10.0 | 8 | >64 |
| | Ciprofloxacin | | | | | 1 | | 2 | 1 | 2 | 4 | 4 | 3 | 5.0 | 16 | >64 |
| | Imipenem | | | | | | | 3 | 4 | 7 | 3 | 3 | | 35.0 | 8 | 32 |
| | Meropenem | | | | | | | | 2 | 4 | 2 | 4 | 8 | 0.0 | 64 | >64 |
| | Amikacin | | | | | | | 7 | 7 | 4 | 2 | | | 100.0 | 4 | 16 |
| | Linezolid | | | | | | | 2 | 5 | 11 | 2 | | | 90.0 | 8 | 16 |

MIC: minimum inhibitory concentration

されなかった。また、*M. abscessus* と *M. massiliense* が混在または複数のシーケンス解析結果を有する株は今回認められなかった。CAM の MIC 値が 3 日目で 8 µg/mL 以上を示した 8 株のうち、*M. massiliense* 4 株は遺伝子変異 (A2057 G) を認め、*M. abscessus* 4 株はすべて野生型であった。一方、3 日目で 4 µg/mL 以下、14 日目で 4~7 管 (2¹-2⁷) の上昇を示す耐性を示し、誘導耐性株と判定された 17 株はすべて *M. abscessus* であった。14 日目においても 2 µg/mL 以下の MIC 値を示し、誘導耐性を認めなかった 22 株は 0~3 管 (2⁰-2³) の上昇を示し、*M. abscessus* 6 株、*M. massiliense* 16 株と確認できた。また、3 ないし 4 管 (2³ ないし 2⁴) の MIC 値上昇を示したが 14 日目に Intermediate となった 2 株は *M. abscessus* であった (Table 2)。

CAM の誘導耐性が認められた *M. abscessus* 17 株は、*erm* (41) 解析により *M. abscessus* sequevar. T28 を有していた。一方、3 日目で耐性と判定された *M. abscessus* 4 株は sequevar. T28 の *erm* (41) を有し、3 日目で感受性、14 日目で Intermediate と判定された *M. abscessus* 2 株も同じタイプの *erm* (41) を有していた。14 日目で感受性となった 22 株のうち、5 株が誘導耐性能を欠く *M. abscessus* sequevar. T28C の *erm* (41) を有しており、1 株のみ sequevar. T28 の *M. abscessus* であった。残りの 16 株は *erm* (41) の一部が欠損した *M. massiliense* であった。これら *M. massiliense* の MIC 値は不変または 1 管 (2) の上昇にとどまっていた一方、*M. abscessus* sequevar. T28 はすべて 3 管 (2³) 以上の上昇を認めた。sequevar. T28C では 1 株のみ 3 管 (2³) の

上昇を認めたが、残りの 4 株は 0~2 管 (2⁰-2²) の上昇であった。

全ての対象株における CAM と AZM の MIC 値分布の相関では、AZM の MIC 値が 2 µg/mL 以上であった 21 株のうち 3 日目で CAM 耐性を示した 8 株を除く 13 株は *M. abscessus* であり、感受性が 11 株、Intermediate が 2 株となった。これらの株はすべて 14 日目で CAM の MIC 値上昇と CAM 耐性が確認され誘導耐性ありと判定された。AZM の MIC 値が 1 µg/mL を示した 7 株では、CAM の MIC 値の上昇がみられなかった 1 株 (*M. massiliense*) 以外の株は 3~7 管 (2³-2⁷) の MIC 値の上昇を認めた。AZM の MIC 値が 0.5 µg/mL 以下の 21 株は 1~3 管 (2-2³) の CAM の MIC 値上昇を認めたものの、14 日目においても感受性と判定された (Fig. 1, 2)。

