

感受性測定値の実験条件による動揺について

藤井良知・紺野昌俊

東京大学医学部附属病院小石川分院小児科

古屋 暁 一

国立東京第一病院内科

小酒井 望

順天堂大学医学部臨床病理学教室

桑原 章 吾

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 42 年 11 月 20 日受付)

化学療法剤の働らきが病巣内で直接病原微生物の代謝に干渉しその増殖を停止させることを本質とする事実からみて、適当な生体外増殖環境で菌の増殖を完全に阻止するために必要な最小の薬剤濃度（すなわち最小増殖阻止濃度 minimum inhibitory concentration）の値を正確に求めることは、薬剤の体内分布の過程の追求とともに、薬剤の効果を予測するためのもつとも重要な資料として、いわば化学療法研究の基本ともいべき研究手段となつてゐる。

同一の薬剤について多くの研究者がえた MIC を相互に比較したり、異なる薬剤のそれを臨床効果とにらみあわせて検討するような場合、MIC の測定条件に差があるとそれらを同一のレベルで取扱うことができないうらみがある。そこで、わが国ではこれまで福見によつて提唱されたカンテン培地 2 倍階段希釈法（いわゆる腸菌班法）¹⁾が MIC 測定法の標準として広く一般に用いられてきたのであるが、この方法によつてもなお場合によつて動揺を防止できないことが経験されてきた。

一方、臨床的な感受性の迅速予測の方法として、現在わが国では 1 濃度法および 3 濃度法によるディスク検査法が一般に普及しており、とくに 1 濃度法では、一定の条件下でディスクの周囲の阻止円の直径をたがい直角な 2 方向から測定し、その平均値を標準曲線にあてはめて平板希釈法の MIC 値に換算する方法を標準法として採用し、この方法が研究領域にまである程度進出している状態である。

腸菌班法による MIC 測定法は現在実施されている条件下でどの程度まで動揺するものか、またディスク法による測定値はどれくらい信頼できるものか……こうした疑問はこれらの方法が化学療法の基礎および臨床面で占める比重からすれば当然くわしく検討されるべき性質のものであろうが、その大規模な検討はわが国ではまだ実

施されていない。日本化学療法学会は、これまで化学療法剤の臨床効果判定の基準の設定に努力してきたのであるが、さらにそれらのすべての成績の基本の一面を荷う感受性測定値の再現性の問題を採りあげ、1966 年のはじめから小委員会をつくつて検討を行なつてきた。

以下に 1 年半にわたつて行なわれた検討の結果をまとめて報告し、各研究機関のこの問題に対する考察の資料として提供する。

実施の方法

感受性値（希釈法およびディスク法）の再現性についての検討は、学会から一定数の菌株を各研究機関に送付し、一定の薬剤に対する希釈法およびディスク法による感受性値の報告をうけ、これを集計検討するという経過で行なわれた。なお、菌株の配布はシオノギ臨床検査室を通じ塩野義製薬株式会社により、また感受性値記録用紙その他連絡事項の配布は万有製薬株式会社によつて行なわれた。

I) 第 1 回の検討実施経過

第 1 回の検討は 1966 年 7 月から 10 月にわたつて行なわれた。

a) 試験菌株：つぎの 4 株を用いた。

No. 2 *Escherichia coli*No. 3 *Streptococcus faecalis*No. 4 *Staphylococcus aureus*No. 5 *Staphylococcus aureus*

使用菌株はいずれも東邦大学医学部微生物学教室で保存または分離したものである。なお、No. 1 株として *Shigella flexneri* を予定したのであるが、郵便法の規制により短期間の送付完了がきわめて困難であることがわかつたので、これを試験菌株から除外した。

b) 検査すべき薬剤：ペニシリン G(PC-G)、硫酸ジヒドロストレプトマイシン (SM)、硫酸カナマイシン

(KM), クロラムフェニコール (CP), 塩酸テトラサイクリン (TC) およびエリスロマイシン (EM) の6種を用いた。

c) 培地および接種条件: この検討では希釈法とディスク法による感受性値を定めることだけを条件とし, No.3 株に血液加培地を用いるよう規定した他は細かい実施条件を規制しなかつた。

