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

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7月19日受付)

緒言

細菌の化学療法剤に対する感受性成績は用うる試験方法によつて異なることは周知のところである。本邦では好気性菌の薬剤感受性試験の標準法はほぼ確立されている。しかし嫌気性菌のそれは実験者に各種各様の方法が用いられているので各研究者の報告から嫌気性菌の薬剤感受性を比較することが困難である。臨床各科領域で嫌気性菌に対する関心が高まりつつある今日,嫌気性菌の薬剤感受性試験法の標準化およびその成績の再現性の検討が世界的な問題となつている。著者らの教室に於いてはGAM寒天培地(ニッスイ)を基礎培地としたAgar dilution methodで嫌気性菌の最小発育阻止濃度(MIC)を測定して来た。

本報では接種菌液作成法,接種菌量,接種方法等の諸因子がMIC値に及ぼす影響について検討した。

実験材料および方法

1) 供試菌株:*Bacteroides fragilis* (Ju-9), *Bacteroides melaninogenicus* (Rm-1), *Fusobacterium varium* (J-2-61), *Fusobacterium necrophorum* (W-12), *Fusobacterium nucleatum* (8FM), *Eubacterium lentum* (H-1), *Propionibacterium acnes* (P-15), *Bifidobacterium adolescentis* (6G-3), *Clostridium ramosum* (J-2-71), *Clostridium perfringens* (1241-Sakai), *Peptococcus prevotii* (9321-1), *Peptococcus aerogenes* (14963-2), *Peptococcus anaerobius* (B-40), *Peptococcus variabilis* (PL-7-1), *Peptostreptococcus anaerobius* (B-38), NCTC Group VII (Hare) (9819-1-2) および *Veillonella parvula* (10990) の17株を用いた。

2) 供試薬剤:Thiophenicol (TP)〔エーザイ〕, Propionylmaridomycin (PMDM)〔武田〕, Sulfobenzylpenicillin (SBPC)〔武田〕, Dideoxykanamycin B (DKB)〔明治〕, Cephazorine (CEZ)〔藤沢〕,およびDoxycycline (DOTC) の6剤を用いた。

3) 薬剤感受性測定法:Agar dilution methodによつた。

ア) 薬剤含有平板作成法:予め用意した各薬剤の2倍階段希釈法(1,000 μg/mlから1.9 μg/mlまで)の2 mlと約50~55℃に保たれたGAM寒天培地(ニッスイ)の18 mlとをよく混合して平板に固めた。ペトリ皿の内径は8.5 cmである。室温で約3時間乾燥した後で使用した。培地はpH 7.2±0.2に調整した。

イ) 接種菌液と接種菌量:薬剤含有平板に接種する菌液作成のための培養は原則としてGAM液体培地(ニッスイ)で嫌気的に行なわれた。GAM半流動高層培地(GAM高層と記す)(ニッスイ), Fluid thioglycollate medium (Difco) およびGAM寒天培地も使用された。培養時間は6, 12, 24および48時間であつた。平板上集落からの菌液の作成または菌液を希釈する必要のある時には教室常用の希釈液[1] (KH_2PO_4 4.5 g, Na_2HPO_4 7.5 g, 塩酸システィン1 g, Tween 80 1 g, 蒸留水1 L, pH 7.2) を用いた。

ウ) 薬剤含有平板への接種方法:薬剤含有平板への接種は内径1 mmの白金耳で約1 cmに画線塗抹する方法と多目的アパラッツス(武藤器械)による方法とで行なわれた。多目的アパラッツスでは1回の操作で27菌株が薬剤含有平板上に点状に接種される。多目的アパラッツスの白金耳の内径は1 mmである。

エ) 嫌気培養法:嫌気培養は原則としてスチールウール法[2] (N_2 90%, CO_2 10%) で行なわれた。スチールウール法 (CO_2 100%) も用いられた。培養時間は48時間である。

オ) MIC値の決定:肉眼で完全に発育阻止を示す薬剤の最低濃度をMICとした。

実験成績

1) 前培養に用いたGAM高層とGAM液体培地の比較

被検菌のGAM高層とGAM液体培地での24時間培養菌を用い,その1白金耳量を画線塗抹して両者でのMIC値を比較した。17菌株で4薬剤について検討した成績はTable 1に示す。SBPCでは,17株中9株は前培養培地が異なつてもMICは一致した。17株中6株はGAM高層での前培養でより耐性に判定され,残りの2

