

平成15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

目 次

第3分野

課題番号

20030917A KH31028	非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価	吉岡澄江 …… 1
918A KH31029	ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発	能美健彦 …… 10
919A KH31030	バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発	川崎ナナ …… 18
920A KH31031	医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究	棚元憲一 …… 27
921A KH31032	動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究	大野泰雄 …… 33
922A KH31033	医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発	藤本純一郎 …… 43
923A KH31034	創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立	井上 達 …… 48
924A KH31035	新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究	合田幸広 …… 58
925A KH31036	医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究	頭金正博 …… 67
926A KH31037	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	山崎利雄 …… 74
927A KH31038	食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立	山本茂貴 …… 83
928A KH32081	DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究	阿曾幸男 …… 90

第4分野

929A KH41039	ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立	小熊恵二 …… 97
930A KH41040	小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究	奥山虎之 …… 101
931A KH42074	熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究	名和行文 …… 105
932A KH42075	新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究	山崎俊夫 …… 115

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 細菌第一部
研究者 山崎 利雄

研究要旨 主要 5 薬剤単剤と RFP・INH・SM(または EB)の混合薬剤液を用いて、多剤併用療法に則した ATP 測定による迅速な結核菌薬剤感受性試験法の検討および、微量キット化のための試薬類を用いて、検査精度と検査結果の妥当性についての検討を行った。

分担研究者

極東製薬工業(株) 三輪 昭成

A. 研究目的

わが国の結核の治療は、抗結核薬を 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、最初の 2 か月間にピラジナミド (PZA) を加えて、6 ヶ月で治療する短期化学療法が標準的な治療法になっている。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、結核療法研究協議会が 5 年ごとに報告される「入院時薬剤耐性に関する 1997 研究報告」によると未治療例では SM、INH、RFP、EB のいずれかに耐性を示す頻度は 10.3%、多剤耐性菌の頻度は 0.8% と耐性頻度の高率化が認められている。一方、既治療例では SM、INH、RFP、EB のいずれかに耐性を示す頻度が 42.2%と未治療例の 4 倍に及んでおり、更に多剤耐性菌に関しては 19.7% と高率となっている。そのため、結核病学会等では、多剤耐性菌による結核感染症例が、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、有効な抗結核薬であるが、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、より適切な治療方針決定のために、実際の治療に則した薬剤感受性試験法の確立が望まれている。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易いなどの問題もある。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は重要であり、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。薬剤感受性試験の迅速化を図るために、ATP法を応用し、実際の結核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ことを最終目的としたが、昨年度までに、主要5抗結核薬剤にそれぞれ単剤耐性をもつ結核菌参照菌株を用いて、各薬剤にたいする正確な最低発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration; MIC)を測定した。RFP、INH、EB、SMの1/2希釈系列と、主要5抗結核薬剤の組み合わせにより、単剤に高度耐性菌であっても併用効果によりMICは劇的に低下することがわかったので、多剤併用した場合の薬剤感受性試験に適した濃度について検討した。今年度は、多剤併用した場合の薬剤濃度をATP法に適用し、薬剤感受性試験の迅速化と正確性について検討した。また、試験管法(マクロ法)から96穴マイクロプレート(ミクロ法)を用い、一度に複数検体の感受性試験を処理可能な方法への展開を図るとともに、測定器の開発を同時に行った。さらにATP法をキット化するための試薬類を用いて、検査精度と検査結果の妥当性についての検討を行った。

B. 研究方法

(1) 使用菌及び接種菌液の調製

保存の結核菌参照菌株 American Type Culture Collection(ATCC)27294、ATCC35820(SM耐性)、ATCC35822(INH耐性)、ATCC35827(KM耐性)、ATCC35837(EB耐性)、ATCC35838(RFP耐性)、ATCC35830(TH、INH耐性)、ATCC35821(PAS耐性)の8株と、臨床分離結核菌115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Middlebrook 7H9 broth 5mlに懸濁し、通常大気中、37℃で3から7日間培養し、McFarland No.0.5濁度以上の菌懸濁液を得た。この菌液を充分攪拌、10分間静置後、その上清を新しい

