

「非結核性抗酸菌に対する MIC測定の意味」



座長

木下 承皓先生

森ノ宮医療大学
保健医療学部臨床検査学科

演者

御手洗 聡先生

結核予防会結核研究所 抗酸菌部 部長
長崎大学大学院
抗酸菌感染症講座抗酸菌感染症疫学分野 教授

サマリー

- 非結核性抗酸菌 (NTM ; Non-tuberculosis Mycobacteria) における各種抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) には、ばらつきが大きい。また、耐性遺伝子 (*erm* 遺伝子) を有する NTM はマクロライド系薬に耐性を示す可能性がある。従って抗菌薬の感受性は、その都度 MIC 測定による確認が必要である。
- MIC 測定の要点は、培地の pH、温度、菌量の調整と純培養であることの確認、そして内部精度管理 (IQC) にある。
- 感受性試験の判定基準は、米国臨床検査標準化委員会 (CLSI) の M24 第3版に準じる。この基準ではクラリスロマイシン (CAM) とアミカシン (AMK) が肺 NTM 症の1次選択薬剤に位置づけられている。
- MIC 測定は細菌の定量的性質の一部を見ているにすぎず、CLSI 判定基準のカットオフ値の信頼性も 100% とは言えない。演者らは、還元発色試薬を用いて感受性をより正確に定量する新たな方法を開発しており、それを世界標準にすることを目指している。

NTM に対する各抗菌薬の感受性はまちまち

2021年12月の時点で、抗酸菌は208菌種が同定されています。そのうちNTMは約200菌種あると考えられており、半分強が迅速発育菌です。一方、遅発育菌は迅速発育菌より少ないのですが、実臨床で分離されるのは *M. avium* と *M. intracellulare* がほとんど

です。

抗酸菌全体における国内での分離率は、*M. avium* が最も多く、それに *M. intracellulare* が続き、いずれも遅発育菌です。3番目は、かつては遅発育菌の *M. kansasii* でしたが、最近は迅速発育菌の *M. abscessus* と入れ替わっています。そのほかの菌種も一定の割合で分離されます。

各菌種における各種抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) は、結核菌に対

しては比較的狭いレンジで収まっていますが、*M. avium* と *M. intracellulare* を主体とする MAC (*Mycobacterium avium* complex) ではかなりばらつきが大きく、感受性がある程度のレンジに収まっている抗菌薬はクラリスロマイシン (CAM) とアジスロマイシン (AZM) です (表1)¹⁾。そのため、NTM のほとんどを占める MAC に対する各種抗菌薬の感受性試験の標準化は難しく、必要に応じて MIC や最小殺菌濃度などの測定を、その都度行わなければならないのが現状です。

遅発育菌の MIC 測定では培地に OADC を加える

米国臨床検査標準化委員会 (CLSI) が提唱する遅発育菌についての薬剤感受性試験の手順では、まずミュラーヒントン寒天培地を pH7.3~7.4 に調製します。いわゆる CAMHB (Cation adjusted Mueller-Hinton broth) と呼ばれるものです。ただし、遅発育菌はミュラーヒントン液体培地だけではほとんど発育しないため、OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase) を加えます。このとき、他の菌種が混入す

薬剤	MIC (μg/mL)	
	<i>M. tuberculosis</i>	MAC
イソニアジド	0.025-0.05	0.6->10.0
ピラジナミド	<100.00	>100.00
リファンピシン	0.06-0.25	0.12-16.0
エタンブトール	0.94-3.8	0.94-15.0
エチオナミド	0.3-1.2	0.3-≥10.0
ストレプトマイシン	0.5-2.0	1.0-8.0
アミカシン	0.5-2.0	1.0-16.0
カプレオマイシン	1.25-2.5	5.0-40.0
オフロキサシン	0.25-2.0	4.0->32.0
シプロフロキサシン	0.25-2.0	0.5-16.0
クロファミジン	0.06-0.25	0.06-0.25
クラリスロマイシン ¹⁾	— ²⁾	0.12-8.0
アジスロマイシン ¹⁾	—	4.0-16.0

1) 前処理分離株についてのみ表示

2) MAC分離株との比較は未実施

出典: Heifets L., Antimicrob Agents Chemother. 1996 Aug;40(8):1759-67.

