

MIC2000システムを利用した液体培地希釈法 と寒天平板希釈法における最小発育阻止濃度 (MIC) 測定値の比較検討

金子 通治 金丸 佳郎 春日 徳彦
三木 礼子* 長沼 益美* 佐野 人美*

(細菌の薬剤感受性を測定することの意義は、次の二点にある。(1). 臨床から分離された細菌や畜産業、水産業の分野において分離された細菌が、どのような薬剤に感受性であるかを決め、治療や予防に有効な薬剤を選択すること。(2). 上記(1)の病院や施設等において分離された細菌の薬剤感受性、耐性のデータを集計、蓄積し、その施設における耐性菌の疫学的状況を把握すること。その結果、得られた疫学的状況を基礎とし、それぞれの施設等における種々の対策、たとえば防疫対策をたてることが可能となる¹⁾。

この薬剤感受性を測定する方法として、寒天平板希釈法(以下、平板法)、液体培地希釈法(以下、液体法)とディスク法がある。平板法、液体法は、寒天、液体培地に薬剤の倍々希釈系列を加え、それに試験菌を接種してその菌の発育を阻止する薬剤の最小濃度、つまり最小発育阻止濃度(MIC: minimum inhibitory concentration)を測定するのである。ディスク法は、寒天平板に試験菌を接種し一定濃度の薬剤を含有したディスクを置いて拡散した薬剤が菌の発育を阻止した結果、生じた阻止円の直径を測定する方法であり、一濃度法と三濃度法がある。これらの方法のなかで平板法が、薬剤のMIC値を正しく測定するために最も多く利用されている方法であり、国際的にも使用されている。

最近、このMICを測定する手段として、各種の薬剤感受性測定自動機器の普及がみられ、Autobac I System (Pfizer), MS-2 System (Abbott Laboratories), MIC 2000 System (Dynatech), Auto Micobic System (Vitek System Inc.)などがそれである²⁾。

今回、われわれはそれら機器のうちMIC 2000システム(Dynatech社、液体法)を利用する機会を得た。そこで、当施設において分離されたサルモネラ 231株を対象にMIC 2000システムによる液体法と従来の平板法とで薬剤感受性試験を行ない、MIC値の比較検討を行なったので報告する。

材料および方法

1. 試験菌

対象とした試験菌のサルモネラ 231株は、1981年2月から1982年5月までの間に山梨県内において分離された株である。231株の由来別内訳は、河川水由来152、と場排水由来64、ヒト由来13およびウシ由来2株である。血清型別にみると多く分離された上位5位は、*S. typhimurium* 33株、*S. panama* 30株、*S. tennessee* 19株、*S. agona* 19株、*S. infantis* 18株の順である。全体では36血清型にも及んだ。

2. 使用薬剤と培地

使用した薬剤は、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、カナマイシン(KM)、アミノペンジルペニシリン(AB-PC)およびナリジキシン酸(NA)である。薬剤濃度はSM, TC, CP, KM, NAについては200 μ g/mlより始まる2倍希釈系列を使用して0.8 μ g/mlまでとし、AB-PCについては3,200 μ g/mlより同様に12.5 μ g/mlまでの範囲とした。

使用培地は、液体法であるMIC 2000についてはMueller Hinton Brothを使用した。平板法については、日本化学療法学会法³⁾に従い、Mueller Hinton 変法改良培地である感受性測定用ブイヨンおよび寒天培地を使用した。

3. 測定法

MIC 2000は、マイクロプレートを使用し従来の液体法を省力化、迅速化させることを目指しマイクロ化した機器である。また、MIC測定のほか腸内細菌同定も可能な自動分析機器でもある。しかし、感受性試験結果の観察は、肉眼で判定することになっている。接種菌量は、指示に従い 10^7 cells/mlとした。平板法については、日本化学療法学会の指示に従い接種菌量を 10^6 cells/mlとし、マイクロプランターによって接種後37°C、18時間培養してMICを測定した。

* 山梨県立中央病院

結 果

サルモネラ 231株の平板法での各薬剤における MIC の分布を図1～図6に示した。SMを除き、他の薬剤は6.3～50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 間のMIC値を示した株は少なく、また

NAは200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の1株を除いてすべて12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であった。各薬剤におけるサルモネラ231株の平板法とMIC2000法の両法の比較を表1に示した。平板法のMIC値で、SM、TC、CP、KM、NAについては50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を、AB-PCについては100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を示した菌

