

微量液体希釈法による *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*,
Haemophilus influenzae および *Branhamella catarrhalis* の抗菌薬に
対する感受性測定用培地の検討と本法による臨床分離株の感受性分布

杉浦 朗・高山 保・城野久美子
株式会社武田分析研究所*

(平成2年7月13日受付・平成2年9月6日受理)

抗菌薬感受性測定法として日本化学療法学会で標準化された微量液体希釈法において、コンピューター制御の光度計による最小発育阻止濃度 (MIC) を判定する半自動化のシステムを、栄養要求のきびしい菌種に対して適用できる測定培地を検討した。*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, ならびに *Haemophilus influenzae* に対して接種菌用および測定用培地として、それぞれBrain Heart Infusion液体培地 (BHI) と5%ウマ血清 (HS) 加 Mueller-Hinton 液体培地 (MHB), クックドミート培地 (CM) と、5% HS 加 BHI, ならびに Hemin (X 因子, X), β -diphosphopyridine nucleotide (V 因子, V) 添加 BHI と、X, V 添加 BHI を使用したところ、接種菌はそれぞれ20時間 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml の生菌数を保持し、接種菌量の調整が容易にできた。また MIC は寒天平板希釈法の標準法と比較して、ampicillin (ABPC), cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cefmenoxime (CMX), および gentamicin (GM) では60~100%の一致率が得られたが、minocycline (MINO) では一致率が低かった。*Branhamella catarrhalis* は、MHB中菌塊が発生し、接種菌量の調整がし難かったが、振とう培養すると37°C, 13~20時間均一な接種菌液としての生菌数を保持できた。しかし、 Mg^{++} 25 μ g/ml と Ca^{++} 50 μ g/ml 添加した MHB を使用した微量液体希釈法では、マイクロプレートの底に菌塊となって増殖し、自動化のためには不十分であった。これらの培養条件で1989年度の臨床分離株について上記の6薬剤に対する感受性分布を調査した。

Key words: 微量液体希釈法, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*

抗菌薬の感受性測定のために、日本化学療法学会において寒天平板希釈法による測定法が標準法として設定され¹⁾、その後2回に渡って改訂が行われた^{2,3)}。一方、欧米諸国では近年液体希釈法⁴⁾による最小発育阻止濃度 (MIC) の測定が主流となり、臨床検査においても広く採用され、測定機器も利用されている。マイクロプレートを利用する微量液体希釈法は、製品、機器の開発に伴い、薬剤、培地が少量で測定でき経済的であること、また成績の信頼性も高く迅速性、操作が容易であることから、日本でもそれらの利用者が増加するにつれ、日本化学療法学会で抗菌薬感受性測定法検討委員会で検討された結果、微量液体希釈法の標準法が設定された⁵⁾。しかし、寒天平板標準法の附4に記載された栄養要求のきびしい菌種については触れられていない。National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) では pneumococci に2~5%溶血ウマ血液添加

Mueller-Hinton 液体培地⁶⁾を使用すること、また *Haemophilus* 測定用培地⁷⁾の試み、その培地の *Streptococcus pneumoniae* への応用⁸⁾など、これらの菌種についても液体希釈法用の培地について検討はされている。我々も微量液体希釈法によって、臨床分離株の抗菌薬の感受性を測定してきたが、これらの栄養要求の厳しい菌種ならびに呼吸器感染症に急増してきた *Branhamella catarrhalis* について、寒天平板法の標準法と比較して MIC 値に大きな変動がなく、できるだけ透明で、調製も容易な培地を検討した。前培養条件を含め、半自動化を目的としたコンピューター制御の測定システムに適用できる方法が設定できたので、培養条件ならびに本条件で測定した1989年度に臨床から分離された株の感受性分布を報告する。

I. 材料および方法

1. 試験菌株

*大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

1987～1989年に京都第二赤十字病院泌尿器科、県立広島病院内科、北野病院臨床検査部、および福岡市医師会臨床検査センターの4施設で分離された *Streptococcus pyogenes* 69株、*Streptococcus pneumoniae* 89株、*Haemophilus influenzae* 95株、*Branhamella catarrhalis* 48株、ならびに東京大学医科学研究所より分譲された *S. pneumoniae* IID 553, IID 554, *H. influenzae* IID 983, IID 984を使用した。

2. 供試薬剤

Ampicillin (ABPC, 武田薬品), cefazolin (CEZ, 藤沢薬品), cefotiam (CTM, 武田薬品), cefmenoxime (CMX, 武田薬品), gentamicin (GM, エッセクス日本), minocycline (MINO, 日本レグリー) の6薬剤を使用した。

3. 培地および添加物

次の培地ならびに添加物を使用した。Mueller-Hinton 寒天培地 (MHA, Difco), Mueller-Hinton 液体培地 (MHB, Difco), Brain Heart Infusion 寒天培地 (BHA, Difco), Brain Heart Infusion 液体培地 (BHI, Difco), クックドミート培地 (CM, 日本水製薬) Fildes 消化血液 (Fildes Enrichment, FE, Difco), ウマ血液 (HB, 日本生物材料センター), ウマ血清 (HS, M. A. Bioproducts), 塩化マグネシウム (Mg^{++} , 和光純薬, 試薬特級), 塩化カルシウム (Ca^{++} , 和光純薬, 試薬特級), Hemin (X因子, X, 和光純薬) β -diphosphopyridine nucleotide (DPN, 酵母製, V因子, V, 和光純薬)