Table 1. MIC of anaerobes (Streak on plate method)

Organism \ Medium \ Antibiotic	MIC (μg/ml) SBPC S	SBPC B	PMDM S	PMDM B	CEZ S	CEZ B	TP S	TP B
B. fragilis	25	25	0.78	0.78	6.25	6.25	3.13	3.13
B. melaninogenicus	0.39	0.19	0.19	0.19	0.78	0.39	3.13	1.56
F. varium	100	100	100	100	100	100	0.78	1.56
F. necrophorum	0.39	0.39	50	25	0.19	0.19	0.78	0.78
F. nucleatum	0.19	0.19	50	50	0.19	0.19	0.39	0.78
P. acnes	0.39	0.78	0.19	0.19	0.19	0.39	0.39	0.78
E. lentum	100	50	1.56	0.78	100	100	6.25	6.25
B. adolescentis	6.25	1.56	0.39	0.39	12.5	12.5	3.13	3.13
C. perfringens	12.5	12.5	3.13	1.56	0.78	0.78		
C. ramosum	50	50	3.13	0.78	6.25	1.56	3.13	3.13
V. parvula	6.25	3.13	100	50	0.19	0.19	0.78	0.78
P. prevotii	1.56	1.56	1.56	0.78	1.56	0.78	3.13	3.13
P. aerogenes	0.39	0.39	0.78	0.78	0.19	0.19	0.39	0.78
P. variabilis	3.13	12.5	3.13	0.78	0.78	0.78	3.13	3.13
P. anaerobius	1.56	0.78	6.25	6.25	0.39	0.19	3.13	3.13
Pst. anaerobius	12.5	12.5	3.13	3.13	0.78	0.78	3.13	3.13
NCTC Group VII	0.39	0.19	6.25	3.13	0.19	0.19	3.13	3.13

Inoculum prepared from 24-hour culture in GAM semisolid medium (S) or in GAM broth (B)

株はGAM液体培地での前培養でより耐性に判定された。PMDMでは，17株中9株が一致した。残りの8株は全てGAM高層でより耐性に判定された。CEZでは，17株中12株が一致した。17株中4株はGAM高層の前培養でより耐性に判定され，残りの1株はGAM液体培地でより耐性に判定された。TPでは，16株中11株が一致した。残りの5株中4株はGAM液体培地での前培養でより耐性に判定され，1株はGAM高層でより耐性に判定された。すなわち全体としてGAM高層での前培養の場合のMIC値がGAM液体培地での前培養の場合のMIC値より高くでる傾向を示した。菌種による特徴的な傾向は認められなかった。

2) 接種菌液調整の方法の比較

接種菌液は次の方法によって準備された。方法 1：GAM液体培地での24時

Table 2. Comparison of inoculum preparating method

Organism \ Method	MIC (μg/ml) CEZ 1	CEZ 2	TP 1	TP 2	SBPC 1	SBPC 2
F. necrophorum	0.19	0.19	0.78	0.78	0.39	0.19
F. varium	100	100	1.56	1.56	100	50
P. acnes	0.19	0.19	0.78	0.78	0.78	0.19
E. lentum	0.78	0.19	3.13	3.13	0.39	1.56
P. prevotii	0.78	0.78	3.13	3.13	0.78	0.78
P. anaerobius	0.19	0.19	3.13	3.13	0.78	0.78
P. variabilis	0.19	0.19	3.13	3.13	0.78	0.78
P. aerogenes	100	100	6.25	12.5	100	100
NCTC Group VII	0.19	0.19	3.13	6.25	0.19	0.19
V. parvula	0.19	0.19	0.78	0.39	0.39	0.19

* Method 1 : 24 culture in GAM broth
Method 2 : Finegold's method modified by the author

間培養菌液（教室で常用されて来た方法)。方法 2：5% 家兎血液加 Fluid thioglycollate medium での 48 時間培養菌を滅菌生理食塩水で 10^{-2} 倍に希釈したもの（1965 年頃 FINEGOLDら[8] が用いた方法)。方法 3：GAM 寒天培地での 48 時間培養菌の 1 白金耳量（内径 3 mm）を 1 ml の GAM 液体培地に均等に浮遊したもの（KISLAK[5] の方法の著者による変法)。方法 1，方法 2 および方法 3 の接種菌液 1 ml あたりの生菌数は各々 10^8～10^9，10^6～10^7，および 10^8 であることが定量培養で確かめられた。方法 1 では画線塗抹法，方法 2 および方法 3 では多目的アパラッツスで接種して MIC 値を比較した。薬剤は CEZ, TP および SBPC を用いた。方法 1 と方法 2 の比較は 11 菌株を用い，方法 1 と方法 3 の比較は 14 菌株を用いて行なつた。成績は Table 2 と Table 3 に示した。

