

## 【総説】

## MIC 測定の精度上の問題点

田村 俊<sup>1,2)</sup>・池戸 正成<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 栄研化学株式会社市場対策室学術二部\*<sup>2)</sup> 帝京大学大学院医療技術研究科<sup>3)</sup> 元 栄研化学株式会社

(平成 23 年 7 月 29 日受付・平成 23 年 8 月 11 日受理)

近年、臨床の現場で MIC 値による報告が広く行われるようになってきた。しかしながら MIC 値は測定時の要因によって変動する場合があります、ある程度幅をもった数値であると考えられる。そのためデジタル的な絶対的な数値としてとらえることには問題がある。今回 MIC 値の意味とその変動の原因について影響を及ぼす個々の要因ごとに考えてみたい。

**Key words:** MIC, drug-susceptibility, growth curve, quality control range

## I. はじめに

1980 年代半ばより国内では Clinical and Laboratory Standards Institute (旧 National Committee for Clinical Laboratory Standards) 基準<sup>1,2)</sup>に従った検査法を導入し国内での検査方法の統一を図ったこと、さらに検査試薬メーカーが微量液体希釈法のプレートを提供するようになり、それまで主流であったディスク法による検査方法に代わり定量的に数値が得られる MIC 測定が広く行われるようになってきた。また、ディスク法では感染症の治療の指標として薬剤感受性の試験結果を Susceptible (S), Intermediate (I), Resistant (R) のカテゴリー判定だけしかできなかつたが、微量液体希釈法では菌の発育を抑えることのできる濃度を示した MIC 値による報告も合わせて報告できるようになってきた。

しかしながら MIC 値を生化学検査のような数値としてデジタル的にとらえてしまうと種々の問題が生じる場合がある。MIC 値は一定の濃度の薬剤が存在する培地のなかで菌が発育できるかどうかを発育の指標としての集落形成あるいは濁りとして確認することが基本となっている。この際、測定する菌の種類や薬剤の作用機序によって発育形状が異なるため、場合によっては判定に差が生じる場合がある。さらに培地中のチミン、チミジンのトリメトプリムへの拮抗作用に代表されるように培地の組成が薬剤に影響することから、日本化学療法学会や Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) では感受性試験にはミュラーヒントンプロス (MHB) の使用を規定している。

また、同じ MHB でも含有されるイオン濃度によって感受性値が異なることがある。同様に、MIC 値に変動を

生じる原因として接種菌量、培養温度、培養時間などが挙げられる。

さらに、MIC 測定は結果が MIC 値  $4 \mu\text{g/mL}$  など数値で返されるため、この数値があたかも絶対値のように取り扱われてしまうことがある。元々微量液体希釈法は Fig. 1 のようなマイクロプレートに希釈段階を取った薬剤と培地を分注し、そこに菌を接種し培養した後、どの濃度で菌の発育を抑えることができるかを確認する検査方法である。その際、薬剤の濃度は  $1 \mu\text{g/mL}$  を基準として高濃度側、低濃度側に 2 倍の濃度系列となっている。すなわち  $1 \mu\text{g/mL}$  の次のウエルは  $2 \mu\text{g/mL}$ 、その次は  $4 \mu\text{g/mL}$  という濃度が設定されている。この時  $2 \mu\text{g/mL}$  のウエルに菌が発育し、 $4 \mu\text{g/mL}$  に菌の発育がみられなかった時 MIC 値を  $4 \mu\text{g/mL}$  と判定する。この場合、試験菌が抗菌薬で発育を抑えられる濃度が  $2 \mu\text{g/mL}$  をわずかでも超えてしまえば(例えば 2.1 でも 3.9 でも)  $2 \mu\text{g/mL}$  のウエルには発育してしまうため MIC 値は  $4 \mu\text{g/mL}$  となる。したがって MIC 値  $4 \mu\text{g/mL}$  という表記は  $2 \mu\text{g/mL} \sim 4 \mu\text{g/mL}$  と幅をもった値であることを示している。

今回、MIC 値が接種菌量、培養時の条件(培養時間・培養温度)、培地の影響、測定の際に生じる誤差などの種々の条件で変動する原因について、影響を及ぼす個々の要因ごとに菌の増殖曲線をもとに考えてみたい。

## II. 菌の増殖曲線から見る変動要因

微量液体希釈法は抗菌薬が菌の発育を抑えることができるかどうかを液体培地中で確認する方法である。Fig. 2 の 1 のように  $10^5 \text{CFU/mL}$  の菌を抗菌薬を含まない培地に接種した時培養時間とともに菌の増殖がみられやが

