

嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について 第3報

1 濃度ディスク法の検討 (1)

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 50 年 5 月 30 日受付)

著者は嫌気性菌の薬剤感受性試験法についての検討を重ね、その基礎的方法である寒天希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) の測定に関しては、いちおう再現性のある方法を定めた^{1,2)}。しかしこの希釈法は操作が複雑なため一般検査室ではより簡易なディスク法により希釈法で求められる MIC の近似値を求めることが望まれている。金沢³⁾は、すでに多くの菌種の嫌気性菌をひとまとめとして1濃度ディスク法の検討を行ない報告したが、嫌気性菌は菌種により発育の遅速が著しい。

そこで本報では、先づ嫌気性菌の中で最も発育の良い菌種の1つである *Clostridium perfringens* を用いて1濃度ディスク法の検討を行なった。

実験材料および方法

供試菌株: *Clostridium perfringens* 52 株を用いた。これらは教室の三和が 1973 年に南極の昭和基地周辺の土壌から分離した株³⁾と岐阜市の土壌から分離された株および臨床材料から分離された株である。

供試薬剤およびディスク: 原末は、製薬会社から分与をうけた力価の明らかな 12 種類を用いた。ディスクは市販の昭和ディスクを用いた。以下、12 種の薬剤とその1濃度ディスクの力価を示す。Penicillin-G (PCG): 20 u, Aminobenzylpenicillin (ABPC): 30 μ g, Cephaloridine (CER): 30 μ g, Erythromycin (EM): 50 μ g, Oleandomycin (OLM): 30 μ g, Spiramycin (SPM): 30 μ g, Lincomycin (LCM): 30 μ g, Clindamycin (CLDM): 30 μ g, Chloramphenicol (CP): 100 μ g, Tetracycline (TC): 200 μ g, Streptomycin (SM): 50 μ g および Kanamycin (KM): 50 μ g。

最小発育阻止濃度 (MIC) の測定方法: GAM 寒天(日水)を基礎培地とする寒天希釈法を用いた。各種薬剤の1,000 μ g/ml 溶液を原液とし 1.9 μ g/ml まで2倍希釈した。その各々 2 ml に約 50°C に保温された GAM 寒天を 18 ml 添加しよく混合し平板に固めた。被検菌の GAM ブイヨン(日水)での 4~6 時間嫌気培養菌液をそのまま (MC FARLAND standard solution の #1~#1 の半分の濁度に相当)、また濁度が著しく高いものに

については UENO's diluent⁴⁾ あるいは 0.05% の Yeast Extract 水溶液で上述した濁度に調整したものを接種菌液として用いた。この時の生菌数は 10⁵~10⁶/ml である。感受性測定用 GAM 平板には多目的アパラツス(武藤器械)を用いて迅速に接種し、37°C で通常 20~24 時間嫌気培養した。

1 濃度ディスク法による阻止円の直径測定: 1 濃度ディスク法に用いる培地には希釈法と同様に GAM 寒天を用いた。ペトリ皿(内径 8.5 cm)への分注量は 20 ml とした。接種菌液の作成方法は希釈法に準じた。GAM 平板には市販の cotton swab (大日本製薬)を用いて同一平板に同一 cotton swab で少くとも3方向からていねいに塗抹された。この時の平板1枚あたりの接種生菌数は、約 10⁴ 個である。1枚の平板には3種類のディスクを限度とした。ディスクを培地表面に密着させ、直ちに 37°C で 20~24 時間嫌気培養した。

阻止円の直径はノギスで測定し、小数点1位を4捨5入 mm 単位で求めた。楕円形の阻止円の場合には長径と短径を平均した値を用いた。

嫌気性培養法: 嫌気性培養法はスチールウール法(CO₂ 10%, N₂ 90% ガス環境下)を用いた。

実験成績および考察

1) MIC の分布

供試した 12 種類の薬剤の *C. perfringens* に対する MIC の分布を Table 1 に示した。PCG は *C. perfringens* 25 株全株に対し 0.39 μ g/ml 以下、ABPC は 52 株全株に対し 0.39 μ g/ml 以下の MIC を示した。CER は 25 株全株に対し 3.13 μ g/ml 以下の MIC を示した。

