

## 尿中細菌検索用 dip-slide に関する検討

—検体尿量の違いにより生じる問題点—

鈴木由美子・石原 理加・石井由紀子・中澤ありさ・出口 浩一

東京総合臨床検査センター研究部\*

(平成 9 年 1 月 9 日受理・平成 9 年 5 月 16 日受理)

主として尿路感染症由来 16 菌種 18 株のヒト尿で作製した菌液に、 $\beta$ -ラクタム系 ( $\beta$ -lactams) 6 薬剤とニューキノロン系 (NQs) 2 薬剤を添加した「抗菌性物質含有尿」を対象とし、使用方法の異なる dip-slide による培養結果を比較して以下の結果を得た。

1. MIC 値 $\leq 6.25 \mu\text{g/ml}$ を示した株を感性株、同じく $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$ を示した株を耐性株としてまとめた結果では、いずれの薬剤においても耐性株を供試した場合には両方の培地には発育していたが、感性株を供試した結果には大きな差が認められた。すなわち、8 薬剤の感性株の大部分はウリカルト E<sup>®</sup>には発育しないものの、ダイアスライド<sup>®</sup>には感性株が  $P < 0.01$  の有意差をもって発育していた。

2. 感性株における差は、双方の dip-slide に接種する尿量がウリカルト E に比較してダイアスライドは 1/100 程度少ないことに起因すると考えられた。これにより、薬剤含有 (残存) 尿を dip-slide で培養する際に、検体尿量が多い場合には偽陰性が生じ得ることが示唆された。

**Key words:** dip-slide, 検体尿量, break point, 偽陰性, 尿中排泄濃度

尿路感染症の診断を目的とした尿中細菌の定量培養を簡易化する目的で、1965 年に Mackey ら<sup>1)</sup>が考案した dip-slide は、我が国でも 1973 年以降に日常検査で使用されており<sup>2)</sup>、この dip-slide は我が国における UTI 薬効評価基準においても推奨されている<sup>3)</sup>。しかし近年、血中半減期の長い抗菌性物質が続々と開発されており<sup>4-6)</sup>、これらの薬剤投与症例においては尿中に長時間抗菌性物質が排泄されている場合も多く、それらが dip-slide を用いた定量培養の結果に影響することも考えられる。そこで我々は、我が国で上市されている使用方法の異なる製品の 2 つを使用して、尿中に含まれている抗菌性物質の存在が dip-slide の定量培養成績に与える影響を検討した。

### I. 材料と方法

#### 1. 使用した dip-slide

ウリカルト E<sup>®</sup> (第一化学); グラム染色標本などに用いるスライドグラス大プラスチック製板に、寒天が両面にコーティングされている。片面は cystine-lactose-electrolyte-deficient agar (CLED)<sup>7)</sup>、反対面は 2 つに区分されていて、そのうちの 1 つは Mac Conkey agar (以下では MAC と略)、もう 1 つは Enterococcus agar である。使用方法は、採取した尿量が多い場合には尿コップ内に培地をそのまま浸す方法と、尿量が少ない場合はピペットなどで尿を培地の表面に滴下する方法があるが、いずれの方法においても培地に浸み込む尿量は、我々の過去における定量培養との相関を含む検

討結果においては、コーティングされている寒天約 2 ml の 1/10 相当としての約 0.2 ml 程度であることから、3 種類の培地に発育する菌数の上限は  $10^6$  CFU/ml である<sup>2,7)</sup>。

ダイアスライド<sup>®</sup> (日水製薬); ウリカルト E よりもやや直径が長いプラスチック製板に、CLED と MAC の寒天培地が本体の内側に向い合ったプラスチック製のサンプラーに挟まれている。使用方法はサンプラーの先端にある上下に曲がったサンプラーチップ (V字型) を尿中に浸した後にそれを引き上げると、サンプラーチップに付着した極少量の尿が培地に塗布される仕組みとなっている。これにより、培地に浸み込む尿量は 0.002 ml 程度 (ウリカルト E の約 1/100) であり、定量培養との相関によると培地に発育する菌数の上限は  $10^6$  CFU/ml である<sup>7)</sup>。

#### 2. 菌液の作製

当所で保存している *Staphylococcus aureus* FDA 209-P JC-1, *Escherichia coli* NIHJJC-2, 尿路感染症由来 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) TR 101, *Staphylococcus saprophyticus* TR 102, *Enterococcus faecalis* TR 103, *Enterococcus faecium* TR 104, *Escherichia coli* TR 105, *Citrobacter freundii* TR 106, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* TR 107, *Enterobacter aerogenes* TR 108, *Enterobacter cloacae* TR 109, *Serratia marcescens* TR 110, *Proteus vul-*

garis TR 111, *Morganella morganii* TR 112, *Pseudomonas aeruginosa* TR 113, *Acinetobacter baumannii* TR 114, *Acinetobacter lwoffii* TR 115, *Stenotrophomonas maltophilia* TR 116, 計 18 株の菌液をヒト尿を用いて  $3 \times 10^6$  CFU/ml, および  $3 \times 10^4$  CFU/ml に調製した。