Middlebrook 7H9 brothにてMcFarland No.0.5濁度に調製した。

(2) 微量液体希釈法でのRFP・INHとEBあるいはSM存在下における結核菌のMICの測定

結核菌の薬剤感受性試験用ブロスミックMTB-1キット(極東製薬工業)の各1~11列のウェルにRFP0.02(最終濃度0.01)μg/ml・INH0.20(最終濃度0.10)μg/mlとEB2.0(最終濃度1.0)μg/mlあるいはSM2.0(最終濃度1.0)μg/mlを加えた薬剤混液を0.1mlずつ分注し、12列目には、Middlebrook 7H9 brothを0.1mlずつ分注し、各菌液(O.D. 0.1)の1/100希釈液の0.1mlずつを1~12列に分注した。5%炭酸ガスフランキ中37℃で7日、10日目に写真を撮りコロニーの有無を判定した。

(3) ATP法(マクロ法)による薬剤感受性試験

INH 0.1μg/ml、RFP 2.0μg/ml、EB 2.5μg/ml、SM 0.8μg/ml、KM 5.0μg/mlの単剤をそれぞれ含有するMiddlebrook 7H9 broth、RFP 0.01μg/ml・INH 0.10μg/ml・SM1.0μg/ml(またはEB 1.0μg/ml)の混合薬剤液を含有するMiddlebrook 7H9 broth、および薬剤不含のMiddlebrook 7H9 broth 5mlに、それぞれMcFarland No. 0.5濁度に調整済みの結核菌懸濁液0.1mlを接種し、37℃にて培養した。培養開始後5日目にそれぞれの培養液100μlを測定用チューブに採取し、filamentous cell treatment(FCT)試薬50μlを添加、室温30分間放置後、抽出試薬50μlを加え、チューブにキャップをした後、恒温水槽中にて60℃、5分間加熱してATPを抽出した。室温まで冷却後、ルシフェリン・ルシフェラーゼ100μlを加え、直ちにルミテスターK210(キッコーマン社)にて発光量(Relative light units; RLU)を測定した。判定は、RLU ratio(薬剤含有培養液のRLU測定値を薬剤不含培養液のRLU測定値で除した値)で行ない、RLU ratio≤0.5を感性、RLU ratio>0.5を耐性とした。

(4) ATP法(ミクロ法)による薬剤感受性試

験

McFarland No. 0.5 濁度に調整済みの結核菌懸濁液を Middlebrook 7H9 broth にて 40 倍に希釈し、その菌液を薬剤固着白色プレート（以下 W プレート）の所定ウエルに 100 μ l ずつ接種した。36 \pm 1 $^{\circ}$ C 通常大気で 5 日間培養後の各ウエルに FCT 試薬を 50 μ l ずつ添加を行い、室温にて 30 分間放置後、ATP 抽出試薬を 50 μ l 加え W プレート専用ホットプレートで 80 $^{\circ}$ C、15 分間 ATP 抽出を行った。常温まで冷却後、W プレートをマイクロミノリーダー LP-5000M（マイクロテックニチオン）にセット、発光試薬を 100 μ l ずつ自動分注後、発光量を実測した。判定はマクロ法と同様の判定基準により判定した。

（5）比較参照法による薬剤感受性試験

日本結核病学会より発刊された[新結核菌検査指針 2000]に記載された、1%小川卵培地を基礎培地とする一濃度による比率法と、NCCLS M24-A に記載された Middlebrook 7H10 寒天培地を用いる agar proportion 法を行った。操作判定は、それぞれに記載された方法を遵守して行った。

C. 研究成果

（1）RFP・INH 存在下における SM あるいは EB の薬剤濃度の検討

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 列のウエルに RFP 0.01 μ g/ml・INH 0.01 μ g/ml と SM 2.0~0.5 μ g/ml あるいは EB 1.0~0.25 μ g/ml の最終濃度になるようにそれぞれ加えて、各参照菌株の発育の抑制程度を調べた結果を Table 1 に示す。各薬剤に耐性を持つ参照株の発育は、培養 7 日目の判定では、すべて完全に抑制されたが、10 日目の判定では、SM、EB とも 0.5 μ g/ml 以下の濃度では、ATCC3538(RFP 耐性菌)の MIC の上昇がみられたので、混合薬剤系に用いる薬剤濃度は、SM、EB とも 1.0 μ g/ml の濃度に決定した。

