

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年）

日本化学療法学会は1968年、寒天平板希釈法による抗菌薬感受性測定の標準法を設定した（Chemotherapy, Vol. 16, 1968）。しかしその後、薬剤感受性試験の成績が蓄積されるに従い、菌種によっては測定時の培養条件（培地の組成、接種菌量、培養温度、培養時間など）により測定値にかなりの変動がみられることが指摘され、さらに *in vivo* 効果や臨床効果に相関する値を求めようとする要望が高まり、1974年と1981年の2回にわたって感受性測定法の改定が行なわれた（Chemotherapy, Vol. 22, 1974, Vol. 29, 1981）。

また、1979年には、嫌気性菌の薬剤感受性測定法についても寒天平板希釈法による標準法が設定された（Chemotherapy, Vol. 27, 1979）。

しかし、実際には寒天平板希釈法の省力化、半自動化を目的としたいくつかの機器が開発され、日本化学療法学会の標準法といいながら、実際にはほとんどがその変法ともいべきこれらの機器を用いて行なわれているのが実状である。

一方、欧米諸国では近年液体希釈法によるMICの測定が主流となっており、WHO Expert Committee on Biological Standardization Twenty-eighth Report (WHO Technical Report Series. 610, 1～133, 1977) に準じた機器による微量液体希釈法が広く採用されている。本法は、培地が少量で済むこと、同時に多数の薬剤感受性試験を施行できること、MICの測定に引続きMBCの測定も可能であることなどの利点を有しており、欧米ではルチン検査においても広く使用されている。1980年代に入ると本法は我が国にも導入され、次第に利用者が増加し始め、その標準化が強く要望されるようになった。

このような実状から本学会において、1988年、再び薬剤感受性測定法を見直すこととなり、抗菌薬感受性測定法検討委員会（表1）が設置された。

今回、委員会では微量液体希釈法の標準化を目標に施設間差、薬剤別、菌種別について、寒天平板希釈法との比較を行なうと共に、本法の精度について検討し、第37回日本化学療法学会（1989年、東京）において、その成果を報告した。この検討結果に基づき、以下のような微量液体希釈法の標準法を設定した。

表1. 抗菌薬感受性測定法検討委員会（1988年）

委員長	五島 瑳智子	東邦大学医学部微生物学教室
委員	岡田 淳	関東通信病院総合検査科
	小栗 豊子	順天堂大学医学部附属病院中央臨床検査室
	菅野 治重	千葉大学医学部附属病院検査部
	山口 恵三	長崎大学医学部附属病院検査部
	渡辺 邦友	岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設

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 —

1. 抗菌薬の保存法

抗菌薬は吸湿防止のためにデシケーターに入れ、常温で力価が低下する薬剤もあるので、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. 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 300g, 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 イオン 50 mg/l と Mg イオン 25 mg/l を添加して使用する (Cation Supplemented Mueller-Hinton Broth : CSMHB)。

Mueller-Hinton broth (M H broth) は市販されているいずれの製品でもよいが、使用した培地の製造会社名を明記する。

U字型ウエルのマイクロプレートを使用し、1 ウエルあたり薬剤含有感受性測定用培地を 0.1 ± 0.02 ml 分注し専用のシールで密閉したのち、 -60°C 以下に保存、3 か月以内に使用する。なお安定性の悪い薬剤 (β -ラクタム剤など) の中にはこの期間内においても薬剤力価の低下する場合もあるので十分な精度管理が必要である。

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。水に不溶解ないし難溶の薬剤は必要に応じてエチルアルコール、緩衝液、NaOH 液、DMSO 液などで、できるだけ少量に溶解した後、精製水や緩衝液で希釈して薬剤原液を作る。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でなう。

抗菌薬の希釈濃度は $1 \mu\text{g/ml}$ を中心とした下記のような 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

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

(薬剤の希釈法は付則-2 を参照)。

4. 接種用菌液の調製および菌の接種

一夜培養した寒天培地上的の被検菌体を滅菌生理食塩液で 0.5 Mc FARLAND (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約 0.005 ml 接種し、最終接種菌量を約 10^4 CFU/ウエルとする。菌液調製後 15 分以内に接種する。

なお、各プレートには薬剤不含有培地を 1 プレートにつき 1～2 ウエルに分注しておき、菌の発育の対照とする。

5. 培養温度および時間

$35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18～24 時間培養する。

培養に際し、各ウエルの培養温度を均一にするために、マイクロプレートを 4 枚以上積み重ねることは避ける。

6. 判定

判定に際しては、対照に用いた薬剤不含有培地での菌の発育を確認した後、菌の発育が肉眼的に認められないウエルの中、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。

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 以下であっても沈殿塊が 2 個以上みられた場合

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以下で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。

[例] 薬剤希釈濃度(μg/ml): 128 64 32 16 8 4 2 1 0.5 0.25 0.12 C
 菌 の 発 育 : - - - - + + - - + + + +

上記のような成績が再現試験によっても再認され、8, 4 μg/mlのウェルに発育している菌が汚染菌でない場合、MICは16 μg/mlとする。(C: 薬剤不含有培地)

7. 精度管理

測定の都度、精度管理用菌株(付則-3参照)を用いて精度管理を行なう。

[付 則]

