

原 著

Mycobacterium avium–*Mycobacterium intracellulare*
Complex の抗結核剤感受性の測定法

束 村 道 雄

藤田学園保健衛生大学医学部微生物学教室
国立療養所中部病院抗酸菌研究施設

受付 平成元年12月6日

DETERMINATION OF THE SUSCEPTIBILITIES TO ANTITUBERCULOSIS
AGENTS IN *MYCOBACTERIUM AVIUM*–*MYCOBACTERIUM*
INTRACELLULARE COMPLEX

Michio TSUKAMURA *

(Received for publication December 6, 1989)

The determination of the susceptibilities to antituberculosis agents in *Mycobacterium avium*–*Mycobacterium intracellulare* complex (MAI complex) is influenced by the size of inoculation used in the determination. Such influences differ greatly according to the drugs. By increasing the number of colony-forming units (CFU) of the inoculation to 10^6 -fold, minimal inhibitory concentrations (MICs) of rifampicin and cycloserine have increased only 2- to 3-fold. However, MICs of ethionamide, streptomycin, enviomycin and ethambutol have increased 4- to 9-fold. In contrast, MICs of isoniazid and sulfadimethoxine have increased 30- to 35-fold. Since the determination of MICs of isoniazid and sulfadimethoxine are so greatly influenced by the size of inoculation, the determinations of MICs of these two drugs should be carried out by use of the "actual count" method (6, 7, 9) or the proportion method (8). In the actual count method, the MIC is determined by inoculating 20–100 CFU.

The determination of isoniazid susceptibility of *M. tuberculosis* (H37Rv) was influenced only slightly by the size of inoculation, but that of *M. bovis* (BCG) was influenced greatly as occurred in the determination of MAI complex strains.

Key words : *Mycobacterium avium*–*Mycobacterium intracellulare* complex, Susceptibility testing to antituberculosis agents

キーワード : *Mycobacterium avium*–*Mycobacterium intracellulare* complex, 抗結核剤感受性測定

* From the Department of Microbiology, Fujita Gakuen Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi 470-11 Japan.

緒言

Mycobacterium avium–*Mycobacterium intracellulare* complex による感染症は、今日の日本では、決して稀とはいえない感染症となった。しかし、難治のことが多く、最も厄介な感染症の1つともいえる。最近、MAI complex (*Mycobacterium avium*–*M. intracellulare* complex を MAI complex と略す) 感染症の治療効果と、この菌の抗結核剤感受性との間に、関係があることが報告され、感受性検査も重要であると考えられつつある¹⁾²⁾。

しかし、感受性の境界濃度 (critical concentration) をどこに引くべきかについては、明確な consensus ができていない。東村・一山³⁾ は、感受性検査の判定を、37°C 2週培養後に行うことを提唱した。非定量的な、ある程度大きい接種菌量を用いる場合、間接法検査で、結核菌の場合は、たいがい4週で判定されているが、MAI complex の場合は、もっと早く判定できる。MAI complex の性質も、まだ十分に分かっていない。10⁵~10⁶ 生菌単位 (colony-forming units=CFU) を接種に用いた場合、小川培地では、結核菌の場合より、ずっと早く判定ができるのに、“actual count” が可能な20~100 CFU の接種では、約半数の菌株の成績判定は、結核菌なみに4週くらいかかる。この原因として、Tsukamura⁴⁾⁵⁾ は、MAI complex の方が、単位重量に含まれる CFU が大きいことを指摘している。

最近、筆者は、MAI complex の感受性検査を、どうすべきか考えて実験している間に、接種菌量による最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration = MIC) の変化が、MAI complex の場合、結核菌に比してかなり大きいことを見出した。特に、INH (isoniazid) と SX (sulfadimethoxine) の場合に、特に大きい。本報では、この現象を報告するとともに、MAI complex の抗結核剤感受性測定法について考察を行いたい。

実験方法

MAI complex 9株と *M. tuberculosis* 05001 (H37 Rv) および *M. bovis* 06003 (BCG 日本株) の合計11株を使用した。感受性測定は、「1%小川培地」を使用して行った。使用した抗結核剤は、RFP (Rifampicin, Lepetit, Milano), SM (streptomycin sulfate, 明治製薬), TH (ethionamide, 塩野義製薬), INH (isoniazid, 塩野義), EB (ethambutol, 科研化学), EVM (enviomycin sulfate, 東洋醸造), SX (sulfadimethoxine, 中外製薬), CS (cycloserine, 和光純薬) である。RFP と TH は propylene glycol に、他は蒸留水に溶解し、その溶液1容を、滅菌前の小川培地

