

患者喀痰および環境から分離した *Mycobacterium avium* complex の抗結核薬感受性

¹森重 雄太 ²山崎 利雄 ¹天野富美夫

要旨：〔目的〕患者喀痰および環境から分離した *Mycobacterium avium* complex (MAC) の、イソニアジド (INH)、リファンピシン (RFP)、エタンプトール (EB) に対する感受性を解析し、臨床分離株と環境分離株で薬剤感受性に差が見られるか検討した。〔方法〕微量液体希釈法により、各種薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (MBC) を測定し、分離株ごとの MIC/MBC 分布を解析した。〔結果・考察〕いずれの株も INH に対して高い MIC と MBC を示したが、両者において累積分布に大きな差は認められなかったことから、INH は殺菌的に作用していることが示唆された。一方で、RFP と EB に関しては、臨床分離株と比較して環境分離株のほうがやや高い MIC と MBC を示した。また、特に臨床分離株において、MIC と MBC に大きな差が認められた。これらの結果から、EB のみならず、通常は殺菌的に作用することが知られている RFP も、低濃度では静菌的に作用する可能性が示唆された。**キーワード：**非結核性抗酸菌、抗結核薬感受性、MIC (minimum inhibitory concentration)、MBC (minimum bactericidal concentration)

序 章

MAC (*Mycobacterium avium* complex) とは、偏性好気性のグラム陽性菌である *M. avium* および *M. intracellulare* の 2 種類を主とする菌群の総称である。MAC を含む *Mycobacterium* 属菌の多くは、水系、土壌、動物の体内など自然環境中に広く存在し、同じ *Mycobacterium* 属の結核菌 *M. tuberculosis*、らい菌 *M. leprae* とは区別され、非結核性抗酸菌 (NTM; Nontuberculous Mycobacteria) と称される。NTM は、免疫力が低下した患者において重篤な感染症を引き起こすことがあるため、临床上重要な菌種である。NTM を起因菌とする疾患で最も頻発するものは肺 NTM 症であり¹⁾、従来は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの慢性肺疾患を有する患者における発症例が多かった。しかしながら、近年ではこれらの要因をもたない、健康な中高年女性が発症するケースの報告が増加している。南宮らの報告では、日本における肺 NTM 症の 2014 年推定罹患率は 14.7 人/10 万人と、2007 年と比較して約 2.6 倍上昇していることが明らかになった¹⁾。また、肺 NTM

症による 5 年間の死亡率は 5.4%²⁾ と、決して低くはないことから、公衆衛生上重要な感染症であると言える。

NTM 症は、現在でもなお治療が困難な感染症である。その背景にある要因として、既存の抗結核薬に対する抵抗性が高いことが挙げられる。また、NTM に対する薬剤感受性の評価方法が確立されておらず、有効な薬剤を選択することが困難であることも、NTM 症の治療を困難にしている一因と考えられている。今後、より一層増加するであろう NTM 症を効率よく治療するためには、NTM の薬剤感受性を的確に評価する実験系を構築し、その結果に基づいて適切な薬剤の種類および投与量を検討することが重要であると考えられる。

本研究では、MAC の臨床分離株 4 株および環境分離株 6 株について、複数の抗結核薬に対する薬剤感受性を解析したので、報告する。

材料と方法

〔対象〕

Mycobacterium avium complex (臨床分離株 4 株 : NTM

¹大阪薬科大学薬学部生体防御学研究室、²国立感染症研究所バイオセーフティ管理室

連絡先：天野富美夫、大阪薬科大学薬学部生体防御学研究室、〒569-1094 大阪府高槻市奈佐原4-20-1

(E-mail: amano@gly.oups.ac.jp)

(Received 22 Dec. 2016 / Accepted 28 Feb. 2017)

症で死亡した患者肺より分離されたMino株、および1990年5月に国立病院機構東京病院患者喀痰より分離された3株、環境水および動物より分離した環境分離株6株)を、Middlebrook 7H9培地 (Beckton, Dickinson and Company) 10 mLに接種し、37°Cで7日間、静置培養した。培地には、サプリメントとしてADC (Albumin-Dextrose-Catalase) Enrichment (BD) を終濃度10% (w/v) となるように添加した。

[最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC) の測定]