方法 1 と方法 2 の比較では，CEZ および TP の 11 菌株に対する MIC は両方法間でよく一致した。SBPC に対しては方法 1 の場合に MIC が 2～4 倍高く出る傾向を示した。方法 1 と方法 3 の比較では，CEZ, TP および SBPC とも，方法 3 の場合に方法 1 の場合よりも 2～4 倍高い MIC を示す傾向を示した。菌種別にみても特に一定の傾向は認められなかつた。

3) 接種菌量の影響

GAM 液体培地での24時間培養菌液を原液とし，教室常用の希釈液で 10^{-2} 倍希釈法で所要濃度まで希釈した。原液，10^{-2} 倍希釈液および 10^{-4} 倍希釈液から各々 1 白金耳量を画線塗抹し，接種菌量による MIC 値を比較した。薬剤は TP および PMDM を用いた。接種菌液の 1 ml あたりの生菌数は 10^8～10^9，10^6～10^7 および 10^4～10^5 であつた。Table 4 に示すとおり，TP では *B. fragilis*, *E. lentum* および *P. anaerobius* が，PMDM では *F. varium*, *B. adolescentis*, *Pst. anaerobius* および *V. parvula* では接種菌量により MIC は影響を受けなかつた。しかし多くの場合，10^{-2} 倍の接種菌

Table 3. Comparison of inoculum preparating method

	MIC (μg/ml)					
	CEZ		TP		SBPC	
Organism \ Method	1	3	1	3	1	3
B. melaninogenicus	0.39	1.56	1.56	0.19	0.19	0.19
B. fragilis	6.25	25	3.13	6.25	25	12.5
F. necrophorum	0.19	0.19	0.78	1.56	0.39	0.19
F. varium	100	100	1.56	1.56	100	100
F. nucleatum	0.19	0.19	0.78	0.39	0.19	0.19
P. acnes	0.19	0.19	0.78	1.56	0.78	0.78
B. adolescentis	12.5	12.5	3.13	3.13	0.39	3.13
E. lentum	0.78	0.39	3.13	6.25	0.39	1.56
C. ramosum	1.56	6.25	3.13	6.25	25	25
P. prevotii	0.78	0.78	3.13	3.13	0.78	3.13
P. anaerobius	0.19	0.19	3.13	6.25	0.78	1.56
P. variabilis	0.19	0.19	0.78	1.56	3.13	6.25
P. aerogenes	100	100	6.25	6.25	100	100
Pst. anaerobius	0.39	0.78	3.13	6.25	12.5	12.5
NCTC Group VII	0.19	0.19	3.13	6.25	0.19	0.19
V. parvula	0.19	0.19	0.78	1.56	0.39	0.39

* Method 1 : 24-culture in GAM broth
Method 3 : KISLAK's method modified by the author

Table 4. Inoculum size and MIC

	MIC (μg/ml)					
	TP			PMDM		
Organism \ Inoculum	9−8	7−6	5−4	9−8	7−6	5−4
B. fragilis	3.13	3.13	3.13	0.78	0.39	0.39
F. varium	3.13	1.56	1.56	100	100	100
F. necrophorum	1.56	1.56	0.78	25	25	12.5
E. lentum	6.25	6.25	6.25		0.19	0.19
B. adolescentis	6.25	6.25	3.13	0.19	0.19	0.19
P. prevotii	3.13	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78
P. aerogenes	0.78	0.39	0.39	0.78	0.39	0.39
P. variabilis	3.13	3.13	1.56	3.13	1.56	1.56
P. anaerobius	3.13	3.13	3.13	6.25	6.25	3.13
Pst. anaerobius	6.25	3.13	3.13	0.39	0.39	0.39
NCTC Group VII		3.13	1.56			1.56
V. parvula		0.39	0.39		50	50

