

## 抗菌薬感受性試験微量液体希釈法検討委員会報告書

インフルエンザ桿菌に対する微量液体希釈法測定培地の問題点  
—日本化学療法学会法馬溶血液添加培地と CLSI 法 HTM 培地の比較—

## 抗菌薬感受性試験微量液体希釈法検討委員会

委員長 山口 恵三<sup>1)</sup>委員 平潟 洋一<sup>2)</sup>, 小林 寅喆<sup>3)</sup>, 池戸 正成<sup>4)</sup>, 大野 章<sup>1)</sup><sup>1)</sup>東邦大学医学部医学科微生物・感染症学講座<sup>2)</sup>東北大学大学院医学系研究科臨床微生物解析治療学講座<sup>3)</sup>東邦大学医学部看護学科感染制御研究室<sup>4)</sup>栄研化学株式会社生物化学研究所

MIC 測定法は日本化学療法学会(日化療)によって、1968年に寒天平板希釈法に対し制定され(MIC 測定法改訂委員会報告. *Chemotherapy*, 1981, 29: 76-79), その後1979年に嫌気性菌に対する同法の制定が行われた。さらに1980年に再改訂され、その後長く使用されてきた。微量液体希釈法に対しては1990年に制定され、1992年に栄養要求性の厳しい菌種に対する測定培地の検討および嫌気性菌に対する測定法の検討が行われ改訂版として制定された(抗菌薬感受性測定法委員会報告. *Chemotherapy*, 1993, 41: 183-189)。その後感染症抗菌薬療法を取り巻く環境は、抗菌薬耐性菌の蔓延と多様化、PK/PD理論の向上などによって大きく変化し、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) や European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) などでは頻回に抗菌薬感受性測定法の改訂作業が行われてきた。本学会での見直し作業は、2007年に寒天平板希釈法に対して行われた。見直しの結果、特定の菌種を除き対象菌種を定めたくて CLSI 法を日化療法の一部として採用することに変更された(抗菌薬感受性測定法委員会最終報告(2007年)(日本化学療法学会雑誌, 2008, 56: 49-57)。微量液体希釈法に関する改訂作業は、2008年1月に山口恵三委員長のもとに小委員会が組織され開始された。以下にその経緯を述べる。

委員による第1回討議において指摘されたのは、インフルエンザ桿菌の測定法であった。すなわち日化療法と CLSI 法では基礎培地であるミュラーヒントンブロス(MHB)へのサプリメントが異なり、実施上 CLSI 法に問題が多いのではないかとの意見である。このため、現場で微量液体希釈法に対しどのような疑問や問題点を持っているかを調査することとなり、日本化学療法学会会員および日本臨床微生物学会会員にアンケート調査を実施した。

その結果、多くの会員に指摘された問題点は、委員会での指摘同様、CLSI 法の *Haemophilus Test Medium Broth* (HTM 培地) 使用によるインフルエンザ桿菌の薬剤感受性試験における測定時での発育性の悪さ、それによる判定の困難さであった。アンケート調査では日化療法培地のほうが、CLSI 法培地よりも判定しやすいという回答が相当数みられた。

このアンケート結果を受け、本委員会においてはインフルエンザ桿菌に対する測定培地の再評価を、全国複数の検査施設の協力のもと実施することとなった。

## 材料と方法

## 1. Phase I 試験

Phase I 試験では、インフルエンザ桿菌用微量液体希釈法に用いる培地として、日化療法ヘモフィルス属菌試験用培地、CLSI 法の HTM 培地の違いを、それぞれの基礎培地のロットによる影響も含めて評価することを目的とした。

## 1) 実施方法

日化療法、CLSI 法に基づくインフルエンザ桿菌用微量液体希釈法マイクロプレート(ドライプレート)の作製、および基礎培地である CAMHB 3 ロットおよび日化療法と CLSI 法のサプリメントの準備を栄研化学株式会社に依頼した。これらを下記協力7施設にロット番号を A, B, C とブラインドにして配布した。同時に QC 株として *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 ( $\beta$ -lactamase non-producing ampicillin-resistant [BLNAR]), *H. influenzae* ATCC 49766 を用い測定した。測定はロットごとに30回実施し、Lot. A, B, C の各薬剤における参加協力施設全体の幾何平均 MIC 値を求め、培地ロット差について検討した。

