

微量液体希釈法によるサルモネラ菌, 赤痢菌, 下痢原性大腸菌の薬剤感受性測定について

岸田 一則, 山口マリ子, 高木 謙二
小岩井健司, 内村真佐子, 鶴岡 佳久

Antimicrobial Susceptibility Tests by Microdilution Method for *Salmonella*, *Shigella* and Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains.

Kazunori KISHIDA, Mariko YAMAGUCHI, Kenji TAKAGI
Kenji KOIWAI, Masako UCHIMURA, and Yoshihisa TSURUOKA

I はじめに

近年, 薬剤感受性検査において微量液体希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) の測定が普及し, 市販の製品も多数開発されるようになり, 1989年には日本化学療法学会標準法¹⁾も設定された。本法はマイクロプレートを用いるため場所を取らずに多種の薬剤を検査できること, 薬剤や培地が少量で済むこと, またプレートの冷凍保存が可能であることなどの利点¹⁾を持つ。われわれは, 病原細菌のMICを寒天平板希釈法で測定し, 疫学調査や化学療法の参考にしてきたが, 微量液体希釈法による成績を検討する機会も増加することが予想される。今回は本法の特徴を探るため, サルモネラ菌, 赤痢菌, 下痢原性大腸菌のMICを測定し, 寒天平板希釈法による成績と比較検討した。

II 方法

1) 菌株 1990年から1991年に, 県内の患者及び保菌者から分離されたサルモネラ菌64株, 赤痢菌33株, 下痢原性大腸菌31株を被験菌とした。

2) 薬剤 テトラサイクリン (TC), アンピシリン (ABPC) クロラムフェニコール (CP), カナマイシン (KM), ナリジクス酸 (NA), セファロリジン (CER) を使用した。

3) 感受性測定培地 微量液体希釈法はMueller-Hinton broth (BBL) にCaイオン50mg/l, Mgイオン25mg/lとなるように添加して使用した。寒天平板希釈法はMueller-Hinton agar (BBL) を使用した。

4) 薬剤感受性測定方法 化学療法学会標準法による微量液体希釈法¹⁾と寒天平板希釈法²⁾を用いて, 被検菌株の各抗菌薬に対するMICを測定し, ディスク拡散法によって結果の確認を行った。培地の各抗菌薬希釈系列は微量液体希釈法128, 64, 32, 16, 8, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 寒天平板希釈法100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調整した。そのうち30株については市販の製品を併用してTC, ABPC, CP, NAに対するMICを測定した。

5) 菌液濃度別MIC測定 各薬剤に対し8~64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のMICを示す菌株, その範囲にない場合は128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の菌株を選択し, その培養菌液の2倍希釈液を5段階作製して, それぞれのMICを微量液体希釈法で測定した。4倍希釈液が標準法に定められた菌液 (10⁷個/ml) と同一濃度となるように調整した。

6) MICの比較 微量液体希釈法と寒天平板希釈法では感受性測定用培地の抗菌薬希釈系列が違うので得られるMICの数値は同じにならない。それぞれのMICの一致率を検討するために両方法で同じ抗菌薬希釈系列で測定した。

III 結果

1) 薬剤感受性成績 測定したMICによる菌分布状況 (表1) (表2) はMICの高い菌株と低い菌株で, 菌の分布に片寄りが認められた。感受性を判定するため, 低いMICの菌分布が終わる1段階上の濃度を耐性限界値 (微量液体希釈法は各薬剤に対し32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で大腸菌のCER耐性のみ64 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 寒天平板希釈法は25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) として耐性菌を選択した。耐性菌検出状況 (表3) は寒天平板希釈法と比較すると大腸菌1株がCERに対する感受性が一致しなかったが, 他は全ての成績が一致した。

表1 微量液体希釈法で測定したサルモネラ菌，赤痢菌，下痢原性大腸菌のMIC別菌分布

検査菌株数	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 別菌株数							
	>128	128	64	32	16	8	≤ 4	
サルモネラ菌 64株	TC	5	5				6	48
	ABPC	5						59
	CP	2	1				26	35
	KM	5	2			2	7	48
	NA						21	43
	CER	1		1	1	1		60
赤痢菌 33株	TC	15	14					4
	ABPC	10					3	20
	CP	3	7			1	8	14
	KM					5	3	25
	NA	2						31
	CER		2				3	28
下痢原性大腸菌 31株	TC	8	3			1	3	16
	ABPC	6				1	15	9
	CP	4				4	21	2
	KM	2			1	7	9	12
	NA	1						30
	CER		1		4	4	11	11