（2）耐性を持つ臨床分離菌株についての混合薬剤液使用の効果の検討

臨床分離菌 50 株を用いて混合薬剤液の効果調べた。そのうちの多剤耐性菌 12 株について、RFP 0.01 μ g/ml、INH 0.10 μ g/ml、SM 1.0 μ g/ml の結果を Table 2 に、RFP 0.01 μ g/ml、INH 0.10 μ g/ml、EB 1.0 μ g/ml の結果を Table 3 に示した。単剤試験法で RFP、INH、SM、EB の全薬剤に耐性でなければ、全ての株で MIC 測定値の低下が見られた。また、高度耐性菌であっても、感性菌と判定される領域まで、MIC が低下した株も存在したことから、使用した混合薬剤液の濃度の妥当性を確認した。

（3）混合薬剤使用による ATP 法による薬剤感受性試験法の検討

主要 5 薬剤単剤に RFP・INH・SM と RFP・INH・EB の混合薬剤を追加し、ブロスミック MTB-1 を参照法として、ATP 法による薬剤感受性試験を行った。結核菌参照菌 6 株の薬剤感受性試験結果を Table 4 に示した。単剤にそれぞれ高度耐性を持つ参照菌株であっても、混合薬剤を用いたところでは全て、感性と判定された。臨床分離菌は、50 株試験したが、そのうちの 5 株の薬剤感受性試験結果を Table 5 に示した。E17 株は、単剤では INH と SM に耐性菌であるが、RFP・INH・SM と RFP・INH・EB では感性と判定された。INH、RFP、EB、KM に耐性菌である F11 株は、RFP・INH・EB では耐性と判定されたが、RFP・INH・SM では感性と判定された。H6 株と F4 株は、RFP、INH、SM、EB の全薬剤に耐性菌であるので、RFP・INH・SM と RFP・INH・EB では耐性と判定された。このように、単剤試験法で RFP、INH、SM、EB の全薬剤に耐性でなければ、混合薬剤を用いたところでは全て、感性と判定された。また、判定までに要した日数は 5 日間で、MIC 法の 7 日間より 2 日早く判定された。

（4）ATP 法（マイクロ法）による単剤感受性試験の標準菌株での再現性

ATP 法の測定精度を確認する目的に ATCC

標準菌株 8 株を用いて 5 回ずつ反復試験した時の再現性試験成績を Table 6 に示す。感性株及び単一耐性株ともに感性、耐性を再現性を持って正確に判定できることが確認できた。

(5) ATP 法 (マイクロ法) による単剤感受性試験の臨床分離株での検討

臨床分離菌 65 株について、小川法と ATP 法を比較解析した成績を Table 7 に示す。試験対象薬剤 7 薬剤において感性 (S) あるいは耐性 (R) で両試験法の判定が一致した頻度は 92%~100%であった。完全 (100%) 一致率が得られた薬剤は RFP のみであった。両試験法間で乖離が認められた頻度は 1.5% (INH)~6.2% (TH) の範囲にあった。3.1% (KM) を除くと全て小川法が耐性 (R)、ATP 法が感性 (S) に判定される傾向が認められた。試験期間は、ATP 法は 65 菌株全て 5 日間で判定できたのに対し、小川法は 3~4 週間の期間を要した。

Agar 法と ATP 法を比較解析した成績を Table 8 に示す。試験対象薬剤 7 薬剤において感性 (S)、あるいは耐性 (R) で両試験法の判定が一致した頻度は 96.9%~100%と極めて高い相関性が得られた。両試験法で唯一乖離が認められた EB は Agar 法が耐性 (R) に対し ATP 法は感性 (S) であった。試験期間は、Agar 法は記載マニュアルに遵守して判定したため、65 株すべて 3 週間を要した。

D. 考 察

わが国の結核菌薬剤感受性試験法は、日本結核病学会より発刊された[新結核菌検査指針 2000]により、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されている。しかし、この方法は、判定結果がでるまでに 3~4 週間を必要とするが、判定時期を遅らせると耐性と判定され易い。また、操作法が煩雑で判定には、技術者の熟練を要すなどの問題がある。そのため、基礎培地に酸化還元色素を添加し、コロニーを観察し易い培地が市販されている。欧米では、液体培地や寒天培地を基礎培地とす

