

【原著・基礎】

操作法を簡略化した薬剤感受性キットの開発

井上 美晴¹⁾・岩田 守弘²⁾・檜谷 総子²⁾・山口 恵三¹⁾¹⁾ 東邦大学医学部微生物学教室*²⁾ 東邦大学大森病院中央検査部I部微生物

(平成9年11月20日受付・平成10年4月14日受理)

薬剤感受性試験マイクロプレートのウェルへの分注操作を簡略化したキットの開発を試みた。考案したキットは、上面より被験培養液（菌液）を注入すると余剰液がキット下部にセットした吸水体により吸水され、ウェルにのみ被験培養液（菌液）が定量的に保持される構造となっている。キット試作品を用いて余剰液の吸水時間、ウェルの定量性などの物理的基本性能を検討した結果、良好な成績が得られた。本法は、各薬剤を含むウェルへの被験培養液（菌液）の分注操作を簡略化させることで分注器（ディスプレイペンサー）あるいは菌液トレーなどが不要となることを特徴としており、このことにより導入時のイニシャルコストの低減、および減菌を必要とする廃棄物などの減少が可能となる。本キットを用いて121菌株、15薬剤の菌発育阻止濃度（MIC）について用手法と比較したところ、相関係数0.9938～0.9950と非常に高い相関を示し、薬剤感受性試験への応用が十分可能であると判断された。

Key words: 新規開発キット、基礎性能、MIC、相関性、薬剤感受性試験

近年の薬剤感受性試験は、ペニシリン耐性肺炎球菌、バンコマイシン耐性腸球菌などを代表とする耐性菌の増加¹⁻³⁾、また、それらによる難治性感染症の増加に伴い従来のディスク法によるカテゴリー判定から、菌発育阻止濃度（MIC）の測定へと変遷しつつある。MICの測定は主に微量液体希釈法によって行われており、そのシステムは数社から販売されているがそれぞれに特徴があり⁴⁻⁶⁾、検査室においては病院内の状況に応じて選択しているものと考えられる。しかし、市販のシステムに共通して言える欠点として使用機器自体が非常に高価であること、施設のニーズに応じた薬剤選択がなかなかできないことなどをあげることができる。

本論文では考案した新規開発キットの物理的な基本的性能試験および臨床分離株を用いてMIC測定実験を行い、マイクロプレートによる微量液体希釈法・日本化学療法学会標準法⁷⁾との相関性について比較検討したので報告する。

I. 材料および方法

1. 試験菌株

MICの測定は1996年1月から1997年3月に東邦大学大森病院検査部にて分離同定された *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* および *Pseudomonas aeruginosa* の11菌株、110菌株を対象に行った。

また、標準菌株として *S. aureus* ATCC 29213,

S. pneumoniae ATCC 49619, *E. faecalis* ATCC 29212, *H. influenzae* ATCC 49247, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *S. marcescens* ATCC 8100, *P. mirabilis* ATCC 29245, *C. freundii* ATCC 8090, *E. cloacae* ATCC 13047 および *P. aeruginosa* ATCC 27853 を用いた。

2. 使用薬剤

Ampicillin (ABPC), piperacillin (PIPC), cefazolin (CEZ), cefaclor (CCL), ceftazidime (CAZ), flomoxef (FMOX), imipenem (IPM), aztreonam (AZT), gentamicin (GM), erythromycin (EM), clindamycin (CLDM), minocycline (MINO), chloramphenicol (CP), levofloxacin (LVFX) および vancomycin (VCM) の計15薬剤を用いた。

3. 新規開発キットの構造と物理的性能評価

1) 構造

概要図を Fig. 1 に示したが、ウェル (A) の直径は6 mm、容量50 μ l で各ウェル間のピッチは市販マイクロプレートと同間隔となっている。原理は、上部より流下した被験培養液（菌液）によっていったん開口部 (B) を満たし、その後余分な被験培養液（菌液）は吸水口 (C) より余剰液吸水体 (D) に吸水・保持される。これにより各ウェルには特殊な分注装置を必要とすることなく、また分注操作を行うことなく一定量の液体が保持されることになる。

