

## 【原著・基礎】

## 化学発光法を用いた菌体内 ATP 測定による薬剤感受性測定

吉田 正樹<sup>1,2)</sup>・柴 孝也<sup>1,2)</sup>・細谷 龍男<sup>1)</sup><sup>1)</sup>東京慈恵会医科大学内科学講座\*, <sup>2)</sup>同 感染制御部

(平成16年12月13日受付・平成17年1月21日受理)

ルシフェリン・ルシフェラーゼ試薬を用いた化学発光法は菌体内 ATP を短時間で測定できる。この化学発光法を用いた薬剤感受性検査も短時間で測定可能である。臨床分離株 3 菌種 45 株 (MSSA 15 株, MRSA 15 株, *Pseudomonas aeruginosa* 15 株) を用いて, 各種薬剤中の細菌の増殖および薬剤感受性検査を測定し, 標準法との比較を行った。MSSA では ampicillin の MIC は化学発光法と標準法での一致率は 60% と低く, さらに ofloxacin では 20% と低値であった。Ampicillin と ofloxacin を除く薬剤では高い一致率を認めた。MRSA では試験薬剤すべてにおいて高い一致率も認めた。*P. aeruginosa* では一致率が低かった。抗菌薬の種類, 細菌の種類により標準法と化学発光法の一致率に違いが認められた。抗菌薬と菌種を選べば, 化学発光法による薬剤感受性検査は短時間に結果が得られ, 標準法と一致率が高く, 標準法の代用となりうる。標準法との乖離は認められる菌種, 薬剤もあり, 実際に臨床検査として臨床像に一致する検査法であるかはこれからの研究を待たなければならない。標準法より臨床経過を反映する検査法になる可能性もあり期待される。

**Key words:** chemiluminescent assay, ATP, Antibacterial activity

細菌の薬剤感受性検査は, ディスク拡散法と微量液体希釈法にて行われている。さらに最小発育阻止濃度 (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) の測定は寒天平板希釈法<sup>1)</sup>と微量液体希釈法<sup>2)</sup>により行われる。また, 以前よりルシフェリン・ルシフェラーゼ試薬を用いた化学発光法にて ATP の測定が報告されている<sup>3)</sup>。この方法を用いて菌体内の ATP を測定することにより, 有意な細菌尿のスクリーニング<sup>4)</sup>を行ったり, 食品中や消毒液中の細菌数の測定が行われてきた。ATP 測定による細菌数の測定は短時間で結果が得られ, 細菌数の評価には有用である。菌体内 ATP の測定により, 抗菌薬中での細菌の増殖を測定し, 抗菌力の評価ができないか検討し, 日本化学療法学会標準法<sup>5)</sup> (以下標準法と略す) に準じた微量液体希釈法による成績と比較, 検討した。

## I. 材料と方法

### 1. 供試菌株

菌株は, 当教室に保存された臨床分離株 3 菌種 45 株 (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) 15 株, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 15 株, *Pseudomonas aeruginosa* 15 株) を用いた。

### 2. 供試薬剤と検討濃度

MSSA, MRSA については, ampicillin (ABPC), piperacillin (PIPC), cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cef-tazidime (CAZ), minocycline (MINO), amikacin (AMK), arbekacin (ABK), imipenem (IPM), ofloxacin (OFLX), clarithromycin (CAM), vancomycin (VCM) の 12 薬剤を

用いた。濃度は ABPC と PIPC では 0.25 ~ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 7 段階連続希釈系列, CEZ, CTM, CAZ, MINO, AMK, ABK については 0.25 ~ 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 8 段階連続希釈系列, IPM, OFLX, CAM, VCM では 0.125 ~ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 8 段階連続希釈系列で行った。*P. aeruginosa* については, PIPC, CAZ, MINO, AMK, ABK, IPM, OFLX の 7 薬剤について MSSA と同様の濃度で検討した。96 穴マイクロプレートに各種抗菌薬を含むミューラーヒントン培地 100  $\mu\text{L}$  を分注し希釈系列を作成した。

### 3. 化学発光法による菌体内 ATP の測定

細菌を含むミューラーヒントン培地 50  $\mu\text{L}$  をとり HEPES buffer 50  $\mu\text{L}$ , ATP 抽出液 50  $\mu\text{L}$  を加え, 5 分後にルシフェリン・ルシフェラーゼ 50  $\mu\text{L}$  を加え, ルミカウンター 1000 にて化学発光値 (RLU) を測定した。