薬剤	MIC (μg/mL)			
	感受性	判定保留	耐性	
1次選択薬剤	クラリスロマイシン	≤8	16	≥32
	アミカシン (静注)	≤16	32	≥64
	アミカシン (リポソーム包埋・吸入)	≤64	—	≥128
2次選択薬剤*	モキシフロキサシン	≤1	2	≥4
	リネゾリド	≤8	16	≥32

*これらの薬剤の臨床効果は必ずしも証明されていない。

出典: Woods, Gail L. M24: Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes, 3rd Edition. CLSI, 2018.

ると培養パターンが不揃いになるので、純培養であることの確認が重要です。

そしてコロニー性状を確認しながら、ループで透明なコロニーを回収して使用することが基本になります。抗酸菌は脂質が非常に多い菌なので、ガラスビーズ入りの分散チューブなどで乳化し、滅菌水などでマクファーランド濁度標準液番号0.5濃度の菌液に調製します。

MIC測定では接種する菌量を適切に調整する必要がありますが、マクファーランドスタンダードでは濃度は比較的

大まかで、抗酸菌の場合はコロニー形成単位を10の4乗から10の5乗の間で接種できればよいことになっています。調製した菌液の50μLを10mLのCAMHBと5%のOADCで希釈します。希釈調整した菌液を感受性用MICプレートの各ウェルに100μL(10の4乗程度の菌数)を接種します。

次に、MICプレートを酸素透過性のフィルムでシールし、36±1°Cで培養します。各ウェルは丸底のため、発育した菌はきれいな丸い形を成して底に沈み、

その大きさによっておおよその発育状態が分かります。培養7日目にプレートを観察し、コントロールの発育が十分であればMICを判定します。しかし、発育不十分であれば10~14日目に改めて判定します。

肺MAC症に対する1次選択薬剤はCAMとAMK

感受性試験の結果の解釈は、CLSIの最新の判定基準であるM24 第3版に準じます。この基準では、*M. avium*や*M. intracellulare*に起因する肺NTM症に対してはCAMが1次選択薬剤に位置づけられています(表2)²⁾。CAMの感受性のカットオフ値は≤8μg/mL、耐性は≥32μg/mL、16μg/mLでは判定保留になります。判定保留の意味合いをどう考えるかですが、基本的には耐性と考えた方がよいと思います。

また、アミカシン(AMK)も1次選択薬剤に位置づけられており、感受性のカットオフ値は静注製剤で≤16μg/mL、リポソーム化AMK吸入製剤は≤64μg/mLです。リポソーム化AMKのカットオフ値はかなり高く設定されていますが、吸入製剤は局所の濃度が非常に高まるため、そうなっています。局所濃度が高いリポソーム化AMKは、より強力な抗菌作用が期待できます。

なお、CLSIの判定基準M24 第3版には、2次選択薬剤にモキシフロキサシン(MFLX)やリネゾリド(LZD)が挙げられていますが、臨床効果が証明されていないとの注釈が付記されています。従って、この判定基準に示されているカットオフ値は、基本的に1次選択薬剤しか臨床との相関が保証されていないと考えるべきです。また実臨床では、リファンピシンやリファブチンなどのリファマイシン系薬に加え、エタンブトール、ストレプトマイシンなども使用されますが、実際の効果についての確証は

ありません。

MIC測定では、菌株の内部精度管理 (IQC) も重要です。CLSI はMIC測定の際のIQCとして、米国培養細胞系統保存機関 (ATCC) が保有する製品番号ATCC 00927の*M. marinum*株を使用することを提唱しています。この株の培養温度は30°Cです。また遅発育菌の1次選択薬剤であるCAMのMICは0.5~2 µg/mL、AMKは1~4 µg/mLの範囲に収まる必要があるとされています。ATCC 00927の入手が難しい場合は、結核研究所に連絡すれば精度管理株としての分与を受けられます。

迅速発育菌のMIC判定は耐性を考慮し14日目に

迅速発育菌は最近になって分離が非常に増えており、特に*M. abscessus*が増加していることは先述した通りです。そのため、迅速発育菌に対する感受性試験の重要性も高まりつつあります。迅速発育菌の感受性試験もMIC測定になります。

手順は菌液を作製し、MICプレート各ウェルに接種するところまでは遅発育菌と同じです。異なるのは、培養時の温度を30±2°C (遅発育菌では36±1°C) にすることです。また判定は、培養開始後48時間以上経過してから、コントロールの培地に十分な発育があることを確認した上で実施します (遅発育菌では7日目)。結果の解釈は培養開始後3~5日目までに行うことが基本ですが、判定できない場合は再検になります。