## 2) 使用薬剤

次の8薬剤について括弧内に示した濃度範囲で試験を行った。薬剤濃度は2倍連続希釈系列を用いた。アンピシリン

ン (ABPC, 0.06~128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), アモキシシリン/クラブラン酸 (ACV, 0.06/0.03~64/32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ST 合剤 (T/S, 0.004/0.07~8/152  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), セフトリアキソン (CTRX, 0.015~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), メロペネム (MEPM, 0.008~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), アジスロマイシン (AZM, 0.06~64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), セフジニル (CFDN, 0.03~64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), シプロフロキサシン (CPFX, 0.001~2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

### 3) 使用培地

表 1 にそれぞれの培地組成を示した。

表 1. 日本化学療法学会と CLSI 法における *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* MIC 測定培地の組成比較

日本化学療法学会法		CLSI 法	
CAMHB (基礎培地)		CAMHB (基礎培地)	
NAD	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	NAD	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$
馬溶血液	2~5%	Hematin	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Yeast extract	5 $\text{mg}/\text{mL}$	Yeast extract	5 $\text{mg}/\text{mL}$
		Thymidine phosphorylase*	0.2 IU/mL

\* : Sulfonamid や trimethoprim を測定する時に添加

### 4) 接種菌液の調整と接種方法

試験菌株をチョコレート寒天培地に接種, 5% 炭酸ガス環境下, 35 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$  で 20~24 時間培養した集落から鈎菌し, MHB あるいは生理食塩液で 0.5 McFarland 標準濁度に調整した。その 50  $\mu\text{L}$  を日化療法培地および CLSI 法培地のそれぞれ 13 mL に添加, 攪拌後 15 分以内にドライプレートに 100  $\mu\text{L}$ /ウエルずつ分注し, 好気条件にて 35 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$  で 20~24 時間培養後に判定した。

### 5) 培地ロット間差の評価法

評価対象薬剤は CLSI で管理基準が記載されているものを対象とした, すなわち *H. influenzae* ATCC 49247 ではメロペネムとセフジニルを除外, *H. influenzae* ATCC 49766 ではメロペネムとセフジニルだけを対象とした。

また各施設で試験方法, 薬剤, 培地ロットの組み合わせの成績で MIC の管理幅を 5% 以上 (30 回測定のうち 2 回) 越えた組み合わせの成績は評価対象から除外した。さらに施設全体の成績で管理幅から外れた成績が 5% 以上あった場合は, その施設の成績すべてを除外することとした。ロット間差の評価は, 全施設を合計した成績で評価した。

### 6) 統計処理

Excel 2007 付属の Student-t 検定にて行い, 有意水準は 5% とした。

### 7) 測定施設

長崎大学附属病院検査部  
佐賀大学医学部附属病院  
神戸大医学部附属病院検査部  
天理よろづ相談所病院  
藤田学園保健衛生大学病院臨床微生物検査室  
順天堂大学医学部附属病院臨床検査部  
札幌医科大学附属病院検査部

## 2. Phase II 試験

Phase II 試験では, 日化療法培地と CLSI 法培地の比較および発育支持能などの比較を目的とした。

### 1) MIC 測定に及ぼす影響

実施方法: Phase I と同様に, 栄研化学株式会社にインフルエンザ桿菌用微量液体希釈法マイクロプレート (ドライプレート) の作製, および基礎培地である CAMHB およびサプリメントの提供を依頼した。ただし使用した基礎培地はいずれにおいても Phase I でロット差がみられなかったため 1 ロットのみを用いた。

対象菌株としては, A) インターラボ試験用 40 株 (発育良好 20 株, 発育不良 20 株 BLNAR,  $\beta$ -lactamase non-producing, ampicillin-susceptible [BLNAS],  $\beta$ -lactamase producing, ampicillin-resistant [BLPAR] を含む), および, B) 2008 年 10 月から 2008 年 12 月の期間に各施設において連続して分離された (重複患者は除く) 新鮮分離株 30 株/施設を用いた。

Phase II 試験では, 各施設より報告された MIC 分布から, 薬剤ごとに幾何平均 MIC 値を求め, 両方法間の MIC 分布の有意差についてインターラボ試験用 40 株, 各施設における新鮮分離株に対し検討した。また Phase I 同様に