### 4. 薬剤感受性試験

#### 1) 化学発光法

12 薬剤の希釈系列が作成された 96 穴マイクロプレートに供試菌  $5 \times 10^4$  をイノキュレーター (長瀬産業) にて接種し, 4 時間または 6 時間培養後に各 well より 50  $\mu\text{L}$  菌液をとり, 菌体内 ATP 測定に用いた。

#### 2) 日本化学療法学会標準法

化学発光法に使用したものと同一 96 穴マイクロプレートを使用し, 供試菌  $5 \times 10^4$  をイノキュレーター (長瀬産業) にて接種し, 35  $^{\circ}\text{C}$  にて 18 ~ 24 時間培養し, 肉眼にて混濁, 沈殿物を確認し, MIC を決定した。

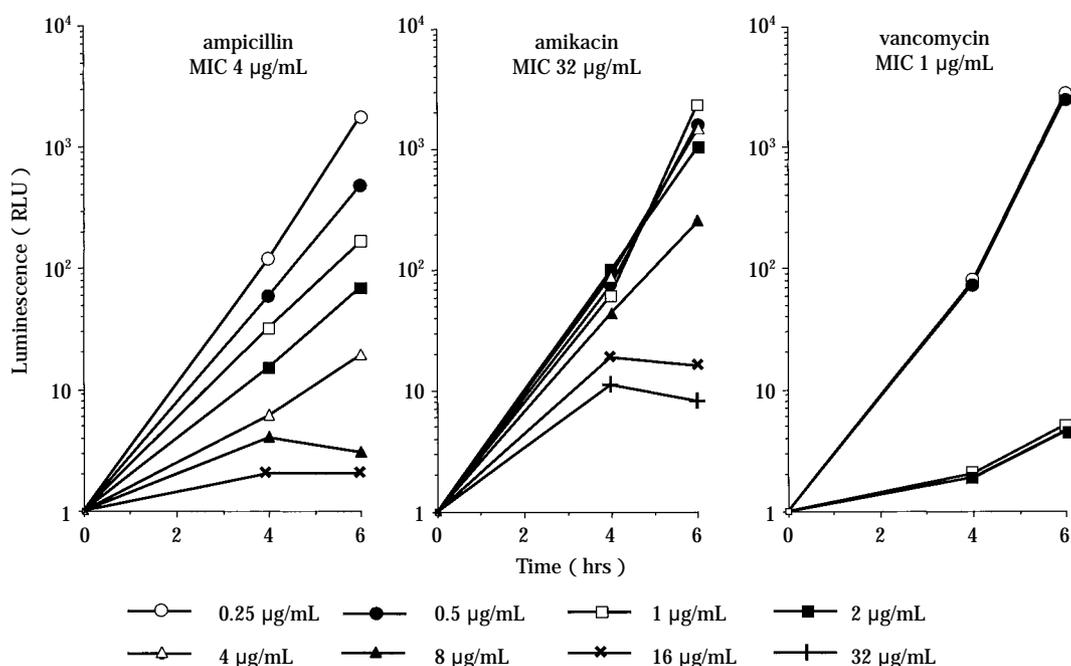


Fig. 1. Time variations in bacterial ATP based on antimicrobial agent concentration.

## II. 結 果

### 1. 細菌数と化学発光値の相関

MSSA をミューラーヒントン培地にて培養した菌液を用いて 2 倍の希釈系列を作成し、化学発光値を測定したところ、細菌数が  $1/2^6 \times 6.76 \times 10^7$  以上で菌量と化学発光値の間には相関 ( $R^2 = 0.989$ ) が認められた。同様に MRSA, *P. aeruginosa* についても良好な相関を認めた。

### 2. 化学発光値の経時的変化

MSSA を ABPC, AMK, VCM のそれぞれの濃度にて 4 時間と 6 時間接触後の菌体内 ATP 量を測定した (Fig. 1)。ABPC と AMK では 4 時間培養, 6 時間培養ともに濃度依存的に菌の発育が抑制された。AMK の 6 時間培養では 16 µg/mL と 32 µg/mL で菌の発育が抑制されている。VCM では 4 時間培養と 6 時間培養の両方で 1 µg/mL 以上で抑制された。