EM, OLM および SPM は、25 株に対しそれぞれ 0.78~12.5 μ g/ml, 1.56~50 μ g/ml および 1.5~12.5 μ g/ml の MIC を示した。LCM は 44 株に対し 0.19~25 μ g/ml の範囲の MIC を示し 0.19 μ g/ml と 6.25 μ g/ml とにピークをもつ2峰性を示した。CLDM は 44 株全株に対し 1.56 μ g/ml 以下の MIC を示した。WILKIN⁵⁾らにより報告された CLDM に高度耐性の *C. perfringens* はここでは認められていない。

Table 1 Distribution of MICs of *C. perfringens* to 12 antimicrobial agents

Drug	No. of strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
		0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
PCG	25	21	4								
ABPC	25	24	1								
CER	24	1		5	5	13					
EM	24			1	14	9	1				
OLM	25				1	2	18	3		1	
SPM	25						11	14			
LCM	43	11	6	1	6	3	10	4	2		
CLDM	44	21	10	6	6	1					
CP	25				1	24					
TC	44	36				1	3	2	1	1	
SM	26										26
KM	26										26

CP は 25 株に対し 1.56~3.13 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し, TC は 44 株中 36 株に対し 0.19 $\mu\text{g/ml}$ 以下の MIC を, また残りの 8 株に対しては 3.13~50 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示した。

SM, KM は 26 株全株に対し 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示した。

2) 阻止円の直径の大きさの分布

10 種類のディスクの周囲に生じた阻止円の直径の大きさの分布を Fig. 1 に示した。

PCG ディスクには, 25 株とも直径 34 mm 以上の阻止円を生じ, ABPC には 52 株全株とも直径 40 mm 以上の阻止円を生じた。CER には, 直径 23~36 mm の

阻止円を生じた。

EM, OLM および SPM ディスクには, それぞれ 19~36 mm, 10~20 mm および 19~26 mm の直径の阻止円を生じた。LCM には, 19~42 mm, CLDM には 22~39 mm の直径の阻止円を生じた。

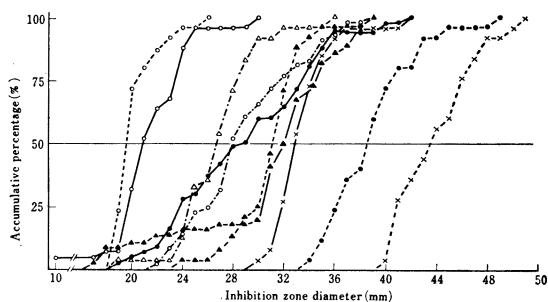
CP ディスクには 29~42 mm, TC には 17~39 mm

Table 2 Effect of inoculum size on zone diameters around discs (*C. perfringens*)

Strain	Inoculum size	Disc**			
		CP	LCM	AB-PC	TC
Sakai	7*	29	27	45	22
	6	31	30	47	24
	5	34	33	47	24
	4	37	37	—	—
JAM 10-1	7	29	22	42	31
	6	34	28	46	35
	5	36	29	49	35
	4	36	30	—	—
JAM 1-2	7	28	24	41	31
	6	33	27	47	35
	5	35	28	48	38
	4	36	28	—	—
JAM 84-1	7	29	29	45	31
	6	34	32	47	34
	5	37	35	52	37
	4	38	36	—	—

* 7 : $10^7/\text{ml}$

** Potency : CP 100 μg , LCM 30 μg , ABPC 30 μg , TC 200 μg

Fig. 1 Distribution of inhibition zone diameters around discs (*C. perfringens*)

PCG (20 u) ●.....● AEPC (30 μg) ×.....×
 CER (30 μg) ▲.....▲ EM (50 μg) △.....△
 OLM (30 μg) ○.....○ SPM (30 μg) ○.....○
 CLDM (30 μg) ○- - - - ○ LCM (30 μg) . - - .
 CP (100 μg) × - - - × TC (200 μg) ▲ - - - ▲