しかし, 報告書には使用培地名 (乾燥培地なら製造会社名とロット番号), 希釈法では希釈段階, ディスク法では使用ディスクとそのロット番号, 被検菌の増菌培地と培養条件, 接種菌量 (増菌培地そのままを接種したかまたは希釈したか, 接種に使用した白金耳の内径, ピペットの場合は接種液量) などについて報告書への記載を依頼した。

d) 検討に参加した機関

第1回の検討に参加した研究機関は30カ所で第1表に表示してある。

II) 第2回の検討実施経過

第1回の成績をしらべた結果, 第2回の検討は実施計画を一部改めて1967年2月から5月にわたって行なわれた。すなわち, 今回はディスク感受性を求めることは依頼せず, もつぱら平板希釈法に焦点をおいた。

a) 試験菌株: つぎの5株を用いた。

No.1 *Staphylococcus aureus* (209-P 株)

No.2 *Staphylococcus aureus*

No.3 *Escherichia coli*

No.4 *Klebsiella pneumoniae*

No.5 *Pseudomonas aeruginosa*

No.2 株および No.3 株は第1回の試験菌株の No.4 ~5 株, もしくは No.2 株とは異なる株である。これらの菌株も前回同様東邦大学医学部微生物学教室から提供された。

b) 検査すべき薬剤: 前回試験した6種の薬剤のなかで動揺の少ない EM の代りにセファロリジン (CER) を加えた6種の抗生物質を用いた。

c) 実施の条件

第1回の感受性測定値の分布が希釈法についてもかなり広い範囲にわたつたことから, 第2回の実施条件はかなり細かく規定された。

i) 感受性測定用培地としてはハート・インヒュジョン・カンテンまたは感性ディスク用培地 (ニッサン), 増菌用培地としてはカゼイン・ソイ混合ペプトンブイヨンの乾燥培地製品のいずれかを使用するよう規定された。

ii) 抗生物質の培地添加量は 100~0.2 mcg/ml の間の2倍段階希釈に固定し (PC-G についても mcg/ml を用いること), 念のため薬剤溶液および感受性測定用培地平板の作製法を細かく記載した。

iii) 接種方法として, 増菌培地 18~24 時間培養を, なるべく内径 1 mm 前後の白金耳で 2 cm 程度に画線

塗布することを規定し, この平板を 18~20 時間培養後, まつたく増殖を認めない最低濃度を MIC として記載し, 1 コでも集落が発生したり, きわめてうすい菌苔が生じた場合でも増殖とみなすことを確認した。

d) 検討に参加した機関

第2回の検討に参加した研究機関は35カ所で第3表に表示してある。

検討の成績

I) 第1回の検討成績の集計

機関別検査項目のまとめは第3表に示してある。

1) 実施方法についてのまとめ

a) 培地: 感受性測定用培地として協力研究機関の半数に近い14機関がハート・インフュジョン・カンテン (栄研) を用いており, その他の会社のハート・インヒュジョン・カンテン, 感性ディスク用培地を加えると, 21機関がハート・インヒュジョン含有培地を用いている。

また増菌用ブイヨンとしては各社製のカゼ

第1表 第1回の検討に参加した研究機関

北大真下内科	慈恵大上田内科	名市大柴田外科
東大伝研内科	昭和大小児科	京府大産婦人科
東大分院小児科	東邦大微生物	関西医大大久保内科
東大吉利内科	横浜市大福島内科	大阪市大第2外科
東大泌尿器科	国立東一中検	シオノギ臨床検査室
日大石山外科	関東通信耳鼻科	岡山大皮膚科
慶大五味内科	群馬大微生物	広島大第1外科
慶大島田外科	新潟大木下内科	徳島大泌尿器科
順天大産婦人科	新潟大眼科	九州大皮膚科
順天大臨床病理	新潟大鉄道病院	熊本大河盛内科