4. 増殖度の測定

i) 濁度の測定

各培養後の液体培地についてフォトメーター (日立 100-26型, 600 nm, 光路長 1 cm) で、吸光度を測定した。

ii) 生菌数の測定

S. pyogenes および *S. pneumoniae* は BHA, *H. influenzae* は 5% FE 加 MHA, *B. catarrhalis* は MHA を使用し、混釈寒天平板法または Spiral System (Spiral System Instruments Ltd., グンゼ産業販売) によって、37°C, 24時間培養後、生育したコロニー数を計測した。なお、*S. pyogenes* のように透明コロニーのため、Spiral System のレーザーコロニーカウンターで検出しにくい菌種に対しては、0.1% MTT 試薬 (3-(4,5-dimethyl 2-thiazoyl) 2,5-diphenyl 2H tetrazolium) を培養後のコロニー上に噴霧して発色させた後レーザーコロニーカウンターで計測した。

5. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

1) 寒天平板希釈法

日本化学療法学会標準法³⁾の附4栄養要求のきびしい菌種の MIC 測定に準じて測定した。抗菌薬は市販薬剤の表示力価に基づいて、1,000 μ g/ml の滅菌水溶液を調製し、無菌的にタイリューター (株大日本精機) を用いて滅菌水で2倍希釈系列を調製した。接種菌液は下記の微量液体希釈法と同一の菌液について、測定用培地として *S. pyogenes* および *S. pneumoniae* は 5% HB 加 MHA, *H. influenzae* は 5% FE 加 MHA, *B. catarrhalis* は MHA を使用し、接種菌量 10^8 cfu/ml をマイクロプランター (佐久間製作所) で約 5 μ l ずつスポット接種し、37°C, 18～20時間培養後、発育が阻止された最小濃度を MIC とした。

2) 微量液体希釈法

i) 抗菌薬の希釈法

市販薬剤の表示力価に基づいて、それぞれ以下に検討した感受性測定用液体培地で100 (寒天培地希釈法との比較のためには、寒天培地希釈法の標準法の濃度を使用) または 128 μ g/ml の溶液を調製し、無菌的にタイリューター (株大日本精機) によって同じ培地で2倍希釈系列を調製した。

ii) 微量液体希釈プレートの調製

上記希釈系列を96穴マイクロプレートを使用する微量液体希釈法用装置 MIC-2000 (日本ダイナテック, 長瀬産業販売) のディスペンサーで100 μ l ずつ分注し、滅菌済合成樹脂製袋に封入し、-20°C で予備凍結後-80°C に凍結保存した。なお、本保存法によって希釈薬剤は6か月安定であることを確認した。使用時このマイクロプレートを自然解凍し、5時間以内に使用した。

iii) 接種菌液の調製および接種

それぞれの菌種毎に以下に検討した培地に、試験菌を1白金耳接種し、37°C, 18～20時間培養し、その1 ml をゼラチン含有緩衝生理食塩水 (BSG) 30 ml に加えて 10^6 ～ 10^7 cfu/ml の生菌数に希釈し、その全量を MIC-2000 用一槽接種皿に入れた。これを MIC-2000 のイノキュレーターによって、微量液体プレートの各ウェルに約 1.5 μ l ずつ接種した。本操作による最終接種菌量は 10^4 ～ 10^5 cfu/ml となる。

iv) 培養

菌を接種したプレートは、最上部をアルミホイルでおい、培養温度が均一になるように穴のあいたトレイに並べて 35°C, 18～20時間培養した。

v) 判定法

菌の発育による濁度を、96穴マイクロプレート用光度計 (タイターテック[®], マルチスキャン MCC, 大日本製薬販売, 620 nm のフィルター使用) とパーソナル

コンピューター (NEC, PC 9801) による解析装置を使用して測定し、それぞれの培地の吸光度によるリミット値を設定することにより MIC 値を得た。なお、測定時、コロニーの散在やスキップ現象、また、菌の発育以外にプレートの傷や泡などによる吸光度の誤測定を防止するため、測定プレートを肉眼でチェックし、キーボード入力による修正機能を付与した。

II. 実験結果

1. *S. pyogenes*

1) 接種菌の培養

本菌種は MHB では 10^7 cfu/ml 程度までしか増殖しなかったため、接種菌の培養として適当ではなく、より増殖しやすく、また 18~22 時間ほぼ一定の生菌数を保つことができる培地を検討した。培地として BHI を使用した結果、37°C、18~22 時間培養後の生菌数は $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml となり、充分な接種菌量を得ることができた。

2) 感受性測定

臨床分離株 24 株について、日本化学療法学会標準法の附 4 に記載された 5% HB 加 MHA と微量液体希釈法の 5% HS 加 MHB による MIC の差を Table 1 に示した。ABPC, CEZ, CTM, および CMX では供試菌株すべての MIC が一致し、GM では 1 株のみ 2 管微量液体希釈法の方が感受性が高くなった。MINO では微量液体希釈法の方が感受性が高くなる株が 10 株、低くなる株が 1 株認められた。

2. *S. pneumoniae*

1) 接種菌の培養

本菌種は日本化学療法学会標準法の附 4 に記載され

た 5% HB 加 MHB, ならびに 5% FE 加 MHB 中 37°C 培養で $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml まで増殖可能であったが、最大の増殖に達する時間が 1 夜以内であり、その後、生菌数が定常状態を保つ時間が短く、被験時濁度は大きいが生菌数が減少しているものが多かった。そこで、MIC 測定のために、18~22 時間ほぼ一定の生菌数を保つことができる培地を検討した。臨床分離株 14 株ならびに HD 株 2 株について 1 白金耳を、BHI ならびに菌株保存用培地の CM 培地 5 ml に移植し、37°C、15 および 22 時間培養後の吸光度と生菌数を Table 2 に示した。