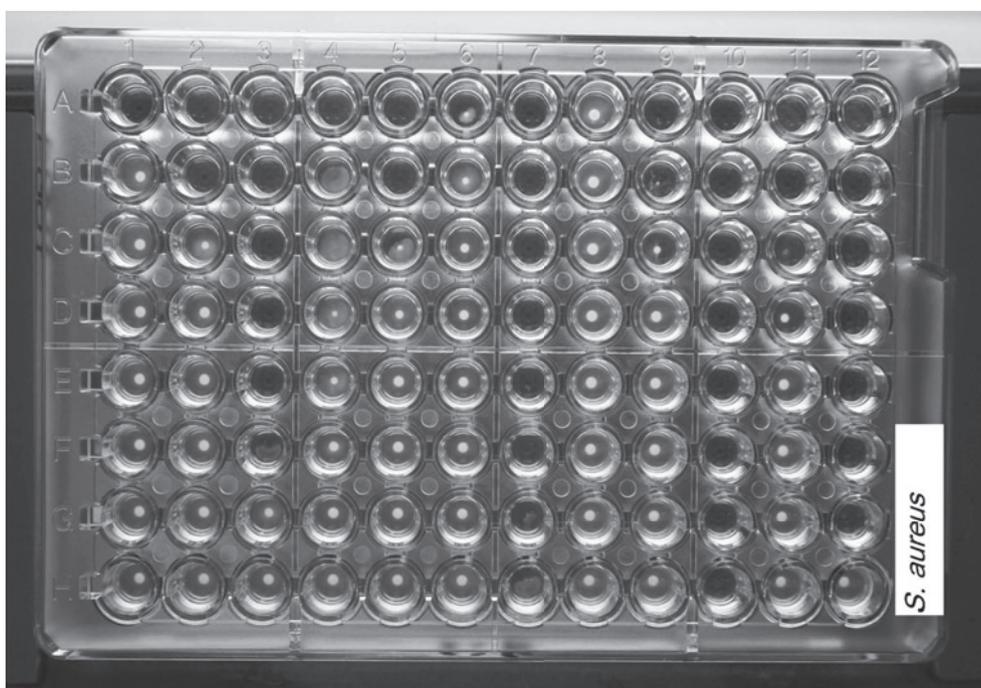


Fig. 1. Microdilution plate.

The dilution step of the antimicrobial agent is prepared in the 96-well microplate. Serial twofold dilution were prepared according to Clinical and Laboratory Standards Institute document M7. And *Staphylococcus aureus* inoculated to the plate. Turbidity is not seen when growth is suppressed with the antimicrobial agent and turbidity is seen when not suppressed.

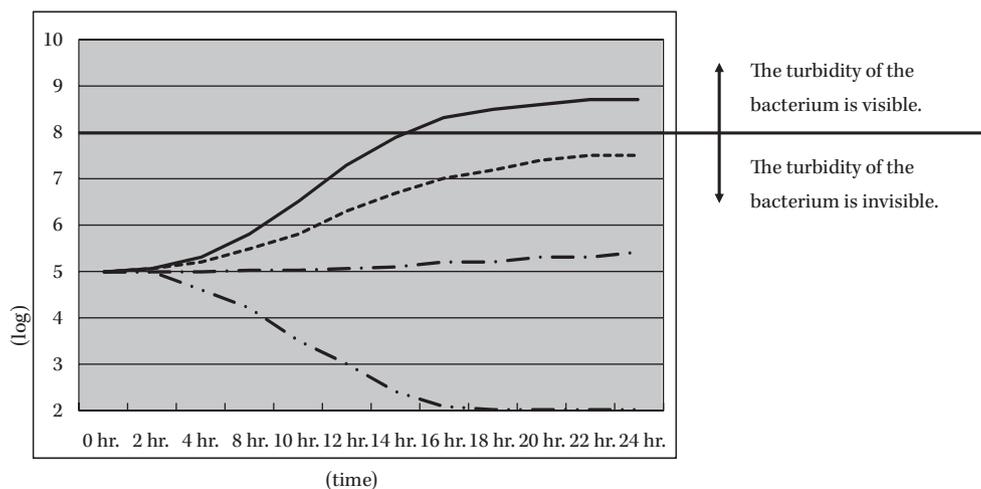


Fig. 2. Growth curve of microorganism.

1: — 2: ..... 3: - - - 4: - . - .

The inoculated bacterium proliferates by culture. The growth curve is different depending on the concentration and the kind of the antimicrobial agent. When the number of bacteria becomes  $10^8$  CFU/mL, the bacteria are visible.

て一定となる。しかしながら培地中に抗菌薬が存在すると発育に阻害が起こるためさまざまな増殖パターンを示すことになる。抗菌薬により菌が死滅した場合は Fig. 2 の 4 のように徐々に菌数が減少していく。また、菌は死滅するわけではないが発育が抑えられた場合は Fig. 2 の

3 のように菌数がほぼ一定で変わらない。さらに、抗菌薬の影響を受け増殖はするものの発育が完全には抑制されない場合は Fig. 2 の 2 のように緩やかなカーブで増殖する。ここで問題となるのが微量液体希釈法の判定方法が菌の発育を肉眼で確認する点である。肉眼で発育が認め