第2表 第2回の検討に参加した研究機関

北大真下内科	慈恵大上田内科	京府大産婦人科
北大眼科	国立東一中検	関西医大大久保内科
東大伝研内科	荏原病院小児科	大阪市大塩田内科
東大分院小児科	関東通信外科	大阪市大第2外科
東大吉利内科	川崎市立病院	シオノギ臨床検査室
東大泌尿器科	横浜市大福島内科	武田薬品生物研
日大石山外科	群馬大微生物	藤沢薬品中央研
慶大五味内科	新潟大木下内科	岡山大皮膚科
慶大島田外科	広島大上村外科	日医大産婦人科
新潟大眼科	徳島大泌尿器科	順天大産婦人科
新潟大臨床病理	九州大皮膚科	順天大臨床病理
名市大柴田外科	熊本大河盛内科	

第3表 第1回検討における機関別検査項目のまとめ

希釈法		ディスク法		実施機関数
ブイヨン	平板	1濃度	3濃度	
	○	○	○	4
○	○	○		1
	○		○	8
	○	○		11
○			○	1
○		○	○	1
	○			1
		○		2
			○	1
3	27	18	14	30

イン・ソイ混合ペプトンブイヨンが 14 カ所を占めた。

b) 接種菌量について

使用白金耳は、1~1.5 mm 内径のもの と 2 mm 内径のものが 11 カ所ずつで大部分を占め、ピペットで接種を行なう場合は 0.05 ml を頂点として 0.1~0.03 ml の接種が大部分を占めていた。

また、参加した機関の大部分 (23 カ所) は増菌培地培

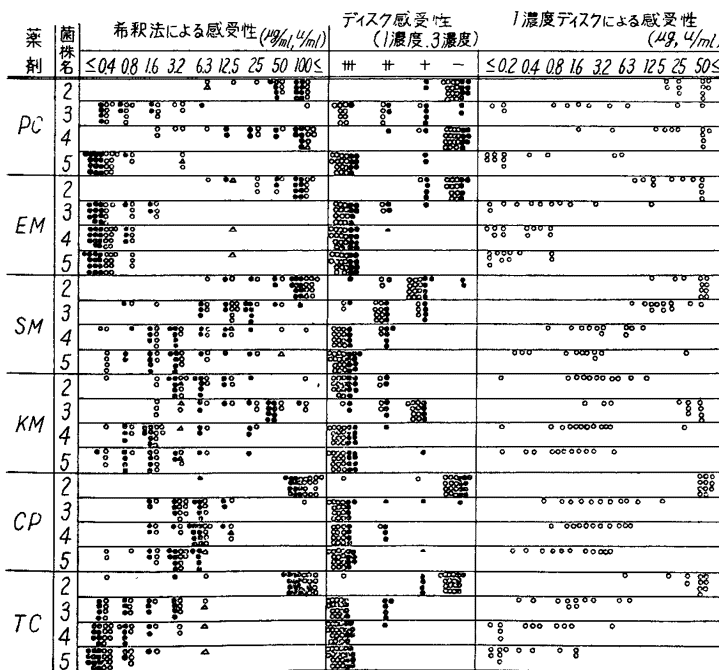
養をそのまま接種菌液として用い、5カ所は 10~10⁶ 倍の希釈液を用いた。5カ所は固形培地培養から菌液を製し、3カ所はディスク法と希釈法にそれぞれ別の菌液を使用している。

2) 希釈法による感受性値の集計

第4表の左側の部分には各薬剤、菌株別に平板希釈法による測定値が記録してある。表を全体としてみてもすぐわかるように高耐性および高感受性の部分では薬剤に関係なく成績の動揺が少ないといえる。もちろん、100 mcg/ml 以上、0.4 mcg/ml 以下についても2段階濃度をつくれればバラツキは出るであろうが、高感受性なり高耐性の判断に誤まりを起す心配はない。一般的にみても、また今回の試験株についても中等度感受性域における分布密度に乏しい EM, TC などと比較的的感受性値の動揺が少ないのはうなずけることである。

これとは逆に、SM, KM, および No. 3, No. 4 株の PC 感受性値はかなりひろい範囲に分散している。PC については、薬剤とペニシリナーゼ活性との鏡り合いを考えれば、この動揺も不可避的なものと思われるが、SM と KM については感受性値の動揺という事実は経験的にも確認されていながら、原因はまだはつきりしない。