* 9−8 : 10^{9-8}/ml

量の増加は2倍程度ではあるが，MICを高くする傾向を示した。

4) 前培養の時間の影響

GAM 高層で 24 時間培養した被検菌の1白金耳量(内径 1 mm) を GAM 液体培地 10 ml に接種した。その 6, 12 および 24 時間培養菌液を用いて画線塗抹法により TP および DOTC に対する感受性値を測定し比較した。6, 12 および 24 時間培養菌液の 1 ml あたりの生菌数は各々 10^5～10^6, 10^7～10^8 および 10^8～10^9 であることが定量培養により確かめられた。Table 5 に示すとおり，GAM 液体培地での培養時間が長くなれば，MIC が高くなる傾向を示した。前培養の時間が長くなればそれだけ接種菌量が多くなる結果と考えられる。TP では 13 株中 9 株は，6, 12 および 24 時間の前培養菌液を使用した場合の MIC はたつた1希釈段階以内の差におさまつた。残りの4株中3株は2希釈段階異なり，1株は4希釈段階異なつた。DOTC では 13 株中 10 株は 1 希釈段階以内の差であり，残りの3株は2希釈段階の差であつた。

5) 接種方法の影響

GAM 液体培地での 24 時間培養菌を

Table 5. Time of incubation and MIC

Organism \ Time of incubation(hr)	MIC (μ g/ml) TP 6	12	24	DOTC 6	12	24
B. fragilis	12.5	6.25	6.25	0.19	0.39	0.19
B. melaninogenicus	0.19	0.39	0.19	0.19	0.19	0.19
F. varium	1.56	1.56	1.56	0.78	1.56	0.78
F. nucleatum	0.19	3.13	0.39	0.19	0.19	0.19
E. lentum	3.13	6.25	12.5	0.19	0.39	0.19
B. adolescentis	3.13	3.13	6.25	0.78	0.78	1.56
V. parvula	0.78	1.56	3.13	0.19	0.39	0.78
P. prevotii	3.13	3.13	3.13	0.78	1.56	1.56
P. aerogenes	0.19	0.39	0.39	0.39	0.19	0.19
P. varia ilis	3.13	3.13	3.13	0.39	1.56	0.78
P. anaerobius	1.56	6.25	3.13	0.39	0.39	0.39
Pst. anaerobius	3.13	3.13	3.13	0.19	0.19	0.19

Table 6. Inoculating methods and MIC

Organism \ Inoculating method	MIC (μ g/ml) SBPC S	A	PMDM S	A	CEZ S	A	TP S	A
B. fragilis	100	25	0.78	0.78	6.25	25	3.13	6.25
B. melaninogenicus	25	25	0.19	0.19	0.39	0.19	1.56	3.13
F. varium	100	100	100	100	100	100	1.56	1.56
F. necrophorum	0.39	0.39	25	50	0.19	0.19	0.78	1.56
F. nucleatum	0.19	0.19	50	50	0.19	0.19	0.78	0.39
P. acnes	0.39	0.78	0.19	0.19	0.19	0.19	0.78	1.56
E. lentum	100	100	0.78	1.56	100	100	6.25	3.13
B. adolescentis	1.56	1.56	0.39	0.78	12.5	3.13	3.13	6.25
C. ramosum	25	25	0.78	1.56	1.56	6.25	3.13	3.13
V. parvula	6.25	3.13	50	100	0.19	0.19	0.78	0.78
P. prevotii	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	3.13	3.13
P. aerogenes	0.19	0.39	0.78	0.78	0.19	0.19	0.78	1.56
P. variabilis	0.78	1.56	0.78	1.56	0.78	0.78	3.13	3.13
P. anaerodius	0.78	0.78	6.25	6.25	0.19	0.19	3.13	6.25
Pst. anaerobius	12.5	12.5	3.13	1.56	0.78	0.78	3.13	6.25
NCTC Group VII	0.19	0.19	3.13	3.13	0.19	0.39	3.13	6.25

* S : Streak method by a loop (inner diameter 1 mm)

** A : Multipurpose inoculating apparatus method

通常の画線塗抹する方法と多目的アパラッツス用のメザラの溝に約 1 ml を入れ多目的アパラッツスで接種した場合との成績を比較した。16 菌株の 4 種類の薬剤に対する感受性の比較を Table 6 に示した。

