

# *Helicobacter pylori* に対する Mueller Hinton 半流動培地を用いた新 MIC 測定法の有用性

—NCCLS 精度管理法に準じた測定法の考案—

藤岡 利生<sup>1)</sup>・那須 勝<sup>1)</sup>・戸田 陽代<sup>2)</sup>・長谷川美幸<sup>2)</sup>  
村岡 宏江<sup>2)</sup>・小林 寅詰<sup>2)</sup>・西園寺 克<sup>3)</sup>・猪狩 淳<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 大分医科大学第 2 内科\*

<sup>2)</sup> 三菱化学ビーシーエル化学療法研究室

<sup>3)</sup> 順天堂大学医学部臨床病理学教室

(平成 8 年 8 月 22 日受付・平成 8 年 11 月 1 日受理)

*Helicobacter pylori* に対する抗菌薬の MIC を CO<sub>2</sub> 培養を行わずに測定可能な半流動培地による測定法を考案し、正確性について詳細な検討を行った。従来から用いられている寒天平板希釈法は *H. pylori* の発育性の問題から、CO<sub>2</sub> (10~15 %) 培養を必要とした。しかしその CO<sub>2</sub> によって寒天培地中の pH が低下し、マクロライド系抗菌薬の *H. pylori* に対する MIC 値は、中性での結果と比較して 8~16 倍高い値を示した。したがって、本菌の発育条件を考慮し、CO<sub>2</sub> を用いない半流動培地での微好気条件による測定法を考案した。半流動培地は本菌が十分に発育し、日本化学療法学会標準法に準じた Mueller Hinton broth (Difco) に 0.2 % agar を加えたものを測定培地とした。約 10<sup>7</sup>CFU/ml となるように試験菌を接種し、35 °C、48 時間好気培養を行い培地中層部での発育を判定した。その結果、用いた抗菌薬 amoxicillin, clarithromycin, azithromycin および ciprofloxacin の MIC 測定における日差再現性は良好で、いずれの薬剤も 2 倍以内と安定な成績が得られた。NCCLS 精度管理基準に従い管理用菌株として *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 および *Escherichia coli* ATCC 25922 を用い同条件で前記 4 薬剤の MIC を測定した結果、ciprofloxacin の後者に対する MIC が 0.03 µg/ml と 1 管 (2倍) 範囲を外れた以外はすべて基準内であった。このことから本測定法は *H. pylori* の MIC 測定に適し NCCLS の精度管理基準を同時に満たすものと考えられた。

**Key words:** *Helicobacter pylori*, semi-solid agar, susceptibility test, quality control

*Helicobacter pylori* の薬剤感受性は一般に臨床細菌検査室で汎用されているディスク感受性法や寒天平板希釈法によって測定されている。しかしディスク感受性は長時間培養と薬剤の拡散の問題等によって正しい値が得られない。また寒天平板希釈法も同様に長時間 CO<sub>2</sub> 培養を要することから、培地 pH が低下し、一部の薬剤では MIC 値が高くなる (低感受性化) ことがある。特に 14 員環のマクロライド系薬の代表である erythromycin (EM) に対する影響は大きい。今回我々はこれらの問題を解決し、かつ正確に MIC 測定が可能な方法を考案し検討した。

## I. 材料および方法

### 1. 試験菌株

胃潰瘍、十二指腸潰瘍患者胃粘膜組織より分離し、可能な限り継代培養を避け、実験までに 10 % ジメチルスルホキシド、馬血清を添加した Brucella broth (Difco) 中で -80 °C 保存した *H. pylori* 臨床分離株 30 株および ATCC 由来の *H. pylori* 3 株を試験菌とした。また精度管理用菌株として NCCLS 指定の、

*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 および *Escherichia coli* ATCC 25922 の 2 株を用いた。

### 2. 使用抗菌薬

Amoxicillin (AMPC; 藤沢薬品), clarithromycin (CAM; ダイナボット), azithromycin (AZM; ファイザー製薬), ciprofloxacin (CPFX; バイエル薬品), 以上、力価の明らかな 4 薬剤を用いた。

