

嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について

第2報 再現性について

渡 辺 邦 友

岐阜大学医学部微生物学教室

(主任：鈴木祥一郎教授)

(昭和 49 年 8 月 20 日受付)

緒 言

嫌気性菌の培養法の進歩は臨床材料からの嫌気性菌の分離率を上昇させている。しかし、これらの嫌気性菌の薬剤感受性測定に有効な標準法はまだ確立していない。

著者らの研究室では GAM 寒天培地を基礎培地とする Agar dilution method が行なわれている。本研究はこの Agar dilution method の標準化のためのものである。MIC に及ぼす実験条件の影響については第1報に述べた。今回は再現性の点から検討を加えた。

実験材料および方法

1) 供試菌株: 教室保育株である *Eubacterium lentum* (H-1), *Propionibacterium acnes* (P-15), *Bacteroides fragilis* (H-11), *Fusobacterium nucleatum* (2390), *Peptostreptococcus putridus* (B-38), *Peptococcus asaccharolyticus* (Z-1003) および *Veillonella parvula* (10790) の7株を主に用いた。判定者間の MIC の読みの再現性の検討には、岐阜大学医学部泌尿器科の患者の尿から分離した嫌気性菌 *Peptostreptococcus* 9株, *Peptococcus* 31株および *Veillonella* 2株の計43株も用いた。

2) 供試薬剤: 全実験を通して Thiopenicol (TP) [エーザイ] を用いた。使用にあたり、滅菌蒸留水で充分振とう溶解し 1,000 $\mu\text{g/ml}$ を原液とした。判定者間の MIC の再現性の検討には、Sulfobenzylpenicillin (SBPC) [武田], Pivampicillin (PVPC) [武田], Aminobenzylpenicillin (ABPC) [協和醸酵], Cefazolin (CEZ) [藤沢], Doxycycline (DO TC) [ファイザー], Propionylmaridomycin (PMDM) [武田], Spiramycin (SPM) [アップジョン], Clindamycin (CLDM) [アップジョン] および Deoxykanamycin B (DKB) [明治] の9種類の薬剤も加えた。

3) 薬剤感受性測定法: Agar dilution method により行なつ

た。

① 薬剤含有平板作成法: 第1報に記した方法で作成した。

② 接種菌液作成法: GAM 液体培地(ニッスイ)での6および24時間培養菌液を用いた。6時間培養菌液の濁度は、MC FARLAND の standard solution で no.1 の半分(以下, no.1/2 と記す)であつた。いつぼう, 24時間培養菌液の濁度は, no.1 以上であつた。菌液 1 ml あたりの生菌数は, 前者で 10^6 前後, 後者で 10^8 前後であつた。

③ 薬剤含有平板への菌接種方法: 内径 1 mm の白金耳および多目的アパラツス(武藤器械)を用いた。多目的アパラツスの白金耳部の内径は 1 mm である。

④ 嫌気培養法: スチールウール法 (CO_2 10%, N_2 90%) で行なつた。37°C で 24 および 48 時間培養した。

⑤ MIC の判定方法: 判定者間の MIC の再現性の検討の場合には、著者の他に3名の判定者を加えた。肉眼で完全な発育阻止を示す化学療法剤の最低濃度をMICとした。

4) MIC の再現性の検討のための実験方法設定: MIC に影響する諸因子の中で、被検菌液作成法として GAM 液体培地での6および24時間培養菌液を用いた。薬剤含有平板への菌の接種方法は白金耳(内径 1 mm) によ

Table 1 Eight methods for determining the MIC

factors methods	inoculum	inoculating method	time of incubation
Method 1	24 hr-culture	streak	24 hr
Method 2	24 hr-culture	apparatus	24 hr
Method 3	6 hr-culture	streak	24 hr
Method 4	6 hr-culture	apparatus	24 hr
Method 5	24 hr-culture	streak	48 hr
Method 6	24 hr-culture	apparatus	48 hr
Method 7	6 hr-culture	streak	48 hr
Method 8	6 hr-culture	apparatus	48 hr

Method 1 is a routine method in our laboratory.