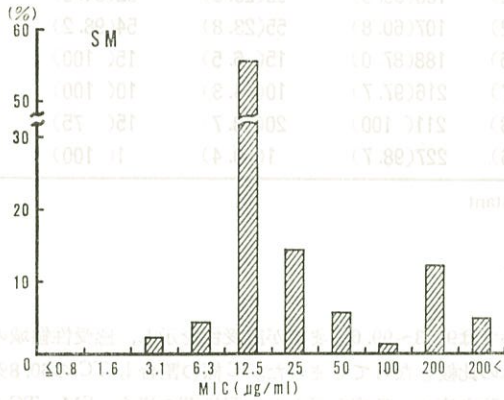


図1 サルモネラ231株のSMにおけるMICの分布

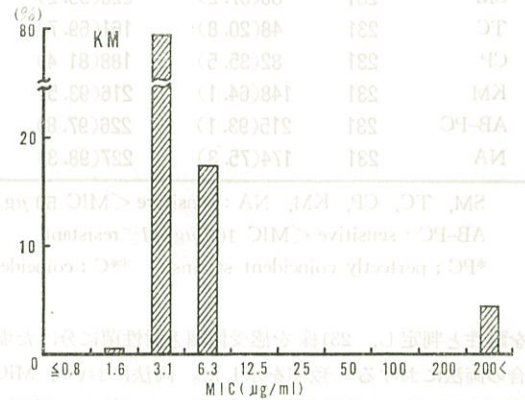


図4 サルモネラ231株のKMにおけるMICの分布

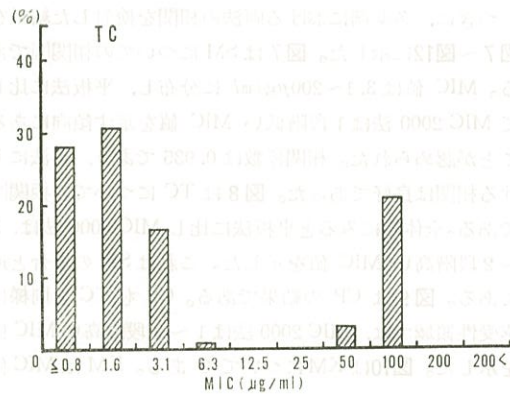


図2 サルモネラ231株のTCにおけるMICの分布

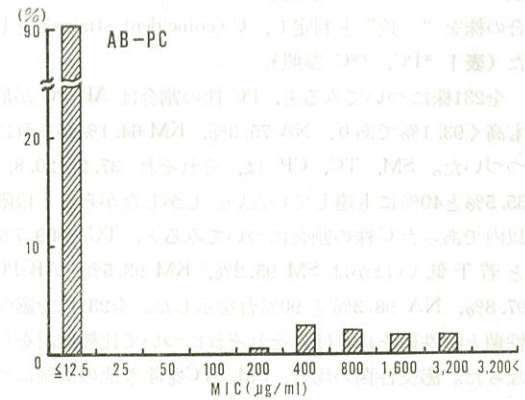


図5 サルモネラ231株のAB-PCにおけるMICの分布

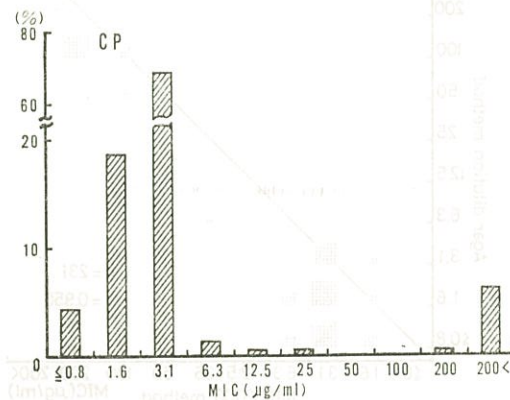


図3 サルモネラ231株のCPにおけるMICの分布

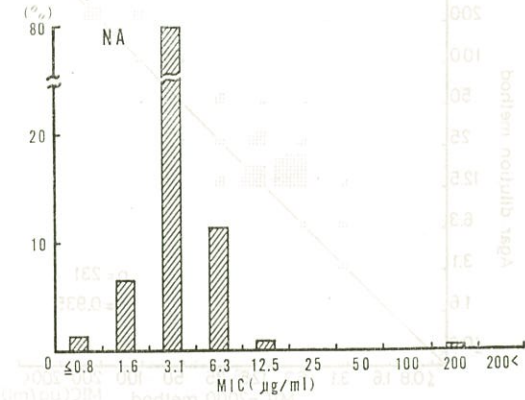


図6 サルモネラ231株のNAにおけるMICの分布

表1 Susceptibility of *Salmonella* 231 strains and rate of coincidence of MIC on different methods