したがって、各ウェルに薬剤の所望量をコーティン

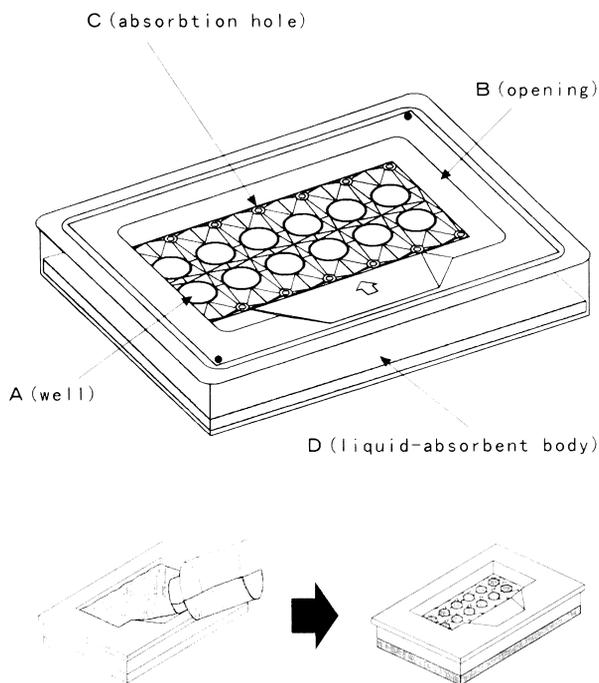


Fig. 1. A schematic of the new kit and broth pouring method.

グシ乾燥させておけば液体培地に菌を懸濁し、これを注入するだけで被験培養液（菌液）の分注、接種が行われることになる。

2) 物理的性能評価

a) ウェルの定量性

各ウェルの液体培地保持量の精度を検査することを目的に、ミューラーヒントンブロス 10 ml をキット上面より流し入れ、ウェルに残った液体をマイクロピペットで全量吸引し、その重量から各ウェルの容量と保持精度を測定した。なお液体培地には流下時に生じる気泡がウェル内に混入し定量精度低下を招くおそれがあるため、少量の界面活性剤を添加した。

b) 余剰液吸水時間の測定

操作性を考慮し、ミューラーヒントンブロス 10 ml をキット上面の注入口より流し入れ、ウェルに所定量が残るまでの余剰液吸水時間を測定した。吸水体には吸水マット（スポンジ）、パルプ不織布およびパルプ不織布+吸水性高分子の3種類を使用した。

c) 薬剤保持力と培地内への溶出性

ウェル内にコーティングされた薬剤は被験培養液（菌液）を注入し余剰液が吸水されるまではウェル内に保持され、被験菌の培養を開始する時点では培地内に溶出させる必要がある。そこで水溶性の色素（青色1号）を用いて以下の検討を行った。色素を 640 $\mu\text{g/ml}$ となるように溶解した溶液に高分子を糊剤として 5% 含有させ、その溶液 10 μl を正確にウェル内に分注し乾燥させた（1 ウェル 50 μl での復元濃度：128 $\mu\text{g/ml}$ ）。

色素を塗布乾燥したキットに精製水 10 ml を流下し余剰液が吸水された時点からのウェル内吸光度（OD 620）をマイクロプレートリーダー（タイトレック社製マルチスキャン MK II）にて経時的に測定した。

また使用薬剤を代表して ABPC、CEZ および CP を同様に分注乾燥したキットについて同様に流下 5 分後のウェル内薬剤力価を HPLC にて測定し、溶出率を算出した。

4. MIC の測定

1) 標準法による MIC 測定

日本化学療法学会標準法に準じた微量液体希釈法（用手法）にて行った。ただしグラム陽性球菌および *H. influenzae* には 1/3 馬溶血液を最終 3%，非働化牛胎児血清を最終 5% 濃度となるように加え、 β -NAD を 50 mg、酵母エキス 3 g を培地 1 l あたり添加した。また、グラム陰性桿菌には酵母エキス 3 g を培地 1 l あたり添加して使用した。

薬剤濃度は緑膿菌用を $\leq 0.125 \sim 128 \mu\text{g/ml}$ の 11 段階とした他は、 $\leq 0.063 \sim 64 \mu\text{g/ml}$ の 11 段階の倍数希釈系列とした。

2) 新規開発キットによる MIC 測定

薬剤原末を糊剤（高分子）とともに適宜溶媒に溶かし、復元濃度で用手法と同一となるよう希釈系列を調整し新規開発キットの各ウェルに 10 μl 充填後、乾燥固化したものを冷所（15 $^{\circ}\text{C}$ 以下）にて保存し 1 か月以内に使用した。