MIC 分布の管理幅(最大と最小)を設け、管理幅を5%以上越えた MIC 値は評価対象から除外した。またある施設のある薬剤の MIC 分布が施設全体から大きく外れていた場合、Phase I と同じ基準でその施設のその薬剤の MIC 値はすべて除外した。

## 2) 発育支持能の比較

A) インターラボ試験用 40 株を対象に以下の方法で行った。各施設の実施担当者による発育性の報告結果を検討した。B) インターラボ試験用 40 株について *ftsI* 遺伝子の変異のパターンおよび TEM 型遺伝子の有無に基づき、BLNAR, Low-BLNAR, BLNAS に分類し、24 時間、48 時間インキュベーション後の 600 nmOD 値測定(三菱化学メディエンス化学療法研究室にて実施)にて評価した。遺伝子検索はインフルエンザ桿菌遺伝子検出試薬キット(湧永製薬, 大阪)を用い、キット添付の取扱い説明書に従って耐性遺伝子の検索を実施した。Lys-526 変異のみを有する軽度耐性菌は Low-BLNAR として判定した。TEM 型遺伝子および解析した耐性遺伝子のいずれをも有しない株は感性株(BLNAS)として判定した。

## 3) 統計処理

Excel 2007 付属の Student-t 検定(片側)にて行い、有意水準は5%とした。

## 4) 測定施設

長崎大学附属病院検査部  
 神戸大医学部附属病院検査部  
 天理よろづ相談所病院  
 藤田学園保健衛生大学病院臨床微生物検査室  
 順天堂大学医学部附属病院臨床検査部  
 札幌医科大学附属病院検査部  
 三菱化学メディエンス化学療法研究室

# 結 果

## 1. Phase I 試験

*H. influenzae* ATCC 49247, ATCC 49266 に対する Lot. A, B, C の各薬剤における参加協力施設全体の幾何平均 MIC 値の成績を表 2 に示した。*H. influenzae* ATCC 49247 に対するアジスロマイシンの MIC 値は CLSI 法においてやや低かった例を除き、ATCC 株の成績は、ほぼ同等であった。日化療法, CLSI 法のいずれにおいてもそれぞれの基礎培地にロット間の差は認められなかった。

表 2. 培地ロット (A, B, C) ごとの各施設の幾何平均 MIC 値—日本化学療法学会法培地と CLSI 法培地の比較—

菌株	抗菌薬	$\mu\text{g/mL}$							
		日化療法				CLSI 法			
		培地ロット				培地ロット			
A	B	C	Ave.	A	B	C	Ave.		
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	ABPC	4.7	4.6	4.7	4.7	4.7	4.3	4.5	4.5
	ACV	4.2/2.1	4.1/2.0	4.1/2.0	4.1/2.0	4.4/2.2	4.4/2.2	4.4/2.2	4.4/2.2
	T/S	0.10/1.97	0.09/1.69	0.10/1.91	0.10/1.85	0.10/1.98	0.10/1.86	0.11/2.13	0.10/1.99
	CTR	0.12	0.11	0.12	0.11	0.12	0.11	0.12	0.11
	AZM	0.96	1.01	1.09	1.02	0.73	0.69	0.78	0.73
	CPFX	0.023	0.024	0.024	0.024	0.02	0.024	0.023	0.022
<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	MEPM	0.039	0.039	0.039	0.039	0.038	0.037	0.036	0.037
	CFDN	0.18	0.17	0.19	0.18	0.16	0.16	0.15	0.16

## 2. Phase II 試験

### 1) MIC 測定におよぼす影響

#### (A) インターラボ試験用 40 株に対する MIC 試験

日化療法および CLSI 法培地プレートでのインターラボ試験用 40 株に対する各薬剤の施設別平均 MIC 値分布を表 3 に示した。

$\beta$ -ラクタム系薬において、日化療法培地での幾何平均 MIC 値は CLSI 法培地を用いた場合に比較して有意に高い値が示された。日化療法培地と CLSI 法培地の全施設の幾何平均 MIC 値比が最も高かったのはアンピシリンにおける 1.86 ( $p=0.0064$ ) であり、最も低かったのはセフトリアキソンの 1.22 ( $p=0.0123$ ) であった。アジスロマイシンにお