### 3. 使用培地

寒天平板希釈法としてリン酸 Buffer で 3 種類の pH (6, 7, 8) に調整した Brucella agar (Difco) に 5 % となるように馬脱繊維液を加え使用した。

半流動培地 (semi-solid agar) は Heart infusion broth (Difco), Mueller Hinton broth (Difco), Brucella broth (Difco) および Thioglycollate medium without indicator-135C (BBL) に最終 0.2 % となるように Bacto Agar (Difco) を加え、さらに馬血清を 10 % となるように加え用いた。

### 4. MIC 測定法

寒天平板希釈法は日本化学療法学会標準法<sup>1)</sup>に準じて行った。すなわち、100~0.025 µg/ml の抗菌薬希釈系列を含む測定培地に約 10<sup>6</sup>CFU/ml に調製した菌液をミクロプランター（大日本精機）で 5 µl 接種し、35 °C、CO<sub>2</sub> 10 % で 72 時間培養を行った。半流動培地による測定は *Helicobacter pylori* 輸送用培地（HP 培地）<sup>2)</sup> を応用した。128~0.002 µg/ml 抗菌薬希釈系列を含む各測定培地に試験菌を 4.0×10<sup>7</sup>、1.0×10<sup>7</sup> および 2.5×10<sup>6</sup> CFU/ml となるように接種し、軽く混和後、セラピッツ（小野薬品）に無菌的に 2 ml 分注し、35 °C 好気条件で 1~3 日間培養後、各日、判定を行った。判定は培地中層部（微好気部分）に発育した濁帯のみられない濃度を MIC とした。半流動培地での日差再現性は、同 4 薬剤の MIC を 3 日間に分け測定した。NCCLS 指定の管理用菌株については 10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>CFU/ml の 3 菌量で他はこれまでの操作を同様に行い MIC 値を求めた。

## II. 結 果

### 1. 寒天平板希釈法の MIC 値におよぼす培地 pH の影響

MIC 測定値に培地 pH が影響すると考えられる CAM および AMPC の試験菌に対する MIC 値を Fig. 1 に示した。試験菌 30 株中 pH 調整のため添加した Buffer の影響によって発育しなかった株は 9 株、すなわち発育が認められた 21 株の成績である。

CAM において pH 6.0 でほとんどの試験菌に対する MIC 値が 0.10~0.05 µg/ml に分布したのに対し、pH 7.0 および pH 8.0 に調整した培地では約 4~8 倍低い、0.013 µg/ml に分布した。またこの傾向は低感受性株で顕著で pH 6.0 において 12.5 µg/ml 以上の 2 株は、pH

7.0 で 3.13 µg/ml および 0.78 µg/ml、pH 8.0 では両株に対し 0.78 µg/ml と 16 倍以上低い値を示した。AMPC においては逆に pH 6.0 でほとんどの株に対し、0.013 µg/ml ともっとも低い値を示した。pH 7.0 では pH 6.0 に比べ約 4 倍高い 0.05 µg/ml、pH 8.0 では 2 倍高い 0.025 µg/ml に分布した。*H. pylori* に対していずれの薬剤も測定培地の pH によって MIC 値が変動することが確認された。

### 2. 各種半流動培地における試験菌株の発育

寒天平板希釈法で発育した 21 株のうち臨床分離株 10 株および参考菌株 3 株、計 13 株の Heart infusion, Mueller Hinton, Brucella および Thioglycollate 半流動培地における発育を Table 1 に示した。培養 1 日目で明らかに試験菌の発育が認められた培地は Brucella で 8 株、Heart infusion および Thioglycollate で 7 株、Mueller Hinton で 5 株であった。しかし Brucella および Thioglycollate では 1 日目で発育しない株が 2 株存

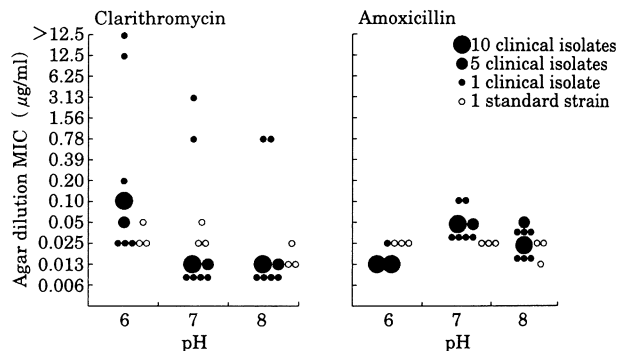


Fig. 1. Agar dilution MICs of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin and amoxicillin at various pHs.

