

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(2)

渡辺 邦友・上野 一恵

岐阜大学医学部付属嫌気性実験施設

甲畑 俊郎・渡辺 泉・江崎 孝行

今村 博務・二宮 敬宇・鈴木祥一郎

岐阜大学医学部微生物

沢 赫代・沢村 治樹・川出 真坂

岐阜大学医学部付属病院中央検査部

(昭和 55 年 3 月 24 日受付)

Bacteroides group の 50 株の LCM, CLDM, CP, TP, MINO, CEZ の 6 薬剤に対する感受性を GAM 寒天培地 (ニッスイ) を用いた寒天希釈法および 1 濃度ディスク法で測定し, *B. fragilis* group に対し 1 濃度ディスク法が成立するか否かを検討した。その結果, 寒天希釈法によって得られた最小発育阻止濃度 (MIC) と 1 濃度ディスク法によるディスク周囲に生じた阻止円の直径とは, よく相関した。同時に検討した 3 濃度ディスク法では, TC を除きかなりよく相関した。TC では, 12.5~25 µg/ml と比較的高い MIC を示した 15 株中 9 株が卍と判定された。

序 文

著者らは嫌気性菌の薬剤感受性試験法についての検討を重ね, 寒天希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) の測定に際し, 再現性の高い実験条件を定めた^{1,2)}。またこの寒天希釈法による MIC を基礎とし, 1 濃度ディスク法の検討を行ない, *Clostridium perfringens*³⁾ と嫌気性球菌 (*Peptococcus*, *Peptostreptococcus*)⁴⁾ についての成績を示した。本報では *Bacteroides fragilis* group (*Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. ovatus* など) について 1 濃度法が成立するか否かを, また 3 濃度ディスク法についても若干の検討を加えた。

材料と方法

供試菌株

教室保育の *Bacteroides fragilis* group 50 株を供試した。これらは各種臨床材料およびヒトの糞便から分離され, 著者らの方法⁵⁾により同定されたものである。

供試薬剤の原末およびディスク

原末は, 栄研化学から分与を受けた力価の明らかな Lincomycin (LCM), Clindamycin (CLDM), Chloramphenicol (CP), Tetracycline (TC), Minocycline (MINO), および Cefazolin (CEZ) の 6 種類である。ディスクは, 市販の 1 濃度ディスク (昭和) および 3 濃度

ディスク (栄研化学) の 2 種である。

最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

著者らの標準化された方法に従った¹⁾²⁾。ただし, 測定条件をより一定にするために今回は, 嫌気培養法に関しては, スチールウール法によらないで, 3 種混合ガス (CO₂ : H₂ : N₂ = 10 : 10 : 80) と室温で働く触媒 (細砕した白金をアルミナで被覆したもの) により嫌氣的にされ, 37°C に調整されたアネロボックス (平沢製作所) を用いる方法によった。以下, アネロボックス法と称する。

1 濃度ディスク法による阻止円の直径の測定

先に報告した *C. perfringens* の場合と同様の方法で行なった³⁾。嫌気培養は MIC 測定の場合と同様にアネロボックス法である。

1 濃度ディスク法の阻止円の直径の再現性

同一菌株, 同一薬剤ごとに 5 系列の平板を準備し, 各平板で求めた 5 個の測定値の最大値と最小値およびその差を比較した。

1 濃度ディスク法の阻止円の直径に及ぼす培養環境の影響

スチールウール法とアネロボックス法とでの成績を比較検討した。各々 2 系列の平板を準備し, 2 個の測定値の平均値を求めて比較した。スチールウール法は, ジャー内のガス環境を CO₂ 100%, CO₂ 20%, N₂ 80%, N₂

Table 1 Ranges of zone diameters around 6 kinds of discs with 5 control strains

Antimicrobial Organism	Actual range of measurements (Min.-Max.)					
	LCM	CLDM	CP	TC	MINO	CEZ
<i>B. fragilis</i>	28.0~31.0	42.0~45.6	34.6~38.3	34.7~39.0	22.0~23.6	37.5~42.0
<i>B. distasonis</i>	48.2~53.6	55.1~59.4	41.2~51.2	49.4~56.2	33.4~35.8	50.4~56.6
<i>B. vulgatus</i>	40.1~46.4	51.2~54.8	40.6~41.4	39.8~42.8	37.5~41.8	43.1~53.6
<i>B. ovatus</i>	11.6~14.5	29.0~31.4	31.2~33.6	19.8~22.3	14.0~16.6	28.4~31.8
<i>B. thetaiotaomicron</i>	23.6~28.3	34.9~38.4	32.4~36.6	34.0~37.4	17.3~18.9	39.8~43.7

These values were based on 5 replicate determination.