BHI では、培養 15~22 時間においていずれの株も濁度は高かったが、生菌数で見ると 15 時間目に $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml に達し、22 時間目になると 10^4 cfu/ml に減少する株や、15 時間目にはすでに 10^4 cfu/ml 以下に減少する株がみられた。一方、CM では濁度は低い、さきの減少した株でも 22 時間 10^8 程度の生菌数を保ち、一定の接種菌量を得ることができた。

2) 感受性測定

臨床分離株 16 株について、測定用培地として 5% HS 加 MHB で培養したとき、増殖可能な菌株と不可能な菌株がみられたので、5% HS 加 BHI を使用したところ供試菌株すべてが増殖し、増殖状態を光度計で測定することができた。微量液体希釈法の培地として 5% HS 加 BHI を使用したとき、寒天平板希釈法の 5% HB 加 MHA を使用したときの MIC の差を Table 3 に示した。供試 6 薬剤中 CEZ および CTM はすべてが、ABPC および MINO では 14 株が、また CMX では 12 株が ± 1 管以内に入ったが、GM では 9

Table 1. Comparison of broth microdilution to agar dilution MICs against 24 strains of *Streptococcus pyogenes*

| Drug | No. of strains with indicated ratio of BMD \log_2 (MIC) to AD \log_2 (MIC) | | | |
|-------------|--|----|-------|----|
| | -3 | -2 | -1~+1 | +2 |
| Ampicillin | | | 24 | |
| Cefazolin | | | 24 | |
| Cefotiam | | | 24 | |
| Cefmenoxime | | | 24 | |
| Gentamicin | | 1 | 23 | |
| Minocycline | 1 | 9 | 13 | 1 |

Broth microdilution (BMD), 5% horse serum supplemented Mueller-Hinton broth

Agar dilution (AD), 5% horse blood-supplemented Mueller-Hinton agar

Table 2. Growth of *Streptococcus pneumoniae* in brain heart infusion broth (BHI) and cooked meat medium (CM) at 37°C for 15 and 22 h

| Strain no. | BHI | | | | CM | | | |
|------------|-----------------|-------|-----------------------------|-------------------|-----------------|-------|-----------------------------|-------------------|
| | Optical density | | Viable cell counts (cfu/ml) | | Optical density | | Viable cell counts (cfu/ml) | |
| | 15 h | 22 h | 15 h | 22 h | 15 h | 22 h | 15 h | 22 h |
| TY 272 | 1.224 | 1.278 | 8.0×10^7 | 8.9×10^7 | 0.280 | 0.200 | 1.6×10^8 | 1.6×10^8 |
| TY 274 | 1.624 | 1.701 | 6.7×10^8 | 1.9×10^8 | 0.365 | 0.345 | 1.9×10^8 | 1.4×10^8 |
| TY 277 | 0.456 | 0.540 | 2.5×10^6 | $< 10^4$ | 0.395 | 0.230 | 1.7×10^8 | 5.8×10^7 |
| TB 153 | 0.360 | 0.402 | 5.2×10^6 | $< 10^4$ | 0.135 | 0.130 | 6.0×10^6 | 5.6×10^6 |
| TB 309 | 0.660 | 0.655 | $< 10^4$ | $< 10^4$ | 0.360 | 0.315 | 4.0×10^7 | 2.3×10^7 |
| TB 310 | 1.026 | 1.078 | 6.1×10^8 | 4.4×10^8 | 0.250 | 0.230 | 1.5×10^8 | 1.3×10^8 |
| TB 311 | 0.745 | 0.625 | $< 10^4$ | $< 10^4$ | 0.255 | 0.295 | 1.0×10^8 | 1.0×10^8 |
| TB 315 | 0.588 | 0.628 | $< 10^4$ | $< 10^4$ | 0.305 | 0.230 | 1.4×10^8 | 1.4×10^8 |
| TB 316 | 0.520 | 0.436 | 1.0×10^5 | $< 10^4$ | 0.390 | 0.255 | 5.6×10^7 | 9.0×10^7 |
| TB 318 | 0.616 | 0.600 | 2.3×10^7 | $< 10^4$ | 0.385 | 0.305 | 5.6×10^7 | 5.4×10^7 |
| TB 319 | 0.580 | 0.428 | 4.0×10^4 | $< 10^4$ | 0.400 | 0.375 | 4.2×10^7 | 4.0×10^7 |
| TB 480 | 0.396 | 0.396 | $< 10^4$ | $< 10^4$ | 0.705 | 0.445 | 1.4×10^7 | 8.2×10^6 |
| TB 538 | 0.716 | 0.530 | 1.8×10^6 | 1.5×10^8 | 0.405 | 0.325 | 3.6×10^7 | 7.2×10^6 |
| TB 593 | 0.174 | 0.600 | 1.9×10^7 | 7.4×10^7 | 0.250 | 0.230 | 3.2×10^7 | 3.7×10^7 |
| IID-553 | 0.532 | 1.232 | 1.9×10^7 | 7.8×10^7 | 0.410 | 0.455 | 1.3×10^8 | 1.8×10^8 |
| IID-554 | 1.398 | 1.431 | 3.0×10^8 | 6.5×10^6 | 0.190 | 0.280 | 4.9×10^7 | 1.3×10^8 |

Table 3. Comparison of broth microdilution to agar dilution MICs against 16 strains of *Streptococcus pneumoniae*

| Drug | No. of strains with indicated ratio of BMD- \log_2 (MIC) to AD- \log_2 (MIC) | | | |
|-------------|--|-------|----|----|
| | -2 | -1~+1 | +2 | +3 |
| Ampicillin | | 14 | 1 | 1 |
| Cefazolin | | 16 | | |
| Cefotiam | | 16 | | |
| Cefmenoxime | | 12 | 3 | 1 |
| Gentamicin | | 9 | 7 | |
| Minocycline | 2 | 14 | | |

