

【短 報】

Mycobacterium intracellulare の異なる集落変異株の
各種抗菌薬に対する感受性について佐藤 勝昌¹⁾・富岡 治明¹⁾・佐野 千晶¹⁾・清水 利朗¹⁾・佐野 啓介^{1,2)}・松島 敏春³⁾¹⁾島根医科大学微生物・免疫学教室*²⁾同 耳鼻咽喉科学教室³⁾川崎医科大学呼吸器内科学教室

(平成 14 年 1 月 5 日受付・平成 14 年 2 月 26 日受理)

Mycobacterium avium complex (MAC) には集落形態を異にする 3 種の集落変異株, すなわち SmT 株, SmO 株および Rg 株があるが, それらのビルレンスは異なることが知られている。今回は同一の MAC 菌株から分離された各集落変異株が rifabutin, rifampicin, streptomycin, kanamycin, ethambutol, isoniazid, ofloxacin, ciprofloxacin および cefoxitin に対してどのような感受性を示すかについて検討した。その結果, (1) ethambutol と isoniazid を除くいずれの供試薬剤に対しても, SmT 株は SmO 株に比べて, その感受性が著しく低いこと, (2) Rg 株は SmT 株と SmO 株の中間型の薬剤感受性を示すことが明らかになった。これらのことは, 臨床材料より分離された MAC 菌株の薬剤感受性判定においては, 供試菌株の集落形態を知ることが重要であることを示している。

Key words: *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium intracellulare*, 集落変異株, 薬剤感受性

Mycobacterium avium complex (MAC) には集落形態を異にする 3 種の集落変異株, すなわち, 平滑, 透明, 不整形扁平集落株 (SmT), 平滑, 不透明, ドーム状集落株 (SmO), および粗糙, 不透明, 不整形集落株 (Rg) が知られている^{1,2)}。マウスやニワトリに対するビルレンスはおおむね SmT, Rg>SmO であること^{1,3)}, また, SmT 菌と SmO 菌とでは IFN- γ knockout マウスでの感染動態に差異がみられ, SmO 菌は SmT 菌とは異なり IFN- γ 非依存性に排除されることや⁴⁾, ヒト単球に感染させた場合の IL-18 や IFN- γ 産生誘導能は SmO>SmT であること⁵⁾などが報告されている。なお SmT 菌は SmO 菌よりもマクロファージ (M Φ) の殺菌作用に対して抵抗性が強いが, 前者では M Φ との接触に際してその活性酸素産生誘起能が著しく低いことが一因をなしている^{3,6)}。さらに, SmT 菌は酸性多糖と脂質よりなる外層を有し, M Φ 内に貪食された SmT 菌には菌の周りに glycopeptidolipid (GPL) よりなる電子線透過帯 (ETZ) が認められており, このものが M Φ の殺菌エフェクター分子に対して一種のバリアーとして働いている可能性も指摘されている^{2,7)}。また, ETZ は抗菌薬の MAC 菌体内への移行に対するバリアーとして働くため, SmT 菌は SmO 菌に比べて抗菌薬や抗菌物質に対する感受性が低いものとされているが⁸⁻¹⁰⁾, 同一の MAC 菌株から分離された SmT, SmO, Rg 集落変異株が各種抗菌薬に対して何のような感受性を示すのかにつ

いて詳しく比較検討した例にはまだ接し得ていない。

さきに著者らが, わが国の肺 MAC 症患者喀痰 (50 検体) の小川培地での初代培養を 7 H 11 寒天平板上で劃線分離培養し SmT, SmO, Rg 3 種の集落変異株の分布について調べたところ, SmO 集落変異株が 0~1% で残りが SmT 集落変異株であったものが 28%, 同様に SmO 集落変異株の占める割合が 2~10%, 11~50%, 51~80%, 81~100% であったものが, それぞれ 8, 28, 8, 26% という分布を示すという成績が得られており, また 1 検体 (2%) からは Rg 集落変異株のみが分離されている (成績未発表)。

ところで, MAC 感染症では環境からの菌の伝播が主要な感染経路であるため polyclonal infection が多く, AIDS 患者での全身播種性 MAC 症では 30% にもおよぶものと報告されている¹¹⁾。しかしながら, 通常の肺 MAC 症などのいわゆる限局型の MAC 感染症では, やはりほとんどの場合は monoclonal infection であるうえに¹²⁾, ここで問題としている同一菌株由来の SmT, SmO, Rg 3 種の集落変異株の存在は, 実際に monoclonal infection のタイプの MAC 症例についての RFLP 遺伝子分析によっても証明されており¹³⁾, 上述のわが国の肺 MAC 症患者喀痰中の 3 種の MAC 集落変異株の分布は, 各患者の感染部位における monoclonal な MAC 感染菌株から生じた各集落変異株の分布を示しているものと考えて大過ないものと思われる。このような状況にかんが