る画線塗抹と多目的アパラツス(白金耳部内径 1 mm)を用い、菌接種後の MIC 判定までの嫌気培養時間は 24 および 48 時間とした。これらの各組み合わせで Table 1 に示す方法 1 から方法 8 までの 8 種類の実験方法を設定した。

実験成績

1) 8 種類の実験方法による MIC とその再現性

方法 1 から方法 8 までの 8 組の実験方法で 7 菌株の MIC 測定を 5 回反復して実験した。5 回の MIC 測定値が代表値 MIC からどの程度ばらつくかを検討することにより再現性をみた。代表値 MIC には、5 回の MIC 測定値の最頻値をとり、最頻値が 2 個存在する場合には中央値をとった。Table 2-1, 2-2 に示すとおり、8 組の実験方法の中で、方法 1 の再現性が最も良かった。方法 1 は被検菌株の GAM 液体培地での 24 時間培養菌を白金耳で薬剤含有平板に画線塗抹し、24 時間の嫌気培養後に MIC を判定する方法である。方法 3, 方法 5, 方法 6 および方法 8 が次に良い。方法 2, 方法 4 および方法 7 では菌株によっては MIC の再現性が悪かった。方法 3, 方法 4 および方法 8 で、*P.acnes*, *P.asaccharolyticus*, *V.parvula* および *E.lentum* は対照培地でも発育のみられないことがあつた。対照培地での菌発育陰性とは、これらの前培養の条件ではこれらの菌株は MIC 測定に必要な程度の菌発育が得られなかつたことを示唆している。さらに長時間の培養が必要であろう。この点に関する著者の実験では、Agar dilution method での接種菌量は 10^{5-6} /ml からの 1 白金耳が必要であることは前報に示した。本実験での対照培地での菌陰性例ではそれ以下であつた。

Pst.putridus, *E.lentum*, *B.fragilis* および *P.asaccharolyticus* の MIC は設定した 8 組の実験方法のどの方法でも極めてよく一致した。しかし、*P.acnes*, *V.parvula* および *F.nucleatum* の MIC は実験方法により 2~8 倍の差があつた。各菌株別に 8 組の実験方法によつて得られた各々の最頻値 MIC の分布を Table 3 に示した。

2) 判定者による MIC の読みの差

同一薬剤含有平板を 3 人の判定者 (A, B, C) によつて MIC を判定した。被検菌の 6 時間および 24 時間培養菌液を用いた。Table 4 は画線塗抹による接種方法の場合の成績である。Table 5 は同一菌株の多目的アパラツスに

よる接種の場合の成績である。

被検菌株の 6 時間培養菌液を画線塗抹した場合、*E.lentum* と測定不能の *P.acnes* を除く 5 株の MIC の読みは 3 人の判定者間でよく一致した。多目的アパラツス使用の場合では *V.parvula* および *F.nucleatum* を除く 5 株の MIC の読みはよく一致した。被検菌株の 24 時間培養菌液を用いた時、画線塗抹による接種では *E.lentum* および *V.parvula* を除いた 5 株の MIC の読みは 3 人の判定者間で大きく異なつた。また、多目的アパラツス使用の場合にも *V.parvula* および *F.nucleatum* の MIC の読みがよく一致したのを除くと他の 5

Table 2-1 Distribution of MICs in relation to the mode by methods and strains

Method	Strain	Agar dilution steps Log ₂						
		-2	-2	-1	Mode	+1	+2	+2
Method 1	1				5*			
	2				5			
	3				3	2		
	4				4	1		
	5			2	3			
	6				3	2		
	7				4	1		
Method 2	1				4	1		
	2				3	2		
	3			2	3			
	4			1	3	1		
	5				4	0	1	
	6		1	0	2	1		
	7				4	1		
Method 3	1				5			
	2				2	2		
	3				4	1		
	4				1			
	5				3	2		
	6			2	3			
	7			2	1	2		
Method 4	1				4	1		
	2				3			
	3			2	3	2		
	4				2	2		
	5			2	2	0	1	
	6				3	2		
	7				4	1		