なお、菌株の条件を一定に保ち、使用菌液調整時の誤差を防ぐため Fig. 2 に示した方法に従い接種菌液は標準法と同一の被験菌液を用いて行った。

培養および判定は、標準法および新規開発キットともに 35 $^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養後、肉眼的に菌の発育が認められなくなるもっとも低い薬剤濃度を MIC とした。

II. 実験結果

1. 新規開発キットの物理的性能評価

1) ウェルの定量性

ウェルの容量と精度を Table 1 に示した。50 回の繰り返し（50 キット 600 ウェル）の結果、平均ウェル容量は $49.5 \pm 1.40 \mu\text{l}$ とほぼ設計通りの値を示し、きわめて優れた精度を示した。

2) 余剰液給水時間の測定

吸水体の材質別給水時間を Table 2 に示した。50 回の繰り返しの結果、平均吸水時間は吸水マット（スポンジ）； 42 ± 3.98 秒、パルプ不織布； 23 ± 2.37 秒およびパルプ不織布+吸水性高分子； 13 ± 1.94 秒であった。10 ml の液体をキットに流し入れるのに要する時間は数秒であり、その後できるだけ速やかに余剰液が吸水されることが操作時間の短縮にもつながることから、今回使用した 3 種類の中ではパルプ不織布の繊維内に高

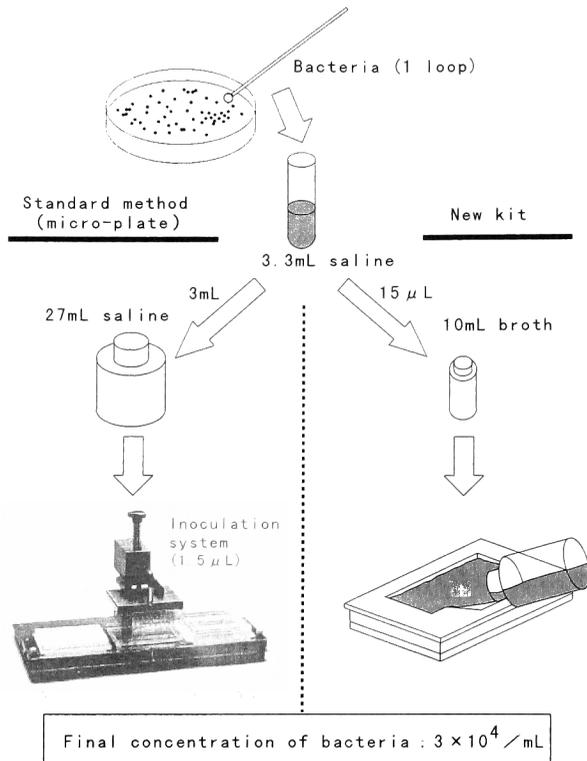


Fig. 2. Inoculation method.

Table 1. Well volume and precision

Average volume (μl)	49.5
Maximum volume (μl)	52.4
Minimum volume (μl)	42.9
SD	1.40

(n: 600 wells)

Table 2. Broth absorption time for each material

	Time	SD
Absorbent sponge	42 sec	3.89
Non-woven pulp cloth	23 sec	2.37
Non-woven pulp cloth + absorbent polymer	13 sec	1.94

分子を配合させたものが適していると考えられた。

3) 薬剤保持力と培地内への溶出性

ウェル内に乾燥塗布した色素の溶出性を Fig. 3 に示した。この結果から色素は余剰液吸水後約 30 秒から溶出し始め、5 分以後は色素のほぼ全量が溶出していると考えられた。

また、ABPC、CEZ および CP の薬剤力価はそれぞれ添加量の 99.8、99.1 および 99.3 % で色素と同様の溶出性を示した。

2. 標準法と新規開発キットの MIC 値の比較

1) 全試験菌株の相関性

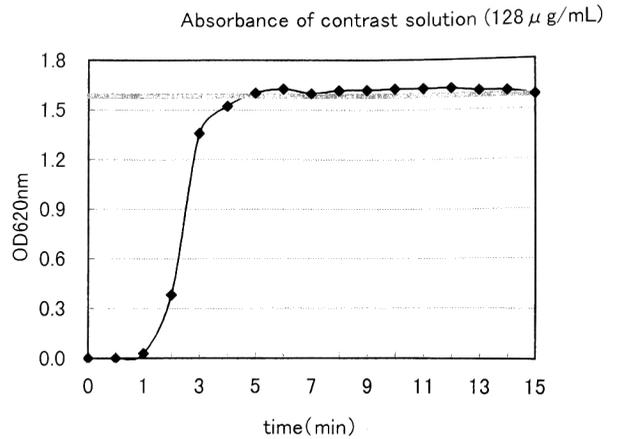


Fig. 3. Dissolution curve of colorant.

