

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究 重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発

所 属 国立感染症研究所 細菌部

研究者 山崎 利雄

分担研究者

極東製薬工業（株） 三輪 昭成

要旨

結核菌の主要 5 薬剤それぞれに単剤耐性を持つ参照菌株を用いて、RFP、INH、EB に対する主要 5 抗結核薬剤の相乗効果を調べた。組み合わせにより、単剤に高度耐性菌であっても相乗効果により MIC は劇的に低下した。また、ATP 測定による迅速薬剤感受性試験法（マクロ法）の微量化も可能になった。

1. 研究目的

わが国の結核の治療は、抗結核剤を 2 から 3 剤組み合わせる多剤併用療法が行われている。近年は、ヒドラジッド（INH）、リファンピシン（RFP）とエタンブトール（EB）または、ストレプトマイシン（SM）にピラジナミド（PZA）を加えて、6 ヶ月で治療する短期化学療法が主流になっている。しかし、現行の薬剤感受性試験法は、いずれの方法も一剤ごとについて検査されている。そのため、現行の薬剤感受性試験で被検菌が耐性菌になったと判定されると、別の薬剤に代えて治療が続けられる。わが国では、現在のところ耐性菌の頻度は少なく、結核患者から分離される 95%は、抗結核薬に感性的な結核菌である。しかし、多剤耐性菌による結核感染症例が、結核病学会等で聞かれるようになり、難治性結核の治療に苦慮していると報告されている。とくに、RFP は有効な抗結核剤であるが検査の結果、低度耐性であっても、別の薬剤に代えて治療が続けられる。そのため、患者は、適切な治療を受けられず、予後が悪かったり、再発の恐れがあったりする。結核の治療は、多剤併用療法なので、一剤に耐性菌であっても、他の薬剤に感性的菌であれば、菌は死滅させられ治療は成功する。そのため、RFP を越える有効な治療薬がない現在、より適切な治療のために、実際の治療に則した新しい薬剤感受性試験法を確立することが望まれている。ところが、わが国の結核菌薬剤感受性試験法は、基礎培地に 1 % 小川培地を用いているため、最終判定結果を得るまでに 3 から 4 週間を必要とする。また、操作法が煩雑で判定にも技術者の熟練を要し、個人差が出る場合もある。さらに、判定時期を遅らせると耐性と判定されやすいなどの問題もある。また、欧米では AIDS の流行に伴い、多剤耐性菌による感染が増加している。そのため、迅速で正確な薬剤感受性試験法の開発が望まれている。結核患者の治療において正確な菌の薬剤感受性を知ることが重要であり、早期に菌の薬剤感受性がわかれば、患者の予後を最良にすることができる。また、自動化により、検査技師の結核感染の危険性を最小にする事ができる。さらに、治療期間の短縮により結果的に医療費の抑制にもつながる。結核菌の薬剤耐性遺伝子を PCR にて検出する方法は迅速であるが、操作が煩雑で、検査費用が高く耐性情報も限られている。そこでわれわれは、生きている微生物の数が、微生物の持っている adenosine triphosphate (ATP) 量を測定することにより知ることができることに着目し、結核菌の単剤について薬剤感受性を検査する迅速な方法（ATP 法と略す）を開発した。主要 5 薬剤の組み合わせによる相乗効果を調べ、薬剤感受性試験に用いる適切な薬剤濃度を決定するとともに、薬剤感受性試験の迅速化のために、ATP 法を応用し、微量化や自動化を図り、

実際の治療に行われている、多剤併用療法に則した新しい薬剤感受性試験法の開発をすることを最終目的とした。

2. 研究方法

(1) 使用菌及び接種菌液の調製

当研究室保存の結核菌参照菌株 American Type Culture Collection (ATCC) 27294、ATCC35820 [streptomycin (SM)耐性]、ATCC35822 [isoniazid (INH)耐性]、ATCC35827 [kanamycin (KM)耐性]、ATCC35837 [ethambutol (EB)耐性]、ATCC35838 [rifampicin (RFP)耐性]および臨床分離結核菌 10 株を用いた。−80℃にて保存された菌株を 1% 小川培地に接種、37℃で 2~4 週間培養後、1/4 白金耳の菌塊を Mddbrook 7H9 broth 5m に懸濁し、通常大気中、37℃で 3 から 7 日間培養し、McFarland #0.5 濁度以上の菌浮遊液を得た。この菌液を充分攪拌、10 分間静置後、その上清を新しい Mddbrook 7H9 broth にて McFarland #0.5 濁度に調製した。