### 3. 抗菌性物質含有菌数

Ampicillin (ABPC, ファイザー製薬), cefaclor (CCL, 塩野義製薬), cefotiam (CTM, 武田薬品工業), cefetamet (CEMT, 日本ロシユ), cefditoren (CDTR, 明治製薬), ritipenem (RIPM, ファルマシア), ciprofloxacin (CPFX, バイエル薬品), levofloxacin (LVFX, 第一製薬), 以上 8 薬剤の標準原末を使用し, 各々の 500  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml を作製してその 1/10 希釈液となるよう上記 2. に示した 18 株の  $10^6$  CFU/ml および  $10^4$  CFU/ml に添加し, 8 薬剤の 50  $\mu$ g/ml と 5  $\mu$ g/ml 含有菌液を作製した。

### 4. 菌液の接種と培養および菌数測定

上記 3. に示した  $10^6$  CFU/ml および  $10^4$  CFU/ml の各々に 8 薬剤の 50  $\mu$ g/ml と 5  $\mu$ g/ml を含有する菌液と, 薬剤無添加の菌液を合わせた計 74 サンプルは, サンプル作製時に 5  $^{\circ}$ C にて 2 時間放置しておき, 1. に示した 2 種類の dip-slide に接種し, 37  $^{\circ}$ C 一夜培養後に

各々の主として CLED に発育した菌数を測定した。

### 5. 18 株の薬剤感受性

2. に示した 18 株の薬剤感受性を, 日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定標準に従い,  $10^6$  CFU/ml 接種の寒天平板希釈法にて MIC を測定した<sup>8)</sup>。

### 6. 推計学的検討

上記 4. で得られた結果は, 2 項目検定法 (2 項検定) により推計学的検討を行った。

## II. 結 果

### 1. 供試 18 株に対する 8 薬剤の MIC 値

Table 1 に示したように, 8 薬剤の MIC は各々の薬剤の抗菌スペクトルを反映した結果が大部分であったが, MRSA, *C. freundii*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* は 8 薬剤のすべてに耐性を示す多剤耐性株であり, *S. marcescens* はニューキノロン耐性株であった。

### 2. 抗菌性物質存在下における発育株数

#### 1) ABPC, CCL, CTM 存在下

Table 2 は ABPC, CCL, CTM の各々 50  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml 存在下において, 双方の CLED 培地 (以下では双方の CLED 培地を略) に  $\geq 10^3$  CFU/ml で発育した株数を  $10^6$  および  $10^4$  CFU/ml 菌液接種, さらに MIC 値  $\leq 6.25$   $\mu$ g/ml を感性株, 同じく  $\geq 12.5$   $\mu$ g/ml を耐性株としてまとめた結果である。ABPC 50  $\mu$ g/ml 存

Table 1. MIC values of 8 antibacterial agents against 18 bacterial strains

| Organism  | MICs ( $\mu$ g/ml) $10^6$ CFU/ml |      |      |      |      |              |              |              |
|---|----------------------------------|------|------|------|------|--------------|--------------|--------------|
|   | ABPC                             | CCL  | CTM  | CEMT | CDTR | RIPM         | CPFX         | LVFX         |
| <i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209-P JC-1                     | 0.05                             | 0.39 | 0.2  | >100 | 0.2  | $\leq 0.025$ | 0.2          | 0.2          |
| MRSA TR 101   | 50                               | 100  | >100 | >100 | 100  | >100         | >100         | >100         |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> TR 102                      | 0.05                             | 0.78 | 0.39 | >100 | 0.39 | $\leq 0.025$ | 0.39         | 0.2          |
| <i>Enterococcus faecalis</i> TR 103                             | 0.39                             | 50   | 100  | >100 | 25   | 1.56         | 1.56         | 1.56         |
| <i>Enterococcus faecium</i> TR 104                              | 0.39                             | 100  | >100 | >100 | >100 | 0.78         | 3.13         | 3.13         |
| <i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2                               | 3.13                             | 3.13 | 0.1  | 0.39 | 0.2  | 0.39         | $\leq 0.025$ | 0.05         |
| <i>Escherichia coli</i> TR 105                                  | 6.25                             | 6.25 | 0.2  | 0.78 | 0.39 | 0.78         | 0.05         | 0.1          |
| <i>Citrobacter freundii</i> TR 106                              | >100                             | >100 | >100 | >100 | >100 | 25           | >100         | >100         |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>subsp. <i>pneumoniae</i> TR 107 | >100                             | 12.5 | 0.78 | 0.1  | 0.39 | 0.39         | 0.05         | 0.1          |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> TR 108                            | 100                              | 50   | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 3.13         | $\leq 0.025$ | 0.05         |
| <i>Enterobacter cloacae</i> TR 109                              | >100                             | >100 | >100 | >100 | 100  | 25           | 25           | 25           |
| <i>Serratia marcescens</i> TR 110                               | 50                               | >100 | 6.25 | 1.56 | 0.78 | 3.13         | 12.5         | 12.5         |
| <i>Proteus vulgaris</i> TR 111                                  | >100                             | >100 | >100 | 0.2  | 0.1  | 0.39         | $\leq 0.025$ | $\leq 0.025$ |
| <i>Morganella morganii</i> TR 112                               | >100                             | >100 | 6.25 | 1.56 | 1.56 | 1.56         | $\leq 0.025$ | $\leq 0.025$ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TR 113                            | >100                             | >100 | >100 | >100 | >100 | >100         | >100         | >100         |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> TR 114                           | 12.5                             | 100  | 50   | 25   | 25   | 0.39         | 0.2          | 0.2          |
| <i>Acinetobacter lwoffii</i> TR 115                             | 6.25                             | 100  | 100  | >100 | 25   | 0.1          | 0.05         | 0.05         |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TR 116                      | 100                              | >100 | >100 | >100 | 100  | >100         | 0.1          | 0.1          |

MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*

ABPC: ampicillin, CCL: cefaclor, CTM: cefotiam, CEMT: cefetamet, CDTR: cefditoren, RIPM: ritipenem, CPFX: ciprofloxacin,

LVFX: levofloxacin

Table 2. Comparison of URICULT E with DIASLIDE under 18 kinds of bacterial broth spiked ampicillin, cefaclor and cefotiam respectively

| Antibacterial agent | Potency ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Inoculum size (CFU/ml) | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) | No. of strains | Growin strains <sup>a)</sup> |          |     |
|---------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------|------------------------------|----------|-----|
|                     |                              |                        |                          |                | URICULT E                    | DIASLIDE |     |
| Ampicillin          | 50                           | 10 <sup>6</sup>        | $\leq 6.25$              | 7              | 3                            | 7        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 11             | 11                           | 11       | N.S |
|                     |                              | 10 <sup>4</sup>        | $\leq 6.25$              | 7              | 2                            | 6        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 11             | 11                           | 11       | N.S |
|                     | 5                            | 10 <sup>6</sup>        | $\leq 6.25$              | 7              | 6                            | 7        | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 11             | 11                           | 11       | N.S |
|                     |                              | 10 <sup>4</sup>        | $\leq 6.25$              | 7              | 6                            | 7        | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 11             | 11                           | 11       | N.S |
| Cefaclor            | 50                           | 10 <sup>6</sup>        | $\leq 6.25$              | 4              | 2                            | 4        | *   |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 14             | 14                           | 14       | N.S |
|                     |                              | 10 <sup>4</sup>        | $\leq 6.25$              | 4              | 1                            | 3        | *   |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 14             | 14                           | 14       | N.S |
|                     | 5                            | 10 <sup>6</sup>        | $\leq 6.25$              | 4              | 4                            | 4        | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 14             | 14                           | 14       | N.S |
|                     |                              | 10 <sup>4</sup>        | $\leq 6.25$              | 4              | 4                            | 4        | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 14             | 14                           | 14       | N.S |
| Cefotiam            | 50                           | 10 <sup>6</sup>        | $\leq 6.25$              | 8              | 0                            | 8        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 10             | 10                           | 10       | N.S |
|                     |                              | 10 <sup>4</sup>        | $\leq 6.25$              | 8              | 7                            | 8        | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 10             | 10                           | 10       | N.S |
|                     | 5                            | 10 <sup>6</sup>        | $\leq 6.25$              | 8              | 7                            | 8        | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 10             | 10                           | 10       | N.S |
|                     |                              | 10 <sup>4</sup>        | $\leq 6.25$              | 8              | 5                            | 8        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 10             | 10                           | 10       | N.S |

<sup>a)</sup> growing of  $\geq 10^4$  CFU/ml\*\* :  $P < 0.01$ , \* :  $P < 0.05$ 

N. S: not significant

在下 10<sup>6</sup> および 10<sup>4</sup> CFU/ml の感性株, CTM 50  $\mu\text{g/ml}$  存在下 10<sup>6</sup> CFU/ml の感性株, および CTM 5  $\mu\text{g/ml}$  存在下 10<sup>4</sup> CFU/ml の感性株においては, ウリカルト E に比較してダイアスライドが  $P < 0.01$  の有意差をもって発育株数が多かったが, CCL 存在下では 10<sup>6</sup> および 10<sup>4</sup> CFU/ml の感性株で  $P < 0.05$  の有意な傾向であったが, 3 薬剤の耐性株においては有意差が認められなかった。

## 2) CEMT, CDTR, RIPM 存在下

Table 3 は CEMT, CDTR, RIPM の上記 1) と同様の条件での結果である。3 薬剤においては共通して各々の 50  $\mu\text{g/ml}$  存在下の 10<sup>6</sup> および 10<sup>4</sup> CFU/ml の感性株において, ウリカルト E に比較してダイアスライドが  $P < 0.01$  の有意差をもって発育株数が多く, CDTR 50  $\mu\text{g/ml}$  存在下の耐性株および 5  $\mu\text{g/ml}$  存在下の感性株でも 10<sup>4</sup> CFU/ml では  $P < 0.05$  の有意な傾向であったが,

3 薬剤の耐性株においては有意差が認められなかった。

## 3) CPFX, LVFX 存在下

Table 4 は CPFX, LVFX の上記 1), 2) と同様の条件での結果である。2 薬剤においては共通して各々の 50  $\mu\text{g/ml}$  と 5  $\mu\text{g/ml}$  双方の存在下の 10<sup>6</sup> および 10<sup>4</sup> CFU/ml の感性株において, ウリカルト E に比較してダイアスライドが  $P < 0.01$  の有意差をもって発育株数が多かったが, 2 薬剤の耐性株においては有意差が認められなかった。

## 3. ABPC および LVFX 添加 18 株の菌液接種による両培地の発育性

### 1) ABPC 添加菌液接種

Tables 5, 6 は 18 株の 10<sup>6</sup> CFU/ml に ABPC 50  $\mu\text{g/ml}$  と 5  $\mu\text{g/ml}$  を添加した菌液を, ウリカルト E とダイアスライドに接種した結果をまとめたものである。Table 5 に示した 50  $\mu\text{g/ml}$  存在下におけるウリカルト

