

[原 著]

新規遅発育性非結核性抗酸菌用 MIC 測定キットの多施設による精度評価

青野昭男¹⁾・近松絹代¹⁾・五十嵐ゆり子¹⁾・井上 学²⁾・北川真喜²⁾・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⁾・御手洗聡^{1) 3)}

¹⁾ 公益財団法人結核予防会結核研究所

²⁾ 極東製薬工業株式会社

³⁾ 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5年5月25日受付, 令和5年9月27日受理)

2023年3月に極東製薬工業株式会社より CLSI M24 3rd ed.に対応した遅発育性非結核性抗酸菌用 MIC 測定キットが発売された。我々はこれに先立ち、遅発育性非結核性抗酸菌の MIC 測定を行うキットの臨床実践性評価のため、任意の多施設による一致性評価試験を実施し、全19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69.1%から98.9%で、MICの再現性は90.0%以上を示した薬剤が全体の68.6% (95% CI: 57.7-79.4) と良好であったことから、臨床細菌検査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、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た。

Key words: 遅発育性非結核抗酸菌, 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、その有病率は結核を上回っている¹⁾。非結核性抗酸菌は結核と同じ抗酸菌であるものの、その発育性状や栄養要求は菌ごとに異なる。このため結核菌の検査をそのまま転用できるものではない。これは薬剤感受性試験においても同様であり、結核菌の基準をそのまま転用できるものではなく、それぞれの菌の特性にあわせて培養条件や判定基準に従わなければならない²⁾。非結核性抗酸菌症の主要な原因菌は *Mycobacterium avium* (*M. avium*) と *Mycobacterium intracellulare* (*M. intracellulare*) の二菌種であり、これに *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*) あるいは *Mycobacterium abscessus* species が続き³⁾、さらに希少菌種を含め多彩な抗酸菌が分離される。適切な診断プロセス⁴⁾によって抗酸菌が原因菌と判断され、治療導入の対象となった場合、*M. avium*, *M. intracellulare* や *M. kansasii* などの主要な菌種に関してはその治療のガイドラインが示されており、薬剤感受性試験の実施が推奨されている⁵⁾。また Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) は主要な菌において臨床効果との相関が得られている薬剤のブレイクポイントを設定している⁶⁾⁷⁾。

これまでの我が国における遅発育性非結核性抗酸菌 (Slow Growing Mycobacteria: SGM/結核菌を除く) 用 MIC 測定キットは、プロスミック NTM 極東製薬工業株式会社 (東京)

が広く用いられてきた。プロスミック NTM は基本的には2003年に CLSI が発行した M24-A に準拠している。現在の CLSI 基準である M24 3rd ed.⁶⁾に示されている SGM 測定には陽イオンを調整した Mueller-Hinton 培地を用いているのに対し、プロスミック NTM は Middlebrook 7H9 培地を用いており CLSI M24 3rd ed.に示されている基準を当てはめることはできない。このため CLSI M24 3rd ed.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。

また AMK においては、*M. avium* および *M. intracellulare* 症におけるリポソーム化製剤による吸入療法が、2021年より承認され臨床に導入された。吸入療法では静脈内投与に比較し高い病巣内 AMK 濃度が得られる。このため AMK の耐性/感受性の基準は、静脈内投与の場合で 16 µg/mL 以下が感受性、64 µg/mL 以上が耐性であるのに対して、吸入療法における基準は 64 µg/mL 以下が感受性、256 µg/mL 以上が耐性と判定基準が異なる。吸入療法導入にあたっては AMK の MIC 測定が重要な役割を担っており⁸⁾、MIC プレーットの AMK の測定レンジもこの吸入療法への対応を配慮し上限を 256 µg/mL 以上に設定する必要があるが、こうした状況に対応できていなかった。

しかし2023年3月に極東製薬工業株式会社より CLSI M24 3rd ed.に対応した SGM 用 MIC 測定キット「プロスミック SGM」が発売された。これに先立ち我々は SGM 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 SGM の量産テストタイプを用いて多施設による一致性評価試験を実施した。

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
青野昭男
TEL: 042-493-5711
FAX: 042-492-4600
E-mail: aono@jata.or.jp