表4表 希釈法およびディスク法による感受性値の動揺 (第1回検討成績のまとめ)



○はハート・インフュジョン・カンテン(栄研)採用
△はバレン希釈法

●は1濃度法
○は3濃度法

金沢が強調しているように²⁾、2倍段階希釈法を用いる場合、理論的にも測定値が3希釈段階に動揺することは当然であろうが、多くの菌株、薬剤についてバラツキはさらに広い。ただ、検査機関の半数に近い14機関がハート・インフュジョン・カンテン(栄研)を測定用培地として使っているところから、その成績を黒丸印で表示してみると、ある程度まで動揺の幅が狭くなっている。この成績から、測定条件をきびしく規正すれば、成績の再現性が高まることが予想された。

3) ディスク法による感受性値の集計

i) #~ - で表示した場合

第4表の中央のランには #~ - で表示した場合のディスク法による感受性値がプロットしてある。この場合も全体として平板希釈法と同様に、中等度感受性域での動揺は大きく、たとえば No. 3 株の PC, CP など -~# の全域に動揺し、SM と

第5表 第2回の検討における実験条件の整理

増菌培地	試験培地	白金耳の内径
トリプト・ソイ・ブイヨン 17 (栄研)	ハート・インヒュジョン・カンテン(栄研)	1~1.5 mm 27
トリプト・ソイ・ブイヨン(ニッサン) 11	" (ニッサン)	7 1.5~2.0 5
Trypticase-soy-broth (BBL) 6	ディスク用培地(ニッサン)	3 2.5 1
ブイヨン 1	その他	2 3.0 2
35	35	35

KM では3段階にわたるバラツキが見られる。

この表では、1濃度法による測定値を黒丸印で表示したが、成績のバラツキは全体として白丸印で表示された3濃度法測定値にくらべてやや大きいようである。

ii) 1濃度ディスク標準法による感受性値の動揺

1濃度ディスク法では阻止円の径を測定して、それから標準曲線をつかつて感受性を数値に換算する、いわゆる標準法が行なわれているので、その成績を記載した11機関の数値を集計してみた。第4表の右側のランがそれである。

この場合も、平板希釈法でのべた事実が大体あてはまるが、全体としてみると、SM や KM の一部の例を除けば、動揺の幅は平板希釈法のそれにくらべてある程度大きいようである。とくに、平板希釈法では比較的成绩が小さくまとまっている EM や CP にもかなりのバラツキが見られる点は一考を要する。