1. *Pst.putridus* 2. *E.lentum* 3. *B.fragilis* 4. *P.acnes*
5. *V.parvula* 6. *F.nucleatum* 7. *P.asaccharolyticus*
Plates were incubated for 24 hrs at 37°C.

* the number of readings

株は大きく異なつた。すなわち、発育の良好な菌株については、6時間培養菌液使用の場合の判定者間の MIC の読みが再現性が良く、発育の比較的悪い菌株については 24 時間培養菌液使用の場合の判定者間の MIC の読みが再現性が良いと言える。

3) 接種菌液と MIC の読みの再現性

嫌気性球菌 43 株の MIC を測定した。接種菌液は上記成績から原則として 6 時間培養菌液を用いた。24 時間培養した時には、菌液の濁度を 6 時間培養菌液のそれに調整して用いた。6 時間培養菌液の濁度は MC FARLAND の standard solution no. 1/2 程度である。同一

平板を 4 人の判定者 (A, B, C および D) で MIC 値を読んだ。Table 6 は、SBPC, PVPC, AMPC, CEZ, DOTC, TP, PMDM, SPM, CLDM および DKB の 10 薬剤の成績である。

以下、1 菌株の 1 薬剤に対する MIC 値を 1 件として 36 菌株の 10 薬剤に対する成績ののべ 319 件について、次の 4 つのグループに分類した。Group A: A, B, C および D の読んだ MIC が全く一致したもの。Group B: A, B, C および D のうち 3 人の MIC が一致したもの。Group C: A, B, C および D のうち 2 人の MIC が一致したもの。Group D: A, B, C および D の読んだ MIC が全部異なつたもの。Group A と Group B を合計すると 267 件で、全体の約 84% であつた。

薬剤別にみると、AMPC, CEZ および CLDM では 3 人以上の MIC の読みの一致したものは 97~100% と高く、DOTC および TP では 71~72% と低く、他の 5 薬剤では 76~86% であつた。

いつぼう、3 人の判定者の読みが一致した 74 件中一致しなかつた他の判定者の読みと 1 希釈段階しか異ならなかつたものは 69 件を占めた。また、2 人の判定者の読みが一致した 47 件中、一致しなかつた他の 2 人の読みと 1 希釈段階しか異ならなかつたものは 24 件を占めた。すなわち、A, B, C および D の 4 人の読みがたつた 1 希釈段階以内しか異ならなかつたものは全部で 286 件で、全体の約 90% を占める成績であつた。

4) MIC に影響を与える因子

被検菌の培養時間、菌液の薬剤含有平板への接種方法および平板の判定までの嫌気培養時間が MIC に及ぼす影響を Fig. 1, 2 および 3 に示した。

被検菌の培養時間に関しては、6 時間培養が 24 時間培養よりも MIC を低くする。この傾向は画線塗抹による接種および多目的アパラツスによる接種と同様の傾向である。*P. acnes*, *V. parvula*, *F. nucleatum* および *P. asaccharolyticus* は MIC 値が変動する。発育の速度と発育の仕方 (沈殿発育する傾向の強弱) が関係していると考ええる。

接種方法に関しては、多目的アパラツス使用の場合、画線塗抹による接種よりある種の菌 (*F. nucleatum*, *P. asaccharolyticus*) では MIC が高く現われることがある。

