

[原 著]

迅速発育性抗酸菌用 MIC 測定キット多施設評価

青野昭男¹⁾・近松絹代¹⁾・五十嵐ゆり子¹⁾・下村佳子¹⁾・細谷真紀子¹⁾

森重雄太¹⁾・村瀬良朗¹⁾・高木明子¹⁾・山田博之¹⁾・御手洗聡¹⁾²⁾

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分野

(令和2年7月7日受付, 令和2年11月4日受理)

2019年9月に極東製薬工業株式会社より CLSI M24 3rd ed.に対応した迅速発育性抗酸菌用 MIC 測定キットが発売された。我々はこれに先立ち, 迅速発育性抗酸菌の MIC 測定を行うキットの臨床実践性評価のため, 多施設による一貫性評価試験を実施した。研究参加は任意とし, 全23施設より回答を得た。MIC 測定操作は CLSI M24 3rd ed.の基準に従い実施した。菌種別薬剤別の全体一致率は73.9%~98.3%で, MICの再現性は95%以上を示したものが全体の75%と良好であったことから, 臨床細菌検査において使用に堪えるキットであると考えられた。一方でいくつかの施設では, 基準値から外れた結果を報告しており, MIC測定では一般的な事象であるが, 導入前後で適切かつ継続的なトレーニングの実施が必要であると思われる。

Key words: 迅速発育性抗酸菌, MIC 測定キット, 多施設評価

序 文

近年我が国において非結核性抗酸菌症の増加が報告されている¹⁾。非結核抗酸菌症の主要な原因菌は *Mycobacterium avium* および *Mycobacterium intracellulare* であるが, 一方で比率上稀少ではあるものの迅速発育性抗酸菌 (Rapid Growing *Mycobacterium*: RGM) である *Mycobacteroides abscessus* complex の急速な増加が報告されている²⁾。*Mycobacteroides abscessus* complex には *Mycobacteroides abscessus* subsp. *abscessus* (*M. abscessus*), *Mycobacteroides abscessus* subsp. *bolletii* (*M. bolletii*) および *Mycobacteroides abscessus* subsp. *massiliense* (*M. massiliense*) の3亜種が含まれるが, 亜種間でマクロライド感受性が異なる。*M. abscessus/bolletii* は *erm* (41) 遺伝子を保有しておりマクロライドに対する誘導耐性を示すが, これに対して *M. massiliense* の *erm* 遺伝子は不完全 (truncated) であるために *erm* (41) が発現せず, マクロライドに感受性である³⁾。また, 本邦における *M. abscessus* の約1割では *erm* (41) 遺伝子の28番目の遺伝子が T ではなく C であり (sequence variant; sequevar), クラリスロマイシンに感受性を示す⁴⁾⁵⁾。一方で *M. massiliense* においては *rrl* (23S rRNA) 遺伝子変異によるマクロライド高度獲得耐性も報告されている。つまり, *M. abscessus* complex のマクロライド感受性は亜種同定である程度の推測が可能であるものの, 様々な例外があることから, 最終的には Minimum Inhibitory Concentration

(MIC) の測定を必要とすることになる。

他の RGM についても, 菌種ごとに一定の薬剤感受性・耐性の特性を有するものの, 同一の菌種であっても同一の薬剤に対して異なる感受性を示すため, 結核菌で実施するような単純なブレイクポイントテスト (比率法) を適用できない。個々の株ごとに薬剤感受性を評価するためには MIC 測定が必須となる。

日本国内ではこれまで Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M24 3rd ed.⁶⁾に対応した MIC 測定キットが発売されていなかったため, CLSI の示す「感受性・耐性」基準を直接臨床的に適用できない状況が続いていた。しかし2019年9月に極東製薬工業株式会社 (東京) より CLSI M24 3rd ed.に対応した RGM 用 MIC 測定キット「プロスミック RGM」が発売された。これに先立ち我々は RGM の MIC 測定を行う同キットの実践的評価を進めるため, プロスミック RGM の量産テストタイプを用いて, 多施設による一貫性評価試験を実施した。

