

感受性測定用培地の種類による測定値の変動

河喜多龍祥

東海大学医学部附属病院中央臨床検査部

大沢伸孝

北里大学

長田富香

東京女子医科大学

向島達

国立がんセンター

田中徳満

群馬大学

(ディスク測定法研究会 班長 三橋進)

(昭和55年12月1日受付)

抗菌活性の測定は日常の業務として臨床における感染症の適正医療、薬剤耐性菌の疫学的研究、薬学上の新薬の選択等に実施されているが、この重要性をもつ活性測定値に種々の因子が影響を与えることは知られてはいるものの文献的データに乏しい。

我々は薬剤の抗菌活性測定用培地として5社で市販している6種の培地を使用、被検菌として *E. coli* NIHJ 株、*S. aureus* FDA 209P 株を用い、活性測定法としては寒天希釈平板法とカップ法で実施し、Gentamicin と Tetracycline の活性に及ぼす各種培地の影響を検討した。

結果は測定法の如何に拘らず、測定値は各培地間において著明な変動が示され、また同一培地を用いて活性測定を行なった場合でも、被検菌種、測定する薬剤により活性値に大きな変動をきたすことが示された。

抗菌活性の測定は臨床における治療薬の選択、薬剤耐性菌の疫学的研究および薬学上の新薬の選択などに対し、日常の業務として行なわれているが、薬剤の抗菌活性に変動を与える多くの因子が報告され、また活性を正確に測定できるよう測定方法の改善等の工夫がなされている。

我々は薬剤の抗菌活性に及ぼす培地の影響について検討を加えたので、その結果を報告する。

I. 実験材料および方法

使用菌株: 抗菌力測定の被検菌として *Staphylococcus aureus* FDA 209P 株および *Escherichia coli* NIHJ 株、他の *S. aureus*、*E. coli* は教室保存の臨床分離株 20~25 株を使用した。

培地: カップ法による抗菌力測定において使用した培地はいずれも感受性測定用培地として市販されているもので日水製薬 (Lot. No. AIY 251)、栄研化学 (Lot. No. NK 008 E)、Difco. (Lot. No. 608526)、BBL (Lot. No.

J8 DEAL) の薬剤感受性用測定培地、および Oxoid の Diagnostic sensitivity test (DST) agar (Lot. No. 20920224) と ISO-sensivity test (IST) agar (Lot. No. 22021602) の5社製品、6種の培地を用い検討した。なお培地の pH は各製品に指示された値に調整して使用した。調整時の培地 pH は Difco. 7.2、BBL 7.3、Oxoid の DST, IST 培地、日水および栄研の感受性測定用培地はそれぞれ pH7.4 であった。

カップ法による抗菌力の測定・被検菌を Triptosoy broth (Difco) に接種し 37°C、18時間培養後遠心し生理的食塩水にて1回洗浄、生食水に再浮遊させたものを培地への接種菌液とした。煮沸溶解後 45°C に保ってある各寒天培地に前述の菌液を添加しよく混合した後、直径 9cm のシャーレに 10 ml あて分注したが被検菌のシャーレ当りの接種菌量は *S. aureus*、*E. coli* とともに 10⁷ 個とした。ステンレス製のカップ (直径 9 mm) の寒天平板上へのセットは平板1枚につき4個とし、cup-drop-

per を用いて 10cm の高さから落下させてセットした。種々の濃度の薬剤を含む溶液をカップ内に注入し 37°C, 18 時間培養後、被検菌の増殖阻止円の直径を測定したが一薬剤の一濃度につき平板各 5 枚を使用した。

寒天希釈平板法による抗菌力の測定：薬剤による被検菌の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は化学療法学会法による寒天希釈平板法を用いたり。すなわち Tryptosoy broth を用いた前培養菌液を希釈して 10⁶ 個/ml の菌量とし、マイクロプランター (佐久間製作所, 東京) を使用して各種薬剤濃度を含む平板上に上記菌液を接種, 37°C 18 時間培養後判定した。