全株の CAM に対する感受性率は 3 日目で 79.6% (39 株)、14 日目で 44.9% (22 株) を示した。*M. abscessus* に限った場合には 79.3% から 20.7% と減少していた ($p < 0.05$)。一方、*M. massiliense* では 3 日目、14 日目ともに 80.0% を維持した ($p = 1$)。その他の薬剤に対する感受性率は、*M. abscessus* では MFLX 0.0%, CPFX 0.0%, IPM 27.6%, MEPM 0.0%, AMK 100%, LZD 72.4%, *M. massiliense* では MFLX 10.0%, CPFX 5.0%, IPM 35.0%, MEPM 0.0%, AMK 100%, LZD 90.0% となり、亜種間で有意な差は確認されなかった ($p > 0.05$)。*M. abscessus* における CAM の 3 日目の MIC₅₀ は 1 µg/mL を示し、14 日目では 32 µg/mL と上昇したが、*M. massiliense* では 0.12 µg/mL のまま変化はみられなかった。

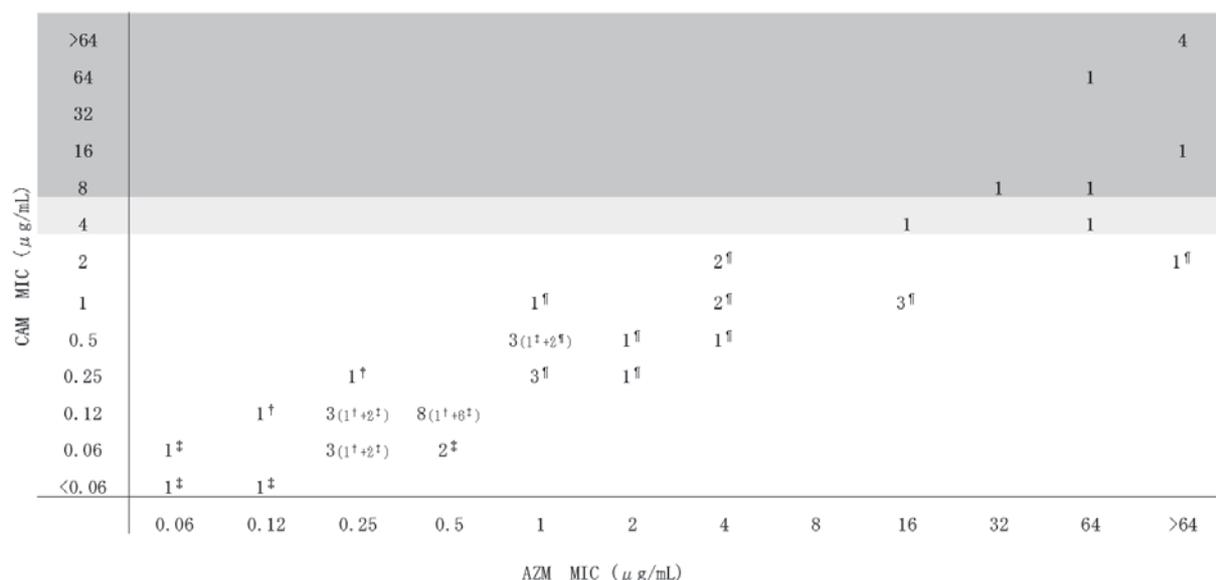


Fig. 1. MIC distributions of clarithromycin and azithromycin on 3rd day
 CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin
 †: number of *M. abscessus* sequevar. T28C isolates
 ‡: number of *M. massiliense* isolates
 ¶: number of isolates with induced CAM resistance