の直径の阻止円を生じた。KM, SM ディスクの周囲には 1 株も阻止円を生じなかった。

3) 阻止円の直径の大きさに及ぼす接種菌量と培養時間の影響

接種菌液の 1 ml あたりの生菌数を 10^7 個から 10^4 個までの 4 段階に変化させ阻止円の直径の大きさを比較した成績を Table 2 に示した。

接種菌液 1 ml あたりの生菌数の増加は, CP, LCM, ABPC および TC のいずれのディスクでも阻止円の直径を小さくした。1 ml あたりの生菌数 $10^5 \sim 10^6$ 個の接種菌液を用いた時の阻止円が, 最も鮮明で測定しやすかった。

次に平板にディスクを置いてからの嫌気培養時間を 12 時間, 24 時間とし, それぞれの阻止円の直径を測定し比較した (Table 3)。

TC, CP, EM, LCM, ABPC および CER いずれの薬剤も培養時間の影響は小さかった。

4) MIC と阻止円の直径の相関

各菌株につき寒天希釈法による MIC と 1 濃度ディスク法による阻止円の直径を求め, 両者の相関を検討した。

C. perfringens の感受性の程度が比較的広い範囲に分布した薬剤 LCM, CLDM および TC について MIC と阻止円の直径の相関を Fig. 2, 3, 4 に示した。LCM ではよく相関した。TC では, 感性菌と耐性菌を区分する点を MIC $1.56 \mu\text{g/ml}$, 阻止円の直径 28 mm 付近に置くことができる。PCG, ABPC, CER, EM, OLM, SPM, CP でも MIC と阻止円の直径はひじょうに狭い範囲に集合して分布した。すなわち, 1 濃度ディスク法で求めた阻止円の直径から希釈法によって求めた MIC と近似の値をかなり正確に推定できることを示唆した。

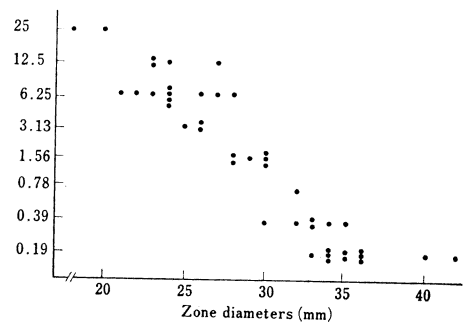
5) 1 濃度ディスク法による感受性の程度分類

細菌のある抗菌剤に対する感受性の程度は薬剤の通常の投与によって得られる血中濃度により推定することが

できる。

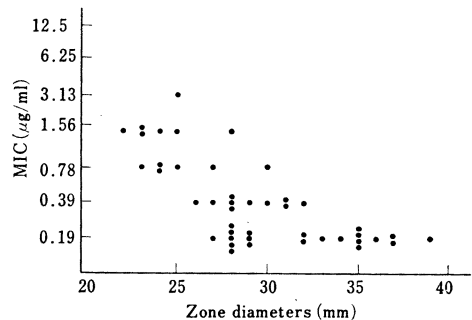
感受性の程度を MIC により 3 段階に分類した表について, 1 濃度ディスク法による阻止円の直径を MIC の代りにあてはめるなら Table 4 のようになる。

Fig. 2 Relationship between zone diameters around LCM discs and MIC values



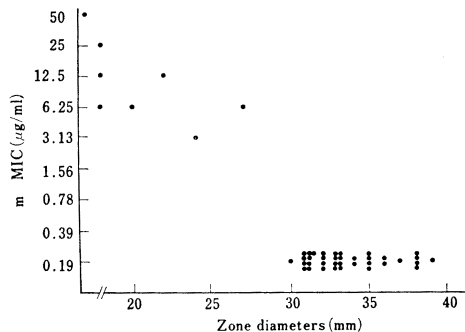
* *C. perfringens* : 43 strains ** LCM (30 μg)

Fig. 3 Relationship between zone diameters around CLDM discs and MIC values



* *C. perfringens* : 44 strains ** CLDM (30 μg)

