

## MIC 2000 システムによる MIC 測定方法の検討：日本化学療法学会標準法による MIC 測定との比較

角井 徹・中野 博・世古昭三  
 榊 知果夫・畑地康助・仁平寛巳  
 広島大学医学部泌尿器科

(昭和 59 年 8 月 1 日受付)

*S. marcescens* と *P. aeruginosa* の臨床分離株を各 50 株使用して ampicillin (ABPC), carbenicillin (CBPC), piperacillin (PIPC), cefazolin (CEZ), ceftizoxime (CZX), latamoxef (LMOX), gentamicin (GM), amikacin (AMK), fradiomycin (FRM), polymixin-B (PL-B), nalidixic acid (NA), pipemidic acid (PPA), minocycline (MINO) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を MIC 2000 システムによる Mueller Hinton broth を培地とした微量液体培地希釈法 (最終接種菌量  $10^4$  CFU/ml) と、日本化学療法学会標準法による Mueller Hinton agar を培地とした寒天平板培地希釈法とで測定し、MIC の差が 1 管以内を両測定方法の一致として一致率を検討したところ、以下の結果を得た。

1. *S. marcescens* では LMOX の 62%、MINO の 56% を除き、他は 90% 近くかそれ以上の一致率であった。液体培地の最終接種菌量を  $10^8$  CFU/ml と増量することにより LMOX、MINO における一致率は著明に改善されたが、液体培地中の  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  濃度の影響は認めなかった。

2. *P. aeruginosa* では、penicillin 系、cephem 系の薬剤においては約 90% かそれ以上の一致率であったが、他の一致率は GM 34%、AMK 12%、FRM 12%、PL-B 12%、MINO 12%、PPA 56% と不良であった。最終接種菌量を  $10^8$  CFU/ml と増量することにより一致率の改善が認められたのは PPA および MINO のみであった。aminoglycoside 剤および PL-B では液体培地中の  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  濃度を寒天培地中のそれに近い濃度に増量することにより、はじめて一致率の著明な改善が得られた。

近年の新しい抗菌剤の開発は目覚ましいものがあるが、他方では感染症の変遷や難治性感染症の増加もあって抗菌剤の選択は複雑となってきている。日常の臨床において抗菌剤選択の重要な指標の一つに抗菌力測定があげられ、簡単で実用的な方法として感受性ディスクによる感受性試験が臨床的に広く利用されている。しかしこの方法は半定量的なもので、抗菌力の定量的表示としては MIC の測定が望ましい。とくに尿路感染症においては抗菌剤の尿中濃度が治療に重要な関連があるので MIC という情報が必要であり、血中濃度を基準にしたディスク法による感受性検査の成績のみでは不十分の感が強い。したがって MIC の測定が日常のルーチン検査として望ましいのであるが、現行の MIC 測定法は多大の労力と時間を要する点が妨げとなって、日常の臨床的検査に採用することが困難となっている。この難点を解消する目的で微量液体培地希釈法を用いた MIC 2000 (日本ダイナテック社) という半自動測定装置が開発さ

れた。しかし現在のところ実際に臨床分離株を用いての検討ははまだ充分とは言えない。そこで著者らは尿路感染症より分離された *S. marcescens* および *P. aeruginosa* を使用して本法により MIC を測定し、日本化学療法学会標準法によって測定された MIC と比較検討した成績を報告する。

### I. 対象と方法

#### 1. 被検薬剤

penicillin 系の ampicillin (ABPC), carbenicillin (CBPC), piperacillin (PIPC), cephem 系の ceftizoxime (CZX), latamoxef (LMOX), aminoglycoside 系の gentamicin (GM), amikacin (AMK), fradiomycin (FRM), その他 polymixin-B (PL-B), nalidixic acid (NA), pipemidic acid (PPA), minocycline (MINO) の 12 剤について MIC の測定を行なった。

#### 2. 被検菌株

広島大学附属病院泌尿器科の臨床検体より分離され、保存している *S. marcescens* および *P. aeruginosa* の各 50 株を MIC 測定用の菌株に使用した。

接種菌液は Heart Infusion medium(栄研)を用いて 37°C 一夜培養にて増菌をし、Buffered Saline with Gelatin(BSG) で  $10^8$  CFU/ml に調製したものを使用した<sup>1)</sup>。