Table 2-2 Distribution of MICs in relation to the mode by method and strain

Method	Strain	Agar dilution steps Log ₂						
		-2	-2	-1	Mode	+1	+2	+2
Method 5	1				5			
	2				4	1		
	3				4	1		
	4			1	4			
	5		1	0	3			
	6			2	1		2	
	7			1	3		1	
Method 6	1			1	4			
	2				4	1		
	3				5			
	4			2	3			
	5		2	0	3			
	6			2	3			
	7			2	1		2	
Method 7	1				5			
	2				4	1		
	3				5			
	4			1	4			
	5			2	1	0	2	
	6			1	3		1	
	7				4			
Method 8	1			1	4			
	2				3	2		
	3				5			
	4			2	3			
	5				3	0	2	
	6				4		1	
	7				4			

* Plates were incubated for 48 hrs at 37°C.

Table 3 Distribution of the mode MICs obtained by eight different methods

organism	Agar dilution steps Log ₂					
	-2	-2	-1	Mode	+1	+2 +2
<i>Pst. putridus</i>				4	4	
<i>E. lentum</i>				8		
<i>B. fragilis</i>				7	1	
<i>P. acnes</i>	1	1		6		
<i>V. parvula</i>			1	4	0	3
<i>F. nucleatum</i>			3	3	1	1
<i>P. asaccharolyticus</i>				7	0	1

判定までの培養時間に関しては、24 時間培養より 48 時間培養のほうが MIC は高く現われる。*P. acnes*, *V. parvula* および *P. asaccharolyticus* はこの傾向を示した。

考 察

Agar dilution method の細部の術式は研究者によって異なる²⁻⁷⁾。例えば、被検菌液作成方法については、FINEGOLD ら²⁾ は平板上からの 2~3 個の集落を Thio-glycollate 培地に接種し 6 時間培養する。KISLAK らは平板上の集落を内径 3 mm の白金耳の 1 白金耳量を Brain heart infusion broth の 1 ml に浮遊させる。著者ら⁶⁾ は GAM 液体培地に GAM 半流動高層培地からの

1 白金耳を接種し培養する。また、薬剤含有平板への接種方法についてみると、FINEGOLD らは STEER'S inoculum replicator²⁾ (多目的のアパラツスのようなもの)を用いる。KISLAK³⁾ は内径 3 mm の白金耳を用いる。著者らは内径 1 mm の白金耳を用いる。判定については、FINEGOLD ら²⁾ は 48 時間培養後に判定する。KISLAK ら³⁾ は 18 時間培養後に判定する。著者らは 24 時間培養後に判定する。これらの細部の術式は同一研究者においても、文献を出すごとに改良されている。

最も再現性の良かった教室常法である方法 1 をはじめとする画線塗抹による接種方法群が多

目的のアパラツスを使用する方法群よりやや再現性が高い印象をうけた。また、GAM 半流動高層培地からの 1 白金耳量を GAM 液体培地に接種し 6 時間培養する方法では必要充分の菌量を得ることができない菌株が存在することが知られた。すなわち、嫌気性菌全般を 1 度に取り扱う時、同じ操作で常に一定した生菌数の菌液を得られないことが問題である。比較的発育の遅い菌株、例えば *P. acnes*, *F. nucleatum* および *E. lentum* 等は別に扱うとか必要充分で安定した生菌数を得るための対策を立てる必要があることを示唆した。実験方法が異なると MIC がかなり変動する菌株については、これがその菌の属または種で特異的なことであるのか、多くの菌株に

Fig. 1 Correlation of MIC values between methods using a 6 hr. culture in GAM broth and a 24 hr. culture. A; Agar plate was inoculated by means of a loop B; by means of an apparatus. A-1, B-1; Determination was made after 24 hr and A-2, B-2; after 48 hr.