Broth microdilution (BMD), 5% horse serum-supplemented brain heart infusion broth

Agar dilution (AD), 5% horse blood-supplemented Mueller-Hinton agar

株のみの一致となり、MINO 以外は微量液体希釈法の方が感受性が低くなる傾向がみられた。

3. *H. influenzae*

1) 接種菌の培養

本菌種は日本化学療法学会標準法の附4に記載された5% FE加MHB中37°C培養で $10^7 \sim 10^8$ cfu/mlまで増殖可能であったが、消化血液中のHemin (X), DPM (V)を添加することによっても同様に増殖可能である^{7,9)}。5% FEにかえてMHBにX, Vをそれぞれ20 µg/ml添加(Xは10 mgを約3滴の濃アンモニア水に溶解し、精製水10 mlを加えた後、Vは10 mgを精製水10 mlに溶解後、それぞれ0.5 µmメンブロンフィルターでろ過滅菌し、所要量を高圧滅菌後冷却した基礎培地に無菌的に添加)した培地で増殖状態を調べたが、供試した25株の増殖状態はいずれも不良で、感受性測定用の接種菌として使用できなかった。そこで、基礎培地としてBHIを使用し、X, Vの必要量を調べた。Vの1 µg/mlに対してXを1~10 µg/ml添加した培地中の臨床分離株18株の増殖状態を、それぞれの濁度まで増殖した株数で示した(Fig. 1)。供試菌株によってXの要求量が異なり、1 µg/mlでも増殖可能な菌株もあったが、増殖不良の株もみられ、7.5 µg/ml以上添加するといずれの菌株も37°C, 16時間で接種菌として用いることができる増殖状態を示した。次に、Xの10 µg/mlに対してVを1, 5, ならびに10 µg/ml添加によっていずれも増殖が促進されたので、両

因子ともに10 µg/ml添加することとした。X, V各々1または10 µg/mlずつを添加した培地中の生菌数はTable 4に示したとおり、両因子の要求量の少ない7株についても10 µg/ml添加培地中で37°C, 15~22時間接種菌として使用できる生菌数を保つことができた。

2) 感受性測定

臨床分離株25株について、測定用培地として5%

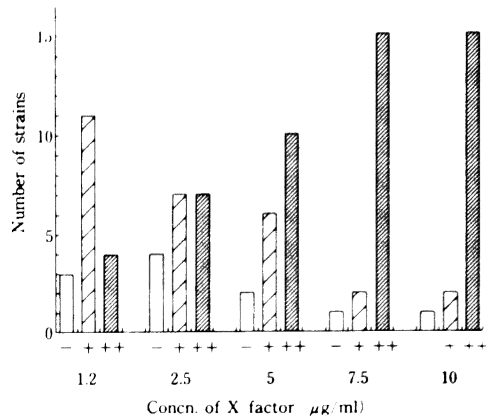


Fig. 1. Effect of X-factor on growth of *Haemophilus influenzae* in 1 µg/ml V-factor-supplemented brain heart infusion broth; optical density -, <0.1; +, 0.1~0.5; ++, >0.5

Table 4. Effect of concentration of X- and V-factors on growth of *Haemophilus influenzae* in brain heart infusion broth

| Strain no. | Concn. of X and V-factors (µg/ml) | | | | | | | |
|------------|-----------------------------------|-------|-----------------------------|-------------------|-----------------|-------|-----------------------------|-------------------|
| | X 1 and V 1 | | | | X 10 and V 10 | | | |
| | Optical density | | Viable cell counts (cfu/ml) | | Optical density | | Viable cell counts (cfu/ml) | |
| | 15 h | 22 h | 15 h | 22 h | 15 h | 22 h | 15 h | 22 h |
| TY-2 | 0.480 | 0.480 | 2.0×10^9 | 6.6×10^8 | 0.545 | 0.605 | 2.4×10^9 | 4.6×10^8 |
| TY-8 | 0.400 | 0.430 | 1.8×10^9 | 3.2×10^8 | 0.470 | 0.520 | 6.5×10^9 | 5.6×10^8 |
| TY-43 | 0.375 | 0.425 | 3.8×10^8 | 7.8×10^8 | 0.460 | 0.550 | 2.2×10^9 | 6.6×10^8 |
| TY-50 | 0.325 | 0.365 | 1.5×10^9 | 4.0×10^8 | 0.385 | 0.470 | 3.1×10^9 | 7.0×10^8 |
| TY-56 | 0.405 | 0.465 | 4.8×10^8 | 2.8×10^8 | 0.505 | 0.595 | 4.0×10^9 | 7.8×10^8 |
| IID-983 | 0.610 | 0.625 | 3.6×10^9 | 5.2×10^8 | 0.635 | 0.680 | 6.9×10^9 | 6.8×10^8 |
| IID-984 | 0.600 | 0.620 | 4.0×10^9 | 6.6×10^8 | 0.600 | 0.660 | 2.5×10^9 | 6.6×10^8 |

FE加MHAを使用した寒天平板希釈法とX、Vおのおの10 µg/ml添加BHIを使用した微量液体希釈法によるMICの差をTable 5に示した。CEZでは感受性が高くでる株が約1/3みられ、MINOも-2管以上の差になる株が11株(44%)認められたが、他の4薬

剤では、21~23株(84%以上)が±1管以内のMIC値を示した。次にCEZ、MINOで一致率が低かったことが、基礎培地としてBHIを使用したことに原因するのかを調べるために、5%FEまたはX、Vをおのおの10 µg/ml添加したBHAによる寒天希釈法と同BHIに