### 3. MIC 測定法

#### 1) 寒天平板希釈法

日本化学療法学会標準法に準じて行なった<sup>1)</sup>。すなわち培数希釈された薬剤を含む Mueller Hinton agar (Difco, 以下 MHA と略す) 平板に  $10^8$  CFU/ml の菌液を接種し、37°C, 18 時間培養後に最小発育阻止濃度 (MIC) の判定を行なった。なお薬剤の濃度は LMOX, CZX, MINO が 100  $\mu$ g/ml から 0.05  $\mu$ g/ml, aminoglycoside 剤と PL-B が 400  $\mu$ g/ml から 0.2  $\mu$ g/ml, その他は 1,600  $\mu$ g/ml から 0.78  $\mu$ g/ml の範囲で希釈系列を作製した。

#### 2) 微量液体培地希釈法

寒天平板希釈法と同じ薬剤希釈系列を作製し, Mueller Hinton broth(Difco, 以下 MHB と略す) を培地として MIC 2000 システムにより 96 孔のマイクロプレートに分注後,  $-80^\circ\text{C}$  にて保存した。使用時はこれを室温で解凍し, MIC 2000 システム内で  $10^8$  CFU/ml の菌液を用いて接種を行ない, 37°C, 18 時間培養後に MIC の判定を行なった。なおこの時の各ウェル中の最終接種菌量は  $1.5 \times 10^4$  CFU/ml となる。

## II. 結 果

液体培地希釈法での MIC が化療標準法による MIC

と 1 管以内の差であるものを成績一致と判定して、各種薬剤の一致率を算出した。

*S. marcescens* を被検菌株にした場合に penicillin 系はいずれも 90% 以上の一致率であったが、LMOX は 62% と一致率は低下した。aminoglycoside 系では一致率は GM 88%, AMK 100%, FRM 78% と良い成績が得られた。その他では PL-B 100%, NA 98%, PPA 96% と高い一致率であったが、MINO は 56% と低い一致率であった (Table 1)。

*P. aeruginosa* を被検菌株に使用した場合に一致率は penicillin 系は 88% 以上, cephem 系も 90% 以上であった。aminoglycoside 系の一致率は GM 34%, AMK 12%, FRM 12% であった。その他は NA 92%, PL-B 12%, PPA 56%, MINO 12% の一致率であった。すなわち aminoglycoside 剤, PL-B, PPA および MINO において一致率は低値であった (Table 2)。

以上、一致率が低値を示した薬剤においては *S. marcescens* および *P. aeruginosa* のいずれの場合も、微量液体希釈法における最終接種菌量が化療標準法に比較して少ないことが考えられた。そこで最終接種菌量を  $10^8$  CFU/ml となるように菌液を調整して再度比較試験を行なうと、*S. marcescens* 使用における LMOX, MINO の一致率はそれぞれ 100%, 90% と改善した (Fig. 1, 2)。同様に *P. aeruginosa* 使用における PPA, MINO の一致率もそれぞれ 95%, 81% と改善したが aminoglycoside 剤, PL-B においては接種菌量を  $10^8$  CFU/ml にしても GM 5%, AMK 10%, FRM 3%, PL-B 14% と一致率の改善はみられなかった (Table 3)。従来から *P. aeruginosa* の aminoglycoside 剤, PL-B, MINO に対する感受性は培地中の  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  などの影響

Table 1 Difference in dilution rate of broth dilution MICs (MIC 2000) from that of agar dilution MICs (standard method)

(50 strains of *S. marcescens*)

Antimicrobial agents	Difference in dilution rate							Agreement (%)
	$\leq -3$	-2	-1	0	+1	+2	$\geq +3$	
ABPC	0	0	2	45	2	1	0	98
CBPC	0	0	0	44	3	3	0	94
PIPC	1	0	1	40	8	0	0	98
CEZ	0	0	1	49	0	0	0	100
CZX	1	2	18	27	1	0	1	92
LMOX	5	14	24	7	0	0	0	62
GM	0	6	23	15	2	0	0	88
AMK	0	0	16	34	0	0	0	100
FRM	0	11	25	14	0	0	0	78
PL-B	0	0	1	49	0	0	0	100
NA	0	0	2	45	2	1	0	98
PPA	0	1	20	28	0	1	0	96
MINO	7	15	21	7	0	0	0	56