表2 寒天平板希釈法で測定したサルモネラ菌，赤痢菌，下痢原性大腸菌のMIC別菌分布

検査菌株数	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 別菌株数							
	>100	100	50	25	12.5	6.25	≤ 3.13	
サルモネラ菌 64株	TC	6	4				54	
	ABPC	4	1				59	
	CP	2	1			2	44	15
	KM	7				17	22	18
	NA						31	33
	CER	1	1	2			6	54
赤痢菌 33株	TC	25	4				4	
	ABPC	6	4				23	
	CP	5	1	3	1		4	19
	KM				12		18	3
	NA	2						31
	CER			1	1		3	28
下痢原性大腸菌 31株	TC	9	2				1	19
	ABPC	6					6	19
	CP	4				7	18	2
	KM	2			1	4	18	6
	NA	1				1	1	28
	CER				1	5	6	19

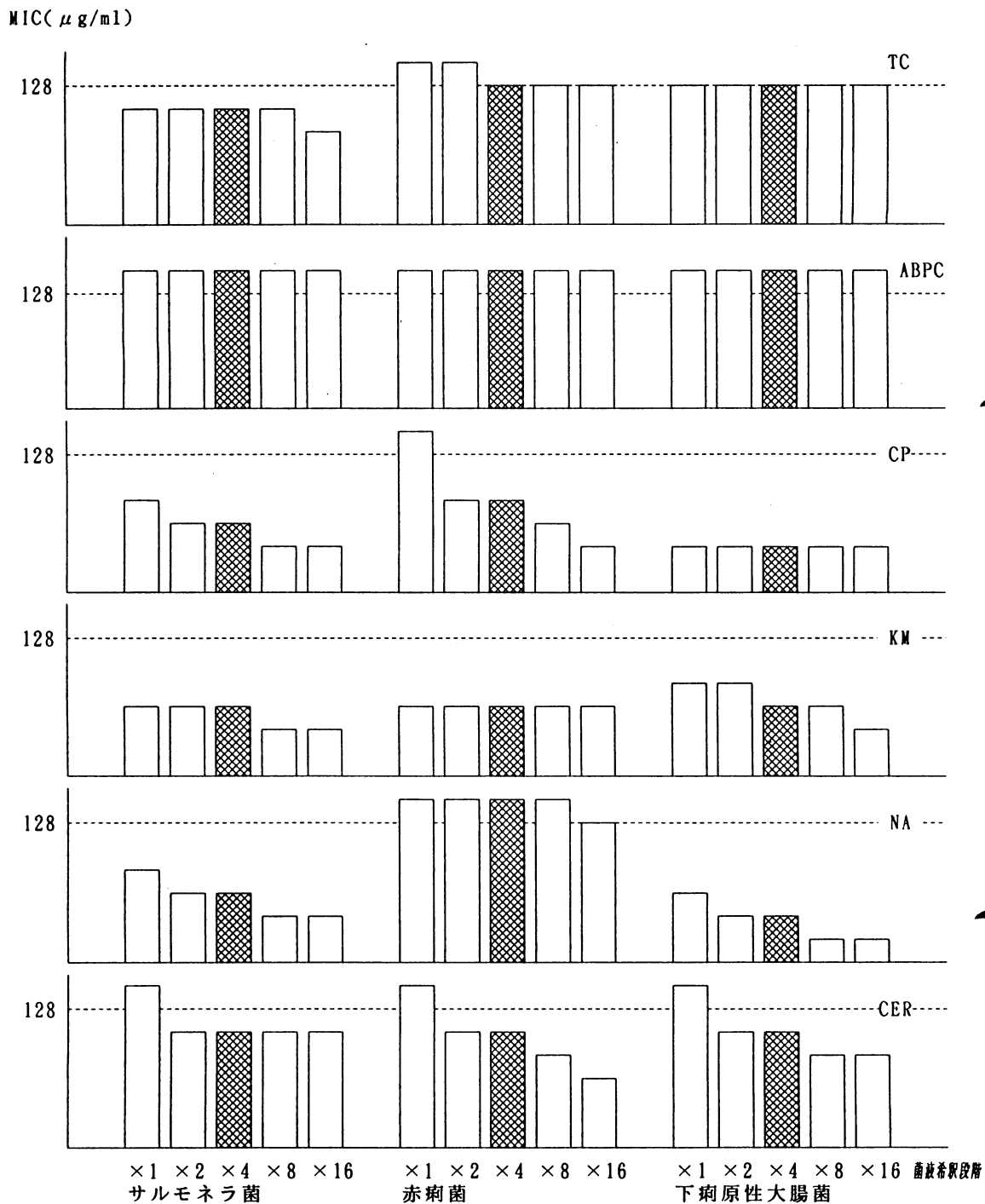


図1 微量液体希釈法で測定したサルモネラ菌, 赤痢菌, 下痢原性大腸菌の各抗菌剤に対する菌液濃度別MIC

表3 微量液体希釈法による耐性菌検出状況

検査菌株数	薬 剤	耐性菌検出状況(%)
サルモネラ菌 64株	TC	10 (15.6)
	ABPC	5 (7.8)
	CP	3 (4.7)
	KM	7 (10.9)
	NA	0 (0)
	CER	4 (6.3)
赤 痢 菌 33株	TC	29 (87.9)
	ABPC	10 (30.3)
	CP	10 (30.3)
	KM	0 (0)
	NA	2 (6.1)
	CER	2 (6.1)
下痢原性大腸菌 31株	TC	11 (35.5)
	ABPC	6 (19.4)
	CP	4 (12.9)
	KM	3 (9.7)
	NA	1 (3.2)
	CER	1 (3.2)

表4 微量液体希釈法と寒天平板希釈法で測定した薬剤別MICの一致率

検査菌株数	MIC一致菌株数(%)					
	TC	ABPC	CP	KM	NA	CER
サルモネラ菌 20	20(100)	20(100)	20(100)	20(100)	20(100)	18(90)
赤 痢 菌 10	10(100)	9(90)	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
下痢原性大腸菌 10	9(90)	10(100)	9(90)	9(90)	10(100)	9(90)
合 計(%) 40	39(97.5)	39(97.5)	39(97.5)	39(97.5)	40(100)	37(92.5)

表5 微量液体希釈法標準法と市販キットで測定したMICの一致率

検査菌株数	MIC一致菌株数(%)			
