

新しい抗菌薬感受性測定法: E Test の有用性について

—第2報 栄養要求性の厳しい *Streptococcus pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* に対する検討—長谷川美幸¹⁾・内野卯津樹¹⁾・村岡 宏江¹⁾・小林 寅詰¹⁾金子 明寛²⁾・佐々木次郎²⁾・岩田 敏³⁾¹⁾三菱化学ビーシーエル・化学療法研究室*²⁾東海大学医学部口腔外科学教室³⁾国立霞ヶ浦病院小児科

(平成6年9月21日受付・平成7年5月8日受理)

E Test は AB BIODISK 社 (スウェーデン) で開発されたもので、抗菌薬を各濃度段階に含む細長い strip を利用して、従来のディスク感受性の要領で簡便に MIC を測定するものである。今回、小児科感染症より分離された *Streptococcus pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* の penicillin 耐性株および感受性株に対する各種抗菌薬の MIC を E Test を用いて測定し、日本化学療法学会標準法による寒天平板希釈法の測定値と比較した。これらの試験菌株に対する、両方法による各薬剤の MIC 値は penicillin に対する感受性に関係なく比較的よく一致した。しかし Penicillin Insensitive *Streptococcus pneumoniae* (PISP) は imipenem, azithromycin および vancomycin の E Test による MIC が寒天平板法より 2 倍高い値となった。また両菌種の測定培地に加えた血液成分は、E Test による測定値に影響を与えなかった。

Key words: E Test, 寒天平板希釈法, MIC, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*

我々は、最近、スウェーデンで開発された E Test を用いて^{1,2)}、数種の抗菌薬の各種の標準菌株および *Staphylococcus aureus* に対する MIC を測定し従来法である寒天平板希釈法と比較した。その結果両方法による測定値はよく一致し、E Test は信頼性をもち臨床検査の現場で活用が可能であると考えられた (投稿中)。今回は小児科領域の感染症から分離された *Streptococcus pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* に対する各抗菌薬の MIC を測定し、寒天平板希釈法と比較したのでその結果を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 試験菌株

1993年10月から1994年2月の間に全国の医療施設における小児科の感染症患者より分離され、当研究室で-80°C炭末スキムミルク中で保存された *S. pneumoniae* および *H. influenzae* より penicillin 低感受性 *S. pneumoniae* (PISP) 10株、penicillin 感受性 *S. pneumoniae* (PSSP) 15株と β -lactamase 産生 (β +) *H. influenzae* 10株および β -lactamase 非産生 (β -) *H. influenzae* 15株を無作為に選定して試験菌株とした。試験菌は主に中耳炎、髄膜炎、肺炎、気管支炎由来株である。

2. MIC 測定法

1) E Test^{1,2)}

S. pneumoniae はコロニア羊血液寒天培地 (BBL) に、*H. influenzae* はチョコレート II 寒天培地 (BBL)

で前培養を行い、発育したコロニーを掻き取り滅菌生理食塩液中に McFarland No. 0.5 に調製した。滅菌綿棒に菌液を侵し、下記に示した寒天培地に均一に塗抹した。下記に示した各薬剤の E Test を専用アプリケーションを用い、平板上に置いた。試験培地は直径 90 mm の滅菌シャーレに厚さ 4 mm となるよう分注し用いた。培養は 35°C で 18 時間行い、阻止円径の目盛りより MIC を求めた。E Test の MIC 中間目盛りについては化学療法学会標準法の数値に準じて判定した。なお、寒天平板法、E Test とも Mueller Hinton medium (M. H. M., Difco) に 5% 馬脱繊維血を用い、*S. pneumoniae* は血液寒天平板、*H. influenzae* はチョコレート寒天平板にして使用した。E Test に用いた薬剤 strip と濃度範囲を下記に示した。

Ampicillin (ABPC: 濃度範囲 256~0.016 $\mu\text{g/ml}$)
 Piperacillin (PIPC: 256~0.016 $\mu\text{g/ml}$)
 Clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC: 256~0.016 $\mu\text{g/ml}$)
 Sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC: 256~0.016 $\mu\text{g/ml}$)
 Imipenem (IPM: 32~0.002 $\mu\text{g/ml}$)
 Cefpirome (CPR: 256~0.016 $\mu\text{g/ml}$)
 Ceftriaxone (CTRX: 32~0.002 $\mu\text{g/ml}$)
 Azithromycin (AZM: 256~0.016 $\mu\text{g/ml}$)
 Vancomycin (VCM: 256~0.016 $\mu\text{g/ml}$)

2) 寒天平板希釈法

従来法による MIC 値は、化学療法学会標準法⁹⁾に従い寒天平板希釈法で測定した。すなわち各薬剤濃度を含む M. H. M. に試験菌 10^6 CFU/ml を $5 \mu\text{l}$ 接種し、 35°C 18 時間培養後、発育の認められなかった最小濃度を MIC とした。