Table 2 Difference in dilution rate of broth dilution MICs(MIC 2000) from that of agar dilution MICs (standard method)

(50 strains of *P. aeruginosa*)

Antimicrobial agents	Difference in dilution rate							Agreement(%)
	≤ -3	-2	-1	0	+1	+2	≥ +3	
ABPC	1	5	15	29	0	0	0	88
CBPC	1	2	9	36	2	0	0	92
PIPC	2	4	16	25	3	0	0	88
CEZ	1	0	3	46	0	0	0	98
CZX	0	3	31	16	0	0	0	94
LMOX	0	3	27	20	0	0	0	94
GM	28	5	10	5	2	0	0	34
AMK	30	14	5	1	0	0	0	12
FRM	36	8	5	1	0	0	0	12
PL-B	20	23	1	5	0	0	1	12
NA	0	4	19	27	0	0	0	92
PPA	3	19	23	4	1	0	0	56
MINO	31	12	4	1	1	1	0	12

Fig. 1 Comparison of MICs of LMOX against *S. marcescens* between agar dilution method and broth dilution method (MIC 2000)

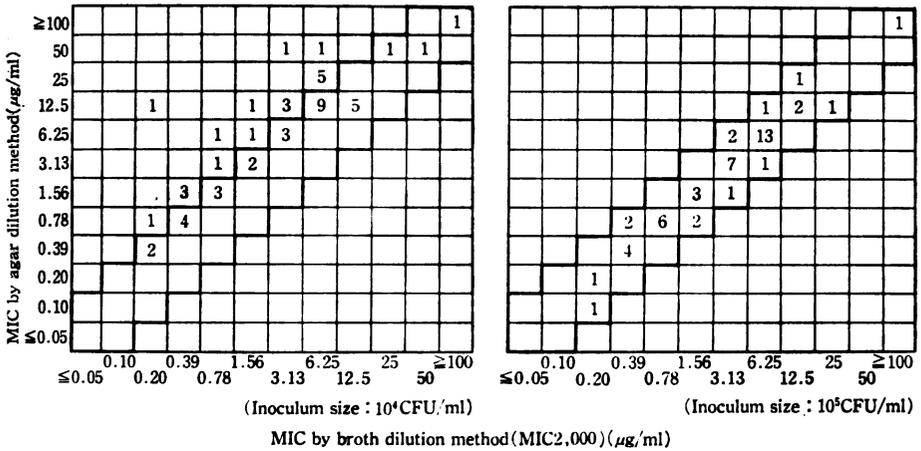


Fig. 2 Comparison of MICs of MINO against *S. marcescens* between agar dilution method and broth dilution method (MIC 2000)

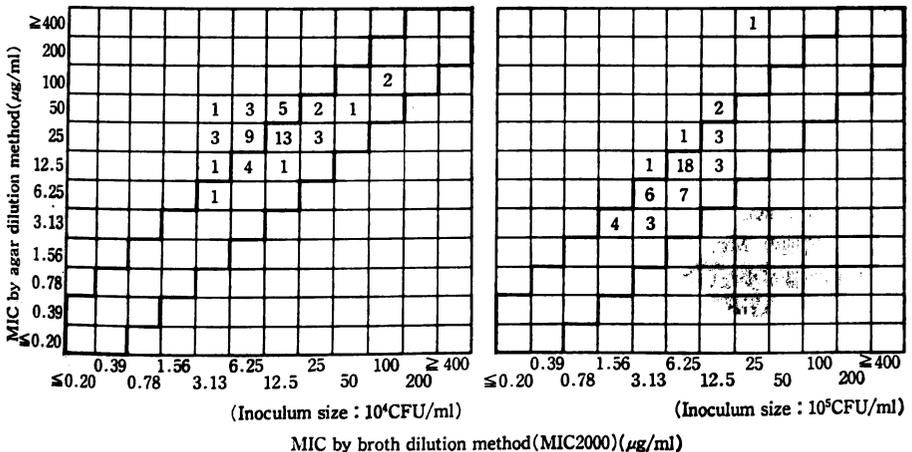


Table 3 Difference in dilution rate of broth dilution MICs (MIC 2000) from that of agar dilution MICs (standard method)  
(42 strains of *P. aeruginosa*, inoculum size:  $10^8$  CFU/ml)