Drugs	Total			Sensitive		Resistant	
	No. of strains	No. of PC* strains(%)	No. of C** strains(%)	No. of strains(%)	No. of C strains(%)	No. of strains(%)	No. of C strains(%)
SM	231	86(37.2)	220(95.2)	176(76.2)	168(95.5)	55(23.8)	52(94.5)
TC	231	48(20.8)	161(69.7)	176(76.2)	107(60.8)	55(23.8)	54(98.2)
CP	231	82(35.5)	188(81.4)	216(93.5)	188(87.0)	15(6.5)	15(100)
KM	231	148(64.1)	216(93.5)	221(95.7)	216(97.7)	10(4.3)	10(100)
AB-PC	231	215(93.1)	226(97.8)	211(91.3)	211(100)	20(8.7)	15(75)
NA	231	174(75.3)	227(98.3)	230(99.6)	227(98.7)	1(0.4)	1(100)

SM, TC, CP, KM, NA : sensitive <MIC 50 µg/ml ≤ resistant

AB-PC : sensitive <MIC 100 µg/ml ≤ resistant

*PC : perfectly coincident strains **C : coincident strains

を耐性と判定し、231株を感受性菌と耐性菌に分けた場合の両法における一致率を示した。両法においてMIC値が全く一致した株をPC (perfectly coincident strains) とした。また、平板法のMIC値を基準とし、MIC 2000法でのMIC値が薬剤希釈系列±1段階以内であった場合の株を“一致”と判定し、C (coincident strains) とした(表1 *PC, **C 参照)。

全231株についてみると、PC株の割合はAB-PCが最も高く93.1%であり、NA 75.3%、KM 64.1%がこれにつづいた。SM, TC, CPは、それぞれ37.2、20.8、35.5%と40%にも達していない。しかしながら±1段階以内であったC株の割合についてみると、TCが69.7%と若干低いほかはSM 95.2%、KM 93.5%、AB-PC 97.8%、NA 98.3%と90%台を示した。全231株を感受性菌と耐性菌に分け、それぞれについて比較検討を行った。感受性菌の場合、SM, TCを除き他の薬剤につ

いては91.3~99.6%までが感受性を示し、感受性領域のみの比較となってしまった。C株の割合もTCの60.8%を除き高い一致率を示した。耐性菌の場合、SM, TCともに55株、23.8%を占め、C株の割合もSM 94.5%、TC 98.2%とともに高い一致率であった。

つぎに、各薬剤における両法の相関を検討した結果を図7~図12に示した。図7はSMについての相関図である。MIC値は3.1~200µg/mlに分布し、平板法に比してMIC 2000法は1段階低いMIC値を示す傾向にあることが認められた。相関係数は0.935であり、両法における相関は良好であった。図8はTCについての相関図である。全体的にみると平板法に比しMIC 2000法は、1~2段階高いMIC値を示した。これはSMの場合と逆である。図9はCPの結果である。CPもTCと同様に感受性領域では、MIC 2000法は1~2段階高いMIC値を示した。図10はKMについてである。KMはMIC値