寒天平板希釈法による MIC の測定には ABPC (明治製菓), PIPC (富山化学), CVA/AMPC (スミスクラインピーチャム), SBT/ABPC (ファイザー製薬), IPM (萬有製薬), CPR (ヘキスト), CTRX (日本ロシュ), AZM (ファイザー製薬), VCM (塩野義製薬) の 9 薬剤を用いた。

II. 結 果

1. *S. pneumoniae* についての検討

S. pneumoniae PISP 10 株および PSSP 15 株に対する各種抗菌薬の平均 MIC と MIC 分布を Table 1 に示した。なお平均 MIC は 2 つの測定法から得られた値の母集団そのものを比較する為に各 MIC 値を 2 を底とした指数に変換し算出した。PISP に対し E Test では寒天平板法と同値か 2 倍高い値となった。IPM, AZM および VCM は約 2 倍, 他の薬剤は同値か 1.6 倍程度高かった。MIC 分布では IPM および AZM では E Test の値が 2 倍程度高い値を示したが, その他の測定値はほぼ一致した。PSSP に対しては E Test の値が CPR および VCM が 1.8 倍程度高かった。それ以外は 1.5 倍程度の範囲内で, ほぼ一致する結果となった。それとともない MIC 分布にも大差は生じなかった。Table 2 の

MIC₉₀ で見た場合, PISP, PSSP 共に両法による測定値は, よく一致する傾向を示した。しかし, 平均 MIC 同様 PISP に対する IPM, AZM および VCM の E Test の値が 2 倍高い値となった。PSSP に対しては PIPC および CPR で寒天平板法より E Test が 2 倍高かった以外はすべてよく一致した。平均 MIC, MIC₉₀ 共に両法は比較的よく一致し 2 倍を超える不一致を認める例はまったくなかった。

PISP 10 株, PSSP 15 株の MIC 値の差異を Fig. 1 に E Test/寒天平板希釈法として図示した。Fig. 1-a) に示す通り, PISP では各薬剤とも E Test の値が同じ値もしくは 2 倍程度高かった。特に, IPM, AZM は 10 株すべて, VCM は 10 株中 9 株 E Test が 2 倍高い値となった。

Fig. 1-b) の PSSP では ABPC, PIPC, IPM の 3 薬剤は同値か上下 2 倍程度のバラツキを認めたが, CPR, AZM, VCM の 3 薬剤は PISP 同様, 同値または 2 倍 E Test が高い値を示した。

2. *H. influenzae* についての検討

H. influenzae に対する平均 MIC を Table 3 に示した。寒天平板希釈法, E Test とともに β -lactamase 産生, 非産生株を問わずよく一致する結果となった。いずれの薬剤においても 1.5 倍以上差が生じる例は認められなかった。

本菌に対する MIC₉₀ 値は β -lactamase 非産生株の 1 例を除きすべて一致した。不一致例は β -lactamase 非産生株の PIPC の値が寒天平板希釈法で $0.031 \mu\text{g/ml}$,

Table 1. Geometric mean MIC of antimicrobial drugs for *Streptococcus pneumoniae* strains

Strain (number)	Test method	Drug					
		ampicillin	piperacillin	imipenem	cefpirome	azithromycin	vancomycin
PISP (10)	E Test	1.51 (0.5~2)	1.51 (0.5~2)	0.33 (0.125~0.5)	0.41 (0.25~0.5)	1.15 (0.125~4)	0.33 (0.125~0.5)
	agar dilution	0.93 (0.5~2)	0.93 (0.5~2)	0.17 (0.063~0.5)	0.25 (0.125~0.5)	0.58 (0.063~2)	0.18 (0.125~0.5)
PSSP (15)	E Test	0.032 (0.016~0.063)	0.044 (0.016~0.125)	0.020 (0.016~0.031)	0.070 (0.016~0.25)	0.51 (0.031~>256)	0.48 (0.25~1)
	agar dilution	0.038 (0.016~0.063)	0.037 (0.016~0.063)	0.020 (0.016~0.031)	0.038 (0.016~0.125)	0.35 (0.031~>128)	0.26 (0.125~0.5)

PISP: penicillin-insensitive *Streptococcus pneumoniae*, PSSP: penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*
(): MIC range

Table 2. MIC₉₀ of antimicrobial drugs for *Streptococcus pneumoniae* strains

Strain (number)	Test method	Drug					
		ampicillin	piperacillin	imipenem	cefpirome	azithromycin	vancomycin
PISP (10)	E Test	2	2	0.5	0.5	2	0.5
	agar dilution	2	2	0.25	0.5	1	0.25
PSSP (15)	E Test	0.063	0.125	0.031	0.25	>256	0.5
	agar dilution	0.063	0.063	0.031	0.125	>128	0.5