Table 1. Growth differences of *Helicobacter pylori* strains in four semi-solid agars

	Heart infusion		Mueller Hinton		Brucella		Thioglycollate		
	C. I.	reference strain	C. I.	reference strain	C. I.	reference strain	C. I.	reference strain	
1 day	+	7	0	5	0	7	1	6	1
	±	2	3	4	3	1	2	2	2
	-	1	0	1	0	2	0	2	0
2 days	+	9	3	9	3	9	3	9	3
	±	1	0	1	0	1	0	1	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0
3 days	+	9	3	9	3	9	3	9	3
	±	1	0	1	0	1	0	1	0
	-	0	0	0	0	0	0	0	0

Heart infusion: Heart infusion broth (Difco) + 0.2% Bacto Agar (Difco)

Mueller Hinton: Mueller Hinton broth (Difco) + 0.2% Bacto Agar (Difco)

Brucella: Brucella broth (Difco) + 0.2% Bacto Agar (Difco)

Thioglycollate: Thioglycollate medium without indicator -135C (BBL) + 0.13% Bacto Agar (Difco)

C. I.: clinical isolate, 10 strains, Reference strain: ATCC 43504, ATCC 43579 and ATCC 43629

+: growth, ±: poor growth, -: no growth

在した。2 日目では十分に発育の認められた株はいずれの培地においても 12 株で、残り 1 株は弱い発育を示した。3 日間の培養においても試験菌の発育性に変化はなく、弱発育菌の 1 株もこれ以上の発育は認められなかった。したがって、いずれの培地における 2 日培養での発育性に差はないことから、以下の検討を Mueller Hinton 半流動培地を用いて行った。

### 3. 各種抗菌薬の MIC 値におよぼす接種菌量の影響

Mueller Hinton 半流動培地を測定培地として、*H. pylori* 臨床分離株 5 株 ATCC 標準株 3 株および NCCLS 精度管理用菌株 2 株の各種接種菌量における 4 薬剤の MIC を測定した (Table 2)。*H. pylori* は 4.0, 1.0,  $0.25 \times 10^7$  CFU/ml, *S. aureus* および *E. coli* は  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  CFU/ml の各接種菌量で測定した。いずれ

の薬剤においても *H. pylori* の一部の菌株に菌量が高くなるにつれ MIC 値が上昇する結果が得られたが、MIC 値の差が 2 倍を超えることはなかった。また CAM および AZM に対し低感受性を示した No. 2 および No. 92 に対しても、安定した成績が得られた。精度管理用菌株の 2 菌種に対しても同様な結果で  $10^6 \sim 10^4$  CFU/ml の接種菌量間で MIC 値の差が 2 倍を超えることはなかった。これらの結果から *H. pylori* の接種菌量は  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml とした。また精度管理用菌株、2 菌種は NCCLS のガイドラインに従い、 $1.0 \times 10^5$  CFU/ml を接種菌量とした。

### 4. 日差再現性

接種菌量の検討で用いた *H. pylori* および *S. aureus*, *E. coli* を試験菌株として、前述で定めた測定

Table 2. Effect of various inocula on semi-solid agar dilution MICs of four antimicrobial drugs for *Helicobacter pylori*