Table 3. Comparison of URICULT E with DIASLIDE under 18 kinds of bacterial broth spiked cefetamet, cefditoren and ritipenem respectively

| Antibacterial agent | Potency ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Inoculum size (CFU/ml) | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) | No. of strains | Growin strains <sup>a)</sup> |          |     |
|---------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------|------------------------------|----------|-----|
|                     |                              |                        |                          |                | URICULT E                    | DIASLIDE |     |
| Cefetamet           | 50                           | $10^6$                 | $\leq 6.25$              | 7              | 1                            | 7        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 11             | 11                           | 10       | N.S |
|                     |                              | $10^4$                 | $\leq 6.25$              | 7              | 0                            | 7        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 11             | 11                           | 11       | N.S |
|                     | 5                            | $10^6$                 | $\leq 6.25$              | 7              | 7                            | 7        | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 11             | 11                           | 11       | N.S |
|                     |                              | $10^4$                 | $\leq 6.25$              | 7              | 6                            | 7        | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 11             | 11                           | 11       | N.S |
| Cefditoren          | 50                           | $10^6$                 | $\leq 6.25$              | 9              | 2                            | 9        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 9              | 9                            | 9        | N.S |
|                     |                              | $10^4$                 | $\leq 6.25$              | 9              | 1                            | 8        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 9              | 7                            | 9        | *   |
|                     | 5                            | $10^6$                 | $\leq 6.25$              | 9              | 8                            | 9        | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 9              | 9                            | 9        | N.S |
|                     |                              | $10^4$                 | $\leq 6.25$              | 9              | 7                            | 9        | *   |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 9              | 9                            | 9        | N.S |
| Ritipenem           | 50                           | $10^6$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 7                            | 13       | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 4                            | 5        | N.S |
|                     |                              | $10^4$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 5                            | 12       | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 4                            | 4        | N.S |
|                     | 5                            | $10^6$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 12                           | 13       | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 5                            | 5        | N.S |
|                     |                              | $10^4$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 12                           | 13       | N.S |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 5                            | 5        | N.S |

<sup>a)</sup> growing of  $\geq 10^3$  CFU/ml

\*\* :  $P < 0.01$ , \* :  $P < 0.05$

N. S: not significant

E には ABPC 感性の 7 株中 3 株が発育していないものの、ダイアスライドにはこれら 3 株を含む 18 株のすべてが発育していたが、Table 6 に示した  $5 \mu\text{g/ml}$  存在下における両培地の発育性は 1 株を除き同様であった。

#### 2) LVFX 添加菌液接種

Tables 7, 8 は上記 3. 1) と同様の LVFX 添加菌液接種の結果である。Table 7 に示した  $50 \mu\text{g/ml}$  存在下におけるウリカルト E には LVFX 感性の 13 株中 12 株が発育していないものの、ダイアスライドには LVFX 感性の 13 株中 11 株が発育しており、Table 8 に示した  $5 \mu\text{g/ml}$  存在下においてもウリカルト E には LVFX 感性の 13 株中 8 株が発育していないものの、ダイアスライドには LVFX 感性の 13 株中 12 株が発育していた。

なお、LVFX  $50 \mu\text{g/ml}$  存在下においてダイアスライドに発育した LVFX 感性 11 株中の 7 株、同じく  $5 \mu\text{g/ml}$  存在下にダイアスライドに発育した LVFX 感性

12 株中の 2 株の CLED における菌数は  $\leq 10^4$  CFU/ml に減少していた。

### III. 考 察

dip-slide が考案されたそもそもの目的は、尿中細菌の定量培養をベットサイドでも実施を可能とするために簡易化することにあつた<sup>1,2,9)</sup>。一方、我が国においては 1970 年代の後半からは新規の抗菌性物質の尿路感染症における第二相および第三相試験での細菌学的効果の検討は、主として UTI 薬効評価基準にもとづいて dip-slide による患者採取尿の一夜培養後の総菌数は担当医が判定することとし、そこに発育しているコロニーの正確な同定と MIC 測定などはいわゆる「一括集中測定機関」が実施しており、我々の施設もそれに指名される機会も多かった<sup>10,11)</sup>。我々はそこで使用する dip-slide は、ウリカルトまたはウリカルト E は世界的に使用されていること<sup>2)</sup>、さらに 1993 年まではウリカ

Table 4. Comparison of URICULT E with DIASLIDE under 18 kinds of bacterial broth spiked ciprofloxacin and levofloxacin respectively

| Antibacterial agent | Potency ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Inoculum size (CFU/ml) | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) | No. of strains | Growth strains <sup>a)</sup> |          |     |
|---------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------|------------------------------|----------|-----|
|                     |                              |                        |                          |                | URICULT E                    | DIASLIDE |     |
| Ciprofloxacin       | 50                           | $10^6$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 0                            | 11       | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 5                            | 5        | N.S |
|                     |                              | $10^4$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 0                            | 4        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 5                            | 5        | N.S |
|                     | 5                            | $10^6$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 5                            | 13       | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 5                            | 5        | N.S |
|                     |                              | $10^4$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 5                            | 8        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 5                            | 5        | N.S |
| Levofloxacin        | 50                           | $10^6$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 0                            | 11       | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 5                            | 5        | N.S |
|                     |                              | $10^4$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 0                            | 3        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 5                            | 4        | N.S |
|                     | 5                            | $10^6$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 5                            | 12       | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 5                            | 5        | N.S |
|                     |                              | $10^4$                 | $\leq 6.25$              | 13             | 4                            | 8        | **  |
|                     |                              |                        | $\geq 12.5$              | 5              | 5                            | 5        | N.S |