(2) 微量液体希釈法での最低阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC)の測定

結核菌の薬剤感受性試験用プロスミック MTB-1 キット (極東製薬工業) を用いて参照菌株の MIC を測定した。すなわち、Mddbrook 7H9 broth 4m に菌苔を内径 3mm の白金耳で 1/4 菌量接種し、充分攪拌をおこない McFarland No.1 ($\sim 3 \times 10^7$ CFU/m) 濁度に相当する菌濃度に達するまで $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で密栓静置培養 (3~5 日間) をおこなった。得られた McFarland No.1 濁度菌液を更に Mddbrook 7H9 broth にて 100 倍希釈した後、その 0.2m を薬剤乾燥固着マイクロプレート (96 穴マイクロプレート: Nunc 社製) の各ウェルに分注し、5% CO₂、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ にて培養し、7 日~10 日後、肉眼的に菌発育がまったく認められない最小濃度を MIC とした。

(3) 主要 5 薬剤の相乗効果の検討

プロスミック MTB-1 の各 1~11 列のウェルに RFP 1.0~0.004 (最終濃度 0.5~0.002) $\mu\text{g}/\text{m}$ 、INH 1.0~0.003125 (最終濃度 0.5~0.0015625) $\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB 8.0~0.25 (最終濃度 4.0~0.125) $\mu\text{g}/\text{m}$ をそれぞれ 100 μ ずつ分注し、12 列目と RFP、INH、EB の固着してあるウェルには、Mddbrook 7H9 broth を 0.1m ずつ分注し、各参照菌株の菌懸濁液 (O.D. 0.1) の 1/100 希釈液の 0.1m ずつを 1~12 列に分注した。5% 炭酸ガス中 37℃で 7 日、10 日目にプレート底部のコロニーの有無を肉眼的に判定した。

(4) ATP 法のマイクロ化への諸条件の検討

[測定器及び測定試薬]: 測定機器は、発光マイクロプレートリーダー「ルミプロット」バイオハザード型 (PSS 社) を、ATP 抽出試薬及び発光試薬はキッコーマン社製を用いた。

[薬剤プレート]: INH 0.1 $\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB 2.5 $\mu\text{g}/\text{m}$ 、RFP 2.0 $\mu\text{g}/\text{m}$ 、SM 2.0 $\mu\text{g}/\text{m}$ 、KM 5.0 $\mu\text{g}/\text{m}$ の濃度を、96 穴白色マイクロプレート (住友ベークライト社製) の所定位置に 100 μ ずつ分注後、18 時間常温乾燥させて薬剤固着プレートを作成した。

A. 発光量のバラツキ・クロストーク: プレートを使用し、ATP 標準試薬 ($2 \times 10^{-6}\text{M}$ キッコーマン社製) を 100 倍に希釈を行い、所定ウェルに 100 μ ずつ添加した。また、一部のウェルには Mddbrook 7H9 broth を 100 μ ずつ添加し、発光したウェルに隣接するウェルに影響を生じるか、また、発光量にバラツキを生じないかの測定を行った。

B. 測定時間の検討: 20 箇所のウェルに ATP 標準試薬の 100 倍希釈液を 100 μ ずつ添加し、発光測定時間の検討を行った。

C. 希釈直線性の検討: ATP 標準試薬を用いて滅菌精製水により 7 段階希釈系列を作製し測定した。

D. ATP 抽出時間の検討: ATP の抽出時間を設定するために、*M. tuberculosis* ATCC27294 株を使用して

測定を行った。McFar and No.0.5 濁度に調整した菌液をプレート 3 枚に 100μ ずつ接種し、通常大気 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて 5 日間培養後の各ウェルに、f amentous ce treatment (FCT) 試薬 50μ を添加、室温で 30 分間放置後、ATP 抽出試薬を 50μ 加え、プレート専用ドライブロックバス（日進理化）を用いて 65°C で（0 分、5 分、10 分間）ATP 抽出を行った。常温に戻した後、ルミプロットにて発光試薬を自動分注後、発光量を測定した。