Strain	Inoculum size (CFU/ml)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		amoxicillin	clarithromycin	azithromycin	ciprofloxacin
<i>Helicobacter pylori</i> *C. I. 2	$4.0 \times 10^7$	0.004	4	8	0.06
	$1.0 \times 10^7$	0.004	2	8	0.06
	$2.5 \times 10^6$	0.004	2	8	0.06
C. I. 7	$4.0 \times 10^7$	0.004	0.015	0.12	0.25
	$1.0 \times 10^7$	0.004	0.015	0.06	0.12
	$2.5 \times 10^6$	0.004	0.015	0.06	0.12
C. I. 9	$4.0 \times 10^7$	0.015	0.008	0.06	0.25
	$1.0 \times 10^7$	0.015	0.008	0.06	0.25
	$2.5 \times 10^6$	0.008	0.008	0.06	0.25
C. I. 20	$4.0 \times 10^7$	0.008	0.015	0.06	0.25
	$1.0 \times 10^7$	0.004	0.015	0.06	0.25
	$2.5 \times 10^6$	0.004	0.015	0.06	0.25
C. I. 92	$4.0 \times 10^7$	0.008	4	32	0.12
	$1.0 \times 10^7$	0.008	4	16	0.12
	$2.5 \times 10^6$	0.004	4	16	0.12
ATCC 43504	$4.0 \times 10^7$	0.008	0.015	0.06	0.25
	$1.0 \times 10^7$	0.008	0.008	0.06	0.25
	$2.5 \times 10^6$	0.008	0.008	0.06	0.25
ATCC 43579	$4.0 \times 10^7$	0.015	0.015	0.12	0.12
	$1.0 \times 10^7$	0.008	0.015	0.12	0.12
	$2.5 \times 10^6$	0.008	0.015	0.12	0.12
ATCC 43629	$4.0 \times 10^7$	0.008	0.03	0.12	0.12
	$1.0 \times 10^7$	0.008	0.015	0.12	0.12
	$2.5 \times 10^6$	0.008	0.015	0.12	0.12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	$1.0 \times 10^6$	0.5	0.5	1	0.5
	$1.0 \times 10^5$	0.5	0.5	1	0.5
	$1.0 \times 10^4$	0.5	0.5	0.5	0.25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$1.0 \times 10^6$	8	64	8	0.03
	$1.0 \times 10^5$	4	64	8	0.03
	$1.0 \times 10^4$	4	64	8	0.03

\*C. I. Clinical isolate

培地、接種菌量で3日間連続で4薬剤のMICを測定し、本法の日差再現性を検討した (Table 3)。

*H. pylori* 8株および *S. aureus*, *E. coli* 各1株に対し、用いた4薬剤いずれにおいても3日間安定したMIC値が得られ、測定日間でMIC値の差が2倍を超えることはなかった。したがって本法は *H. pylori* に対するMIC測定において安定した再現性が得られることが確認された。

#### 5. NCCLS 精度管理基準との比較

NCCLS, MIC測定精度管理基準<sup>3)</sup>と本法で得られた *S. aureus* および *E. coli* に対する4薬剤のMIC値を Fig. 2 に示した。なお、AMPC の管理基準は amoxicillin/clavulanic acid で代用した。AMPC, CAM および AZM の3薬剤の *S. aureus* および *E. coli* に対する3回のMIC値は、すべてNCCLS 精度管理基準内で

あった。*S. aureus* に対するCPFXのMIC値は0.25~0.5  $\mu\text{g/ml}$  と管理基準内であったが *E. coli* に対しては3回のMIC値はすべて0.03  $\mu\text{g/ml}$  で管理基準より1管(2倍)高い結果となった。

### III. 考 察

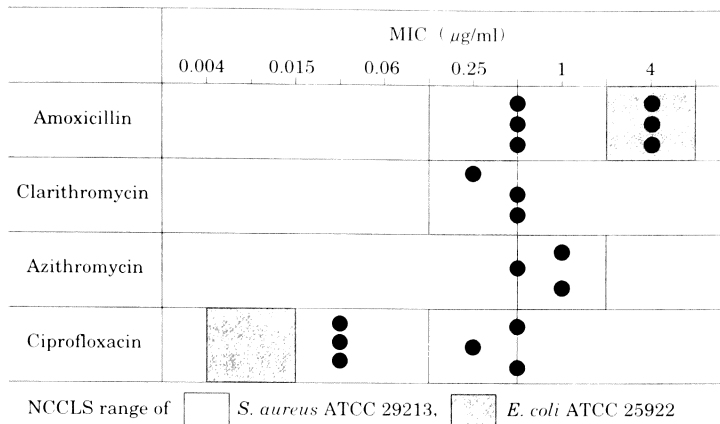
細菌の抗菌薬感受性試験成績には多くの因子が関与する。特に遅発育菌や栄養要求性の厳しい菌の場合、発育に必要な環境や、添加する物質によって感受性値が大きく変化する<sup>4)</sup>。今回検討した *H. pylori* は微好気性菌で、発育の遅い菌種である。