Table 2 Variability of zone diameters

Antimicrobial Strain	Anaerobiosis Atmosphere	Steel-wool copper sulfate method			Anaerobic chamber
		CO ₂ : N ₂ 100: 0	CO ₂ : N ₂ 20: 80	CO ₂ : N ₂ 0: 100	CO ₂ : H ₂ : N ₂ 10: 10: 80
CLDM	1	51.4*	50.0	52.4	51.2
	2	8.0	8.0	8.8	8.0
	3	55.2	52.0	55.8	52.2
TC	1	43.6	43.0	42.8	41.2
	2	24.6	22.7	17.0	22.2
	3	23.7	21.2	38.4	38.7
CP	1	42.8	41.0	44.2	42.6
	2	38.6	37.4	36.2	33.8
	3	41.7	40.7	41.4	41.3
CEZ	1	24.6	28.6	24.4	23.4
	2	35.6	32.8	46.2	45.2
	3	30.4	32.3	30.7	34.8

* Zone diameter (Mean) (This value was based on 2 replicate determination.)

100% の3種類に変化させて検討した。

3濃度ディスク法

GAM ブイヨン(ニッスイ)での18時間嫌気培養菌液の0.3mlをGAM寒天(80×230mm)に滴下し、コンラージ棒で拡げた。ディスクを置き軽く圧迫したのち、アネロボックス内で18~24時間培養し、判定した。

成績

1) 1濃度ディスク法の阻止円の直径の再現性

Table 1に5菌株、6薬剤ごとに5個の測定値のうち最大値と最小値を示した。最大値と最小値の差は0.8mmから10.5mmの範囲に分布し、その大部分は2mmから4mmの範囲にあった。特に再現性の悪いディスクは認められなかった。

2) 1濃度ディスク法の阻止円の直径に及ぼす培養環境の影響

Table 2に4種類の異なる培養環境で測定した阻止円の直径を比較した成績を示した。TCディスクで1株、

CEZディスクで1株が、CO₂0%のスチールウール法とアネロボックス法での阻止円の直径とCO₂20%およびCO₂100%のスチールウール法での阻止円の直径との間に10mm以上の差を示したが、その他の場合は、1mmから7.6mmの差にとどまり、その多くは2mmから5mmの小さい差を示したにとどまった。

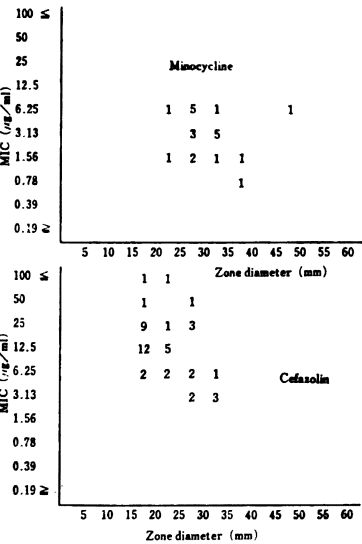
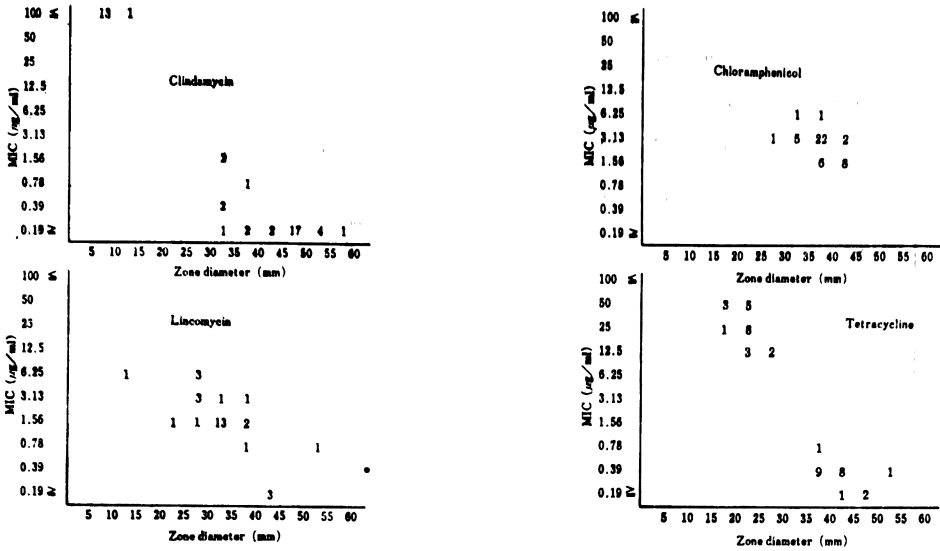
3) 1濃度ディスク法における阻止円の直径とMICとの関係

