

ブドウ球菌, グラム陰性桿菌に対する Dynatech MIC 2000 System  
及び化学療法学会標準法 (HI 及び MH 培地) で測定した  
常用抗生物質最小発育阻止濃度の比較

佐々木昌子・大泉耕太郎・渡辺 彰  
青沼 清一・大沼 菊夫・今野 淳  
東北大学抗酸菌病研究所内科

(昭和 58 年 6 月 1 日受付)

臨床分離 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. liquefaciens* 7 菌種の新鮮株と保存株に対する常用抗生物質 (ABPC, SBPC, PIPC, GM, DKB, AMK, CEZ, CMZ, CTM, CZX, CPZ, LMOX, CFS) の最小発育阻止濃度 (MIC) を, 市販 Mueller Hinton (MH) 培地, heart infusion (HI) 培地を用いて, 液体希釈法と寒天平板法 (化療標準法) で測定し, それぞれの測定値を比較した。なお, 液体希釈法は Dynatech MIC 2000 system を, 寒天平板法は microplanter を用い, 接種菌量はそれぞれ 10 倍希釈 1 夜培養菌の 0.0015 ml および 100 倍希釈 1 夜培養菌の 0.005 ml とした。

(1) MH 培地对 HI 培地: 新鮮株を用い MHB と HIB での MIC, および保存株を用い MHA と HIA での MIC を比較した。結果はいずれの菌に対しても, いずれの薬剤に対しても, MH と HI 培地での MIC の間に有意差は認められなかった。

(2) 液体希釈法对寒天平板法: MH 培地を用い, 液体希釈法と, 寒天平板法による MIC 値を比較した。緑膿菌を除く 6 菌種では, 両 MIC 間に有意差は認められなかった。緑膿菌に対しては, 液体希釈法で測定した AG 剤の MIC が寒天平板法での MIC に比べ有意に低い値を示した。

(3) 新鮮株 MIC 对保存株 MIC: 液体希釈法 (MHB) で測定した新鮮株 MIC と保存株 MIC を比較した。*S. aureus* においては, ABPC, PIPC, GM, DKB, AMK の保存株 MIC が, 新鮮株 MIC より有意に低い値を示した。同じく *S. epidermidis* においては ABPC, PIPC, DKB, CZX が, *P. aeruginosa* においては, GM, AMK, CPZ, LMOX が, *E. coli* では, AMK が, *K. pneumoniae* では, LMOX が, *S. liquefaciens* は, CZX と CPZ が, 保存後有意の MIC の低下を示した。

以上の結果, 今回検討した 7 菌種のうち, 緑膿菌に対する AG 剤を除き, MH 培地と HI 培地により測定した MIC は, 寒天培地, 液体培地を問わず, 有意の差は認められず, Dynatech MIC 2000 system でのデータと化療標準法でのデータとの比較は可能と認められる。これに対し, 緑膿菌に対する AG 剤 MIC を, 液体希釈法で測定する際は, 二価陽イオンの調整が必要である。また, 新鮮株 MIC と保存株 MIC の間には有意の格差が認められ, 保存株でのデータと新鮮株でのデータは単一に論ずることができず, 明確に区別すべきものと考えられる。

病原菌に対する薬剤感受性は測定方法, 培地条件, 菌側の条件により変化することは知られている<sup>1,2)</sup>。薬剤感受性の測定は日本化学療法学会で標準法が規定され, それに従って最小発育阻止濃度 (MIC) が測定されてきた<sup>3)</sup>。本法は 1982 年に今まで感受性測定用培地として指定されてきた HI 培地を MH 培地に変更され現在に至っている<sup>4)</sup>。我々の施設では, 1980 年に Dynatech MIC 2000 system を導入し, 従来通りの寒天平板法で MIC を測定すると同時に液体希釈法でも MIC を測定してき

た。Dynatech MIC 2000 system 導入により, 新鮮株 MIC 測定が容易となり, HI 培地で測定した新鮮分離株における MIC が保存株で測定した MIC に比べ高値を示すことはすでに報告した<sup>5)</sup>。

今回は, 従来行なわれてきた HI 培地と新しく制定された MH 培地による MIC 値の比較, Dynatech MIC 2000 system を使用した液体希釈法と microplanter を使用した寒天平板法 (化療標準法) で測定した MIC の比較, および新鮮株 MIC と保存株 MIC の比較を行な

い2,3の知見を得たので報告する。

### I. 実験方法

対象菌：本院患者検出菌のうち、*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. liquefaciens* の7菌種である。新鮮株は臨床分離直後のものとし、保存株は半流動寒天培地に2~3か月保存後のものとした。

使用薬剤：ペニシリン剤(PC剤)は、ampicillin (ABPC), sulbenicillin (SBPC), piperacillin (PIPC), アミノグリコソイド剤(AG剤)は、gentamicin (GM), dibekacin (DKB), amikacin (AMK), セフェム剤(CEP剤)は cefazolin (CEZ), ceftizoxime (CZX), cefoperazone (CPZ), latamoxef (LMOX), cefsulodin (CFS) を使用した。