SBPC では 16 株中 11 株は両方法での MIC が一致した。残りの 5 株中 3 株は多目的アパラッツスによる MIC 値がより耐性に判定され，2 株は画線塗抹法による MIC 値がより耐性に判定された。PMDM では 16 株中 9 株が一致した。残りの 7 株中 6 株は多目的アパラッツスによる MIC 値がより耐性に判定され 1 株だけ画線塗抹法でより耐性に判定された。CEZ では 16 株中 11 株が一致した。残りの 5 株中 4 株は多目的アパラッツスでより耐性に判定され，1 株だけ画線塗抹法でより耐性に判定された。最後に TP では 16 株中 5 株が一致した。残りの 11 株中 9 株は多目的アパラッツスでより耐性に判定され，2 株だけが画線塗抹法でより耐性に判定された。全体として，多目的アパラッツス使用の場合の MIC 値が画線塗抹法による MIC 値より 2 倍程度，時に 4 倍程度耐性に判定される傾向を示した。

6) 嫌気ジャー内の CO_2 濃度の影響

CO_2 100% の嫌気ジャー内で嫌気培養した場合と CO_2 10% N_2 90% の嫌気ジャーで培養した場合とで MIC 値を比較した。薬剤には CO_2 により影響を受けるといわれるマクロライド系の PMDM を供した。GAM 液体培地での 24 時間培養菌とその 10^{-2} 倍希釈液を接種菌液として多目的アパラッツスにより接種した。この時の 24 時間培養菌液の 1 ml あたりの生菌数は 10^7～10^8 であつた。Table 7 に示すとおり，100% CO_2 環境で培養された場合の MIC は 10% CO_2 90% N_2 の嫌気環境で培養された場合の MIC より 2 倍程度耐性に判定される傾向がみられた。培地の pH は CO_2 10% N_2 90% の嫌気ジャー内で 37°C 24 時間放置されると約 0.5～1.0 低下することが確かめられている。CO_2 100% の嫌気ジャーに置かれても培地の pH は約 1.0 低下するだけである。

Table 7. CO_2 concentration in jar and MIC of PMDM

	Inoculum size			
	10^{7-8}/ml		10^{5-6}/ml	
Organism \ CO_2 conc. (%) in jar	100	10	100	10
B. fragilis	1.57	0.39	0.78	0.39
B. melaninogenicus	0.19	0.19	0.19	0.19
F. varium	100	100	100	100
F. necrophorum	100	25	50	25
F. nucleatum	50	50	25	50
P. acnes	0.19	0.19	0.19	0.19
E. lentum	0.39	0.19	0.19	0.19
B. adolescentis	0.19	0.19	0.19	0.19
C. ramosum	0.78	1.56	0.78	0.78
V. parvula	100	50	50	50
P. prevotii	0.78	1.56	0.78	0.78
P. aerogenes	1.57	0.78	0.78	0.39
P. variabilis	6.25	3.13	3.13	1.56
P. anaerobius	6.25	6.25	6.25	6.25
Pst. anaerobius	0.39	0.39	0.39	0.39
NCTC Group VII			0.78	1.56

* 100% CO_2 in jar　　** 10% CO_2 and 90% N_2 in jar

考　　按

各種薬剤の嫌気性菌に対する MIC 測定に関しては，好気性菌の場合と同様に液体培地を用いる方法と寒天培地を用いる方法がある。MOORE ら[3]は，嫌気的条件下での Broth dilution method により MIC を測定している。しかし Agar dilution method により MIC を測定している研究者が多い[4,5,6,7]。

著者らは，GAM 寒天培地を基礎培地とする Agar dilution method で嫌気性菌の MIC を測定している。GAM 寒天培地は培地中に各種栄養素を豊富に含有するように工夫されているため，諸外国で用いられている他の基礎培地と比較して，血液を添加する必要がないという長所がある。また，Liver veal agar (Difco)，Brain heart infusion agar (BBL)，Columbia agar (BBL)，Schaedler agar (BBL)，および Brucella agar (BBL) に血液を添加した培地と比較して，嫌気性菌の発育支持力はまさるとも劣らない。ある薬剤に関して GAM 寒天培地を用いて測定した MIC は他の培地を用いて測定した MIC より耐性に判定される傾向を示すことが知られている[12]。著者はこのような特徴を有する GAM 寒天培地を薬剤感受性測定用培地として用いている。