<sup>a)</sup> growing of  $\geq 10^3$  CFU/ml\*\* :  $P < 0.01$ 

N. S: not significant

Table 5. Comparison of URICULT E and DIASLIDE under 18 bacterial strains ( $10^6$  CFU/ml) spiked 50  $\mu\text{g/ml}$  of ampicillin

| Test no. | Organism   | Antibacterial agent | Potency ( $\mu\text{g/ml}$ ) | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) | URICULT E |        |        | DIASLIDE |        |
|----------|--|---------------------|------------------------------|--------------------------|-----------|--------|--------|----------|--------|
|          |  |                     |                              |                          | CLED      | MAC    | Entero | CLED     | MAC    |
| 1        | <i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209-P JC-1                  | ampicillin          | 50                           | 0.05                     | —         | —      | —      | $10^5$   | —      |
| 2        | MRSA TR 101  |                     |                              | 50                       | $10^6$    | —      | —      | $10^6$   | —      |
| 3        | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> TR 102                   |                     |                              | 0.05                     | —         | —      | —      | $10^6$   | —      |
| 4        | <i>Enterococcus faecalis</i> TR 103                          |                     |                              | 0.39                     | —         | —      | $10^4$ | $10^6$   | —      |
| 5        | <i>Enterococcus faecium</i> TR 104                           |                     |                              | 0.39                     | —         | —      | —      | $10^5$   | —      |
| 6        | <i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2                            |                     |                              | 3.13                     | $10^5$    | $10^5$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 7        | <i>Escherichia coli</i> TR 105                               |                     |                              | 6.25                     | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^5$   | $10^5$ |
| 8        | <i>Citrobacter freundii</i> TR 106                           |                     |                              | >100                     | $10^6$    | $10^5$ | —      | $10^6$   | $10^5$ |
| 9        | <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> TR 107 |                     |                              | >100                     | $10^6$    | $10^4$ | —      | $10^4$   | $10^4$ |
| 10       | <i>Enterobacter aerogenes</i> TR 108                         |                     |                              | 100                      | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 11       | <i>Enterobacter cloacae</i> TR 109                           |                     |                              | >100                     | $10^6$    | $10^5$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 12       | <i>Serratia marcescens</i> TR 110                            |                     |                              | 50                       | $10^6$    | $10^5$ | $10^4$ | $10^6$   | $10^5$ |
| 13       | <i>Proteus vulgaris</i> TR 111                               |                     |                              | >100                     | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^5$ |
| 14       | <i>Morganella morganii</i> TR 112                            |                     |                              | >100                     | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 15       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TR 113                         |                     |                              | >100                     | $10^6$    | $10^5$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 16       | <i>Acinetobacter baumannii</i> TR 114                        |                     |                              | 12.5                     | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 17       | <i>Acinetobacter lwoffii</i> TR 115                          |                     |                              | 6.25                     | $10^6$    | $10^5$ | —      | $10^6$   | $10^5$ |
| 18       | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TR 116                   |                     |                              | 100                      | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^5$ |

CLED: cystine-lactose-electrolyte-deficient agar, MAC: Mac Conkey's agar, Entero: Enterococcus agar

MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*

Table 6. Comparison of URICULT E and DIASLIDE under 18 bacterail strains ( $10^6$  CFU/ml) spiked 5  $\mu$ g/ml of ampicillin

| Test no. | Organism   | Antibacterial agent | Potency ( $\mu$ g/ml) | MIC ( $\mu$ g/ml) | URICULT E |        |        | DIASLIDE |        |
|----------|--|---------------------|-----------------------|-------------------|-----------|--------|--------|----------|--------|
|          |  |                     |                       |                   | CLED      | MAC    | Entero | CLED     | MAC    |
| 1        | <i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209-P JC-1                  | ampicillin          | 5                     | 0.05              | —         | —      | —      | $10^5$   | —      |
| 2        | MRSA TR 101  |                     |                       | 50                | $10^6$    | —      | —      | $10^6$   | —      |
| 3        | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> TR 102                   |                     |                       | 0.05              | $10^4$    | —      | —      | $10^6$   | —      |
| 4        | <i>Enterococcus faecalis</i> TR 103                          |                     |                       | 0.39              | $10^6$    | —      | $10^6$ | $10^6$   | —      |
| 5        | <i>Enterococcus faecium</i> TR 104                           |                     |                       | 0.39              | $10^5$    | —      | $10^4$ | $10^6$   | —      |
| 6        | <i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2                            |                     |                       | 3.13              | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 7        | <i>Escherichia coli</i> TR 105                               |                     |                       | 6.25              | $10^6$    | $10^5$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 8        | <i>Citrobacter freundii</i> TR 106                           |                     |                       | >100              | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 9        | <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> TR 107 |                     |                       | >100              | $10^6$    | $10^5$ | —      | $10^5$   | $10^5$ |
| 10       | <i>Enterobacter aerogenes</i> TR 108                         |                     |                       | 100               | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 11       | <i>Enterobacter cloacae</i> TR 109                           |                     |                       | >100              | $10^6$    | $10^5$ | —      | $10^5$   | $10^5$ |
| 12       | <i>Serratia marcescens</i> TR 110                            |                     |                       | 50                | $10^6$    | $10^5$ | $10^4$ | $10^6$   | $10^5$ |
| 13       | <i>Proteus vulgaris</i> TR 111                               |                     |                       | >100              | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^5$ |
| 14       | <i>Morganella morganii</i> TR 112                            |                     |                       | >100              | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 15       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TR 113                         |                     |                       | >100              | $10^6$    | $10^5$ | —      | $10^6$   | $10^5$ |
| 16       | <i>Acinetobacter baumannii</i> TR 114                        |                     |                       | 12.5              | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 17       | <i>Acinetobacter lwoffii</i> TR 115                          |                     |                       | 6.25              | $10^6$    | $10^5$ | —      | $10^6$   | $10^5$ |
| 18       | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TR 116                   |                     |                       | 100               | $10^6$    | $10^5$ | —      | $10^6$   | $10^5$ |