PISP: penicillin-insensitive *Streptococcus pneumoniae*, PSSP: penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*

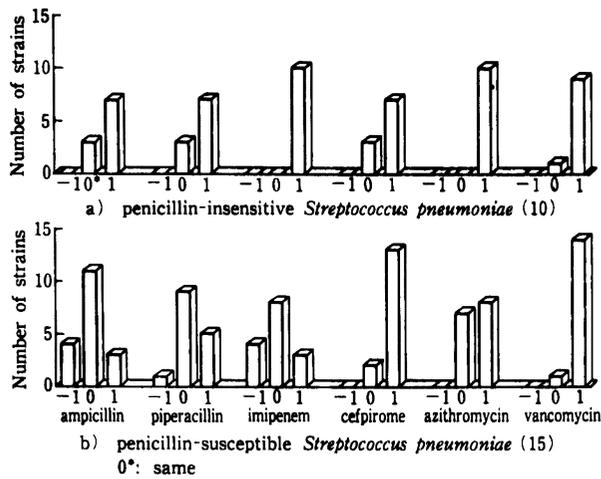


Fig. 1. Comparison of E Test MICs with agar dilution MICs: No. of E Test MICs within indicated concn (log 2) of agar dilution MICs.

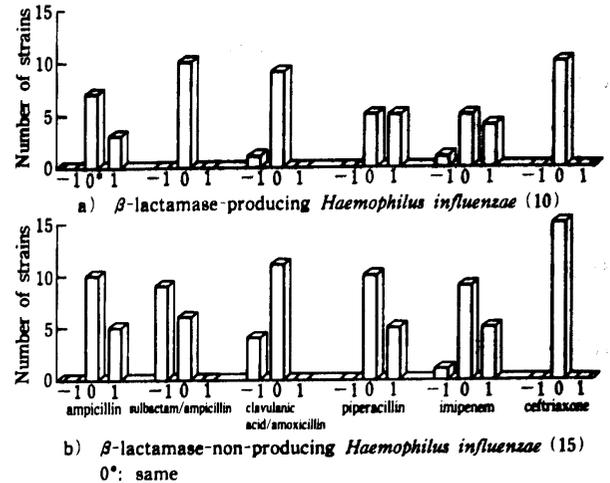


Fig. 2. Comparison of E Test MICs with agar dilution MICs: No. of E Test MICs within indicated concn (log 2) of agar dilution MICs.

Table 3. Geometric mean MIC of antimicrobial drugs for *Haemophilus influenzae* strains

Strain (number)	Test method	Drug ($\mu\text{g/ml}$)					
		ampicillin	sulbactam/ampicillin	clavulanic acid/amoxicillin	piperacillin	imipenem	ceftriaxone
$\beta+$ (10)	E Test	19.7 (4~128)	1.41 (1~4)	1.23 (1~4)	9.19 (2~256)	1.32 (0.5~4)	≤ 0.016 (≤ 0.016)
	agar dilution	16.0 (4~64)	1.41 (1~4)	1.32 (1~4)	7.46 (2~128)	0.94 (0.25~2)	≤ 0.016 (≤ 0.016)
$\beta-$ (15)	E Test	0.38 (0.25~1)	0.42 (0.25~1)	0.52 (0.25~1)	0.027 (0.016~0.25)	0.88 (0.25~4)	≤ 0.016 (≤ 0.016)
	agar dilution	0.31 (0.125~1)	0.63 (0.5~2)	0.63 (0.5~2)	0.022 (0.016~0.125)	0.73 (0.125~2)	≤ 0.016 (≤ 0.016)

$\beta+$: β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*, $\beta-$: β -lactamase-non-producing *Haemophilus influenzae*
(): MIC range

Table 4. MIC₉₀ of antimicrobial drugs for *Haemophilus influenzae* strains

Strain (number)	Test method	Drug ($\mu\text{g/ml}$)					
		ampicillin	sulbactam/ampicillin	clavulanic acid/amoxicillin	piperacillin	imipenem	ceftriaxone
$\beta+$ (10)	E Test	64	2	2	32	2	≤ 0.016
	agar dilution	64	2	2	32	2	≤ 0.016
$\beta-$ (15)	E Test	1	1	1	0.063	2	≤ 0.016
	agar dilution	1	1	1	0.031	2	≤ 0.016

$\beta+$: β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*, $\beta-$: β -lactamase-non-producing *Haemophilus influenzae*