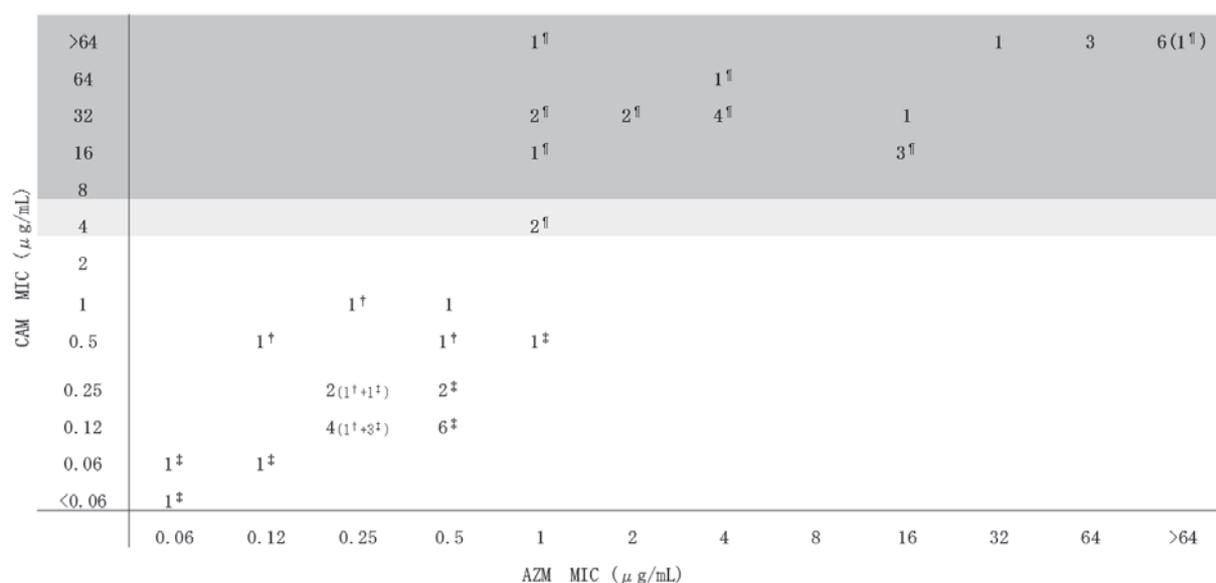


Fig. 2. MIC distribution changes of clarithromycin after 14 days of incubation
 The MICs of azithromycin were recorded on day 3
 CAM: clarithromycin, AZM: azithromycin
 †: number of *M. abscessus* sequevar. T28C isolates
 ‡: number of *M. massiliense* isolates
 ¶: number of isolates with induced CAM resistance

AZMのMIC₅₀は*M. abscessus*では4 μg/mL, *M. massiliense*では1 μg/mLとなった。両亜種ともAZMに対するMIC値の平均はCAMより有意に高かった ($p < 0.05$)。

3種類のキノロン系薬剤と2種類のカルバペネム系薬剤のMIC₅₀を比較したところ、亜種間での違いはみられなかったが、MFLX, CPFXが8及び16 μg/mLであったのに対し

STFXは1 μg/mLと低く、カルバペネム系薬剤ではMEPMは64 μg/mL, IPMは8 μg/mLとなりMIC値の違いが示された (Table 2)。MIC値の平均値はSTFX, MFLX, CPFXの順に有意に高く ($p < 0.05$)、IPMの方がMEPMより有意に低かった ($p < 0.05$)。

考 察

肺 *M. abscessus* 症は非結核性抗酸菌症の中でも難治な疾患であり、標準的な抗結核薬はすべて無効である。CAM, CPFX, ドキシサイクリンの経口薬3剤に、最初の4週間にセフォキシチン（もしくはIPM）とAMKの注射薬2剤を併用して治療しても、喀痰の菌陰性化率は41.6%（10例/24例）にとどまるとされている⁵⁾。ただし、肺 *M. massiliense* 症の場合では、97.0%（32例/33例）で喀痰の菌陰性化が得られたという⁵⁾。MABCは28のポジションの遺伝子変異と配列の欠損の有無により分類される *erm* (41) の遺伝子型 (sequevar) とCAMの誘導耐性能、亜種の関連が認められており¹¹⁾¹²⁾、正確な亜種同定を行うことで治療効果や治療成績が予測できる可能性が高いとされている¹¹⁾。 *erm* (41) の sequevar を調べることによりCAMに対する感受性の適切な評価がなされ、治療薬選択のツールになるという報告¹¹⁾もある。今回対象株のうち *erm* (41) の欠損を持つ *M. massiliense* は40.8%（20株）を占め、CAMの誘導耐性能を有さなかったことから、薬剤感受性検査の14日目を持たずに *erm* (41) の解析結果をもって *M. massiliense* の推定を行うことは可能であると考えられた。しかし、今回の検討結果と同様に、臨床現場では3日目で耐性を示す *M. massiliense* 株の存在が報告されており¹³⁾¹⁴⁾、薬剤感受性検査を実施することは必須であると思われる。また、*M. abscessus* sequevar. T28であるが耐性が誘導されなかった株には *erm* (41) 内の他の変異は認められず、*erm* (41) 以外の耐性を惹起する領域が関与している可能性が考えられた。今回CAMの使用歴については不明であるが、*M. abscessus* の獲得耐性株では *rrl* 変異が認められず、*rrl* 変異を有する *M. abscessus* 株が少ないとされている Mougari らの報告¹⁵⁾と同じ傾向が示された。したがって、CAM耐性に関与する他の領域の解明が今後必要になるだろう。塩基配列の読解を必要とする遺伝子解析をわが国で一般的に普及することは難しいが¹⁶⁾、将来的には、鑑別に有効な配列を効率的に検出するような反応系を用いたキットの製品化が必要であろう。