CLED: cystine-lactose-electrolyte-deficient agar, MAC: Mac Conkey's agar, Entero: Enterococcus agar

MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*Table 7. Comparison of URICULT E and DIASLIDE under 18 bacterail strains ( $10^6$  CFU/ml) spiked 50  $\mu$ g/ml of levofloxacin

| Test no. | Organism   | Antibacterial agent | Potency ( $\mu$ g/ml) | MIC ( $\mu$ g/ml) | URICULT E |        |        | DIASLIDE |        |
|----------|--|---------------------|-----------------------|-------------------|-----------|--------|--------|----------|--------|
|          |  |                     |                       |                   | CLED      | MAC    | Entero | CLED     | MAC    |
| 1        | <i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209-P JC-1                  | levofloxacin        | 50                    | 0.2               | —         | —      | —      | $10^4$   | —      |
| 2        | MRSA TR 101  |                     |                       | >100              | $10^6$    | —      | —      | $10^6$   | —      |
| 3        | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> TR 102                   |                     |                       | 0.2               | —         | —      | —      | $10^5$   | —      |
| 4        | <i>Enterococcus faecalis</i> TR 103                          |                     |                       | 1.56              | —         | —      | $10^5$ | $10^6$   | —      |
| 5        | <i>Enterococcus faecium</i> TR 104                           |                     |                       | 3.13              | —         | —      | —      | $10^6$   | —      |
| 6        | <i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2                            |                     |                       | 0.05              | —         | —      | —      | $10^3$   | $10^3$ |
| 7        | <i>Escherichia coli</i> TR 105                               |                     |                       | 0.1               | —         | —      | —      | —        | —      |
| 8        | <i>Citrobacter freundii</i> TR 106                           |                     |                       | >100              | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 9        | <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> TR 107 |                     |                       | 0.1               | —         | —      | —      | —        | —      |
| 10       | <i>Enterobacter aerogenes</i> TR 108                         |                     |                       | 0.05              | —         | —      | —      | $10^3$   | —      |
| 11       | <i>Enterobacter cloacae</i> TR 109                           |                     |                       | 25                | $10^5$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 12       | <i>Serratia marcescens</i> TR 110                            |                     |                       | 12.5              | $10^6$    | $10^5$ | $10^4$ | $10^6$   | $10^6$ |
| 13       | <i>Proteus vulgaris</i> TR 111                               |                     |                       | $\leq 0.025$      | —         | —      | —      | $10^4$   | —      |
| 14       | <i>Morganella morganii</i> TR 112                            |                     |                       | $\leq 0.025$      | —         | —      | —      | $10^4$   | $10^4$ |
| 15       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TR 113                         |                     |                       | >100              | $10^6$    | $10^6$ | —      | $10^6$   | $10^6$ |
| 16       | <i>Acinetobacter baumannii</i> TR 114                        |                     |                       | 0.2               | —         | —      | —      | $10^3$   | —      |
| 17       | <i>Acinetobacter lwoffii</i> TR 115                          |                     |                       | 0.05              | —         | —      | —      | $10^4$   | $10^4$ |
| 18       | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TR 116                   |                     |                       | 0.1               | —         | —      | —      | $10^3$   | $10^4$ |

CLED: cystine-lactose-electrolyte-deficient agar, MAC: Mac Conkey's agar, Entero: Enterococcus agar

MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*

Table 8. Comparison of URICULT E and DIASLIDE under 18 bacterail strains ( $10^6$  CFU/ml) spiked 5  $\mu$ g/ml of levofloxacin

