

最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について

(1968 年制定, 1974 年改訂)

諸外国での MIC 測定法と吾国との間に二、三の差違がみられることから、1979 年 3 月日本化学療法学会理事会より MIC 測定法の改訂の要望がなされ、藤井理事長より下記委員が委嘱され、委員会が組織された。約 1 ケ年培地及び接種菌量の検討を加え、また国外の主な研究機関よりアンケートを求め、以下に述べる改訂案を作製し、日本化学療法学会理事会に答申し、これ

が 1980 年 10 月 23 日理事会において承認された。

委員

五島 凌智子, 徐 慶一郎, 河喜多龍祥
小酒井 望, 三橋 進, 西野 武志
大沢 伸孝, 田波 洋

(A B C 順 責任者: 三橋 進)

最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂案	現 行 法 (1968 年制定, 1974 年改訂)	備 考
<p>1. 被検菌の抗菌薬感受性測定には、次の寒天平板希釈法を用いる。 感受性測定用培地としては Mueller-Hinton 培地を基礎とした半合成培地 (MH 培地と略す) を使用する。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。</p>	<p>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。</p>	<p>改訂案では Heart Infusion Agar の使用を廃止し、MH 培地を用いることにした。</p>
<p>2. 抗菌薬の濃度段階 下記の 100 $\mu\text{g/ml}$ より 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 $\mu\text{g/ml}$。 なお、100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度を使用する場合は、200, 400, 800, 1,600 $\mu\text{g/ml}$ とする。 ただし、力価として unit を用いる抗菌薬もすべて $\mu\text{g/ml}$ を使用すること。</p>	<p>2. 抗生物質の濃度段階 下記の 100 $\mu\text{g/ml}$ より 2 倍希釈を使用する。 100, 50, 20, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05, 0.025 $\mu\text{g/ml}$。 なお、100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度を使用する場合は 200, 400, 800, 1,600 $\mu\text{g/ml}$ とする。 ただし、力価として unit を用いる抗生物質もすべて $\mu\text{g/ml}$ を使用すること。</p>	<p>改訂案は現行法と同じ。</p>
<p>3. 接種用菌液 増菌用培地に培養後菌数を約 $10^8/\text{ml}$ に調整したものを接種菌液とする。 注1) 増菌用培地は下記の製品のいずれでもよいが、使用する感受性測定用寒天培地と同一の会社製品を使用することが望ましい。なお、製造会社名は明記すること。 Mueller-Hinton broth (Difco) 感受性測定用ブイヨン培地 (栄研, ニッスイ)</p>	<p>3. 接種用菌液 増菌用培地に約 $10^8/\text{ml}$ 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) トリプトソヤブイヨン (ニッスイ)</p>	<p>改訂案では MH ブイヨンを用いることにした。</p>
<p>注2) 上記の増菌用培地では、37°C、18~20 時間培養で黄色ブドウ球菌 209P 株、大腸菌 NIHJ 株ともに、$10^8\sim 10^9/\text{ml}$ の菌数に達する。接種用菌液を約 $10^8/\text{ml}$ に調整するには、使用直前に増菌培地または緩衝液とゼラチンを含む生理食塩液 (BSG, 附</p>	<p>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 209P 株は約 $10^8/\text{ml}$、大腸菌 NIHJ 株は約 $10^9/\text{ml}$ となる。 接種用菌液を約 $10^8/\text{ml}$ に調整するには、使用直前に増菌用培地で希釈する。</p>	

最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂案	現 行 法 (1968 年制定, 1974 年改訂)	備 考
<p>6 参照) で希釈する。</p> <p>菌の種類によって増菌用培地における菌数が相違するから、測定しようとする菌種について、予め 37°C, 18~20 時間培養の菌数を測定しておくことが必要である。</p> <p>注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。</p> <p>注4) 接種菌量による影響および従来の測定値との比較を目的とする場合に、10⁸/ml と 10⁹/ml の菌液を作製し、これを接種する。</p> <p>これによって過去の成績との比較、接種菌量による MIC 値の変動を知ることができる。</p> <p>注5) 前培養菌液の希釈</p> <p>MH ブイヨンに 18~20 時間培養後、平等の菌液をつくるため機械的振盪をよく加えてから増菌用培地または BSG で希釈する。</p> <p>(参考) 緑膿菌の場合菌膜の形成をさけ、菌の平等発育を得るためには KNO₃ を 0.4% の割に MH ブイヨンに添加するとよい。</p>	<p>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。</p> <p>4) 10⁸/ml の菌液で耐性を示す場合は、10⁹/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 10⁸/ml の菌液およびその 100 倍希釈菌液 (約 10⁶/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。</p>	<p>被検菌全株については 10⁸/ml の菌液で測定し、10⁸/ml は各菌種の数株とした。</p> <p>菌液は 10⁸/ml (できれば 10⁸/ml~10⁹/ml の範囲) に調整するのが望ましい。また各菌種が使用する MH ブイヨンの 18 時間培養でどの程度の菌数に達するかは予め知っておく必要がある。</p>
<p>4. 菌の接種法</p> <p>ニクロム線ループ (内径 1 mm 前後) で 2 cm 程度画線塗抹するか、1 スポット接種する。または特殊の接種装置を用いて多数の検体を同時に接種してもよい。</p>	<p>4. 菌の接種法</p> <p>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。測定培地へ接種される菌密度がこれと同程度に調製されれば、白金耳以外の接種装置を用いてもよい。</p>	<p>4. 画線塗抹と 1 スポット接種する方法に殆んど差のないことが既に確かめられている。標準のニクロム線ループは市販されている。この標準ループを用いて一濃度ディスク法で行われている接種法による培地単位面積当りの菌数は、米国の FDA 法のそれと、多数検体をニクロム棒を用いて 10⁸/ml の菌液を接種する場合のそれと殆んど差のないことが確かめられている。</p>
<p>5. 培養時間, 温度</p> <p>18~20 時間, 37°C</p>	<p>5. 培養時間, 温度</p> <p>18~20 時間, 37°C</p>	<p>5. 改定案は現行法と同じ。</p>
<p>6. 判定</p> <p>完全に発育が阻止された最低濃度をもって MIC 値とする。数個 (5 個以内) の集落の場合は Variant であって発育阻止とみなしてよい。但し、小さな集落が多数みられる時は、その菌はその薬剤によって耐性が誘導されたもので発育と認める。</p>	<p>6. 判定</p> <p>完全に発育が阻止された最低濃度をもって感受性をあらかず。</p> <p>注: 集落が 1 個でも発育した場合、または極めて小さ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。</p>	<p>5. 改定案は現行法と同じ。</p> <p>6. 10⁸/ml の菌液を標準ループで 1 スポット</p>

