

ドライプレートを用いた微量液体希釈法による
Helicobacter pylori MIC測定
に関する報告書

—日本化学療法学会標準寒天平板希釈法との比較—

日本化学療法学会抗菌薬感受性測定委員会
ヘリコバクター・ピロリ委員会

ドライプレートを用いた微量液体希釈法による
Helicobacter pylori MIC測定
に関する報告書

—日本化学療法学会標準寒天平板希釈法との比較—

日本化学療法学会抗菌薬感受性測定委員会
ヘリコバクター・ピロリ委員会

委員

- 那須 勝¹⁾ : 大分医科大学第二内科
西野 武志²⁾ : 京都薬科大学微生物学
東 健 : 福井医科大学第二内科
川上 由行 : 信州大学医療技術短期大学
小林 寅喆 : 三菱化学ビーシーエル・化学療法研究室
斎藤 厚 : 琉球大学医学部第一内科
笹津 備規 : 東京薬科大学薬学部病原微生物学
高橋 信一 : 杏林大学医学部第三内科
福田 能啓 : 兵庫医科大学第四内科
峯 徹哉 : 東海大学医学部消化器内科
藤岡 利生 : 大分医科大学総合診療部

(順不同)

1): 委員長、2): 前委員長

はじめに

Helicobacter pylori 感染消化性潰瘍の治療に抗菌薬とプロトンポンプインヒビター(PPI)の併用が推奨されている。欧米諸国では、抗菌薬として主に用いられているのは clarithromycin(CAM)、metronidazole(MNDZ)、tetracycline(TC)および amoxicillin(AMPC)で AMPC と CAM または MNDZ の組合せに PPI を加えた 3 剤併用療法が治療効果を上げている。日本では、保険適用の制限から CAM+AMPC+PPI の組合せがほとんどである。一方、*H. pylori* の CAM 耐性化による除菌不成功例は深刻な問題となっている。*H. pylori* の除菌治療の成否を予測するためにも薬剤感受性の結果は重要な情報となる。

現在、我が国や国際的な標準法として定められている *H. pylori* の薬剤感受性測定法は agar dilution 法のみである^{1,2)}。しかし、一般の臨床検査室において抗菌薬を含む寒天平板を調製し、MIC を測定する事は容易な事ではない。

今回我々は、抗菌薬がマイクロプレートに air-dried coat され、試験菌液のみを分注し培養するだけで MIC が測定できる micro broth dilution 法を用い MIC を測定し、本学会標準法の agar dilution 法と比較検討した。

試験菌株、抗菌薬および測定施設

2001 年のブレイクポイント制定委員会各施設において収集した *H. pylori* 256 株を試験菌株とした。抗菌薬は、CAM および AMPC について測定した。

なお、測定を実施した施設は東海大学医学部消化器内科、東京薬科大学薬学部病原微生物学、大分医科大学第二内科、琉球大学医学部第一内科、三菱化学ピーシーエル・化学療法研究室(順不同)である。

最小発育阻止濃度(MIC)の測定

Agar dilution 法

H. pylori に対する CAM または AMPC の agar dilution 法による MIC 測定は本学会標準法に準じて行った¹⁾。

Micro broth dilution 法

羊血液寒天培地 M58(栄研化学)にて前培養した試験菌をかきとり、滅菌生理食塩液に McFarland 2.0 となるように調整した菌液 0.5mL を 9.5mL の 5%ウマ血清加 Mueller Hinton broth に添加し、被験菌液($5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ CFU/mL)とした。

CAM および AMPC の 0.0015~3.2 μ g の濃度がエアードライコーティングされた 96well のマイクロプレート(ドライプレート:栄研)に被験菌液を 100 μ L 注入し、35°C 3日間、微好気条件下で培養した。培養後各 well を観察し菌の発育の有無により MIC を判定した。