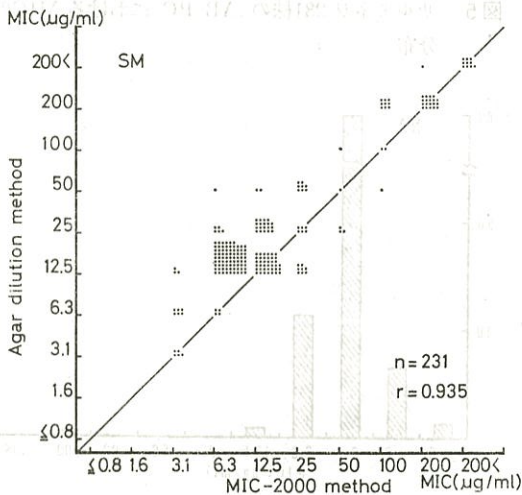


図7 SMについての両法における相関図

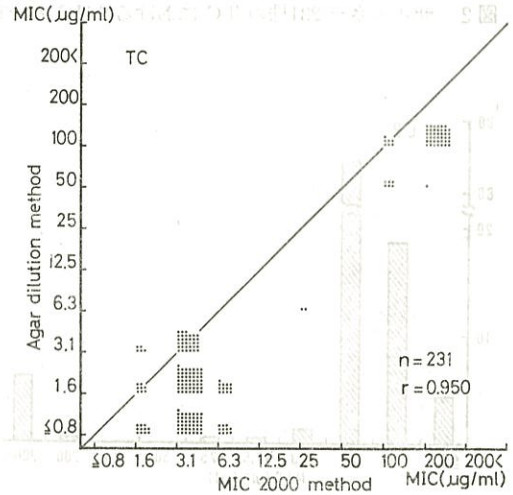


図8 TCについての両法における相関図

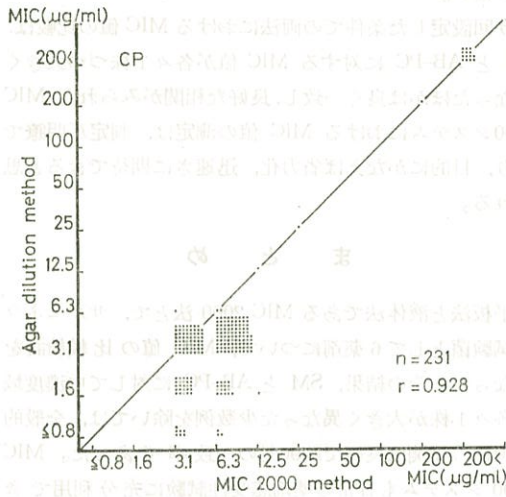


図9 CP についての両法における相関図

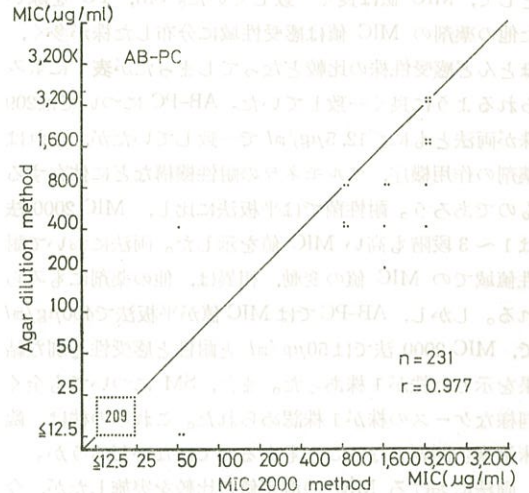


図11 AB-PC についての両法における相関図

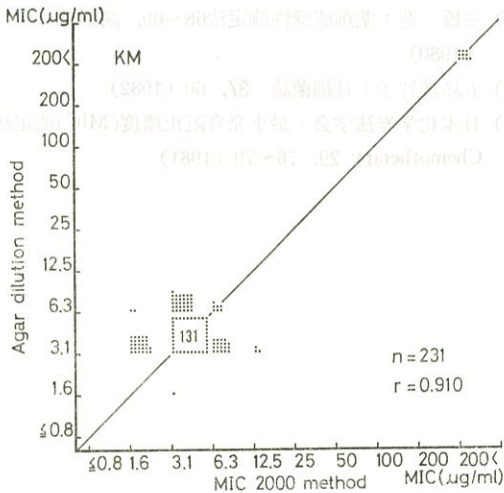


図10 KM についての両法における相関図

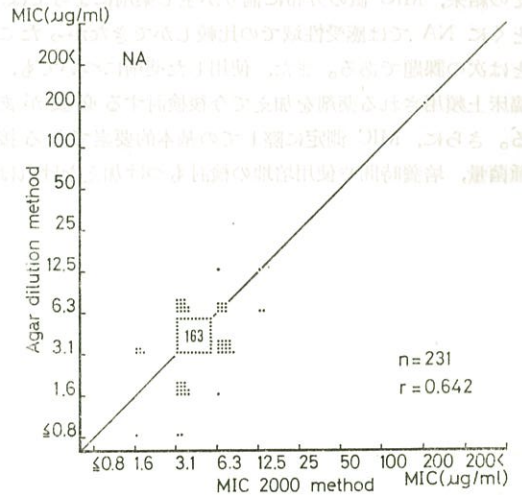


図12 NA についての両法における相関図

3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を中心に前後の希釈段階の MIC 値に集中したが、相関係数は 0.910 であった。TC、CP と同様に中濃度域の MIC 値をもつ株を試験菌として使用してみなければならないであろう。図11は AB-PC である。 $\leq 12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の MIC 値は両法で完全に一致していたが、耐性菌は全体として MIC 2000法の方が高い MIC 値を示す傾向にあった。希釈段階が3段階も異なる株が3株もあり、そのうちの1株は平板法の MIC 値が $400\mu\text{g}/\text{ml}$ であるのに対し、MIC 2000法では $50\mu\text{g}/\text{ml}$ と耐性と感受性に分かれてしまう結果となった。図12は NA である。NA は耐性菌が1株しかなく感受性域の MIC 値の比較となってしまった。3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MIC 値を中心に両法で1~2段階異なったが、よく一致していた。MIC 値の高い株が1株しかなかったため、分布が適当でなく

相関係数は 0.642 と低い数値を示す結果となった。

表1と各薬剤の相関図(図7~図12)を比較すると、 ± 1 段階以内のC株の占める率と相関係数は、必ずしも一致しなかった。これは、サルモネラに対する各薬剤の MIC 値の偏りによるものと考えられる。

平板法と MIC 2000法を ± 1 段階以内のC株の占める率で比較してみると、TC が約70%のほかは81.4~98.3%とよく一致していた。相関係数も NA が0.642のほかは、SM 0.935、TC 0.950、CP 0.928、KM 0.910、AB-PC 0.977と両法における相関は良好であった。