臨床材料からの分離菌等で急を要する時には GAM 高層での 1 夜～24 時間培養菌を白金耳でとり薬剤含有平板に画線塗抹する方法を行なうことがあつた[11]。GAM 半流動高層による培養法は，嫌気性菌を好気的環境下でも発育させることができる唯一の方法であり，特別の嫌気培養装置を必要としない。すなわち，ひじように簡単な操作ですませることができる。しかし接種菌量が不均一となることが予想され MIC が

接種菌量により影響を受けるならば成績の正確さと再現性の点で問題となる。また，GAM 半流動高層に含有される寒天は薬剤含有平板上に集落様の粒子を作り，判定を困難にする。GAM 半流動高層での 24 時間培養菌のよく発育している部位からの 1 白金耳量を画線塗抹する方法と GAM 液体培地での 24 時間嫌気培養菌液からの 1 白金耳量を画線塗抹する方法での MIC 値の比較では，予想した程の差は認められなかつたが，寒天を含有しない GAM 液体培地での培養菌液を使用した場合の判定が容易であつた。著者らは，GAM 液体培地での嫌気培養菌液を接種菌液として用いることにした。

しかし，この接種菌液作成の方法は研究者により異なる。FINEGOLD ら[8]は 5% 羊血液加 Fluid thioglycollate medium での 48 時間培養菌液を 10^{-2} 倍に希釈したものをかつて用いていた。しかしその後 6 時間培養菌液を用いるようになつた。また KISLAK[5] は，寒天培地での 48 時間培養菌を液体培地に均等に浮遊させたものを用いた。外国の文献中にみられる MIC と著者らの MIC を比較するために設定して行なつた実験から，FINEGOLD らの MIC は，著者らの MIC より低く現われていると考えられた。その原因は接種菌液の 1 ml あたりの生菌数に求められる。著者らの用いる接種菌液は 1 ml あたり 10^8～10^9 であり，FINEGOLD らの方法に準じた接種菌液は 10^6～10^7 であつた。KISLAK に準じた接種菌液作成法での MIC は著者らの MIC より高く現われた。KISLAK の方法に準じた接種菌液の 1 ml あたりの生菌数は 10^8 であつた。接種菌液の生菌数がほぼ等しいにもかかわらずこのように差を生じた理由として接種方法が問題となる。すなわち画線塗抹法と多目的アパラッツス法のちがいである。1 ml あたり 10^9 の生菌数を有する菌液からの 1 白金耳量（内径 1 mm）には 10^5～10^6 の生菌数を有し両方法間で差はほとんどない。しかし，この 10^5～10^6 の菌は，画線塗抹法では薬剤含有平板上の約 20 mm^2 に接種され，多目的アパラッツス法では約 13 mm^2 に接種される。GAM 液体培地での菌の発育は，6 時間で 1 ml あたり 10^5～10^6，12 時間で 10^7～10^8，そして 24 時間で 10^8～10^9 である。実験成績から嫌気性菌でも GAM 液体培地での 6 時間培養菌液を用いて MIC 測定が可能であり，その MIC 値は 24 時間培養菌液使用の場合よりも 2 倍ほど低いだけである。6 時間培養菌液を接種菌液にした場合，判定が容易であつた。

嫌気性菌ににおいても多目的アパラッツスを用いる接種方法が，FINEGOLD[4]，WASHINGTON[7]，INGHAM[6] らにより行なわれている。多目的アパラッツス使用の際の彼らの接種菌液 1 ml あたりの生菌数は，各々 10^5～10^6，10^5～10^6，および 10^5 である。同じ接種菌液を用いても多目的アパラッツスで接種して得た MIC 値は画線塗抹法によつて得た MIC よりやや高く判定されることはすでに述べた。

嫌気性菌の各種薬剤に対する感受性測定ににおける Agar dilution method の標準化の第 1 歩として，主に接種菌液作成方法，接種菌量および接種方法が MIC に及ぼす影響について検討した。その結果，接種菌液は寒天を含有しない液体培地を用いて作成し，その 1 ml あたりの生菌数は 10^5～10^6（6 時間培養菌液）とする。接種方法は多目的アパラッツスを用いる。上に述べた方法が，MIC 測定操作の正確さ，迅速性および簡易性の観点から優れていることが認められた。その手技の実際例についてはさらに詳細に検討し，これらの方法による成績の再現性については第 2 報に報告する。

