

速 報

嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法

嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会

委員長	小 酒 井	望 (順天大・医・臨床病理)
委員	上 野 一	恵 (岐阜大・嫌気性菌研究施設)
	五 島 瑳	智 子 (東邦大・医・微生物)
	三 橋	進 (群大・医・微生物)
	中 山 一	誠 (日大・医・第三外科)
	島 田	馨 (都養育院)
	玉 井 健	三 (金大・医・微生物)
	小 栗 豊	子 (順天大・病院中検)

ま え が き

嫌気性菌の MIC 測定法作成に当って、下記の点を考慮した。

(1) 最近耐性化が著しい *Bacteroides* 属を中心に検討し、測定法を立案、作成した。

(2) 好気性菌を主たる対象とした、日本化学療法学会標準法 (1968 年制定, 1974 年改訂) は、再検討の余地はあるが、現在広く普及しているので、本法に準じ、本法との喰い違いを出来るだけ少くするように努力した。とくに濃度段階、接種菌量は現在の標準法をそのまま採用した。

(3) 感受性測定用培地、増菌用培地は、現在広く使用されている入手し易い国産品、輸入品を主とした。

(4) 対照菌株としては、標準法に使用されているブドウ球菌 209P 株、大腸菌 NIHJ 株も使用できるようにし、ほかに *Bacteroides fragilis* ss *fragilis* GM 7000 を加えた。

なお、本法は発育の良好な *Bacteroides* 属を主たる対象として作成したので、発育の遅い菌属については、培地、培養時間などを考慮する必要がある。

方 法

被検菌株の抗生物質感受性測定には、次の寒天平板希釈法を用いる。

1. 感受性測定用培地

下記のいずれかを使用する。

(1) GAM 寒天培地

(2) Brucella agar

(3) Brain heart infusion agar

(2), (3)の培地は5%血液(ヒツジまたはウマ)を加えて用いる。いずれの培地でもよいが、培地名と製造会社名を明記すること。

2. 抗生物質の濃度段階

下記の 100 $\mu\text{g/ml}$ よりの2倍希釈を使用する。

100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05, 0.025 $\mu\text{g/ml}$.

なお、100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度を使用する場合は200, 400, 800, 1,600 $\mu\text{g/ml}$ とする。

ただし、力価として unit を用いる抗生物質もすべて $\mu\text{g/ml}$ を使用すること。

3. 接種用菌液

増菌用培地に約 $10^8/\text{ml}$ に増殖したものを接種菌液とする。

注 1) 増菌用培地には、GAM プイオンを用いる。

2) GAM プイオンではガスバック法 (CO_2 は5%), スチールウール法 (CO_2 は5%), 37°C 20 時間の嫌気培養で *B. fragilis* は約 $10^8/\text{ml}$ となる。

接種用菌液を $10^8/\text{ml}$ に調製するには、使用直前に増菌培地または0.05% 酵母エキス水溶液で希釈する。

3) $10^8/\text{ml}$ の菌液についても MIC を測定することが望ましい。通常 $10^8/\text{ml}$ 菌液およびその100倍希釈液 (約 $10^6/\text{ml}$) の2段階の菌液を用いて測定する。(いわゆる2点法)。この場合両方の MIC を併記すること。

4. 菌の接種法

白金耳 (なるべく内径1mm前後のもの) で2cm前後画線塗抹する。なお、測定培地へ接種される菌密度がこれと同程度に調整されれば、白金耳以外の接種装置を用いてもよい。

注) 菌に対する空気の影響をできるだけ少くするためには、各種菌接種装置を用いて、迅速に接種することが望ましい。

5. 嫌気性培養法

菌を接種した培地はできるだけ迅速に次のいずれかの方法によって嫌氣的に培養する。

- (1) ガスパック法 (CO₂ 5%)
- (2) スチールウール法 (CO₂ 5%)

いずれの方法を用いてもよいが、方法を明記すること。

注) CO₂ 濃度はガスパック法では約 5%, スチールウール法で飽和重炭酸ナトリウム液を同封したときは約 5% となる。

6. 培養時間・温度

24 時間, 37°C

7. 判定

肉眼で明らかに発育が阻止された最低濃度をもって MIC をあらわす。

注) 耐性変異率の高い薬剤では、対照 (薬剤を含まない培地) の発育と比べて明らかに発育が抑制された濃度以上の高濃度において、2, 3 の集落が認められることがあるが、これは除外する。

〔附〕

1. 抗生物質標準液の作製, 希釈法

各抗生物質の力価の明らかな粉末を化学天秤で 0.1 mg の単位まで正確に秤量し、滅菌精製水を適量加えて、力価 1,000 μg/ml の溶液を作る。

1,000 μg/ml の溶液が出来たならば、滅菌メスピペッ

トを用いて、滅菌精製水で 2 倍希釈を行ない、500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 2.0……μg/ml の溶液を作る。この際希釈に用いるメスピペットは、必ず希釈のたびごとにとりかえなければならない。

1,000 μg/ml の標準液は原則として測定の度ごとに調製する。

2. 感受性測定用平板の作り方

培地を溶解し、その温度が 60~50°C になったところで、上記の抗生物質溶液を培地の 1/9 量加え、よくまぜあわせ、シャーレに分注して平板とする。作製した平板培地は室温で 3~4 時間乾燥させ、作製した当日中に必ず使用すること。

3. 被検菌株と対照菌株

被検菌株はなるべく分離後継代 2, 3 代以内のものを使用する。測定に際しては常に対照菌株を使用すること。なお、対照菌株としては日本化学療法学会の指定する *Bacteroides fragilis* ss, *fragilis* GM 7000, またはブドウ球菌 209P 株, 大腸菌 NIHJ 株を用いる。

(附記)

昭和 54 年 3 月 9 日理事会に於て本答申を承認、当分試行することとなった。なお、標準菌株 *Bacteroides fragilis* ss, *fragilis* GM 7000 については岐大嫌気性菌研究施設 (岐阜市司町 40, 干 55) に問い合わせられたい。