

短 報

Mycobacterium avium および *Mycobacterium intracellulare*
 のニューマクロライド剤, ニューキノロン剤および
 抗結核剤に対する感受性

小川 賢二・三輪 太郎・笹本 基秀
 佐々木 智康・津田 美奈子・本多 康希
 古井 秀彦

国立療養所東名古屋病院呼吸器内科

鳥居 啓三・高木 健三

名古屋大学医学部第2内科

受付 平成4年5月22日

IN VITRO SUSCEPTIBILITIES OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* AND *MYCOBACTERIUM*
INTRACELLULARE TO NEW MACROLIDES, NEW QUINOLONES, AND
 ANTITUBERCULOUS DRUGS ON DUBOS AGAR MEDIUM

Kenji OGAWA*, Taro MIWA, Motohide SASAMOTO, Tomoyasu SASAKI,
 Minako TSUDA, Kousuke HONDA, Hidehiko FURUI,
 Keizo TORII and Kenzo TAKAGI

(Received for publication May 22, 1992)

Mycobacterium avium and *M. intracellulare* were isolated from the sputum of patients infected with atypical mycobacteria using 1% Ogawa medium and identified by the DNA probe test. Then the MICs of various kinds of drugs against these mycobacterial species were determined on Dubos agar medium, and the drug susceptibilities were also determined on 1% Ogawa medium in parallel. The drugs tested were new macrolides, such as clarithromycin (CAM) and roxithromycin (RXM), new quinolones, such as ofloxacin (OFLX) and ciprofloxacin (CPFX), and antituberculous drugs, such as isoniazid (INH), rifampicin (PFP), streptomycin (SM), and ethambutol (EB). The MICs of the drugs tested, especially those of CAM, OFLX, and RFP, when determined on Dubos agar medium, were generally lower against *M. intracellulare* than against *M. avium*. The susceptibilities of the mycobacterial isolates tested to RFP and SM determined on Dubos agar medium were markedly different from those determined on 1% Ogawa medium. Such discrepancies may be accounted for by absorption of these drugs to the egg medium and instability of RFP in the egg medium. Overall, our results indicate that the new macrolides and new quinolones are effective against atypical mycobacteria.

* From the Division of Respiratory Medicine, Department of Internal Medicine, Higashi Nagoya National Hospital, Nagoya 465 Japan.

Key words : New macrolide, New quinolone, Dubos agar medium, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, Susceptibility

キーワード : ニューマクロライド剤, ニューキノロン剤, デュボス寒天培地, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, 感受性

近年, 非定型抗酸菌症の治療は, 従来の抗結核剤多剤併用, 新しいリファマイシンの誘導体, ニューキノロン剤などが試みられている。その臨床効果は, まだ満足の得られる結果とは言えず, 新しい治療薬の開発が待ち望まれている状況にある。1980年代後半に入り, 新しく開発されたニューマクロライド剤である Clarithromycin (CAM), Roxithromycin (RXM) が *Mycobacterium avium* に対し, *in vitro* での最少発育阻止濃度 (MIC), および実験的 *in vitro* 投与の研究で優れた効果を示すことが相次いで報告された^{1)~4)}。これらの基礎的データをもとにして, 1991年 B. Dautzenbergら⁵⁾は, *M. avium* に感染した Acquired immuno deficiency syndrome (AIDS) 患者に対し, CAM の Randomized, double-blind, placebo-controlled trial を行った。これは, 患者を2群に分け, 第1群は CAM 単独で6週間投与の後, プラセボ, rifampin (RFP), isoniazid (INH), ethambutol (EB), clofazimine のプラセボ+4剤で6週間治療, 第2群はまずプラセボ単独で6週間経過をみた後, CAM+前記4剤での治療を6週間行い, 患者血液中 *M. avium* がどう変化するかを, Colony forming units (CFU) で判定した。そして, 途中脱落せずに CAM を投与することのできた両群合わせて11名の患者全員に優れた効果を認め, 播種性の *M. avium* 感染に対し有効であることを報告している。今回われわれは, 主に肺結核後遺症としての非定型抗酸菌感染患者21名の喀痰を, 小川培地を用いて分離培養し, CAM, RXM, Ofloxacin (OFLX), Ciprofloxacin (CPFX), INH, RFP, EB, Streptomycin (SM) 8剤の MIC をデュボス寒天培地で測定, 比較検討を行った。