II) 第2回の検討成績の集計

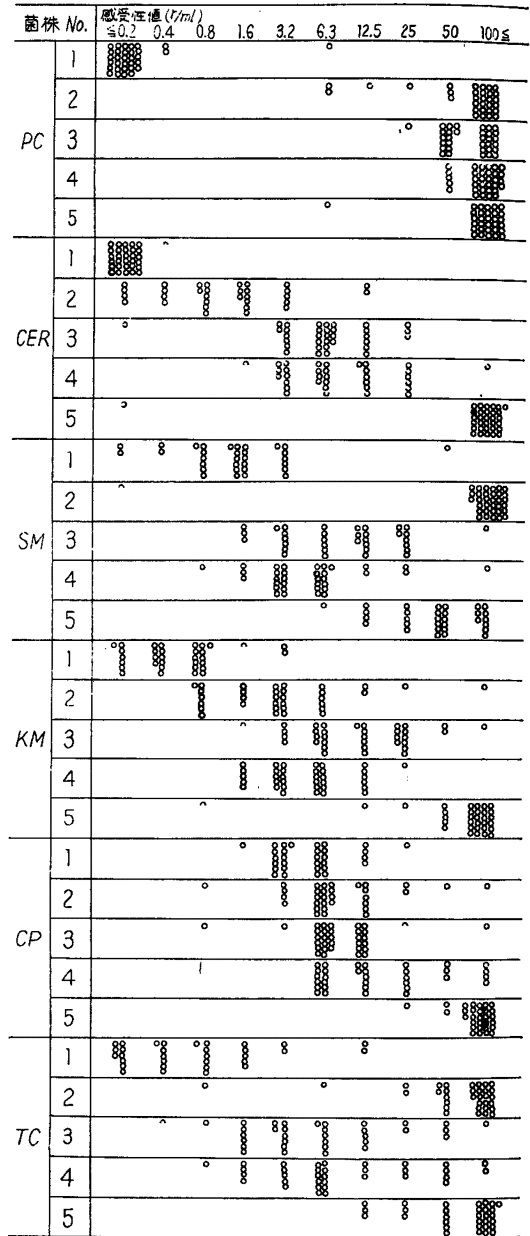
1) 実験条件の整理

主要実験条件については第5表にまとめたとおりである。今回は上述のとおりかなり実験条件を拘束した結果、条件の動揺は比較的せまい範囲に限局され、トリプト・ソイブイヨンで増菌、内径 1~1.5 mm の白金耳でハート・インヒュジョン・カンテン試験培地に接種という条件が大部分を占めた。

2) 感受性値の集計 (第6表)

今回も第1回と同じく高耐性と高感受性域は一致した成績を示しているが、動揺の範囲は全体として小さくなる傾向を示している。たとえば第1回の試験における No.2 株の PC 感受性は 6.3~>100 u/ml, No.4 株は 1.6~>100 u/ml という大きな動揺を示し、PC 高感受性の No.5 株でも ≤0.4~3.2 u/ml のバラツキがあるが、今回の No.1 株 (209-P 株) では1例を除き 0.4~≤0.2 mcg/ml に、比較的動揺を示した No.2 株でも 31件中 24 件が同一の値を示した。

第6表 第2回の検討における平板希釈法感受性値の動揺



これに対し、No. 2 株の CER, KM, CP, No.3 株の CER, SM, KM, TC, No.4 株の CER, SM, KM, TCなどは最高 8~9 希釈段階にわたる動揺を示した。SM, KM, TC, CER など中等度感受性域 (1.6~25 mcg/ml の付近) を示す菌株の多い抗生物質では感受性の動揺は避けられないようで、とくに SM, KM, TC にその傾向が強い。いずれにしても、大部分の菌株、薬剤について成績の 70% 以上が希釈 3 段階以内に包括されたことは、実験

条件の規制の効果を示すものと考えてよいであろう。

考 察

1) 平板希釈法による感受性値の動揺を少なくするには現在わが国で行なわれている平板希釈法(腸菌班法)は福見が赤痢菌の抗生物質感受性の年次変動を記録する目的で規定したものである。この方法はつくつた時点ではかなりきびしい規定であると考えられ、十分な再現性が期待されたのであるが、その後増殖用培地の種類がかなり多くなるなど各種の要因が複雑化するにつれて、しだいに成績を動揺させる要素も増加してきたと思われる。とくに培地と接種条件を一定にすることが重要な因子である点は、第1回の検討で、同一製品を試験培地として用いた機関の測定値に動揺が少なかつたこと、培地および接種条件をきびしく規定した第2回の測定値に比較的動揺が少なかつた点からも明らかであろう。希釈法の目的は研究面にあるのだから、再現性を高めるためには可能なすべての手段をためらうことなく実施すべきであろう。

難かしい問題として、一般的には接種菌量をどのように規定すればよいかという課題が浮び上ってくる。すでに三橋らは一部の薬剤について 10^8 /ml 菌液接種よりも 10^9 /ml 菌液接種のほうが確実な高い感受性値をえられるとして後者の条件を採ることをすすめている³⁾。しかし、私たちが感受性値を求める主要な目的は臨床的な化学療法効果の予測の資料をえることにある。たとえば、現在の「ふつう」の測定法 (10^8 /ml 以上の濃厚な菌液接種)で PC-G に >100 u/ml の高耐性を示すブドウ球菌は各種の接種ルートで動物実験を行なっても多くの場合治療効果は期待できない。しかし、こんな菌株でも接種菌量が $1/100 \sim 1/1,000$ になれば、かなりの株が少くとも中等程度程度の感受性を示すようになるのである。もちろん、実験動物感染治療成績が臨床効果を常に反映するとはいえないけれども、なにか合理的な根拠がない限り、菌液希釈という操作が動揺を生みだす原因の1つになりうることを念頭に置かなくてはなるまい。薬剤によつて少量菌接種のほうが適切に臨床効果を反映するものがあるとすれば、当然納得できる根拠を確認してから条件を固定すべきであろう。