使用培地：heart infusion broth (HIB : Difco), Mueller Hinton broth (MHB : Difco), nutrient agar (Difco), heart infusion agar (HIA : Difco), Mueller Hinton medium (MHA : Difco) を使用した。

MIC 測定方法：液体希釈法は Dynatech MIC 2000 system を使用し、1夜培養菌の10倍希釈液0.0015 ml を薬剤含有 microplate に接種し、37°C, 1夜培養し、菌の発育を認められない最小薬剤濃度を MIC とした。寒天平板法の MIC は、microplanter を用い、1夜培養菌の10倍希釈菌液0.005 ml を薬剤含有寒天平板上に接種し、菌の発育を阻止する最小薬剤濃度を MIC とした。

実験はそれぞれ独立に以下の3つの組合せで行なった。

(1) MHB と HIB での MIC の比較：新鮮株に対し、Dynatech MIC 2000 system による液体希釈法で HIB と MHB での MIC を測定し、両者を比較した。

(2) 新鮮株 MIC と保存株 MIC の比較：分離直後菌および2~3か月半流動培地保存菌の MIC を、培地を MHB とし、液体希釈法により測定し、新鮮株 MIC と保存株 MIC を比較した。

(3) 液体希釈法(MHB)と寒天平板法(MHA, HIA)での MIC の比較：保存菌を MHB による液体希釈法および MHA, HIA による寒天平板法により測定した各 MIC 間での比較を行なった。

なお、MIC の比較に際しては、各組合せ独立に、2群間 MIC の平均の差の検定を行ない、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

### II. 成績

*S. aureus* においては、HIB と MHB を培地として測定した MIC 間には、いずれの薬剤でも推計学的有意差は認められなかった。新鮮株と保存株 MIC の間では

PC 剤, AG 剤, CEP 剤といずれも保存株での MIC が新鮮株 MIC より低く、そのうち、ABPC, PIPC, GM, DKB, AMK での低下は推計学的に有意の差であった。保存株に対し培地を MHB, MHA, HIA とし、測定した MIC 間には有意の差はみられなかった (Fig. 1)。

*S. epidermidis* は、HIB と MHB を培地とし測定した MIC 間には有意差は認められなかった。新鮮株 MIC と保存株 MIC では、12 薬剤すべてで保存株 MIC の低下がみられ、そのうち、ABPC, PIPC, DKB, CZX では推計学的に有意の低下を示した。保存株で測定した MHB, MHA, HIA での MIC 間には有意差がみられなかった (Fig. 2)。

*P. aeruginosa* においては、MHB と HIB を用い測定した MIC 間には、有意差は認められなかった。新鮮株と保存株に対する MIC は9薬剤すべてで保存後低下する傾向を示し、特に GM, AMK, CPZ, LMOX では有意の低下を示した。3つの培地条件 MHB, MHA, HIA による MIC を比較した場合は、GM, DKB, AMK において MHB と MHA 間で有意の差を示し、MHA と HIA の間には有意差は認められなかった (Fig. 3)。

*E. coli* においては、HIB, MHB を用い測定した MIC 間に差は認められなかった。新鮮株 MIC と保存株 MIC を比較した場合、AMK の新鮮株 MIC は保存後有意の低下を示した。保存株に対し、MHB, MHA, HIA の3培地条件で測定した MIC 間には有意の差はみられなかった (Fig. 4)。