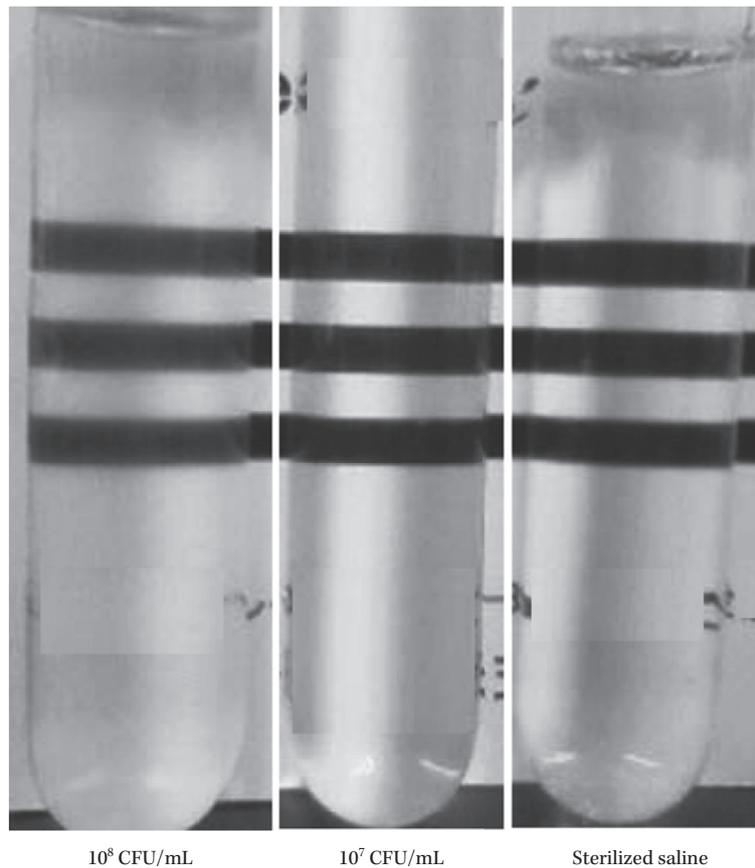


Fig. 3. Turbidity of a microorganism.

*Escherichia coli* was adjusted to the McFarland standard No.1 so that the bacterium density was  $10^8$  CFU/mL, and was then diluted to ten times with sterilized saline. The turbidity is not seen as much as sterilized saline at  $10^7$  CFU/mL though the turbidity can be confirmed at  $10^8$  CFU/mL.

られるためには少なくとも  $10^8$  CFU/mL 以上の菌量が必要となる。Fig. 3 は  $10^8$  CFU/mL の菌液と  $10^7$  CFU/mL の菌液を比較したものであるが、 $10^8$  CFU/mL であれば明らかに濁りが確認できるが  $10^7$  CFU/mL では濁りが確認できず、対象としておいた菌が存在しない滅菌生理食塩水と区別がつかない。したがって判定の際、Fig. 2 の 2 のような発育が種々の条件によって  $10^8$  CFU/mL のラインを挟んで変動すると、最終発育ウエルの発育が陽性となったり陰性となったりする。そのため、MIC 値自体に差が出てしまうことになる。次にどのような条件で変動するかを確認する。

#### 1. 接種菌量による変動

CLSI による菌液調整の基準は各ウエルにおよそ  $5 \times 10^5$  CFU/mL ( $2 \sim 8 \times 10^5$  CFU/mL) になるよう分注するように規定されている。最終的にウエルに分注される量が  $5 \times 10^5$  CFU/mL になればよく、途中の希釈方法については規定されていない。一例として、マクファーランド No.1 (約  $3 \times 10^8$  CFU/mL) に調製した菌液 0.025 mL を 12 mL のブロス中に接種 (480 倍希釈) すると  $6.3 \times 10^5$  CFU/mL となり規定の接種菌量の範囲に入ることとな

る。

通常菌量を濁りで判定しているが同じ濁度でも菌の大きさによって菌量に差がみられることから、菌量を正確に調整することは難しい。そのため、CLSI でも  $2 \sim 8 \times 10^5$  CFU/mL の間に入るよう、接種量に幅をもたせている。しかしながらこの範囲内に入っても結果に差が生じる可能性もある。

Fig. 4 のように接種時に  $10^5$  CFU/mL の範囲内で菌量の差があった場合、菌量が多いほうが増殖曲線の立ち上がりが早くなり、濁りが確認できる  $10^8$  CFU/mL に到達する時間に差が生じることとなる。20 時間の時点で確認すると接種菌量の多かったものは  $10^8$  CFU/mL を超えるため発育陽性と判断されるが、接種菌量が少なかったものはまだ  $10^8$  CFU/mL までは達しないため陰性と判定される。この判定の違いが MIC の判定の差となって現れてくる。

#### 2. 判定時間の差による判定の変動

CLSI ではブドウ球菌の MIC 値を判定する際、オキサシリンおよびバンコマイシンに関しては他の薬剤が 16~20 時間判定なのに対し 24 時間で判定するように