E. 薬剤感受性試験の検討：ATCC 標準菌株及び臨床分離菌株を用いた。McFar and No.0.5 濁度に調整した菌液を薬剤プレートに 100μ ずつ接種し、通常大気 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて 5 日間培養プレートの各ウェルに FCT 試薬 50μ を添加し、室温で 30 分間放置後、ATP 抽出試薬を 50μ 加え、プレート専用ドライブロックバスで 65°C 、10 分間抽出を行った。常温に戻した後、ルミプロットにて発光試薬を 100μ 自動分注後、発光量を測定した。判定は RLU ratio （薬剤含有培養液の RLU 測定値÷含有培養液の RLU 測定値）で行い、 $\text{RLU ratio}\leq 0.5$ を感性（S）、 $\text{RLU ratio}>0.5$ を耐性（R）とした。

3. 研究成果

（1）結核菌参照菌株の主要 5 薬剤に対する MIC の測定

ブロスミック MTB-1 キット（極東製薬工業）を用いて結核菌参照菌株 ATCC27294、ATCC35820（SM 耐性）、ATCC35822（INH 耐性）、ATCC35827（KM 耐性）、ATCC35837（EB 耐性）、ATCC35838（RFP 耐性）の主要 5 薬剤に対する MIC の 8 回繰り返し測定した結果を Table 1 に示した。ATCC27294 株は、用いた抗結核剤全てに感性菌であるが、INH には $0.0625\sim 0.125\mu\text{g}/\text{m}$ 、RFP には $0.03125\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB には $1\mu\text{g}/\text{m}$ 、SM には $1\mu\text{g}/\text{m}$ 、KM には $1\sim 2\mu\text{g}/\text{m}$ の MIC を持っていた。INH 耐性の参照菌株である ATCC35822 株は、INH には $32\mu\text{g}/\text{m}$ 以上の MIC をもつと判定されたが、微量液体希釈法を用いて正確な MIC を測定したところ $512\mu\text{g}/\text{m}$ であった。そして、RFP には $0.03125\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB には $2\mu\text{g}/\text{m}$ 、SM には $1\sim 2\mu\text{g}/\text{m}$ 、KM には $1\sim 2\mu\text{g}/\text{m}$ の MIC を持っていた。RFP 耐性の参照菌株である ATCC35838 株は、INH には $0.125\sim 0.250\mu\text{g}/\text{m}$ 、RFP には $1\sim 4\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB には $1\sim 2\mu\text{g}/\text{m}$ 、SM には $1\sim 2\mu\text{g}/\text{m}$ 、KM には $2\mu\text{g}/\text{m}$ の MIC を持っていた。EB 耐性の参照菌株である ATCC35837 株は、INH には $0.0625\sim 0.250\mu\text{g}/\text{m}$ 、RFP には $0.03125\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB には $32\sim 128\mu\text{g}/\text{m}$ 、SM には $0.5\sim 1\mu\text{g}/\text{m}$ 、KM には $1\sim 4\mu\text{g}/\text{m}$ の MIC を持っていた。SM 耐性の参照菌株である ATCC35820 株は、INH には $0.125\sim 1\mu\text{g}/\text{m}$ 、RFP には $0.03125\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB には $2\mu\text{g}/\text{m}$ 、SM には $128\mu\text{g}/\text{m}$ 以上の MIC をもつと判定されたが、微量液体希釈法を用いて正確な MIC を測定したところ $2048\mu\text{g}/\text{m}$ であった。そして、KM には $0.5\sim 1\mu\text{g}/\text{m}$ の MIC を持っていた。KM 耐性の参照菌株である ATCC35838 株は、INH には $0.125\sim 1\mu\text{g}/\text{m}$ 、RFP には $0.03125\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB には $2\sim 4\mu\text{g}/\text{m}$ 、SM には $1\sim 2\mu\text{g}/\text{m}$ 、KM には $32\sim 128\mu\text{g}/\text{m}$ の MIC を持っていた。