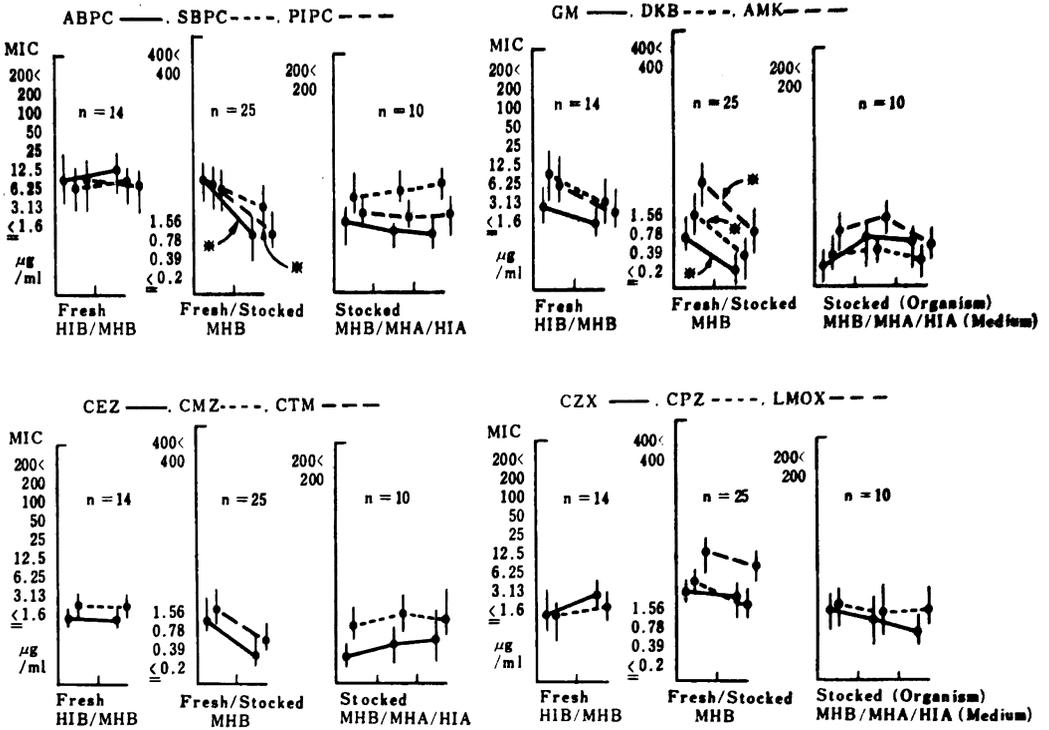
*K. pneumoniae* においては、新鮮株に対し HIB, MHB で測定した MIC 間には有意の差はみられなかった。新鮮株 MIC と保存株 MIC を比較した場合、LMOX では、保存後 MIC の有意の低下を認めた。保存株を用いた MHB, MHA, HIA 培地間 MIC には有意の差はみられなかった (Fig. 5)。

*K. oxytoca* においては、MHB, HIB を用い測定した MIC 間には有意の差はみられなかった。新鮮株 MIC と保存株 MIC の比較では、第3世代 CEP 剤で保存株 MIC の低下傾向を示した。保存株に対し、測定した MIC は、MHB, MHA, HIA 3培地間に有意の差はみられなかった (Fig. 6)。

*S. liquefaciens* においては、MHB, HIB で測定した MIC 間、および MHB, MHA, HIA による MIC の間には有意の差はみられなかった。新鮮株と保存株に対する MIC 間では、CZX, CPZ の保存株 MIC で、推計学的に有意の低下を認めた (Fig. 7)。

すなわち、MHB と HIB および MHA と HIA で測定した MIC 間には有意の差は認められなかった。液体

Fig.1 Difference between means of MICs of antibiotics against *Staphylococcus aureus* on three systems of HIB/MHB (a), Fresh/Stocked (b) and MHB/MHA/HIA (c).



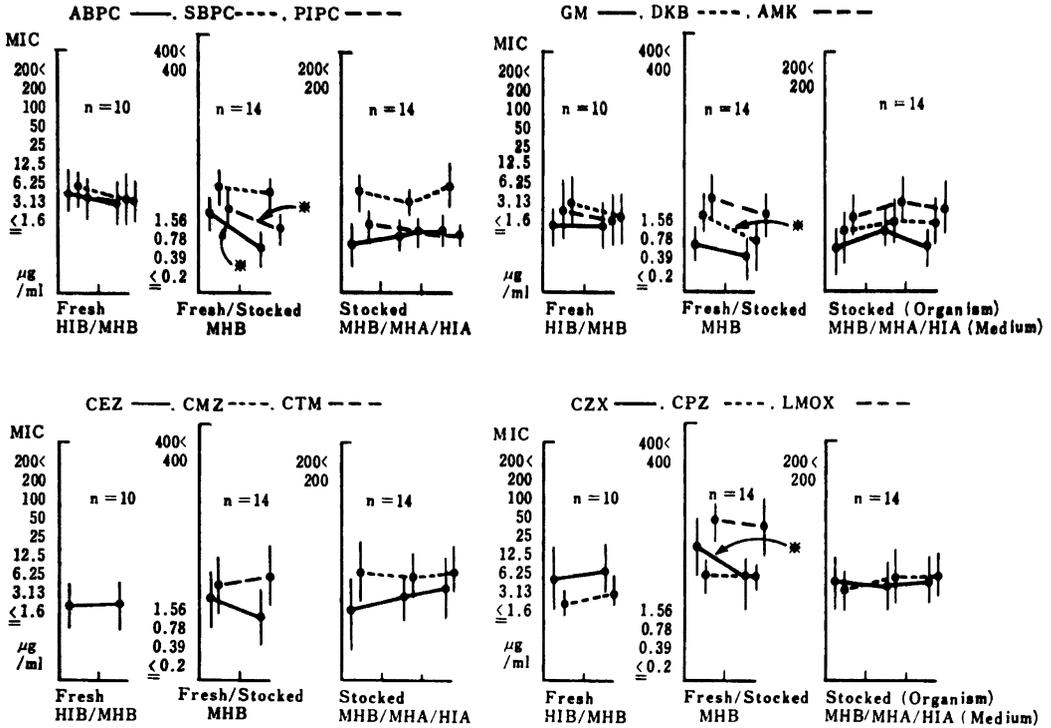
(a) MICs were determined by a broth dilution technic of Dynatech MIC 2000 system against strains freshly isolated from clinical materials, on HIB and MHB.