*島根県出雲市塩冶町 89-1

みた場合、臨床分離 MAC 菌株よりの 3 種の集落変異株の諸種抗菌薬に対する感受性について比較検討することによって、MAC 患者よりの分離 MAC 菌についての薬剤感受性検査成績の精度の向上を考える上で有用な知見が得られるものと期待される。そこで今回は、わが国の肺 MAC 症患者喀痰より分離された SmT, SmO および Rg の 3 種の MAC 集落変異株について、種々の抗菌薬に対する感受性についての比較検討を行った。

供試菌としては、MAC 肺感染症患者よりの臨床分離株である MAC N-235, N-242, N-257, N-260, N-275, N-279, N-281 株 (いずれも DNA プローブテストで、*Mycobacterium intracellulare* と同定) の計 7 菌株より、以下の方法で SmT, SmO および Rg 集落変異株を分離し実験に供した。すなわち、MAC 症患者喀痰よりの小川培地上初代培養菌を Middlebrook 7H10 寒天培地に劃線接種し、37°C で 3 週間培養後に、SmT, SmO および Rg に特徴的な形態の集落を拾い、さらに 7H10 寒天培地上での分離培養を 2~4 回繰り返すことにより、それぞれの集落変異株の純粋培養を得た。次いで、分離菌を 7H9 培地中で 5 日間培養した後、-80°C に保存した。用時、解凍し 7H9 培地中で 5 日間培養したものを供試菌として用いた。なお、MAC の臨床分離株には、SmT と SmO の中間型の平滑、透明、ドーム状集落を形成するものが多く²⁾、同一菌株より典型的な SmT および SmO 株を分離できるものが少ないため、今回は SmT 株、SmO 株各 7 株ずつを供試するに留まった。このうち同一菌株から SmT, SmO および Rg 集落変異株のすべてを分離し得たのは、N-257, N-260, N-275 の 3 菌株のみであった。

供試薬剤としては、rifabutin (RBT), rifampicin

(RFP), streptomycin (SM), kanamycin (KM), ethambutol (EB), isoniazid (INH), ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX) および cefoxitin (CFX) を用いた。また、供試薬剤の各菌株に対する MIC 値は、7H10 培地を用いての寒天希釈法によって判定したが¹⁴⁾、正確な MIC 値を得るため、計 3 回以上の繰り返し実験を行った。

Table 1 には、今回供試した薬剤の供試菌株の SmT, SmO および Rg 集落変異株に対する MIC 値を示したが、いずれの薬剤の MIC 値とも SmT 株 \geq Rg 株 \geq SmO 株の順であることが明らかになった。また、SmT および SmO 株に対する MIC₅₀ 値 (正確には MIC₅₇) を求めてみると、いずれの薬剤の MIC₅₀ 値とも SmT 株 \geq SmO 株であった。この場合、MIC₅₀ (SmT)/MIC₅₀ (SmO) 値は、供試薬剤ごとに大きく異なり、1~128 と幅広い分布を示していた (データ省略)。

Table 2 には、Table 1 の成績より求めた各薬剤の各供試菌株の SmT 株の SmO 株に対する MIC 値の比の値 (MIC_T/MIC_O 値)、ならびに、SmT 株の Rg 株に対する MIC 値の比の値 (MIC_T/MIC_R 値) を示した。まず、MIC_T/MIC_O 値についてであるが、EB や INH の場合を除いては、このパラメーターは供試菌株間で大きく変動しており幅広い分布を示すことがわかった。おおむね RFP, OFLX, CPFX, CFX, RBT, SM, KM, EB, INH の順であった。同様に MIC_T/MIC_R 値についてみると、MIC_T/MIC_O 値ほど高い値を示さず、おおむね CPFX, OFLX, CFX, RFP, RBT, KM, SM, EB, INH の順であることがわかった。

以上の成績より、(1) INH と EB を除くいずれの供試薬剤に対しても、SmT 株は SmO 株に比べて、その

Table 1. *Mycobacterium intracellulare* SmT, SmO and Rg colonial variant susceptibility to antimicrobial drugs^{a)}