（2）RFP と主要 4 薬剤の相乗効果

ブロスミック MTB-1 の各薬剤が固着してある 96 穴マイクロプレートの各 1～11 列のウェルに RFP $0.5\sim 0.002\mu\text{g}/\text{m}$ 、INH $0.5\sim 0.0015625\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB $4.0\sim 0.125\mu\text{g}/\text{m}$ の濃度にそれぞれ加えて、各参照菌株の発育が、どの程度抑制されるか調べた結果を Table 2 に示す。各薬剤に耐性を持つ参照株の発育は、RFP $0.008\mu\text{g}/\text{m}$ 、INH $0.125\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB $1.0\mu\text{g}/\text{m}$ の濃度以上では完全に抑制された。RFP $0.004\mu\text{g}/\text{m}$ の濃度では、ATCC35837、ATCC35822 では抑制傾向が見られ、INH $0.0625\mu\text{g}/\text{m}$ の濃度では、ATCC35837、ATCC35822、ATCC35838 では抑制傾向が見られた。しかし、RFP $0.002\mu\text{g}/\text{m}$ 、INH $0.03\mu\text{g}/\text{m}$ 、EB $0.5\mu\text{g}/\text{m}$ の濃度では全く抑制されなかった。

（3）ATP 法のマクロ化への検討

A. 発光量のバラツキ・クロストーク：Tab e 3 には、プレート外側部 38 ウェルを除く 58 ウェルの発光量を示した。プレートウェルの一部に ATP 標準試薬を添加、更に残りのウェルには M dd ebrook 7H9 broth を添加し、発光量のバラツキとクロストーク有無の検証を行った。プレート外側部 38 ウェルを除く 58 ウェル間では発光量のバラツキも低く安定した測定結果が得られた。Tab e 4 の ATP 標準試薬と M dd ebrook 7H9 broth を交互に分注したプレートにおいても、発光したウェル間でのバラツキもなく安定した測定結果であった。また、隣接するウェルに対するクロストークの影響性について、本測定結果より検証を行ったが、発光したウェルによる影響は全く認められなかった。

B. 測定時間の検討：Tab e 5 に示す 20 箇所のウェルに ATP 標準試薬を添加し、発光試薬添加後の測定時間について 0.1 秒間、1 秒間、1.5 秒間、2 秒間、2.5 秒間、3 秒間の条件にて検討を行った。。測定時間を長くするごとに発光量の増加が認められた。そのなかで、測定時間 1 秒間が発光量的にもウェル間でのバラツキにおいても良好な結果が得られた (Tab e 6) 。

C. 希釈直線性の検討：ATP 標準試薬を用いて滅菌精製水により 7 段階希釈系列 ($10^{-6}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$) を作製し測定した結果を、F g に示すごとく $10^{-7}\text{M} \sim 10^{-11}\text{M}$ まで直線性が認められた。実際、結核菌を用いての感受性試験では、 10^{-11}M までの感度が必要とされるが、本結果は十分使用可能な感度成績が得られた。

D. ATP 抽出時間の検討：*M. tuberculosis* ATCC27294 株を使用して ATP 抽出時間の検討を行った。Tab e 7 に示すとおり、抽出時間の延長とともに発光量の増加が認められた。そのなかで、5 分間の抽出時間がウェル間のバラツキも少なく安定した測定結果を示した。

