

最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂について

1968年に制定された本学会標準法(Chemotherapy, 16(1), 98~99, 1968)は、とくに接種菌量の規定がないため、薬剤の種類によつては、接種菌量の差によつてMIC値に著しい差が生ずることがあり、この点を検討する必要があることが指摘された。そして本法を再検討するならば、その他の点についても検討し、改定案を作成することが、本学会理事会で決定し、大越理事長より改定案作成の委員が委嘱された。委員会は昨年12月から4回開催し、三橋委員からブドウ球菌、大腸菌各10株の配布を受け、各委員が各種の接種菌量、接種方法等を用いて検討し、改正案を作成し、6月に理事会に答申した。

本改正案の作成に当つては次の点を考慮した。

(1) 現行法が広く普及しているので、大きな改訂は

避けたこと。

(2) 接種菌量の大小がMIC値に著しく影響する場合が多いので、接種菌量をできるだけ一定に保つよう規定した。ただし希釈操作は面倒であるから、できるだけ避けるようにしたこと。

(3) 耐性株に対しては、いわゆる2点法を採用した。例えばブドウ球菌でEMで耐性を誘導される株は本法で発見できること。

(4) 栄養要求のきびしい菌種のMIC測定法に関しては、培地、培養法など検討すべき問題が多くあるので、今回は除外したこと。

1974年6月27日

MIC測定法改定委員会

小酒井 望, 五島瑳智子, 中沢 昭三
紺野 昌俊, 三橋 進, 松本文夫
中山一 誠, 清水喜八郎, 岡本 緩子

最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂案	現 行 法	備 考
被検菌株の抗生物質感受性測定には、次の寒天平板希釈法を用いる。 1. 感受性測定用培地 下記のいずれかを使用する。 (1) Heart Infusion Agar (2) 感性ディスク用培地 いずれの会社の製品でもよいが、製造会社名を明記すること。	被検菌株の抗生物質感受性測定には、次の寒天平板希釈法を用いる。 1. 感受性測定用培地 下記のいずれかを使用する。 (1) Heart Infusion Agar (2) 感性ディスク用培地 いずれの会社の製品でもよいが、製造会社名を明記すること。	改正案は現行法と同じ。
2. 抗生物質の濃度段階 下記の100 µg/mlよりの2倍希釈を使用する。 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05, 0.025 µg/ml。 なお、100 µg/ml以上の濃度を使用する場合は200, 400, 800, 1,600 µg/mlとする。 ただし、力価としてunitを用いる抗生物質もすべてµg/mlを使用すること。	2. 抗生物質の濃度段階 下記の100 mcg/mlよりの2倍希釈を使用する。 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05, 0.025 mcg/ml。 なお、100 mcg/ml以上の濃度を使用する場合は200, 400, 800, 1,600 mcg/mlとする。 ただし、力価としてunitを用いる抗生物質もすべてmcg/mlを使用すること。	IUPACの勧奨にもとづきµgを使用する。
3. 接種用菌液 増菌用培地に約10⁸/mlに増殖したものを接種菌液とする。 注1) 増菌用培地には、カゼイン・ソイ混合ペプトンブイヨンなどを使用する。これには下記の製品がある。いずれでもよいが、製造会社名を明記すること。 Trypticase Soy Broth (BBL) トリプトソイブイヨン(栄研) トリプトソーヤブイヨン(ニッスイ)	3. 増菌用培地 カゼイン・ソイ混合ペプトンブイヨンを使用する。 これには下記の製品がある。そのいずれでもよいが、製造会社名を明記すること。 Trypticase Soy Broth (BBL) トリプトソイブイヨン(栄研) トリプトソーヤブイヨン(ニッサン)	改正案では3. 注1)に移した。 現行法にはなく新たに加えた。

