

原 著

Mycobacterium avium Complex に対する抗結核剤の
最小発育阻止濃度測定 of 培養期間について

東 村 道 雄 ・ 一 山 智

国立療養所中部病院内科

受付 昭和 62 年 8 月 10 日

CORRELATION OF MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION VALUES OF
ANTITUBERCULOSIS AGENTS AGAINST *MYCOBACTERIUM AVIUM*
COMPLEX STRAINS WITH INCUBATION PERIOD

Michio TSUKAMURA* and Satoshi ICHIYAMA

(Received for publication August 10, 1987)

The minimal inhibitory concentration (MIC) values of antituberculosis agents (rifampicin, ethambutol, streptomycin and enviomycin) against *Mycobacterium avium* complex strains were determined after incubation at 37°C for 2, 3 and 4 weeks. The testing of the MIC values were carried out using the Ogawa egg medium. Compared with the 2 weeks incubation, longer incubation periods caused increase of the MIC values. The MIC values were most influenced in the testing of the MIC values for rifampicin. The determination of the MIC values could be made after incubation for 2 weeks. Therefore, it is recommended to read the values at 2 weeks.

Key words : Antituberculosis agents, Incubation time, Minimal inhibitory concentration, *Mycobacterium avium* complex

キーワード : 抗結核剤, 培養期間, 最小発育阻止濃度, *Mycobacterium avium* complex

緒 言

日本では、結核菌の抗結核剤感受性の測定は、小川培地を使用して 37°C 4 週培養後に判定されるのが一般的であるように思われる。これに伴って、*Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex (*M. avium* complex) の菌株の検査も同じようにして行われていることが多い。しかし、*M. avium* complex の発育 (集落形成) は、一般に結核菌よりも少し速いので、果たして、同じように 4 週判定でよいのだろうかという疑問が起こる。もし、もっと早く判定できるものであれば、そ

うした方がよいのに決まっているからである。

研究 方 法

最近 (1986 年) に患者の喀痰から分離し、*M. avium* complex と同定した 10 株を使用した。同定の方法は既報によった¹⁾。

感受性検査には、「1%小川培地」を使用した。Rifampicin (RFP) は 20mg/ml の割合に propylene glycol に溶解し、他の ethambutol (EB), streptomycin sulfate (SM) 及び enviomycin sulfate (EV M) は蒸留水に溶解し、それぞれ 5 mg/ml, 20mg/ml,

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

Table 1. Relationship between the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antituberculosis Agents against *Mycobacterium avium* Complex Strains and the Incubation Time for Reading

Antituberculosis agent	Strain No.	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
		Incubation period		
		2 weeks	3 weeks	4 weeks
Streptomycin	1	25	25	25
	2	12.5	25	25
	3	1.6	1.6	1.6
	4	100	100	100
	5	1.6	1.6	1.6
	6	1.6	1.6	1.6
	7	200	> 200	> 200
	8	100	200	200
	9	12.5	12.5	12.5
	10	6.25	25	25
Enviomycin	1	50	100	100
	2	25	50	50
	3	6.25	6.25	6.25
	4	25	50	50
	5	6.25	6.25	6.25
	6	1.6	1.6	1.6
	7	> 400	> 400	> 400
	8	100	200	200
	9	25	25	25
	10	50	50	50
Rifampicin	1	6.25	25	50
	2	12.5	25	50
	3	0.8	0.8	0.8
	4	3.13	6.25	6.25
	5	1.6	1.6	1.6
	6	0.8	0.8	0.8
	7	> 200	> 200	> 200
	8	> 200	> 200	> 200
	9	1.6	6.25	6.25
	10	0.8	3.13	6.25
Ethambutol	1	12.5	12.5	12.5
	2	3.13	6.25	12.5
	3	0.8	0.8	0.8
	4	6.25	6.25	12.5
	5	0.8	0.8	0.8
	6	0.8	0.8	0.8
	7	12.5	25	25
	8	12.5	12.5	12.5
	9	6.25	6.25	6.25
	10	3.13	6.25	6.25