同じ理論がその他の実験条件(たとえば培地組成の変更、培地 pH の変更、または培養時間の短縮など)にもあてはまるのはいうまでもない。

もう1つ、忘れてはならない大きな課題がある。はじめ、福見は腸菌班法の規定の際、各平板の分画の1つにかならず感受性のわかつた標準株を同じ条件で塗布し、その感受性値を観察することにより、希釈その他不測の誤りによる感受性値の動揺を防止する配慮を示したの

であるが、その後この方法が普及するにつれて、この重要な事実が忘れられてしまつたのである。「感受性既知」という事項は新しい抗菌剤にはあてはまらないにしても、共通の標準株が加えられていれば動揺の実態ははるかにつかみやすい。

もちろん、「共通の標準株」の設定にも多くの難関がある。同じ菌株でも異なる条件での保存過程を通じて起こるであろう変異を否定できないからである。とくに赤痢菌では R 形化によつて感受性の高まる事実が経験されている。どんな理由で、どの菌株をえらび、それをどんな方法で研究機関に提供するかは学会全体が検討すべきもつとも重要な課題といえるであろう。

いずれにしても、今回の貴重な成果を参考にして、従来の腸菌班法をさらにきびしく規制した平板希釈法の実施案の作成が望ましいことは改めていうまでもない。

2) ディスク法の限界

化学療法に用いられる抗菌剤の数が増加するにつれて臨床薬剤の選択が問題となり、ディスク法の重要度は年ごとに増しつづつある状態である。

現行のディスクの薬剤含量は標示量に対して一定の幅の動揺範囲(3濃度ディスクなら 85~135%)が規定されているが、その検定は多数のディスクを集めて測定したいわば平均の動揺の確認にすぎず、1枚1枚のディスクの含量にそれ以上の動揺がないとはいえない。1濃度ディスク標準法で、培地あるいは接種条件をかなりきびしく規定したとしても、上述の理由だけからでも動揺を抑制することはできないであろう。まして、培地(とくにカンテンの性状の不均一性)その他の条件を考えに入れるとすれば、第1回の検討でえられた1濃度ディスク標準法による感受性数値の動揺はむしろ当然のこととも考えられる。さらに、三宅が指摘しているように⁴⁾、阻止円の径の測定値が測定者の「くせ」によつてある程度変動することも動揺の1因となつている。

その反面、 $\text{III} \sim$ の4段階で判定する限り、1濃度法と3濃度法の成績に大差はなく、また桑原によると、両者の再現性にも有意の差はないという⁵⁾。ディスク法の使命はあくまで簡易、迅速を旨とする臨床的予備テストと解すべきで、標準法についてはさらに根本的な再検討を望みたい。

結 論

日本化学療法学会では、感受性測定値の再現性をしらべるため、1966年から1967年にかけて2回にわたり、一定の菌株を各研究機関に配布し、腸菌班法による感受性値、および1濃度法あるいは3濃度法によるディスク法感受性値の提出を求め、その値を集計検討した。

1) 第1回の検討では、平板希釈法の実施条件を細か

く規定しなかつたので、測定値はかなり広い範囲に動揺した。一般に高感受性、高耐性の部分は動揺が少なく、また SM, KM は試験した他の薬剤よりも動揺が大きいようであった。

2) ディスク法による感受性値は、卅～一 の4段階に分けて判定すれば、1濃度法でも3濃度法でも再現性に大差がないが、1濃度ディスク標準法で平板感受性値に換算するやりかたは動揺がかなり大きいようであった。