| Test no. | Organism   | Antibacterial agent | Potency ( $\mu$ g/ml) | MIC ( $\mu$ g/ml) | URICULT E |        |              | DIASLIDE |        |
|----------|--|---------------------|-----------------------|-------------------|-----------|--------|--------------|----------|--------|
|          |  |                     |                       |                   | CLED      | MAC    | Enterococcus | CLED     | MAC    |
| 1        | <i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209-P JC-1                  | levofloxacin        | 5                     | 0.2               | —         | —      | —            | $10^6$   | —      |
| 2        | MRSA TR 101  |                     |                       | >100              | $10^6$    | —      | —            | $10^6$   | —      |
| 3        | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> TR 102                   |                     |                       | 0.2               | $10^6$    | —      | —            | $10^6$   | —      |
| 4        | <i>Enterococcus faecalis</i> TR 103                          |                     |                       | 1.56              | $10^6$    | —      | $10^6$       | $10^6$   | —      |
| 5        | <i>Enterococcus faecium</i> TR 104                           |                     |                       | 3.13              | $10^6$    | —      | —            | $10^6$   | —      |
| 6        | <i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2                            |                     |                       | 0.05              | —         | —      | —            | $10^5$   | $10^5$ |
| 7        | <i>Escherichia coli</i> TR 105                               |                     |                       | 0.1               | —         | —      | —            | —        | —      |
| 8        | <i>Citrobacter freundii</i> TR 106                           |                     |                       | >100              | $10^6$    | $10^6$ | —            | $10^6$   | $10^6$ |
| 9        | <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> TR 107 |                     |                       | 0.1               | —         | —      | —            | $10^4$   | $10^4$ |
| 10       | <i>Enterobacter aerogenes</i> TR 108                         |                     |                       | 0.05              | —         | —      | —            | $10^6$   | $10^6$ |
| 11       | <i>Enterobacter cloacae</i> TR 109                           |                     |                       | 25                | $10^6$    | $10^6$ | —            | $10^6$   | $10^6$ |
| 12       | <i>Serratia marcescens</i> TR 110                            |                     |                       | 12.5              | $10^6$    | $10^6$ | $10^4$       | $10^6$   | $10^6$ |
| 13       | <i>Proteus vulgaris</i> TR 111                               |                     |                       | $\leq 0.025$      | —         | —      | —            | $10^5$   | —      |
| 14       | <i>Morganella morganii</i> TR 112                            |                     |                       | $\leq 0.025$      | —         | —      | —            | $10^6$   | $10^6$ |
| 15       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TR 113                         |                     |                       | >100              | $10^6$    | $10^6$ | —            | $10^6$   | $10^6$ |
| 16       | <i>Acinetobacter baumannii</i> TR 114                        |                     |                       | 0.2               | —         | —      | —            | $10^4$   | $10^3$ |
| 17       | <i>Acinetobacter lwoffii</i> TR 115                          |                     |                       | 0.05              | $10^3$    | $10^4$ | —            | $10^6$   | $10^5$ |
| 18       | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TR 116                   |                     |                       | 0.1               | $10^5$    | $10^5$ | —            | $10^6$   | $10^4$ |

CLED: cystine-lactose-electrolyte-deficient agar, MAC: Mac Conkey's agar, Enterococcus: Enterococcus agar

MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*

ルト E と使用方法が大きく異なる dip-slide が登場していなかったことにより、1980 年代前半まではウリカルト、1980 年代後半以降においてはウリカルト E を使用していた。しかし、そこには課題も残されていた。ウリカルト E に発育するコロニー数の上限は  $10^8$  CFU/ml であることはすでに記述したが、発育した複数菌各々の分別定量が不可能な場合も多い。さらに時として、薬剤投与終了後の翌日採尿例においては、ウリカルト E にはコロニーが形成されていないものの、それを送付した担当医の施設での定量培養では  $\geq 10^3$  CFU/ml の生菌が検出されていたという事例にも遭遇した。さらにその後においては、血中半減期の長い抗菌性物質が続々と開発されるようになり<sup>4-6)</sup>、我々にはそれらへの対応が切実な問題となった。しかし、これらの課題は dip-slide では生じていても、標準エーゼ法などでは解決し得る問題点である。我々が使用している標準エーゼは内径が 1.5 mm、そこで採取する尿量は約 0.01 ml でウリカルト E に接種する尿量の約 1/20 である。そして、エーゼの画線方法を工夫すれば、複数菌各々のシングルコロニーの区別は可能であり、含有する薬剤の影響もウリカルト E に比較すればはるかに少ない。これにより、上述した事項は dip-slide 特有の問題点といえよう。

上記の理由から我々は、1993 年以降に登場したダイアスライド<sup>7)</sup>に注目した。すでに記述したようにダイアスライドに接種する尿量はウリカルト E の約 1/100 であるが、我々の別報においては<sup>7)</sup>、単独菌を対象とした場合にはウリカルト E とダイアスライドの有用性はほぼ同等であり、複数菌の分別定量および抗菌性物質含有 broth を用いた結果においては、ウリカルト E に比較してダイアスライドの有用性が高いことが示唆された。しかし、別報における抗菌性物質存在下の試験は broth 菌液であり、対象株数は 10 株、薬剤数は 3 薬剤と少なかった。そこで実施したのが今回の検討である。今回の検討においてはヒト尿を使用し、対象株は 18 株、抗菌性物質は主として経口の 8 剤とした。

今回の結果は、各々の薬剤の MIC 値  $\leq 6.25 \mu$ g/ml を示す株を感性株、 $\geq 12.5 \mu$ g/ml を示す株を耐性株として試みに集計してみた。これによるとウリカルト E とダイアスライドの双方に発育した株数は耐性株においてはすべての薬剤で有意差が認められず、耐性域における break point と相関しており、感性株においてもニューキノロン系 (NQs) 2 薬剤においては break point とほぼ相関していた。しかし、 $\beta$ -ラクタム系 ( $\beta$ -lactams) 6 薬剤では感性株とした株もウリカルト E とダイアスライドの双方に発育した株が認められた。これ

ら感性株における相違は NQs と  $\beta$ -lactams の作用機作の違い、 $\beta$ -lactams においては菌液中の  $\beta$ -ラクタマーゼの影響も考えられるが、*in vitro* での break point の設定、なかでも  $\beta$ -lactams においては困難を伴うものと思われた。しかし、上記の結果においてはウリカルト E に比較して感性株の大部分がダイアスライドには有意差をもって発育していた。これらの要因は前述した検体尿量の違いによるものと考えられる。上記により、抗菌性物質含有尿を dip-slide で培養した際には、そこで接種された尿量の差異が培養結果に反映することが示唆された。