E. 薬剤感受性試験の検討：Tab e 8 には、ATCC6 菌株を 3 回ずつ反復試験した時の再現性試験成績をまとめた。感性株及び単一薬剤耐性株ともに、培養 5 日間で感性・耐性を再現性を持って正確に判定できることを確認した。Tab e 9 には、*M. tuberculosis* 臨床分離株 10 株を使用し、先に開発した試験管法 (マクロ法) を比較参照法として、INH、RFP、EB、SM、KM の 5 薬剤について、比較検討した。その結果、マクロ法との比較成績は、INH、RFP、EB、SM、KM の 5 薬剤とも 100%一致した。測定期間については、ATCC 株と同様、全株培養 5 日間で判定可能であった。

4. 考 察

わが国の臨床で使われている結核菌薬剤感受性試験法は、1%小川卵培地を基礎培地とする一濃度による比率法を標準法とすることが、日本結核病学会より発刊された[新結核菌検査指針 2000]に記載されている。しかし、この方法は最終判定結果がでるまでに 3～4 週間を必要とする。また、操作法が煩雑で判定には、技術者の熟練を要し、判定時期を遅らせると耐性と判定されやすいなどの問題もある。米国疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention ; CDC) は、1994 年に臨床検査部門の結核菌検査への迅速な対応と報告の必要性を強調し、臨床材料から菌の分離、同定、薬剤感受性試験までの結核菌検査を、すべて 30 日以内に終了し医師に報告するようにという勧告を出した。この勧告を達成するために、われわれは、生きている微生物の細胞内に含まれる ATP 量を測定することによって、培養液中の生菌数を測定できることに着目し、ATP 測定法を結核菌の薬剤感受性試験に応用することで、試験期間を 5 日間に短縮し、さらに数値化による客観的な判定が可能な結核菌の薬剤感受性試験法 (ATP 法) を開発することができた。しかしながらこの方法は単剤による試験管法である。結核の治療は抗結核薬 2～3 剤での併用療法が標準的な治療法であることから、単剤での試験結果がそのまま臨床効果に反映しないことが知られている。そこで、多剤併用療法に則した迅速で正確な結核菌の薬剤感受性試験の開発を目標とし、今年度は、結核菌参照菌株の主要 5 薬剤に対する最低阻止濃度(MIC)を調べ、RFP と主要 4 薬剤の相乗効果を調べた。RFP 以外に単剤の耐性を獲得した耐性菌は、RFP と組み合わせることにより完全に発育を抑制することができ

ることがわかった。ATCC35822 株は INH に $512\mu\text{g}/\text{m}$ 、ATCC35820 は、SM に $2048\mu\text{g}/\text{m}$ もの高濃度の MIC をそれぞれ持っていた。しかし、RFP $0.008\mu\text{g}/\text{m}$ と組み合わせることによりそれぞれの MIC は、0.03 まで低下した。また、EB $1\mu\text{g}/\text{m}$ と組み合わせることにより、MIC は 0.03 まで低下した。このことは、単剤に対する感受性を検査している現行法で、その抗結核薬に耐性と判定された場合であっても、実際には抗結核薬 2～3 剤での併用療法により、排菌が止まり患者の治療が成功している現実と合っている。結核の治療は、薬による副作用の出現を見ながら行われている。さらに、患者の体格、栄養状態、肝機能や腎機能の能力などにより、服薬後の時間により各薬剤の血中濃度は一定ではない。そのため、臨床的な患者の治療成績を参考にしながら、本法を用いた薬剤感受性試験の薬剤濃度の決定を行う予定である。また、96 穴マイクロプレートを用いた 2 ないし 3 剤でのチェッカーボードパネルを考案するために、先に開発した ATP マクロ法をマイクロプレート法へと展開する必要があった。われわれは、市販品の発光マイクロプレートリーダーを入手し、本報告に示した基本測定条件の検討から着手し始めた。その結果、ATP 標準試薬を使用し①発光量のバラツキ・クロストーク②測定時間の検討③希釈直線性の検討④ATP 抽出時間の検討⑤薬剤感受性試験の検討を行い、マイクロプレート法への展開が可能となった。

薬剤感受性試験検査の培養に要する時間を極力短縮するために、Mddbrook 7H9 broth を基礎培地とする ATP 法を用いる予定であるが、液体培地のため雑菌汚染が生じやすい。また、ATP 測定作業時や容器破損時には、エアロゾルが発生しやすいので、作業は安全キャビネット内で行う必要がある。そのため、バイオハザード対策のとられた測定装置の開発も今後の課題として残っている。