材料と方法

参加施設

外部精度評価 (External Quality Assessment: EQA) 法

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	Cont.
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	
B	AZM	AZM	AZM	AZM	AZM	AZM	AZM	AZM	AZM	AZM	AZM	Cont.
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	
C	MFLX	MFLX	MFLX	MFLX	MFLX	MFLX	STFX	STFX	STFX	STFX	STFX	STFX
	8	4	2	1	0.5	0.25	4	2	1	0.5	0.25	0.125
D	AMK	AMK	AMK	AMK	AMK	AMK	KM	KM	KM	KM	KM	KM
	256	128	64	32	16	8	64	32	16	8	4	2
E	MINO	MINO	MINO	MINO	MINO	MINO	DOXY	DOXY	DOXY	DOXY	DOXY	DOXY
	16	8	4	2	1	0.5	16	8	4	2	1	0.5
F	INH	INH	INH	INH	INH	INH	LZD	LZD	LZD	LZD	LZD	LZD
	4	2	1	0.5	0.25	0.125	64	32	16	8	4	2
G	EB	EB	EB	EB	EB	EB	TH	TH	TH	TH	TH	TH
	16	8	4	2	1	0.5	16	8	4	2	1	0.5
H	RBT	RBT	RBT	RBT	RBT	RBT	RFP	RFP	RFP	RFP	RFP	RFP
	8	4	2	1	0.5	0.25	4	2	1	0.5	0.25	0.125

Fig. 1. Arrangement of plate for measuring minimum inhibitory concentration and expected concentration after inoculation with bacterial solution ($\mu\text{g/ml}$)

CAM: Clarithromycin, AZM: Azithromycin, MFLX: Moxifloxacin, STFX: Sitafoxacin, AMK: Amikacin, KM: Kanamycin, MINO: Minocycline, DOXY: Doxycycline, INH: Isoniazid, LZD: Linezolid, EB: Ethambutol, TH: Ethionamide, RBT: Rifabutin, RFP: Rifampicin

のひとつである Proficiency testing (最小発育阻止濃度, Minimum Inhibitory Concentration : MIC 既知の SGM 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 SGM 用 MIC プレートの測定精度を多施設で評価することを目的に, まず事前に任意の多施設に参加を呼び掛け, 本研究に参加を希望する施設を対象とした。うち, 実施プロトコルについて諸との回答を得た 19 施設に試験用の検体 (被験菌及び SGM 用の MIC プレート) を送付した。具体的には, 参加への呼びかけを 2022 年 3 月上旬より開始し, 同年 4 月下旬に検体を配布した。結果の報告は検体受領から 3 ヶ月以内とした。

被験検体

被験 SGM 10 株 (5 種 \times 2 株) を 0.5 mL 程の液体培地中に懸濁した状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) ゆうパックにて送付した。

今回使用した株は *M. avium* subsp. *avium* (*M. avium*) (ATCC 25291) および *M. intracellulare* subsp. *intracellulare* (*M. intracellulare*) (ATCC 13950), *M. kansasii* (ATCC 12478), *Mycobacterium lentiflavum* (*M. lentiflavium*) (ATCC 51985), 及び *Mycobacterium marinum* (*M. marinum*) (ATCC 927 / CLSI M24 3rd ed. 指定精度管理株) 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, SGM 用 MIC プレートに実装した 14 薬剤を対象とした。具体的には clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM), moxifloxacin (MFLX), sitafloxacin (STFX), amikacin (AMK), kanamycin (KM), minocycline (MINO), doxycycline (DOXY), isoniazid (INH), linezolid (LZD), ethambutol (EB), ethionamide (ETH), rifabutin (RBT)

及び rifampicin (RFP) の 14 剤を 6 から 11 濃度 (2 倍希釈系列) で乾燥固着したマイクロプレートを使用した。Fig. 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 (*M. marinum* : $30 \pm 1^\circ\text{C}$, その他 : $36 \pm 1^\circ\text{C}$) し, 発育と純培養を確認した。発育した菌体をマイコプロスにて前培養した。前培養は通常大気にて McFarland No. 1 に相当する濁度まで, 3 から 5 日間培養した。この菌液を滅菌精製水にて McFarland No. 0.5 ($\text{OD}_{530} = 0.08-0.1$) に調製した。調製した菌液 55 μL を 11 mL 滅菌精製水に加えチューブミキサーでよく攪拌し, これを接種用菌液とした。

上記で調製した菌液を MIC プレートの各ウェルに 100 μL ずつ接種し, プレートにはプレートシールを貼り, 蓋をした後, 密封容器に入れ通常大気中で培養した (*M. marinum* : $30 \pm 1^\circ\text{C}$, その他 : $36 \pm 1^\circ\text{C}$)。

MIC の判定は培養 7 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 7 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。