	TC	ABPC	CP	NA
サルモネラ菌 10	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
赤 痢 菌 10	6(60)	10(100)	9(90)	10(100)
下痢原性大腸菌 10	8(80)	10(100)	9(90)	10(100)
合 計 30	25(83.3)	30(100)	28(93.3)	30(100)

IV 考察

本法によるサルモネラ菌, 赤痢菌, 下痢原性大腸菌の抗菌薬に対する耐性菌検出状況は, 寒天平板希釈法による成績とほぼ同様の傾向を示した。しかしMICは菌種, 薬剤により異なることがあるので, 成績には測定方法を明記する必要がある¹⁾。菌液調整時の誤差がMICに及ぼす影響を, 菌液濃度を変えて検討した。測定条件が大幅に異なることが無ければ影響は小さいと考えられる。しかし操作中の雑菌汚染などのミスのため判定が困難に

2) 菌液濃度別MIC測定 菌液濃度別にMICを測定したところ, 図1に示したように標準となる×4菌液の前後ではMICの変動は±1管以内であった。

3) MICの比較 方法別に測定されたMICの差が±1管以内の場合を一致と判定した。サルモネラ菌20株中18株(90%), 赤痢菌10株中9株(90%), 大腸菌10株中7株(70%)の成績が一致した。薬剤別のMIC一致率(表4)は比較的高いが, 各薬剤, 各菌種で方法によりMICが異なる事が認められた。特に大腸菌はMICの一致しない株が多く認められた。

4) 市販キットの成績 耐性菌の検出状況は, サルモネラ菌10株中TC耐性1株, CP耐性1株, 赤痢菌10株中TC耐性8株, ABPC耐性6株, CP耐性6株, NA耐性2株, 大腸菌10株中TC耐性1株, ABPC耐性4株, CP耐性3株で標準法と成績は100%一致した。しかしMICの一致率(表5)を見ると赤痢菌, 大腸菌は比較的低かった。いずれも標準法のMICより低値であった。

なる事があるので注意が必要である。市販の微量液体希釈法キットは操作が簡便で, 室温保存が可能であるので使いやすいが, MICは標準法と区別する必要がある。微量液体希釈法は, 様々な利点を有するので今後普及が見込まれるが, 本法に限らず感受性検査法は, 測定条件によって影響を受けやすいので, それぞれの測定方法の特性をよく理解した検査が必要と思われる。

V 文献

- 1) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告(1989): 微量液体希釈によるMIC測定法, *Chemotherapy*, 38, 102~107.
- 2) 日本化学療法学会MIC測定法検討委員会報告(1981): 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について, *Chemotherapy*, 29: 76~77.