考 察

MIC 値の測定を従来の平板法と、液体法である MIC 2000法とでサルモネラ 231株を用いて比較したが、全体

として、MIC 値は良く一致していた。SM、TC を除いた他の薬剤の MIC 値は感受性域に分布した株が多く、ほとんど感受性株の比較となってしまったが表 1 にみられるように良く一致していた。AB-PC については 209 株が両法ともに $\leq 12.5 \mu\text{g/ml}$ で一致していたが、これは薬剤の作用機序、サルモネラの耐性機構などに依存するものであろう。耐性菌では平板法に比し、MIC 2000 法は 1~3 段階も高い MIC 値を示した。両法において耐性値域での MIC 値の変動、相異は、他の薬剤にもみられる。しかし、AB-PC では MIC 値が平板法で $400 \mu\text{g/ml}$ で、MIC 2000 法では $50 \mu\text{g/ml}$ と耐性と感受性と別な結果を示した株が 1 株あった。また、SM についても全く同様なケースの株が 1 株認められた。これらの株は、臨床治療上問題となることもあるのではないだろうか。

両法における MIC の測定値の比較を実施したが、今回用いた試験菌であるサルモネラは、河川水由来、と場排水由来株が 93.5% を占めたためか感受性株が多かった。その結果、MIC 値の分布に偏りが生じ薬剤によっては、とくに NA では感受性域での比較しかなかったことは次の課題である。また、使用した薬剤についても、臨床上前用される薬剤を加えて今後検討する必要がある。さらに、MIC 測定に際しての基本的要素である接種菌量、培養時間や使用培地の検討もつけ加えなければ

ならない。

今回設定した条件での両法における MIC 値の比較は、SM と AB-PC に対する MIC 値が各々 1 株ずつ大きく異なったほかは良く一致し、良好な相関がみられた。MIC 2000 システムにおける MIC 値の測定は、判定が明瞭であり、目的にかなえば省力化、迅速さに期待できると思われる。

ま と め

平板法と液体法である MIC 2000 法とで、サルモネラを試験菌として 6 薬剤について、MIC 値の比較検討を行なった。その結果、SM と AB-PC に対して中濃度域で各々 1 株が大きく異なった少数例を除いては、全般的に両法の相関は良好で約 90% の一致率であった。MIC 2000 システムも日常の薬剤感受性試験に充分利用できると思われた。

文 献

- 1) 三橋 進：薬剤感受性測定法 68~69, 講談社 (1980)
- 2) 五島瑛智子：日細菌誌 37, 60 (1982)
- 3) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法 Chemotherapy 29, 76~79 (1981)