Antimicrobial agents	Difference in dilution rate							Agreement (%)
	≤ -3	-2	-1	0	+1	+2	≥ +3	
GM	24	16	1	1	0	0	0	5
AMK	14	24	4	0	0	0	0	10
FRM	23	18	0	1	0	0	0	3
PL-B	11	20	4	6	0	0	0	14
MINO	0	8	27	7	0	0	0	81
PPA	0	2	24	15	1	0	0	95

Table 4 Difference in dilution rate of broth dilution MICs (MIC 2000) from that of agar dilution MICs (standard method) after supplementing MHB with calcium and magnesium

(42 strains of *P. aeruginosa*)

Antimicrobial agents	Difference in dilution rate							Agreement (%)
	≤ -3	-2	-1	0	+1	+2	≥ +3	
GM	1	10	22	9	0	0	0	74
AMK	0	10	26	6	0	0	0	76
FRM	1	8	27	6	0	0	0	79
PL-B	1	6	17	18	0	0	0	83
MINO	0	1	4	37	0	0	0	98
PPA	0	0	5	35	2	0	0	100

Table 5 Difference in dilution rate of broth dilution MICs (MIC 2000) from that of agar dilution MICs (standard method) after supplementing MHB calcium and magnesium

(50 strains of *S. marcescens*, inoculum size:  $10^8$  CFU/ml)

Antimicrobial agents	Difference in dilution rate							Agreement (%)
	≤ -3	-2	-1	0	+1	+2	≥ +3	
LMOX	0	3	15	23	8	0	0	94
GM	2	7	31	8	2	0	0	82
AMK	2	2	28	18	0	0	0	92
FRM	2	11	24	10	2	0	0	72
PPA	0	0	20	30	0	0	0	100
MINO	0	4	31	12	0	0	0	91

を受け、これらの重金属イオンが増加すると細菌の耐性が増加するといわれている<sup>2-4)</sup>。今回著者らが使用した培地の Mg と Ca の含有量は MHA ではそれぞれ 2.3 mg/dl, 4.1 mg/dl であったのに比較して、MHB では両者ともに 0.7 mg/dl と低値であった。*P. aeruginosa* を使用した場合に、培地の Mg, Ca 含有量がともに低値であることと接種菌量が少ないことが相互に作用して、微量液体希釈法による MIC が化療標準法による MIC に比較して低値を示したものと考えられた。そこで MHB に  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  と  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  を添加して MHA の Mg, Ca 含有量と同量にし、最終接種菌量は

$10^8$  CFU/ml として再度比較試験を行なった。結果は GM 74%, AMK 76%, FRM 79%, PL-B 83%, MINO 98% と一致率が著明に増加した。また同時に行なった PPA は 100% の一致率であった (Table 4)。

*S. marcescens* を使用した場合においても  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  などのイオンを培地に添加し、これらの薬剤における一致率を検討したが変化はなく、この場合は重金属イオンの影響はほとんどないものと考えられた (Table 5)。

### III. 考 察

近年は抗菌剤の開発が目覚ましく、多種多様の抗菌

剤が臨床的に使用されるようになった。しかし一方ではこれに対応して、耐性菌の出現、あるいは自然耐性を有する常在菌の関与などがあるために、感染症の治療には起炎菌に対して十分な抗菌力を有する薬剤の選択が重要な問題となっている。この点でディスク法による薬剤感受性試験は簡便であるために臨床的に広く施行され、治療薬剤の選択に必要な情報を提供しているわけである。しかしこの検査の成績は抗菌力の半定量的な表示で、かつ測定誤差や精度管理に問題があって<sup>9)</sup>、精度が高い MIC の測定が臨床上也望まれるところである。また尿路感染症においては抗菌剤の尿中濃度が治療に重要な関連があるので、薬剤の血中濃度を基準にしたディスク法による感受性検査の成績と腎排泄型の抗菌剤の治療成績との間にかなりの不一致が認められた。これらの問題点の解消のために、薬剤の抗菌力を定量的に示す MIC の測定が必要となってくる。