Serial twofold dilutions of antituberculosis agents were prepared and these were added to the Ogawa egg medium before sterilization. The medium was poured in 7 ml quantities into tubes, 165 by 16.5 mm, and made as slopes by sterilization at 90°C for 60 minutes. The following concentrations were used for testing the minimal inhibitory concentration: Enviomycin, 400–1.6 $\mu\text{g/ml}$; rifampicin and streptomycin, 200–0.8 $\mu\text{g/ml}$; ethambutol, 50–0.2 $\mu\text{g/ml}$. To each series, one control medium containing no agent was added. Each medium was inoculated with a 0.02 ml – sample of bacterial suspension by a spiral loop that can deliver a 0.02 ml – sample by one inoculation, and the tubes inoculated were incubated at 37°C. The bacterial suspension used for inoculation was a 10 mg wet weight per ml suspension prepared from a 14 day – old culture of the test strains. The minimal inhibitory concentration was determined as a concentration on which no membranous growth occurred.

Table 2. Increase of Minimal Inhibitory Concentration Values against *Mycobacterium avium* Complex Stains Caused by Extension of Incubation Period

Antituberculosis agent	Number of strains showing increase of minimal inhibitory concentration compared with that after incubation for 2 weeks				
	Incubation period : 3 weeks		Incubation period : 4 weeks		
	Twofold increase	Fourfold increase	Twofold increase	Fourfold increase	Eightfold increase
Streptomycin	3 / 10	1 / 10	3 / 10	1 / 10	
Enviomycin	4 / 10		4 / 10		
Rifampicin	2 / 10	3 / 10	1 / 10	2 / 10	2 / 10
Ethambutol	3 / 10		3 / 10	1 / 10	

40mg/mlの溶液を作った。これらを蒸留水で倍数希釈し、その1容を滅菌前の小川培地100容に添加し、7mlずつ165×16.5mmの試験管に分注し、90℃60分間滅菌して斜面培地とした。希釈列は2⁻⁸まで作り、原液添加の培地と薬剤を含め対照培地と合わせて10本1組とした。

被検株は37℃に2週間培養して菌液(10mg/ml湿菌量)を作り、この0.02mlずつを上記の各培地に渦巻白金耳で接種した。渦巻白金耳は、1接種で0.02mlが接種できるように調製した。接種後の試験管に、底に3mmの切れ目のあるダブルゴム栓を覆せ、37℃に培養した。集落発生状態は、毎週観察し4週までつづけた。

最小発育阻止濃度(MIC)は、菌膜(薄膜を含む)を発生しない最小濃度として判定した。

研究結果

成績をTable 1及び2に示した。2週判定に比較して、3週判定では、SMのMIC値が2倍になる株が3株、4倍になるものが1株あった。この関係は、判定を4週にしても同じである。EVMのMIC値も、3週または4週培養で判定すると、4株が2倍になった。RFPのMIC値は、2週判定と比べて、3週では、2倍となるものが2株、4倍となるものが3株あった。これを4週判定にすると、MIC値が8倍まで上昇するものが2株、4倍となるものが2株、2倍となるものが1株あった。EBのMIC値も、判定を3ないし4週にすることで2倍~4倍になるものが4株あった。いずれの抗結核剤についても、3または4週判定では、2週判定と比較して、MIC値が上昇するものがかなりあった。特に、RFPのMIC値は、判定時期をずらすと大きく出る傾向が強かった。