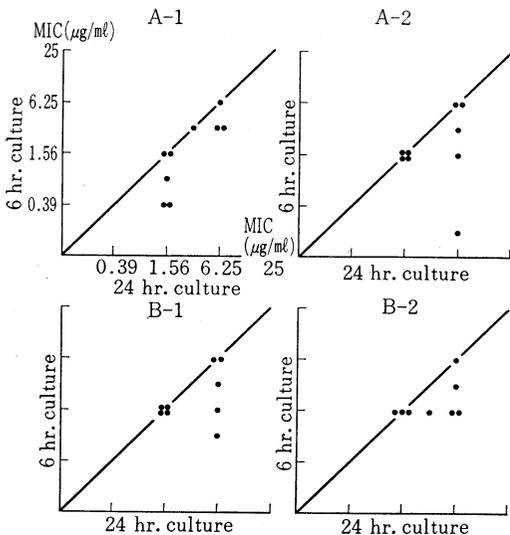


Fig. 2 Correlation of MIC values between methods using an apparatus and a loop A; A 6 hr. culture was inoculated. Determination was made after 24 hr. (A-1, B-1) and after 48 hr. (A-2, B-2) B; A 24 hr-culture was inoculated.

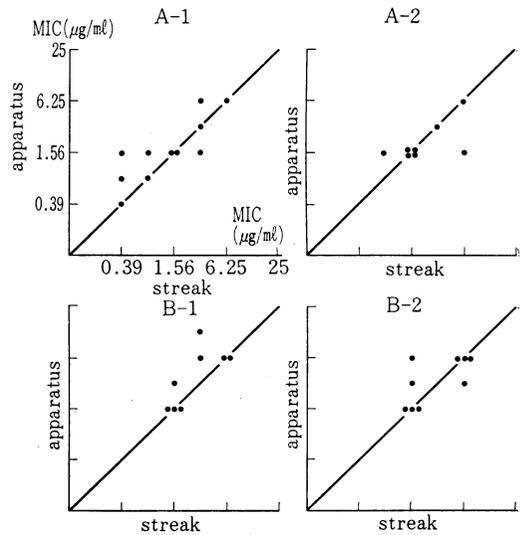


Table 4 Variability of readings of MIC
Method of inoculation : streak

organism	inoculum		Range of MIC values	
	reader		6 hr. cultures	24 hr. cultures
<i>Pst. putridus</i>	A		1.56~3.13	3.13
	B		3.13	6.25
	C		3.13	12.5~100
<i>E. lentum</i>	A		0.39~1.56	3.13
	B		3.13~6.25	6.25
	C		3.13	3.13~6.25
<i>B. fragilis</i>	A		0.78~1.56	1.56~6.25
	B		1.56	3.13
	C		0.78~1.56	100
<i>P. acnes</i>	A		*	0.78~1.56
	B		*	1.56
	C		*	6.25
<i>V. parvula</i>	A		0.78	0.78
	B		0.78	0.78
	C		0.39~0.78	0.78
<i>F. fusiforme</i>	A		0.78~1.56	3.13
	B		1.56~3.13	3.13
	C		1.56	>100
<i>P. asaccharolyticus</i>	A		0.39~0.78	1.56
	B		0.39	1.56
	C		0.39	25~>100

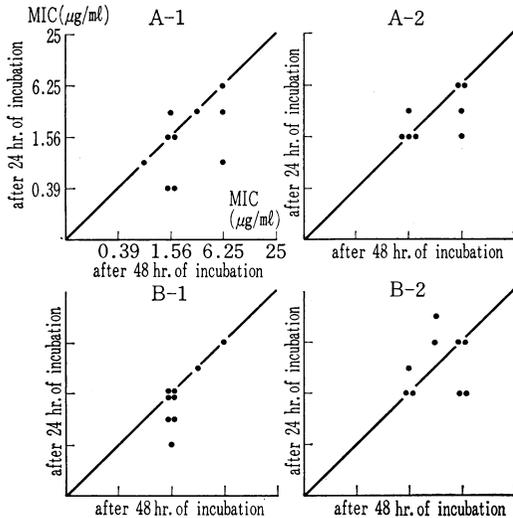
Plates were incubated for 24 hrs. at 37°C. * No growth