MIC の測定には寒天平板希釈法と液体培地希釈法の 2 種類があるが、前者は操作が簡単で一度に多くの細菌株の試験が可能であることより、本邦では日本化学療法学会標準法として寒天平板希釈法を用いた MIC の測定が制定されている<sup>1)</sup>。しかしこの方法は測定の度に数多くの器具を準備し、かつ寒天培地や薬剤希釈系列の作製などに要する時間は多大であるため、臨床的に広く施行されるまでには至っていない。MIC 2000 システムは液体希釈法を用いたものであるが、96 孔のマイクロプレートを使用することで培地や接種菌液の微量化を図るシステムである。また測定しようとする各種抗菌剤の希釈系列を一度に大量作り、 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $-60^{\circ}\text{C}$  で保存しておけば約 2 か月は MIC が変動しないので<sup>9)</sup>、この期間中は随時に MIC 測定が可能となり、かなり省力化されることとなる。

通常の MIC 測定に際して、その値に影響を与える大きな因子として、まず第一に接種菌量があげられる。今回の実験では寒天平板希釈法と微量液体希釈法用の 2 種類の菌液を作製する手間を省くため、 $10^8$  CFU/ml の菌液 1 種類を用意して接種した。このため微量液体希釈法におけるウェル中の最終接種菌量は  $1.5 \times 10^4$  CFU/ml となり、結果としてこの方法による MIC は化療標準法のそれより総じて低目であった。そこで最終接種菌量を  $10^8$  CFU/ml となるように菌液を作製して比較すると、*S. marcescens* を使用した場合の一致率は著明に改善した。諸家の報告では菌液の最終接種濃度は  $10^8$  CFU/ml となるのが最適であるとされており<sup>7,8)</sup>、それを裏付ける成績であった。

MIC 測定に影響を及ぼす第二の因子として培地の成分がある。特に *P. aeruginosa* に対する aminoglycoside

剤や tetracycline 系薬剤などの MIC は培地中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度の影響を受け、寒天平板希釈法と液体希釈法を比較した場合は液体培地中の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の含有量が少ないため、液体培地による MIC は通常 1～3 管低くなるといわれている<sup>9,10)</sup>。すなわち  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{Mg}^{2+}$  が抗菌剤の活性を低下させるため、*P. aeruginosa* の耐性が増加すると考えられている<sup>9,10)</sup>。著者らの成績でも  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の添加により微量液体希釈法による MIC が上昇し、寒天平板希釈法との一致率が著明に改善した。*P. aeruginosa* だけでなくほとんどのブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌はこれらイオンの影響を受け、その添加により MIC が上昇するという報告もあるもので<sup>9)</sup>、MHB にこれらのイオンを添加して検査を行なうべきであろう。

しかし MHB の Ca と Mg の含有量は一定でないため、今後は実際に使用するにあたってどの程度これらの物質を加えるかが問題である。一般的には Ca が 5.0 mg/dl, Mg が 2.5 mg/dl になるように補正するのがよいといわれている<sup>9,10)</sup>。今回は化療標準法との比較という意味で MHA の含有量である Ca 4.1 mg/dl, Mg 2.3 mg/dl と同等にしたが、ほぼ満足できる結果であったので、おおよそこの位の値であれば実際には差支えないものと思われる。

次に MIC 2000 の使用上の利点としては、(1) 従来から MIC の測定に要していた時間、労力などの大幅な節約が可能である、(2) プレートの凍結保存により随時に MIC の測定が可能で、治療薬剤の選択に有力な情報を提供できる、(3) 検査に使用する薬剤の微量化により、検査室内、浮卵器内など検査に使用する場所の狭小化などをあげることができる。問題点としては、(1) 菌接種皿、マイクロプレートなどの消耗品が比較的高価であるから維持経費が割高である、(2) 分注器が大きい ( $34 \times 40 \times 24$  cm) ので、この滅菌のために大型のオートクレーブが必要である、(3) 被検薬剤の種類、薬剤濃度希釈段階の制定、感受性基準の設定などがあげられる。とくに検査すべき薬剤の種類、薬剤濃度の希釈段階などは診療科、あるいは施設によって異なることも考えられる。したがって臨床的頻度が高い細菌に対して有効な基準的薬剤を選択し、それぞれの濃度段階の制定と感受性基準の設定を今後検討していく必要があると思われる。