目視判定の際の各薬剤の MIC は, 菌の発育が全く認められないか, あるいは微量発育 (ピンホール状) しか認められないウェルの最小濃度を MIC とした。

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「事前に規定した許容範囲」に入ったかどうかで判定の可否を判断した。

M. marinum については, CLSI M62 1st ed.⁷⁾ 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 1st ed. 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及び極東製薬工業にて反復測定して決定した基準株 (本研究で使用した対象株) の MIC の結

Table 1. Minimum inhibitory concentration standards for each bacterial species and agent ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Species	ATCC	CAM	AZM	MFLX	STFX	AMK	KM	MINO
<i>M. avium</i>	25291	$\leq 0.06-0.25$	1-4	0.5-2	$\leq 0.125-0.5$	≤ 8	$\leq 2-4$	≤ 0.5
<i>M. intracellulare</i>	13950	0.25-1	8-32	$\leq 0.25-1$	0.25-1	≤ 8	2-8	4-16
<i>M. kansasii</i>	12478	$\leq 0.06-0.25$	1-4	≤ 0.25	≤ 0.125	≤ 8	$\leq 2-4$	0.5-2
<i>M. lentiflavum</i>	51985	$\leq 0.06-0.125$	1-4	≤ 0.25	≤ 0.125	≤ 8	$\leq 2-4$	≤ 0.5
<i>M. marinum</i>	00927	0.5-2	8-32	0.5-4	$\leq 0.125-1$	1-4	$\leq 2-4$	≤ 0.5

Species	ATCC	DOXY	INH	LZD	EB	TH	RBT	RFP
<i>M. avium</i>	25291	≤ 0.5	> 4	$\leq 2-4$	4-16	8- > 16	$\leq 0.25-0.5$	$\leq 0.125-0.5$
<i>M. intracellulare</i>	13950	8- > 16	2- > 4	4-16	2-8	> 16	$\leq 0.25-0.5$	0.5-2
<i>M. kansasii</i>	12478	1-4	1-4	$\leq 2-4$	16- > 16	≤ 0.5	$\leq 0.25-0.5$	0.25-1
<i>M. lentiflavum</i>	51985	≤ 0.5	0.25-1	$\leq 2-4$	16- > 16	1-4	$\leq 0.25-0.5$	$\leq 0.125-0.5$
<i>M. marinum</i>	00927	1-8	> 4	$\leq 2-4$	2-8	1-4	$\leq 0.25-0.5$	$\leq 0.5-2$

Bold-type characters: CLSI M62 1st ed. standard range

果を元に、MIC 値の 1 管差までを許容する範囲を基準値とした。設定した基準値を Table 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 1 管差を許容範囲として評価した。

結 果

一つの施設で *M. lentiflavum* が発育しなかったため、(19 施設 \times 10 株) - 2 株の 188 株で結果の解析を行った。

全体あるいは菌種別に参加施設間の一致率 (Table 2) を解析した。総合的な判定一致率は DOXY で最も低く 69.1% (95% CI : 62.5-75.8) であり、RBT で最大 98.9% (95% CI : 96.2-99.7) 一致していた。菌種別では *M. avium* で MINO 及び DOXY の一致率が低く、78.9% (95% CI : 66.0-91.9) であった。CAM, AZM, STFX, AMK, INH, LZD, TH 及び RBT は 100% (95% CI : 90.8-100) の一致を示した。一方 *M. intracellulare* では MINO 及び DOXY での一致率がそれぞれ 39.5% (95% CI : 23.9-55.0) と 34.2% (95% CI : 19.1-49.3) であった。AZM と RFP も一致率が低値であり、それぞれ 55.3% (95% CI : 39.5-71.1) と 52.6% (95% CI : 36.8-68.5) であった。CAM での一致率は 73.7% (95% CI : 59.7-87.7) であった。AMK, INH, KM, MFLX では 100% (95% CI : 90.8-100) の一致率を示した。

M. kansasii では EB で一致率が 47.4% (95% CI : 31.5-63.2), RFP で 71.1% (95% CI : 56.6-85.5), DOXY で 76.3% (95% CI : 62.8-89.8) と低値であったことを除けば、他は 80% 以上の一致率を示していた。*M. lentiflavum* は MINO, DOXY, INH 及び RFP で一致率が 61.1% (95% CI : 45.2-77.0), 61.1% (95% CI : 45.2-77.0), 55.6% (95% CI : 39.3-71.8) 及び 75.0% (95% CI : 60.9-89.1) で低値であることを除けば、他は 80% 以上の一致率を示した。