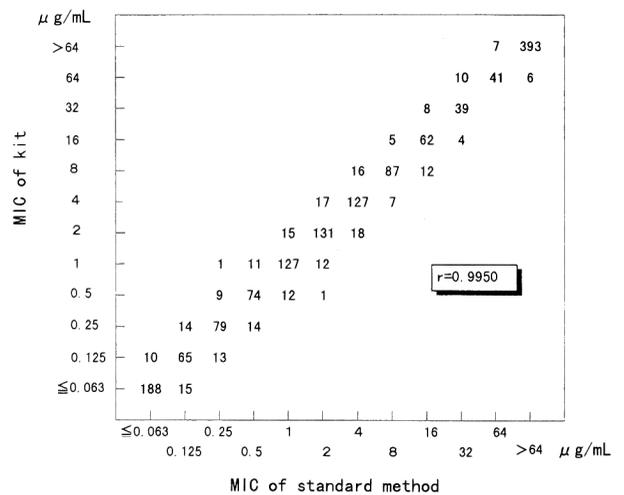


Fig. 4. Correlation between MICs of standard method and new kit (except *Pseudomonas aeruginosa*).

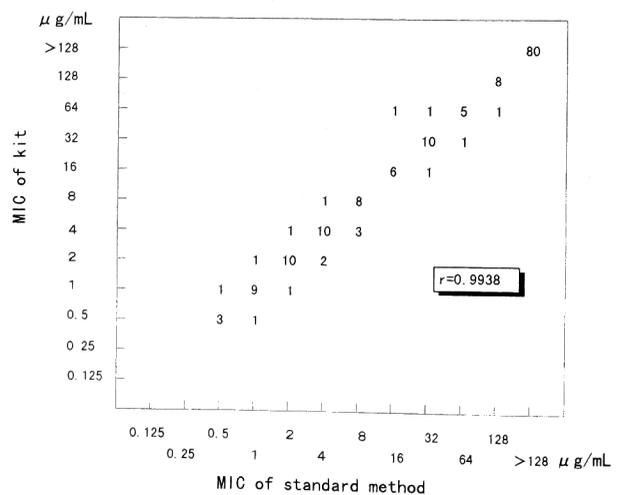


Fig. 5. Correlation between MICs of standard method and new kit (*Pseudomonas aeruginosa*).

用手法による MIC 値と新規キットによる MIC 値の全体の分布および相関性を Figs. 4, 5 に示した。耐性または感性側の偏りはなく、相関係数も緑膿菌以外が

0.9950, 緑膿菌が 0.9938 と高い相関性が認められた。

2) 各菌種別の相関性

各菌種別の MIC 一致率および相関性を Table 3 に示した。各菌種の MIC 完全一致率は 81.8~90.3 %, ± 1 管までを一致とみなした場合は 99.4~100 % ときわめて高い値を示した。また相関係数は 0.9917~0.9958 と高い値を示し, 菌種別に特異な傾向は見られなかった。

3) 薬剤別の相関性

各薬剤別の MIC 一致率を Tables 4, 5 に示した。一致率をもっとも低かったのは緑膿菌以外の菌種, 緑膿菌ともに GM で, それぞれ 83/110 (75.5 %), 6/11 (54.5 %) であったがいずれも ± 1 管以内に収まっていた。

4) 標準菌株の MIC

標準菌株として用いた *S. aureus* ATCC 29213, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. faecalis* ATCC 29212, *H. influenzae* ATCC 49247, *E. coli* ATCC 25922 および *P. aeruginosa* ATCC 27853 の 6 菌株において, NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards: 米国臨床検査標準委員会) で MIC 管理限界値⁸⁾ が設定されている薬剤に対する MIC はいずれも管理限界の範囲内であった。