7H9培地で 5×10^5 CFU/mLに希釈した菌液を96穴マイクロプレートに接種し、イソニアジド (INH), リファンピシン (RFP), エタンブトール (EB) を添加し、37°Cで7日間培養した。INHとEBは注射用水 (大塚製薬) に溶解し、RFPはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。培地中のDMSOによる菌の発育への影響は、本実験に使用する最大濃度 (5.12 v/v%) において見られなかった (データ示さず)。INHとEBはSigma-Aldrich社より、RFPは和光純薬工業株式会社より、それぞれ入手した。

MICの評価は、肉眼的に有意の菌発育が認められず、かつ550 nmにおける菌液の吸光度をMultiskan FCマルチプレートリーダー (Thermo Scientific) で測定し、菌の増殖が見られなくなった最小の薬剤濃度をMICとした。

MBCの評価は、MICの評価に供した薬剤含有菌液を被験菌液として、この被験菌液1 μ Lを、薬剤を含まないMiddlebrook 7H10寒天培地 (BD) にエーゼ (栄研器材) を用いて接種し、37°Cで7日間培養した。7日目の時点で、肉眼的に有意なコロニー形成が認められない最小の薬剤濃度をMBCとした。寒天培地には、サプリメントとしてOADC (Oleate-Albumin-Dextrose-Catalase) Enrichment (BD) を終濃度10% (w/v) となるように添加した。

結 果

臨床分離株3株および環境分離株6株に対する、各種薬剤のMIC₅₀とMIC₉₀ (μ g/mL) およびMBC₅₀とMBC₉₀ (μ g/mL) をTableに示した。また、Mino株に対する各種薬剤のMICとMBCを併せて示した。

臨床分離株に対するMIC₅₀とMIC₉₀ (μ g/mL) は、INHにおいて32/128と高く、RFPとEBにおいてはそれぞれ1/2, 2/8と低かった。MBC₅₀とMBC₉₀ (μ g/mL) は、INHにおいて64/256と高く、RFPおよびEBにおいて、それぞれ8/16, 32/64となり、EBで高くなる傾向が見られた。一方で、環境分離株に対するMIC₅₀とMIC₉₀ (μ g/mL) は、INHにおいて16/128であり、MIC₅₀が臨床分離株よりもやや低濃度側にシフトした。RFP, EBにおいてはそれぞれ、4/32, 4/128と臨床分離株よりも高濃度側

Table *In vitro* activities of drugs against *M. avium* complex (MAC)

Clinical isolates (n=3)				
Drugs	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MBC ₅₀	MBC ₉₀
INH	32	128	64	256
RFP	1	2	8	16
EB	2	8	32	64
Environmental isolates (n=6)				
Drugs	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MBC ₅₀	MBC ₉₀
INH	16	128	32	128
RFP	4	32	16	64
EB	4	128	8	128

Mino		
Drugs	MIC	MBC
INH	256	256
RFP	16	32
EB	4	8

*INH: Isoniazid
RFP: Rifampicin
EB: Ethambutol (μ g/mL)

にシフトし、特に、EBのMIC₉₀が大幅に上昇していることが示された。MBC₅₀とMBC₉₀ (μ g/mL) は、INHにおいて32/128であり、臨床分離株よりも低濃度側にシフトした。RFPおよびEBでは、それぞれ16/64, 8/128となった。Mino株については、INHに対するMICとMBC (μ g/mL) は256/256と非常に高く、RFPでは16/32, EBでは4/8となった。Mino株はもともと、NTM症で死亡した患者肺から分離された株であるが³⁾、実験室株として使用されるうちに、分離当初の薬剤感受性を示さなくなった可能性があるため、本報においては参考として、臨床分離株と分けて記載した。

次に、臨床分離株における薬剤ごとのMIC累積曲線およびMBC累積曲線をFig. 1に示した。Fig. 1 (A) に示すように、INHに対するMICとMBCの累積値は、ほぼ同様の上昇傾向であった。Fig. 1 (B) および (C) には、それぞれRFPおよびEBに対するMICとMBCの累積曲線を示している。興味深いことに、RFP, EB共に、MBC累積曲線の立ち上がり濃度がMIC累積曲線と比べて高かった。一方で、環境分離株の場合は、Fig. 2 (A) に示すように、INHに対するMICとMBCの累積曲線は、臨床分離株の場合と同じく、ほぼ同様の上昇傾向を見せた。RFPに対するMICとMBCの累積曲線は、Fig. 2 (B) に示すように、両曲線の立ち上がり開始濃度に差が見られたが、臨床分離株とは異なり、EBに対するMICとMBCの累積曲線は、Fig. 2 (C) に示すように、両曲線の立ち上がり濃度の差はわずかであった。

