

抗菌薬感受性測定法検討委員会報告(1992年) (委員長: 斎藤 厚)

日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会(前委員長: 五島瑛智子)は、好気性の一般細菌を対象とした微量液体希釈法について検討を加え、その成績を第37回日本化学療法学会総会(1989年, 東京)において報告し、それを学会標準法として制定した(Chemotherapy 38: 102~105, 1990)。委員会ではこれに引続き、①測定用培地に添加するCa⁺⁺, Mg⁺⁺量, ②栄養要求性の厳しい菌種を対象とした培地成分, ③嫌気性菌を対象とした微量液体希釈法, などについても検討を加え、その成績については第39回日本化学療法学会総会(1991年, 東京)において報告した。その後、上記検討項目について幾つかの修正を加え、これを標準法(案)として第40回日本化学療法学会総会(1992年, 名古屋)において提案し、学会員から意見を広く求めた。

今回、原案に若干の修正を加えた以下の方法を日本化学療法学会標準法として追加する(平成5年2月)。

現委員長	斎藤 厚	琉球大学医学部第1内科学教室
委員	稲松 孝思	東京都老人医療センター感染症科
	岡田 淳*	関東通信病院検査科
	小栗 豊子*	順天堂大学医学部付属病院中央臨床検査室
	菅野 治重*	千葉大学医学部付属病院検査部
	公文 裕巳	岡山大学医学部泌尿器科教室
	山口 惠三*	東邦大学医学部微生物学教室
	渡辺 邦友*	岐阜大学医学部付属嫌気性菌実験施設
	渡辺 彰	東北大学抗酸菌病研究所内科

前委員長 五島 瑛智子 東邦大学医学部微生物学教室
(*; 継続委員)

* 今回の標準法公示に関してご意見がおりの方は、日本化学療法学会事務局・抗菌薬感受性測定法検討委員会までご連絡下さい。

[宛て先] 〒141
東京都品川区上大崎 2-20-8
日本化学療法学会事務局
抗菌薬感受性測定法検討委員会
TEL; 03-3493-7129

I. 微量液体希釈法による MIC 測定法（日本化学療法学会標準法）の一部修正

日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告として、[微量液体希釈による MIC 測定法（微量液体希釈法）—日本化学療法学会標準法—] を、Chemotherapy 38: 102~105, 1990 年に掲載したが、その後、同委員会において測定法の検討を重ねた結果、今回、以下の項目について測定法の修正を行うこととなった。_____は修正箇所を示す。

[修正 1] (P 103)

2. 感受性測定用培地

感受性測定用培地は、Mueller-Hinton broth（組成：肉抽出液 300 g，カザミノ酸 17.5 g，デンプン 1.5 g，精製水 1,000 ml）を用い、滅菌後の培地 pH を 7.2~7.4 (25°C) に調整し、更に Ca^{++} 25~50 mg/L, Mg^{++} 12.5~25 mg/L となるよう、適量を添加して使用する。

(Cation-adjusted Mueller-Hinton broth: CAMHB)

以下同文。

[修正 2] (P 103)

4. 接種用菌液の調製および菌の接種

一夜培養した寒天平板上の被検菌体を滅菌生理食塩液で 0.5 McFarland (約 10^8 CFU/ml) 相当に懸濁し、これを滅菌生理食塩液で 10 倍に希釈 (約 10^7 CFU/ml) して接種用菌液とする。

各ウエルへこの菌液を、1~5 μ l 接種し、最終接種菌量を約 5×10^4 CFU/ウエルとする。菌液調整後 15 分以内に接種する。

以下同文。

[修正 3] (P 104)

1. 2 価イオンの調製法と感受性測定用培地への添加法

1) 培地中の 2 価イオンの定量が可能な場合

Mueller-Hinton broth 中の 2 価イオンの濃度を測定し、最終濃度が Ca^{++} 25~50 mg/L, Mg^{++} 12.5~25 mg/L の範囲に入るよう、必要な量を添加する。

Ca^{++} 調製液は、塩化カルシウム ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 3.68 g を精製水 100 ml に溶解 (10 mg \cdot Ca^{++} /ml) 後、ろ過滅菌し、必要量を、滅菌した Mueller-Hinton broth 1,000 ml に添加する。また Mg^{++} 調製液は、塩化マグネシウム ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) の 8.36 g を精製水 100 ml に溶解 (10 mg \cdot Mg^{++} /ml) 後、ろ過滅菌し、必要量を、滅菌した Mueller-Hinton broth 1,000 ml に添加する。