ただし、例えば*M. abscessus* speciesは一定期間の持続使用により、CAMなどのマクロライド系薬に誘導耐性を示すことが分かっているため、その時間を考慮し、最終的なMICの結果判定は14日目にいきます。この耐性のメ

表3 迅速発育抗酸菌 (RGM) のMIC測定の判定基準 (CLSI M24 第3版による)

薬剤	MIC (µg/mL)		
	感受性	判定保留	耐性
アミカシン ¹⁾	≤ 16	32	≥ 64
セフォキシチン ²⁾	≤ 16	32-64	≥ 128
シプロフロキサシン ³⁾	≤ 1	2	≥ 4
クラリスロマイシン ⁴⁾	≤ 2	4	≥ 8
ドキシサイクリン	≤ 1	2-4	≥ 8
イミペネム ⁵⁾	≤ 4	8-16	≥ 32
リネゾリド	≤ 8	16	≥ 32
メロペネム	≤ 4	8-16	≥ 32
モキシフロキサシン	≤ 1	2	≥ 4
スルファメトキサゾール-トリメトプリム ⁶⁾	≤ 2/38	—	≥ 4/76
チゲサイクリン ⁷⁾	—	—	—
トブラマイシン ⁸⁾	≤ 2	4	≥ 8

- 1) *M. abscessus* complexでMIC値が≥ 64 µg/mLの場合は再検するかrrs遺伝子変異を検索する。
 - 2) セフォキシチンは本邦未承認。
 - 3) レボフロキサシンでも可。
 - 4) 誘導耐性があり得るので最終判定は培養14日後。
 - 5) もし*M. fortuitum* group, *M. smegmatis* groupあるいは*M. mucogenicum* groupでMIC > 8 µg/mLの場合は培養3日以内で再検する。再検後も同様なら報告しない。
 - 6) MICは80の阻害をもって判断する。
 - 7) チゲサイクリンのMICと臨床効果との相関は確立されていない。そのためMICのみ報告する、とされている。
 - 8) トブラマイシンは*M. chelonae*感染症の治療に使用される。もしMIC > 4 µg/mLの場合は再検する。再検時も同様であれば*M. chelonae*であるか再同定する。
- 出典: Woods, Gail L. M24: *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes*, 3rd Edition. CLSI, 2018.

カニズムについては後述します。

迅速発育菌の精度管理では、製品番号ATCC 00686の*M. peregrinum*を使用します。迅速発育菌でも基本的にはCAMとAMKが1次選択薬剤です。CAMのMICは≤ 0.06~0.5 µg/mL、AMKは≤ 1~4 µg/mLの範囲に収まるように精度管理を行うことが推奨されています。MICの判定基準も遅発育菌と同様にCLSIのM24 第3版になります。

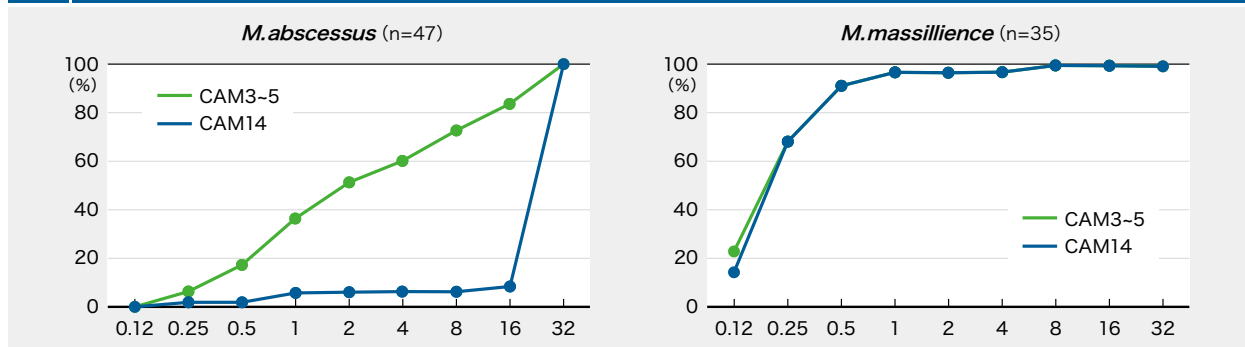
AMKのほか、シプロフロキサシン、CAM、ドキシサイクリン、イミペネム、LZD、メロペネム、MFLXなどの判定基準も公表されています(表3)²⁾。ただし、CLSIの判定基準はあくまで1つの指標であり、カットオフ値の信頼性は現状では100%とは言えません。従って、この指標を基にさまざまな薬剤を使用し、それらのエビデンスを集積していくことが重要だと思えます。