材料と方法

参加施設

外部精度評価法のひとつである Proficiency testing (MIC 既知の RGM 基準株によって構成されたパネルテスト) により, 新規開発された RGM 用 MIC プレート「プロスミック RGM」を用いて, 迅速発育性抗酸菌の MIC 測定精度を多施設間で評価することを目的とし, この研究に参加を希望する施設を対象とした。参加は任意であり, 施設名を伏して公表することを含む実施プロトコルの内容について諾とした施設のみに試験用の検体 (被験菌及びプロスミック RGM MIC 測定キット) を送付し, 23 施設より参加の回答を得た。

被験検体 (迅速発育性抗酸菌)

被験 RGM 10 株を 0.4~0.5 ml の液体培地中に懸濁した状

著者連絡先: (〒204-8533) 東京都清瀬市松山 3-1-24
公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部
青野昭男
TEL: 042-493-5711
FAX: 042-492-4600
E-mail: aono@jata.or.jp

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMK						ST					
	128	64	32	16	8	4	152/8	76/4	38/2	19/1	9.5/0.5	4.8/0.25
B	TOB						DOXY					
	16	8	4	2	1	0.5	16	8	4	2	1	0.5
C	IPM						MEPM					
	64	32	16	8	4	2	64	32	16	8	4	2
D	FRPM						LZD					
	64	32	16	8	4	2	32	16	8	4	2	1
E	LVFX						CLF					
	32	16	8	4	2	1	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06
F	MFLX						STFX					
	8	4	2	1	0.5	0.25	8	4	2	1	0.5	0.25
G	AZM											Cont.
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	
H	CAM											Cont.
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	

AMK: Amikacin, ST: Trimethoprim-sulfamethoxazole, TOB: Tobramycin, DOXY: Doxycycline, IPM: Imipenem, MEPM: Meropenem, FRPM: Faropenem, LZD: Linezolid, LVFX: Levofloxacin, CLF: Clofazimine, MFLX: Moxifloxacin, STFX: Sitafloxacin, AZM: Azithromycin, CAM: Clarithromycin

図1. 最小発育阻止濃度測定用プレート上の薬剤配置と菌液接種後の予定濃度 (μg/ml)

態で参加施設担当者に送付した。被験菌は国連容器を用いて三重包装とし (UN3373), 金属ケース (四次容器) に収めてゆうパックにて郵送した。

今回使用した菌株は *M. abscessus* subsp. *abscessus* (*M. abscessus*, ATCC19977), *M. abscessus* subsp. *massiliense* (*M. massiliense*, JCM15300), *Mycobacteroides chelonae* (ATCC35752), *Mycolicibacterium fortuitum* (ATCC6841) 及び *Mycolicibacterium peregrinum* (ATCC700686/CLSI M24 3rd ed. 指定精度管理株) 等の基準株であり, クローニング後に液体培地で培養し, 再現性評価のため各菌種を2株 (duplication) ずつとして計10株とした。

試験薬剤

試験薬剤は, プロスミック RGM に実装している14薬剤を対象とした。具体的には, Amikacin (AMK), Trimethoprim-sulfamethoxazole (ST), Tobramycin (TOB), Doxycycline (DOXY), Imipenem (IPM), Meropenem (MEPM), Faropenem (FRPM), Linezolid (LZD), Levofloxacin (LVFX), Clofazimine (CLF), Moxifloxacin (MFLX), Sitafloxacin (STFX), Azithromycin (AZM) 及び Clarithromycin (CAM) の14剤を5~11濃度 (2倍希釈系列) で固着したマイクロプレート (プロスミック RGM) を使用した。図1に薬剤の配置と菌液を接種した後に期待される薬剤濃度を示した。

菌液接種と培養

送付された被験菌を各施設で小川培地に継代培養 (30±2℃, 3~5日) し, 発育と純培養を確認した。発育した菌体を菌液調製用試験管 (ビーズ入り) に採取し, 500 μl 程度の滅菌生理食塩水若しくは滅菌水を添加して, ミキサーでよく攪拌した。攪拌後, 再度, 滅菌生理食塩水若しくは滅菌水を添加

し, McFarland No. 0.5 (OD₅₃₀=0.08~0.1) に調製した。菌液接種用の Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB) 培地 (pH 7.4) 12 mL に調製した菌液 50 μl を加え, ミキサーでよく攪拌し, 接種用菌液とした。