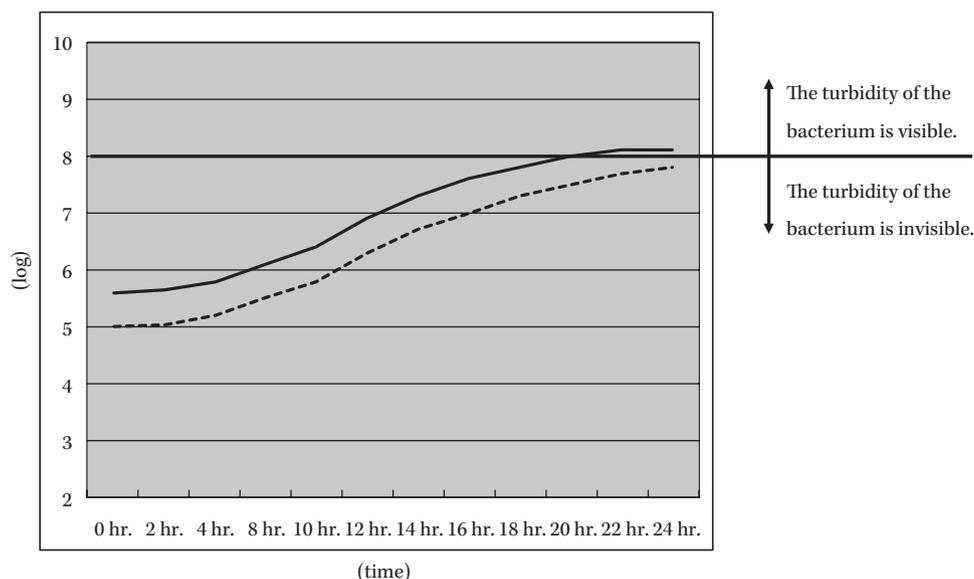


Fig. 4. Influence of inoculum size on the growth curve.

When the growth speed of the bacterium is same, one with a lot of inoculum rates reaches  $10^8$  CFU/mL early.

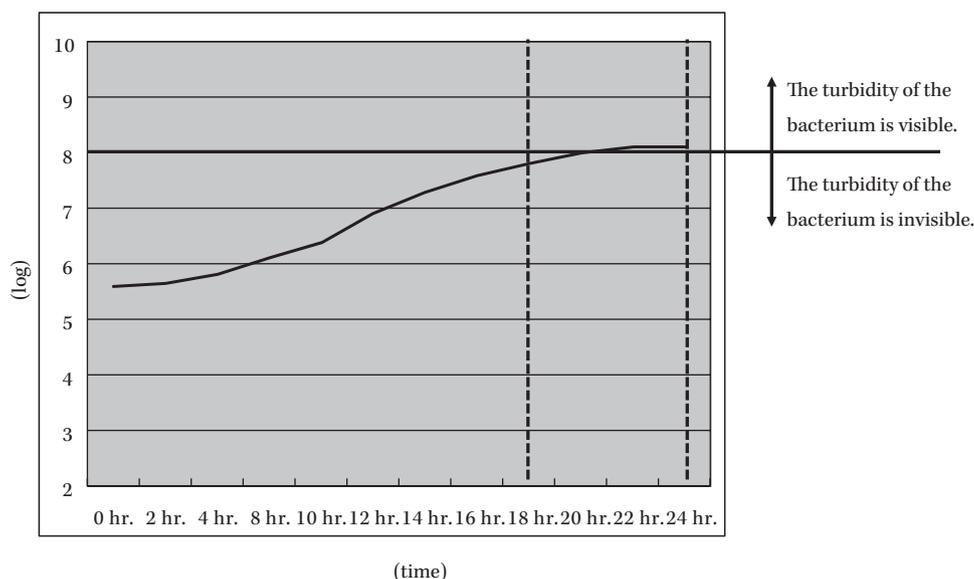


Fig. 5. Influence of time on the growth curve.

Growth can be confirmed at 24 hours though growth is not seen for 18 hours as shown in the figure.

なっている。これは Fig.5 のように 18 時間ではまだ  $10^8$  CFU/mL に達していないが 24 時間になると  $10^8$  CFU/mL を超えるという増殖を示す場合がある。この時 18 時間判定では発育陰性となるが 24 時間では陽性となり判定に差が生じることとなる。特にオキサシリンは MRSA の判定に重要な薬剤のため判定時間を規定どおりに行わないと耐性菌の見落としにつながる。

### 3. 培養温度の差による判定の変動

CLSI では一般細菌の場合  $35^{\circ}\text{C}$  で培養するように規定されている。一般的な細菌の場合、培養の至適温度は

$35^{\circ}\text{C}$  付近であるため  $30^{\circ}\text{C}$  に比べ  $35^{\circ}\text{C}$  のほうが良好な発育を示す。そのため Fig.6 のように規定の温度より低い  $30^{\circ}\text{C}$  培養で培養した場合、一定時間内に  $10^8$  CFU/mL に達しない場合がある。そのため  $35^{\circ}\text{C}$  培養では陽性のウエルが  $30^{\circ}\text{C}$  で陰性となり、MIC の判定の差となって現れてくる。

### 4. 培地の差による判定の変動

現在 CLSI 基準では一般細菌の場合 MHB を使用して感受性測定を行うようになっている。しかし国内で CLSI 基準が定着する前はハートインフュージョン培地のような