Fig. 1-1, 1-2, 1-3に1濃度ディスク法による阻止円の直径とMICとの関係を示した。

CLDMの1.56μg/mlに感受性を示す株は1濃度ディスク法で直径35mm以上の阻止円を生じ、CLDMの50μg/mlに耐性の株は全て直径10mm以下の阻止円を生じた。LCMの3.13μg/mlに感受性を示す株は、31株中29株までが1濃度ディスク法で直径25mm以上の阻止円を生じ、LCMの50μg/mlに耐性の13株中12株が直径10mm以下の阻止円を生じた。

CPは、*B. fragilis* group 46株に対して1.56~6.25

Fig. 1 Relationship between zone diameters around discs and MIC values



μg/ml の範囲の MIC を示し、1 濃度ディスク法で 25 mm~45 mm の阻止円の直径を有した。TC の 0.39 μg/ml に感受性を示す株は、1 濃度ディスク法で直径 30 mm 以上の阻止円を生じ、6.25 μg/ml に耐性の株は直径 30 mm 以下の阻止円を生じた。MINO は 12.5 μg/ml で全株の発育を阻止した。1 濃度ディスク法では全て直径 20 mm 以上の阻止円を生じた。CEZ は、*B. fragilis* group に対し 3.13~100 μg/ml 以上の MIC を示した。また 1 濃度ディスク法では直径 15~35 mm の阻止円を生じた。6 薬剤とも、MIC と阻止円の直径とは、よく相

関した。

4) 3 濃度ディスク法と MIC との関係

成績を Fig. 2 に示した。CLDM では、MIC 100 μg/ml 以上の株は、全て 3 濃度ディスク法で (-), MIC 1.56 μg/ml 以下の株は全て 3 濃度ディスク法で (卍) であった。LCM では、6.25 μg/ml 以下の MIC を示す 31 株中 3 株は (-) または (+), 残りの 28 株は (卍) または (卍) と 3 濃度法で判定された。TC では、MIC 12.5~50 μg/ml の 18 株中 3 株は (+) と、残りの 15 株は (卍) または (卍) と判定された。しかし 0.78 μg/ml 以下の MIC を示す 22 株は全て (卍) であった。MINO では MIC 6.25 μg/ml 以下の 46 株中 45 株は (卍) または (卍) と判定され、1 株だけが (+) と判定

Fig. 2 Relationship of MIC values to results from Eiken disc method

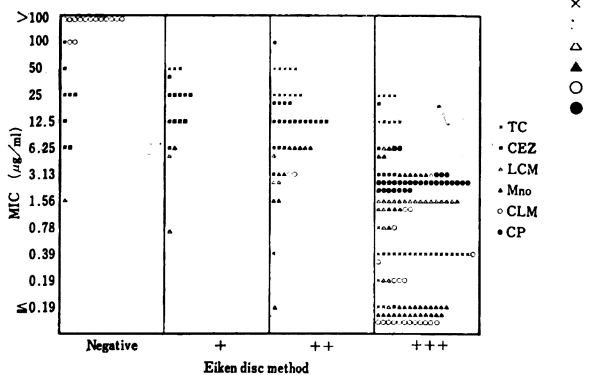


Table 3 Estimation of susceptibility of *B. fragilis* to antimicrobial agents based on inhibition zone diameters

Disc	Susceptibility		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
CEZ		35 mm~15 mm (8.13~30)	
LCM		20 mm or more (≤ 12.5)	
CLDM	30 mm or more (≤ 0.78)		
CP	30 mm or more (≤ 3.13)		
TC	35 mm or more (≤ 1.56)	35 mm~15 mm (3.13~30)	
MINC		35 mm~25 mm (1.56~6.25)	

された。CEZ では、MIC 25 $\mu\text{g/ml}$ の 13 株中 8 株は (-) または (+), 残りの 5 株は (++) または (+++) と判定された。また 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示す 16 株中 5 株は (-) または (+) と, 残りの 11 株は (++) と判定された。MIC 6.25 $\mu\text{g/ml}$ の 7 株中 3 株は (-) または (+) と, 残りの 4 株は (++) または (+++) と判定された。