薬剤：Gentamicin (Gm) および Tetracycline (Tc) を抗菌力測定の薬剤として使用したが、いずれも力価検定の標品を使用した。

II. 結 果

1. 阻止円直径に及ぼす培地の影響

カップ法による抗菌力測定に際し、5 枚の平板を用いて被検菌に対する Gm および Tc の阻止円の直径を測定しその変動を検討した。結果は Table 1 に示すように極めて変動は少なかった。すなわち、標準偏差 (SD) 値の最も大きい *E. coli* と Gm の組合せの場合でも、平均値に対する SD の値は ±14.2% であり、他は ±0.2~0.3 % と測定値の変動は極めて少ないことが示された。

S. aureus 209 P 株に対する Gm の抗菌力、すなわち発育阻止円の直径と使用培地との関係を示したのが Fig. 1 である。阻止円の直径は培地 A を用いた場合最も大きく、次いで培地 B, C, D, E の順であり、培地 F では最も小さい阻止円を示した。このことは、測定に用いる培地により、阻止円の大きさは著しく左右されることを示している。

Fig. 2 には Gm の濃度と *E. coli* NIHJ 株の発育阻止円の大きさとの関係を示したが、これも測定に用いた培地により大きく変動し、阻止円直径の大きく測定される培地は培地 E であり、次いで A, (D, B, C), F の順とな

り、Gm の発育阻止円の大きさに及ぼす培地の影響は被検菌によっても異なってくるが示されている。

S. aureus 209 P に対する Tc の阻止円の大きさについて示したのが Fig. 3 である。結果は培地 A を用いた場合に最も大きい阻止円直径を示し、次いで培地 E, D, F の順となり、培地 B および C の両者は阻止円の大きさはよく一致すると共に最も小さな発育阻止円を示していた。Fig. 1 と Fig. 3 の結果から、同一 *S. aureus* 209 P を被検菌としても、用いた薬剤によって、培地の相異なる阻止円の大きさへの影響が著明に変化することが示された。

E. coli と Tc の関係において、使用培地の阻止円の大きさに及ぼす影響を検討した結果を Fig. 4 に示した。Tc の抗菌活性測定において、被検菌が *S. aureus* あるいは *E. coli* にかよって大きな変化を示したものは培地 B および培地 C であった。Fig. 2 および Fig. 4 の間では使用した薬剤に対する各培地の影響が示されている。また Fig. 3, 4 において Tc の発育阻止円の大きさに及ぼす培地の影響は、被検菌によって変動することを示している。

Fig. 1 Effect of media on the inhibition zone diameter of Gm against *S. aureus* 209 P

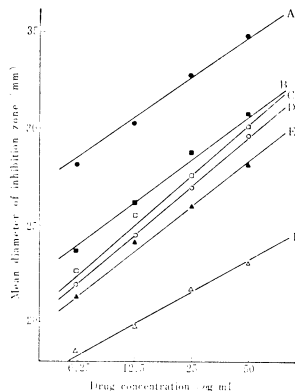


Fig. 2 Effect of media on the inhibition zone diameter of Gm against *E. coli* NIHJ

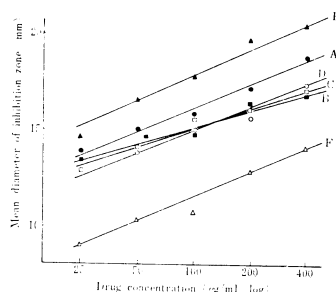
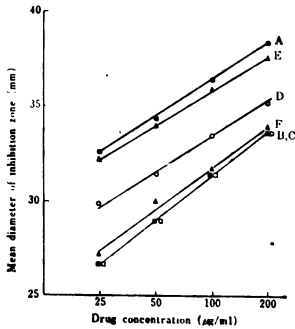