erm 遺伝子があるとCAM耐性を示す可能性がある

耐性について少し触れておきます。CAMなどのマクロライド系薬は、抗酸菌の23S rRNAに結合して蛋白合成を阻害し、抗菌作用を示します。一方、*M. abscessus* や*M. bolletii*はerm遺伝子を基本的に有しており、マクロライド系薬を一定期間使用するとerm遺伝子が誘導されます。この遺伝子によって、マクロライドの結合部位がメチル化されて結合できなくなるため、*M. abscessus*や*M. bolletii*にマクロライド耐性を生じさせます。

ただし、*M. abscessus*や*M. bolletii*には、マクロライド系薬に感受性になるバリエーションを有する株もあります。このバリエーションによってマクロライド系薬に感受性を維持する*M. abscessus*や*M.*

図1 *M. abscessus* と *M. massiliense* の薬剤感受性 (複十字病院の臨床保存82株)



出典：複十字病院データ

bolletii は約1割あると言われています。そのため、耐性に傾きやすい薬剤でも、最終的にはMICでの確認が必要です。

耐性が誘導されるまでの時間については、結核予防会複十字病院で分離された *M. abscessus* 47株 と *M. massiliense* 35株にCAMを投与した検証が行われています。*M. abscessus* ではCAM投与後3~5日では感受性がかなりの割合で維持されていましたが、14日目までにメチレーションが誘導され、一気に耐性を示すようになりました(図1)。

しかし *M. massiliense* では投与後の日数にかかわらず、ほぼ一貫して感受性が示されます。それは *M. massiliense* が *erm* 遺伝子の一部を欠損しているためです。もちろんすべての *M. massiliense* がCAM感受性かといえばそうではなく、長期に使用すると別のメカニズムで耐性化することはあります。従って、治療履歴などに注意する必要があります。

薬剤感受性試験の世界標準を確立したい

MIC測定は細菌の定量的性質の一部を見ているにすぎません。従って、抗菌薬の感受性は本来、生体側との関連で考えなければならないはずで、例え

ば、臨床における薬物動態/薬力学や薬物血中濃度モニタリングなどの相関を加味しながら、カットオフ値の妥当性を明確化する必要があります。さらに、それをテーラーメイドすることも今後の方向性として重要です。

多彩なNTMが大量に分離されているにもかかわらず、それらに対する各種抗菌薬の感受性や耐性の閾値は、依然として確立されていません。希少菌種に至っては、薬剤感受性情報そのものが極めて不十分です。

こうした現状を受けて、私どもは現在、還元発色試薬を用いて発育状況を数値化する方法を開発中です。抗菌薬の濃度によって菌の発育がどの程度抑制できているのかを、還元数値で表す方法です。現在のMIC測定は半定量的な手法と言えるので、こうした本当の定量的な方法で薬剤に対する感受性や耐性のカットオフ値を算出し、より正確な値を明示したいと考えています。

日本は肺NTM症が他国に比べると非常に多いように思います。そうした意味でも、この分野における研究をリードしなければならない立場にあると言えるでしょう。1人でも多くの先生方と一緒に、より多くのエビデンスを集積し、NTMの判定法と抗菌薬の感受性試験の世界標準を確立していきたいと考えています。

ディスカッション

木下 迅速発育菌のMIC測定では、ミューラーヒントン寒天培地を用いた簡易的な測定法であるEテスト法もしばしば選択されています。それでもよいのでしょうか。

御手洗 CLSIの基準にはその方法が含まれていません。現状では、CLSIに準じた方法を選択すべきだと思います。

木下 迅速発育菌のCAMに対する耐性の判定は14日間待つ必要があるとのことでした。5~6日目に行った感受性の結果解釈を、その時点で診療科に報告してもよいのでしょうか。

御手洗 菌種が *M. abscessus* と分かっていても、5日目辺りのデータで惑わしてしまうのは、やはり問題かと思います。ですから、あくまで14日間待つことを基本にしていきたいと思います。ただし、3~5日目でもMICが上昇してしまうことは確かにあります。そこで耐性が示されていれば、耐性と報告してよいと思います。

参考文献

- 1) Heifets L. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996; 40: 1759-1767.
- 2) Woods, Gail L. *M24: Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes*, 3rd Edition. CLSI, 2018.