2) 培地中の 2 価イオンの定量が不可能な場合

Mueller-Hinton broth 中に含まれる 2 価イオンの量が表示されている場合は、表示されている量を基準として、補正に必要な量だけ 2 価イオンを添加する。

Mueller-Hinton broth 中に含まれる 2 価イオンの量が記載されていない場合は、滅菌した Mueller-Hinton broth 1,000 ml に、前記の、 Ca^{++} 調製液 (10 mg \cdot Ca^{++} /ml) 2.5 ml と、 Mg^{++} 調製液 (10 mg \cdot Mg^{++} /ml) 1.25 ml に添加する。

培地中の 2 価イオン濃度は、特に *Pseudomonas aeruginosa* のアミノ配糖体系抗菌薬およびテトラサイクリン系抗菌薬に対する MIC に大きな影響を与えるため、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 の MIC を参考にし、精度管理を行う必要がある。

P. aeruginosa ATCC 27863の MIC 値の許容範囲 (参考値)

Gentamicin	1-4	Tetracycline	8-32
Tobramycin	0.5-2	Doxycycline	4-16
Amikacin	2-8	Minocycline	4-16
Ofloxacin	1-4	Cefotaxime	8-32

(単位は $\mu\text{g/ml}$)

[修正4] (P 105)

5. いわゆる MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) の検出法

2価イオン調製 Mueller-Hinton broth (CAMHB) 1,000 ml に塩化ナトリウム (NaCl) 20 g を添加した培地を使用し、オキサシリン (MIPIC) に対する MIC を測定する。MIC が $4 \mu\text{g/ml}$ 以上を示した黄色ブドウ球菌は耐性株とし、いわゆる MRSA と判定する (メチシリンで MIC を測定するよりもオキサシリンを用いた方が MRSA を検出しやすいため)。

II. (追補1) 栄養要求性の厳しい菌種を対象とした培地の調整および感受性測定法

はじめに

一般細菌に対する微量液体希釈法による薬剤感受性測定標準法が 1990 年に制定された (Chemotherapy 38: 102~105, 1990)。しかし、本法に指定されている培地では発育の見られないものや、発育性が極めて悪い菌種が存在することから、これらの栄養要求性が厳しい菌種の中で、とくに臨床で起炎病原体として重要で且つ分離頻度の高い菌種を対象に検討を加え、以下の方法を標準法として採用することにした。

1. 対象菌種

Haemophilus spp. (*H. ducreyi* を除く),
Listeria spp.
Streptococcus spp., *Enterococcus* spp.
M. (B.) catarrhalis

2. 接種法

- (1) 寒天平板上で一晚純培養した検菌の集落を無菌的にかき取り、これを Mueller-Hinton broth (MHB) に懸濁し、0.5 McFarland に調製し被検菌液とする。
- (2) 上記被検菌液をさらに 10 倍に希釈し、この菌液を適当な接種器 (接種量; $1\sim 5 \mu\text{l}$) を用いて、約 5×10^4 CFU/ウエルの菌量となるように感受性試験用マイクロプレートに接種する。

3. 測定用培地;

基礎培地: CAMHB (Ca^{++} , Mg^{++} 調製 Mueller-Hinton broth)添加物: ① NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide); $15 \mu\text{g/ml}$

② 馬溶血液; 2~5%

③ 酵母エキス; 5 mg/ml

(注1) 培地 pH が 7.2~7.4 の範囲にあることを確認すること。

(注2) ヘモフィルス属以外は [CAMHB+馬溶血液] のみの培地を用いてもよい。

4. 培養法; 35°C , 通常環境下で培養する。

5. 判定; MIC の判定は 18~24 時間培養後に行う。肉眼的に菌の発育が認められなくなる最も低い薬剤濃度を以て MIC とする。

判定は、本学会標準法の微量液体希釈による MIC 測定法 (Chemotherapy 38: 102~105, 1990) に準じて行う。

(注 3) 用いる馬溶血液の溶血ろ過が充分でない場合には、培地中に沈殿物が生じ菌塊と誤って判定されることがあるので、被検菌非接種ウエルの陰性対照と比較し、沈殿物か菌塊かの鑑別を正しく行う必要がある。

6. 精度管理用菌株と MIC の許容範囲 (参考値)

精度管理用菌株		ABPC	MINO	EM	CZX
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49247	2-8			0.06-0.5
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	0.25-1	0.12-0.5	0.12-0.5	2-8
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	0.5-2	2-8	1-4	>32

(単位は $\mu\text{g/ml}$)