100容に加えて所要濃度とした。培地は、7 ml ずつ 165 × 16.5 mm の試験管に分注し、90°C 60分間滅菌して斜面培地とした。

被検株は、小川培地に白金耳で塗抹し、37°C 10日間培養し、発育した集落を、ガラス玉入りコルペンで5日間振盪して、0.1% Tween 80 水溶液に浮遊させて、湿菌量 10 mg/ml の菌液を作った。これを、0.1% Tween 80 水溶液で10倍希釈し、10⁻⁷に至った。接種には、原菌液、10⁻¹, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ の5種の菌液を使用し、その0.02 ml ずつを渦巻白金耳 (1白金耳で0.02 ml となるように調製) で、小川培地に接種した。接種した試験管には、底に3 mm の切れ目のあるダブルゴム栓を覆せ、37°C に培養した。10⁰ および 10⁻¹ 菌液接種の場合、対照と同じ発育を示す培地と比較して、急に発育が著減する濃度を MIC とした。一方、10⁻⁵~10⁻⁷ 菌液接種の場合は、対照培地が、20~100個の集落を示した接種系列で、発育が完全に阻止された最小濃度を MIC とした。この感受性測定法は、いわゆる“actual count”法⁶⁾⁷⁾である。方法の原理も方法も、Canetti et al.⁸⁾ の“proportion method”とまったく同じである⁹⁾。

菌液を作るのに、0.1% Tween 80 液を用いたが、実験に要したとき10分位の Tween 80 接触では、CFU の減少も、感受性の変化もまったく起こらなかった。この点、外国のある報告¹⁰⁾とはまったく異なる結果を得た。蒸留水に浮遊させた場合と、0.1% Tween 80 液に浮遊させた場合では、ほとんど常に、後者の方が高い CFU をえた。おそらく、Tween 80 によって、菌の clumping が減少するためと思われる。

なお、“actual count”が可能になるほどの集落の大きさを得るまでの培養期間は、菌株により異なった。おおよそ、3週または4週かかった。接種生菌単位数の大小に伴う MIC の変化は、10⁰~10⁻⁷ 菌液接種で同じ時期に判定した。

使用した薬剤希釈列は、2倍希釈列であった。使用した最大濃度は、RFP 200 µg/ml ; SM 200 µg/ml ; TH 200 µg/ml ; INH 200 µg/ml ; EB 50 µg/ml ; EVM 400 µg/ml ; SX 50 µg/ml ; CS 50 µg/ml であった。

実験成績

実験成績を Table 1 および 2 に示す。Table 1 の上段に示した MICs は、“actual count”法によって得た値、下段に示した MICs は、その10⁶倍 (100万倍) の CFU を接種して得られた値である。Table 2 に、両者の MICs の差を倍率で示す。10⁶倍の接種生菌単位 (CFU) を使用することによる MIC 値の上昇率平均値は、Table 2 の最下段に示されている。