今回の検討では、*M. massiliense* とされた20株の80.0%がCAM感受性であったのに対し、*M. abscessus* と同定された29株のCAM感受性である割合は20.7%と低かったことから、*M. abscessus* より *M. massiliense* の感受性率は高いとされる既報の結果を支持することができた¹⁵⁾。しかし、欧米やわが国におけるMABC株に対する後方視的研究では、CAMの誘導耐性能と亜種間に相関がみられない株が稀に存在するとされていることから¹³⁾¹⁷⁾、慎重な解釈が必要である。

既報では、MABCの誘導耐性株とは「感受性から耐性へのMIC値の上昇が認められた株」と記載されている¹²⁾¹⁴⁾。今回の検討では、3日目のMIC値が低値であったために14日目で3管（2³）以上のMIC値の上昇を示しながらもIntermediateとされた *M. abscessus* 株が存在し、従来の基準では誘導耐性株と判定されなかった。しかし、これらの株も“真の誘導耐性株”と同様に、誘導耐性能を有する“誘導Intermediate株”として注意を払うことが必要であろう。したがって、正確な誘導耐性能の評価には、3日目から14日目におけるMIC値の変動と14日目における感受性判定を用いることが重要であると考えられた。

現在、CLSIではマクロライドの耐性誘導の有無を確認するために、3日目でCAM感受性であった場合は14日目に判定することを推奨している⁴⁾。しかし、肺非結核性抗酸菌症のなかでも治療が難渋するとされる *M. abscessus* 症において、治療の第一選択薬であるCAMの誘導耐性の有無が14日待つことなく早期に推定されれば、より早く治療方針の決定がなされ、治療奏効に寄与できると思われる。Christiansonらは、マクロライドの誘導耐性を示す *M. abscessus* のうち、80%を超える株が7日までにMIC値の上昇を認め、耐性と判定されたという¹⁸⁾。今回、3日目のCAMのMIC値が2 µg/mL以下であり且つAZMのMIC値が2 µg/mL以上のすべての株は14日目のCAMのMIC値上昇が認められた。したがって、3日目のCAMとAZMのMIC値の組み合わせにより、誘導耐性株を推定できる可能性が示唆された。しかし、本検討での株数は少ないため、今後、さらに株数を増やしてCAM誘導耐性と *erm* (41) との関係性を検討する必要がある。