Table 5. Comparison of broth microdilution to agar dilution MICs against 25 strains of *Haemophilus influenzae*

| Drug | No. of strains with indicated ratio of BMD log ₂ (MIC) to AD log ₂ (MIC) | | | | |
|-------------|--|----|-------|----|----|
| | -3 | -2 | -1~+1 | +2 | +3 |
| Ampicillin | | | 21 | 1 | 3 |
| Cefazolin | 3 | 5 | 16 | 1 | |
| Cefotiam | | 1 | 23 | 1 | |
| Cefmenoxime | | 1 | 23 | 1 | |
| Gentamicin | | 1 | 21 | 2 | 1 |
| Minocycline | 2 | 9 | 14 | | |

Broth microdilution (BMD), 10 µg/ml of X and V factor-supplemented brain heart infusion broth

Agar dilution (AD), 5% Fildes enrichment-supplemented Mueller Hinton agar

Table 6. Effect of media on broth microdilution to agar dilution MICs against 23 strains of *Haemophilus influenzae*

| Drug | Medium | No. of strains with indicated ratio of BMD-log ₂ (MIC) or ADB-log ₂ (MIC) to AD-log ₂ (MIC) | | | | |
|-------------|-------------|--|----|-------|----|----|
| | | -3 | -2 | -1~+1 | +2 | +3 |
| Ampicillin | BHA + 5% FE | | | 22 | 1 | |
| | BHA + XV 10 | | | 22 | 1 | |
| | BHI + XV 10 | | | 21 | 1 | 1 |
| Cefazolin | BHA + 5% FE | | 3 | 20 | | |
| | BHA + XV 10 | | 2 | 21 | | |
| | BHI + XV 10 | 3 | 5 | 15 | | |
| Minocycline | BHA + 5% FE | 1 | 5 | 17 | | |
| | BHA + XV 10 | | 2 | 21 | | |
| | BHI + XV 10 | 2 | 8 | 13 | | |

Broth microdilution (BMD), 10 µg/ml of X and V factor-supplemented brain heart infusion broth (BHI+XV 10)

Agar dilution (ADB), 5% Fildes enrichment-supplemented brain heart infusion agar (BHA+5% FE) or 10 µg/ml of X and V factor-supplemented brain heart infusion agar (BHA+XV 10)

Agar dilution (AD), 5% Fildes enrichment-supplemented Mueller-Hinton agar

よる微量液体希釈法のMICを比較した(Table 6)。供試した23株中、CEZは寒天培地では、FE添加、XおよびV添加ともに20管以上が±1管以内に入り、基礎培地の差によって大きな影響はみられなかったが、微量液体希釈法では、±1管以内に入る株が15株まで低下し、寒天培地と液体培地による差がでる薬剤であった。MINOについては寒天培地、微量液体希釈法とも一致度が低く、寒天または培地の種類によってMICに影響を受けやすい薬剤であった。

4. *B. catarrhalis*

1) 接種菌の培養

本菌種についてMHB中での増殖状態を調べた結果、37°C、静置培養では増殖状態が不良な上、菌塊が

発生し、接種菌用として適当な培養法ではなかった。そこで同培地に接種し、試験管振とう機で振とう培養(6 ml/18×180 mm試験管使用)を行ったところ、Table 7に示したとおり、37°C、13~20時間均一な接種菌液としての生菌数を保持できることが認められた。

2) 感受性測定

臨床分離株12株について、MHAを使用した寒天培地希釈法と、Mg⁺⁺を25 µg/mlとCa⁺⁺を50 µg/ml添加したMHBを使用した微量液体希釈法によるMICの差をTable 8に示した。MINO以外の5薬剤ではいずれも11株(92%)以上が一致した。MINOでは2株が±1管以内に入った以外2~3管感受性が高くなり、一致度が低くなった。また、微量液体希釈法の96穴マ

Table 7. Growth of *Branhamella catarrhalis* by shaking culture in cation supplemented Mueller-Hinton broth at 37°C for 13 and 20 h

| Strain no. | Optical density | | Viable cell counts (cfu/ml) | |
|------------|-----------------|-------|-----------------------------|-------------------|
| | 13 h | 20 h | 13 h | 20 h |
| | TY-2759 | 0.933 | 3.065 | 1.6×10^8 |
| TY-2760 | 2.748 | 3.235 | 7.8×10^7 | 2.9×10^7 |
| TY-2762 | 3.144 | 3.130 | 7.0×10^8 | 8.0×10^7 |
| TY-2764 | 1.341 | 2.285 | 2.2×10^8 | 3.7×10^8 |
| TY-2768 | 1.704 | 2.910 | 1.9×10^8 | 5.1×10^8 |
| TY-2771 | 1.830 | 2.805 | 1.0×10^9 | 7.4×10^8 |
| TY-2776 | 0.696 | 3.440 | 9.6×10^6 | 7.5×10^7 |
| TY-2773 | 1.674 | 4.520 | 8.2×10^8 | 2.1×10^9 |

Table 8. Comparison of broth microdilution to agar dilution MICs against 12 strains of *Branhamella catarrhalis*

| Drug | No. of strains with indicated ratio of BMD-log ₂ (MIC) to AD-log ₂ (MIC) | | | |
|-------------|--|----|-------|----|
| | -3 | -2 | -1~+1 | +2 |
| Ampicillin | | 1 | 11 | |
| Cefazolin | | | 12 | |
| Cefotiam | | 1 | 11 | |
| Cefmenoxime | 1 | | 11 | |
| Gentamicin | | | 11 | 1 |
| Minocycline | 2 | 7 | 2 | 1 |

Broth microdilution (BMD), Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-supplemented Mueller-Hinton broth
Agar dilution (AD), Mueller-Hinton agar