### 3. 薬剤濃度と 6 時間培養後の菌体内 ATP の変化

それぞれの薬剤存在下における 6 時間培養後の化学発光値と薬剤濃度の関係を Figs. 2, 3 に示した。薬剤濃度が上昇するにつれて化学発光値は減少し、MIC に近い値では低い値を示す。ABPC, PIPC, CEZ, CTM では 2 倍の濃度 (1 管) の違いで、化学発光値としては約 20 ~ 40 RLU の違いであり濃度の上昇とともに徐々に低下するが、ABK, AMK, VCM, OFLX はある濃度までは高値を示し、それ以上の濃度で急激に低下する。

### 4. 化学発光法と標準法による MIC の一致率

化学発光値が 30 以下に低下した最小濃度を化学発光法による MIC と定義し、得られた MIC と標準法より得られた MIC の一致率を Table 1 (MSSA), Table 2

(MRSA) と Table 3 (*P. aeruginosa*) に示した。化学発光法による MIC が標準法による MIC より高くなる場合はプラスとなり、低くなる場合はマイナスで示されている。化学発光法と標準法による MIC を比較し、1 管以内のずれを完全一致とした。MSSA では CTM, IPM, MINO, ABK, CAM, VCM は一致率が 100% であり、AMK は 86.7%, PIPC, CEZ, CAZ では 73.3%, ABPC は 60.0%, OFLX は 20.0% であった (Table 1)。CEZ, CAZ, AMK, OFLX ではプラスの菌株が多く、化学発光法による MIC が標準法より高く出ていることがわかる。

一方、MRSA については PIPC, CTM, CAZ, ABK, OFLX, CAM, VCM は 100% であり、ABPC, MINO, AMK は 86.7%, CEZ, IPM は 73.3% であった (Table 2)。ABPC, IPM, MINO ではマイナスの菌株が多く、化学発光法による MIC が標準法より低く出ており、AMK では高く出ている。

MSSA と MRSA の一致率を比較すると、CTM, ABK, CAM, VCM は 100% で一致しており、AMK では 86.7% で同一、CEZ では 73.3% で同一であった。PIPC, CAZ は 73.3% と 100%, OFLX は 20% と 100%, ABPC は 60% と 86.7%, MINO は 100% と 86.7%, IPM は 100% と 73.3% と感受性菌と耐性菌で乖離がみられた。全体では MSSA はのべ 180 株中 145 株 (80.5%), MRSA はのべ 180 株中 166 株 (92.2%) が一致した。

*P. aeruginosa* の一致率をみると、-1 ~ +1 の完全一致率は 54.3% であり *S. aureus* より低く、その中では IPM, AMK, OFLX の一致率が 73.3% と高かった。MINO は一致率は 26.7% と低い値であった。PIPC,