Fig. 4 Relationship between zone diameters around TC discs and MIC values



* *C. perfringens* : 44 strains ** TC (200 μg)

Table 3 Effect of incubation time on zone diameter around discs (*C. perfringens* 1 strain)

Disc (Potency)	Incubation time (hr)	
	12	24
TC (200 μg)	20*	20
CP (100 μg)	30	29
EM (50 μg)	23	24
LCM (30 μg)	30	31
ABPC (30 μg)	37	38
CER (30 μg)	29	27

* Inhibition zone diameter (mm)

Table 4 Estimation of susceptibility of *C. perfringens* to antimicrobial agents based on inhibition zone diameters

Disc (Potency)	Susceptibility		
	Susceptible	Inter- mediate	Resistant
PCG (20 μ g)	*34 or more (** ≤ 1.56)		
ABPC (30 μ g)	40 or more (≤ 1.56)		
CER (30 μ g)	31 or more (≤ 1.56)		
EM (50 μ g)	33 or more (≤ 0.78)	32 to 19	(50 $\leq$)
OLM (30 μ g)	(≤ 0.78)	30 to 16	15 or less (25 $\leq$)
SPM (30 μ g)	(≤ 3.13)	26 to 19	(50 $\leq$)
LCM (20 μ g)	30 or more (≤ 0.78)	29 to 21	(50 $\leq$)
CLDM (30 μ g)	31 or more (≤ 3.13)		
CP (100 μ g)	30 or more (≤ 3.13)		
TC (200 μ g)	30 or more (≤ 1.56)	29 to 25	24 or less (100 $\leq$)
SM (50 μ g)			8 or less (100 $\leq$)
KM (50 μ g)			8 or less (100 $\leq$)

* Inhibition zone diameter (mm)

** MIC (μ g/ml)

ま と め

C. perfringens の GAM ブイヨンでの 4~6 時間嫌気

培養菌液 (MC FARLAND standard solution #1~#1 の半分の濁度) を cotton swab で、培地分注量 20 ml の GAM 平板 (ペトリ皿内径 8.5 cm) に塗抹し、ディスクを置き、20~24 時間嫌気培養して求められる阻止円の直径の大きさは、著者の標準化した希釈法によって得られる MIC とよく相関した。

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、二宮敬宇講師に深謝いたします。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 : 1459~1465, 1974
- 2) 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 2 報。再現性について。Chemotherapy 22 : 1495~1501, 1974
- 3) KANAZAWA YUTAKA & TOSHIO KURAMATA: Disc sensitivity testing of anaerobic bacteria. Progress in chemotherapy, II, 67~72, 1974
- 4) 三和敏夫, 他：南極大陸の昭和基地周辺地域から分離された *C. perfringens* の薬剤感受性。医学と生物学 91 : 57~61, 1975
- 5) BALOWS *et al.*: Anaerobic Bacteria, Role in Disease, C. C. Thomas, Springfield, Ill., U.S.A., 1972
- 6) WILLKINS, T. D. & T. THIEL : Resistance of some species of *Clostridium* to clindamycin. Antimicrob. Agents & Chemother. 3 : 136~137, 1973

STANDARDIZED ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY
TESTING OF ANAEROBES. 3Single Disc Diffusion Method (*C. perfringens*)

KUNITOMO WATANABE

Department of Bacteriology, Gifu University School of Medicine

The susceptibility of *C. perfringens* was determined by both agar dilution method and single disc diffusion method. The agar dilution method was the standardized method described in previous papers. The single disc diffusion method was as follows: The inoculum was a 4 to 6 hr culture in GAM broth (Nissui). It has almost the same turbidity as #1 MC FARLAND standard solution. The plate (GAM agar) poured to a depth of 5 to 6 mm was applied with a cotton swab soaked in inoculum and incubated in jars (Steel-wool copper sulfate method, Atmosphere: CO₂ 10%, N₂ 90%) at 37°C. Inhibition diameters were measured after 20 to 24 hrs.

Inhibition zone diameters and agar dilution MICs had a good correlation each other. Inhibition zone diameters could be used in place of the minimal inhibitory concentrations of the drug used.