る薬剤感受性試験法が開発され実用化されている。1994 年に、米国疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention ; CDC) は、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、全て 30 日以内に終了し、医師に報告するよう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数は、細胞内に含まれる ATP 量を測定することによって、知ることが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、昨年度までに検討した多剤併用した場合の薬剤感受性試験に適した濃度を ATP 法に適用し、薬剤感受性試験の迅速化と正確性について検討した。主要 5 薬剤単剤に RFP・INH・SM と RFP・INH・EB の混合薬剤を追加し、ATP 法による薬剤感受性試験法を行った。単剤では、RFP、INH、SM、EB の全薬剤に耐性菌である場合には、混合薬剤を用いた場合でも耐性と判定された。単剤では、それぞれ高度耐性をもつ菌株であっても、混合薬剤を用いたところでは全て、感性と判定された。また、単剤試験法で RFP、INH、SM、EB の全薬剤に耐性でなければ、混合薬剤を用いたところでは全て、感性と判定された。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。また、判

定までに要した日数は 5 日間で、MIC 法の 7 日間より 2 日早く判定され、より迅速な薬剤感受性試験法であった。

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。また、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、検査例数を増やし、本法を用いた薬剤感受性試験の正確性を検討する必要がある。さらに、本法は、試験管を用いる方法なので、測定専用試験管に培養液を採取する作業があるため、煩雑でありこの際、危険を伴うため、マイクロプレートを用いて微量化を行う必要がある。そのために、われわれは、96 穴のマイクロプレートに試験薬剤を乾燥固着する方法を用いて 1 プレートで複数検体を同時に測定できるマイクロ法を考案するとともに、ATP 量を正確に測定すべくマイクロルミノメーターの設計開発を行った。その基礎的な検討結果については昨年度報告したが、従来のマクロ法と同等の成績が得られることを確認した。そこで本研究のテーマであるキット化のための最終的評価検討とし結核菌の臨床分離菌 65 株を用い、国内外で採用されている標準法との比較検討を実施した。小川法と ATP 法を比較解析した結果は、試験対象 7 薬剤において感性 (S) あるいは耐性 (R) で両試験法の判定が一致した頻度は、92%~100%であった。また、Agar 法と ATP 法を比較解析した結果。試験対象薬剤 7 薬剤において感性 (S)、あるいは耐性 (R) で両試験法の判定が一致した頻度は、96.9%~100%と極めて高い相関性を得ることができた。判定に要する期間について、小川法及び Agar 法は 3~4 週間の期間を要したのに対し、ATP 法は、全 65 株ともに培養 5 日間と迅速性について大幅な短縮化が認められた。以上の結果から、生物発光法を用いた薬剤感受性試験法は、迅速かつ高い測定精度もつ試験法であることから今後、臨床検査現場への応用が期待できる方法と考える。し

かし、ATP 法は、Middlebrook 7H9 broth を基礎培地とするため雑菌汚染が生じ易い。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易いので、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。

E. 結論

主要 5 薬剤単剤に RFP・INH・SM と RFP・INH・EB の混合薬剤を追加し、ATP 法による薬剤感受性試験法を行った。単剤試験法で高度耐性をもつ菌株であっても、RFP、INH、SM、EB の全薬剤に耐性でなければ、混合薬剤を用いたところでは全て、感性と判定された。また、判定までに要した日数は 5 日間で、MIC 法の 7 日間より 2 日早く判定された。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を確立した。さらに、薬剤感受性試験のキット化と微量化を目指し、96 穴マイクロプレートとマイクロルミノメーターを用いることで、同時に多検体の測定を可能とすることができた。ATCC 標準菌株を用いた反復測定では耐性・感性を正確に判定することができ、極めて高い再現性を確保した。結核菌臨床分離株を用い、小川法と Agar 法と比較評価を行い高い互換性を得た。本測定法は簡便かつ大量の検体を処理することができ、しかも 5 日間判定と迅速性が高いことから有用な試験法であると考え