III. 考 察

日本化学療法学会により微量液体希釈法が標準化されて以来, MIC 測定を導入する施設が増加しその傾向は今後ますます強くなることが予想される。

マイクロプレートを使った試験は多数の薬剤が同時に試験できる点や, 一枚のプレートで多数の試験が行える点が大きな利点と考えられる。しかしコンパクト

な分, ウェルの大きさも小さいため液体の分注には特殊なマイクロピペットや分注器を必要とし, 分注器については価格も高く, ある程度の設置スペースも必要となる。また被験菌の接種器も別途必要となる可能性がある。今回私達はこの被験培養液(菌液)の分注, 接種操作を省略したマイクロプレートに変わる試験用具として上記の形態を考案し, その試作品では液体培地の給水時間, ウェルの定量性も良好で確実に操作時間が短縮できると考えられた。

日本化学療法学会標準法と新規開発キットによる MIC 値は全体的に良好な一致率を示した。MIC 値に 2 管の差があった組み合わせは FMOX と *C. freundii*, IPM と *E. cloacae* および MINO と *P. aeruginosa* の 3 件であったがいずれも 3 管以上の差は認められなかった。GM および IPM は他の薬剤に比べ完全一致率は低かったものの, 前後 1 管差以内での一致率は 99 % 以上と高く, 使用上問題ないレベルにあると考えられた。このように高い一致率が得られたことは, 菌液調整時の誤差を防ぐために同一の被験菌液を使用したこと, また, 新規開発キットが物理的にもマイクロプレートと同等の性能を有しているためであると考えられ, 薬剤感受性試験への応用が十分可能であると判断された。マイクロプレートに比べ多薬剤の MIC 測定への対応は難しいという短所はあるものの, 耐性菌のチェックあるいは特定薬剤の MIC 測定など, 有用性は高いと思われた。

また, 今回保存安定性についてのデータは提示していないが, 一般に不安定といわれているペニシリン系抗菌薬の benzylpenicillin (penicillin G) を用いて検

Table 3. Distribution of MIC differences for all agents against each bacterial species
— Standard method MIC versus the new kit MIC —

	Agreement (%)					Coefficient of correlation
	-2	-1	0	+1	+2	
<i>S. aureus</i>	0.0	10.3	81.8	7.9	0.0	0.9917
<i>S. pneumoniae</i>	0.0	7.9	86.7	5.5	0.0	0.9948
<i>E. faecalis</i>	0.0	6.7	86.1	7.3	0.0	0.9919
<i>H. influenzae</i>	0.0	7.3	86.7	6.1	0.0	0.9944
<i>E. coli</i>	0.0	6.7	87.3	6.1	0.0	0.9953
<i>K. pneumoniae</i>	0.0	7.3	85.5	7.3	0.0	0.9953
<i>S. marcescens</i>	0.0	6.1	86.7	7.3	0.0	0.9949
<i>P. mirabilis</i>	0.0	7.3	87.3	5.5	0.0	0.9958
<i>E. cloacae</i>	0.6	5.5	84.8	9.1	0.0	0.9943
<i>C. freundii</i>	0.0	9.1	83.6	6.7	0.6	0.9928
<i>P. aeruginosa</i>	0.6	3.0	90.3	6.1	0.0	0.9938

- : more resistant, + : more sensitive

Table 4. Distribution of MIC differences for each agent against all strains except for *Pseudomonas aeruginosa*

Standard method MIC versus the new kit MIC—

	Agreement (%)					Coefficient of correlation
	-2	-1	0	+1	+2	
Ampicillin	0.0	7.3	87.3	5.5	0.0	0.9905
Piperacillin	0.0	6.4	89.1	4.5	0.0	0.9919
Cefazolin	0.0	4.5	88.2	7.3	0.0	0.9910
Cefaclor	0.0	8.2	80.0	11.8	0.0	0.9820
Ceftazidime	0.0	10.9	82.7	6.4	0.0	0.9918
Flomoxef	0.0	8.2	80.9	10.0	0.9	0.9915
Imipenem	0.9	7.3	78.2	13.6	0.0	0.9682
Aztreonam	0.0	6.4	85.5	8.2	0.0	0.9961
Gentamicin	0.0	15.5	75.5	9.1	0.0	0.9654
Erythromycin	0.0	8.2	90.0	1.8	0.0	0.9922
Clindamycin	0.0	4.5	94.5	0.9	0.0	0.9983
Minocycline	0.0	8.2	81.8	10.0	0.0	0.9894
Chloramphenicol	0.0	8.2	86.4	5.5	0.0	0.9772
levofloxacin	0.0	4.5	88.2	7.3	0.0	0.9881
Vancomycin	0.0	2.7	96.4	0.9	0.0	0.9985

