

【総説】

特殊な病原微生物（レジオネラ属菌，クラミジア科菌，結核菌，真菌）の
薬剤感受性検査が抱える課題竹村 弘^{1,2)}¹⁾ 聖マリアンナ医科大学微生物学*²⁾ 聖マリアンナ医科大学病院感染制御部

(平成 23 年 7 月 26 日受付・平成 23 年 8 月 3 日受理)

病原微生物に対する MIC の測定をはじめとする薬剤感受性検査は、感染症の治療において重要な役割を果たしており必須の検査といえる。薬剤感受性検査の標準的な方法やブレイクポイントについては、米国臨床検査標準化協会（Clinical and Laboratory Standards Institute）、日本化学療法学会などの推奨法があり、これらに従えば再現性が高い検査を簡単に行うことができる。一方これらの薬剤感受性検査は、基本的に一般細菌（通性嫌気性菌，好気性菌）を対象にしている。非定型病原体（レジオネラ属菌，クラミジア科菌，結核菌，真菌など）の薬剤感受性検査は、一般細菌と比べて手技的に難しく、問題点を含んでいる検査も多い。本稿では特殊な微生物の薬剤感受性検査の問題点について、いくつかの微生物を例に挙げて概説した。

Key words: drug-susceptibility, *Legionella* spp., Chlamydiaceae, *Mycobacterium tuberculosis*, fungus

微生物の薬剤感受性検査は希釈法，ディスク法とその応用である Etest[®]（シスメックス・ピオメリユー）による検査などがある。一般に外注検査や小規模の検査室では手技が簡便で安価なディスク法が選択されることが多いが，最小発育阻止濃度（MIC）を求めるためには希釈法か Etest[®]による検査を行う必要がある。希釈法には寒天平板法と液体希釈法があるが，実際の検査室では主に液体希釈法の一つである微量液体希釈法が用いられる。微量液体希釈法は，マイクロプレート 1 枚で多数の抗菌薬について検討できるように工夫された検査法である。自動機器を用いれば効率的に多数の菌について検査することが可能で，大学病院など検査件数が多い施設で汎用される方法である。薬剤感受性検査の標準的な方法については，米国臨床検査標準化協会（Clinical and Laboratory Standards Institute：CLSI），日本化学療法学会などの推奨法があり，どの検査室でも再現性が高い検査を簡単に行える。一方これらの薬剤感受性検査は，基本的に一般細菌（通性嫌気性菌，好気性菌）を対象にしておき，その他の病原体（レジオネラ属，クラミジア科菌，結核菌，真菌，マイコプラズマ属菌，リケッチア科菌など）については，まだ検査法の試行錯誤が行われているものも多くある。本稿では特殊な微生物の薬剤感受性検査の問題点について，いくつかの微生物を例に挙げて概説する。

I. 細胞内寄生細菌

1. レジオネラ属菌（*Legionella* spp.）

Legionella pneumophila をはじめとするレジオネラ属菌

（*Legionella* spp.）は，さまざまな細胞の食胞内で増殖可能な細菌で，本菌による肺炎は，空調設備，加湿器，温泉水等から生じる本菌を含むエアロゾルを吸引し，気道末梢の肺胞マクロファージ等の細胞のなかで，菌が増殖することによって惹起されることが知られている¹⁾。レジオネラ属菌は偏性細胞内寄生菌ではないので，Buffered charcoal yeast extract（BCYE）寒天培地や Buffered yeast extract（BYE）液体培地などの人工的培地で培養可能である。したがって，これらの培地を用いた希釈法（寒天平板法希釈法，液体希釈法）やディスク法，Etest[®]による検査も可能である。ただし，BCYE 寒天培地には活性炭が含まれているので，薬剤によっては吸着によって活性が低下し，正確な判定ができないものがある（活性炭の代わりに澱粉を入れた Buffered starch yeast extract [BSYE] 寒天培地が有用な場合がある）。一般にレジオネラ属菌は，多くの抗菌薬に対して薬剤感受性が良好で，耐性菌の報告も非常にまれである。したがって，これらの方法で計測した MIC の値は低い値を示し，この場合 β -ラクタム薬やアミノグリコシド薬にも感受性という結果になる。しかし前述のようにレジオネラ属菌は細胞内寄生細菌なので，治療に際しては抗菌薬の細胞内への移行性が重要で，臨床効果は必ずしもこれらの方法で計測した MIC の結果と一致しない。すなわちレジオネラ属菌は， β -ラクタム薬やアミノグリコシド薬などの細胞内移行が良くない薬剤は臨床的に無効で，正しく抗菌