考察およびまとめ

著者らは、嫌気性菌感受性測定法の標準化を試み、まず基本的方法としての希釈法の実験条件について検討し、さらには *C. perfringens* と嫌気性球菌 (*Peptococcus*, *Peptostreptococcus*) について 1 濃度ディスク法が成立することを報告した。要約すると *C. perfringens* については、検討した薬剤 (PCG, ABPC, CER, EM, OLM, SPM, LCM, CLDM, CP, TC, SM, KM) のすべてについて希釈法による MIC とディスク法による阻止円の直径との間には充分な相関関係が成立した。しかし嫌気性球菌では、*C. perfringens* と同一の実験条件でのディスク法の実施が困難であること、また同一の MIC でも阻止円の直径にかなりの幅がある傾向をうかがわせた。

今回は、臨床材料から最もしばしば分離される嫌気性菌である *B. fragilis* group について 1 濃度が成立するかを検討した。その結果は、先に示したように *C. perfrin-*

gens の場合と同様の実験条件で、検討した全ての薬剤 (LCM, CLDM, CP, MINO, CEZ) について、希釈法による MIC とディスク法による阻止円の直径との間には充分な相関関係が成立した。感受性の程度を MIC により感受性・中間、耐性と 3 段階に分類した表について、阻止円の直径を MIC に代用した時 Table 3 のようになる。*C. perfringens* の場合と比較できた 4 薬剤についてみると、LCM, CLDM, CP ではその境界となる値がよく一致したが TC では 5 mm 程度異なった。この TC での不一致の原因については、特別の検討を行っていないが、培養方法の差による影響を考えないとする、発育速度の差異あるいは TC ディスクの力価の差異に原因が求められるかも知れない。また 3 濃度ディスクについての検討の結果、CEZ, MINO, CLDM, CP, LCM については、満足すべき成績を得たが、TC については問題があった。すなわち (++) と判定された 31 株中 9 株に (29%), 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示す株があったことには注意すべきである。

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) 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 3 報。1 濃度ディスク法の検討(1)。Chemotherapy 24: 436~439, 1976
- 4) 今村博務, 渡辺邦友, 甲畑俊郎, 望月 泉, 三和敏夫, 二宮敏子, 上野一恵：嫌気性菌の薬剤感受性試験法, 嫌気性球菌の 1 濃度ディスク法について。Chemotherapy 24: 440~442, 1976
- 5) 臨床嫌気性細菌学：岐阜大学医学部微生物学教室編, 1978
- 6) YUTAKA KANAZAWA & TOSHIO KURAMATA: Disc sensitivity testing of anaerobic bacteria. Progress in chemotherapy, II, 67~72, 1974
- 7) 金沢 裕：感受性ディスク法の基礎と臨床 (1 濃度法を中心として)。メディアサークル 23: 71~75, 1978
- 8) 金沢 裕：感受性ディスク法の基礎と臨床 (1 濃度法を中心として)。メディアサークル 23: 199~204, 1978

STANDARDIZATION OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF ANAEROBES. 3

Single Disc Diffusion Test(2)

KUNITOMO WATANABE, KAZUE UENO

Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine

SCHUNRO KOBATA, IZUMI WATANABE, TAKAYUKI EZAKI, HIROMU IMAMURA,

KBIU NINOMIYA, SHOICHIRO SUZUKI

Department of Bacteriology, Gifu University School of Medicine

KAKUYO SAWA, HARUKI SAWAMURA and MASAKA KAWADE

Bacteriology Section, Clinical Laboratory, Gifu University Hospital

The antimicrobial susceptibilities of 50 strains of *Bacteroides fragilis* group (*B. fragilis*, *B. thetaio-taomicron*, *B. vulgatus*, *B. distasonis* and *B. ovatus*) were determined by the agar dilution technique described in the previous reports and by disc diffusion methods with the Showa discs and the Eiken discs.

The results are summarized as follows :

1. Relationship of agar dilution MICs to inhibition zone diameters around the Showa discs was considerably good about LCM, CLDM, CP, MINO, TP, and CEZ. The approximate MIC values may be obtained from inhibition zone diameters around discs.
2. Relationship of agar dilution MICs to results from Eiken disc method was also good about LCM, CLDM, CP, MINO and CEZ. But 9 strains determined as very sensitive to TC by Eiken disc method were resistant to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ or more of TC.