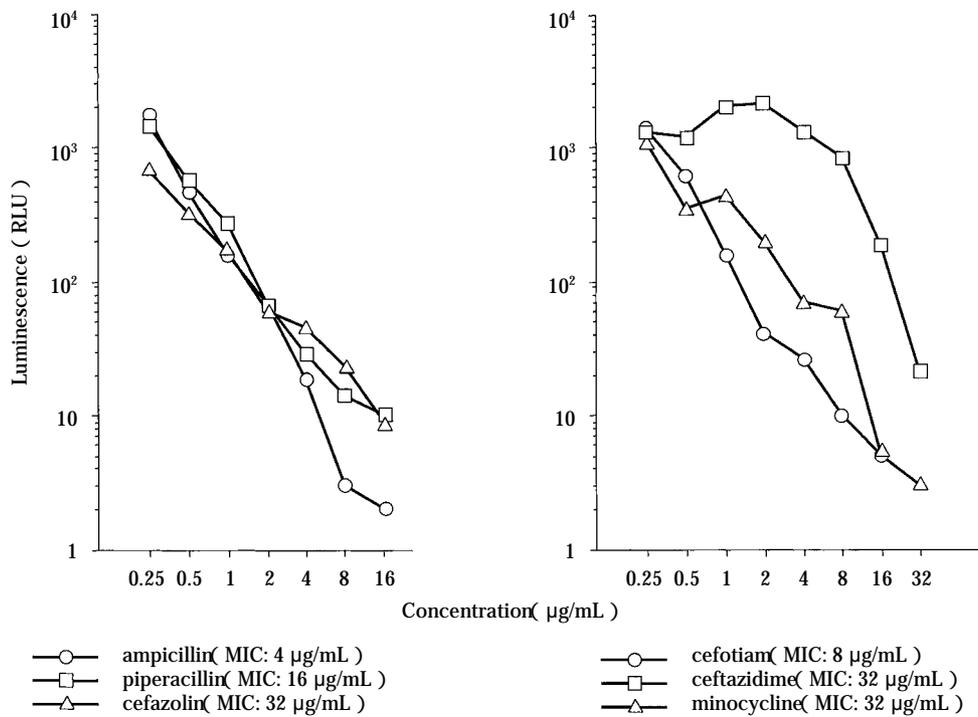


Fig. 2. Bacterial ATP cultivated after 6 hrs under function from antimicrobial agent.

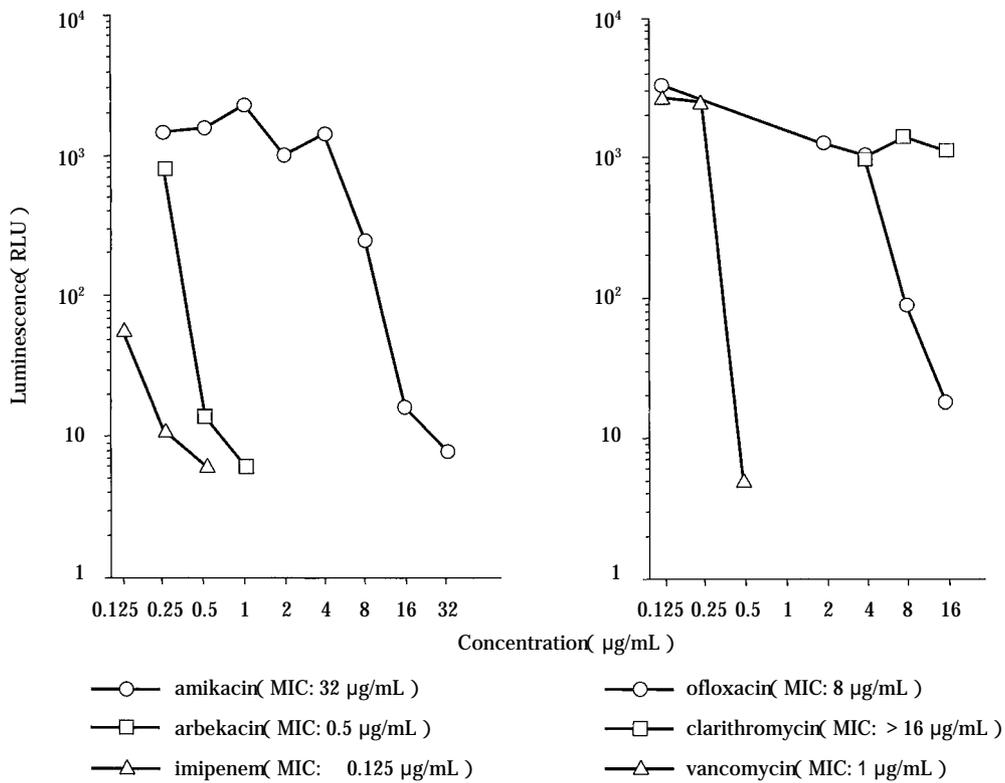


Fig. 3. Bacterial ATP that was cultivated after taking 6 hrs under the function from antimicrobial agent.