- : more resistant, + : more sensitive

Table 5. Distribution of MIC differences for each agent against *Pseudomonas aeruginosa*

—Standard method MIC versus the new kit MIC

	Agreement (%)					Coefficient of correlation
	-2	-1	0	+1	+2	
Piperacillin	0.0	0.0	90.9	9.1	0.0	0.9899
Ceftazidime	0.0	9.1	90.9	0.0	0.0	0.9799
Imipenem	0.0	18.2	72.7	9.1	0.0	0.9750
Aztreonam	0.0	0.0	81.8	18.2	0.0	0.9495
Gentamicin	0.0	9.1	54.5	36.4	0.0	0.7230
Erythromycin	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	1.0000
Minocycline	9.1	0.0	90.9	0.0	0.0	0.9278
Chloramphenicol	0.0	0.0	81.8	18.2	0.0	0.9047
levofloxacin	0.0	9.1	90.9	0.0	0.0	0.9888

- : more resistant, + : more sensitive

討したところ、40℃、1か月間（乾燥剤封入アルミ製袋にて保存）で薬剤残存率は95%以上を示した。今後は長期間あるいは多薬剤での詳細な検討が必要であると考えられた。

文 献

- 1) ペニシリン耐性肺炎球菌研究会, 紺野昌俊, 他: 全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究。感染症学雑誌 68: 1338~1350, 1994
- 2) 大野 章, 石井良和, 山口恵 三: 抗菌薬とその耐性化多剤耐性菌の問題点バイコマイシン耐性腸球菌の耐性

- 発現メカニズム。日本臨床 55: 194~200, 1997
- 3) 小栗豊子, 三澤成毅, 猪狩 淳: 各種病原細菌の薬剤感受性の現状と年次推移。化学療法の領域 12: 1207~1220, 1996
 - 4) 小川小夜子, 生方公子: 全自動細菌同定・薬剤感受性検査システム「auto SCAN Walk Away」。臨床と微生物 19: 297~303, 1992
 - 5) 長沢光章: 好気性菌・嫌気性菌薬剤感受性 同定検査システム「セプターシステム」。臨床と微生物 19: 311~318, 1992
 - 6) 岡田 淳, 加悦みわ子, 鈴木孝一, 他: 薬剤感受性検査システム「センシミック」による MIC 測定。臨床と微生物 20: 379~383, 1993
 - 7) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告: I. 微量液体希釈法による MIC 測定法 (日本化学療法学会標準法) の一部修正, II. 栄養要求の厳しい菌種を対象とした培地の調整および感受性測定法, III. 微量液体希釈法による嫌気性菌の MIC 測定法。Chemotherapy 41: 184~189, 1993
 - 8) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—3rd ed.; Approved standard. NCCLS document M7-A3, Villanova, Pa.; NCCLS, 1993

The development of antibiotic susceptibility test kit which was simplified of operation

Yoshiharu Inoue¹⁾, Morihiko Iwata²⁾, Fusako Kashitani²⁾
and Keizo Yamaguchi¹⁾

¹⁾ Department of Microbiology, Toho University, School of Medicine, 5-21-16, Ohmorinishi, Ota-ku, Tokyo 143-8541, Japan

²⁾ Department of Clinical Laboratory, Omori Hospital, Toho University

We have developed a kit which simplifies the dispensing of broth into a well. This kit has the following structure. Thus, a broth is poured over the kit surface, extra broth is absorbed by the liquid-absorbent body placed in the bottom of the kit, and the broth is only maintained in the well quantitatively. A sampler kit yielded good results in basic physical performance in terms of the absorption time for extra broth and the quantity in the well. A characteristic of this method was simplified dispensing of the broth into the well which contains antibiotics. Furthermore, the tray into which the bacterial liquid is poured and broth dispenser are unnecessary, raising the possibility of reducing the initial cost and decreasing rejection which is necessary for sterilization. We compared the MIC of the standard method with the MIC of the kit for about 121 strains and 15 antibiotics. Our kit was very cost-effective, showing a coefficient of correlation of 0.9938~0.9950 in comparison with a standard method. This suggests that the kit is applicable to antibiotic susceptibility testing.