3) 第2回の検討では平板希釈法のみを問題とし、かつ実施条件をかなりきびしく規定したため、全体として動揺の範囲はかなり狭くなつた。

4) 2回の検討の結果から、平板希釈法の再現性を高めるには、実施条件をなるべく細かく規定した標準の方法を制定するとともに、常に共通の対照菌株を設定することの必要性が痛感された。

この検討の実施に当って御支援を賜つた石山理事長はじめ各理事の方々の御厚志に深甚の謝意を表し、協力下さつた各研究機関に厚く御礼申し上げます。また実施を御

援助いただいた塩野義製薬株式会社、万有製薬株式会社と併せて御礼申し上げます。

(第1回の検討成績は第13回日本化学療法学会東日本支部総会で、第2回の検討成績は第15回日本化学療法学会総会で、それぞれその大要が報告された。)

文 献

- 1) 福見秀雄, 中谷林太郎, 小酒井望, 広明竹雄, 小張一峰, 渡辺晶子: 赤痢菌のストレプトマイシン, クロラムフェニコール感受性の測定法について。日本医事新報 No.1513: 14~17, 1953
- 2) KANAZAWA, Y.: Single disc method for minimum inhibitory concentration determination. J. Antibiotics, Ser. A 19: 175~189, 1966
- 3) 永井裕, 田中徳満, 橋本一, 三橋進: 各種薬剤に対する耐性赤痢菌の耐性度の限界。第15回日本化学療法学会総会講演, 1967-6-2
- 4) 三宅修: ディスク法による感受性測定に関する基礎的検討 (1)。3濃度ディスクの中濃度を用いる簡易法。Chemotherapy 15(6): 690~698, 1967
- 5) 桑原章吾: 感受性測定値ほどの程度まで信頼できるか? 最新医学 22(8): 1881~1885, 1967

FLUCTUATION OF THE BACTERIAL DRUG-SENSITIVITY VALUES ACCORDING TO EXPERIMENTAL CONDITIONS

RYOCHI FUJII and MASATOSHI KONNO

Department of Pediatrics, Tokyo University Branch Hospital, Tokyo

GYOICHI KOYA

Department of Internal Medicine, The First National Hospital of Tokyo

NOZOMU KOSAKAI

Department of Clinical Pathology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo

SHOGO KUWAHARA

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine, Tokyo

The Japan Society of Chemotherapy has carried out controlled trials on reproducibility of bacterial drug-sensitivity values by both the plate dilution method and the disk method, which were repeated twice during a period from summer of 1966 to summer of 1967.

In the first examinations, the laboratories belonging to The Japan Society of Chemotherapy were each supplied with 4 test strains, and requested to investigate their sensitivities to antibiotics by the plate dilution method and the disk method (with mono- or three-concentration disks). Six antibiotics (penicillin-G, dihydrostreptomycin, kanamycin, erythromycin, chloramphenicol and tetracycline) were used in these investigations. In the plate dilution method, sensitivities to streptomycin and kanamycin showed a trend of greater fluctuation of the results than those to the other 4 drugs. When the reading of the results was made by 4 grades with the disk method (卅, ++, + and -), no difference was observed in the reproducibility of the results between the two disk methods. However, the sensitivity values in terms of MIC obtained by the standard method with the mono-concentration disk, which were computed, with reference to the standard curve, from the length of diameter of the inhibitory zone around the used disk, showed still greater fluctuation than those obtained by the

plate dilution method.

In the second examinations, the laboratories were each supplied with 5 test strains, and requested to investigate only the plate dilution method. In this trial, the experimental conditions such as the media used, the inoculum size and incubation time were indicated in greater detail than in the first trial. The fluctuation in the sensitivity values was smaller as compared with the results of the first trial.

Through these two examinations, it was confirmed that the reproducibility was greater in the case of the highly resistant and the highly sensitive area. The moderately sensitive zone, on the other hand, showed wider fluctuation of the results.

From these results, it was considered of vital necessity for elevating the reproducibility of the sensitivity values that the standard method, which indicates in detail the kinds of used media, inocula sizes and procedures of inoculation, should be established and that all the investigators should use some well-known strains as controls.