マイクロプレート培養において、マイクロプレートの底に菌塊となって増殖し、光度計で測定できず、肉眼判定の必要な株が存在した。

5. 1989年度の臨床分離株の感受性

前項で設定した培養条件を用いて、微量液体希釈法により1989年度に4施設で分離された株について6薬剤に対する感受性分布を測定した。

1) *Streptococcus pyogenes*

供試した45株の6薬剤に対する累積百分率をFig. 2に示した。 β -ラクタム系薬剤耐性株はみあたらず、ペニシリン系薬剤のABPCおよび第3世代セフェム系薬剤のCMXに対して、すべての供試菌株が $\leq 0.016 \mu\text{g/ml}$ で発育が阻止され、最も高い感受性を示した。次いで第2世代セフェム系薬剤のCTMに高い感受性を示し、供試菌株のうち1株がMICで $0.13 \mu\text{g/ml}$ を示した以外はすべて $0.03 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。次に第1世代セフェム系薬剤のCEZに対し、すべての供試菌株が $0.06 \mu\text{g/ml}$ 以下の感受性を示した。これらに対しアミノ配糖体系のGMに対してはMICで $2\sim 8 \mu\text{g/ml}$

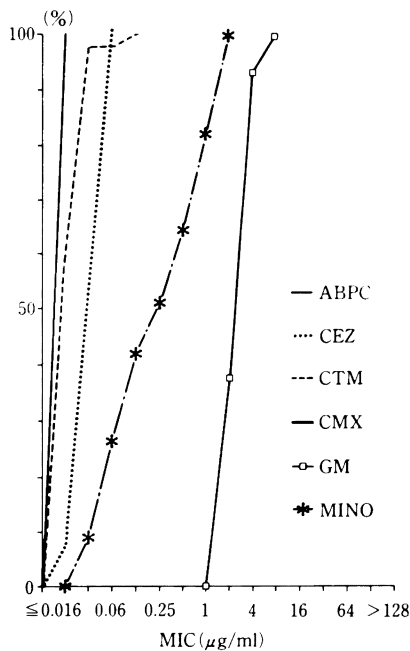
mlに分布し、 β -ラクタム系に比べて低感受性を示した。テトラサイクリン系のMINOに対する感受性は、 $0.03\sim 2 \mu\text{g/ml}$ と、比較的広い範囲に分布した。

2) *Streptococcus pneumoniae*

供試した75株の6薬剤に対する累積百分率をFig. 3に示した。 β -ラクタム系薬剤に対しては比較的高い感受性を示したが、感受性のピークは、ABPC、CEZ、CTMおよびCMXでそれぞれ、 ≤ 0.016 , 0.03 , 0.06 および $\leq 0.016 \mu\text{g/ml}$ であった。一方、GMとMINOに対しては比較的低感受性を示し、GMでは $0.5\sim 64 \mu\text{g/ml}$ に分布し、ピークは $16\sim 32 \mu\text{g/ml}$ にあり、MINOでは $0.25\sim 64 \mu\text{g/ml}$ に幅広く分布した。

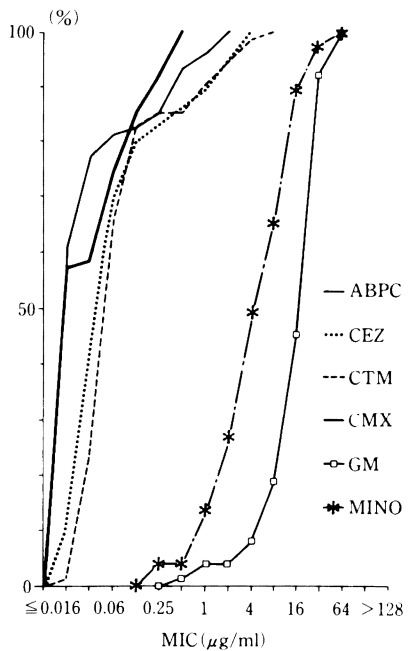
3) *Haemophilus influenzae*

72株供試した結果 (Fig. 4) からみると、本菌種は供試薬剤のうちCMXに最も高い感受性を示し、1株が $0.06 \mu\text{g/ml}$ のMICを示した以外はすべて $\leq 0.016 \mu\text{g/ml}$ で発育が阻止された。次いで β -ラクタム系薬剤では、ABPCに対して高感受性を示し、以下CTM、CEZの順で、それぞれ 0.13 , 0.5 および $2\sim 4 \mu\text{g/ml}$ に



ABPC: ampicillin, CEZ: cefazolin,
CTM: cefotiam, CMX: cefmenoxime,
GM: gentamicin, MINO: minocycline

Fig. 2. Cumulative susceptibilities of 45 strains of *Streptococcus pyogenes* clinically isolated in 1989



ABPC: ampicillin, CEZ: cefazolin,
CTM: cefotiam, CMX: cefmenoxime,
GM: gentamicin, MINO: minocycline

Fig. 3. Cumulative susceptibilities of 75 strains of *Streptococcus pneumoniae* clinically isolated in 1989

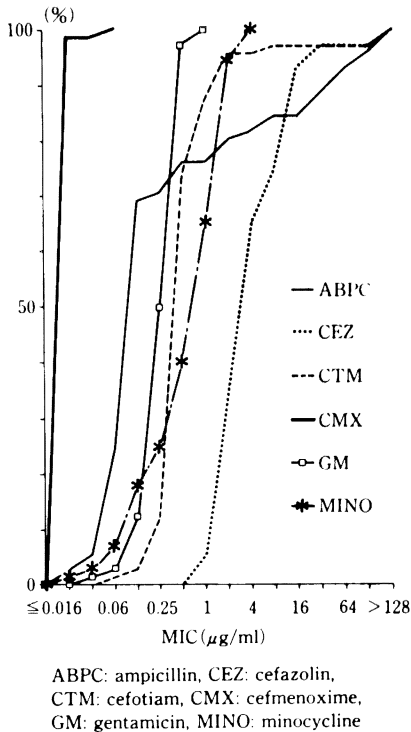


Fig. 4. Cumulative susceptibilities of 72 strains of *Haemophilus influenzae* clinically isolated in 1989