結　論

嫌気性菌に対する薬剤感受性試験法の標準化の検討を行ない，次の結果を得た。

1) 被検菌の前培養には液体培地を用いる。寒天を含有した半流動培地での前培養は，判定の際，正確さを欠く可能性がある。

2) 接種菌量は MIC に変動を与える。操作を迅速に行なうためにも嫌気性菌では 6 時間培養菌液（1 ml あたり 10^5～10^6）を用いることを提案する。

3) 接種方法は多目的アパラッツスを用いる。この方法では一度に多数の菌が接種でき，簡単かつ迅速に操作を終えることができる。従がつて酸素の嫌気性菌への影響も最少限にすることができる。

4) 嫌気ジャー中の CO_2 はある種の薬剤（PMDM）の抗菌力に影響を与えた。

稿を終るに当り，本研究の実施に際し，ご指導，ご校閲を戴いた当教室の恩師 鈴木祥一郎教授，上野一恵助教授，二宮敬宇助手に深謝致します。さらに本実験に協力下された当教室の各位にも感謝致します。

文　献

1) 小酒井望，鈴木祥一郎編：嫌気性菌と嫌気性菌症，医学書院，1968

2) 上野一恵：国産スチールウール（steel wool）による嫌気性培養法の実際。メディアサークル 57：1～7，1964

3) WILKINS, T. P. L. V. HOLDEMAN, I. J. ABRAMSON & W. E. C. MOORE: Standardized single disc method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. Antimicr. Agents & Chemoth. 1: 451～459, 1972

4) SUTTER, V. L.; Y. Y. KWOK & S. M. FINEGOLD: Standardized antimicrobial disc susceptibility testing of anaerobic bacteria. I. Susceptibility of *Bacteroides fragilis* to tetracycline. Appl.

Microb. 23 : 268～275, 1972
5) KISLAK, J.W. : The susceptibility of *Bacteroides fragilis* to 24 antibiotics. J. Inf. Dis. 125 : 295～299, 1972
6) INGHAM, H.R. ; J.B. SELKON, 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
7) MARTIN, W.I. ; M. GARDNER & J.A. WASHINGTON II : *In vitro* antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens. Antimicr. Agents & Chemoth. 1 : 148～158, 1972
8) FINEGOLD, S.M ; .N.E. HARADA & L.G. MILLER: Lincomycin ; Activity against anaerobes and effects on normal human fecal flora. Antimicr. Agents & Chemoth. 5 : 659～667, 1965
9) SUTTER, V.L. ; Y.Y. KWOK & S.M. FINEGOLD: Susceptibility of *Bacteroides fragilis* to six antibiotics determined by standardized antimicrobial disc susceptibility testing. Antimicr. Agents & Chemoth. 3 : 188～193, 1973
10) 二宮敬宇, 向坂 孝, 上野一恵, 鈴木祥一郎 : 嫌気性菌の薬剤感受性試験法について。Chemotherapy 19 : 106～110, 1971
11) 上野一恵, 二宮敬宇, 大谷文茂, 向坂孝, 鈴木祥一郎 : Thiamphenicolの嫌気性菌に対する抗菌作用について。Chemotherapy 19 : 115～118, 1971
12) 二宮敬宇, 谷 悦子, 渡辺邦友, 牛嶋彊, 上野一恵, 鈴木祥一郎, 清水保夫, 坂 義人, 毛 泉, 磯貝和俊, 西浦常雄 : Propionylmaridomycin の嫌気性菌に対する抗菌作用。Chemotherapy 21 : 982～988, 1973

STANDARDIZED ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF ANAEROBES
1. FACTORS INFLUENCING AGAR DILUTION MIC

KUNITOMO WATANABE
Department of Bacteriology, Gifu University School of Medicine

Agar dilution method with GAM agar (Nissui) has been used for susceptibility testing of anaerobes in our laboratory. MIC of an antibiotic for an organism has to be defined according to the condition of test.

Strains tested are grown in GAM broth (Nissui) anaerobicaly. Semisolid culture is not appropriate as inoculum. It is possible that a 6-hour culture in GAM broth is employed as inoculum. A 6-hour culture has 10^5 to 10^6 living cells per ml. This inoculum is applied very easily and rapidly to the surface of the susceptibility plates by means of a multiporpous apparatus. The plates are incubated at 37°C in anaerobic jars (Steelwool copper sulfate method ; CO_2 10%, N_2 90%), and are read after about 48 hours of incubation.