いても、 $\beta$ -ラクタム系薬と同様に日化療法培地での幾何平均 MIC 値が CLSI 法培地に比べ有意に高く、MIC 値比は 1.60 ( $p=0.0003$ ) であった。シプロフロキサシンにおいても日化療法で有意に高いが ( $p=0.0034$ )、MIC 値比は 1.21 とそれほど大きくはなかった。

しかし ST 合剤では逆に CLSI 法培地での幾何平均 MIC 値が有意に高く ( $p=0.0004$ )、MIC 値比は 0.64 と、他抗菌薬とは逆の結果であった。

表 3. Phase II インターラボ試験用 40 株に対する各抗菌薬の幾何平均 MIC 値—日本化学療法学会法培地と CLSI 法培地の比較—

施設	抗菌薬							
	ABPC		ACV		CFDN		CTX	
	日化療法	CLSI 法	日化療法	CLSI 法	日化療法	CLSI 法	日化療法	CLSI 法
A	1.037	0.931	1.268/0.634	1.195/0.597	1.440	0.822	0.057	0.054
B	1.078	0.614	1.375/0.688	1.059/0.53	1.350	0.529	0.091	0.066
C	1.704	1.091	2.147/1.074	1.390/0.695	1.704	1.000	0.073	0.059
D	0.908	0.245	1.748/0.874	0.837/0.418	1.335	0.857	0.092	0.081
E	1.245	1.116	1.826/0.913	1.494/0.747	1.578	1.157	0.066	0.059
F	1.856	0.981	2.038/1.019	1.400/0.700	1.859	1.059	0.134	0.098
t 検定 ( $p$ 値)	0.0064		0.0056		<0.0001		0.0123	
日化療法/CLSI 法 (全施設平均)	1.86		1.45		1.78		1.22	

施設	抗菌薬							
	MEPM		AZM		T/S		CPFX	
	日化療法	CLSI 法	日化療法	CLSI 法	日化療法	CLSI 法	日化療法	CLSI 法
A	0.076	0.067	1.037	0.689	0.154/2.934	0.261/4.951	0.014	0.013
B	0.093	0.046	1.038	0.626	0.114/2.238	0.181/3.443	0.015	0.012
C	0.147	0.085	1.216	0.707	0.158/3.010	0.255/4.840	0.023	0.019
D	0.123	0.064	0.926	0.686	0.105/2.000	0.161/3.055	0.017	0.011
E	0.127	0.088	0.864	0.538	0.103/1.964	0.192/3.651	0.022	0.021
F	0.178	0.094	1.339	0.764	0.154/2.934	0.195/3.703	0.018	0.014
t 検定 ( $p$ 値)	0.0023		0.0003		0.0004		0.0034	
日化療法/CLSI 法 (全施設平均)	1.69		1.60		0.64		1.21	

#### (B) 各施設分離株に対する MIC 試験

成績を表 4 に示した。インターラボ試験用株に比べて顕著ではないが、 $\beta$ -ラクタム系薬において、日化療法での平均 MIC 値が CLSI 法に比べ高く出る傾向が示された。アンピシリンおよびセフジニルにおいては有意差を持って日化療法での平均 MIC 値が高く示された ( $p=0.0124$  および  $0.0420$ )。

アジスロマイシンでは共通株同様に有意差を持って日化療法での平均 MIC 値が高く示された ( $p=0.0025$ ) 一方、ST 合剤ではインターラボ試験の結果と同様に、CLSI 法で平均 MIC 値が有意に高い結果であった ( $p=0.0030$ )。シプロフロキサシンでは有意差はみられなかったものの、日化療法における平均 MIC はやや高かった。

表4. Phase II施設株に対する各抗菌薬の幾何平均 MIC 値—日本化学療法学会法培地と CLSI 法培地の比較—

施設 (株数)	抗菌薬							
	ABPC		ACV		CFDN		CTRX	
	日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法
A (30)	1.466	1.466	1.332/0.666	1.652/0.826	1.182	1.270	0.015	0.015
B (30)	1.823	1.203	1.662/0.831	1.447/0.724	1.320	1.023	0.031	0.024
C (30)	2.895	1.587	2.895/1.447	1.447/0.724	1.866	1.203	0.029	0.021
D (25)	2.173	1.840	1.647/0.824	1.474/0.737	1.474	1.434	0.019	0.018
E (32)	2.520	1.414	1.682/0.841	1.682/0.841	1.231	1.164	0.021	0.018
F (150)	1.741	1.397	1.741/0.871	1.391/0.695	1.598	1.211	0.016	0.015
t 検定 (p 値)	0.0124		0.1004		0.0420		0.2548	
日治療法/CLSI 法 (全施設平均)	1.42		1.43		1.20		1.15	