上記で調製した菌液を MIC プレートの各ウエルに 100 μl ずつ接種し, ラミジップ (株式会社生産日本社) 若しくは培養容器に入れて, 大気条件下で 30±2℃ で培養を実施した。

MIC の判定は培養3~5日目にコントロールに十分な発育が認められることを確認して行った。培養5日目において発育が不十分な場合は再度試験を実施することとした。また CAM と AZM について14日目まで培養を継続し, 14日目を最終判定とした。判定は CLSI M24 3rd ed. の基準に従い, 判定鏡を用いた目視判定にて, 菌発育の認められないウエルを MIC として判定した。ただし ST 合剤のみは, コントロールウエル (薬剤不含有) の発育と比較し, 80% 以上発育が阻止されたウエルを MIC と判定した。

結果の解析

各薬剤について, 菌種ごとにあらかじめ設定した MIC 値が「正常範囲」に入ったかどうかで判定の可否を判断した。

M. peregrinum については, CLSI M62⁷⁾ に記載された MIC 精度管理基準値をそのまま適用した。CLSI M62 に基準値が示されていない菌種・薬剤については, 結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科及び極東製薬工業にて反復測定した基準株の MIC の結果を基に, MIC 値の上下1濃度までを許容する範囲を基準値とした。設定した基準値を表1に示した。

上記の MIC 値を基準として, 各施設の結果を解析した。各施設で測定された MIC 値が基準範囲内にある場合は True (T) とし, 基準値を逸脱した場合は False (F) として基本

表 1. 菌種及び薬剤毎の最小発育阻止濃度基準値 (µg/ml)

Species	ATCC	AMK	ST	TOB	DOXY	IPM	MEPM	FRPM	LZD
<i>M. abscessus</i>	ATCC19977	4-16	76/4->158/8	4-16	8->16	2-8	32->64	32->64	8-32
<i>M. massiliense</i>	JCM15300	4-16	76/4->158/8	4-16	0.5-2	4-16	32->64	32->64	8-32
<i>M. chelonae</i>	ATCC35752	8-32	19/1-76/4	1-4 [§]	2->16	≤2-8	8-32	32->64	≤1-2
<i>M. fortuitum</i>	ATCC6841	≤4-8	≤4.8/0.25-19/1	8->16	≤0.5-1	2-8*	4-16	4-32	2-8
<i>M. peregrinum</i>	ATCC700686	≤4	≤4.8/0.25-38/2	2-8	≤0.5	≤2-16	4-16	4-32	1-8
	M62 standard	≤1-4	≤4.8/0.25-38/2	2-8	0.12-0.5	2-16	2-16		1-8

Species	ATCC	LVFX	CLF	MFLX	STFX	AZM 3-5	AZM 14	CAM 3-5	CAM 14
<i>M. abscessus</i>	ATCC19977	8-32	0.25-1	4->8	0.5-2	4-64	32->64	0.5-8	32->64
<i>M. massiliense</i>	JCM15300	8-32	0.125-0.5	4->8	0.5-2	0.5-4	2-8	0.125-0.5	0.25-1
<i>M. chelonae</i>	ATCC35752	≤1-2	0.125-0.5	≤0.25-0.5	≤0.25-0.5	0.25-1	1-4	≤0.06-0.5	0.25-1
<i>M. fortuitum</i>	ATCC6841	≤1-2	0.125-0.5	≤0.25-0.5	≤0.25-0.5	16->64	16->64	2-16	32->64
<i>M. peregrinum</i>	ATCC700686	≤1-2	0.125-0.5	≤0.25	≤0.25-0.5	2-8	4-16	≤0.06-0.5	0.25-1
	M62 standard			≤0.06-0.25				≤0.06-0.5	

[§]*Mycobacteroides chelonae*において tobramycin の最小発育阻止濃度が 4 µg/ml を越えることは精度管理上許容されない (critical error)

**Mycobacterium fortuitum*において imipenem の最小発育阻止濃度が 8 µg/ml を越えることは精度管理上許容されない (critical error)

M62 standard : CLSI M62 に示されている *Mycobacterium peregrinum* の精度管理用最小発育阻止濃度

的に T の一致率を評価した。また、同じ株での施設内再現性については MIC 値の許容差 1 濃度として評価した。2 施設からは CAM と AZM の 3~5 日目の値が送付されなかったため、21 施設のみで解析した。