考 察

本報の研究結果は、*M. avium* complexの抗結核剤感受性の測定が2週培養後に十分可能であることを示した。しかも、培養期間を3週または4週まで延長すると、MIC測定値が2~8倍まで増大することがあった。培養期間延長の影響は、特にRFPで大きいように思われた。このMIC値上昇は、次の理由によると思われる。第一は、結核菌でも知られるごとく、抗結核剤の作用が殺菌的ではなく発育遅延作用であるために、培養期間の延長に伴って集落の増大が起こるためと思われる²⁾。第二は、培養によってRFPの培地内分解が起こるためと思われる²⁾³⁾。

冒頭で述べたごとく、日本では、結核菌の抗結核剤感受性測定法が、そのまま*M. avium* complexにも準用されているため、37℃4週培養後に結果を判定するのが一般的である。ところが、本報の結果は、4週後の判定では、2週後判定に比べて、しばしば、感受性が低く出ることを示している。感受性の判定をいつ行うべきかは、次の条件を考慮して決めるべきであろう。

1) 臨床医は、感受性検査の結果を可及的速く知りたい。これを考えれば、2週で判定可能であれば、2週判定がよいことは明らかである。

2) 次の問題点は、いつ判定すれば、感受性検査の結果と抗結核剤の臨床効果とが、よりよく一致するかということである。これに関しては、現在、よく分かっていない。しかし、我々は、最近、2週判定での感受性測定の結果が、ある程度、*M. avium* complex肺感染症に対する抗結核剤の臨床効果と一致することを観察している(1987年4月、日本結核病学会総会報告)⁴⁾。

以上を考慮すると、*M. avium* complexの抗結核剤

感受性の判定は、一応、2週培養で行って、その観察結果と臨床効果の関係を追求してゆくべきであると考え。

上述のごとく、*M. avium* complex 株の MIC 値測定は、たいていの場合、2週判定が可能である。しかし、*M. avium* complex 株の中には、少数ではあるが、結核菌以上に発育速度が悪い "dysgonic" 株がある。これらの遅発育性株の発育を速くするためには、小川培地または Sauton 寒天培地に Tween 80 を添加するとよい⁵⁾。しかし、Hui et al.⁶⁾によると、*M. smegmatis* ATCC 607 株の RFP 感受性が Tween 80 添加によって高かったという。最近の我々の研究結果によると、*M. avium* complex 株の RFP 感受性も Tween 80 で菌を処理することによって高まった。従って、Tween 80 添加によって、遅発育性の *M. avium* complex 株の発育を促進してやると、RFP 感受性が実際よりも高くでる恐れがある。この遅発育性菌の感受性検査をどうするかは、向後の問題として残される。

結 論

「1%小川培地」を使用して、*M. avium* complex の抗結核剤 (RFP, EB, SM, EVM) 感受性を測定する場合、2週培養で十分成績判定が可能である。3週または4週培養で結果を判定すると、しばしば、感受性が2~8倍低くなる。*M. avium* complex の抗結核剤感受

性検査の判定は、2週培養後に判定することを原則とすべきである。そして、この成績を基準として、向後、臨床効果との対応を観察すべきであると思われる。

文 献

- 1) Tsukamura, M. : Numerical identification of slowly growing mycobacteria. *Microbiol. Immunol.* 29 : 1039-1050, 1985.
- 2) 束村道雄他 : 抗結核剤の結核菌発育遅延作用の比較, *結核*, 55 : 365, 1980.
- 3) 田村昌敏他 : 各種の因子が rifampicin の結核菌最低発育阻止濃度に及ぼす影響に関する研究, *結核*, 48 : 463, 1973.
- 4) 束村道雄・一山 智 : 抗結核剤は *Mycobacterium avium* 肺感染症に対して治療効果があるのか? *結核*, 62 : 189, 1987 (第62回日本結核病学会総会報告抄録).
- 5) 束村道雄他 : Tween 80 による遅発育性 *Mycobacterium intracellulare* の発育促進, *結核*, 45 : 195, 1970.
- 6) Hui, J. et al. : Permeability barrier to rifampin in mycobacteria. *Antibiot. Agents Chemother.* 11 : 773, 1977.