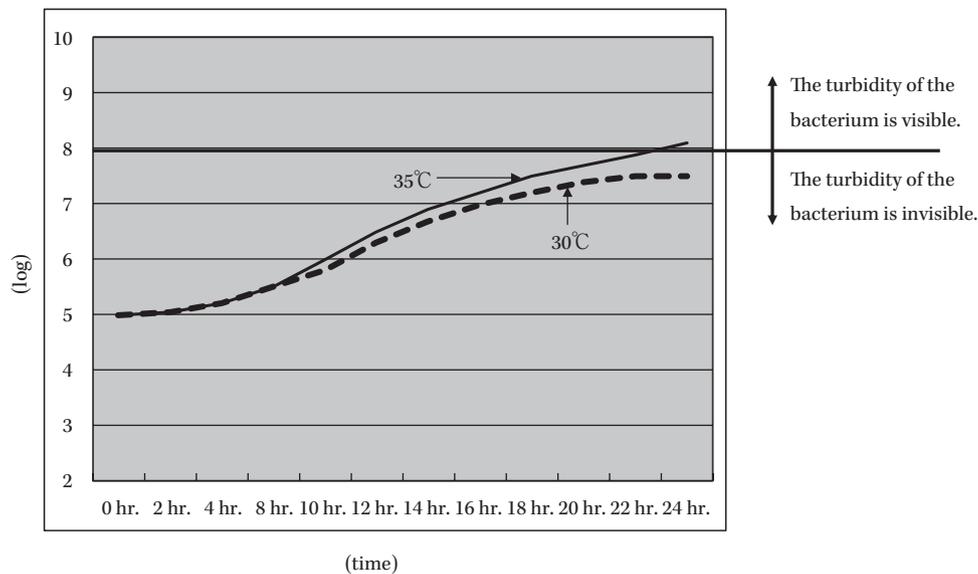


Fig. 6. Influence of temperature on the growth curve.

Growth can be confirmed when the medium is cultured at 35°C, but growth is not seen when cultured at 30°C.

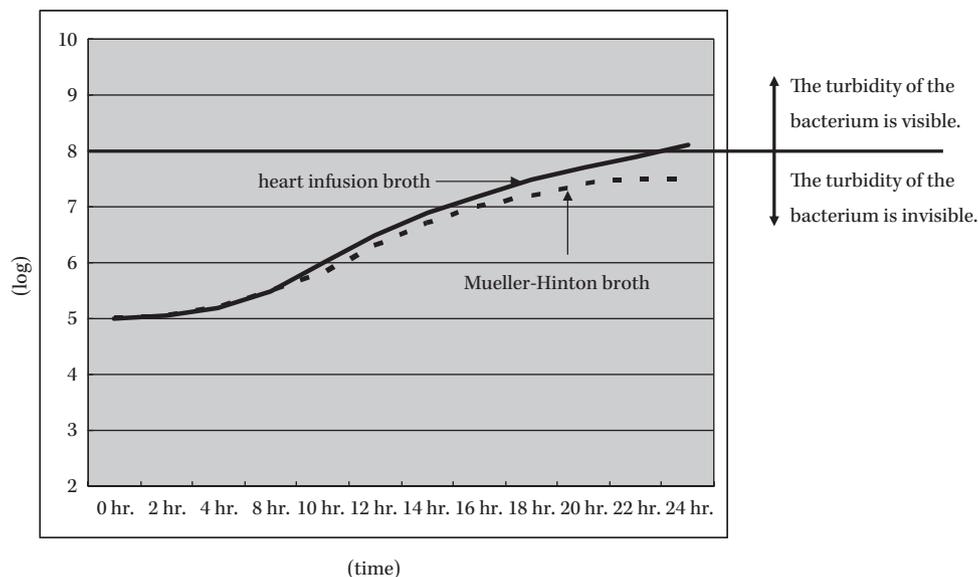


Fig. 7. Influence of the medium on the growth curve.

Growth can be confirmed when the medium is cultured in heart infusion broth, but growth is not seen when cultured in Mueller-Hinton broth.

MHB 以外の培地を使用している感受性検査も行われていた。MHB は組成中にハートインフュージョン培地のような動物性タンパク質を含んでおらず発育支持力が高い培地というわけではない、しかしながら感受性の結果が再現性良く測定できる培地として CLSI では感受性試験用の培地として採用されている。そのため、Fig.7 のように他の培地を使用すると MHB で  $10^8$  CFU/mL に達しない場合でも  $10^8$  CFU/mL を超えてしまう場合がある。この場合、MHB で発育陰性で他の培地で発育陽性となり、

MIC の判定の差となって現れてくる。また MHB では培地中の成分からチミジンが除去されている。これは培地中にチミジンが存在すると ST 合剤の MIC 値が変動するためである<sup>3,4)</sup>。しかしこのため、一部のチミジン要求性ブドウ球菌では MHB に発育しないというデメリットも存在する。

さらに同じ MHB でも Ca, Mg イオンの濃度で MIC が変動することが知られている。特に *Pseudomonas aeruginosa* でテトラサイクリン系、アミノグリコシド系