Table 5 Variability of readings of MIC
Method of inoculation : apparatus

organism	inoculum		Range of MIC values	
	reader		6 hr. cultures	24 hr. cultures
<i>Pst. putridus</i>	A		3.13	6.25
	B		3.13	6.25
	C		3.13	>100
<i>E. lentum</i>	A		3.13	6.25
	B		3.13	6.25~12.5
	C		1.56~3.13	12.5~>100
<i>B. fragilis</i>	A		1.56	1.56~6.25
	B		1.56	1.56~3.13
	C		0.78~1.56	100~>100
<i>P. acnes</i>	A		0.19~0.78	1.56
	B		0.39	1.56
	C		0.39~0.78	1.56~6.25
<i>V. parvula</i>	A		1.56	1.56
	B		0.78~1.56	1.56
	C		0.39~0.78	0.78~3.13
<i>F. fusiforme</i>	A		0.78~1.56	6.25
	B		1.56~3.13	12.5
	C		0.39~1.56	>100
<i>P. asaccharolyticus</i>	A		1.56	6.25
	B		1.56	1.56~3.13
	C		0.78~1.56	100

Plates were incubated for 24 hrs. at 37°C.

Fig. 3 Correlation of MIC values read after 24 hr. of incubation and 48 hr. A; A 6 hr. culture was inoculated 1, using a loop and 2, an apparatus. B; A 24 hr. culture was inoculated 1, using a loop and 2, an apparatus.



ついて検討すべきであろう。

実験成績 3 は判定基準に大きな問題を投げた。接種方法の相違には無関係に、24 時間培養菌使用の時にみられた 3 名の判定者間の著しい読みの差は 6 時間培養菌使用の時に消失した。菌株の側からみると、比較的発育の早い菌株では 6 時間培養菌使用のほうが判定者間の MIC

の読みの差は小さく、比較的発育の遅い菌株すなわち *P. acnes* および *F. nucleatum* では 24 時間培養菌使用のほうが判定者間の MIC の読みの差が小さい。また、*E. lentum* および *V. parvula* は菌の発育状態が培養条件によりばらつきやすいので注意を要する。すなわち、菌の新鮮さと充分発育していることの確認が重要である。

嫌気性球菌の 10 薬剤に対する感受性試験の成績から、接種菌液を 6 時間培養菌液とすると、ひじょうにより判定者間の再現性を得ることができた。判定者による MIC の読みの差を生じさせる原因としては菌液の濁度が問題となる。6 時間培養菌液と 24 時間培養菌液の相違点はその 1 ml あたりの生菌数と菌液の濁度である。とくに菌液の濁度は、最大発育許容濃度と最小発育阻止濃度の間で著しく影響すると考えられる。いわゆる barely visible haze of growth の判定者による取り扱いの相違が、MIC の読みに大きく影響していた。24 時間培養菌使用の時に、とくにこの barely visible haze of growth をみることが多かつた。接種方法については、操作の簡略化の観点からみて、また諸外国の傾向をみても多目的のアパラツス使用の方向にすべきであると考えられる。判定までの培養時間も試験の迅速化の点から 24 時間以内にすべきであろう。

結 論

寒天平板希釈法による MIC 測定の際、再現性の良い成績を得るため、とくに研究者間の判定の再現性を良くするために、次の点に注意すべきである。

Table 6 Coincidence of MIC's read by four readers

Antibiotics	4 / 4*	3 / 4	2 / 4	0 / 4	Total
SBPC	21**	7	8	0	36
PVPC	17	9	8	0	34
AMPC	29	3	0	0	32
CEZ	24	6	1	0	31
DOTC	14	12	8	2	36
TP	13	9	9	0	31
PMDM	17	7	4	0	28
SPM	14	11	4	1	30
CLDM	28	2	0	0	30
DKB	16	8	5	0	29
Total	193	74	47	3	319

* 4 / 4 : 4 readers had the same MIC value.