まず, 抗酸菌同定キット‘小林’ (小林製薬) により, *Mycobacterium avium* complex (MAC) を同定し, 次に DNA プローブを用い *M. avium* と *M. intracellulare* に分離同定した。テスト用キットは Gen-Probe[®], Rapid Diagnostic System (Gen Probe Co., Ltd. USA) のものを使用した。次にこれらの菌の MIC 測定に際して, 以下の3点の変更を除き, 日本化学療法学会の寒天平板希釈法に従って測定した。変更点は, ①使用培地—栄研化学のデュボス液体培地に寒天を最終濃度で1.5%となるように加え, 平板培地とした。②接種菌量—McFarland No. 0.5の濁度の菌液の10倍希釈液 (10^7 CFU) に綿棒を浸し, それを培地面に

塗抹接種した (接種菌量約 10^6 CFU)。③培養日数—乾燥を防いで対照培地における発育が十分となるよう10日間培養した。また, 培地の違いによる感受性の相違を観察するため同一菌に対する1%小川培地での感受性試験も行った。

デュボス寒天培地で得られた結果を Table 1 に示す。まず, *M. avium* についてみると, 同一菌種にもかかわらずその感受性には大きな違いを認める。中でも RFP は, MIC 値が $<0.013\mu\text{g/ml}$ ~ $25\mu\text{g/ml}$ と大きな差を認めた。全体的にみて薬剤の感受性は CAM, OFLX, CPFX, RFP が良好といえる。次に *M. intracellulare* についてみると, *M. avium* に比べ, どの菌も高い薬剤感受性を示している。特に CAM, OFLX, CPFX, RFP は *M. avium* と同様にすぐれた感受性を示している。次に各薬剤の *M. avium* と *M. intracellulare* に対する MIC を比較してみると, CAM, RXM, RFP では, *M. avium* よりも *M. intracellulare* の方が有意 ($P<0.05$) に高い感受性を示している。また, OFLX は同様な傾向を示した。これに対し CPFX, INH, SM, EB では有意な差を認めなかった。次に同一菌に対する1%小川培地での感受性試験の結果を Table 2 に示す。Table 1 の MIC と比較すると, その感受性には相当な差が認められる。特に RFP や SM は著明であり, たとえば症例2の場合, デュボス寒天培地での MIC は RFP ; $<0.013\mu\text{g/ml}$, SM ; $3.13\mu\text{g/ml}$ に対し1%小川培地での感受性は RFP ; $50\mu\text{g/ml}$ で R, SM ; $200\mu\text{g/ml}$ で R とかけ離れた数値を示している。

富岡ら⁶⁾は, MAC を DNA プローブを用いて同定し, 7H11 寒天培地で MIC を測定した。その結果, OFLX, CPFX に対しては, *M. avium* より *M. intracellulare* の方が抵抗性であったが, RFP, SM, EB に対しては *M. intracellulare* の方がより感受性であり, INH には有意な差は認めなかったと報告している。今回のわれわれの結果とは若干異なるところもあるが, 総じて *M. intracellulare* の方に薬剤感受性が高く, *M. avium* に比べ *M. intracellulare* の方が臨床的に予後良好であるという点で一致していると思われる。

ところで得られた MIC を分析する上で臨床的に重要なことは, 各薬剤が通常の投与量でどの程度の血中濃度, 喀痰中濃度ないしは気管支分泌物中濃度を示すかという点である。現在までに発表されているデータの中で主なもの挙げると, CAM は 200mg 内服2時間後の最高

Table 1 Susceptibilities of *M. avium* and *M. intracellulare* Isolated from Patients Infected with MAC to Various Drugs