III. 微量液体希釈法による嫌気性菌の MIC 測定法

日本化学療法学会標準法

1. 抗菌薬の保存法

抗菌薬は吸湿防止のためデシケーターに入れ、冷暗所に保存する。使用に際しては室温に戻してから秤量する。

2. 薬剤感受性測定用培地

薬剤感受性測定用には、検査対象となる嫌気性菌が良好に発育する液体培地を用いる (付則-1)。

U字型ウエルのマイクロプレートを使用し、薬剤を含有する感受性測定用培地を 1 ウエルあたり 0.1 ± 0.02 ml 分注したものを、薬剤感受性測定用マイクロプレートとする。このとき対照として薬剤を含有しない培地を分注したウエルを設けなければならない。作製したプレートの専用のシールで密閉した後、 -60°C 以下に保存し、3 ヶ月以内に使用する。なお安定性の悪い薬剤 (β -ラクタム剤など) を使用する場合、この期間中においても薬剤力価の低下が認められる場合があるので十分な精度管理が必要である。 -60°C で凍結保存した薬剤感受性測定用マイクロプレートは、使用に先立ち孵卵器内で速やかに解凍し、予備還元操作を行う。すなわちマイクロプレートに貼られたシールをはがして、滅菌プレートで蓋をした後、薬剤感受性測定用マイクロプレートを嫌気環境下に 4 時間以上静置し、培地を還元する (付則-2)。

3. 抗菌薬の溶解および希釈法

水溶性の薬剤は原則として滅菌精製水で溶解する。水に不溶性ないし難溶性の薬剤は必要に応じてできるだけ少量のエチルアルコール、緩衝液、NaOH 溶液、DMSO などで溶解した後、精製水や緩衝液を用いて所定の濃度まで希釈して薬剤原液とする。薬剤原液をさらに希釈する際には滅菌した感受性測定用培地を用いて行う。

抗菌薬の希釈濃度は $1 \mu\text{g/ml}$ を中心とした下記に示す 2 倍希釈系列とする。力価として unit で表示されている薬剤も、可能な限り $\mu\text{g/ml}$ に換算する。

薬剤の希釈例 (参考文献 1)。

128, 64, 32, ……………2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06 $\mu\text{g/ml}$

4. 接種用菌液の調製および菌の接種

通常2日間培養した嫌気性菌用寒天培地上の被検菌を菌液調製用培地に1 McFarland となるように懸濁することにより最初の菌液調製を行う。これをさらに菌液調製用培地で5倍に希釈(約 1×10^8 CFU/ml)して最終的な接種菌液とする。菌液調整用培地としては、原則として感受性測定用培地を用いる。この菌液を適当な接種装置を用いて、最終接種菌量が好気性菌の場合の10倍に相当する約 10^8 CFU/ウエルとなるように各ウエルへ接種する。菌液調製後30分以内に接種するようにし、接種後速やかに嫌気条件下で培養を開始する(付則-3)。

5. 培養条件

嫌気性グローブボックス内、または嫌気性ジャーを用いて35°C 40~48時間培養する。嫌気性指示薬を使用し、嫌気条件下で培養が行われたことを必ず確認する。培養に際し、各ウエルの培養温度を均一にするために、マイクロプレートの積み重ねは3枚までとし、4枚以上重ねることは避ける。

6. 判定

判定に際しては、対照に用いた薬剤を含有しない培地での菌の発育を確認した後、発育が肉眼的に認められないウエルのうち、最小の薬剤濃度をもってMICとする。

下記の基準に従って判定する(参考文献1)。

1) 発育陽性の判定基準

肉眼的に混濁または直径1 mm以上の沈殿が認められた場合
沈殿物の直径が1 mm未満であっても沈殿塊が2個以上見られた場合

2) 発育阻止の判定基準

肉眼的に混濁または沈殿が認められない場合
沈殿があっても直径が1 mm未満で1個の場合

3) 薬剤希釈系列中に不連続な発育が認められた場合(スキップ現象)は判定を保留とし再検する。再検において不連続な発育が再現された場合には、汚染菌の混入がないことを確かめた後、最終的に発育を阻止した最小濃度をもってMICとする。

7. 精度管理

測定の都度、精度管理用菌株を用いて精度管理を行う(付則-4)。

<付 則>

1. 薬剤感受性測定用培地

嫌気性菌の多くの菌種の発育を一律に支持できる最適の培地を発見することはできなかった。従って現時点では以下に示すわが国で比較的使用頻度の高い2種の嫌気性菌用液体培地のいずれかを用いることを推奨する。いずれの培地もブドウ糖の含有量が高いため、各培地容器に記載された滅菌温度を忠実に守りカラメル化による培地の着色増強を低く押さえるように注意する。