3 / 4 : 3 of 4 readers had the same MIC value.

2 / 4 : 2 of 4 readers had the same MIC value.

0 / 4 : None of 4 readers had the same MIC value.

**

No. of strain tested

多くの嫌気性菌は、GAM 液体培地での6時間嫌気培養菌液 (MC FARLAND の standard no.1 の半分の濁度) を接種菌液とする。しかし、比較的発育の遅い嫌気性菌は18~24時間培養菌液 (MC FARLAND の standard no.1 の半分の濁度) を用いる。この時の菌液の1mlあたりの生菌数は 10^5 ~ 10^6 である。必要ならば希釈液または0.05% Yeast extract 水で希釈して調整して用いる。多目的のアパラツスで薬剤含有平板に接種し37°C 24時間培養後に判定する。

稿を終るにあたり、本研究の実施に際し、ご指導、ご校閲下さいました恩師 鈴木祥一郎教授、上野一恵助教授、二宮敬宇助手に深謝いたします。また本研究に際しご協力下さった教室各位に感謝いたします。

文 献

- 1) 渡辺邦友：嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について、第1報、MICに影響する因子。Chemotherapy 22(9) : 1459~1465, 1974
- 2) NASTRO, L. J. & S. M. FINEGOLD : Bactericidal activity of five antimicrobial agents against *Bacteroides fragilis*. J. Inf. Dis. 126 : 104~107, 1972
- 3) KISLAK, J. W. : The susceptibility of *Bacteroides fragilis* to 24 antibiotics. J. Inf. Dis. 125: 295~298, 1972
- 4) BARTLETT, J. G. ; V. L. SUTTER & S. M. FINEGOLD : Treatment of anaerobic infections with lincomycin and clindamycin. N. E. J. Med. 287 : 1006~1010, 1972
- 5) FINEGOLD, S. M. ; N. E. HARADA & L. G. MILLER : Lincomycin ; Activity against anaerobes and effect on normal human fecal flora. Antimicrob. Agents & Chemoth. 659~667, 1965
- 6) 上野一恵, 他 : Sulfobenzylpenicillin の嫌気性菌に対する抗菌作用について。Chemotherapy 19 : 875~880, 1971
- 7) INGHAM, H. R. ; J. B. SELTON, A. A. CODD & J. H. HALE : A study *in vitro* of the sensitivity to antibiotics of *Bacteroides fragilis*. J. Clin. Path. 21 : 432~436, 1968
- 8) STEERS, E. ; E. L. FOLZ, B. S. GRAVES & J. RIDEN : An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot. Chemother. 9 : 307~311, 1959
- 9) ERICSSON, H. M. & J. C. SHERRIS : Antibiotic sensitivity testing report of an international collaborative study. Acta Path. Micro. Scand. B. Suppl. 219, 1971

STANDARDIZED ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF ANAEROBES. II

Reproducible MIC

KUNITOMO WATANABE

Department of Bacteriology, Gifu University School of Medicine

The agar dilution technique which has been used at our laboratory for several years was converted.

Briefly, serial two-fold dilutions of the antibiotic are prepared and incorporated into GAM agar (Nissui). The inoculum is prepared as follows : Almost all strains of anaerobes except slower growing strains is grown in GAM broth (Nissui) for about 6 hours anaerobically. A 6-hour culture in GAM broth has the turbidity of a half of MC FARLAND no.1 (10^5 to 10^6 viable cells/ml). When a 24-hour culture is employed, it is diluted in UENO'S diluent (without agar) or 0.05% yeast extract solution to the same density above.

The inoculum is applied by means of a multipurpose apparatus for rapid inoculation.

The susceptibility plates are incubated at 37°C in anaerobe jars (Steel-wool copper sulfate method ; CO₂ 10%, N₂ 90%) for 24 hours.

The MIC of each strain is read as the highest dilution of drug yielding no growth.

This procedure is better at the point of the rapidity, simplicity and reproducibility.