精度管理株である *M. marinum* の CLSI 基準値に対する結果は CAM (0.5-2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 78.9% (95% CI : 66.0-91.9), MFLX (0.5-4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 84.2% (95% CI : 72.6-95.8), AMK (1.0-4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 100% (95% CI : 90.8-100), DOXY (1.0-8.0

$\mu\text{g}/\text{ml}$) で 94.7% (95% CI : 82.7-98.5), LZD ($\leq 2.0-4.0 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 97.4% (95% CI : 86.5-99.5), RBT ($\leq 0.25-0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 100% (95% CI : 90.8-100), RFP ($\leq 0.5-2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 100% (95% CI : 90.8-100) であり、ほぼ 80% 以上の一致率は確保されていた。

Fig. 2 には各々の菌種における各薬剤の MIC 値の分布を示した。菌種により薬剤毎の分布傾向は異なっていた。Fig. 2-E には今回使用した精度管理株である *M. marinum* の MIC 分布を示したが、斜線の棒グラフで示した値は基準範囲を逸脱したデータである。CLSI M62 1st ed.において *M. marinum* の基準濃度が設定されている 7 薬剤に関して、MIC がすべて基準範囲に入っていた施設は 15 施設 (78.9%) であった。

Table 3 に同一株に関する MIC の再現性を示した。再現性は全体として高く、最低でも 72.2% (95% CI : 57.6-86.9) であり、90.0% 以上の再現性を示した薬剤が全体の 68.6% (95% CI : 57.7-79.4) で、最頻値及び最大値は 100% であった。精度管理株である *M. marinum* の結果は CLSI 基準薬を含め全て 89.5% 以上で、最頻値及び最大値は 100% であった。

考 察

今回、CLSI M24 3rd ed. に準拠した SGM 用 MIC 測定キットの多施設による一致性評価試験を 5 種の SGM 基準株を用いて実施した。菌種別薬剤別の施設間一致率 (Table 2) は概して高く、ほとんどの薬剤で 80% を超えていた。しかし MINO あるいは DOXY については判定一致率が低かった。これを菌種別にみても *M. intracellulare* で最も低く、次いで *M. lentiflavum* が低かった。両菌種とも基準を外れた値が 3-4 管と広い範囲に認められ、ばらつきが大きいことが認められた。また *M. intracellulare* では全体として設定基準範囲外に判定される確率が高く、それは低値側に誤判定される場合が多かった。これはどこまでを発育とするかの判定基準の統一が不十分なため、発育像があいまいなケースにおいておこると思われる。適切な判定指標 (発育の状態を示す写真等) が必要と考えられた。一方で菌種毎の各薬剤に対する MIC の再現性 (Table 3) は高く、多施設間での判定一致率は全体として高いと考えられた。すなわち評価に参加し判定

Table 2. Percentage of concordance for each bacterial species among participating facilities