以上の結果から、臨床分離株と比べて環境分離株は、薬剤感受性が低いことが示された。

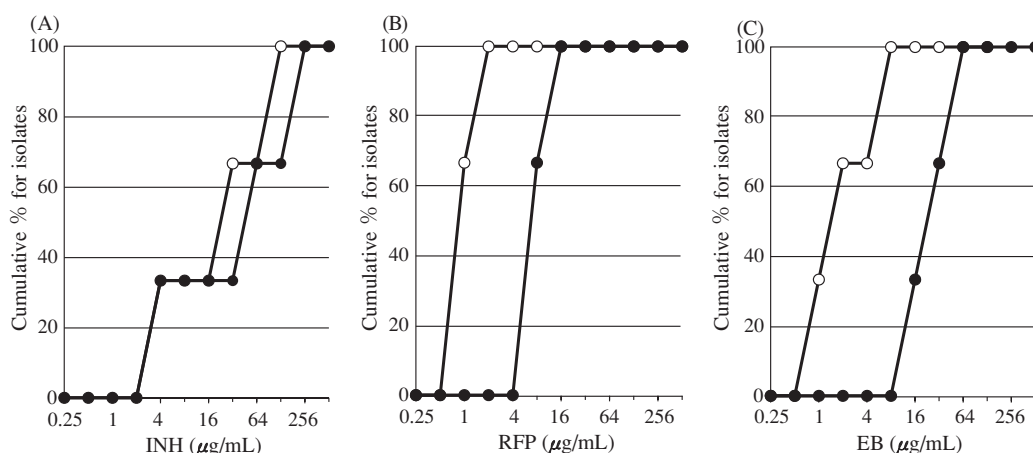


Fig. 1 Cumulative distribution of MICs and MBCs for clinical isolates of MAC against anti-tuberculous drugs. MICs (open circle) and MBCs (closed circle) against INH (A), RFP (B) and EB (C) are shown. MAC isolates were incubated with drugs in Middlebrook 7H9 medium at 37°C for 7 days.

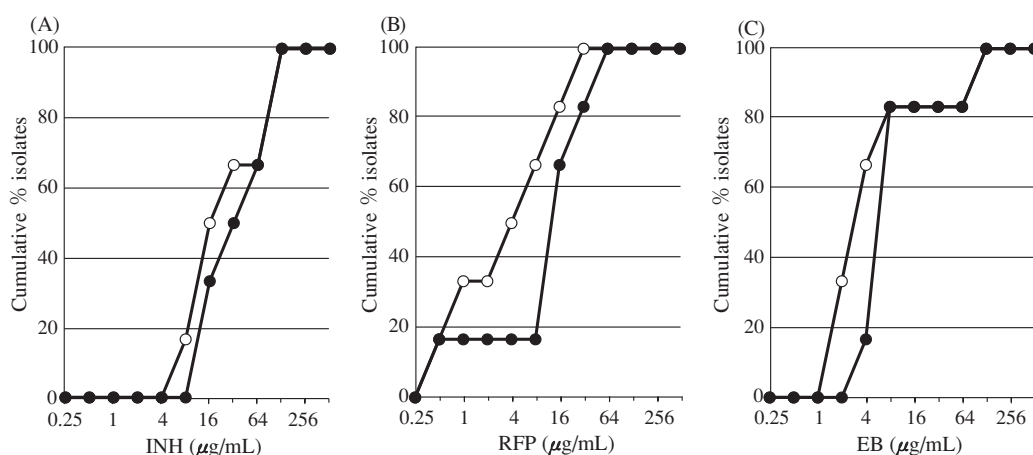


Fig. 2 Cumulative distribution of MICs and MBCs for environmental isolates of MAC against anti-tuberculous drugs. MICs (open circle) and MBCs (closed circle) against INH (A), RFP (B) and EB (C) are shown. MAC isolates were incubated with drugs in Middlebrook 7H9 medium at 37°C for 7 days.