以上のように MIC 2000 システムの使用により得られた *S. marcescens*, *P. aeruginosa* の MIC は、接種菌量や培地中の  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  を調節することにより化療標準法のそれとよく一致した。他の菌種についても検討し化療学会に発表してきたが、いずれもよく一致しており、

現行の化療標準法による MIC の測定と同等に評価できるものと思われる。

本論文の要旨は、第 31 回日本化学療法学会総会 (1983 年 6 月, 大阪) において発表したものである。

#### 文 献

- 1) MIC測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 2) CHERNE, J. E. & L. R. PETERSON: Microdilution aminoglycoside susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* with a cation-supplemented inoculum. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 210~211, 1980
- 3) D'AMATO, R. F.; C. THONSBERRY, C. N. BAKER & L. A. KIRVEN: Effect of calcium and magnesium ions on the susceptibility of *Pseudomonas* species to tetracycline, gentamicin, polymyxin B, and carbenicillin. Antimicrob. Agents Chemother. 7: 596~600, 1975
- 4) 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. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 987~992, 1981
- 5) 菅野治重: 感受性試験に於ける MIC 測定導入の意義。第一回 MIC 研究会, 1982
- 6) BARRY, A. L.; R. N. JONES & T. L. GAVAN: Evaluation of the micro-media system for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing: a collaborative study. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 61~69, 1978
- 7) PETERSON, L. R.; D. N. GERDING, M. M. JONSON, J. E. CHERNE, B. J. OFFER & W. H. HALL: Evaluation of a commercial microdilution system for quantitative susceptibility testing of aminoglycosides against multidrug-resistant, gram-negative bacilli. Antimicrob. Agents Chemother. 17: 20~23, 1980
- 8) FASS, R. J. & J. BARNISHAN: Effect of divalent cation concentrations on the antibiotic susceptibilities of nonfermenters other than *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 16: 434~438, 1979
- 9) KENNY, M. A.; H. M. POLLOCK, B. H. MINSHEW, E. CASILLAS & F. D. SCHOENKNECHT: Cation components of Mueller-Hinton Agar affecting testing of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to gentamicin. Antimicrob. Agents Chemother. 17: 56~62, 1980
- 10) REIMER, L. G.; C. W. STRATTON & L. B. RELER: Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of 44 antimicrobial agents against three standard control strains in broth with and without human serum. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 1050~1055, 1981

COMPARATIVE STUDY OF THE MINIMAL INHIBITORY  
CONCENTRATION BETWEEN MICRODILUTION  
ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING  
SYSTEM (MIC 2000) AND STANDARDIZED  
AGAR DILUTION METHOD

TORU SUMII, HIROSHI NAKANO, SHOZO SEKO, CHIKAO MASU  
KOSUKE HATACHI and HIROMI NIHIRA

Department of Urology, Hiroshima University School of Medicine

Minimal inhibitory concentrations of ampicillin (ABPC), carbenicillin (CBPC), piperacillin (PIPC), cefazolin (CEZ), ceftizoxime (CZX), latamoxef (LMOX), gentamicin (GM), amikacin (AMK), fradiomycin (FRM), polymixin-B (PL-B), nalidixic acid (NA), pipemidic acid (PPA) and minocycline (MINO) against 50 clinical isolates of *S. marcescens* and *P. aeruginosa* were compared between the microdilution method using Dynatec 2000 system with Mueller Hinton broth and the agar dilution method with Mueller Hinton agar (standardized method of Japan Society of Chemotherapy).

Above or below the range of a double dilution, major discrepancy between the results of the two methods was found frequently for LMOX and MINO against *S. marcescens*, and more frequently for GM, AMK, FRM, PL-B and PPA against *P. aeruginosa*. For LMOX and MINO against *S. marcescens*, and PPA and MINO against *P. aeruginosa*, the frequency of the discrepancy was markedly decreased by increasing the final concentration of inoculated organisms from  $10^4$  CFU/ml to  $10^8$  CFU/ml in the microdilution method. For aminoglycosides and PL-B against *P. aeruginosa*, the frequency of the discrepancy was not decreased by increasing the final concentration, and decreased markedly by supplementation of calcium and magnesium into the broth to the level of the agar.