Case No.	Initial	Sex	Age	Species	MIC*							
					CAM	RXM	OFLX	CPFX	INH	RFP	SM	EB
1	■■■■	M	71	<i>M. avium</i>	0.39	1.56	3.13	0.78	3.13	0.39	6.25	100
2	■■■■	M	87	<i>M. avium</i>	0.78	3.13	0.39	<0.013	3.13	<0.013	3.13	6.25
3	■■■■	M	79	<i>M. avium</i>	3.13	12.5	3.13	0.78	25	0.78	3.13	>100
4	■■■■	M	65	<i>M. avium</i>	3.13	12.5	1.56	0.20	3.13	0.10	3.13	25
5	■■■■	M	79	<i>M. avium</i>	3.13	25	12.5	3.13	6.25	1.56	12.5	100
6	■■■■	F	64	<i>M. avium</i>	6.25	25	0.78	0.39	3.13	3.13	12.5	25
7	■■■■	M	62	<i>M. avium</i>	3.13	25	3.13	0.78	25	12.5	6.25	25
8	■■■■	M	69	<i>M. avium</i>	3.13	25	25	0.78	100	6.25	12.5	100
9	■■■■	M	78	<i>M. avium</i>	12.5	50	1.56	0.39	25	25	12.5	12.5
10	■■■■	M	50	<i>M. avium</i>	12.5	50	12.5	6.25	25	25	25	25
11	■■■■	M	54	<i>M. avium</i>	3.13	50	0.78	0.20	6.25	3.13	25	12.5
12	■■■■	F	69	<i>M. avium</i>	3.13	50	1.56	0.78	12.5	3.13	6.25	25
13	■■■■	F	68	<i>M. intracellulare</i>	0.20	0.78	3.13	0.39	3.13	0.05	1.56	12.5
14	■■■■	M	75	<i>M. intracellulare</i>	0.20	0.78	3.13	0.78	100	0.025	1.56	12.5
15	■■■■	F	80	<i>M. intracellulare</i>	0.39	1.56	1.25	3.13	>100	1.56	50	>100
16	■■■■	F	75	<i>M. intracellulare</i>	0.39	1.56	0.78	0.39	12.5	0.10	3.13	25
17	■■■■	F	77	<i>M. intracellulare</i>	0.39	3.13	1.56	0.39	6.25	0.10	3.13	12.5
18	■■■■	M	47	<i>M. intracellulare</i>	0.39	3.13	0.78	0.39	6.25	0.10	3.13	100
19	■■■■	F	85	<i>M. intracellulare</i>	1.56	12.5	0.78	0.39	50	3.13	50	50
20	■■■■	F	67	<i>M. intracellulare</i>	0.78	12.5	3.13	0.78	25	0.39	6.25	12.5
21	■■■■	M	68	<i>M. intracellulare</i>	0.39	25	1.56	0.20	12.5	0.05	6.25	6.25

*MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) indicates the concentration of drug at which 90% of *M. avium* and *M. intracellulare* were inhibited.

血中濃度が $1.36 \pm 0.13 \mu\text{g}/\text{ml}$, 150mg 内服 3 時間後の気管支分泌物濃度が $0.61 \sim 2.20 \mu\text{g}/\text{ml}$, また喀痰中最高濃度が $2.81 \mu\text{g}/\text{ml}$; RXM は 150mg 内服 2 時間後の最高血中濃度が $5.70 \pm 0.96 \mu\text{g}/\text{ml}$, 3 ~ 6 時間後の最高喀痰中濃度の平均が $0.33 \mu\text{g}/\text{ml}$; OFLX は, 200 mg 内服 2 時間後の最高血中濃度が $1.78 \sim 5.94 \mu\text{g}/\text{ml}$, 最高喀痰中濃度が $1.32 \sim 4.38 \mu\text{g}/\text{ml}$; CPFX は 200mg 内服で得られる最高血中濃度が $0.88 \sim 0.90 \mu\text{g}/\text{ml}$, 最高喀痰中濃度が $0.26 \sim 0.69 \mu\text{g}/\text{ml}$; INH は 0.3g 内服 2 ~ 4 時間後の血中濃度が $5 \sim 6 \mu\text{g}/\text{ml}$; RFP は 0.45 g 内服 1.55 時間後が $14.76 \mu\text{g}/\text{ml}$, 8 時間後が $4.97 \mu\text{g}/\text{ml}$; SM は 1g 筋注 1 ~ 2 時間後で $25 \sim 40 \mu\text{g}/\text{ml}$; EB は 15mg/kg 内服 3 時間後で $1.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。

これらのデータに今回得られた結果を比較して考えると, CAM は *M. avium* 12 例中の 2 例および *M. intracellulare* 9 例中の 9 例に対し治療効果が望められると思われる。また RXM は単独では効果を期待し難い。ただ, RXM は *in vitro* ではあるが, RFP との組合せで著明な相乗効果を示すことが報告されている。これは *M. avium* に対し, 単剤で MIC が RXM $16 \mu\text{g}/\text{ml}$, RFP $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ の時, この 2 剤を組合せると RXM + RFP が $0.25 + 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるというもので RXM や