なお、今回の検討においては各々の薬剤 50  $\mu$ g/ml と 5  $\mu$ g/ml 含有菌液は 5 $^{\circ}$ C 2 時間放置としたが、ダイアスライドに発育した NQs 存在下における供試株の多くの菌数は減少していた。これらの株は 5 $^{\circ}$ C の放置時間をさらに延長すればダイアスライドにも発育しないことも考えられることから、こうした実験系には経時的な項目も加えることが必要と思われた。そして、実際診療においては上部および下部尿路感染症や pH の違い、抗菌性物質の組織および尿中濃度の違い、さらに、抗菌性物質による治療は一定期間内の反復投与により細菌との接触時間は長時間持続するなどの違いがあり、今回の結果から、ウリカルト E とダイアスライドの有用性の差に立ち入ることは不可能と考えられた。しかし、我々が示した結果からは、抗菌性物質含有（残存）尿を対象とした dip-slide の使用においては、接種される尿量の違いにより「偽陰性」が生じる可能性があり、これらは UTI 薬効評価基準における細菌学的効果や再発判定などに影響することが危惧される。

以上により、臨床の分野も含めた dip-slide の利用方法に関する今日的検討を期待したい。

本論文は、第 44 回日本化学療法学会総会において編集委員会に投稿するよう推薦を受けたものである。

#### 文 献

- 1) Mackey, J P, Saudys G H: Laboratory diagnosis by infection of the urinary-tract in general practice by mens of a dip inoculum transport medium. Brit. Med. J. 2: 1286~1291, 1966
- 2) 出口浩一: 尿の細菌学的検査の簡易化に関する検討 (第 1 報)。一特に定量培養の簡易化について一。Pure Chemicalis "DAIICHI" 4: 73~78, 1973
- 3) UTI 研究会 (代表 大越正秋): UTI 薬効評価基準 (第 3 報)。Chemotherapy 34: 408~441, 1986
- 4) 齊藤 玲, 富沢磨須美, 中山一郎, 他: Sparfloxacin (DPFX) の基礎的, 臨床的検討。Chemotherapy 39 (Suppl. 4) : 203~212, 1991
- 5) 酒井克治: 合成抗菌剤, ピリドンカルボン酸系合成抗菌剤一Ⅲ。最新抗生剤要覧 第 8 版。P.175~180, 薬業時報社, 1992
- 6) Peeters M, Piot, P: *In vitro* activity of Ro15-8074, a new oral cephalosporin. J. Antimicrob. Chemother. 16: 469~473, 1985
- 7) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 他: 尿中細菌検索用 Dip-slide に関する検討。第 1 報。抗菌性物質の存在により生じる偽陰性の問題点。Jap. J. Antibiotics 48: 155~162, 1995
- 8) 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。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 9) 出口浩一: 特集 細菌検査の簡易化・自動化。簡易化編, ウロチューブ。Medical Technology 7: 227~230, 1979
- 10) 出口浩一: 全国規模で 1979 年 6 月から 1980 年 2 月までに分離した急性・単純性膀胱炎患者からの検出菌分布と薬剤感受性の検討。Chemotherapy 30: 301~307, 1982
- 11) 大森弘之, 公文裕己, 熊澤浄一, 他: 複雑性尿路感染症に対する FC/TA-891 の臨床用量の検討。第 42 回日本化学療法学会総会, 誌上発表抄録, P.90, 1994



## Study of the dip-slides for bacteria detection in urine

—Possible problems caused by difference in quantity of urine inoculated—

Yumiko Suzuki, Rika Ishihara, Yukiko Ishii,  
Arisa Nakazawa and Koichi Deguchi

Section of Studies, Tokyo Clinical Research Center, 14-4 Senjunaka-cho, Adachi, Tokyo, Japan

Using “antibiotic-spiked urine specimens”, in which each of 6 kinds of  $\beta$ -lactams and 2 kinds of new-quinolones (NQs) antibiotics are added to bacterial culture media inoculated with 18 of strains bacteria including 16 species derived from urinary tract infection specimens, the growth performance of 2 different types of dip-slide, URICULT E<sup>®</sup> and DIASLIDE<sup>®</sup> is studied. Any strain which had on MIC value of  $\leq 6.25 \mu\text{g/ml}$  was regarded as a susceptible strain and any strain which had value of  $\leq 12.5 \mu\text{g/ml}$  was regarded as a resistant strains.

〈Result〉

DIASLIDE<sup>®</sup> showed better growth performance than URICULT E<sup>®</sup> for the most of the strains susceptible to the 8 kinds of antibiotics ( $P < 0.01$ ) while both dip-slides showed the same growth performance by the strains resistant to those antibiotics.

〈Comment〉

The discrepancy in results with the susceptible strain is due to the difference in quantity of the specimen inoculated into each dip-slide. Quantity the inoculated into DIASLIDE<sup>®</sup> is approximately 1/100 as much as that used for on URICULT E<sup>®</sup>. As the inhibitory effect of antibiotics depends on the total quantity of the specimen inoculated into the dip-slide, DIASLIDE<sup>®</sup> can avoid escape the false-negative problem even though the urine specimen includes any of the antibiotics.