2) カゼインソイ混合ペプトンブイヨンでは 37°C 18~20 時間培養で黄色ブドウ球菌 209 P 株は約 10^8/ml, 大腸菌 NIHJ 株は約 10^9/ml となる。 接種用菌液を約 10^8/ml に調整するには, 使用直前に増菌用培地で希釈する。 3) 培養後長期間保存してある菌株を試験する場合は, 少なくとも 1 回以上継代培養し, 継代培養直後の菌を使用する。 4) 10^8/ml の菌液で耐性を示す場合は, 10^8/ml 以下の菌液についても MIC を測定することが望ましい。通常増菌用培地に 1 夜培養した約 10^8/ml の菌液およびその 100 倍希釈菌液 (約 10^6/ml) の 2 段階の菌液を用いて測定する (いわゆる 2 点法)。この場合両方の MIC 値を併記すること。		
4. 菌の接種法 白金耳 (なるべく内径 1 mm 前後のもの) で 2 cm 程度画線塗抹する。測定用培地の菌密度がこれと同程度に調製された他の接種装置を用いてもよい。	4. 菌の接種法 一般的には増菌用培地に 18~24 時間培養したものを接種菌液として用い, 白金耳 (なるべく内径 1 mm 前後のもの) で 2 cm 程度, 画線塗抹する。	改正案では, 白金耳を用いる方法以外の方法でも, 接種菌量が同一であればよいとする。
5. 培養時間・温度 18~20 時間, 37°C	5. 培養時間・温度 18~20 時間, 37°C	改正案は現行法と同じ。
6. 判定 完全に発育が阻止された最低濃度をもつて感受性をあらわす。 注: 集落が 1 個でも発育した場合, または極めてうすい菌苔が発育した場合も「発育」とみなす。ただし, 例えばアミノグリコシッド系抗生物質の場合のように, 耐性変異率の高い薬剤では, 対照 (薬剤を含まない培地) の発育と比べて明らかに発育が抑制された濃度以上の高濃度において, 2, 3 の集落が認められることがあるが, これは除外する。例えば, 次の場合は MIC は 12.5 μg/ml とする。 薬剤濃度 (μg/ml) 0...0.78 1.56 3.13 6.25 12.5 25 50 発育の程度 卍... 卍 卍 卍 卍 + (2) + (1) - () 内は集落数	6. 判定 完全に発育が阻止された最低濃度をもつて感受性をあらわす。 ただし 1 個でも集落が発育した場合, または極めてうすい菌苔が発育した場合も「発育」とみなす。	改正案では判定法を明確にするため, 注釈を加えた。
〔附〕 1. 抗生物質標準液の作製, 希釈法 各抗生物質の力価の明らかな粉末を化学天秤で 0.1 mg の単位まで正確に秤量し, 滅菌精製水を適量加えて, 力価 1,000 μg/ml の溶液を作る。	〔注〕 1. 抗生物質標準液の作製, 希釈法 各抗生物質の力価の明らかな粉末を化学天秤で 0.1 mg の単位まで正確に秤量し, 滅菌精製水を適量加えて, 1,000 mcg/ml の溶液を作る。ただし CP の場合は温浴中で加	現行法の〔注〕を〔附〕とした。 1. 現行法の CP, EM, AB-PC の溶解法を削除した。他に溶解しにくい薬剤も

1,000 $\mu\text{g/ml}$ の溶液が出来たならば、滅菌メスピペットを用いて、滅菌精製水で2倍希釈を行ない、500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 2.0... $\mu\text{g/ml}$ の溶液を作る。この際希釈に用いるメスピペットは、必ず希釈のたびごとにとりかえなければならぬ。

1,000 $\mu\text{g/ml}$ の標準液は原則として測定の度ごとに調製する。

2. 感受性測定用平板の作り方

培地を溶解し、その温度が 60~50°C になったところで、上記の抗生物質溶液を培地の 1/9 量加え、よくまぜ合わせシャーレに分注して平板とする。

3. 被検菌株と対照菌株

被検菌株はなるべく分離後継代 2, 3 代以内のものを使用する。

測定に際しては常に対照菌株を使用すること。なお対照菌株としては日本化学療法学会の指定するブドウ球菌 209 P 株または大腸菌 NIHJ 株を用いる。

温して溶解する。EM, AB-PC の場合は完全に溶解するのに多少時間がかかるので、時々振盪しながら溶解する。

1,000 mcg/ml の溶液が出来たならば、滅菌メスピペットを用いて、滅菌精製水で2倍希釈を行ない、500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 2.0...mcg/ml の溶液を作る。この際希釈に用いるメスピペットは、必ず希釈のたびごとにとりかえなければならぬ。

1,000 mcg/ml の標準液は原則として測定の度ごとに調製する。

2. 感受性測定用平板の作り方

培地を溶解し、その温度が 60~50°C になったところで、上記の抗生物質溶液を培地の 1/9 量加え、よくまぜ合わせシャーレに分注して平板とする。

3. 被検菌株と対照菌株

被検菌株はなるべく分離後継代 2, 3 代以内のものを使用する。

測定に際しては常に対照菌株を使用すること。

なお対照菌株としては日本化学療法学会の指定するブドウ球菌または大腸菌菌株を用いる。

あり、いずれも、それぞれに適した溶解法を使用すればよい。

2. 現行法と同じ。

3. 改正案では、本学会で規定している標準株、すなわちブドウ球菌は 209 P 株、大腸菌は NIHJ 株を使用するよう定めた。

上記のごとき、改訂案が委員の方々の御努力により、でき上がりましたが、この案に御意見があられる方は、私迄、お申出戴きたいと存じます。3ヶ月の間に御意見がなければ、この案のごとく現行法を改訂いたしたいと存じます。

日本化学療法学会 理事長 大 越 正 秋