*神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1

Table 1. MICs^a and MIECs^b of antimicrobial agents for *Legionella pneumophila* SMUM-353 in THP-1

Agents	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MIEC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MIEC/MIC ratio
Ampicillin	0.25	>64	—
Cefotiam	0.5	>64	—
Imipenem	0.032	>64	—
Erythromycin	0.5	0.5	1
Clarithromycin	0.032	0.016	1/2
Azithromycin	0.125	0.064	1/2
Clindamycin	16	2	1/8
Ciprofloxacin	0.016	0.016	1
Minocycline	1	0.125	1/8
Rifampicin	0.00025	0.002	8

^aminimal inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) determined with the broth dilution method using BYE- α broth

^bThe intracellular activities of antimicrobial agents were defined as MIECs, which are the lowest concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of agents reducing the CFU number of *L. pneumophila* to less than 10% of the agent-free control at 48 hour.

薬の臨床効果を評価するためには、何らかの細胞を用いた検査が必要である。この観点から、レジオネラ属菌に対する細胞内抗菌活性を評価する方法として、さまざまな培養細胞を用いた検査法が知られているが、いずれも一般の検査室で検査をすることは難しい^{2,3)}。ヒト単球細胞株 THP-1 を用いた実験系で、抗菌薬の *L. pneumophila* の細胞内増殖抑制効果を評価した例を示す (Table 1)。培養上清内および細胞内の生菌数を総菌数として、24 時間後の総菌数が抗菌薬を添加していないコントロールの 10% 以下となる最小の濃度を MIEC として細胞内増殖抑制効果を評価した³⁾。MIEC/MIC 比で各薬剤を比較すると、 β -ラクタム薬では細胞内増殖抑制効果がないことがわかる。これは細胞内増殖抑制効果を評価する実験系の 1 例であるが、検査法のなかで標準化されたものではなく、細胞、評価法、ブレイクポイントなどが研究者によってまちまちである。したがって、その結果もさまざま、別々の研究における数値の直接的な比較は不可能で、同じ実験系のなかで抗菌薬の効果の優劣を比較する必要がある。

2. クラミジア科菌 (*Chlamydia* spp., *Chlamydomphila* spp.)

クラミジア科菌は偏性細胞内寄生菌なので、レジオネラ属菌と異なり人工的な培地のみで培養することはできない。薬剤感受性検査の場合に限らず、初代分離培養や継代培養においても常にヒトや動物の細胞が必要である。クラミジア科菌の薬剤感受性測定法もレジオネラ属菌と同様に、国際的な標準法は存在しない。しかし欧米の報告者の方法と原理的には同様で、国際的に通用する統一化を目指し、1992年に日本化学療法学会の MIC 測定法検討委員会によって、わが国における標準法が示され、現在でもこれに準じて検査が行われている^{4,5)}。この