接種生菌単位の量が変わっても、CS の MIC 値は、影響が最も少なく、接種量が10⁶倍に増えても、MIC

Table 1. Change of Minimal Inhibitory Concentrations by Size of Inoculation

Strain ^{a)}	Rifampicin	Streptomycin	Ethionamide	Isoniazid	Ethambutol	Enviomycin	Sulfadimethoxine	Cycloserine
11004 (1)	200.	12.5	50.	6.3	1.6	25.	3.2	12.5
	>200.	50.	200.	200.	50.	200.	25.	25.
11009 (1)	0.8	12.5	50.	3.2	3.2	12.5	0.4	12.5
	25.	50.	50.	200.	25.	100.	25.	25.
13008 (20)	0.4	1.6	6.3	0.4	0.2	1.6	0.2	6.3
	0.8	25.	100.	50.	3.2	25.	25.	25.
13016	0.4	3.2	25.	1.6	0.8	12.5	0.2	25.
	0.8	12.5	200.	50.	1.6	25.	12.5	25.
13021 (4)	0.4	0.8	6.3	1.6	0.2	0.8	0.2	3.2
	0.8	12.5	100.	200.	3.2	25.	25.	25.
13032 (12)	100.	12.5	25.	0.8	6.3	100.	3.2	3.2
	>200.	200.	50.	25.	25.	400.	25.	3.2
13034 (18)	100.	50.	25.	0.8	1.6	50.	1.6	12.5
	200.	100.	50.	6.3	50.	200.	25.	12.5
13038 (18)	25.	50.	6.3	0.8	0.8	25.	1.6	12.5
	100.	>200.	50.	25.	12.5	50.	25.	12.5
13887 (14)	0.4	1.6	50.	1.6	0.4	1.6	0.2	12.5
	0.4	6.3	100.	12.5	1.6	12.5	6.3	12.5
05001 (H37Rv)	3.2	6.3	6.3	0.02	0.2	6.3	6.3	6.3
	12.5	12.5	12.5	0.05	3.2	25.	50.	6.3
06003 (BCG)	3.2	1.6	6.3	0.05	0.8	1.6	25.	12.5
	12.5	6.3	25.	6.3	3.2	12.5	25.	25.

a) The numbers shown in brackets are the number of serovars determined by Drs. H. Nemoto and H. Yugi, National Animal Health Institute, Ibaraki.

The numbers shown in table are the minimal inhibitory concentrations. The upper row show the minimal inhibitory concentrations determined by the "actual count" method, in which 20-100 colony-forming units were used as the inoculation. The lower row show the minimal inhibitory concentrations determined by inoculating 10^6 -fold colony-forming units.

は平均1.7倍大きくなるだけである。これに次いで、RFPのMICも、影響が少ない。接種量を 10^6 倍にしても、MICの上昇は、平均2.7倍にとどまる。以下、影響は、TH, SM, EVM, EBの順に大きくなる。EBのMIC値測定に対する接種生菌単位の影響は、かなり大きく、 10^6 倍接種で平均8.5倍の増大となる。しかし、INHとSXのMIC値測定に対する影響は、これよりもはるかに大きい。接種生菌単位を 10^6 倍に上げることで、INHのMIC値は、平均34.5倍に、SXのそれは、平均29.7倍に上昇した。

考 察

現在、MAI complex感染症は、稀な疾患ではない。私どもの中部病院でも、入院または外来治療中の本症の患者は、数十名いる。しかし、本症の治療は容易なことではない。今まで、いろいろな工夫をこらしたが、特に

有効な治療法はみつからない。しかし、若干数の患者では、在来の抗結核剤でも、排菌が停止した。しかし、空洞まで完全に消失する例は少ない。このように、予後の良い患者のMAI complexの抗結核剤感受性を調べてみると、結核菌並みの感受性を示すことが分かり、試験管内感受性試験と治療効果の間に関連性があると思われる²⁾。

われわれは、上述の感受性検査を行うにあたって、約10 mg/mlの菌液を作り、その0.02 mlを小川培地に接種する方法を使用した。この接種量中に含まれる生菌単位(CFU)は、 $10^7 \sim 10^8$ であって、結核菌の 10^6 前後と比較して、かなり大きい。このような「非定量的方法」でも、感受性試験によるMIC値の再現性は、かなり良い²⁾。しかし、感受性試験の方法として、より正確(再現性が高い)と信じられている"actual count"法またはproportion method⁶⁾⁻⁹⁾と比べて、どのくら

Table 2. Elevation of Minimal Inhibitory Concentrations Caused by Inoculating 10^6 -fold colony-forming units

Strain	Increase of minimal inhibitory concentration (-fold)							
	Rifampicin	Streptomycin	Ethionamide	Isoniazid	Ethambutol	Enviomycin	Sulfadimethoxine	Cycloserine
11004	ND	4	4	32	32	8	8	2
11009	32	4	1	64	8	8	64	2
13008	2	16	16	128	16	16	128	4
13016	2	4	8	32	2	2	64	1
13021	2	16	16	128	16	32	128	8
13032	ND	16	2	32	4	4	4	1
13034	2	2	2	8	32	4	16	1
13038	4	ND	8	32	16	2	16	1
13887	1	4	2	8	4	8	32	1
Average fold	$2^{1.43}$ 2.7x	$2^{2.63}$ 6.2x	$2^{2.11}$ 4.3x	$2^{5.11}$ 34.5x	$2^{3.09}$ 8.5x	$2^{2.67}$ 6.4x	$2^{4.89}$ 29.7x	$2^{0.78}$ 1.7x

ND The ratio could not be determined.