施設 (株数)	抗菌薬							
	MEPM		AZM		T/S		CPFX	
	日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法
A (30)	0.096	0.119	1.074	0.699	0.066/1.246	0.206/3.923	0.015	0.015
B (30)	0.119	0.082	1.000	0.561	0.072/1.364	0.181/3.437	0.031	0.024
C (30)	0.177	0.119	1.382	0.776	0.030/1.134	0.104/1.974	0.029	0.021
D (25)	0.122	0.100	0.717	0.46	0.042/0.805	0.095/1.780	0.019	0.018
E (32)	0.203	0.107	0.912	0.635	0.119/2.268	0.166/3.147	0.021	0.018
F (150)	0.101	0.099	0.846	0.572	1.029/2.058	1.749/3.499	0.016	0.015
t 検定 (p 値)	0.0587		0.0025		0.0030		0.1530	
日治療法/CLSI 法 (全施設平均)	1.31		1.60		0.51		1.16	

## 2) 発育性

## (A) 各施設からの報告による発育性の比較

インターラボ試験用 40 株に対する発育性の各施設からの報告を表 5 にまとめた。6 施設の平均では、発育良好と判定された株は日治療法で 35.83 株、CLSI 法で 31.83 株、また発育不良 well ありと判定された株数は、日治療法で 3.17 株、CLSI 法で 7.00 株、非発育株は日治療法で 2.67 株、CLSI 法で 2.83 株であり、有意差は認められなかったものの、日治療法培地で発育性が優れている傾向がみられた。

表5. Phase II インターラボ試験用 40 株における各施設での化学療法学会法培地および CLSI 法培地上での発育性比較

施設	発育性					
	発育良好		発育不良 well あり		非発育	
	日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法
A	38	39	0	0	2	1
B	37	37	0	0	3	3
C	37	28	0	9	3	3
D	35	34	1	2	4	4
E	36	33	12	13	2	4
F	32	20	6	18	2	2
平均	35.83	31.83	3.17	7.00	2.67	2.83
t 検定 (p 値)	0.1124		0.1626		0.3906	

## (B) OD 値測定による発育性の比較

インターラボ試験用 40 株に対する OD 値による菌数測定推移を、日治療法と CLSI 法にて比較した成績を表 6 (全体) および表 7 (遺伝子型分類別) に示した。培養 24 時間における日治療法の OD 値は、CLSI 法のものと比較し有意

表 6. 配布共通 40 株における 24 および 48 時間培養後 OD 値測定による発育支持能の比較

菌株	24 時間		48 時間	
	日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法
Hi2-1	0.608	0.239	0.787	0.126
Hi2-2	0.816	0.092	1.035	0.025
Hi2-3	0.146	0.089	0.642	0.03
Hi2-4	0.246	0.175	0.580	0.136
Hi2-5	0.343	0.146	0.500	0.075
Hi2-6	0.248	0.135	0.395	0.150
Hi2-7	0.196	0.086	0.297	0.100
Hi2-8	0.024	0.004	0.125	0.000
Hi2-9	0.802	0.124	1.134	0.044
Hi2-10	0.151	0.109	0.322	0.053
Hi2-11	0.066	0.132	0.412	0.081
Hi2-12	0.491	0.050	0.614	0.011
Hi2-13	0.176	0.101	1.072	0.031
Hi2-14	0.028	0.007	0.114	0.000
Hi2-15	0.173	0.116	0.878	0.075
Hi2-16	0.782	0.153	1.027	0.122
Hi2-17	0.782	0.128	0.617	0.073
Hi2-18	0.149	0.172	0.474	0.125
Hi2-19	0.264	0.138	1.113	0.086
Hi2-20	0.189	0.139	1.027	0.080
Hi2-21	0.818	0.378	0.707	0.247
Hi2-22	0.182	0.085	1.106	0.044
Hi2-23	0.183	0.130	0.939	0.110
Hi2-24	0.215	0.274	1.055	0.300
Hi2-25	0.127	0.115	0.896	0.081
Hi2-26	0.148	0.105	0.282	0.055
Hi2-27	0.173	0.212	0.350	0.196
Hi2-28	0.179	0.128	1.078	0.061
Hi2-29	0.247	0.190	0.857	0.206
Hi2-30	0.116	0.025	0.163	0.009
Hi2-31	0.146	0.135	0.345	0.096
Hi2-32	0.158	0.199	0.353	0.177
Hi2-33	0.461	0.493	1.068	0.548
Hi2-34	0.178	0.121	0.404	0.107
Hi2-35	0.134	0.165	0.293	0.099
Hi2-36	0.592	0.157	0.733	0.109
Hi2-37	0.482	0.125	0.714	0.080
Hi2-38	0.174	0.220	0.510	0.202
Hi2-39	0.187	0.119	1.005	0.079
Hi2-40	0.242	0.152	0.600	0.114
平均	0.296	0.147	0.666	0.109
SD	0.234	0.088	0.317	0.096
t 検定 ( <i>p</i> 値)	< 0.0001		< 0.0001	