方法では HeLa229 細胞を使用するが、*Chlamydomphila pneumoniae* ではより増殖が良い HL 細胞や Hep2 細胞を用いる研究者が多い (MIC/MLC の値に大差はない)。通常 MIC と合わせて、最小殺菌濃度 (minimal lethal concentration : MLC) を求める。MLC は、一般細菌における MBC (minimal bactericidal concentration) と同様の概念で、MIC 判定後に培養上清を薬剤無添加培地に交換し、さらに 48 または 72 時間培養し判定する。MIC/MLC のエンドポイントの判定は、蛍光標識したモノクローナル抗体を用いて細胞を染色し、蛍光顕微鏡 ($\times 100$) の観察で封入体 (inclusion body : IB) が見えなくなる最小濃度をもって判定する。この際、control の IB と比較して明らかに小さいが、発育 (+) と判定する Small inclusion と、(-) と判定する Micro inclusion (200 倍で見ると数個のクラミジア菌体を含んでいる) の識別には熟練を要する。また判定以外にも、①あらかじめ適切な感染力価をもつクラミジア浮遊液を調整して保存しておかなくてはならない、② MIC の判定までに 48 または 72 時間 (MLC にはさらに 48 または 72 時間) かかる、③ 細胞培養が可能で P2 レベル以上の実験室や蛍光顕微鏡が必要である、などが一般細菌の薬剤感受性検査とは大きく異なった点である。これらのため通常の病院の細菌検査室で検査をすることは、レジオネラ属菌の場合よりもさらに難しいと考えられる。クラミジア科菌は元来耐性菌が出現しにくいとされていたが、耐性菌が出現しうるとの報告がみられている⁶⁾。わが国の現状では、クラミジア科菌の新規の臨床分離菌を分離することもままならない。一般に分離菌の各種薬剤に対する感受性を検討することは、薬剤耐性菌の監視、新薬の効果の検討などに欠かせないが、クラミジア科菌の場合、それを行う施設や人材の確保こそが今後の最も大きな課題であろう。

II. 結核菌

結核菌も細胞内寄生細菌であるが、レジオネラ属菌と同様に無細胞の人工的な培地で培養が可能である。結核菌をはじめとする抗酸菌は、一般細菌と異なり培養に 2~8 週間を要することが臨床的に大きな問題である。近年、Middlebrook 液体培地を用いた増菌培養法では 1~2 週間で判定可能で遺伝子診断法と組み合わせれば、2 週間以内に培養の結果を出すことも可能である⁷⁾。薬剤感受性に関しても無細胞の培地で行うさまざまな方法がすでに確立しており、わが国の標準的な検査法は小川培地 (固形培地) を用いた比率法である⁸⁾。比率法とは接種菌量の 1/100 の菌量を含むコントロールと比較して、発育が悪い場合を感性と見る方法である。小川培地を用いた方法では判定までに 3~4 週間の時間が必要で、CLSI は「卵培地 (小川培地) は抗酸菌の薬剤感受性試験に不適切である」として、薬剤感受性検査に Middlebrook の寒天培地または液体培地の使用を勧めている⁹⁾。このため結核菌検査指針 2007 では小川比率法に加え、液体培養法の

Table 2. Incubation periods and end points for the broth microdilution MIC determination of antifungal agents

fungi		antifungals	incubation periods	end points
yeast	<i>Candida</i> spp.	azoles	24 h and 48 h ^a	50% growth inhibition
		amphotericin B	24 h or 48 h	100% growth inhibition
		flucytosine	48 h	50% growth inhibition
		micafungin	24 h	50% growth inhibition
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	azoles	70-74 h	50% growth inhibition
		amphotericin B	70-74 h	100% growth inhibition
flucytosine		70-74 h	50% growth inhibition	
filamentous fungi	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.	azoles amphotericin B	46-50 h	100% growth inhibition
		micafungin	21-26 h	MEC ^b
	<i>Scedosporium apiospermum</i>	azoles amphotericin B	70-74 h	100% growth inhibition
		micafungin	46-72 h	MEC ^b

^aMICs for strains exhibiting trailing growth are determined at 24 h, and for normal growth strains at 48 h.

^bminimum effective concentration: the lowest concentration of micafungin that produces short and aberrant hyphal branchings microscopically.

BACTEC MGIT 960 AST[®] (日本ベクトン・ディッキンソン) と微量液体希釈法で MIC を求めるプロスミック MTB-1[®] (極東製薬工業) を取り入れた¹⁰⁾。これらの検査は結果が 1 週間程度で出るため、CDC が提唱する「結核菌群の分離と同定結果を 21 日以内、薬剤感受性検査結果を 30 日以内に報告する¹¹⁾」という目標をクリアできる。ただしわが国では、1~2 週間程度結果が遅くなるが、費用の面から従来比率法を応用したキットであるマイクロタイター法やウエルパック培地 S[®] (日本ビーシージー) を用いたトレイ法が主流である。これは、わが国の多くの施設では通常結核菌を排菌していることがわかった時点で、結核患者用病床を有する施設に患者を転送する。したがって、診断には迅速性を求め液体培養法を行う施設が増えてきているが、薬剤感受性は多少遅れても操作が簡単な従来法である小川比率法を採用することが多いのかもしれない。米国ほど多剤耐性菌が多くないが、小川比率法のキットのほうが多くの薬剤について同時に検査できるという長所もある。施設によってさまざまな検査法が採用されているが、検査法間での結果の不一致も報告されているので精度管理については注意が必要である。