(b) MICs were determined against strains of freshly isolated from clinical materials and strains stocked on semi-liquid medium for several months, by the broth dilution technic, on MHB.

(c) MICs of MHB, MHA and HIA were determined against stocked strains. MICs of MHB were determined by the broth dilution technic. MICs of MHA and of HIA were determined by the agar dilution method using a microplanter.

Symbols and abbreviations:  $\pm$ , difference between means  $\pm$  SED of MICs of two groups; \* indicates statistically significant at  $P < 0.05$ ; n, No. of strains; HIB, heart infusion broth; MHB, Mueller Hinton broth; MHA, Mueller Hinton agar; HIA, heart infusion agar.

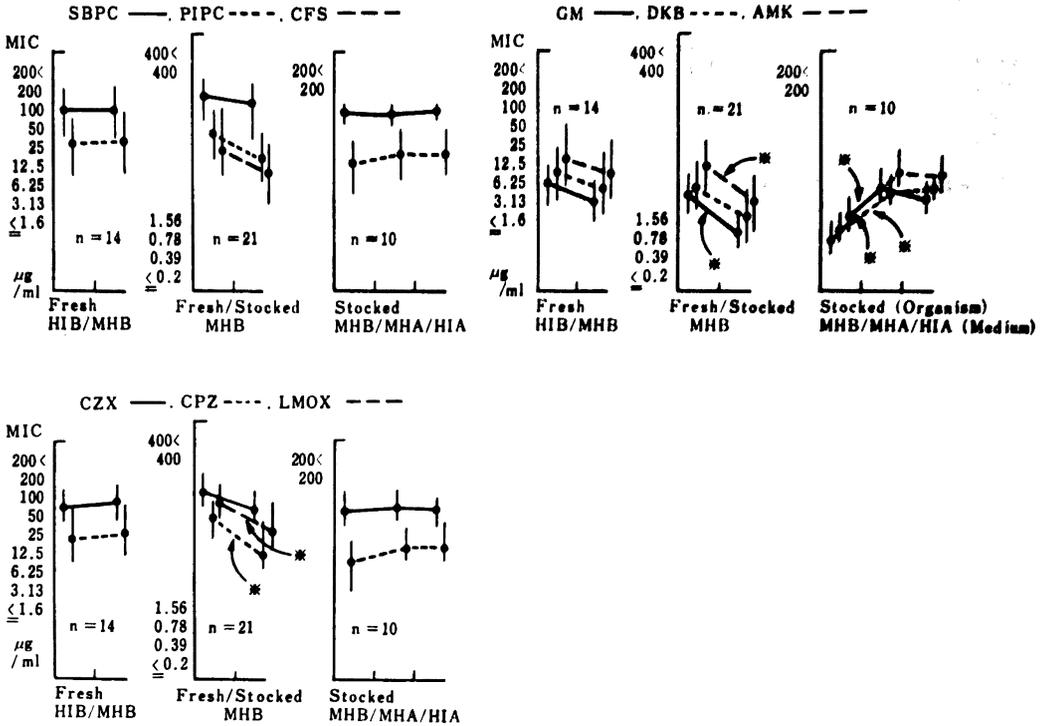
Fig.2 Difference between means of MICs of antibiotics against *Staphylococcus epidermidis* on three systems of HIB/MHB(a), Fresh/Stocked(b) and MHB/MHA/HIA (c).



(a), (b), (c) : see footnote of Fig. 1.

Symbols and abbreviations:  $\pm$ , difference between means  $\pm$  SED of MICs of two groups; \* indicates statistically significant at  $P < 0.05$ ; n, No. of strains; HIB, heart infusion broth; MHB, Mueller Hinton broth; MHA, Mueller Hinton agar; HIA, heart infusion agar.