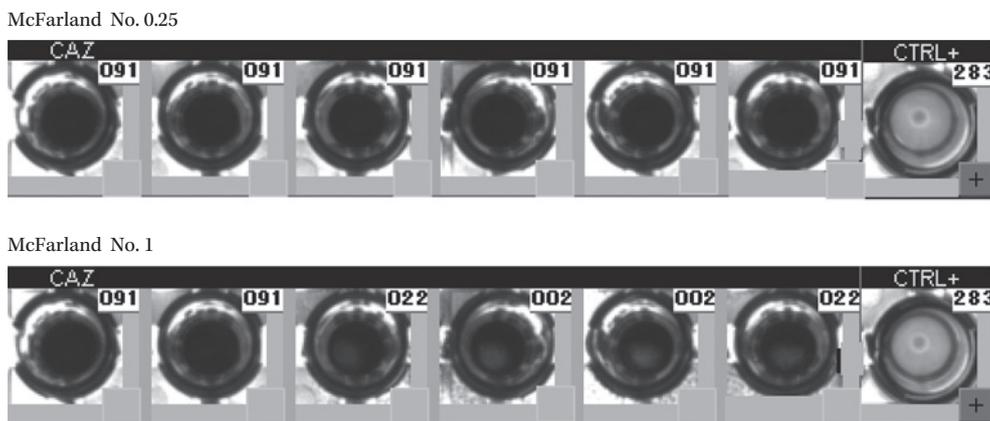


Fig. 8. Growth in plate according to the difference in the inoculum size of *Proteus vulgaris*. Concentration ranged from 0.5 to 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ceftazidime. Growth could not be confirmed with the bacteria adjusted to McFarland standard 0.25 at 0.5 to 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Slight growth was however confirmed at the same concentration when the bacteria density was adjusted to McFarland No.1.

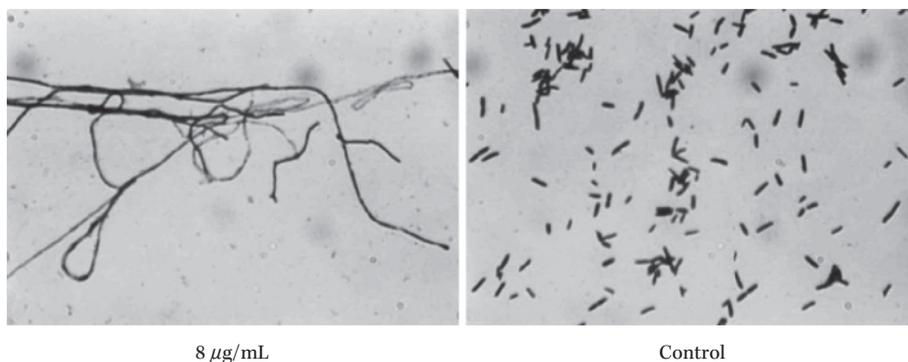


Fig. 9. Form of microorganism which grew in a different concentration of antimicrobial agent in *Proteus vulgaris*.

At a CAZ concentration of 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the receiving bacterium assumes a long form, but maintains the short form in control well with no antimicrobial agent.

の薬剤を測定する場合、イオン濃度が低いと MIC 値が感性にシフトする。そのためミュラーヒントン培地中の Ca, Mg イオンの濃度を一定量添加しておく必要がある。Ca, Mg イオンの濃度は日本化学療法学会<sup>5,6)</sup>でも CLSI でも設定されているが両者で設定されている範囲が異なっている。日本化学療法学会では Ca イオンを 25~50 mg/L, Mg イオンを 12.5~25 mg/L としているが CLSI では Ca イオンを 20~25 mg/L, Mg イオンを 10~12.5 mg/L と若干の差異がみられる。

また、これまでは他の薬剤への影響は少ないといわれていたが、近年ブドウ球菌のオキサシリンの感受性試験の際、Ca イオンの濃度が MRSA の判定に影響するという発表がある<sup>7)</sup>。

### III. 微量液体希釈法の判定

上記のように種々の条件で判定に差があることを示したが、実際のプレートでみられる例を以下に示す。

Fig. 8 に示したように最終接種菌量が CLSI 基準の範

囲に入るようにマクファーランド No.1 で接種した場合は 4~0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度でわずかな発育が確認できるが、マクファーランド No.0.25 で接種した場合は発育が確認できなかった。このような発育状況を示した時判定に苦慮することとなる。日本化学療法学会では 1 mm 以上の沈殿が確認できた場合、CLSI では 2 mm 以上の沈殿が確認できた時発育陽性としている。この基準に従えばマクファーランド No.1 接種での 4~0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度でわずかな発育は発育陽性と判定することになるが、コントロールの発育に比べごくわずかであることから抗菌薬の影響をかなり受けていることが推察される。そこでウエルに発育した菌を釣菌し、顕微鏡で観察すると菌は Fig. 9 のようなフィラメント状の形態となっていることが確認できた。このようにセフトジムを 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  含有するウエルのわずかな濁りは菌数が増えているだけでなく、薬剤の影響を受け菌体が長く伸張するという形態変化により、見かけ上濁度として目視で確認できるよ