結 果

表 2 に菌種別薬剤別の施設間一致率を解析した。その結果、全体 (Total) の一致率では CLF が 73.9% で最も低く、同薬剤に対する被験菌種の中では *M. fortuitum* が 59.5% で最も低い一致率を示した。次に ST 合剤の全体一致率が 80.9% で、菌種では *M. fortuitum* が 52.2% と最低であった。また *M. chelonae* の AZM 3-5 が 54.8% であった。一致率が 60% を下回ったのはこれらの薬剤・菌種の組み合わせのみであり、全体一致率は 73.9-98.3% となった。

CLSI M62 の再検基準である *M. chelonae* における TOB の MIC 値 >4 µg/ml と *M. fortuitum* における IPM の MIC 値 >8 µg/ml については、*M. chelonae* でこの範囲を逸脱した施設はなかったものの、*M. fortuitum* では >8 µg/ml が 3 件認められた。

図 2 には各々の菌種における各薬剤の MIC 分布を示した。菌種により薬剤毎の分布傾向は異なっていた。グラフの中央値は全ての菌種と薬剤で基準値の範囲内に収まっており、グラフのピーク値は *M. abscessus* と *M. chelonae* の AZM 3-5 を除き全て基準値の範囲内に収まっていた。図 2-E には今回使用した培地の精度管理株である *M. peregrinum* の MIC 分布を示したが、棒グラフ (斜線) で示した値は基準範囲を逸脱したデータである。CLSI M62 に精度管理基準濃度の設定がある 9 薬剤については、全体で 92.4% 以上が精度管理範囲に収まっており、MIC がすべて基準範囲に入っていた施設は 23 施設中 12 施設 (52.2%) であった。

表 3 に同一株に関する同一施設での MIC の再現性を示した。再現性は全体として高く、最低でも 76.2% であり、95% 以上の再現性を示した施設が全体の 75% で、最頻値及び最

大値は 100.0% であった。

考 察

今回、CLSI M24 3rd ed. に準拠した RGM 用 MIC 測定キット (プロスミック RGM) の多施設による一貫性評価試験を 5 種の非結核性抗酸菌基準株を用いて実施した。菌種別薬剤別の施設間一致率 (表 2) は概して高く、ほとんどの薬剤・判定時期で 80% を超えていた。研究実施前には判定困難と予想された ST 合剤の 80% 発育をカットオフとする MIC 測定でも、一致率は全体としては 80% を上回っていた。しかし *M. fortuitum* 及び *M. chelonae* では一致率が 52.2% および 69.6% と低く、菌種別・薬剤別 MIC 分布からは、被験菌株の MIC 値が設定された測定範囲を越える *M. abscessus* や *M. massiliense* と比較しても、判定値の分布幅が広く判定の困難性を示していると思われた。特に *M. fortuitum* では False (F) となった株は全て基準値よりも高い値に判定されており、MIC 値が高く判定される傾向が示された。特に CLF では正答率 59.5% と低い値を示し、基準値より高く判定されていた。*M. fortuitum* は迅速発育性抗酸菌のなかでも比較的発育が良好であるため、早い時期に判定のタイミングに到達する。このため接種菌液濃度や判定のタイミングに、十分な注意が必要であると思われた。さらに *M. fortuitum* ATCC6841 を含め迅速発育性抗酸菌にはラフ型コロニーを形成する株を認める。こうした株では薬剤感受性試験の菌液調製において大きな菌塊ができやすく、MIC の判定結果に影響する可能性がある。このため菌液調製の際には菌液を静置し、大きな菌塊を沈殿させるなどの均等菌液となるような配慮が必要と思われる。また LZD で MIC 値が基準値から外れた *M. abscessus* の 14 例 (30.4%) と *M. massiliense* の 11 例 (23.9%) で基準値より高い値が報告されており、特に *M. abscessus* では基準値から外れた全例で高値に判定されていることから、*M. abscessus* complex では LZD の MIC 値が高めに判定されやすいと考えられた。