Species	CAM	AZM	MFLX	STFX	AMK	KM	MINO	DOXY	INH	LZD	EB	TH	RBT	RFP	
<i>M. avium</i>	TRUE	38	37	38	38	37	30	30	38	38	32	38	38	32	
	FALSE	0	1	0	0	1	8	8	0	0	6	0	0	6	
	Proportion	100%	97.40%	100%	100%	97.40%	78.90%	78.90%	100%	100%	84.20%	100%	100%	100%	84.20%
<i>M. intracellulare</i>	95% CI	90.8-100	86.5-99.5	90.8-100	90.8-100	86.5-99.5	66.0-91.9	66.0-91.9	90.8-100	90.8-100	72.6-95.8	90.8-100	90.8-100	90.8-100	72.6-95.8
	TRUE	28	38	25	38	38	15	13	38	29	36	36	36	20	
	FALSE	10	17	0	13	0	23	25	0	9	2	2	2	18	
<i>M. kansasii</i>	Proportion	73.70%	55.30%	100%	65.80%	100%	39.50%	34.20%	100%	76.30%	94.70%	94.70%	94.70%	52.60%	
	95% CI	59.7-87.7	39.5-71.1	90.8-100	50.1-80.9	90.8-100	23.9-55.0	19.1-49.3	90.8-100	62.8-89.8	82.7-98.5	82.7-98.5	82.7-98.5	36.8-68.5	
	TRUE	38	32	38	35	38	38	29	36	38	18	35	38	27	
<i>M. lentiflavium</i>	FALSE	0	6	0	3	2	0	9	2	0	20	3	0	11	
	TRUE	100%	84.20%	100%	92.10%	100%	100%	76.30%	94.70%	100%	47.40%	92.10%	100%	71.10%	
	95% CI	90.8-100	72.6-95.8	90.8-100	79.2-97.3	90.8-100	90.8-100	62.8-89.8	82.7-98.5	90.8-100	31.5-63.2	79.2-97.3	90.8-100	56.6-85.5	
<i>M. marinum</i>	TRUE	29	30	32	32	34	22	22	20	32	35	31	36	27	
	FALSE	7	6	4	4	2	14	14	16	4	1	5	0	9	
	Proportion	80.60%	83.30%	88.90%	88.90%	94.40%	61.10%	61.10%	55.60%	88.90%	97.20%	86.10%	100%	75.00%	
<i>M. marinum</i>	95% CI	67.6-93.5	71.2-95.5	78.6-99.2	78.6-99.2	81.9-98.5	45.2-77.0	45.2-77.0	39.3-71.8	78.6-99.2	85.8-99.5	74.8-97.4	90.4-100	60.9-89.1	
	TRUE	30	37	32	33	38	26	36	35	37	38	33	38	38	
	FALSE	8	1	6	5	0	12	2	3	1	0	5	0	0	
Total	Proportion	78.90%	97.40%	84.20%	86.80%	100%	68.40%	94.70%	92.10%	97.40%	100%	86.80%	100%	100%	
	95% CI	66.0-91.9	86.5-99.5	72.6-95.8	14.5-43.4	90.8-100	53.6-83.2	82.7-98.5	79.2-97.3	86.5-99.5	90.8-100	76.1-97.6	90.8-100	90.8-100	
	TRUE	163	158	177	163	188	131	130	167	174	159	173	186	144	
Total	FALSE	25	30	11	25	5	57	58	21	14	29	15	2	44	
	Proportion	86.70%	84.00%	94.10%	86.70%	100%	69.70%	69.10%	88.80%	92.60%	84.60%	92.00%	98.90%	76.60%	
	95% CI	81.8-91.6	78.8-89.3	90.8-97.5	81.8-91.6	98.0-100	63.1-76.3	62.5-75.8	84.3-93.3	88.8-96.3	79.4-89.7	88.1-95.9	96.2-99.7	70.5-82.6	