一般の臨床検査室で汎用されているディスク感受性試験はディスクに含まれる薬剤の寒天培地への拡散による菌の発育阻止領域(円)から感受性値を求める。しかし *H. pylori* のような発育が遅い菌種の場合、長時間の培養を要することから薬剤の拡散が進行し、大

Table 3. Daily reproducibility of MICs of four antimicrobial drugs for *Helicobacter pylori* in semi-solid agar

Strain	Day	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		amoxicillin	clarithromycin	azithromycin	ciprofloxacin
<i>Helicobacter pylori</i> *C. I. 2	1 day	0.004	2	8	0.06
	2 days	0.004	4	16	0.06
	3 days	0.004	2	8	0.06
C. I. 7	1 day	0.004	0.015	0.12	0.25
	2 days	0.004	0.015	0.12	0.25
	3 days	0.004	0.015	0.06	0.12
C. I. 9	1 day	0.008	0.015	0.06	0.25
	2 days	0.008	0.015	0.06	0.25
	3 days	0.015	0.008	0.06	0.25
C. I. 20	1 day	0.008	0.015	0.06	0.25
	2 days	0.004	0.015	0.06	0.25
	3 days	0.004	0.015	0.06	0.25
C. I. 92	1 day	0.004	4	16	0.12
	2 days	0.008	4	32	0.12
	3 days	0.008	4	16	0.12
ATCC 43504	1 day	0.008	0.015	0.06	0.25
	2 days	0.008	0.008	0.06	0.25
	3 days	0.008	0.008	0.06	0.25
ATCC 43579	1 day	0.008	0.015	0.12	0.12
	2 days	0.015	0.015	0.06	0.12
	3 days	0.008	0.015	0.12	0.12
ATCC 43629	1 day	0.008	0.03	0.12	0.12
	2 days	0.004	0.015	0.12	0.12
	3 days	0.008	0.015	0.12	0.12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1 day	0.5	0.25	1	0.5
	2 days	0.5	0.5	0.5	0.25
	3 days	0.5	0.5	1	0.5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1 day	4	64	8	0.03
	2 days	4	>64	8	0.03
	3 days	4	64	8	0.03

\*C. I. : Clinical isolate



NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

Fig. 2. NCCLS acceptable quality control range of MIC of four reference drugs for two reference strains.

きな阻止円を形成し、偽感受性化する。

一方、寒天平板希釈法による MIC 測定によって薬剤感受性を求める場合、本菌は微好気性菌であることから、10~20% の CO<sub>2</sub> 培養を行うのが通常である。しかし、この場合培地が長時間、高濃度の CO<sub>2</sub> にさらされ、培地中の水と CO<sub>2</sub> により、H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> となり、培地 pH が酸性側に傾く。多くの抗菌薬は測定培地 pH によって MIC 値が変動するといわれ<sup>5)</sup>、本菌の除菌に用いられる代表薬の CAM や AMPC 等も pH の影響を受けることが知られている。CAM 等の macrolide 薬は酸性領域で抗菌力が低下しアルカリ領域で増強する<sup>6)</sup>。逆に penicillin 系等の β-lactam 薬は弱酸性下で抗菌力が増強し、アルカリ化で低下すると報告されている<sup>7)</sup>。今回の成績からも CAM の *H. pylori* に対する抗菌力は pH 6.0 の酸性下では、中性の pH 7.0 の結果に比べ低い傾向にあった。このことは本菌の MIC 測定におよぼす CO<sub>2</sub> 培養の影響を示している。実際に Loo らも *H. pylori* の MIC 測定における CO<sub>2</sub> 培養の問題を指摘している<sup>8)</sup>。またこの培養条件に関する問題は寒天平板希釈法に限らず液体希釈法にも同様に影響するものと考えられる。発育に CO<sub>2</sub> 培養を要する菌種に対する MIC 測定はこのような培地 pH の変動を抑える手段として Buffer を添加する場合がある。しかし *H. pylori* の多くの菌株は、添加した Buffer によって発育阻害を受けることがある。実際、今回の測定においても臨床分離株の約 1/3 が Buffer の添加によって発育に阻害を受けている。結果には示さなかったが今回用いたリン酸 Buffer 以外のいくつかの Buffer を用い検討を行ったが、同様に Buffer の影響を強く受けた。これらのことから今回我々は *H. pylori* 発育必要条件に着目し、CO<sub>2</sub> 培養を行わない培養法、すなわち Mueller Hinton 半流動培地を用いる感受性測定法を考案し検討した。その結果、本法は接種菌量の影響もほとんどなく、3 回にわたる測定間における MIC 値のばらつきもきわめて少な