Strain	Colonial variant	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								
		RFP	RBT	SM	KM	EB	INH	OFLX	CPFX	CFX
N-235	SmT	6.25	0.4	50	25	12.5	12.5	25	3.13	100
	SmO	≤ 0.013	≤ 0.013	3.13	3.13	12.5	12.5	3.13	0.4	6.25
N-242	SmT	6.25	0.2	25	25	12.5	1.6	50	25	>100
	SmO	0.8	0.025	1.6	6.25	6.25	0.8	3.13	1.6	25
N-257	SmT	1.6	0.025	6.25	6.25	6.25	0.8	12.5	6.25	>100
	SmO	0.025	≤ 0.013	0.8	1.6	3.13	0.8	0.2	0.2	6.25
	Rg	0.2	0.025	6.25	3.13	6.25	12.5	0.8	0.4	3.13
N-260	SmT	3.13	0.2	25	25	25	3.13	50	12.5	>100
	SmO	≤ 0.013	≤ 0.013	1.6	3.13	12.5	3.13	0.8	0.2	12.5
	Rg	1.6	0.2	12.5	12.5	12.5	3.13	12.5	3.13	>100
N-275	SmT	1.6	0.2	25	25	6.25	25	50	12.5	>100
	SmO	≤ 0.013	≤ 0.013	0.4	1.6	1.6	12.5	0.2	0.1	0.4
	Rg	0.8	≤ 0.013	6.25	6.25	6.25	25	12.5	1.6	50
N-279	SmT	6.25	0.2	50	25	12.5	12.5	50	25	>100
	SmO	0.05	0.1	1.6	3.13	12.5	6.25	1.6	0.4	12.5
N-281	SmT	3.13	0.4	25	25	12.5	>100	50	12.5	>100
	SmO	0.025	≤ 0.013	1.6	0.2	12.5	>100	0.4	0.1	6.25

^{a)}MIC was measured by agar dilution using 7H10 medium

RFP: rifampicin, RBT: rifabutin, SM: streptomycin, KM: kanamycin, EB: ethambutol, INH: isoniazid, OFLX: ofloxacin, CPFX: ciprofloxacin, CFX: cefoxitin

Table 2. Differences in antimicrobial drug MICs for *Mycobacterium intracellulare* SmT, SmO and Rg colonial variants^{a)}

Parameter	Strain	RFP	RBT	SM	KM	EB	INH	OFLX	CPFX	CFX
MIC _T /MIC _O ^{b)}	N-235	≥512	≥32	16	8	1	1	8	8	16
	N-242	8	8	16	4	2	2	16	16	≥8
	N-257	64	≥2	8	4	2	1	64	32	≥32
	N-260	≥256	≥16	16	8	2	1	64	64	≥16
	N-275	≥128	≥16	64	16	4	2	256	128	≥512
	N-279	128	2	32	8	1	2	32	64	≥16
	N-281	128	≥32	16	128	1	1	128	128	≥32
MIC _T /MIC _R ^{c)}	N-257	8	1	1	2	1	1/16	16	16	≥64
	N-260	2	1	2	2	2	1	4	4	1
	N-275	2	≥16	4	4	1	1	4	8	≥4

^{a)}Parameters were calculated from MICs in Table 1

^{b)}MIC_T/MIC_O: MIC ratio of a given test drug for SmT variant (MIC_T) to its SmO variant MIC (MIC_O)

^{c)}MIC_T/MIC_R: MIC ratio of a given test drug for SmT variant (MIC_T) to its Rg variant MIC (MIC_R)

RFP: rifampicin, RBT: rifabutin, SM: streptomycin, KM: kanamycin, EB: ethambutol, INH: isoniazid, OFLX: ofloxacin, CPFX: ciprofloxacin, CFX: cefoxitin

感受性が著しく低いこと、ならびに、(2) Rg 株は SmT 株と SmO 株の中間型の薬剤感受性を示すことが明らかになった。このことは、臨床材料より分離された MAC 菌株の感受性判定、特に、MIC_T/MIC_O 値や MIC_T/MIC_R 値が大きい薬剤 (rifamycin 誘導体, キノロン薬, アミノ配糖抗生物質) に対する感受性判定においては、分離菌株の集落の形態を知ること、また可能なら SmT 菌を分離して薬剤感受性試験を行うことが重要であることを示している。この現象については、今後の検討課題と思われるが、以下に述べるように、供試薬剤の MIC_T/MIC_O の高値と、その薬剤の抗菌活性発現のメカニズムとの間には一定の連関が認められる。すなわち、高い MIC_T/MIC_O 値を示す薬剤 (rifamycin 誘導体, キノロン薬) は、いずれも菌の核酸合成系阻害剤 (rifamycin, RNA 合成の阻害; キノロン薬, DNA gyrase 阻害) であり、逆に MIC_T/MIC_O 値の低い薬剤 (EB, INH) はいずれも抗酸菌の広義の細胞壁の構築を阻害する薬剤 (EB, アラビノガラクトランの合成阻害; INH, ミコール酸の合成阻害) である。また、MIC_T/MIC_O 値が中間の値を示すアミノ配糖抗生物質 (SM, KM) は、いずれも菌の蛋白合成系の阻害薬である。したがって、SmT 株と SmO 株 (あるいは Rg 株) の間での各薬剤に対する感受性の違いは、供試薬剤の抗菌メカニズムの違いを反映しているもののように思われる。