日本結核病学会・日本呼吸器学会非結核性抗酸菌症診断ガイドライン¹⁹⁾によると、肺非結核性抗酸菌症の診断基準である臨床的要件と細菌学的要件をともに満たした症例に対して薬剤感受性検査を行い、得られた結果を参考にして多剤併用療法を施行することが推奨されている。長期的な化学療法が必要とされる肺MABC症においては、薬剤間相互作用や服薬コンプライアンスの低下による耐性化も危惧されることから、臨床分離株の薬剤感受性を把握しておくことは重要である。今回の検討におけるCAMのMIC₅₀は、*M. massiliense* では3日目と14日目で顕著な変化を示さなかったのに対し、*M. abscessus* ではMIC値の上昇がみられた。また、CAMとAZMの比較では、3日目のMIC₅₀は両亜種ともAZMの方が高い値を示し、亜種間では *M. massiliense* における3日目のAZM（0.5 µg/mL）より *M. abscessus* の値（4 µg/mL）の方が高い傾向がみられた（Table 2）。肺 *M. abscessus* 症におけるCAMとAZMの臨床的有効性を比較するデータはほとんどないが、In vitroではCAMとAZMの薬剤感受性に差はなかったとする報告²⁰⁾がある一方、AZMのMIC値がCAMより高いという報告²¹⁾²²⁾がある。これらについては、耐性機序や薬剤相互作用といった分野での更なる検討が必要であると考えられる。また、最新のCLSI⁴⁾では「Clarithromycin is the class representative for the newer macrolides (ie, azithromycin and roxithromycin)」と結果解釈に幅をもたせている。環境に存在する非結核性抗酸菌の場合、抗菌薬の臨床的有効性の推定は慎重に取り扱うべきであり、同系統の薬剤であっても種々の要因でブレイクポイントが異なる可能性を含んでいることを考慮するべきであろう。したがって、新規薬剤における同系統の代表的薬剤のブレイクポイントの暫定的な運用は可能ではあるが、治療への臨床応用では細心の注意が必要である。

今回、AMKやLZD薬剤に対するMIC₅₀及びMIC₉₀、感受性率が高く、既報の結果¹⁴⁾²³⁾²⁴⁾を支持するものであったが、Aonoらは高いLZD耐性率を報告している²⁵⁾。本検討を含むわが国の臨床分離MABC株についての検討²⁴⁾²⁵⁾は、一施設での検討であり且つLZDの使用歴も不明であるが、Hatakeyamaらの報告²⁴⁾と本検討はMIC値測定と培養温度

を 37°C に設定しているのに対し、Aono らの報告²⁵⁾では CLSIM24-A2 に準拠した方法としている (温度記載なし)。一般的な肺感染症由来菌の培養至適温度は 35°C 付近にあるため 30°C に比べて 37°C のほうが良好な発育を示すが、MABC の場合 30°C 培養の方が良好である。また、CLSI M24 3rd Edition⁴⁾は呼吸器由来検体だけではなく体表面に近い臨床分離株にも対応するため、皮膚感染症の比較的多い迅速発育抗酸菌株の培養温度を 30±2°C にしていると推測される。したがって、MIC 値測定の培養温度の違いが LZD の MIC 値に影響を与えた可能性が考えられた。

SFTX は他のキノロン系薬剤に比べ低い MIC₅₀ と MIC₉₀ を示しており、同薬剤の治療奏効性が期待できるとともに、判定基準の設定が必要であると考えられた。しかし、同薬剤についての臨床的有効性は確立しておらず、今後は他の薬剤との相乗効果の検討が必要と思われる。また、CLSI のブレイクポイントは米国で認可されている薬物の投与量における臨床効果の成績から算出されたものであり、わが国の投与量は日本人の体型をベースに設定されているため米国のそれよりも少ない。したがって、肺 MABC 症における各薬剤の臨床効果は、MIC 値に加え患者群や血中への移行性や Pharmacokinetics/Pharmacodynamics (PK/PD) 等を考慮して総合的に評価する必要があるだろう。