Table 1 Testing condition of MIC for *Helicobacter pylori*

Organism	<i>Helicobacter pylori</i>
Medium	Mueller Hinton broth and horse serum (5% v/v) Air-dried microplate
Inoculum	A saline suspension equivalent to a 2.0 McFarland standard (containing 1×10^7 to 1×10^8 CFU/ml), to be prepared from a 72-hour old subculture from a blood agar plate. 0.5 ml of the suspension is put into 9.5 ml of Mueller Hinton broth supplemented with horse serum (5%v/v). ($5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ CFU / well)
Incubation characteristics	35°C; 3 days ; microaerobic atmosphere produced by gasgenerating system suitable for Campylobacters.

Quality control

H. pylori ATCC43504 を用い同様に MIC を測定し、NCCLS ガイドラインの定める精度管理基準を満たしていることを確認した²⁾。

成績

Micro broth dilution 法、agar dilution 法の一致性では CAM の MIC 値が完全一致した例は 109 例で 43.1%、完全一致を含む±1 管差は 90.1%であった。AMPC では両測定法ともよく一致し、199 例(78.7%)が完全に一致した。AMPC において±1 管を外れる例は 12 例(4.7%)と極めて少なかった(Table 2)。

Table 2 *H.pylori* に対する micro broth dilution 法および agar dilution 法による CAM および AMPC の MIC 比較

	agar dilution / micro broth dilution(log2)							assay株数
	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	
CAM	1 0.4	16 6.3	54 21.3	109 43.1	65 25.7	7 2.8	1 0.4	253 (%)
AMPC	1 0.4	6 2.4	31 12.3	199 78.7	11 4.3	5 2.0	0	253 (%)

Micro broth dilution 法および agar dilution 法によって得られた MIC 値を相関図に示した (Fig. 1,2)。図から明らかな通り、比較的良好な相関関係を示し、very major error(偽感性)、major error(偽耐性)は認められなかった。