表2. 菌種別・薬剤別の施設間一致率

Species	AMK	ST	TOB	DOXY	IPM	MEPM	FRPM	LZD	LVFX	CLF	MFLX	STFX	AZM (3-5)	AZM (14)	CAM (3-5)	CAM (14)
<i>M. abscessus</i>	TRUE	44	45	46	37	43	46	32	37	40	46	41	29	44	33	44
	FALSE	2	1	0	9	3	0	14	9	6	0	5	13	2	9	2
	Proportion	95.7%	97.8%	100.0%	80.4%	93.5%	100.0%	69.6%	80.4%	87.0%	100.0%	89.1%	69.0%	95.7%	78.6%	95.7%
<i>M. massiliense</i>	TRUE	44	40	34	39	46	46	34	43	34	46	45	40	36	42	43
	FALSE	2	0	6	7	0	0	12	3	12	0	1	2	10	0	3
	Proportion	95.7%	100.0%	73.9%	84.8%	100.0%	100.0%	73.9%	93.5%	73.9%	100.0%	97.8%	95.2%	78.3%	100.0%	93.5%
<i>M. chelonae</i>	TRUE	42	32	46	46	42	45	46	46	37	46	46	23	38	42	43
	FALSE	4	14	0	1	4	1	0	0	9	0	0	19	8	0	3
	Proportion	91.3%	69.6%	100.0%	97.8%	91.3%	97.8%	100.0%	100.0%	80.4%	100.0%	100.0%	54.8%	82.6%	100.0%	93.5%
<i>M. fortuitum</i>	TRUE	45	24	46	41	44	44	41	46	25	46	45	42	45	41	37
	FALSE	1	22	0	5	2	2	5	0	21	0	1	0	1	1	9
	Proportion	97.8%	52.2%	100.0%	89.1%	93.5%	95.7%	89.1%	100.0%	59.5%	100.0%	97.8%	100.0%	97.8%	97.6%	80.4%
<i>M. peregrinum</i>	TRUE	44	39	46	37	44	43	43	42	34	42	44	39	39	40	42
	FALSE	2	7	0	9	2	3	3	4	12	4	2	3	7	2	4
	Proportion	95.7%	84.8%	100.0%	80.4%	95.7%	93.5%	93.5%	91.3%	73.9%	91.3%	95.7%	92.9%	84.8%	95.2%	91.3%
Total	TRUE	219	186	223	203	219	224	196	214	170	226	221	173	202	198	209
	FALSE	11	44	7	27	11	6	34	16	60	4	9	37	28	12	21
	Proportion	95.2%	80.9%	97.0%	88.3%	90.9%	97.4%	85.2%	93.0%	73.9%	98.3%	96.1%	82.4%	87.8%	94.3%	90.9%