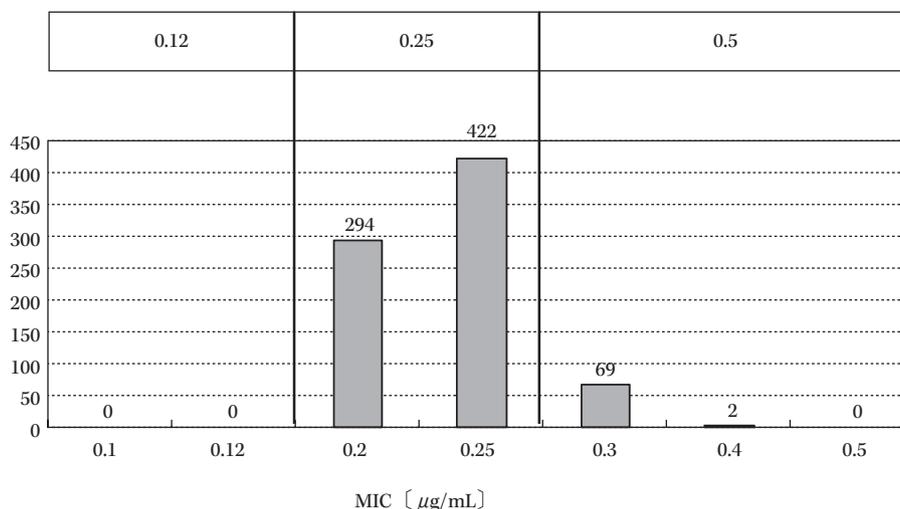


Fig. 10. Distribution of MIC over a small range of concentrations of *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 in PCG.

MIC range was from 0.2 µg/mL to 0.4 µg/mL.

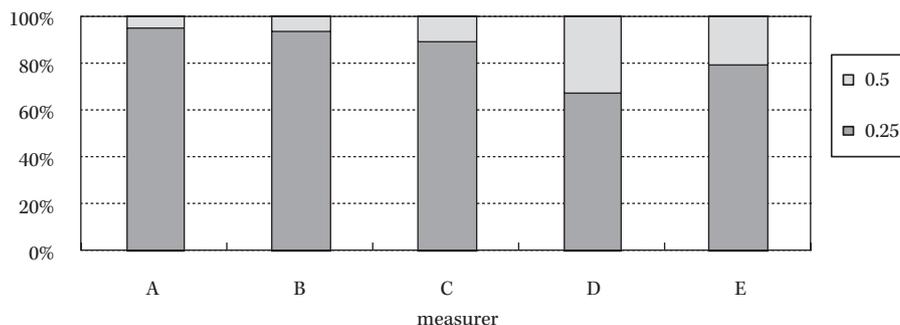


Fig. 11. Distribution of MIC according to different measurers.

As for measurer D and E, an MIC value of 0.5 µg/mL is seen at a higher frequency compared with measurer A and B.

うになったと推察される。しかしながらウエルの濁りだけでは菌の形態が変化しているかどうかの判断はつかないため、測定者の判定の仕方によってMIC値に変動が生じることとなる。

#### IV. 測定の際に生じる誤差

感受性を測定する際 CLSI の基準に則って測定してもどうしても個人差が生じてしまう。特に菌液の調整、発育ウエルの判定に個人差が生じやすい。そこで精度管理菌株 *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 株を使用し、5名の測定者が同一ロットの感受性プレート、同一培養条件で10日間繰り返し試験を行い、データの比較を行った。トータルで787測定例でのMIC値の分布をFig. 10に示した。

薬剤はPCGを使用し希釈段階を0.1, 0.12, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5 µg/mLと細分化したプレートを使用して測定した。MICの分布は0.2 µg/mLに294例, 0.25 µg/mLに422例, 0.3 µg/mLに69例, 0.4 µg/mLに2例という結果であった(通常のMIC判定の場合0.25 µg/mLに

716例, 0.5 µg/mLに71例)。CLSIに設定されている *S. pneumoniae* ATCC 49619 のPCGの管理基準値は0.25~1 µg/mLとなっておりすべて範囲内には入っているが必ずしも同じ値にはならなかった。微量液体希釈法では再現性の高いデータが得られやすい精度管理菌株を使用し、条件をそろえて測定しても測定者間の違い、測定日などの違いによりすべて同じデータを得ることは困難なのが現状である。特にFig. 11にはおのおのの測定者がMIC値をどのように判定したかの頻度を示している。Fig. 11にみられるように同じ測定者でも同一の測定結果が得られるわけでもなく、さらに測定者によってデータのバラツキの程度も変動する。

また、Fig. 11における測定者間の差異は測定から判定までを一人で行った結果であるが、同じプレートを複数の測定者が判定した結果をFig. 12に示した。Fig. 12は *Chryseobacterium meningosepticum* を使用したゲンタマイシンの感受性結果を写真に取り91施設でMICを判定した時のMIC分布である。今回使用した写真では徐々に発