い違う MIC になっているのか分からなかった。

本報では、この研究を行ったのであるが、薬剤の種類により、MIC 値測定に対する接種生菌単位の影響が、かなり違うことが分かった。MAI complex の場合、RFP や CS については、少々接種菌量が違って、測定される MIC 値は、あまり変わらないことが分かった。接種菌量の MIC 値測定に及ぼす影響は、TH, SM, EVM, EB の順に大きくなる。EB の感受性検査の場合、かなり接種生菌単位数に気を配らなければならないことが分かった。

以上の抗結核剤に対して、INH と SX の場合、接種生菌単位数が MIC 値測定に及ぼす影響ははなはだ大きい。生菌単位数が増加すると、MIC 値は、30~35 倍も変わってくる。したがって、A の研究者と B の研究者の測定した MIC 値について論じる場合、接種生菌単位数を同じにしておかなければ、比較ができないことになる。研究のために、MAI complex の INH または SX の感受性を調べる場合には、“actual count”法⁶⁷⁾のような、接種生菌単位数を一定化する方法を用いる必要がある。

Proportion method⁸⁾と“actual count”法の測定手技はまったく同じであるが、結果の表現法が異なる。proportion method では、何 $\mu\text{g/ml}$ での survivors が何%または何%の阻止と表現する。“actual count”法では、接種生菌単位 20~100 CFU の場合の MIC 値で表現する。何%といっても、正確なものではありえないから、この方が、表示が簡単である。“actual count”法では、20~100 CFU が完全に阻止された MIC を示す

故、その濃度は、被検細菌集団 (bacterial population) の 95~99 % が完全に阻止される濃度である。

結 論

MAI complex の抗結核剤に対する感受性検査を行う場合、測定される最小発育阻止濃度 (MIC) は、接種する生菌単位数 (colony-forming units=CFU) によって、多少とも影響される。RFP, CS の MIC 測定に対しては、CFU の影響は比較的少ない。しかし、TH, SM, EVM では、接種 CFU 数により 1:4 ないし 1:6 くらいの差が出る。EB の場合は、この変動が 1:9 くらいになる。しかし、INH と SX の場合は、この影響が著しく大きく、変動幅は 1:30~35 となる。したがって、MAI complex の INH および SX に対する感受性を測定する場合は、接種 CFU 数を一定化する必要がある。

文 献

- 1) Horsburgh, C. R., Mason, U. G., Heifets, L. B. et al. : Response to therapy of pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* infection correlates with results of *in vitro* susceptibility testing, *Am Rev Respir Dis*, 135 : 418-421, 1987.
- 2) Tsukamura, M. : Evidence that antituberculosis drugs are really effective in the treatment of pulmonary infection caused by

- Mycobacterium avium* complex, Am Rev Respir Dis, 137 : 144-148, 1988.
- 3) 東村道雄, 一山 智 : *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, 結核, 63 : 107-110, 1988.
 - 4) 東村道雄, 一山 智 : *Mycobacterium avium* complex の菌が他の遅発育性抗酸菌よりも長生きする可能性について, 結核, 63 : 597-600, 1988.
 - 5) Tsukamura, M. : Evidence suggesting that the life span of *Mycobacterium avium* complex is longer than that of other mycobacteria, Microbiol Immunol, 32 : 769-774, 1988.
 - 6) 東村道雄 : Kanamycin の耐性検査, 医学と生物学, 49 : 87-90, 1958.
 - 7) Tsukamura, M. : "Actual count" method for the resistance test of tubercle bacilli, Japan J Tuberc, 12 : 46-54, 1964.
 - 8) Canetti, G., Rist, N. and Grosset, J. : Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie, critères de résistance, résultats, interprétation, Revue de Tuberculose et de Pneumologie, 27 : 217-272, 1963.
 - 9) Canetti, G., Armstrong, A. R., Bartman, K. et al. : Recent progress in drug resistance test for tubercle bacilli (major and minor drugs), Bull Int Union Tuberc, 37 : 185-225, 1966.
 - 10) Hui, J., Gordon, N. and Kajioka, R. : Permeability barrier to rifampin in mycobacteria, Antimicrob Agents Chemother, 11 : 773-779, 1977.