Table 1 Standard deviations of the inhibition zone diameters by cup method

Organism	Drug	Drug concentration	Diameter (M ± SD)(mm)
<i>S. aureus</i> 209 P	Tc	200	35.3 ± 0.8
	Gm	50	29.6 ± 0.7
<i>E. coli</i> NIHJ	Tc	200	20.4 ± 0.7
	Gm	50	10.6 ± 1.5

Inoculum size used was 9 × 10⁶ cells/plate for *S. aureus* 209 P and 1 × 10⁷ cells/plate for *E. coli* NIHJ. Five plates were used for each drug and 4 stainless steel cylinders were used for one plate

Fig. 3 Effect of media on the inhibition zone diameter of Tc against *S. aureus* 209 P



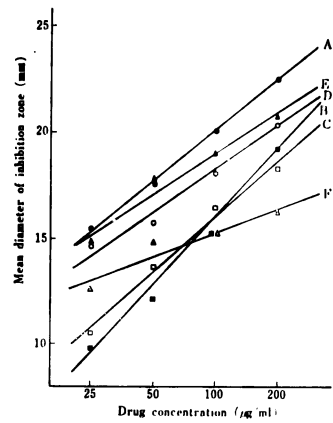
2. MIC 測定値に及ぼす培地の影響

E. coli および *S. aureus* の臨床分離株 20 株以上を用い、Tc および Gm に対する MIC 値を各培地毎に寒天希釈平板法によって測定し、MIC 値の総和を各々求め Table 2 に示した。

E. coli の Gm に対する MIC 値の総和では培地 F が最も高い 50 µg/ml を示し、培地 B は最も低い値で 14 µg/ml であった。Tc に比べ Gm を測定薬剤として用いた場合の方が、使用する培地の影響が著明に現われていた。しかし、Gm の抗菌力測定における培地の影響は、希釈平板法による MIC 値測定とカップ法による発育阻止円の直径の大きさにおいて必ずしも一致せず、カップ法による *E. coli* に対する抗菌力は培地 E > A > D > C > B > F (Fig. 2) に対して、寒天希釈平板法では培地 B > E > A > D > C > F であった。

E. coli 20 株の Tc に対する MIC 総数値は培地 C および F で大きい値を示し、次いで培地 B, D, A, E の順であったが (Table 2), 測定薬剤として Gm を使用した場合と同様、抗菌力に対する培地の影響は Tc においても測定方法によって異なり、カップ法による Tc の抗菌力は使用培地により A > E > D > B > (C) > F と示されたが、寒天希釈平板法では E > A > D > B > C > F として表現された。以上のように Tc の抗菌力もその測定方法や被検菌種によっても変動することが示された。

Fig. 4 Effect of media on the inhibition zone diameter of Tc against *E. coli* NIHJ



III. 討 論

薬剤の抗菌力測定は通常液体培養または寒天平板法によって測定されている²⁾。寒天平板法ではディスク法 (あるいはカップ法)³⁻⁵⁾ と寒天希釈平板法とがある⁶⁾。ディスク法あるいはカップ法による場合、被検株の増殖阻止円の大きさは

- (a) 測定に用いる薬剤の抗菌力
- (b) 薬剤の寒天内浸透速度
- (c) 培地での被検菌の増殖速度
- (d) 培地成分の薬剤拮抗作用

および

(e) 培地内薬剤の培養温度における安定性によって変化が示される。

なお抗菌活性測定用の培地は、次のような品質を具備することが必要である。すなわち

- (1) 被検菌とされる種々の菌種が十分に増殖し得る培地であるとともに
- (2) あまり複雑な培地組成でないこと、
- (3) 国際的にも通常使用されている培地で、
- (4) ロット差の少ない培地であること、
- (5) 薬剤の抗菌活性測定において、その活性に及ぼす影響の少ないものであること、などである。