感受性のピークが存在した。供試菌 72 株は、ABPC では $\leq 0.016 \sim >128$ 、CEZ では $1 \sim >128$ 、CTM では $0.06 \sim >128 \mu\text{g/ml}$ と幅広く分布したが、耐性株の頻度では CTM が最も小さかった。GM では $0.03 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ に分布し、感受性のピークは $0.25 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ に存在した。MINO では $\leq 0.016 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ に分布し、ピークは $1 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ であった。

4) *Branhamella catarrhalis*

供試した 36 株の 6 薬剤に対する累積百分率を Fig. 5 に示した。供試薬剤のうち、GM に最も高い感受性を示し、すべての供試菌株に対して、MIC は $0.13 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。次いで第 3 世代セフェムの CMX に対して感受性ピークは $0.5 \mu\text{g/ml}$ で高い感受性を示し、 $1 \mu\text{g/ml}$ 以下ですべての供試菌株の発育が阻止された。CTM と MINO に対してはほぼ同等の感受性を示し、それぞれ $0.25 \sim 2$ 、 $0.13 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ に分布した。次いで ABPC と CEZ で、これらの薬剤に対する感受性はそれぞれ、 $0.25 \sim 32$ および $0.5 \sim 16 \mu\text{g/ml}$ に分布した。

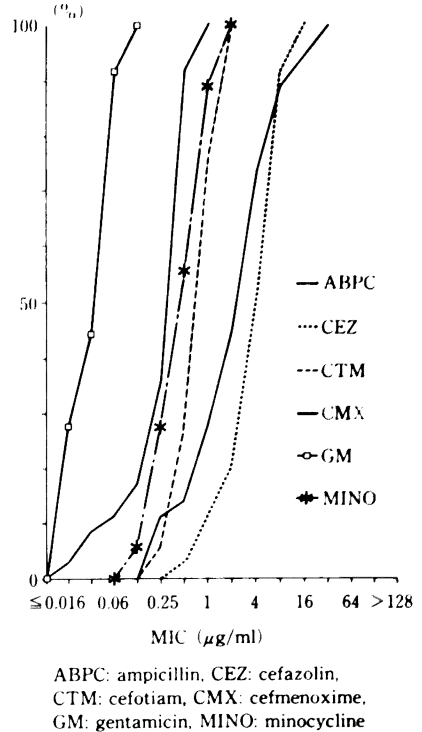


Fig. 5. Cumulative susceptibilities of 36 strains of *Branhamella catarrhalis* clinically isolated in 1989

III. 考 察

日本化学療法学会標準法の微量液体希釈法⁵⁾で、現在測定用培地について述べられていない栄養要求の厳しい菌種についても、微量液体希釈法の利点である自動化への対応を考える必要がある。MIC 値の判定を光度計を用いて、コンピューター制御によるシステム化するためには、それらの菌種に対しても、血液などを添加した不透明な培地ではなく、できるだけ透明で調製が容易な、また安定性の優れた培地が望ましい。また、接種用菌液の調製法も標準法では、1 夜培養した寒天培地上の菌体を滅菌生理食塩液で 0.5 McFarland (10^8 cfu/ml) 相当に懸濁して使用することになっているが、臨床検査などで菌の分離からただちに感受性測定に移る場合は標準法が便利であるが、多数の純粋分離された菌株の感受性を測定する場合は、寒天平板希釈法の標準法³⁾と同様増菌用液体培地で前培養し、生菌数を調製する方法が効率的である。寒天平板希釈法で血液または FE 加 MH 寒天を使用する *S. pyogenes*、*S. pneumoniae*、ならびに *H. influenzae*、また Cation-

supplemented MHB で増殖するが菌塊の生じやすい *B. catarrhalis* についてそれぞれ、微量液体希釈法の自動化に対応でき、寒天平板希釈法の MIC との差のない培地を検討した。

微量液体希釈法でこれらの菌種のための測定用培地として、NCCLS⁹⁾では、*H. influenzae* に 15 $\mu\text{g/ml}$ の bovine hematin (X 因子), 5 mg/ml の yeast extract および 15 $\mu\text{g/ml}$ の β -NAD (V 因子) を添加した MHB (HTM) を提唱しているが、我々の検討では MHB を基礎培地としたとき、X、V ならびに yeast extract を添加しても増殖しにくい菌株が認められた。一方、BHI を基礎培地とし、X、V の必要量を調べたところ、それぞれ 10 $\mu\text{g/ml}$ を添加すると容易に増殖し、また、接種菌の培養用に用いても 20 時間はほぼ一定の生菌数を保ち、調製法も容易なので本培地を採用することとした。MIC 値の差をみると、寒天培地希釈法による MIC との一致率が低い CEZ、MINO (56~64%) のような薬剤もあったが、他の 4 薬剤では 84% 以上の一致率が得られた。

S. pyogenes は比較的栄養要求が厳しくなく、MHB でも増殖可能であったが、増殖度が低く、マイクロプレートでは光度計による計測が難しかった。これに 5% HS を添加するといずれの分離株も充分増殖し、また寒天平板希釈法とも MINO 以外はよく一致し、ほとんど問題なく微量液体希釈法に適用できる菌種であった。