Table 1. Distribution of differences in MICs of 12 antimicrobial agents for 15 Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) determined by chemiluminescence ATP assay versus standard broth microdilution

Antimicrobial agents	No. of isolates with MIC <sup>a)</sup> difference of									- 1 to + 1	
	- 3	- 2	- 1	0	+ 1	+ 2	+ 3	+ 4	+ 5		
ampicillin	0	2	2	7	0	4	0	0	0	9	60%
piperacillin	1	1	6	1	4	2	0	0	0	11	73.3%
cefazolin	0	0	2	5	4	4	0	0	0	11	73.3%
cefotiam	0	0	0	10	5	0	0	0	0	15	100%
ceftazidime	0	0	0	3	8	4	0	0	0	11	73.3%
imipenem	0	0	0	15	0	0	0	0	0	15	100%
minocycline	0	0	0	15	0	0	0	0	0	15	100%
amikacin	0	0	4	2	7	0	2	0	0	13	86.7%
arbakacin	0	0	4	5	6	0	0	0	0	15	100%
ofloxacin	0	0	0	0	3	7	3	1	1	3	20%
clarithromycin	0	0	8	7	0	0	0	0	0	15	100%
vancomycin	0	0	11	2	2	0	0	0	0	15	100%
Total	1	3	37	72	39	21	5	1	1	145	80.5%
(%)	0.6	1.7	20.6	40	21.7	11.7	2.8	0.6	0.6		

<sup>a)</sup>Zero indicates the number of isolates for which MICs were identical: - 1, + 1, ect. Indicate  $\pm \log_2$  dilution differences.

Table 2. Distribution of differences in MICs of 12 antimicrobial agents for 15 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) determined by chemiluminescence ATP assay versus standard broth microdilution

Antimicrobial agents	No. of isolates with MIC <sup>a)</sup> difference of							- 1 to + 1	
	- 3	- 2	- 1	0	+ 1	+ 2	+ 3		
ampicillin	0	2	6	7	0	0	0	13	86.7%
piperacillin	0	0	3	12	0	0	0	15	100%
cefazolin	0	4	1	10	0	0	0	11	73.3%
cefotiam	0	0	6	9	0	0	0	15	100%
ceftazidime	0	0	3	12	0	0	0	15	100%
imipenem	0	4	6	3	2	0	0	11	73.3%
minocycline	0	2	11	2	0	0	0	13	86.7%
amikacin	0	0	8	1	4	2	0	13	86.7%
arbakacin	0	0	3	10	2	0	0	15	100%
ofloxacin	0	0	3	8	4	0	0	15	100%
clarithromycin	0	0	0	15	0	0	0	15	100%
vancomycin	0	0	10	5	0	0	0	15	100%
Total	0	12	60	94	12	2	0	166	92.2%
(%)	0	6.7	33.3	52.2	6.7	1.1	0		

<sup>a)</sup>Zero indicates the number of isolates for which MICs were identical: - 1, + 1, ect. Indicate  $\pm \log_2$  dilution differences.

Table 3. Distribution of differences in MICs of 7 antimicrobial agents for 15 *Pseudomonas aeruginosa* determined by chemiluminescence ATP assay versus standard broth microdilution

Antimicrobial agents	No. of isolates with MIC <sup>a)</sup> difference of										- 1 to + 1	
	- 4	- 3	- 2	- 1	0	+ 1	+ 2	+ 3	+ 4	+ 5		
piperacillin	0	0	0	0	4	3	8	0	0	0	7	46.7%
ceftazidime	0	0	0	0	2	2	1	2	4	4	4	26.7%
imipenem	0	0	0	6	5	0	2	0	1	1	11	73.3%
minocycline	2	4	5	2	2	0	0	0	0	0	4	26.7%
amikacin	0	0	2	2	5	4	2	0	0	0	11	73.3%
arbakacin	0	0	4	2	5	2	2	0	0	0	9	60%
ofloxacin	0	0	0	4	4	3	2	2	0	0	11	73.3%
Total	2	4	11	16	27	14	17	4	5	5	57	54.3%
(%)	1.9	3.8	10.5	15.2	25.7	13.3	16.2	3.8	4.8	4.8		

<sup>a)</sup>Zero indicates the number of isolates for which MICs were identical: - 1, + 1, ect. Indicate  $\pm \log_2$  dilution differences.