Table 2 Antibacterial activities of drugs determined by agar dilution method

Bacteria	No. of used strains	Drug	Total sum of MIC values determined on agar plates (µg/ml)					
			A	B	C	D	E	F
<i>E. coli</i>	25	Gm	22.25	14.00	33.50	27.25	21.50	50.00
	20	Tc	275.80	336.40	349.40	300.40	253.40	349.60
<i>S. aureus</i>	24	Gm	48.48	43.20	60.96	60.96	53.28	84.96
	25	Tc	703.30	1,019.30	1,218.75	913.70	858.00	1,213.60

以上簡条書きにして示したが、薬剤 (Tc および Gm) の抗菌活性は使用する培地によって著しい影響をうけていることは事実である。また抗菌活性に及ぼす培地の影響は活性の測定方法、すなわちカップ法と寒天希釈平板法とでは同一の被検菌 (*S. aureus* または *E. coli*) を用いても、その影響は異なるものであった。

結 語

Gentamicin (Gm) および tetracycline (Tc) の抗菌活性を *E. coli* と *S. aureus* を用い拡散法および寒天希釈法により測定した。使用した両薬剤はともに測定に用いた培地の種類によってその活性は著しく影響され、また抗菌活性への培地の影響は使用した薬剤、被検菌によっても変化を示した。

Gentamicine の *Pseudomonas aeruginosa* に対する抗菌活性測定において、培地中のカチオン特にカルシウムおよびマグネシウムによって著明な変動が示されること、また培地ロットの影響なども報告され^{7,8)}、その活性は多くの因子により左右されることは事実である。したがって測定方法の改良とともに培地の品質管理においても一考をうながし、再現性の高い抗菌活性値が得られるとともに、各種培地間の活性値に大差のない値が得られる抗菌活性測定用培地が供給されることが望ましい。

文 献

1) 日本化学療法学会：最小発育限止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 23：巻頭1～2，1975

- 2) SHERRIS, J. C.: General consideration of *in vitro* antibiotic susceptibility testing—A summation. *ibid*, pp. 128~137, 1974
- 3) VINCENT, J. C. & H. W. VINCENT: Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 55: 162~164, 1944
- 4) BAUER, A. W.; W. M. M., KIRBY, J. C, SHERRIS & M. TURK: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Path. 45: 493~496, 1966
- 5) BARRY, A. L.: The agar overlay technique for disc susceptibility testing. In Current techniques for antibiotic susceptibility testing (ed. A. BALOWS), pp. 17~25, CHARLES and THOMAS, Springfield, 1974
- 6) BARRY, A. L.: Agar diffusion tests. In The antimicrobial susceptibility test (ed. A. L. BARRY), pp. 163~215, LEA and FEBRIGER, Philadelphia, 1976
- 7) KENNY, M. A., *et al.*: Cation components of Mueller-Hinton agar affecting testing of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to gentamicin. Antimicrob. Agents. Chemother. 17: 55~62, 1980
- 8) POLLOCK, H. M., *et al.*: Effect of different lots of Mueller-Hinton agar on the interpretation of the gentamicin susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents. Chemother. 14: 360~367, 1978

CHANGE OF THE LEVELS OF DRUG-SENSITIVITY
BY DIFFERENT KINDS OF ASSAY MEDIA

TATSUYOSHI KAWAKITA

Central Clinical Laboratory, Tokai University Hospital

NOBUTAKA OSAWA

Department of Microbiology, Kitazato University

TOMIKA OSADA

Tokyo Women's Medical University

TATSU MUKOJIMA

National Cancer Center Research Institute

TOKUMITSU TANAKA

Department of Microbiology, Gunma University

(Commission on Drug-sensitivity Test, Chief : S. MITSUHASHI)

The antibacterial activities of gentamicin (Gm) and tetracycline (Tc) were determined by the diffusion and agar dilution assay methods using *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains as test organisms. The antibacterial activity of both drugs were found to be greatly affected by the media used, and the effect of media on the antibacterial activity was different in the organisms and the drugs used.