次に *S. pneumoniae* は HB または FE を添加すると容易に増殖するが、増殖速度が早いうえ、増殖後死滅しやすく、液体培地で前培養すると、濁度は高いが生菌数が少ない場合があった。菌株保存用の培地 CM に接種すると、徐々に増殖し、感受性測定に都合よく接種菌量を調節することができた。寒天平板希釈法においても接種用菌液の培養時生菌数に注意が必要である。測定用培地として、Jorgensen ら⁸⁾は *H. influenzae* 用の HTM を *S. pneumoniae* に使用することを報告しているが、我々が供試した菌株の中には HTM で増殖し難い株が存在した。また *S. pyogenes* 用の 5% HS 添加 MHB でも増殖を認めない株が存在したので、基礎培地を BHI とし、5% HS を添加すると供試菌株すべてが充分増殖し、MIC も寒天平板希釈法と比べて MINO 以外は大きな差がなかった。

B. catarrhalis については、Cation-supplemented MHB で栄養上の問題はなかったが、菌塊を形成するため、接種菌液として一定量の菌量に調節する際に複雑で、また不正確であった。そのため、接種菌の培養時振とう培養を実施したところ、いずれも一様な懸濁

液となり、作業性が著しく向上した。しかし、マイクロプレート用の適当な振とう培養装置が使用できなかったため、現在、MIC 判定のために光度計が使用できない株があり、肉眼判定が必要であり、培養方法についてさらに検討を要する。

これらの培地を使用したとき、調査した菌種別、薬剤別の寒天平板希釈法と微量液体希釈法の一致率 (±1 管以内) は、*S. pyogenes* 54.1~100%, *S. pneumoniae* 56.3~100%, *H. influenzae* 56~92%, *B. catarrhalis* 16~100%, ABPC 84~100%, CEZ 64~100%, CTM 91~100%, CMX 75~100%, GM 56.3~95.8%, MINO 16~87.5% で、いずれの菌種でも一致率が低いのは MINO であり、これは日本化学療法学会抗菌薬感受性測定検討委員会中間報告 (1989年) で Cation-supplemented MHB で増殖可能な 6 菌種 (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli*, *S. aureus*) について報告されているのと同様な傾向であった。

抗菌薬に対する感受性は、測定法、培地の種類によって変動するが、できる限り、測定施設間で差異の少ない方法で測定される必要がある。微量液体希釈法が標準化され、また測定用の薬剤がマイクロプレートにセットされ凍結品または凍結乾燥品として販売されるようになりつつある現在、自動化への対応を含めて、さらに安定で測定精度の高い培地の検討が必要である。

謝 辞

本研究に際し、多数の臨床分離株を分与下さいました京都第二赤十字病院古澤太郎先生、県立広島病院桑原正雄先生、北野病院植手鉄男先生、ならびに福岡市医師会臨床検査センター大隈章平先生に感謝いたします。また実験にご協力いただきました池内信繁氏、岡由子氏、熊田陽子氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 日本化学療法学会効果判定基準研究会 MIC 小委員会：最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration) 測定法の標準化について。Chemotherapy 16: 98~99, 1968
- 2) 日本化学療法学会 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 22: 1126~1128, 1974
- 3) 日本化学療法学会委員 (責任者 三橋進)：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~77, 1981
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A. NCCLS, Villanova, Pa., 1985

- 5) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会：微量液体希釈によるMIC測定法（微量液体希釈法）。Chemotherapy 38：102-105, 1990
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Tentative standard M7 T2, NCCLS, Villanova, Pa., 1988
- 7) Jorgensen J H, Redding J S, Maher L A, Howell A W: Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. 25: 2105-2113, 1987
- 8) Jorgensen J H, Maher L A, Howell A W: Use of *Haemophilus* test medium for broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 28: 430-434, 1990
- 9) Parker R H, Hoeprich P D: Disk method for rapid identification of *Haemophilus* species. Amer. J. Clin. Pathol. 37: 319-327, 1962

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF *STREPTOCOCCUS*
PYOGENES, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, *HAEMOPHILUS*
INFLUENZAE AND *BRANHAMELLA CATARRHALIS*
BY THE BROTH MICRODILUTION METHOD

Akira Sugiura, Tamotsu Takayama and Kumiko Jono

Takeda Analytical Research Laboratories Ltd., 17-85, Jusohonmachi,
2-chome Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

We studied optically clear, simple media for broth microdilution testing using the MIC-2000 system (Dynatech Laboratories) with an auto-reader controlled by a personal computer. *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* produced sufficient growth for inoculum preparation in brain heart infusion broth (BHI), cooked meat medium (CM), and hemin (X-factor) and β -diphosphopyridine nucleotide (V-factor)-supplemented BHI, respectively, and the viable cell counts remained unchanged for 15-22 hours. The MICs were determined in 5% horse serum-supplemented Mueller Hinton broth, 5% horse serum-supplemented BHI, and X- and V-factor-supplemented BHI for *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* and *H. influenzae*, respectively. The MICs of ampicillin (ABPC), cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cefmenoxime (CMX) and gentamicin (GM) determined in the aforementioned media by the broth microdilution method agreed approximately with those determined by the standard agar dilution method recommended by Japan Chemotherapy Society, though the MICs of minocycline (MINO) did not agree as well as those of the other antibiotics. *Branhamella catarrhalis* produced pellets in cation-supplemented Mueller-Hinton broth in static culture, but the cells were dispersed sufficiently for inoculum preparation in shaking culture, and the viable cell counts remained unchanged for 13-20 hours. It was, however, difficult to determine the MICs against *B. catarrhalis* by auto-reader, since this organism sometimes produced pellets in the microplates for which there was no suitable shaking equipment. We investigated the susceptibility distribution of the four kinds of bacteria clinically isolated in 1989 to the six antibiotics mentioned above by the broth microdilution method.