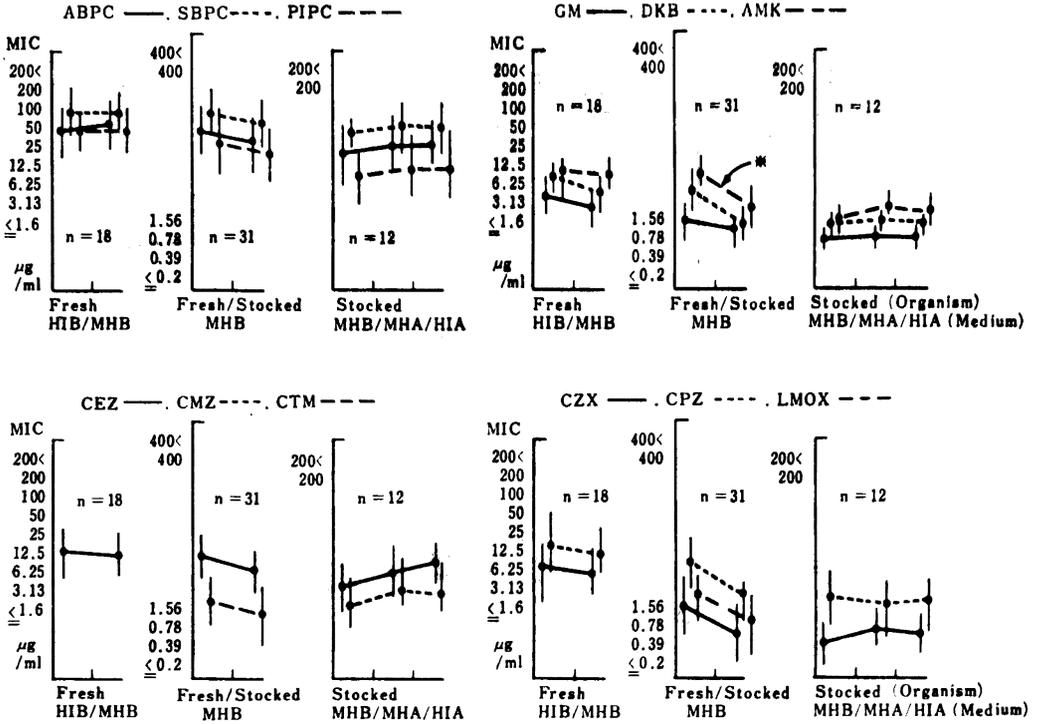
Fig.8 Difference between means of MICs of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* on three systems of HIB/MHB(a), Fresh/Stocked (b) and MHB/MHA/HIA (c).



(a), (b), (c) : see footnote of Fig. 1.

Symbols and abbreviations :  $\pm$ , difference between means  $\pm$  SED of MICs of two groups ; \* indicates statistically significant at  $P < 0.05$ . ; n, No. of strains ; HIB, heart infusion broth ; MHB, Mueller Hinton broth ; MHA, Mueller Hinton agar ; HIA, heart infusion agar.

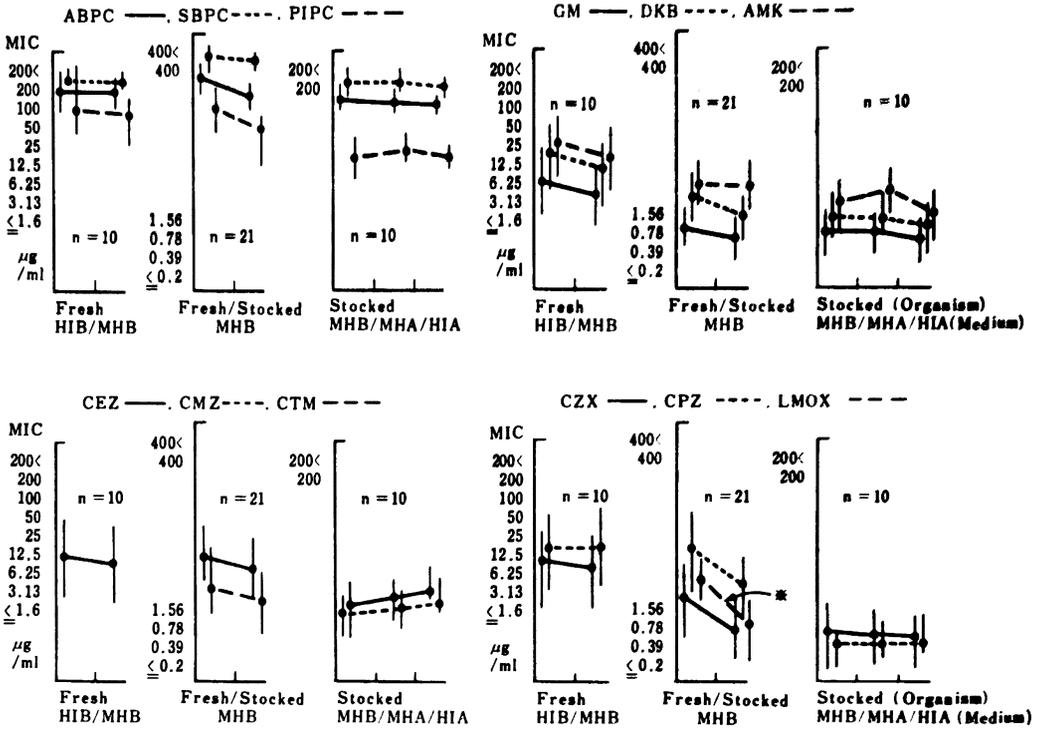
Fig.4 Difference between means of MICs of antibiotics against *Escherichia coli* on three systems of HIB/MHB(a), Fresh/Stocked(b) and MHB/MHA/HIA(c).



(a), (b), (c) : see footnote of Fig.1.