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 山崎利雄、芳賀伸治、佐藤直樹、山下研也、岡沢 豊、三輪昭成、田村俊秀、生物発光を用いた結核菌の多剤併用薬剤感受性試験法の検討、第 78 回日本結核病学会総会、2003、4 月、倉敷

(2) 山崎利雄、芳賀伸治、佐藤直樹、山下

研也、岡沢 豊、三輪昭成、田村俊秀、結核菌
 の多剤併用薬剤感受性試験法の検討、第 73 回
 実験結核研究会、2003、4 月、倉敷

G. 知的財産権の出願・登録状況
 該当なし

Table 1 MIC of reference strains to combination of RFP 0.010 μ g/ml, INH 0.10 μ g/ml and SM or EB

Drug	Concentration (μ g/ml)	MIC measured value of reference strain (μ g/ml)				
		ATCC35820 (MIC=2048)	ATCC35837 (MIC=128)	ATCC35827 (MIC=128)	ATCC35822 (MIC=512)	ATCC35838 (MIC=4)
		SM	EB	KM	INH	RFP
SM	2.0	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
	1.0	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
	0.5	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03*
EB	1.0	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03
	0.5	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03*
	0.25	0.125	0.125	0.125	0.03	0.03*

*Increase of MIC was observed on the tenth day.

Table 2 The decrease effect of MIC of clinical isolates to combination of RFP, INH and SM

Strain	MIC measured value of clinical isolates to combination of RFP, INH and SM (μ g/ml)				
	SM	EB	KM	INH	RFP
H30	16→8	64→2	128→128	1→1	32→32
F11	0.5→0.125	4→0.125	128→0.125	32→0.03	32→0.03
H9	0.5→1	8→8	128→128	4→2	16→4
E10	128→0.125	2→0.125	128→0.125	1→0.03	0.03→0.03
M37	4→2	4→4	>128→128	>32→32	2→1
H6	32→16	8→8	2→2	16→16	32→16
M36	64→32	4→4	2→2	2→1	32→32
E17	128→0.125	2→0.125	2→0.125	32→0.03	0.03→0.03
M33	128→0.125	2→0.125	1→0.125	16→0.03	0.03→0.03
F4	128→128	8→8	128→128	2→2	32→32
K620	8→4	4→4	1→2	32→16	16→16
H55	32→64	16→32	128→128	8→8	4→4

Composition of mixed drug solution is RFP 0.010 μ g/ml, INH 0.10 μ g/ml and SM1.0 μ g/ml.

Table3 The decrease effect of MIC of clinical isolates to combination of RFP, INH and EB

Strain	MIC measured value of clinical isolates to combination of RFP, INH and EB (μ g/ml)				
	SM	EB	KM	INH	RFP
H30	16→8	64→2	128→128	1→1	32→32
F11	0.5→0.5	4→2	128→128	32→32	32→32
H9	0.5→2	8→8	128→128	4→2	16→16
E10	128→0.125	2→0.125	128→0.125	1→0.03	0.03→0.03
M37	4→4	4→2	>128→128	32→32	2→1
H6	32→32	8→4	2→2	16→16	32→32
M36	64→16	4→4	2→2	2→1	32→32
E17	128→0.125	2→0.125	2→0.125	32→0.03	0.03→0.03
M33	128→0.125	2→0.125	1→0.125	16→0.03	0.03→0.03
F4	128→128	8→4	128→128	2→2	32→32
K620	8→8	4→4	1→1	32→16	16→16
H55	32→32	16→16	128→12	8→8	4→4

Composition of mixed drug solution is RFP 0.010 μ g/ml, INH 0.10 μ g/ml and EB 1.0 μ g/ml.