考 察

NTM症の標準的治療法は現在でも確立されていない。その原因の一つとして、NTMに著効を示す薬剤がないことが挙げられる。現在では、特に肺MAC症の治療においては、マクロライド系抗菌薬のクラリスロマイシン (CAM) にRFPとEBを加えた3剤併用療法、さらにストレプトマイシン (SM) もしくはカナマイシン (KM) を加えた4剤併用療法が、一次治療法として推奨されている⁴⁾。また、Heifetsや河田らは血中最高薬物濃度 (C_{\max}) を基にMACの薬剤感受性について提言をしている⁵⁾⁶⁾。河田らは各種抗菌薬の標準投与量における C_{\max} と種々のNTMに対するMICの相関について、*M. avium*および*M. intracellulare*については、特にINH, EBでは C_{\max} (それぞれ4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ ⁶⁾) がMICにほとんど到達しない

ことを報告している。本研究においても、INHに関して、Fig. 1 (A) およびFig. 2 (A) で示すように、臨床分離株では一部が C_{\max} でMICおよびMBCに到達したものの、環境分離株では全くMICおよびMBCに到達しないことを示した。これらの結果は、河田らが報告する⁶⁾に、MAC症の治療にINH単剤はほとんど効果がないことを示唆するものと考えられる。しかし、EBについては、Fig. 1 (C) およびFig. 2 (C) で示すように、 C_{\max} では臨床分離株の多くがMICに到達し、環境分離株も一部がMICに到達した。ところが、MBCには全く到達しなかった。これらの結果は、 C_{\max} ではEBは静菌的に作用していることを示唆すると同時に、血中濃度が低下すればこれらの株は再増殖する可能性があることを示しているものと考えられる。

RFPに対する感受性については、Fig. 1 (B) および

Fig. 2 (B) で示すように、 C_{max} (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で臨床分離株は全てMICに到達し、大部分がMBCに到達した。また、環境分離株も半分以上がMICに到達した。ところが、 C_{max} でMBCに到達した環境分離株はごく一部で、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で急増した。また、通常RFPは殺菌的に作用することが知られているが、本研究で得られた結果は、低濃度ではむしろ静菌的に作用していることを示唆するものであり、EBの場合と同様に、血中濃度が低下すれば、これらの株は再増殖する可能性があることを示しているものと考えられる。EBとRFPは、臨床では前述のようにCAMと併用されることが多いが、本研究で得られた結果は、現在用いられている3剤併用療法において、コンプライアンスの低下をはじめとする様々な原因による血中薬剤濃度の低下が、MACの再増殖を引き起こし、耐性獲得による難治化の原因となる可能性を示唆するものと考えられる。本研究では、CAMに対する感受性については検討していないが、今後検討する必要があると考える。

本研究では、MAC臨床分離株と環境分離株の、薬剤感受性の差を解析した。その結果、両分離株のMIC₅₀とMIC₉₀、およびMBC₅₀とMBC₉₀に注目すると、臨床分離株と比べて環境分離株は、薬剤感受性が低いことが示された。さらに、両分離株のMICおよびMBC累積曲線の立ち上がり濃度の差に注目すると、特にRFPとEBに対して、環境分離株と比べて臨床分離株は、両者の立ち上がり濃度の差が大きいことが示された。これらの結果は、環境分離株が、その生残する環境において様々なストレスに対する抵抗性を獲得し、それが薬剤感受性にも影響を及ぼし、臨床分離株と比べてMICおよびMBC累積曲線の傾きが一様ではなく、かつ緩やかになっている可能性が考えられる。MAC症は、ヒトからヒトへ感染、発病した例の報告が未だなく、その感染源は環境中のMACであると考えられる。このような背景から、種々の環境におけるMACの薬剤感受性獲得機構の解明が急務である。本研究では、Mino株を含めた臨床分離株4株と、環境分離株6株について解析を行ったが、今後はさらに例数を増やして、幅広くMACの薬剤感受性を解析したいと考えている。