Symbols and abbreviations :  $\pm$ , difference between means  $\pm$  SED of MICs of two groups ; \* indicates statistically significant at  $P < 0.05$ . ; n, No. of strains ; HIB, heart infusion broth ; MHB, Mueller Hinton broth ; MHA, Mueller Hinton agar ; HIA, heart infusion agar.

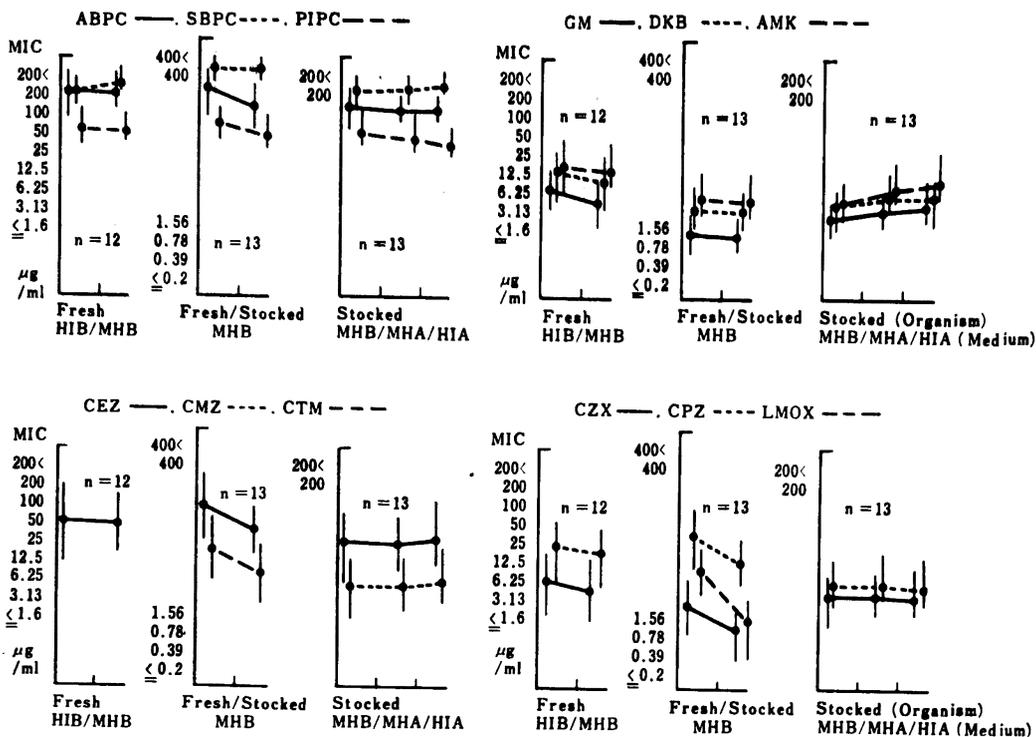
Fig.5 Difference between means of MICs of antibiotics against *Klebsiella pneumoniae* on three systems of HIB/MHB(a), Fresh/Stocked(b) and MHB/MHA/HIA(c).



(a), (b), (c) : see footnote of Fig. 1.

Symbols and abbreviations : †, difference between means ± SED of MICs of two groups ; \* indicates statistically significant at P < 0.05 ; n, No. of strains ; HIB, heart infusion broth ; MHB, Mueller Hinton broth ; MHA, Mueller Hinton agar ; HIA, heart infusion agar.

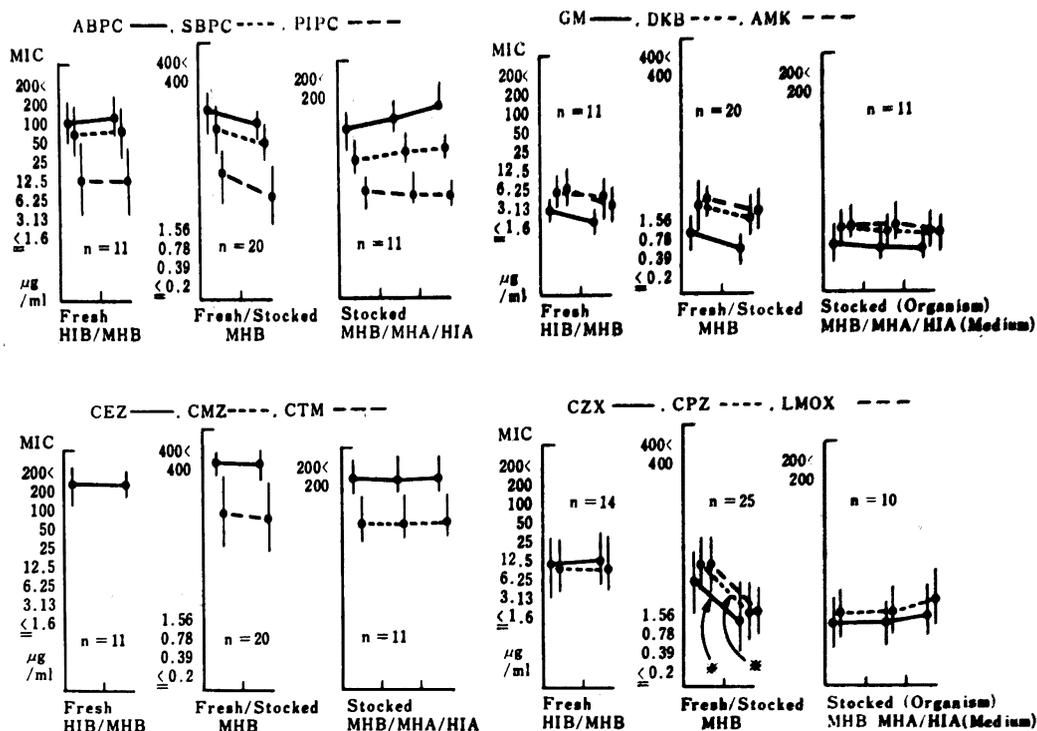
Fig.6 Difference between means of MICs antibiotics against *Klebsiella oxytoca* on three systems of HIB/MHB(a), Fresh/Stocked(b) and MHB/MHA/HIA(c).