最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂案	現 行 法 (1968 年制定, 1974 年改訂)	備 考																														
<p>〔附〕</p> <p>附1 抗菌薬標準液の作製, 希釈法 各抗菌薬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, 滅菌精製水を適当量加えて, 力価 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の溶液を作る。</p> <p>1,000 $\mu\text{g/ml}$ の溶液が出来たならば, 滅菌メスピベットを用いて, 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ベットは, 必ず希釈のたびごとにとりかえなければならない。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。</p> <p>附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, 上記の抗菌薬溶液を培地の 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。</p> <p>附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。</p> <p>附4 栄養要求のきびしい菌種の MIC 測定 <i>S. pyogenes</i> は MH ブイオンで $10^7/\text{ml}$ 迄発育する。<i>S. pneumoniae</i> は血液の添加を必要とし, 5~10% 血液 (ウマまたはヒツジ) 加 MH ブイオン, 5% Fildes 消化血液加 MH ブイオンで $10^7\sim 10^8/\text{ml}$ 迄発育する。<i>H. influenzae</i> も血液の添加を必要とし 5% Fildes 消化血液加 MH ブイオンで $10^7\sim 10^8/\text{ml}$ 迄発育する。これら培地を用いて菌培養を行い, <i>S. pyogenes</i>, <i>S. pneumoniae</i> では 5% 血液 (ウマまたはヒツジ) 加 MH 寒天培地 <i>H. influenzae</i> では 5% Fildes 消化血液加 MH 寒天培地, または 5% 血液 (ウマまたはヒツジ) 加 MH 寒天をチョコレート寒天としたものを用いて MIC を測定する。</p> <p>附5 平板に発育した集落から MIC 測定 の菌液を作製する場合, 標準ニクローム線ル</p>	<table border="1" data-bbox="487 194 921 286"> <tr> <td>薬剤濃度 ($\mu\text{g/ml}$)</td> <td>0</td> <td>...</td> <td>0.78</td> <td>1.56</td> <td>3.13</td> <td>6.25</td> <td>12.5</td> <td>25</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>発育の程度</td> <td>卍</td> <td>...</td> <td>卍</td> <td>卍</td> <td>卍</td> <td>卍</td> <td>卍</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>(2)</td> <td>(1)</td> <td>-</td> </tr> </table> <p>() 内は集落数</p> <p>〔附〕</p> <p>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, 滅菌精製水を適当量加えて, 力価 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の溶液を作る。</p> <p>1,000 $\mu\text{g/ml}$ の溶液が出来たならば, 滅菌メスピベットを用いて, 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ベットは, 必ず希釈のたびごとにとりかえなければならない。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。</p> <p>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。</p> <p>3. 被液菌株と対照菌株 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。</p>	薬剤濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	...	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	発育の程度	卍	...	卍	卍	卍	卍	卍	+	+								(2)	(1)	-	<p>ット接種した場合約 2000 個の細菌が接種されることになる。この場合耐性変異菌の出現はあり得ない。接種菌量を $10^6/\text{ml}$ に規定した一つの理由もここにある。</p>
薬剤濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	...	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50																							
発育の程度	卍	...	卍	卍	卍	卍	卍	+	+																							
							(2)	(1)	-																							

最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂案	現 行 法 (1968 年制定, 1974 年改訂)	備 考										
<p>ープを用いて BSG (buffered saline with gelatin) または MH ブイヨンに懸濁し、硫酸バリウムを対照として比濁法によって菌液を調整する。</p> <p>附 6 BSG の処方は次の通りである。</p> <table data-bbox="105 360 367 517"> <tr> <td>NaCl</td> <td>8.5 g</td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>300 mg</td> </tr> <tr> <td>Na₂HPO₄</td> <td>600 mg</td> </tr> <tr> <td>ゼラチン</td> <td>100 mg</td> </tr> <tr> <td>蒸留水</td> <td>1,000 ml</td> </tr> </table> <p>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。Chemotherapy 誌掲載後 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。</p> <p>昭和 55 年 6 月 21 日 日本化学療法学会 理事長 藤井良知</p>	NaCl	8.5 g	KH ₂ PO ₄	300 mg	Na ₂ HPO ₄	600 mg	ゼラチン	100 mg	蒸留水	1,000 ml		
NaCl	8.5 g											
KH ₂ PO ₄	300 mg											
Na ₂ HPO ₄	600 mg											
ゼラチン	100 mg											
蒸留水	1,000 ml											