5. まとめ

実際の治療に行われている多剤併用療法に則した新しい薬剤感受性試験法を開発するために、主要 5 薬剤にそれぞれ単剤耐性をもつ結核菌の参照菌株を用いて、各薬剤にたいする正確な最低発育阻止濃度（MIC）を測定した。RFP、INH、EB の 1/2 希釈系列と、主要 5 薬剤の組み合わせにより、単剤に高度耐性菌であっても相乗効果により MIC は劇的に低下した。このことは、より詳細な薬剤濃度検討により、新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の確立が可能であることを示唆している。また、結核菌の ATP 測定による迅速薬剤感受性試験法（マクロ法）をマイクロプレートへ展開するための検討として、市販品の発光マイクロプレートリーダーを用い、①発光量のバラツキ・クロストーク②測定時間の検討③希釈直線性の検討④ATP 抽出時間の検討⑤薬剤感受性試験の検討を行った。その結果、測定器については、安定した発光量及び精度を確認した。結核菌の ATCC 標準株ならびに臨床分離株を用いての薬剤感受性試験成績において、マクロ法とマイクロプレート法は、完全に一致する成績が得られた。以上の結果から、多剤併用療法感受性試験への展開は十分期待できると示唆された。

6. 研究発表

無し

7. 知的所有権の取得状況

該当なし

Table 1 Acceptable ranges of minimum inhibitory concentrations for six ATCC reference strains tested against five antimicrobial agents.

antimicrobial agent	Range of minimum inhibitory concentration (μ g/ml)					
	ATCC27294	ATCC35822 (INH-r)	ATCC35838 (RFP-r)	ATCC35837 (EB-r)	ATCC35820 (SM-r)	ATCC35827 (KM-r)
Isoniazid	0.0625~0.125	>32*	0.125~0.250	0.0625~0.250	0.125~1	0.125~1
Rifampin	0.03125	0.03125	1~4	0.03125	0.03125	0.03125
Ethambutol	1	2	1~2	32~128	2	2~4
Streptomycin	1	1~2	1~2	0.5~1	>128**	1~2
Kanamycin	1~2	1~2	2	1~4	0.5~1	32~128

*MIC of ATCC35822 was 512 μ g/ml against isoniazid.

**MIC of ATCC35820 was 2048 μ g/ml against streptomycin.

Table 2 MIC of reference strains to combination of antimicrobial agents.

Antimicrobial agent	Concentration (μ g/ml)	MIC measured value of reference strain (μ g/ml)				
		ATCC35820	ATCC35837	ATCC35827	ATCC35822	ATCC35838
		MIC=2048 SM	MIC=128 EB	MIC=128 KM	MIC=512 INH	MIC=4 RFP
RFP	0.5	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.25	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.125	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.06	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.03	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.016	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.008	0.125	0.125	0.125	0.03	4
	0.004	>128	16	2	0.03	4
	0.002	>128	128	128	>32	4
INH	0.5	0.125	0.125	0.125	>32	0.03
	0.25	0.125	0.125	0.125	>32	0.03
	0.125	0.125	0.125	0.125	>32	0.03
	0.06	>128	16	16	>32	0.5
	0.03	>128	128	>128	>32	4
	0.016	>128	128	>128	>32	4
EB	4	0.125	128	0.125	0.03	0.03
	2	0.125	128	0.125	0.03	0.03
	1	0.125	128	0.125	0.03	0.03
	0.5	>128	128	>128	>32	4
	0.25	>128	128	>128	>33	4
	0.125	>128	128	>128	>34	4