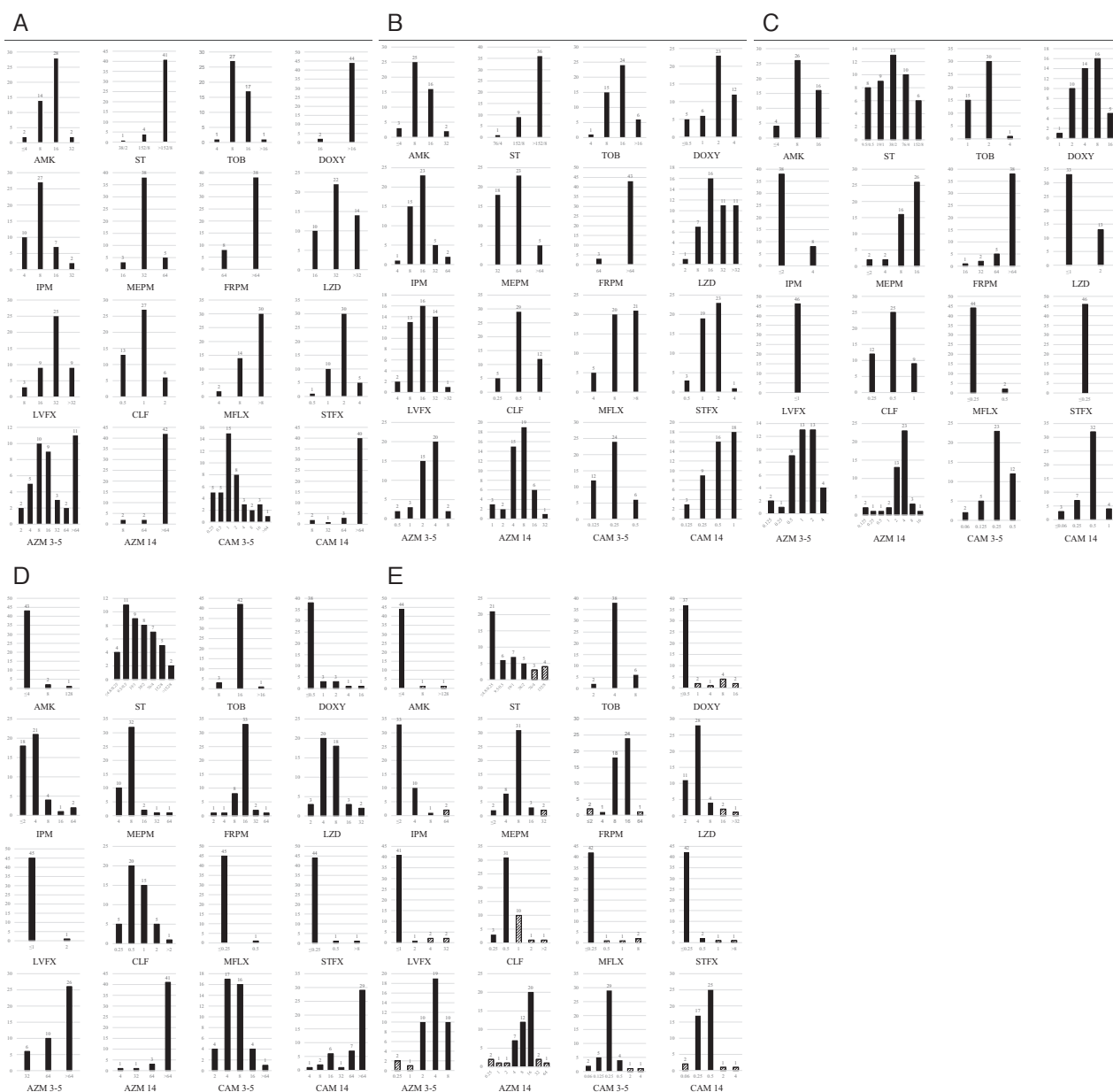


図2. 菌種別・薬剤別 MIC 分布

- A. Distribution of MICs for *Mycobacteroides abscessus*
- B. Distribution of MICs for *Mycobacteroides massiliense*
- C. Distribution of MICs for *Mycobacteroides chelonae*
- D. Distribution of MICs for *Mycolicibacterium fortuitum*
- E. Distribution of MICs for *Mycolicibacterium peregrinum*
(Banded bar : MICs out of normal range)

British Thoracic Society guidelines (BTS) ガイドラインでは、*M. abscessus* においてマクロライド系抗酸菌薬に対する誘導耐性株と獲得耐性株では治療方法が異なっていることから⁸⁾、両者を区別することが望ましいとしている。前述の 23S rRNA の変異による獲得耐性は一般に MIC 値が安定して高値であるが、*erm* (41) の発現による誘導耐性ではマクロライドにより *erm* (41) 遺伝子の発現誘導後に標的タンパクがメチル化されマクロライドの結合が阻害されることで耐性を獲得するため、一般に MIC は徐々に上昇する。この原

理から、誘導耐性株と獲得耐性株の区別はウエル内の菌の経時的な発育像から判断することが可能と考えられる。今回使用した *M. abscessus* の基準株は CAM に対して誘導耐性を生じる株であり、通常では培養 3~5 日目には MIC 低値であるが、その後上昇して 14 日目までに耐性となる。*M. abscessus* の CAM の MIC 分布 (図 2-A.) をみると CAM の 3~5 日目 (CAM3-5) の判定において多くの施設で MIC 値 2 μg/mL 以下の感受性と判定されている一方、3 施設 (13.0%) で 8 μg/mL (耐性) と判定されている。理論上は MIC 値の上

表3. 施設内再現性 (同一菌種薬剤別一致率)