- 1) ABCM プイオン(栄研化学)
- 2) 変法 GAM プイオン, GAM プイオン(日水製薬)

嫌気性菌用液体培地としては、その他 Schaedler プイオン(ヘミン・メナディオンを添加すること)および Anaerobe Broth などもある。これらの嫌気性菌の発育支持力は、このままの処方では総合的に見て推奨した2培地に比較し劣ると判断された。しかし透明度は優れているので、菌液調製用培地として推奨できる。

2. 感受性測定用マイクロプレートの予備還元

凍結保存されていた感受性測定用マイクロプレート、または新鮮作製された感受性測定用マイクロプレートは、予備還元を行わずに使用してはならない。それぞれ解凍、あるいは作製後最低4時間程度、室温で培地の還元を行った後使用する。ただし予備還元が一夜以上に及ぶ場合には、冷暗所に保存する。

予備還元を行わなくても *Bacteroides* (旧分類の *B. fragilis* group のみ) の多くの菌株の MIC 測定は可能であ

った。しかし *Bacteroides* 以外の *Clostridium difficile*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* などの広範囲の菌種の MIC 測定を同時に可能にするため、煩雑ではあるが、あえて予備還元を義務づけることにした。

3. 菌液濃度の調製

B. fragilis ATCC 25285 を用いた検討から 1 McFarland の濁度の菌液が $3 \times 10^8 \sim 8 \times 10^8$ CFU/ml の生菌数を示すことが明らかとなった。従って最初の菌液調製により得られた 1 McFarland の菌液を 5 倍程度希釈すれば 1×10^8 CFU/ml に近い菌液を得ることができると判断された。しかし、菌液の濁度とそれに含まれる生菌数との関係は、菌種によって著しく異なるので、最初の菌液調製時にその点を考慮に入れる必要がある。以下に 5 倍希釈する前の最初の菌液調製法の指針を示す。

a) 1 McFarland に調製すればよいと考えられる菌種

Bacteroides fragilis, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium lentum*, *Propionibacterium acnes* (2 日培養の集落を用いる)

b) 1 McFarland より濃く調整する必要があると考えられる菌種

Peptostreptococcus magnus, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*,

Peptostreptococcus anaerobius (2 日培養の集落を用いる)

Clostridium perfringens (一夜培養の集落を用いる)

Clostridium difficile (一夜培養の集落を用いる)

c) 1 McFarland より薄く調整する必要があると考えられる菌種

Veillonella parvula (2 日培養の集落を用いる)

4. 精度管理

測定の都度下記の菌株を用いて精度管理を行うことが望ましい。それぞれの菌株の微量液体希釈法での精度管理基準については、委員会としては現時点で以下の 7 薬剤に関する基準を提案することができる。

精度管理用菌株

Bacteroides fragilis GAI 5524, ATCC 25285

Bacteroides thetaiotaomicron GAI 5628, ATCC 29741

表 1 精度管理用菌株の薬剤に対する MIC の許容範囲 (参考値)

薬 剤	<i>B. fragilis</i> (GAI 5524, ATCC 25285)	<i>B. thetaiotaomicron</i> (GAI 5628, ATCC 29741)
PIPC	2 - 8	8 - 32
CPZ	NR	32 - 128
CMZ	4 - 16	16 - 64
CZX	NR	2 - 8
LMOX	0.5 - 2	4 - 16
MINO	≤ 0.06	2 - 8
EM	2 - 8	4 - 16
CLDM	0.25 - 1	2 - 8

NR: 許容範囲の決定を保留 (単位は $\mu\text{g/ml}$)

精度管理用菌株は American Type Culture Collection (ATCC) から入手するのが望ましい。菌株の保存は初代培養菌を小分けして 10% スキムミルクに懸濁した状態でフリーザー (-60°C 以下) に保存する。

5. MIC の報告

MIC の報告に際しては、微量液体希釈法の使用を明記し、使用した感受性測定用培地の種類およびできれば精度管理用菌株の MIC を併記する。

参考文献

- 1) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告(1989)(委員長: 五島瑛智子):
微量液体希釈法による MIC 測定法 (微量液体希釈法) — 日本化学療法学会標準法 — CHEMOTHERAPY 38 (1):
102~105, 1990
- 2) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria—Second Edition, Approved Standard M 11-A 2, NCCLS, Villanova, USA, 1990