CAZ, IPM, OFLX ではプラスの菌株が多く、化学発光法による MIC が標準法より高く出ているのに対して MINO では低く出ている。

### III. 考 察

菌体内には ATP が存在し、生菌数と ATP 量が相関するといわれている。それを利用し、バイオフィルム内の細菌数の測定<sup>6)</sup>や抗菌薬の postantibiotic effect の測定<sup>7)</sup>に利用できるとの報告がある。また、ATP-bioluminescence 法を用いた結核菌<sup>8,9)</sup>やマイコバクテリウム<sup>10)</sup>の薬剤感受性検査が報告されている。一般細菌に対する薬剤感受性検査も行われ報告されている<sup>11-14)</sup>。本研究においても Fig. 1 に示されるように、抗菌薬の存在下における細菌数の増加を反映して ATP 量の増加が認められた。化学発光法では抗菌薬の存在下での菌数の測定が可能となり、その測定に要する時間も短時間であり抗菌薬の効果判定に有力な方法であると考えられた。6 時間という短時間においても濃度低下とともに菌数の増加が認められた。 $\beta$  ラクタム系薬である ABPC, PIPC, CEZ, CTM, CAZ, IPM は濃度低下とともに徐々に増加している。これに対して AMK, ABK, OFLX, VCM はある濃度以下になると急激に菌数が増加することがわかる (Figs. 2, 3)。MIC の測定の標準法がある時間で肉眼的に判断しているのに対して、化学発光法は微量の菌数を測定し、数値化しているため、6 時間以上経過した後に増加するものについては標準法と乖離してしまう。

一致率の低い菌種でも接種菌量を増加させることで従来の方法との一致率が上昇したとの報告もある<sup>14)</sup>。また、メナジオン添加により一致率が上昇したとの報告もある<sup>13)</sup>。しかし、標準法と化学発光法は検査の意味するところが違うので、MIC 測定との一致率ばかりにこだわる必要がなく、MIC 測定の標準法は 18~24 時間の時点での肉眼的に観察できる細菌の増殖であり、化学発光法は 6 時間での ATP 測定による細菌の増殖である。プラスの菌株は化学発光法での菌株の発育はみられるが、標準法で検出できるまで菌株は増殖しない株であり、最初はある菌量までは増殖したが、その後増殖の速度が低下した可能性がある。逆にマイナスの菌株は 6 時間では発育が化学発光法で検出されるまで達しないが、18~24 時間では菌株が増殖するものであるといえる。抗菌薬存在下での菌株の発育速度やどこまで発育するかによると思われる。それゆえ、菌種によっては 2 つの方法で測定した MIC は一致しないのは当然であると思われる。菌種や薬剤により標準法との一致率には乖離を認めることは、今までにも報告されている<sup>11-14)</sup>。腸球菌属に対する CEZ の MIC の一致率が 35%、プロテウス属 *Acinetobacter baumannii* の MIC の一致率が 59%、46% と低いとの報告もある<sup>13)</sup>。フィラメント化した菌体が死滅するまでに時間が掛かることが、一致率の低い原因であるという報告もある<sup>11,13)</sup>。ブドウ球菌では CAM の一致率が

70%、LVFX の一致率が 83.3% と他の薬剤より一致率が低いとの報告<sup>12)</sup>があるが、われわれの結果では MSSA, MRSA とともに CAM の一致率は 100% であり、MSSA の OFLX の一致率は 20% と低かった。同じブドウ球菌である MSSA と MRSA においても、一致率の近い薬剤と大きく異なった薬剤があり乖離していた。ABK や VCM を除いて、薬剤の耐性が増すに従って 2 つの方法による MIC はよく一致しているように思われる。このことは高度耐性菌の方が薬剤含有培地において安定した菌の発育をしており、6 時間後と 18~24 時間後の一致率が高い可能性がある。2 つの方法による MIC の一致率の報告は薬剤、菌種により差異があることは確かである。また、標準法による薬剤感受性検査が抗菌薬の臨床効果として必ずしも反映されない場合もある。この短時間の菌量増加を測定できる化学発光法による MIC のほうが臨床効果と相関する可能性も考えられる。

化学発光法による薬剤感受性検査は短時間に結果が出る。抗菌薬と菌種を選べば、化学発光法による薬剤感受性検査は短時間に結果が得られ標準法と一致率が高く、標準法の代用となりうる。標準法との乖離は認められる菌種、薬剤もあり、実際に臨床検査として臨床像に一致する検査法であるかはこれからの研究を待たなければならない。標準法より臨床経過を反映する検査法になる可能性もあり期待される。