(a), (b), (c) : see footnote of Fig. 1.

Symbols and abbreviations:  $\pm$ , difference between means  $\pm$  SED of MICs of two groups ; \* indicates statistically significant at  $P < 0.05$ . ; n, No. of strains ; HIB, heart infusion broth ; MHB, Mueller Hinton broth ; MHA, Mueller Hinton agar ; HIA, heart infusion agar.

Fig.7 Difference between means of MICs of antibiotics against *Serratia liquefaciens* on three systems of HIB/MHB(a), Fresh/Stocked(b), and MHB/MHA/HIA(c).



(a), (b), (c) : see footnote of Fig.1.

Symbols and abbreviations :  $\pm$ , difference between means  $\pm$  SED of MICs of two groups ; \* indicates statistically significant at  $P < 0.05$  ; n, No. of strains ; HIB, heart infusion broth ; MHB, Mueller Hinton broth ; MHA, Mueller Hinton agar ; HIA, heart infusion agar.

希釈法 (MHB) と寒天平板法 (MHA) の間では, *P. aeruginosa* において液体希釈法での AG 剤の MIC と寒天平板法での MIC に有意差がみられた。また, いずれの菌株でも新鮮株 MIC に比べ保存株 MIC が低下していた。推計学的に有意の低下を認めたのは, *S. aureus* に対し ABPC, PIPC, GM, DKB, AMK が, *S. epidermidis* に対し ABPC, PIPC, DKB, CZX, で, *P. aeruginosa* に対しては GM, AMK, CZX, LMOX が, *E. coli* では AMK が, *K. pneumoniae* では LMOX が, *S. liquefaciens* では CZX, CPZ である。

### III. 考 察

日本では, 薬剤感受性測定方法は日本化学療法学会で, 寒天平板法による最小発育阻止濃度 (MIC) が標準法として規定されている<sup>6)</sup>。本法での指定培地は 1981 年に HI 培地から MH 培地に変更されている<sup>4)</sup>。我々の施設でも今までは HI 培地を使用し, 化療標準法に従い諸種の発表を行ってきたが, 今回, 化療標準法が MH 培地に変更されたのに準じ, 従来の HI 寒天培地による測定値と, 新しく標準法となった MH 培地による測定値との間に差がないかどうかについて検討した。我々は Dynatech MIC 2000 system を導入し, 寒天平板法と同時に液体希釈法でも MIC 測定を行ってきたが, 両測定方法によるデータの間における MIC 格差の有無についても検討した。また, 菌側の因子として, 新鮮株と保存株に対する MIC 間の差についてはすでに報告しているが<sup>5)</sup>, 今回は培地を MHB に変え同様な差を示すかについて検討した。

緑膿菌に対する AG 剤を除いて, 対象とした 7 菌種においては, HI 培地と MH 培地には寒天培地, 液体培地を問わず, MIC 測定用培地として差は認められず, また, 液体希釈法, 寒天平板法による MIC 間にも差はみられなかった。緑膿菌に対しては, 液体希釈法 (MHB) での AG 剤の MIC が寒天平板法 (MHA) での MIC 値に比べ有意に低い値を示した。MH 液体培地は二価陽イオン濃度が低く, 緑膿菌において AG 剤の MIC を MH 液体培地で測定した際に, 寒天培地で測定した MIC 値に比べ低い値を示すことが知られている<sup>6,7)</sup>。今回液体希釈法での緑膿菌の AG 剤 MIC が低かったのは二価陽イオン無調整のまま MHB を使用した影響と思われる。

保存株での MIC 低下は, 前回我々が, 報告したごとの結果が, 今回も得られ, HIB での結果と MHB での結果に大きな差がないことを示している。すなわち, 新鮮株でのデータと保存株でのデータは *Staphylococcus* 属, *P. aeruginosa*, Enterobacteriaceae 各々で, 様相を異にしているが, 推計学的に有意の差を示すものであ