1. 2価イオンの調製法と感受性測定用培地への添加法

塩化カルシウム(CaCl₂·2H₂O)の3.68gを精製水100 mlに溶解(10 mg·Ca⁺⁺/ml)後、ろ過滅菌し、その5 mlを滅菌したMueller-Hinton broth 1,000 mlに添加する。

塩化マグネシウム(MgCl₂·6H₂O)の8.36gを精製水100 mlに溶解(10 mg·Mg⁺⁺/ml)後、ろ過滅菌し、その2.5 mlを滅菌したMueller-Hinton broth 1,000 mlに添加する。

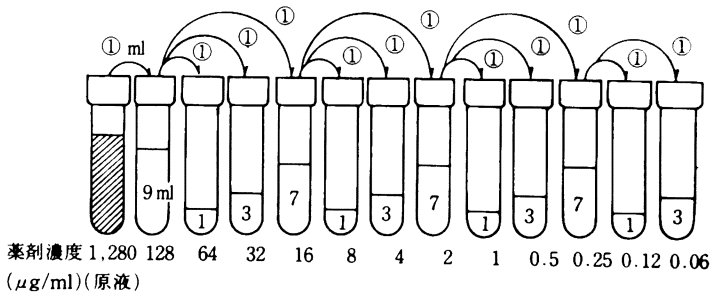
2. 薬剤の希釈法

力価の明らかな薬剤原末を0.1 mgまで正確に秤量し、適切な溶媒の適当量を加えて(下記の式を参照)、力価1,280 μg/mlの溶液を調製し、ろ過滅菌して薬剤原液とする。

$$\text{溶媒量 (ml)} = \frac{\text{原末力価 } (\mu\text{g/mg}) \times \text{原末秤量 (mg)}}{\text{最高濃度 (1,280 } \mu\text{g/ml)}}$$

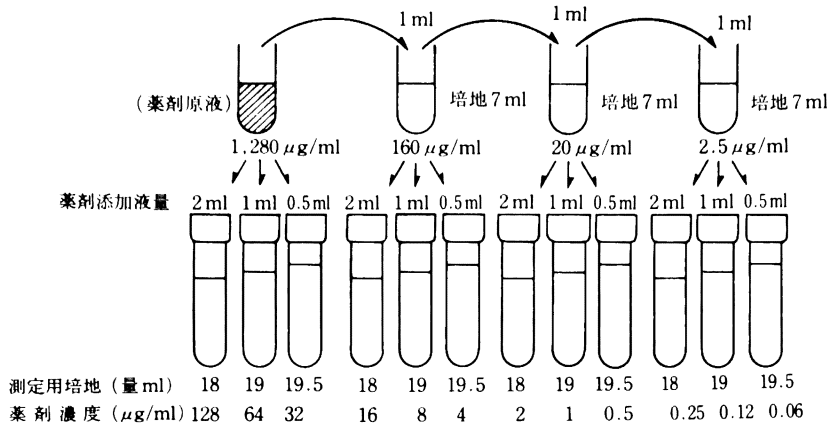
[例1]

滅菌した薬剤原液を感受性測定用培地を用いて128, 64, 32, ... 0.12, 0.06 μg/mlとなるように希釈する。希釈手順は図のように行なう。薬剤原液の希釈には滅菌メスピペットを用い、(誤差を少なくするために3管を越えて連続希釈をしてはならない)濃度希釈ごとに新しい滅菌メスピペットを使用する。



〔例 2〕

1,280 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤原液を感受性測定用培地で 8 倍希釈し, 160, 20 および 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の溶液を調製する。この際薬液を採取する滅菌メスピペットはそのつどかえて操作し, さらに図のように, それぞれを 10 倍, 20 倍および 40 倍に希釈して 128, 64, 32, \dots 0.12, 0.06 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤系列を作製する。この場合の希釈は濃度の低い方から分注すれば, ピペットをかえる必要がない。



3. 精度管理

測定の都度下記の菌株を用いて精度管理を行なうことが望ましい。それぞれの菌株の精度管理基準は参考文献を参照する。

精度管理用菌株

Escherichia coli ATCC 25922

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Streptococcus faecalis ATCC 29212

精度管理用菌株は American Type Culture Collection (ATCC) あるいは理化学研究所微生物系統保存施設 (Japan Collection of Microorganisms; JCM) から入手するか, 市販のゼラチンディスク (Extra strain; 三光純薬) を使用する。

菌株の保存は初代培養菌をスキムミルクに混濁し, 小分けしてフリーザーに保存するか, ゼラチンディスクを作り冷所に保存する。3 代以上継代した菌株は使用してはならない。

4. MIC の報告

MIC 報告に際しては, 微量液体希釈法と寒天平板希釈法の区別を明記する。

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 価イオン調整 Mueller-Hinton broth (CSMHB) 1,000 ml に塩化ナトリウム (NaCl) 20g を添加した培地を使用し, オキサシリン (MPIPC) に対する MIC を測定する。MIC が 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した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)。

参 考 文 献

- 1) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Standard methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standards, NCCLS, Villanova, 1983
- 2) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—Second Edition, Tentative Standard, NCCLS, Villanova, 1988