III. 真 菌

深在性真菌症の主な原因微生物は、カンジダ属やクリプトコッカス属などの酵母様真菌とアスペルギルス属を代表とする糸状菌である。真菌の薬剤感受性検査としては、一般細菌と同様の方法で微量液体希釈法や Etest[®] による検査が可能で、微量液体希釈法は CLSI の標準法が存在する (酵母様真菌: M27-A3 法¹²⁾, 糸状菌: M38-A2 法¹³⁾)。ただし感性か耐性かを示すブレイクポイントは、カンジダ属に対するものしか規定されていない。またカンジダ属のブレイクポイントには「用量依存的感性: S-

DD」という独特の概念がある。これは、「薬剤の血中濃度を最大限に高めれば有効」とされる濃度で、一般細菌の中間 (I) とほぼ同様の意味と思われる。CLSI 法は基本的に RPMI1640 培地を用いた微量液体希釈法であり、菌接種後 24~72 時間で濁度を目視判定する。判定時間や MIC を決めるエンドポイントについては菌種や薬によって異なっており、一般細菌よりもかなり複雑である (Table 2)。エンドポイントの判定は、amphotericin B (AMPH-B) では完全阻止濃度、flucytosine (5-FC), fluconazole (FLCZ) などのアゾール系抗真菌薬、micafungin (MCFG) などカンディン系抗真菌薬では 50% 以上濁度が抑制された濃度とする。カンディン系抗真菌薬の糸状菌に対するエンドポイント判定では、発育阻止が起こりにくいため、顕微鏡的に菌糸の形態変化が確認できる濃度 (MEC: minimal effective concentration) を用いることが勧められている。また酵母様真菌の MIC 判定において、AMPH-B のエンドポイントは 24 時間または 48 時間培養で通常容易に目視で判定できるが、アゾール系抗真菌薬では 24 時間判定した場合と 48 時間判定した場合で判定が数 10~数 100 倍異なる株がある。この現象をトレーリング発育 (trailing growth: TG) という。わが国の全国集計でカンジダ属の約 5%, *Candida tropicalis* の約 30% に TG 株が含まれているという報告がある¹⁴⁾。したがってカンジダ属については 24 時間と 48 時間の両時点で判定を行い、そのうえで TG 株のみ 24 時間判定値を、非 TG は 48 時間判定値を採用するのが妥当である。またカンジダ属に対する MCFG の MIC の判定で、MIC よりも高い濃度で唐突に発育があるパラドックス効果 (paradoxical effect) と呼ばれる現象もある。こういったさまざまな異常現象がなくても 50% 発育阻止を目視で判定すること自体難しい。そこで目視判定を

簡単にする目的で開発された酵母真菌薬剤感受性キット ASTY[®] (極東製薬工業) を用いた検査を採用する検査室が多い。ASTY[®] による検査は微量液体希釈法を原理として、培地に添加したレザズリンという酸化還元指示薬の色調の変化を利用した比色でエンドポイントを判定する (真菌の発育に応じて赤色から青色に変わる)。その試験結果は CLSI・M27-A との良好な相関性を示す¹⁵⁾ が、MCFG や VRCZ などの比較的新しい抗真菌薬や TG 株に関しての相関は不明である。