表 7-1. 配布共通 40 株における 24 および 48 時間培養後 OD 値測定による発育支持能の比較 (遺伝子型別)

遺伝子型	菌株	24 時間		48 時間	
		日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法
BLNAR	Hi2-1	0.608	0.239	0.787	0.126
	Hi2-2	0.816	0.092	1.035	0.025
	Hi2-7	0.196	0.086	0.297	0.100
	Hi2-9	0.802	0.124	1.134	0.044
	Hi2-10	0.151	0.109	0.322	0.053
	Hi2-11	0.066	0.132	0.412	0.081
	Hi2-13	0.176	0.101	1.072	0.031
	Hi2-15	0.173	0.116	0.878	0.075
	Hi2-16	0.782	0.153	1.027	0.122
	Hi2-17	0.782	0.128	0.617	0.073
	Hi2-18	0.149	0.172	0.474	0.125
	Hi2-19	0.264	0.138	1.113	0.086
	Hi2-22	0.182	0.085	1.106	0.044
	Hi2-26	0.148	0.105	0.282	0.055
	Hi2-30	0.116	0.025	0.163	0.009
	Hi2-33	0.461	0.493	1.068	0.548
	Hi2-34	0.178	0.121	0.404	0.107
	Hi2-35	0.134	0.165	0.293	0.099
	Hi2-36	0.592	0.157	0.733	0.109
Hi2-38	0.174	0.220	0.510	0.202	
平均		0.348	0.148	0.686	0.106
SD		0.266	0.092	0.336	0.11
t 検定 ( <i>p</i> 値)		0.0020		< 0.0001	

表 7-2

遺伝子型	菌株	24 時間		48 時間	
		日治療法	CLSI 法	日治療法	CLSI 法
Low-BLNAR	Hi2-8	0.024	0.004	0.125	0.000
	Hi2-12	0.491	0.050	0.614	0.011
	Hi2-14	0.028	0.007	0.114	0.000
	Hi2-20	0.189	0.139	1.027	0.080
	Hi2-21	0.818	0.378	0.707	0.247
	Hi2-31	0.146	0.135	0.345	0.096
	Hi2-39	0.187	0.119	1.005	0.079
	Hi2-40	0.242	0.152	0.600	0.114
平均		0.266	0.123	0.567	0.078
SD		0.249	0.111	0.331	0.077
t 検定 ( <i>p</i> 値)		0.0332		0.0019	

に高く ( $p < 0.0001$ ), 48 時間培養ではその差は顕著となった ( $p < 0.0001$ )。遺伝子型分類別に評価した場合, BLNAS の 24 時間測定では有意差はなかったものの, 同様の傾向が認められた。

表 7-3

遺伝子型	菌株	24 時間		48 時間	
		日化療法	CLSI 法	日化療法	CLSI 法
BLNAS	Hi2-3	0.146	0.089	0.642	0.030
	Hi2-4	0.246	0.175	0.580	0.136
	Hi2-6	0.248	0.135	0.395	0.150
	Hi2-23	0.183	0.130	0.939	0.110
	Hi2-24	0.215	0.274	1.055	0.300
	Hi2-25	0.127	0.115	0.896	0.081
	Hi2-27	0.173	0.212	0.350	0.196
	Hi2-28	0.179	0.128	1.078	0.061
	Hi2-29	0.247	0.190	0.857	0.206
	Hi2-32	0.158	0.199	0.353	0.177
	Hi2-37	0.482	0.125	0.714	0.00
	平均		0.219	0.161	0.714
SD		0.093	0.051	0.260	0.074
t 検定 ( <i>p</i> 値)		0.0613		<0.0001	