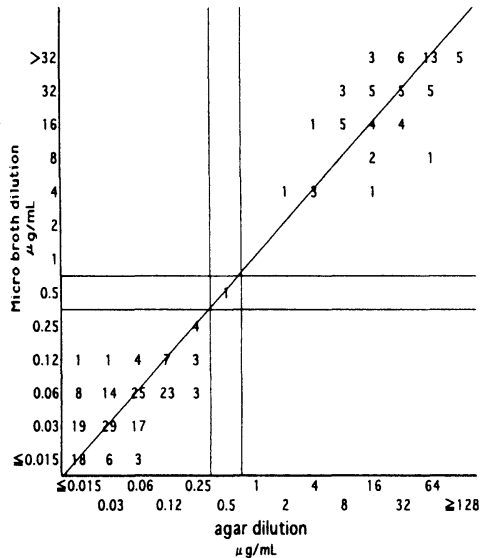


Fig.1 Micro broth dilution法およびagar dilution法を用いた*H. pylori* に対するCAMのMIC

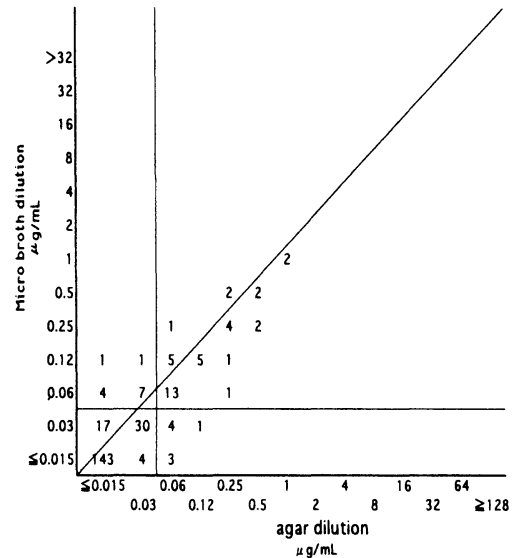


Fig.2 Micro broth dilution法およびagar dilution法を用いた*H. pylori* に対するAMPCのMIC

また、精度管理として *H. pylori* ATCC43504 株に対して 5 回にわたって測定した CAM および AMPC の MIC は micro broth dilution 法で 0.03~0.06 および 0.03 $\mu\text{g/mL}$ であった。Agar dilution 法では CAM の MIC は 0.03~0.12 $\mu\text{g/mL}$ 、AMPC の MIC は ≤ 0.015 ~0.03 $\mu\text{g/mL}$ であった。Micro broth dilution 法で安定した値が得られた。なお、いずれの値も精度管理基準を満たしていた。

考 察

H. pylori に対する MIC 測定法は 2000 年 1 月に NCCLS M100-S10 に掲載された方法が標準法としては初めてである²⁾。諸家による報告では、嫌気性菌の MIC 測定法に準じたものや *Haemophilus* 等の fastidious bacteria を対象とした測定法が応用されている³⁾。しかし *H. pylori* は極めて発育速度が遅いことから、MIC 測定は各種の培養環境に大きく影響される。著者らも *H. pylori* の培養環境に必要な CO_2 が CAM 等のマクロライド系抗菌薬の MIC 値に大きく影響することを指摘してきた⁴⁾。

H. pylori の除菌薬として主に用いられている CAM 等のマクロライド系抗菌薬は pH が低くなる事によって抗菌力が低下することが知られている³⁾。すなわち *H. pylori* の発育に必要な CO_2 が長時間の培養によって培地に溶け込むことによって培地 pH が低くなりマクロライド系抗菌薬の力価低下によって MIC 値が高くなる。本学会が定める *H. pylori* に対する MIC 測定における CAM の breakpoint は S: ≤ 0.25 , I:0.5, R: ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ で MIC 値が ± 2 管変動してしまうことによって基準が全く異なってしまう。

今回我々は、micro broth dilution 法に日本で広く利用されている air dry micro plate を *H. pylori* の MIC 測定に応用し、本学会の agar dilution 法と比較検討した。その結果両測定法はよく一致する事が確認された。また、micro broth dilution 法による CAM の MIC 値において very major error(偽感性)は全く認められず、さらに、同時に測定した quality control 株も NCCLS の range 内であった事から air dry microplate を用いた micro broth dilution 法は寒天平板同様の精度を有するものと思われる。

一般の微生物検査室で MIC 測定用の原末を入手し、用時調製を行い、MIC 測定を実施する事は、手間、コストの面からも有益ではない。従って試験菌液を調製し、microplate に分注するだけで MIC 測定が可能で、かつ本学会 agar dilution 法と同様な成績が得られる air dry microplate を用いた micro broth dilution 法は有用であることが確認された。

結 語

H.pylori に対する CAM, AMPC の MIC 測定において、微量液体希釈法と日本化学療法学会標準法の寒天平板希釈法とによる結果は、良好に相関し一致した。

文献

- 1) 日本化学療法学会 抗菌薬感受性測定委員会：ヘリコバクター・ピロリ委員会：*Helicobacter pylori* 除菌療法における clarithromycin および amoxicillin のブレイクポイント制定に関する報告書。日化療会誌 48: 561~568, 2000.
- 2) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Tenth informational supplement (aerobic dilution) M100-S10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
- 3) Malanoski GJ, Eliopoulos GM, Ferraro MJ, Moellering RC: Effect of pH variation on the susceptibility of *Helicobacter pylori* to three macrolide antimicrobial agents and temafloxacin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 12:131~133, 1993
- 4) Kobayashi I, Hasegawa M, Saika T, Nishida M, Fujioka T, Nasu M: A new semi-solid agar dilution method for determining amoxycillin, clarithromycin and azithromycin MICs for *Helicobacter pylori* isolates. J Antimicrob Chemother 40:713~716, 1997

(第49回日本化学療法学会西日本支部総会発表、於名古屋、2001年12月)