Bold-type characters: CLSI M62 1st ed. standard range

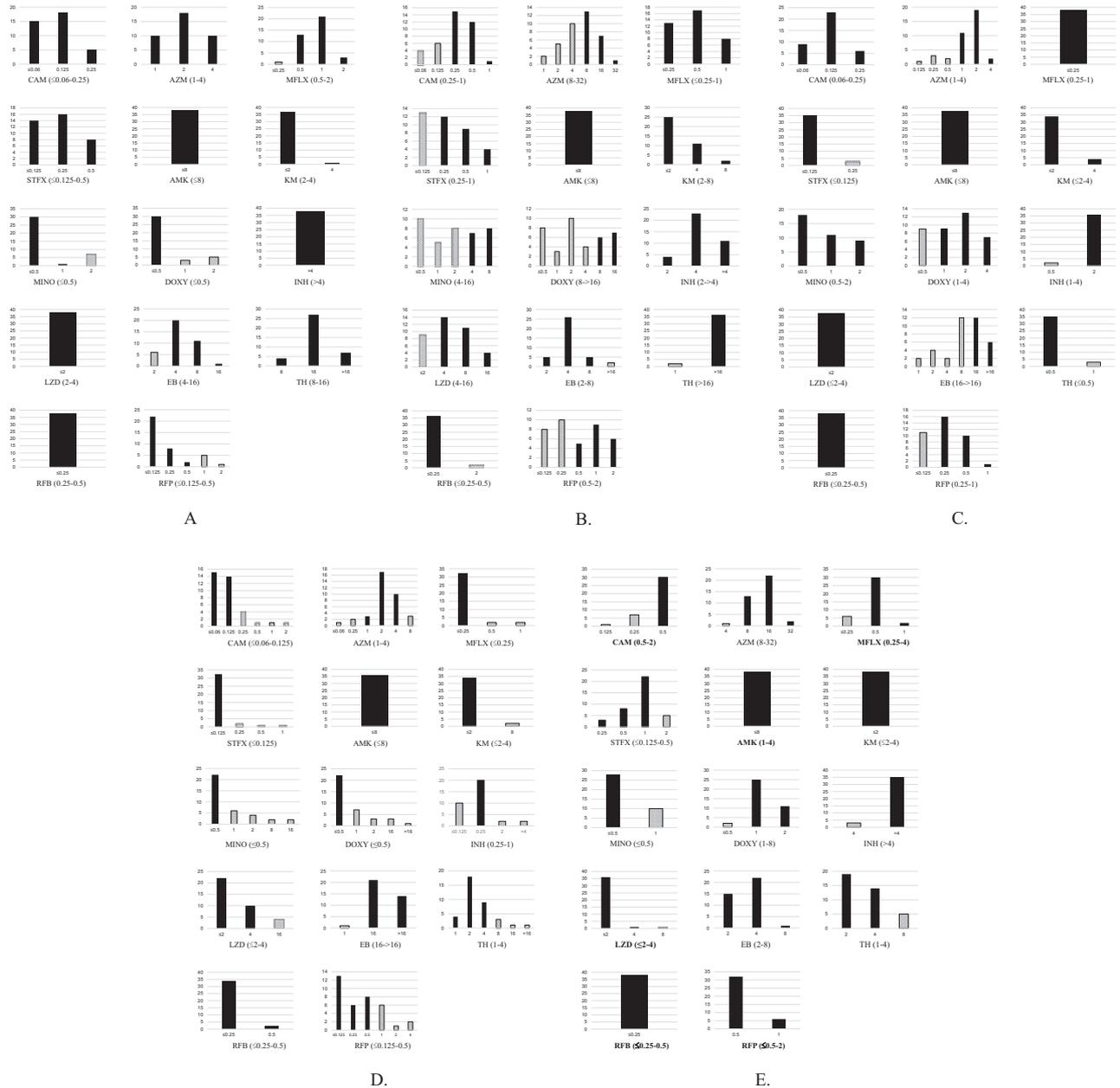


Fig. 2. Distribution of MICs for each species and each drugs.

A. Distribution of MICs for *Mycobacterium avium*

(Banded bar: MICs out of normal range)

B. Distribution of MICs for *Mycobacterium intracellulare*

(Banded bar: MICs out of normal range)

C. Distribution of MICs for *Mycobacterium kansasii*

(Banded bar: MICs out of normal range)

D. Distribution of MICs for *Mycobacterium lentiflavum*

(Banded bar: MICs out of normal range)

E. Distribution of MICs for *Mycobacterium marinum*

(Banded bar: MICs out of normal range, bold-type character: CLSI M62 1st ed. standard)

にかかわった技術者たちは、安定した精度での判定が可能であると思われ、施設間一致率において認められていた判定のバラツキも、判定基準を示すことで一定の改善がみこめることが示唆された。CLSI M62 1st ed.には精度管理株である *M.*

marinum ATCC 927 について、今回用いた薬剤のうち7薬剤の基準濃度が設定されている。この7薬剤のMICがすべて基準範囲に入っていた施設は15施設であり、今回使用したMICプレートは臨床的な使用に堪えるものと考えられた。

Table 3. Reproducibility between facilities (percentage of agreement for the same bacteria species)

Species	CAM	AZM	MFLX	STFX	AMK	KM	MINO	DOXY	INH	LZD	EB	TH	RBT	RFP
<i>M. avium</i>	agree/total	36/38	38/38	38/38	38/38	36/38	36/38	36/38	38/38	38/38	36/38	36/38	38/38	30/38
	Efficiency	94.70%	100%	78.90%	100%	94.70%	94.70%	94.70%	100%	100%	94.70%	94.70%	100%	78.90%
<i>M. intracellulare</i>	95% CI	82.7-98.5	90.8-100	66.0-91.9	90.8-100	82.7-98.5	82.7-98.5	82.7-98.5	90.8-100	90.8-100	82.7-98.5	82.7-98.5	90.8-100	66.0-91.9
	agree/total	30/38	32/38	36/38	36/38	38/38	36/38	36/38	36/38	36/38	36/38	38/38	38/38	36/38
<i>M. kansasii</i>	Efficiency	78.90%	84.20%	94.70%	100%	84.20%	94.70%	84.20%	94.70%	94.70%	94.70%	100%	100%	94.70%
	95% CI	66.0-91.9	72.6-95.8	82.7-98.5	90.8-100	82.7-98.5	82.7-98.5	82.7-98.5	82.7-98.5	82.7-98.5	82.7-98.5	90.8-100	90.8-100	82.7-98.5
<i>M. lentiflavum</i>	agree/total	34/38	34/38	38/38	36/38	38/38	36/38	38/38	38/38	38/38	38/38	36/38	38/38	32/38
	Efficiency	89.50%	89.50%	100%	94.70%	100%	94.70%	73.70%	100%	100%	100%	94.70%	100%	84.20%
<i>M. marinum</i>	95% CI	79.7-99.2	79.7-99.2	90.8-100	82.7-98.5	90.8-100	82.7-98.5	59.7-87.7	90.8-100	90.8-100	90.8-100	82.7-98.5	90.8-100	72.6-95.8
	agree/total	28/36	30/36	36/36	36/36	36/36	36/36	32/36	32/36	32/36	28/36	26/36	36/36	34/36
<i>M. marinum</i>	Efficiency	77.80%	83.30%	100%	100%	100%	100%	88.90%	88.90%	88.90%	77.80%	72.20%	100%	94.40%
	95% CI	64.2-91.4	71.2-95.5	90.4-100	90.4-100	90.4-100	90.4-100	78.6-99.2	78.6-99.2	78.6-99.2	64.2-91.4	57.6-86.9	90.4-100	81.6-98.5
<i>M. marinum</i>	agree/total	36/38	34/38	34/38	34/38	38/38	38/38	34/38	36/38	38/38	34/38	36/38	38/38	38/38
	Efficiency	94.70%	89.50%	89.50%	89.50%	100%	100%	89.50%	94.70%	100%	89.50%	94.70%	100%	100%
<i>M. marinum</i>	95% CI	82.7-98.5	79.7-99.2	79.7-99.2	79.7-99.2	90.8-100	90.8-100	79.7-99.2	82.7-98.5	90.8-100	79.7-99.2	82.7-98.5	90.8-100	90.8-100