表 7-4

遺伝子型	菌株	24 時間		48 時間	
		日化療法	CLSI 法	日化療法	CLSI 法
BLPAR	Hi2-5	0.343	0.146	0.500	0.075

### 考 察

2008 年月上旬に、臨床検査室あるいは研究所に勤務する日本化学療法学会会員および日本臨床微生物学会会員へ、微量液体希釈法の問題点についてのアンケートを実施した。1,348 名中 464 名の会員より回答があった。回答ありの 76% の会員が臨床検査室勤務、2.6% が研究所勤務であった。また 80% が自施設で微量液体希釈法を実施し、そのうちの 76% が CLSI 法にて測定しているとの回答であった。問題点についてはさまざま挙げられていたが、最も多かったのが CLSI 法の HTM 培地におけるインフルエンザ桿菌の判定が難しいとの回答であった。

従来、インフルエンザ桿菌の抗菌薬感受性測定に関しては、動物血液あるいは血液成分の培地への添加が、感受性測定結果に不明瞭さをもたらすことが問題となっていた<sup>1)</sup>。Jorgensen らは、この問題を解決するため、カチオン調製 MHB に、ヘマチン 15 mg/L、NAD 15 mg/L、酵母エキス 5 g/L を添加する HTM 培地を推奨し<sup>2)</sup>、1990 年に NCCLS 小委員会において採用され現在にいたっている。しかしその後、HTM 培地に関して発育不良や、MHB のロットによる影響が大きいなどの問題点も多くみられ<sup>3)</sup>、臨床検査の場では HTM 培地の使用は敬遠される傾向にあった。実際に米国において HTM 培地を使用している施設は 55% だったとのアンケート調査もある (Ronald N. Jones 博士からの私信)。また米国で問題となっているインフルエンザ桿菌のほとんどが MIC 値の高い  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株であり、多くの施設において、略痰分離菌などの非侵襲性株については、 $\beta$ -ラクタマーゼの産生性を確認するのみで感受性を測定していないとの実情もある。

このような背景から日本化学療法学会微量液体希釈法では基本的には CLSI 法を踏襲しているが、インフルエンザ桿菌に対しては、発育性の問題を重視して CLSI 法 HTM 培地のヘマチンの代わりにサプリメントとして馬溶血液を 2~5% 添加した培地を推奨し、現在にいたっている (抗菌薬感受性測定法委員会報告, Chemotherapy, 1993,41:183-189)。以上の経緯により、微量液体希釈法改訂委員会では、インフルエンザ桿菌に対する測定培地にターゲットを絞り、日化療法のインフルエンザ桿菌測定培地の再評価を実施した。

Phase I 試験においては使用する培地およびサプリメントのロット間差を、CLSI 法に定める精度管理株 2 種類を用いて評価した。それぞれ 3 ロットを使用した。今回の検討ではいずれの方法においても基礎培地のロットによる影響は認められなかったため (表 2)、Phase II 試験に移行した。

インターラボ試験用 40 株、各施設新鮮分離株を使用した Phase II 試験から明らかになったことは、一つは  $\beta$ -ラクタム系薬、アジスロマイシンおよびシプロフロキサシンにおいて日化療法培地で MIC 値が有意に高い、あるいはその傾向が示されたことである。

Barryらは、液体希釈法、寒天平板希釈法、E-test法、ディスク法を用い、HTM培地と他培地によるインフルエンザ桿菌のアンピシリン感受性測定比較研究を実施した。その結果、HTM培地に比べ、馬溶血液+NAD添加、チョコレート寒天、Fildes消化血液培地においてMIC値の上昇、あるいは阻止円の縮小がみられることを報告した<sup>3)</sup>。この結果について、著者らは動物血液あるいは成分の添加した培地におけるインフルエンザ桿菌の良好な発育性に要因があると考察している<sup>4)</sup>。