Table 4 Results of antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* ATCC reference strains using ATP and Broth MIC MTB-1 methods

Method	Drug	ATCC27294	ATCC35822	ATCC35838	ATCC35837	ATCC35820	ATCC35827
		(INH-R)	(RFP-R)	(EB-R)	(SM-R)	(KM-R)	
ATP*	INH	S	R	S	S	S	S
	RFP	S	S	R	S	S	S
	EB	S	S	S	R	S	S
	SM	S	S	S	S	R	S
	KM	S	S	S	S	S	R
	RFP·INH·SM**	S	S	S	S	S	S
	RFP·INH·EB***	S	S	S	S	S	S
Broth MIC MTB-1	INH	0.0625	>32	0.125	0.125	0.5	0.5
	RFP	0.03125	0.03125	4	0.03125	0.03125	0.03125
	EB	1	2	2	128	2	2
	SM	1	1	1	0.5	>128	1
	KM	1	1	2	2	1	128

ATP* : Drug resistance indicated INH 0.1, RFP 2.0, EB 2.5, SM 2.0 and KM 5.0 (μ g/mL).

RFP·INH·SM** : The composition concentration is RFP 0.010, INH 0.10 and SM 1.0 (μ g/ml).

RFP·INH·EB*** : The composition concentration is RFP 0.010, INH 0.10 and EB 1.0 (μ g/ml).

S : susceptible

R : resistant

Table 5 Results of antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* of clinical isolates using ATP and Broth MIC MTB-1 methods

Method	Drug	F11	H6	E17	F4	H57
ATP*	INH	R	R	R	R	S
	RFP	R	R	S	R	S
	EB	R	R	S	R	S
	SM	S	R	R	R	S
	KM	R	S	S	R	S
	RFP·INH·SM**	S	R	S	R	S
	RFP·INH·EB***	R	R	S	R	S
Broth MIC MTB-1	INH	32	16	32	2	0.125
	RFP	32	32	0.03	32	0.03
	EB	4	4	2	8	0.5
	SM	0.5	16	128	128	0.5
	KM	128	4	2	128	2

ATP* : Drug resistance indicated INH 0.1, RFP 2.0, EB 2.5, SM 2.0 and KM 5.0 (μ g/mL).

RFP·INH·SM** : The composition concentration is RFP **RFP 0.010·INH 0.10·EB 1.0 (μ g/ml)

RFP·INH·EB*** : The composition concentration is RFP 0.010, INH 0.10 and EB 1.0 (μ g/ml).

S : susceptible

R : resistant

Table 6 Precision of ATP micro method when the eight reference strain of *Mycobacterium tuberculosis* were repeatedly tested

Antimycobacteria agent	strain of <i>M.tuberculosis</i> tested							
	ATCC27294	ATCC35822	ATCC35838	ATCC35837	ATCC35820	ATCC35827	ATCC35830	ATCC35821
Isoniazid	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Rifampicin	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Ethambutol	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Streptomycin	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
Kanamycin	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
Ethionamide	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5
p-aminosalicylic acid	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5

Each value represents no. of susceptible interpretation/no.of testing.

Table 7 Comparison of antimycobacterial susceptibility test results with the egg-base Ogawa proportion method

Antimycobacterial Agent/ATP micro method	comparison with the interpretation by egg-base Ogawa proportion method				
	No. of isolates		Agreement with	Very major	Major
	Susceptible	Resistant	Total(%)	discrepancy(%)	discrepancy(%)
Isoniazid	41	23	98.50%	0(0%)	1(1.5%)
Rifampicin	41	24	100%	0(0%)	0(0%)
Ethambutol	43	21	95.40%	0(0%)	3(4.6%)
Streptomycin	43	19	95.40%	0(0%)	3(4.6%)
Kanamycin	44	19	96.90%	2(3.1%)	0(0%)
Ethionamide	49	12	93.80%	0(0%)	4(6.2%)
p-aminosalicylic acid	48	12	92.30%	0(0%)	5(7.7%)

A total of 65 isolates were tested.

Table 8 Comparison of antimycobacterial susceptibility test results with the Agar proportion method

Antimycobacterial Agent/ATP micro method	comparison with the interpretation by Agar proportion method				
	No. of isolates		Agreement(%) with	Very major	Major
	Susceptible	Resistant	Total(%)	discrepancy(%)	discrepancy(%)
Isoniazid	42	23	100	0	0
Rifampicin	41	24	100	0	0
Ethambutol	43	20	96.9	1.5	1.5
Streptomycin	46	19	100	0	0
Knamycin	46	19	100	0	0
Ethionamide	53	12	100	0	0
p-aminosalicylic acid	53	12	100	0	0

A total of 65 isolates were tested.

平成15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16年9月30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