Species	AMK	ST	TOB	DOXY	IPM	MEPM	FRPM	LZD	LVFX	CLF	MFLX	STFX	AZM 3-5	AZM 14	CAM 3-5	CAM 14
<i>M. abscessus</i>	23/23 100.0%	22/23 95.7%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	22/23 95.7%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	18/21 85.7%	23/23 100.0%	16/21 76.2%	22/23 95.7%
<i>M. massiliense</i>	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	22/23 95.7%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	20/23 87.0%	22/23 95.7%	23/23 100.0%	22/23 95.7%	23/23 100.0%	21/21 100.0%	22/23 95.7%	21/21 100.0%	22/23 95.7%
<i>M. chelonae</i>	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	21/23 91.3%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	22/23 95.7%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	23/23 100.0%	17/21 81.0%	21/23 91.3%	21/21 100.0%	22/23 95.7%
<i>M. fortuitum</i>	22/23 95.7%	18/23 78.3%	23/23 100.0%	18/23 78.3%	21/23 91.3%	19/23 82.6%	22/23 95.7%	21/23 91.3%	23/23 100.0%	18/23 78.3%	22/23 95.7%	22/23 95.7%	20/21 95.2%	23/23 100.0%	20/21 95.2%	19/23 82.6%
<i>M. peregrinum</i>	22/23 95.7%	18/23 78.3%	23/23 100.0%	22/23 95.7%	21/23 91.3%	21/23 91.3%	22/23 95.7%	20/23 87.0%	21/23 91.3%	22/23 95.7%	21/23 91.3%	21/23 91.3%	21/21 100.0%	22/23 95.7%	21/21 100.0%	23/23 100.0%

昇速度から誘導耐性、獲得耐性の判定が可能と考えられるものの、培養条件や株によって誘導耐性であっても早期に高MIC値を示す場合もあり、これだけで誘導耐性、獲得耐性の判定を行った場合、誤って判定される可能性が示された。CAMと同様にAZMもマクロライド抗菌薬として治療に選択されるが、MIC値の分布をみると3から5日目(AZM3-5)の値で、CAMに比べMIC値の上昇が速く、誘導耐性と獲得耐性の区別が難しい傾向が示されていた。CLSI M24 3rd ed.ではマクロライド系抗菌薬の代表薬はCAMであり、誘導耐性と獲得耐性の区別においてもAZMの値は参考までにとどめておくべきと思われた。最終的には、遺伝子のシーケンスによる耐性機構の確認が必要である。

CLSI M62では*M. abscessus*のAMKのMIC値が64 µg/mL以上、*M. chelonae*のTOBが4 µg/mLおよび*M. fortuitum*のIPMが8 µg/mLを超えた場合には再検するよう推奨している。今回の調査では*M. abscessus*および*M. chelonae*ではこの精度管理範囲を逸脱した施設は認められなかったが、*M. fortuitum*のIPMにおいて規定のMIC範囲を逸脱する施設が認められた。我が国における臨床分離株の調査でも*M. fortuitum*のIPMにおいて正常MIC範囲を逸脱する株が報告されているが⁵⁾、基本的に*M. fortuitum* groupはIPM感受性とされており、IPM >8 µg/mLの判定は報告すべきで無いとされている。CLSI M24 3rd ed.では観察のタイミングを培養2日目より開始するよう推奨しており、発育コントロールが十分な発育を認めた場合には、値を記録しておくとしている。これは*M. fortuitum*等の比較的発育が良好な株の場合に、判定のタイミングを逃さないために有効であるとしている。今回の調査では、菌種の同定は求めているため、菌種ごとのMIC値への配慮は不要であったが、実際の臨床分離株での判定と報告の際には、事前の菌種同定に十分に注意しながらMICを判定する必要がある。

CLSI M62では精度管理基準株*M. peregrinum* ATCC 700686を用いた精度管理を推奨している。今回用いた*M. peregrinum*は精度管理基準株であり、一致率の基準も*M. peregrinum*についてはCLSI M62の値を用いている。CLSI M62で示されている9薬剤における*M. peregrinum*での全薬剤での一致率は92.4%以上を示しており、今回参加した施設の検査精度の高さを示したものの、9薬剤すべてについて精度管理基準を満たした施設は23施設中12施設(52%)に留まっていたことから、MICキットの導入には精度管理株を用いたスタッフ間の目合わせなど、適切なトレーニングが必要と考えられた。さらに80%発育をカットオフ値とするST合剤の判定においては、判定値にばらつきが大きく、人の目による判定の限界が感じられた。被験菌の発育状態を数値化し、自動機器による判定を可能とするシステムの必要性が考えられた。