Phase II試験においてMIC測定時の発育性に関し、肉眼的判定の評価がなされ、各施設の実施担当者からの報告をまとめた結果では「日化療法培地での発育性がCLSI法HTM培地より良好である」傾向が示された。しかし統計学的な有意差は得られなかった。インターラボ試験用40株においてgenotypeで分類されたBLNAS, BLNAR(遺伝子型別ではさらにBLNARおよびlow-BLNARに細分類)、およびBLPARのそれぞれの日化療法培地およびHTM培地における発育性を24時間、48時間培養後の濁度を吸光度測定により比較した成績では、24時間後で日化療法が有意差を持ち濁度が高く、48時間後ではその差はより顕著となった(表6, 7)。Phase II試験におけるMIC判定で、発育性の差が傾向のみで有意差が得られなかったことは、MIC測定が20~24時間の視認判定であり、24時間での濁度の差が明確ではあるが、顕著ではなかったことが反映しているのかもしれない。いずれにしる通常20~24時間で、OD0.2を発育判定ラインとすれば、CLSI法ではそれを下回るグループが多く、日化療法では半数近くが上回っており、発育性においては明確に日化療法が優れていると結論づけられた。

一方ST合剤においては、 $\beta$ -ラクタムなどとは逆に、CLSI法のHTM培地でのMIC値が有意に高い結果が示された。成績には示さなかったが、Phase Iで使用したQC株*H. influenzae* ATCC 49766株のST合剤でも幾何平均が日化療法で0.04/0.76  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CLSI法で0.19/3.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ と2管以上CLSI法の値が高い結果であった。Jorgensenらは、5%馬溶血液添加ミュラーヒントンプロスにおいてサルファ剤の平均MIC値が、HTM培地に比べ小さくなることを示した<sup>2)</sup>。サルファ剤は、ペプトンなど培地成分による拮抗作用を受け、ペプトンを含まないミュラーヒントンプロスにおいても拮抗作用のあることは、日本化学療法学会の「ST合剤研究会 MIC測定法のための小委員会」にて報告され、馬溶血液の添加により、培地の拮抗作用が中和されることが明らかにされている(Chemotherapy. 1973;21:67-75)。

日本と米国ではインフルエンザ桿菌感染症に対して使用する抗菌薬が異なり、米国ではST合剤の使用頻度が高く、日本ではほとんど使用されていない。そのため化学療法学会法でST合剤のMIC値が小さくなる結果については、この点を注意事項として付記することにより、臨床の現場で特に問題とならないと結論づけられる。

一方、日本では臨床分離アンピシリン耐性株のなかにアンピシリンのMIC値がそれほど高くはないBLNAR株の占める割合が高いのに対し、米国ではBLNAR株の頻度が低くアンピシリンのMIC値が高いBLPAR株の分離頻度が高い。この点では化学療法学会法でアンピシリンのMIC値が高くでる結果は、むしろBLNAR株を検出するうえで適しているとも考えられる。

日化療法のほうが、BLNAR株をより正確に検出できれば、日化療法培地の使用は、BLNAR株の分離率が高い日本で有用と考えられる。BLNARに対するアンピシリンのMIC値は $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 程度とそれほど高くなく、遺伝子変異によりlow-BLNAR株と判定された菌株ではMICが $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ とCLSIのカテゴリー上、中等度耐性以下と判定される株も多い。そのためCLSI法よりもMIC値がやや高く出る日化療法で、BLNAR株の検出率が高まり、偽陰性結果が減少することが予測され、臨床的にも有用と考えられた。

結論として本委員会では、インフルエンザ桿菌での日化療法培地とCLSI法培地との比較検討結果から、日本化学療法学会、微量液体希釈法によるMIC測定法の再評価という形で、現行の方法に下記注釈\*を加え、委員会報告を作成し活動を終了することとした。

## 文 献

- 1) Bergeron M G, Simard P, Provencher P: Influence of growth medium and supplement on growth of *Haemophilus influenzae* and on antibacterial activity of several antibiotics. J Clin Microbiol 1987; 25: 650-5
- 2) Jorgensen J H, Redding J S, Maher L A, Howell A W: Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 1987; 25: 2105-13
- 3) Barry A L, Packer R R: Performance of *Haemophilus* Test Media prepared with 12 different lots of Mueller-Hinton agar from four manufacturers. J Clin Microbiol 1992; 30: 1145-7
- 4) Barry A L, Fuchs P C, Brown S D: Identification of  $\beta$ -lactamase-negative, ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* with four methods and eight media. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1585-99