Bold-type characters: CLSI M62 1st ed. standard range

臨床でのMICプレートの使用を想定した場合、SGM感染症は原因菌ごとに治療法が異なる⁵⁾⁹⁾。このため微量液体希釈法で得られた結果の解釈は菌によって異なり、それぞれ対応した薬剤感受性試験の報告が求められる²⁾。SGM感染症の大多数を占めるのが *M. avium* あるいは *M. intracellulare* 感染症であり¹³⁾、同感染症の治療は基本的にはCAM、EBおよびRFPの3剤での併用療法が行われ、このうちkey drugとなるのがCAMである⁵⁾⁹⁾。またCLSI M24 3rd ed.においても *M. avium* および *M. intracellulare* に対する臨床効果とMICの間で一定の関連が認められ、報告すべき薬剤としてCAMのMICカテゴリーが示している。そこで今回の *M. avium* と *M. intracellulare* のCAMの成績をみると *M. avium* では100%で全く問題ないと思われるが、*M. intracellulare* では73.7%と38施設中10施設が基準値から外れてMICを低く判定されており、適切な判定指標の設定による精度の改善が必要と思われた。AMKに関しては *M. avium* と *M. intracellulare* 共に100%であるものの、MICはいずれも測定レンジ以下であり、正しく精度を評価できていない可能性を考慮する必要がある。

M. avium あるいは *M. intracellulare* 症に次ぐSGM症は *M. kansasii* 症であり¹³⁾、その治療はRFPが中心である⁵⁾⁹⁾。実際にはRFPにEBおよびINHあるいはマクロライドを加えた3剤で治療するのが一般的である。CLSI M62 1st ed.には検査すべき薬剤のFirst LineとしてCAMとRFPが示されている。この2剤の今回の成績をみるとCAMは全ての施設が基準内に入っており問題ないと思われたが、RFPでは基準内に入った施設が71.1%で、11施設28.9%が基準値より低く判定されていた。再現性に関しては84.2%と良好であったことから適切な判定指標の設定により、精度の改善が見込めるものと考えられた。

M. lentiflavum は *M. avium*、*M. intracellulare* および *M. kansasii* と異なりCLSI M62 1st ed.に個別のMICカテゴリーは示されておらず、区分として *M. avium*、*M. intracellulare* および *M. kansasii* 以外のくくりとなっている。また菌の性状は22℃から37℃の発育温度¹⁰⁾であるものの、今回用いた基準株では37℃よりも、30℃で良好な発育を示していた。しかしCLSI M24 3rd ed.に *M. lentiflavum* に関して個別の設定は設けられていないことから、今回の試験の培養温度は36±1℃で実施している。このため他の菌種に比べ発育がやや劣りCAM、MINOおよびDOXYなど薬剤によってはMIC分布が基準から外れるケースを認め、判定のむずかしさが表れている。しかし培養温度を37℃から30℃へ変更すると、*M. lentiflavum* ATCC51985で今回用いた薬剤のうちINH、THおよびEBでは同等であったが、それ以外の11薬剤でMICが2管以上高くなる(内部データ)ことを確認しており、判定指標による精度向上に加え、測定条件の設定が必要な菌種であると言える。