Table 3 Verification of the cross talk in the amount of ATP luminescence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	90	90	80	90	90	90	80	90	90	90	90	90
B	90	53330	54370	54480	51230	52060	53080	53220	49980	53980	54000	90
C	90	54430	53880	55570	53320	55110	52280	54200	50010	53330	53290	80
D	80	53290	54790	51200	52210	50000	53320	52340	52130	52110	54220	90
E	80	49980	52750	52870	53280	51280	52500	50000	52230	52900	49870	90
F	80	51230	52400	52590	53330	52200	53120	53210	54440	54300	50010	90
G	90	54480	55320	52880	52690	53360	53070	50010	52340	55240	52310	90
H	90	100	90	90	90	80	90	90	100	80	90	90

Table 4 Verification of the cross talk in the amount of ATP luminescence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	52230	53890	51380	52260	52670	54440	51640	55270	51170	54370	53390	54080
B	54540	100	53280	53990	50080	100	55500	55900	52800	90	53330	53190
C	56110	53780	54430	110	52200	54190	49960	90	54390	54400	54300	55200
D	53300	90	53280	54390	50000	90	49780	55370	51860	90	55170	53710
E	54900	54710	51780	80	51890	53700	50000	110	54400	50870	55380	53100
F	52200	90	53270	55510	52280	80	51270	55160	55550	90	55010	50000
G	53280	55270	55800	90	53370	54480	53810	100	49990	50370	49970	52000
H	54440	49980	51100	53190	53800	51750	52760	55370	52880	55370	50000	51090

Table 5 The examination plate about the difference in the amount of luminescence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1		5				11					18
B										15		
C						9						
D	2				8		12		14			19
E			6									
F		4				10					17	
G										16		
H	3		7				13					20

□ : Well which added the ATP standard reagent

Table 6 Relative between measuring time and RLU

Well*	Bioluminescence (RLU)					
	0.1 s	1 s	1.5 s	2 s	2.5 s	3 s
1	11900	55500	132570	218570	294090	373880
2	9560	55500	120240	190040	282030	308880
3	10590	54980	117020	197100	279210	361190
4	10280	54920	113740	199800	273230	307130
5	10540	55910	113460	176090	251390	327050
6	8040	53250	114980	167140	245700	339060
7	9990	53890	120600	177790	264880	375040
8	10270	55250	118080	188750	255700	333610
9	10430	54810	138460	219600	307760	410530
10	9310	55810	122650	194260	280930	345940
11	9600	54410	112910	177350	264950	312060
12	8780	55390	11220	180110	231750	307400
13	8690	55280	116880	200210	239810	333750
14	9150	55620	110310	187810	248050	313680
15	8990	54110	109080	175770	246550	341700
16	9090	55000	119000	193570	257070	415100
17	10110	53600	127800	198840	245520	328810
18	10630	54190	124190	193710	253120	317770
19	11000	54410	114800	199920	248190	324180
20	9970	54220	118000	191280	241580	333810
mean (RLU)	9846	54802.5	118799.5	191385.5	260575.5	340528.5
SE (RLU)	740.4	634	5511.4	10172.5	16247.6	23968.05
Max.	11900	55910	138460	219600	307760	415100
Min.	8040	53600	109080	167140	231750	307130

*Well added the ATP standard reagent at Table 5

Table 7 Relative between ATP extracriion time and RLU

Result	Extraction time		
	0 min	5 min	10 min
mean (RLU)	1635	41548	58435
SD (RLU)	326	1410	6580
CV (%)	19.9	3.40	0.18

SD : standard deviation

CV : coefficient of variation

Table 8 Precision of ATP method when the six reference strains of *Mycobacterium tuberculosis* were repeatedly tested

Antimycobacterial agent	Strain of <i>M. tuberculosis</i> tested					
	ATCC27294	ATCC35822	ATCC35838	ATCC35837	ATCC35820	ATCC35827
Isoniazid	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Rifampicin	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6
ethambutol	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6
Streptomycin	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6
Kanamycin	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6

Table 9 Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to five first-line drugs as determined by the micro and micro ATP method

Antimycobacterial agent	Total no.of isolated tested	Agreed with ATP macro method	
		(S) ※	(R) ※
Isoniazid	10	3	7
Rifampicin	10	4	6
ethambutol	10	4	6
Streptomycin	10	8	2
Kanamycin	10	8	2