いことが確認された。また従来報告されている寒天平板希釈法で判定までに必要な培養時間が 72 時間以上であるのに対し、本法は 48 時間で十分な判定が可能であった。

他方、本菌に対する各種薬剤の MIC は多くの研究者によって報告されているが、そのほとんどは寒天平板希釈法の CO<sub>2</sub> 培養による方法である<sup>9-11)</sup>。すなわち、これらの結果は CO<sub>2</sub> によって培地 pH がやや酸性側に傾いた条件で測定されたものと推定される。また測定の際、精度管理として試験菌と同じ測定培地上で NCCLS の MIC 測定精度管理用菌株を用いて測定している報告は少なく、*Bacteroides fragilis* を用いた嫌気培養による精度管理を実施している例が一部報告されている<sup>12)</sup>。しかし本来であれば必ず同培地、同条件で精度管理を行うことが必要である。今回特に本法の正確性について強調したい点は、*H. pylori* と同じ条件で NCCLS の MIC 精度管理用菌株 *S. aureus* ATCC 29212 および *E. coli* ATCC 25922 の MIC 測定が可能で、*H. pylori* の除菌に用いられている AMPC および CAM の両菌に対する MIC 値がいずれも NCCLS 管理基準内であったことである。一部 CFX の *E. coli* に対する MIC 値が上限を 1 管 (2 倍) 超えていたが、*S. aureus* は管理基準内に収まっていた。このことは本測定培地において *E. coli* に対する CFX の MIC 値はやや高くなることを意味している。しかし *S. aureus* に対する値が基準内であること、*E. coli* に対しても 3 回の測定値がすべて 0.03 µg/ml と安定していることから、十分な精度管理が可能と思われる。

*H. pylori* の除菌を目的として抗菌薬が投与される場合、分離された *H. pylori* の薬剤感受性は治療の結果に大きく影響する。特に最近 *H. pylori* の macrolide 系抗菌薬に対する耐性化の問題<sup>13)</sup> は深刻である。よって本菌の投与抗菌薬に対する耐性情報の臨床への迅速なフィードバックは治療上重要な問題である。

今回検討した、半流動培地を用いた MIC 測定法は NCCLS ガイドラインに準じた精度管理が可能で再現性に優れ、かつ迅速に結果が得られることが確認された。しかし現段階では測定方法が従来の macro broth dilution と同様であることから、用時調整の必要性等、操作上やや繁雑である。現在マイクロプレート化への改良を行い実用化へ検討中で、これらの改良により本法は臨床における *H. pylori* 除菌治療に有用であると考えられる。