糸状菌に対する薬剤感受性検査は前述のように CLSI の標準法 (M38-A2 法) があるものの、さらに問題点が多い。即ち、①均一濃度の接種菌液をつくるのが難しい、②専用の測定キットがない、③ブレイクポイントがなく感性・耐性の判定ができない、④ MCFG のエンドポイントは、顕微鏡的に MEC を確認しなくてはならないなどである。さらに、求めた MIC が、どれだけ実際の臨床効果と一致しているかについては、まだデータが不十分で今後の研究結果を待たなくてはならない。このため、市販のカンジダ属用の微量液体希釈法のプレートがそのまま使用できるにもかかわらず、多くの一般病院の検査室では糸状菌に対する MIC 測定は行われていない。

IV. おわりに

冒頭でも述べたように私達が日常臨床で目にする MIC や薬剤感受性検査の結果は、基本的に一般細菌 (通性嫌気性菌, 好気性菌) を対象にしており、本稿で紹介したような病原微生物の薬剤感受性検査は特殊なものと言わざるをえない。しかしそのような微生物にも今後耐性菌の増加が懸念されるものがある。薬剤感受性と臨床効果の相関を意識した治療を行うことが重要で、現在は実験室レベルの検査であっても、積極的に臨床応用していくべきであろう。

文 献

- 1) Horwitz M, Silverstein S: Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* 1980; 66: 441-50
- 2) Higa F, Kusano N, Tateyama M, Shinzato T, Arakaki N, Kawakami K, et al: Simplified quantitative assay system for measuring activities of drugs against intracellular *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1392-8

- 3) Takemura H, Yamamoto H, Kunishima H, Ikejima H, Hara T, Kanemitsu K, et al: Evaluation of human monocytic cell line THP-1 model for assay of activities of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 589-94
- 4) クラミジア MIC 標準委員会 (代表: 熊本悦明): クラミジア MIC 測定法—日本化学療法学会標準法 (1991年改訂版)—。 *Chemotherapy* 1992; 40: 304-7
- 5) クラミジア MIC 標準委員会 (代表: 熊本悦明): クラミジア MLC 測定法—日本化学療法学会標準法 (1991年)—。 *Chemotherapy* 1992; 40: 315-21
- 6) Sandoz K M, Rockey D D: Antibiotic resistance in Chlamydiae. *Future Microbiol* 2010; 5: 1427-42
- 7) 小林寅喆, 戸田陽代, 小山悦子, 長谷川美幸, 橋口則重, 荒井秀夫, 他: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) を用いた自動抗酸菌検出装置の検出能力に関する検討。 *感染症誌* 1999; 73: 172-8
- 8) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 新結核菌検査指針 2000, 結核予防会, 東京, 2000
- 9) Clinical and Laboratory Standards Institute: Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other aerobic *Actinomycetes*; Approved standard-second edition, M24-A2, CLSI, Wayne, PA, 2011
- 10) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 結核菌検査指針 2007, 結核予防会, 東京, 2007
- 11) Centers for Disease Control and Prevention: CDC guidelines for tuberculosis control in health care facilities. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1994; 43: 1-13
- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard-third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, 2008
- 13) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard-second edition M38-A2. CLSI, Wayne, PA, 2008
- 14) Takakura S, Fujihara N, Saito T, Kudo T, Iinuma Y, Ichiyama S, et al: National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 283-9
- 15) Pfaller M A, Arisan S, Lozano-Chiu M, Chen Y, Coffman S, Messer S A, et al: Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2609-12

Problems in the susceptibility tests for atypical pathogens, *Legionella* spp.,
Chlamydiaceae, *Mycobacterium tuberculosis* and fungi

Hiromu Takemura^{1,2)}

¹⁾ Department of Microbiology, St. Marianna University, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa, Japan

²⁾ Department of Infection Control, St. Marianna University Hospital

In vitro antimicrobial susceptibility tests, MICs determinations, can play an essential role in the clinical management of infectious diseases. Standard methods for measuring MICs and their break points were supplied by some organizations, e.g., Clinical and Laboratory Standards Institute and Japanese Society of Chemotherapy. Most of their standards were for general bacteria. The susceptibility tests for the atypical pathogens e.g., *Legionella* spp., Chlamydiaceae, *Mycobacterium tuberculosis* and fungi are generally more difficult than for general bacteria and some of them are very problematic. The major problems in the susceptibility tests for atypical pathogens are presented in this review.