マクロライド系やキノロン系、カルバペネム系の薬剤は同じ系統間で抗菌力に差があることから、同系統の複数薬剤での感受性の比較は、治療による薬効が望めない場合や副作用が生じた際に薬剤変更を考慮する上で大いに参考になる。IPM と MEPM の間では既報²⁴⁾²⁶⁾と同じく感受性率に違いがみられ、副作用等で薬剤変更を余儀なくされる場合には参考にすることができると思われた。*M. abscessus* と *M. massiliense* 間における IPM の感受性率は、有意差が認められなかったが *M. massiliense* の方が高く、他報²⁾²⁵⁾とは異なる結果となったが Brown-Elliott らの報告²⁶⁾を支持できた。また、キノロン系薬剤である MFLX や CPFX の感受性率は低く、臨床分離株を対象とした MFLX や CPFX の試験管内の感受性は耐性株が多いとする報告と同様の結果が得られた²³⁾²⁵⁾²⁶⁾。これら薬剤の肺 MABC 症における生体内での薬効と *in vitro* の感受性との相関はほとんどわかっていないが、肺 MABC 症が難治性である要因として、既存の抗菌薬に対する生体内での高い抵抗性が考えられた。しかし、CAM 誘導耐性以外の耐性機序に関しては不明な点が多いため、これからの研究課題としたい。また、わが国では迅速発育抗酸菌用の薬剤感受性キットは市販されておらず、今後一層増加すると思われるわが国の肺 MABC 症に適切な治療薬剤を選択するためにも、MABC 用の感受性検査キットの構築が必要であると考えられる。

本検討では、3 日目の CAM と AZM の MIC 値の組み合わせから CAM 誘導耐性株の推測が可能であると考えられた。対象株数が少ないものの各種薬剤に対する感受性の多様性を確認し、肺 MABC 症に対する適切な治療法の確立に寄与すべく細菌学的知見を示すことができた。今後、多施設を対象とした調査研究を実施することで、MABC のデータベースの蓄積と薬剤感受性の評価が可能になると思われる。

利益相反: 申告すべき利益相反はございません。

謝辞: 本論文の執筆に際して、国立病院機構近畿中央呼吸器センター臨床検査科 小池由紀子氏に深謝申し上げます。

文 献

- Morimoto, K., N. Hasegawa, K. Izumi, 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.
- Koh, W-J., B.H. Jeong, S.Y. Kim, et al. 2017. Mycobacterial characteristics and treatment outcomes in *Mycobacterium abscessus* lung disease. *Clin Infect Dis* 64: 309-316.
- Griffith, DE., T. Aksamit, BA. Brown-Elliott, et al. 2007. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 367-416.
- Wood, GL., NL. Wengenack, L. Grace, et al. 2018. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). In: Susceptibility testing of Mycobacteria, *Nocardia* spp., and other aerobic Actinomycetes; M24 3rd Edition, CLSI, Wayne, PA.
- Koh, W-J., K. Jeon, NY. Lee, et al. 2011. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 405-410.
- Haworth, CS., J. Banks, T. Capstick, et al. 2017. British Thoracic Society Guideline for the management of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *BMJ Open Respir Res* 4: e000242.
- Rubio, M., F. March, M. Garrigó, et al. 2015. Inducible and acquired clarithromycin resistance in the *Mycobacterium abscessus* complex. *PLoS ONE* 10: e0140166.
- Devulder, G., M. Prouse de Montclos, JP. Flandrois. 2005. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 293-302.
- Roth, A., M. Fischer, ME. Hamid, et al. 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* 36: 139-147.
- Kim, HY., BJ. Kim, Y. Kook, et al. 2010. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. *Microbiol Immunol* 54: 347-353.
- Brown-Elliott, BA., S. Vasireddy, R. Vasireddy, et al. 2015. Utility of Sequencing the *erm* (41) Gene in Isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* with Low and Intermediate Clarithromycin MICs. *J Clin Microbiol* 53: 1211-1215.
- Nash, KA., BA. Brown-Elliott, RJ. Wallace. 2009. A novel gene, *erm* (41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1367-1376.
- Yoshida, S., K. Tsuyuguchi, T. Kobayashi, et al. 2018. Asso-