### 文 献

- 1) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Approved standard M2-A6, M100-S8. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. NCCLS, Wayne, PA, 1997
- 2) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Approved standard M7-A4, M100-S8. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. NCCLS, Wayne, PA, 1997
- 3) Lyman G E, DeVincenzo J P: Determination of picogram amounts of ATP using the luciferin-luciferase enzyme system. *Analytical Biochemistry* 21: 435 ~ 443, 1967
- 4) Alexander D N, Ederer G M, Matsen J M: Evaluation of an adenosine 5'-triphosphate assay as a screening method to detect significant bacteriuria. *Journal of Clinical Microbiology* 3: 42 ~ 46, 1976
- 5) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会: 微量液体希釈法による MIC 測定法 (微量液体希釈法)。 *Chemother* 38: 102 ~ 105, 1990
- 6) Kumon H, Ono N, Iida M, et al: Combination effect of fosfomycin and ofloxacin against *Pseudomonas* growing in a biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1038 ~ 1044, 1995
- 7) Mackenzie F M, Gould I M, Chapman D G, et al: Postantibiotic effect of meropenem on members of family Enterobacteriaceae determined by five methods. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2583 ~ 2589, 1994
- 8) Nilsson L E, Hoffner S E, Ansehn S: Rapid susceptibil-

- ity testing of *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of mycobacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1208 ~ 1212, 1988
- 9) 山崎利雄, 佐藤直樹, 山下研也, 他: 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法(第IV報): 改良したATP法と参照法との比較。 *臨床病理* 51: 194 ~ 200, 2003
- 10) Becker B, Lang H R M, Schimke D, et al: Evaluation of bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacteria*. *Eur J Clin Microbiol* 4: 556 ~ 561, 1985
- 11) Hattori N, Nakajima M, O hara K, et al: Novel Antibiotic susceptibility tests by the ATP-Bioluminescence method using filamentous cell treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1406 ~ 1411, 1998
- 12) Manome I, Ikedo M, Saito Y, et al: Evaluation of a novel automated chemiluminescent assay system for antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 41: 279 ~ 284, 2003
- 13) 小原忠博, 上岡恵美, 小勝負恭子, 他: 化学発光法を用いた迅速薬剤感受性検査に関する臨床細菌学的検討 ラビッドミル 栄研 'の使用経験を含めて。 *Jpn J Antibiot* 55: 281 ~ 290, 2002
- 14) 高倉るみ枝, 有田健一, 小原忠博, 他: 化学発光法を用いたMRSAの判定と薬剤感受性報告。 *感染症誌* 77: 654 ~ 660, 2003

## Antimicrobial susceptibility testing by chemiluminescence ATP assay

Masaki Yoshida<sup>1,2)</sup>, Kohya Shiba<sup>1,2)</sup> and Tatsuo Hosoya<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Internal Medicine and <sup>2)</sup>Division of Infection Control

Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo, Japan

Antimicrobial susceptibility testing by chemiluminescence ATP assay is a new method for determining of minimum inhibitory concentrations (MICs) by the broth microdilution method. In this method bacterial ATP is measured by the luciferin-luciferase reaction. We tested 30 *Staphylococcus aureus* strains consisting of 15 methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) strains, and 15 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains for susceptibility to 12 antimicrobial agents and 15 *Pseudomonas aeruginosa* strains for susceptibility to 7 antimicrobial agents and compared the results to those obtained by the standard broth microdilution method. Chemiluminescence ATP assays were performed after incubating inoculated microdilution trays for 6 hr at 35 °C.

In the result of the testing for MSSA, the rate of agreement between the results of the tests for ampicillin was only 60.0%. In addition to the result, the rate of agreement for ofloxacin was only 20.0%. The rates of agreement for MICs by the chemiluminescence ATP assay and standard broth microdilution method for MSSA was high for all antimicrobial agents except ampicillin and ofloxacin. The rate of agreement for MICs by the same two methods for MRSA was also high. On the other hand, the rate of agreement for MICs by the two methods for *P. aeruginosa* was low. The MIC determination method by the chemiluminescence ATP assay was more rapidly than the standard broth microdilution method. The chemiluminescence ATP assay may be the most sensitive testing when we choose the combination a sort of bacteria and antimicrobial agent.