また、本研究で用いたINHは非常に安価な抗結核薬であり、発展途上国においても、一般に用いることが可能である。しかし、耐性獲得の容易さ、そもそもの感受性の低さから、現在では肺MAC症の治療に標準的に用いられることは、あまりない。本研究でも示したように、INHに対するMACのMICとMBCは非常に高く、INHに対する抵抗性を既に獲得している可能性が示唆される。しかしながら、RFPやEBとは異なり、有効な濃度域においては殺菌的に作用するため、他剤との併用や十分な

副作用対策により、INHが有効となる可能性も考えられる。

最後に、近年、森本らが報告しているように、EBのようなFirst line drugが誘発する有害事象を避けた結果、不適切な一次治療によって生ずるマクロライド耐性*M. avium* complex (MR-MAC) の出現が問題となりつつある⁷⁾。本研究では、代表的な一次治療薬であるRFPおよびEBに対して、環境中に存在するMACには既に抵抗性を示しているものが存在する可能性も併せて示した。今後、RFPおよびEBの薬剤耐性に寄与する*rpoB*および*embB*の発現量変動および遺伝子配列の変異を、本研究で用いた株について解析する予定である。また、耐性菌の早期同定、適切な薬剤選択により、MAC症の治療効果改善を図るためには、本研究を含めた積極的な薬剤感受性試験によるデータの蓄積が必須であると思われる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、薬剤感受性試験について適切な助言を賜った、大阪薬科大学薬学部生体防御学研究室 小池敦資博士に深謝致します。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特になし。

文 献

- 1) Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, et al.: Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22: 1116-1117.
- 2) Hayashi M, Takayanagi N, Kanauchi T, et al.: Prognostic factors of 634 HIV-negative patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185: 575-583.
- 3) 後藤義孝, 岩切 章, 新城敏晴: 非結核性抗酸菌症患者由来の *Mycobacterium intracellulare* と *Mycobacterium avium* のマウスに対する病原性について. *感染症学雑誌.* 2002; 76: 425-431.
- 4) American Thoracic Society: Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: S1-25.
- 5) Heifets L: Susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 1759-1767.
- 6) 河田典子, 河原 伸, 多田敦彦, 他: BrothMIC NTMを用いた非結核性抗酸菌の薬剤感受性についての検討. *結核.* 2006; 81: 329-335.
- 7) Morimoto K, Namkoong H, Hasegawa N, et al.: Macrolide-Resistant *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease: Analysis of 102 Consecutive Cases. *Ann Am Thorac Soc.* 2016; 13: 1904-1911.

Original Article

ANTITUBERCULOSIS DRUG-SENSITIVITY ANALYSIS OF
MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX ISOLATED FROM SPUTUM SAMPLES
OF PATIENTS WITH NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIOSIS AND
THAT FROM NATURAL ENVIRONMENTS¹Yuta MORISHIGE, ²Toshio YAMAZAKI, and ¹Fumio AMANO

Abstract [Purpose] We analyzed sensitivities of isoniazid (INH), rifampicin (RFP) and ethambutol (EB) against *Mycobacterium avium* complex (MAC) isolated from sputum samples of patients with Non-tuberculous mycobacteriosis and that from natural environments, in order to reveal the different drug-resistance between clinical and environmental isolates.

[Methods] Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the both isolates against INH, RFP and EB were examined by broth microdilution method.

[Results & Discussion] INH showed very high MIC and MBC on the both clinical and environmental isolates without any significant differences. The result suggests that INH has bactericidal effect toward MAC isolates, though it has low efficacy toward them. On the other hand, RFP and EB showed lower MIC and MBC than INH. The environmental isolates showed slightly lower susceptibility than the clinical isolates.

Interestingly, both RFP and EB showed considerably large differences between MIC and MBC, especially against the clinical isolates. These results suggest that not only EB but also RFP, which is known as a bactericidal drug, have bacteriostatic effect toward MAC at low concentration.

Key words: Non-tuberculous mycobacterium, Antitubercular susceptibility, MIC, MBC

¹Laboratory of Biodefense and Regulation, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, ²Division of Biosafety Control and Research, National Institute of Infectious Diseases

Correspondence to: Fumio Amano, Laboratory of Biodefense and Regulation, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki-shi, Osaka 569-1094 Japan.
(E-mail: amano@gly.oups.ac.jp)