- ciation between sequevar and antibiotic treatment outcome in patients with *Mycobacterium abscessus* complex infections in Japan. *J Med Microbiol* 67: 74-82.
- 14) Cho, EH., HJ. Huh, DJ. Song, et al. 2019. Drug susceptibility patterns of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* isolated from respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 93: 107-111.
 - 15) Mougari, F., F. Bouziane, F. Crockett, et al. 2017. Selection of resistance to clarithromycin in *Mycobacterium abscessus* subspecies. *Antimicrob Agents Chemother* 61: e00943-16.
 - 16) 沼田尊功, 稲木俊介, 小島 淳, 他. 2017. 当院における肺 *Mycobacterium abscessus* complex 感染症の臨床的検討. *結核* 92: 587-593.
 - 17) Shallom, SJ., PJ. Gardina, TG. Myers, et al. 2013. New rapid scheme for distinguishing the subspecies of the *Mycobacterium abscessus* group and identification of *Mycobacterium massiliense* with inducible clarithromycin resistance. *J Clin Microbiol* 51: 2943-2949.
 - 18) Christianson, S., W. Grierson, D. Kein, et al. 2016. Time-to-detection of inducible macrolide resistance in *Mycobacterium abscessus* subspecies and its association with the *erm* (41) sequevar. *Plos One* 11: e0158723.
 - 19) 日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会, 日本呼吸器学会感染症・結核学術部会. 2008. 肺非結核性抗酸菌症診断に関する指針—2008年. *結核* 83: 525-526.
 - 20) Choi, GE., SJ. Shin, CJ. Won, et al. 2012. Macrolide treatment for *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* infection and inducible resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 186: 917-925.
 - 21) Kim, SY., CK. Kim, IK. Bae, et al. 2015. The drug susceptibility profile and inducible resistance to macrolides of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 81: 107-111.
 - 22) Maurer, FP., C. Castelberg, C. Quiblier, et al. 2014. *erm* (41)-dependent inducible resistance to azithromycin and clarithromycin in clinical isolates of *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 69: 1559-1563.
 - 23) Yoshida, S., K. Tsuyuguchi, K. Suzuki, et al. 2013. Further isolation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and subsp. *bolletii* in different regions of Japan and susceptibility of these isolates to antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents* 42: 226-231.
 - 24) Hatakeyama, S., Y. Ohama, M. Okazaki, et al. 2017. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan. *BMC Infect Dis* 17: 197.
 - 25) Aono, A., K. Morimoto, K. Chikamatsu, et al. 2019. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacteroides (Mycobacterium) abscessus* complex, *Mycolicobacterium (Mycobacterium) fortuitum*, and *Mycobacteroides (Mycobacterium) chelonae*. *J Infect Chemother* 25: 117-123.
 - 26) Brown-Elliott, BA., J. Killingley, S. Vasireddy, et al. 2016. In Vitro Comparison of Ertapenem, Meropenem, and Imipenem against Isolates of Rapidly Growing Mycobacteria and Nocardia by Use of Broth Microdilution and Etest. *J Clin Microbiol* 54: 1586-1592.

Rapid detection of clarithromycin inducible resistance and determination of the antimicrobial susceptibility in clinical *Mycobacteroides abscessus* complex isolates

Mika Kihara¹⁾, Motohisa Tomita¹⁾, Shiomi Yoshida²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

²⁾Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

Mycobacteroides abscessus complex (MABC), including three subspecies—*M. abscessus*, *M. massiliense*, and *M. bolletii*—is resistant to a variety of antibiotics so limited treatment options are available. The susceptibility of these subspecies to antimicrobial agents depends in particular on the *erm*(41), which are potentially related to inducible clarithromycin (CAM) resistance. The purpose of this study was to carry out identification of these subspecies based multiple sequencing, and *erm*(41). All forty-nine MABC isolates were identified as *M. abscessus* and *M. massiliense* and these subspecies could be discriminated between based on their resistance to CAM, as determined by truncation or mutation of *erm*(41). Regard to macrolide, all tested isolates were inhibited at higher median MICs by azithromycin (AZM) than CAM. Combination in MICs between CAM and AZM assumed all inducible CAM resistance isolates. MABC isolates were low minimal inhibitory concentrations (MICs) to meropenem, moxifloxacin and ciprofloxacin but were low MICs to imipenem and sitafloxacin. Our study demonstrates the importance of correct identification and antimicrobial susceptibility testing, including the testing of potential new agents, in the management of MABC infections.