り, 単一には扱えないものである。薬剤感受性測定の目的自体は, 薬剤を臨床使用する時の目安であるとするれば, 新鮮な菌でのデータが, より臨床に近く有用性が高いと考えられるが, 今後データが集積するにつれて明らかにされていくものと思われる。

最後に, こうした保存株の MIC 低下の機序に関しては, 菌種, 薬剤ごとに種々な態度を示し, 単一な理由で説明できないと思うが, 我々の施設で,  $\beta$ -lactamase との関連について検討した結果では, MIC の低下にとともに,  $\beta$ -lactamase 産生量もまた低下していることが多く, Plasmid の関与がその一つとして想定される<sup>8)</sup>。

なお, 本論文の要旨は, 第 29 回化学療法学会東日本支部総会 (1982 年 10 月, 仙台) において発表したものである。

### 文 献

- 1) 河喜多龍祥, 大沢伸孝, 長田富香, 向島 達, 田中徳満: 感受性測定用培地の種類による測定値の変動。Chemotherapy 29: 897~901, 1981
- 2) RYLANDER, M.; J. E. BROBSON, J. JOHNSON & R. NORBY: Comparison Between Agar and Broth Minimal Inhibitory Concentrations of Cefamandole, Cefoxitin, Cefuroxime. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 15: 572~579, 1979
- 3) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 23: 1~2, 1975
- 4) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について (1968 制定, 1974 改訂)。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 5) 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 渡辺 彰, 青沼清一, 大沼菊夫, 今野 淳: 喀痰分離グラム陰性桿菌, *S. aureus* の抗生物質感受性: 新鮮株と保存株の MIC 格差について。Chemotherapy 30: 760~769, 1982
- 6) CASILLAS, E.; M. A. KENNY, B. H. MINSHEW & F. D. SCHOENKNECHT: Effect of Ionized Calcium and Soluble Magnesium on the Predictability of the Performance of Mueller-Hinton Agar Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa* with Gentamicin: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 19: 987~992, 1981
- 7) FASS, R. J. & J. BARNISHAN: Effect of Divalent Cation Concentrations on the Antibiotic Susceptibilities of Nonfermenters other than *Pseudomonas aeruginosa*: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 16: 434~438, 1979
- 8) 渡辺 彰, 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 青沼清一, 大沼菊夫, 今野 淳: 臨床分離病原菌の保存による MIC の低下と  $\beta$ -lactamase 活性との関連について: 第 29 回日本化学療法学会東日本支部総会講演抄録集, 77, 1982

COMPARATIVE STUDY BETWEEN MICs DETERMINED  
BY DYNATECH MIC 2000 SYSTEM AND  
BY STANDARD AGAR DILUTION METHOD  
(ON MH AND HI MEDIUM)

MASAKO SASAKI, KOTARO OIZUMI, AKIRA WATANABE,  
SEIICHI AONUMA, KIKUO ONUMA and KIYOSHI KONNO  
Department of Internal Medicine, the Research Institute for Chest  
Diseases and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan

Minimal inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics including ABPC, SBPC, PIPC, CFS, GM, DKB, AMK, CEZ, CMZ, CTM, CZX, CPZ and LMOX against 7 species of bacteria (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *S. liquefaciens*) were determined by a broth dilution method and by an agar dilution method (standard method of Japan Chemotherapy Society), on heart infusion (HI) medium and Mueller Hinton (MH) medium. For the broth dilution method, Dynatech MIC 2000 system was used and the inoculum size of bacteria was 0.0015 ml of 10<sup>th</sup> dilution of an overnight culture. For the agar dilution method, microplanter was used and the inoculum size of bacteria was 0.005 ml of 100<sup>th</sup> dilution of an overnight culture.

Neither statistical difference between means of MICs determined by HIB and MHB, nor between means of MICs by MHA and HIA was observed in all of the bacterial species tested.

No statistical difference between mean MICs determined by the broth dilution method (MHB) and by the agar dilution method (MHA) was observed in almost all of the bacterial species tested, except that mean MICs of AGs against *P. aeruginosa* determined by the broth dilution method were statistically lower than that by the agar dilution method.

On *S. aureus*, MICs of ABPC, PIPC, GM, DKB and AMK for fresh isolates were statistically higher than that for the stocked strains. On *S. epidermidis*, MICs of ABPC, PIPC, DKB and CZX for fresh isolates were statistically higher than that for the stocked. On *P. aeruginosa*, MICs of GM, AMK, CPZ, and LMOX for fresh isolates were statistically higher than that for the stocked. Also, statistically higher MICs for the fresh isolates in comparison with that for the stocked strains were observed for *E. coli* of AMK, for *K. pneumoniae* of LMOX, and for *S. liquefaciens* of CZX and CPZ.