さきにわれわれは、*M. intracellulare* は *M. avium* に比べて RFP, SM, KM に対する感受性が高いこと、また、これとは逆に OFLX, CPFX, sparfloxacin などのキノロン薬に対しては、*M. avium* の方が *M. intracellulare* に比べて感受性が高いことを見いだしている^{14,15)}。今回の検討では、*M. intracellulare* に属する菌株のみを実験対象としたが、*M. avium* についても今回得られたものと同様の成績が得られるか否かは、興味深い問題である。現在、この点について知るべく、供試薬剤の種類を増やしての検討を進めつつあるが、その成績については別の機会に報告したい。

謝 辞

供試薬剤を分与いただいた第一製薬株式会社、バイエル薬品株式会社、ファルミタリアカルロエルバ株式会社に深謝します。

文 献

- Schaefer W B, Davis C L, Cohn M L: Pathogenicity of transparent, opaque and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 120: 499~506, 1970
- Belisle J T, Brennan P J: Molecular basis of colony morphology in *Mycobacterium avium*. *Res. Microbiol.* 145: 237~242, 1994
- Saito H, Tomioka H: The role of macrophages in host defence mechanisms against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Res. Microbiol.* 141: 207~212, 1990
- Doherty T M, Sher A: Defects in cell-mediated immunity affect chronic, but not innate, resistance of mice to *Mycobacterium avium* infection. *J. Immunol.* 58: 4822~4831, 1997
- Shiratsuchi H, Ellner J J: Expression of IL-18 by *Mycobacterium avium*-infected human monocytes; association with *M. avium* virulence. *Clin. Exp. Immunol.* 123: 203~209, 2001
- Tomioka H, Saito H: Macrophage chemiluminescence induced by interaction with transparent and opaque colonial variants of *Mycobacterium intracellulare*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 3011~3015, 1993
- Rastogi N, David H L: Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria. *Biochimie* 70: 1101~1120, 1988
- Woodley C L, David H L: Effect of temperature on the rate of the transparent to opaque colony type transition in *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9: 113~119, 1976
- Saito H, Tomioka H: Susceptibilities of transparent, opaque, and rough colonial variants of *Mycobacterium avium* complex to various fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 400~402, 1981
- Mizuguchi Y, Udou T, Yamada T: Mechanism of antibiotic resistance in *Mycobacterium intracellulare*. *Microbiol. Immunol.* 27: 425~431, 1983
- Slutsky A M, Arbert R D, Barbaer T W, et al.:

- Polyclonal infections due to *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS detected pulse-field gel electrophoresis of sequential isolates. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1773~1778, 1994
- 12) von Reyn C F, Pestel M, Arbeit R D: Clinical epidemiologic implications of polyclonal infection due to *Mycobacterium avium* complex. *Res. Microbiol.* 147: 24~30, 1996
- 13) Wright E L, Ginkel S Z, Rastogi N, et al.: Monoclonal infection involving *Mycobacterium avium* presenting with three distinct colony morphotypes. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2475~2478, 1996
- 14) Tomioka H, Sato K, Saito H, et al.: Susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* to various antimicrobial drugs. *Microbiol. Immunol.* 33: 509~514, 1989
- 15) Tomioka H, Saito H, Fujii K, et al.: In vitro antimicrobial activity of benzoxazinorifamycin, KRM-1648, against *Mycobacterium avium* complex, determined by the radiometric method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 67~70, 1993

Transparent, opaque and rough colonial variant susceptibility of *Mycobacterium intracellulare* to antimicrobial drugs

Katsumasa Sato¹⁾, Haruaki Tomioka¹⁾, Chiaki Sano¹⁾, Toshiaki Shimizu¹⁾,
Keisuke Sano^{1,2)} and Toshiharu Matsushima³⁾

¹⁾Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, 89-1 Enya-cho, Izumo, Shimane 693-8501, Japan

²⁾Department of Otorhinolaryngology, Shimane Medical University

³⁾Division of Respiratory Diseases, Department of Medicine, Kawasaki Medical School

Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC) has 3 colonial variants—SmT with smooth, transparent, irregularly shaped colonies; SmO with smooth, opaque, dome-shaped colonies; and Rg with rough, granular, irregularly shaped colonies. These colonial variants differ in virulence in experimental animals. We compared the susceptibilities of 3 colonial variants isolated from identical *M. intracellulare* strain to rifampicin, rifabutin, streptomycin, kanamycin, ethambutol, isoniazid, ofloxacin, ciprofloxacin and cefoxitin, using 7 *M. intracellulare* strains isolated from patients with MAC pulmonary infection. SmT variants were much more resistant to tested antimicrobial drugs, except for ethambutol and isoniazid, than SmO variants. Rg variant susceptibility patterns to tested drugs proved to lie between SmT and SmO variants, indicating the importance of determining the MAC strain colony form isolated from clinical specimens in determining drug susceptibility.