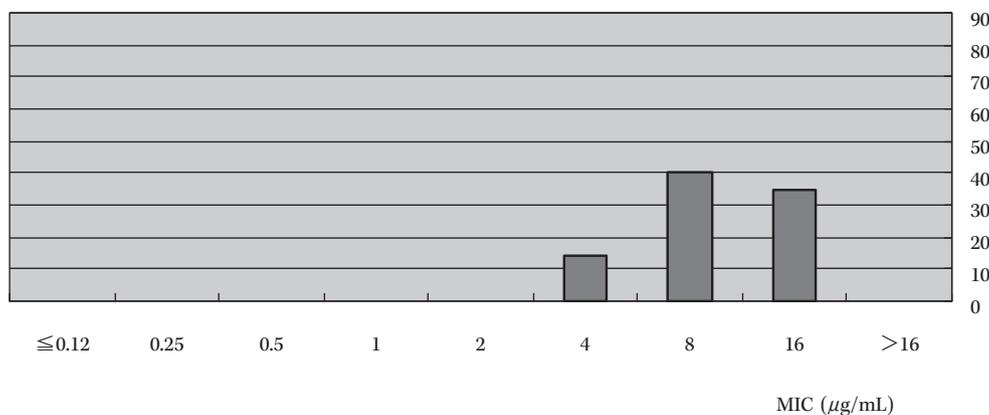


Fig. 12. Distribution of MIC according to measurer in the same plate. At gentamicin concentrations ranging from 0.12 to 16  $\mu\text{g/mL}$ , the plates were inoculated with *Chryseobacterium meningosepticum*. Result that judged same plate in 91 different laboratories.

Table 1. Quality control range in Clinical and Laboratory Standards Institute

Antibiotics	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Ampicillin	0.5-2	0.5-2	2-8	—
Piperacillin	1-4	1-4	1-4	1-8
Cefazolin	0.25-1	—	1-4	—
Ceftazidime	4-16	—	0.06-0.5	1-4
Imipenem	0.015-0.06	0.5-2	0.06-0.25	1-4
Amikacin	1-4	64-256	0.5-4	1-4
Erythromycin	0.25-1	1-4	—	—
Levofloxacin	0.06-0.5	0.25-2	0.008-0.06	0.5-4
Vancomycin	0.5-2	1-4	—	—

( $\mu\text{g/mL}$ )

Acceptable limits for quality control strains used to monitor accuracy.

Nonfastidious organisms were used in Mueller-Hinton Medium without blood or other nutritional supplements.

育が減衰していたため、測定者によって判定に大きく差が生じたものと考えられる。

以上述べたような判定の差異は上記の種々の原因が組み合わさって生じているものと考えられ、どうしても避けられないものと考えられる。そのため CLSI でも精度管理基準値には、Table 1 に示すように  $\pm 1$  管程度の範囲を取っている。

## V. ま と め

今まで述べたような現象による最終ウエルの判定の差異はすべての測定の際に起こるわけではなく、多くの場合良好な再現性が得られている。しかしながら一部の菌株と薬剤の組み合わせでは微量液体希釈法による MIC 値はできる限り正確に検査を行ったとしても発育に微妙な違いが生じるため最終ウエルの判定が異なってしまう場合があることも事実である。そのため得られた MIC 値は絶対的な 1 ポイントの値と考えるよりは前後に変動する可能性がある幅をもった値と認識すべきである。

また、CLSI では操作方法にかなり幅をもたせている

が、これは決していい加減に操作して良いということではなく微生物を扱う場合慎重に取り扱ってもどうしてもブレが生じてしまうためであると考えられる。そのため検査を実施する際は操作方法を一定にしてなるべく操作による誤差が少なくなるようにする必要がある。

最後に、得られた MIC 値は絶対的な数値ではなく、種々の要因で変動する可能性を含んでいる数値であることを考慮し、データの  $\pm 1$  管程度は許容範囲があると考えることが重要である。

## 文 献

- 1) National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS Approved Standard, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. M7-A, 1986
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI Approved Standard Eighth ed., Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. M7-A8, 2009
- 3) 日本化学療法学会：インフルエンザ桿菌に対する微

- 量液体希釈法培地の問題点。日化療会誌 2011; 59: 206-13
- 4) ST合剤研究会 MIC測定法のための小委員会：Sulfamethoxazole と Trimethoprim の感受性測定法。日化療会誌 1973; 21: 67-76
- 5) 日本化学療法学会：日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告。日化療会誌 1990; 38: 102-5
- 6) 日本化学療法学会：抗菌薬感受性測定法検討委員会報告。日化療会誌 1993; 41: 183-9
- 7) 松本哲哉：培地中のCa濃度がオキサシリンの薬剤感受性に及ぼす影響。日本臨床微生物学雑誌 2010; 20: 126

## Problems with the quality of minimum inhibitory concentration (MIC) measurement

Takashi Tamura<sup>1,2)</sup> and Masanari Ikedo<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Eiken Chemical CO., LTD Science Promotion 2nd Department Market Corresponding Division Sales Management Office, 4-19-9 Taito, Taito-ku, Tokyo, Japan

<sup>2)</sup> Teikyo University Graduate School Medical Technology Doctoral & Master's Degree Programs

<sup>3)</sup> Eiken Chemical CO., LTD

Recently, reports in the clinical literature based on the minimum inhibitory concentration (MIC) value have frequently appeared. However, it is possible that the numerical value of the MIC might vary to some degree depending on the factor used to measure it, so that a problem might arise when attempting to capture the MIC as an absolute digital numerical value. In the present study, the authors have examined the individual factors which might have an influence on, and analyze the changes made to, the MIC value.