M. avium、*M. intracellulare* および *M. kansasii* 以外のSGMについてもCLSI M62 1st ed.には薬剤のブレイクポイントが設定されている。しかしこれら希少SGM感染症では、多くの場合で治療のガイドラインが設定されておらず、今後の更なる細菌学的データの蓄積が必要と思われる。こうしたことから、今回のMICプレートにはCLSI推奨基準以外の

薬剤も含まれている。これはSGM感染症の治療薬の模索と、データ蓄積を目的とした構成となっており、臨床効果との相関性を見極めながら適時更新が必要と思われる。

今回参加した施設の多くが、設定した基準値の範囲内に入る結果を報告しており、SGM用MICプレート(現プロスミックSGM, 極東製薬工業)は臨床細菌検査の場において、十分に使用に堪えるものと結論付けることが可能であると思われる。一方で今回参加したいいくつかの施設は、基準値から外れた結果を報告している。SGMの中には発育速度や至適培養温度の観点から発育が良好でない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。CLSI M24 3rd ed.にも非結核性抗酸菌のMIC測定においては熟練した技術に加え、各菌種の予想される感受性パターンに関する知識が必要であると示されている。さらに自施設で非結核性抗酸菌の薬剤感受性試験を実施するにあたっては、外部精度評価プログラムを用いた技能評価を実施するか、信頼できる検査室からの検査結果と比較するなどし、自施設の検査性能を評価する必要性を示している。今後は各検査室における、導入時および継続的な精度の維持を目的とした外部精度評価プログラムの構築が必要であると思われる。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- Namkoong, H, A Kurashima, K Morimoto, et al. 2016. Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan. *Emerg Infect Dis* 22: 1116-1117.
- 日本結核・非結核性抗酸菌症学会教育 抗酸菌検査法検討委員会. 2020. 抗酸菌検査ガイド2020, 南江堂, 東京.
- 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.
- 日本結核病学会非結核性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.
- Daley, CL, et al. 2020. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: An official ATS/ERS/ESCMID/ IDSA clinical practice guideline. *Clin Infect Dis* 71: e1-36.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae* spp. , and Other Aerobic *Actinomycetes*, M24, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae* spp. , and Other Aerobic *Actinomycetes*, 1st ed. CLSI supplement, M62, Wayne, PA.
- 日本結核・非結核性抗酸菌症学会 非結核性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. アミカシン硫酸塩吸入用製剤 (amikacin liposome inhalation suspension: ALIS 販売名 アリケイス[®]吸入液 590 mg) に関する使用指針. 結核 97: 1-2.
- 日本結核・非結核性抗酸菌症学会教育・用語委員会. 結核症の基礎知識 (改訂第5版), VII. 非結核性抗酸菌症. 結核 96: 119-123.
- Springer, B., Wu W.K., Bodmer T., et al. 1996. Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1100-1107.

MIC measurement kit for Slow Growing mycobacteria multicenter evaluation

Akio Aono¹⁾, Kinuyo Chikamatsu¹⁾, Yuriko Igarashi¹⁾, Manabu Inoue²⁾, Maki Kitagawa²⁾, Yoshiko Shimomura¹⁾, Makiko Hosoya¹⁾, Yuta Morishige¹⁾, Yoshiro Murase¹⁾, Akiko Takaki¹⁾, Satoshi Mitarai^{1) 3)}

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

²⁾ Product Development Division KYOKUTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIAL CO., LTD.

³⁾ Basic Mycobacteriosis, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

In March 2023, Kyokuto Pharmaceutical Industries, Ltd. released a MIC assay kit for slow-growing non-tuberculosis Mycobacteria (SGM) in compliance with CLSI M24 3rd ed. Prior to this, we conducted a multicenter study to evaluate the clinical feasibility of the kit for MIC measurement of SGM. The MIC assay was performed according to the criteria of CLSI M24 3rd ed. The overall concordance rate by agent was 69.1% to 98.9%, and the reproducibility of MICs was good, with 68.6% (95% CI: 57.7-79.4) of each drug showing reproducibility of 90.0% or higher, suggesting that the kit is suitable for use in clinical bacteriological testing. On the other hand, some laboratories reported results that deviated from the reference values, which commonly occurs in MIC measurement, then appropriate and continuous training before and after the introduction of the kit is considered necessary.