RFP に耐性の菌に対しての効果が期待できる²⁾。

OFLX, CPFX は共に良好な結果で, ケース No.5,10 の 2 例を除き, 効果が期待できるレベルにある。また抗結核剤では RFP が好結果を得ており, ケース No.9,10 を除き効果が望められると思われる。INH は *M. avium* 4 例, *M. intracellulare* 1 例, SM は 1g 筋注によって得られる血中濃度から考えればケース No.5 を除きほぼ全例に治療効果が望められると思われる。これに対し EB は耐性が強く全例治療効果を望み難い。薬剤耐性の高度な菌に対しては抗結核剤多剤併用ではなく, CAM, RFP, OFLX もしくは CPFX といった薬剤を組合せる方がより高い治療効果を望められると思われる。

最後に, 使用培地の違いによる菌発育阻止能の違いについては慎重な検討を要するが, 小川培地が卵培地であり, 薬剤吸着のリスクがあること⁷⁾や RFP の力価が日を追って低下する点⁸⁾などを考慮すれば, 抗酸菌に対する感受性試験方法の検討は今後の課題といえる。われわれの施設では今回得られたデータを基に, *M. avium* complex 症に対するニューマクロライド剤の臨床応用を検討中である。

Table 2 Susceptibilities on 1% Ogawa Medium of Clinically Isolated *M. avium* and *M. intracellulare*

Case No.	Drug $\mu\text{g/ml}$	INH		RFP		SM		EB	
		1	5	10	50	20	200	2.5	5
1		R	R	R	R	R	R	R	R
2		R	S	R	R	R	R	R	R
3		R	R	R	R	R	R	R	R
4		R	R	R	R	R	R	R	R
5		R	S	R	R	R	S	R	R
6		R	S	R	R	R	S	R	R
7		R	R	R	R	R	S	R	R
8		R	R	R	R	R	R	R	R
9		R	S	R	R	R	S	R	R
10		R	S	R	R	R	S	R	R
11		R	S	R	R	R	S	R	R
12		R	S	R	R	R	S	R	R
13		R	S	R	R	R	S	R	R
14		R	R	R	R	R	S	R	R
15		R	R	R	R	R	S	R	R
16		R	R	R	R	R	R	R	R
17		R	R	R	R	R	S	R	R
18		R	S	R	R	R	S	R	R
19		R	R	R	R	R	S	R	R
20		R	R	R	R	R	R	R	R
21		R	S	R	S	S	S	R	R

R : resistant S : susceptible

文 献

- 1) Fernandes PB, Hardy DJ, McDaniel D, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of clarithromycin against *Mycobacterium avium*. Antimicrob Agent Chemother. 1989 ; 33 : 1531-1534.
- 2) Naik S, Ruck R. *In vitro* activities of several new macrolide antibiotics against *Mycobacterium avium* complex. Antimicrob agent Chemother. 1989 ; 33 : 1614-1616.
- 3) Perronne C, Gikas A, Pernot CT, et al. Activities of clarithromycin, sulfisoxazole, and rifabutin against *Mycobacterium avium* complex multiplication within human macrophages. Antimicrob Agent Chemother. 1990 ; 34 : 1508-1511.
- 4) Clasal M, Rodriguez F, Villalba R. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium avium* to a new macrolide (RU-28965), Chemotherapy, 1987 ; 33 : 255-258.
- 5) Dautzenberg B, Truffot C, Legris S, et al. Activity of clarithromycin against *Mycobacterium avium* infection in patients with the acquired immuno deficiency syndrome, Am Rev Resp Dis. 1991 ; 144 : 564-569.
- 6) 富岡治明, 佐藤勝昌, 斎藤 肇 : 諸種抗菌剤に対する *Mycobacterium avium* と *Mycobacterium intracellulare* の感受性, 結核. 1991 ; 66 : 489~492.
- 7) 工藤祐是, 工藤 禎 : 抗結核薬の試験管内抗菌濃度と卵培地におけるその表現, 結核. 1968 ; 43 : 9~16.
- 8) 東村道雄, 水野松司 : 抗結核剤の結核菌発育遅延作用の比較, 結核. 1980 ; 55 : 365~370.