この論文は第 44 回日本化学療法学会総会において、編集委員会より学会誌に投稿するよう推薦を受けたものである。

#### 文 献

- 1) 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) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 2) 小林寅詔, 長谷川美幸, 藤岡利生, 那須 勝: 新しく考案した *Helicobacter pylori* 輸送用培地 (HP 培地) の有用性。感染症誌 69: 123~124, 1995
- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Tentative Standard M100-S6. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 6th informational supplement, NCCLS, Villanova, Pennsylvania, 1995
- 4) Sham D F, Baker C N, Jones R N, Thornsberry C: Influence of growth medium on the *in vitro* activities of second- and third-generation cephalosporins against *Streptococcus faecalis*. J Clin Microb 20: 561~567, 1984
- 5) 川辺晴英: 培地の性状—感受性測定への影響—。薬剤感受性測定法 (三橋 進編), p.61~67, 講談社, 東京, 1980
- 6) Barry A L, Fuchs P C: *In-vitro* potency of azithromycin against Gram-negative bacilli is method-dependent. J Antimicrob Chemother 28: 607~610, 1991
- 7) Neu, Halord C: *In vitro* antimicrobial activity of 6 [D (-)  $\alpha$ -amino-p-hydroxyphenyl acetamide] penicillanic acid, A new semisynthetic penicillin. Antimicrob Agents Chemother 1: 407~410, 1971
- 8) Loo V G, Sherman P, Matlow A G: *Helicobacter pylori* infection in a pediatric population: *In vitro* susceptibilities to omeprazole and eight antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 36: 1133~1135, 1992
- 9) Knapp C C, Ludwig M D, Washington J A: *In vitro* activity of metronidazole against *Helicobacter pylori* as determined by agar dilution and agar diffusion. Antimicrob Agents Chemother 35: 1230~1231, 1991
- 10) DeCross A J, Marshall B J, McCallum R W, Hoffman S R, Barrett L J, Guerrant R L: Metronidazole susceptibility testing for *Helicobacter pylori*: Comparison of disk, broth, and agar dilution methods and their clinical relevance. J Clin Microbiol 31: 1971~1974, 1993
- 11) Xia H, Keane C T, Beattle S, O'Morain C A: Standardization of disk diffusion test and its clinical significance for susceptibility testing of metronidazole against *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 38: 2357~2361, 1994
- 12) Pavicic M J A M P, Namavar F, Verboom T, Van Winkelhoff A J, De Graaff J: *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to several antimicrobial combinations. Antimicrob Agents Chemother 37: 1184~1186, 1993
- 13) 小林寅詔, 戸田陽代, 長谷川美幸, 西田 実, 藤岡利生, 那須 勝: 胃潰瘍患者胃粘膜より分離した *Helicobacter pylori* 新鮮株の各種抗菌薬感受性。日本化学療法学会雑誌 44: 719~722, 1996

## Evaluation of measurement of MICs of antimicrobial agents for *Helicobacter pylori* in semi-solid agar

Toshio Fujioka<sup>1)</sup>, Masaru Nasu<sup>1)</sup>, Haruyo Toda<sup>2)</sup>, Miyuki Hasegawa<sup>2)</sup>,  
Hiroe Muraoka<sup>2)</sup>, Intetsu Kobayashi<sup>2)</sup>, Katsu Saionji<sup>3)</sup>,  
and Jun Igari<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Second Department of Internal Medicine, Oita Medical University, 1-1 Idaigaoka, Hazama-cho, Oita-gun, Oita 879-55, Japan

<sup>2)</sup> Chemotherapy Division, Mitsubishi-Kagaku Bio-Clinical Laboratories

<sup>3)</sup> Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Juntendo University

We determined the MICs of amoxicillin, clarithromycin, azithromycin and ciprofloxacin for 21 *Helicobacter pylori* strains by using Mueller Hinton semi-solid agar without CO<sub>2</sub> incubation. Generally, the susceptibility of *H. pylori* to these antimicrobial agents was measured by the agar dilution method with incubation in 10-15% CO<sub>2</sub> at 37°C. However, the MICs of macrolides in medium at pH 6.0 in CO<sub>2</sub> were 8-16 times higher than those at pH 7.0. *H. pylori* strains of 1.0×10<sup>7</sup> CFU were inoculated into 1-ml of quantities semi-solid agar (prepared with Mueller Hinton broth to which 2 g of agar per liter was added) in tubes. The tubes were aerobically incubated at 35°C. The tubes were examined for growth of *H. pylori* at a depth of 3 mm from the surface of the medium. Variation in the inoculum size did not affect the MICs of the four drugs. MICs of the antimicrobial agents except for ciprofloxacin used for quality control strains of the National Committee for Clinical Laboratory Standards were within acceptable ranges. The MICs of the four drugs (except the twofold dilution of ciprofloxacin) which were measured for 3 days were within the acceptable range. The use of semi-solid agar for the measurement of MICs will assist clinicians in providing appropriate therapy for infections with *H. pylori*.