E Testで0.063 $\mu\text{g/ml}$ とE Testが2倍高い値を示した (Table 4)。

β -lactamase産生 *H. influenzae* 10株に対し、ABPC、PIPCおよびIPMはE Testが寒天平板法に比べ同値か2倍高い値となった。他3薬剤はE Test、寒天平板法ともにほとんど一致した (Fig. 2)。 β -lactamase非産生15株においてはABPC、PIPC、IPMが β -lactamase産生株同様E Testが同値もしくは2倍程度高い結果となった。しかし、SBT/ABPC、CVA/AMPCは

E Testが寒天平板法に比べ2倍低い同値であった。CTRは15株すべて一致した。

III. 考 察

我々は標準菌株および臨床分離 *S. aureus* に対する特定抗菌薬のMICをE Testを用いて測定し、その測定値の信頼性を検討し正確性、再現性の面から問題がないことを確認した (投稿中)。今回は引き続き栄養要求性および培養条件の厳しい *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の臨床分離株について検討した。これらの菌種は

比較的小児科感染症領域から多く分離され、特に両菌種による髄膜炎は、細菌感染症の中でも重篤で一刻も早い的確な化学療法が望まれる。また、わが国においてもペニシリン低感受性 *S. pneumoniae* (PISP) の増加は深刻であり治療に用いる抗菌薬の選択も大きく変わってくる。このような患者の多くを治療する大規模な病院の中央検査室での薬剤感受性の測定はディスク感受性が用いられているのが現状である。E Test はディスク感受性の要領で簡易に MIC が求められることから中央検査室レベルにも導入しやすく、臨床の現場で正確な薬剤感受性情報が得られる。これらの菌種における E Test の有用性は欧米諸国の多くの研究者によって報告されている。Jorgensen J H⁴⁾らは *H. influenzae* 50 株に対する β -lactam 薬の MIC を E Test と ASM II agar を用いた寒天平板希釈法と比較し、92%以上の一致率を示し、Ngui-Yen J H²⁾らは penicillin 感受性別 *S. pneumoniae* 30 株を用いて感受性にかかわらず 94%の高い一致を認めている。我々の結果からも平均 MIC, MIC₉₀ でみる限り、E Test は寒天平板法とほとんど同様な値を示した。ただ個々の値を見た場合、薬剤によって PISP は E Test の値が寒天平板法より 2 倍程度高くなる傾向にあった。Macias E A⁵⁾らは broth dilution との比較で、同様に耐性株はより耐性側にシフトすることを指摘している。しかし今回、試験菌として用いた栄養要求性の厳しい菌に対しても全般的には寒天平板法とよ

く一致することを確認した。また従来のディスク法と同じ時間で MIC 値が迅速かつ正確に得られる E Test は小児科領域の臨床の現場に大いに役立つものと考えられる。

文 献

- 1) Baker C N, Stocker S A, Culver D H, Thornsberry C: Comparison of the E Test to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special challenge set of Bacteria. *J. Clin. Microbiol* 29: 533~538, 1991
- 2) Ngui-Yen J H, Brycl E A, Porter C, Smith J A: Evaluation of the E Test by Using Selected Gram-Positive Bacteria. *J. Clin. Microbiol* 30: 2150~2152, 1992
- 3) 日本化学療法学会 MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 4) Jorgensen J H, Howell A W, Maher L A: Quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* by using the E-Test. *J. Clin. Microbiol.* 29: 109~114, 1991
- 5) Macias E A, Mason E O Jr., Ocera H Y, Larocco M T: Comparison of E Test with Standard Broth Microdilution for Determining Antibiotic Susceptibilities of penicillin-Resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol* 32: 430~432, 1994

Evaluation of the E Test: a new quantitative antimicrobial susceptibility test

2) Application for *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* strains

Miyuki Hasegawa¹⁾, Utsuki Uchino¹⁾, Hiroe Muraoka¹⁾, Intetsu Kobayashi¹⁾,
Akihiro Kaneko²⁾, Jiro Sasaki²⁾ and Satoshi Iwata³⁾

¹⁾Chemotherapy Division, Mitsubishi-Kagaku Bio-Clinical Laboratories,
Shimura 3-30-1, Itabashi-ku, Tokyo 174, Japan

²⁾Department of Oral Surgery, School of Medicine Tokai University

³⁾Department of Pediatrics, Kasumigaura National Hospital

The E Test was applied to the MIC determination of different antimicrobial drugs for *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* strains isolated from pediatric infections. The E Test MICs were compared with those determined by the agar dilution method. The MIC values obtained by both methods were in agreement, regardless of the penicillin-susceptibility of the test strains or their β -lactamase producibility. However, the E Test MICs of imipenem, azithromycin and vancomycin for penicillin-insensitive strains of *S. pneumoniae* were one dilution higher than those determined by the agar dilution method. The E Test MICs were not affected by the addition of blood components. The E Test appears to be a reliable method for the determination of fastidious bacteria such as *S. pneumoniae* and *H. influenzae*.