CLFは感受性判定ブレイクポイントが設定されていないものの、CLSI M24 3rd ed.でtigecyclineと共に要望があれば測定される薬剤として示されている。しかし十分な臨床データによる裏付けが得られていないとして、MIC値のみの報告にとどめるべきとしている。我が国の迅速発育性抗酸菌に関する調査においても、CLFは多くの株でMIC値1.0 µg/mL以下を示すなど良好なMIC値を示している⁴⁾。プロス

ミック RGM は CLF のほかに感受性判定ブレイクポイントが設定されていない薬剤として FRPM, STFX 及び AZM を実装している。これらの薬剤も要望がある場合に限り MIC 値のみの報告にとどめるのが望ましいと思われる。しかしながら、これらの薬剤は実際に臨床での使用について MIC 情報の提供要求が高いことも事実であり、臨床情報との相関に関するデータの蓄積に期待がかかる。

今回の多施設評価試験では、使用した RGM 用 MIC 測定キットの評価とともに、MIC 測定そのものにかかる精度情報が得られた。今回参加したほとんどの施設は抗酸菌にかかわらず、細菌の MIC 測定を日常的に実施していると思われる。こうした施設の多くが今回設定した基準値の範囲内に入る結果を報告していることから、プロミック RGM は臨床細菌検査の場において、使用に堪えるものであると思われた。一方で今回参加したいくつかの施設は、基準値から外れた結果を報告している。RGM の中には発育速度の観点から判定のタイミングを逃しやすいもの、また CAMHB での発育が良好でない臨床分離株が少なからず存在し、MIC 値の判読に苦慮するケースが存在する。このことから、他の薬剤感受性試験同様、実際にプロミック RGM を使用するにあたっては、継続的で適切なトレーニングの実施により使用に十分習熟してから実施することが必要であると考えられた。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

1) Namkoong, H, A Kurashima, K Morimoto, et al. 2016. Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan. *Emerg Infect Dis* 22: 1116-1117.

2) 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.

3) Nash, KA, BA Brown-Elliott, RJ Wallace Jr. 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.

4) 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.

5) Yoshida, S, K Tsuyuguti, K Suzuki, et al. 2014. Rapid identification of strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group through erm (41) gene pyrosequencing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79: 331-336.

6) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae* spp., and Other Aerobic *Actinomycetes*, M24, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.

7) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae* spp., and Other Aerobic *Actinomycetes*, 1st ed. CLSI supplement, M62, Wayne, PA.

8) Haworth, CS, J Banks, T Capstick, et al. 2017. British Thoracic Society guidelines for the management of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax* 72: iii-ii64.

MIC measurement kit for rapidly growing mycobacteria multicenter evaluation

Akio Aono¹⁾, Kinuyo Chikamatsu¹⁾, Yuriko Igarashi¹⁾, Shimomura Yoshiko¹⁾, Makiko Hosoya¹⁾, Yuta Morishige¹⁾, Yoshiro Murase¹⁾, Akiko Takaki¹⁾, Hiroyuki Yamada¹⁾, Satoshi Mitarai^{1) 2)}

¹⁾ Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

²⁾ Basic Mycobacteriosis, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

In September 2019, Kyokuto Pharmaceutical Industry Co., Ltd. released a MIC measurement kit for rapidly growing mycobacteria (RGM) corresponding to CLSI M24 3rd ed. Prior to this event, we conducted a multicenter evaluation study to see the clinical feasibility of the kit for MIC measurement of RGM. A total of 23 laboratories participated the study voluntarily and results were obtained from them all. The operation was performed according to the standard of CLSI M24 3rd ed. The overall concordance by type of drug was 73.9% to 98.3%, and the reproducibility of MIC was $\geq 95\%$, which was observed in 75% of the laboratories. On the other hand, some facilities reported MICs out of range in results, and it seemed necessary to carry out appropriate and continuous training before and after introduction of the kit.