※Abbreviations : S,susceptible; R, resistant

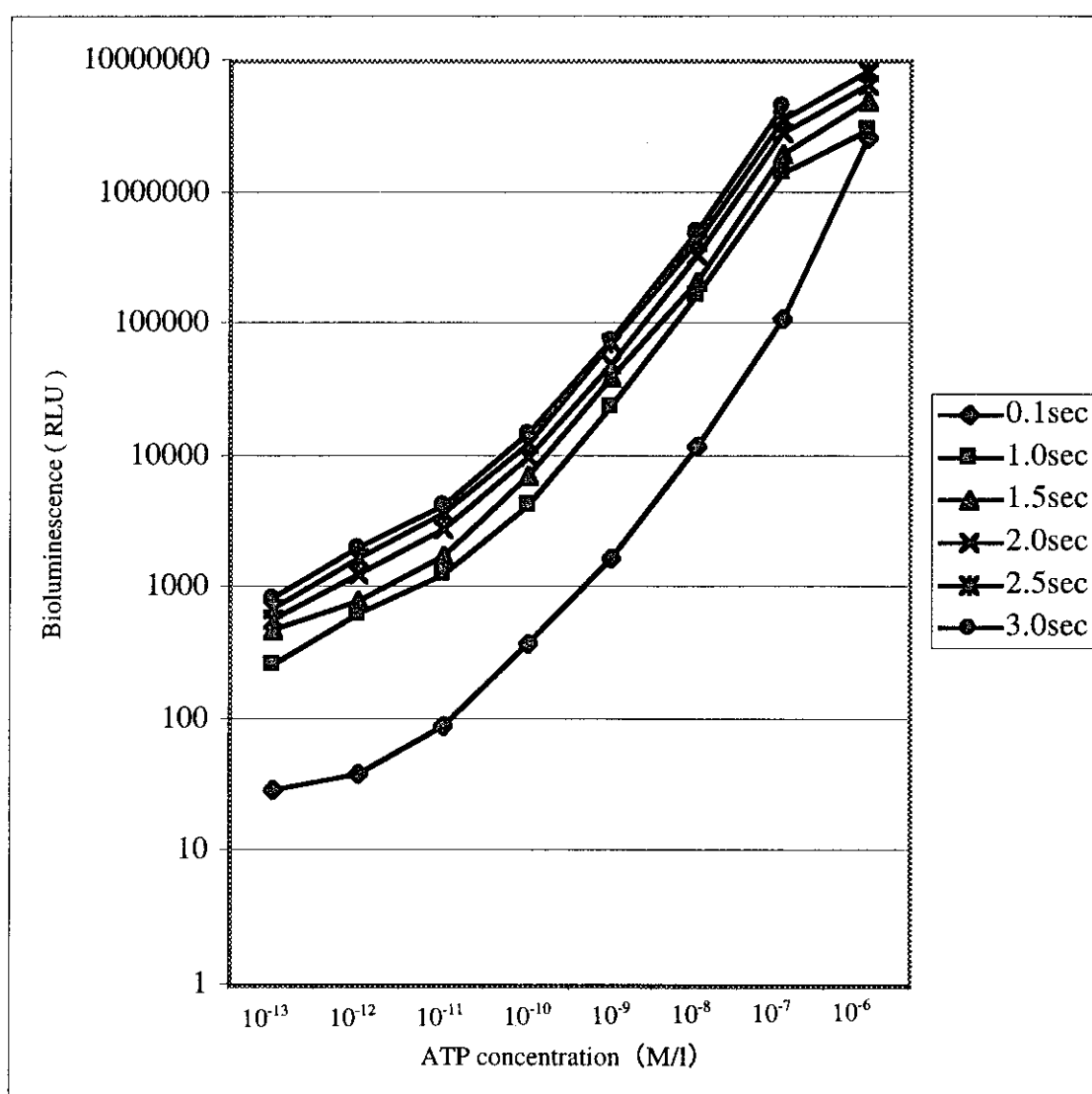


Fig Dilution linearity in a measurement opportunity

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社