

Vibrio anguillarum に対するサル ファ剤のMIC測定法の再検討*

照屋 忠 敬

1. 目的及び内容

サルファ剤に対するMICを測定する場合、エンドポイントが明瞭に出現しないため判定がなかなか困難である。そこでサルファ剤に対するMICの測定について二・三の試験を行い、その方法について検討してみた。

MIC測定法は日本化学療法学会（1981）にしたがった。使用菌株は宮崎大学農学部水産衛生学教室保存の魚病由来のVibrio anguillarumを用いた。前培養はすべてミュラー・ヒントン液体培地（Dittco）を用いた。使用薬剤はスルファモノメトキシン（SMM）を使用した。

二・三の試験の結果は接種菌量を 10^5 cells/mlとした方が最も良い結果が得られた。

報告にあたり御指導をいただいた宮崎大学農学部北尾忠利教授に御礼申し上げます。

2. 試験方法

(1) 培地量の差によるMICの比較

ミュラー・ヒントン寒天培地（MHAと略す）を用いて、直径9 cmシャーレに培地量を15ml（培地量13.5ml、薬剤溶液1.5ml）にした場合と20ml（培地量18.0ml、薬剤溶液2.0ml）にした平板を作成し、V. anguillarumを接種量を変えて接種しMICを測定した。

(2) ミュラー・ヒントン寒天培地（MHA）と感性ディスク用培地（SDN）におけるMICの比較

MHAとSDNの両培地を用いてそれぞれ平板希釈系列をつくり、V. anguillarumの接種量を変えてMICを測定した。

(3) 培地中のNaCl濃度によるMICの比較

MHA及びSDNにNaClの無添加と1%、2%及び3%添加した平板を作成し、V. anguillarumを 10^5 cells/ml接種しMICを測定した。

(4) 血液添加培地によるMICの比較

2% NaCl 加MHAに5%馬血液添加と溶血した馬血を10%添加した平板培地及び血液無添加平板培地を作成し、V. anguillarumのMICを測定した。

(5) MHAと変法学研培地とのMICの比較

2% NaCl 加MHAと2% NaCl 加変法学研培地（表-1）のSMMに対するMICの比較を行った。

* 昭和57年日本水産資源保護協会魚病研修B₁コース報告の一部

表-1 変法学研培地の組成
(1ℓ当り)

カザミノ酸	2.0g
ブドウ糖	1.0g
DL-トリプトファン	10mg
チアミン	10mg
ニコチン酸	10mg
リン酸二ナトリウム	2.5g
リン酸二カリウム	0.4g
硫酸マグネシウム	0.1g
NaCl	5.0g
寒天	15g

大島・長崎・館(1962)より変法

(6) 接種菌量の差によるMIC

V. anguillarum のSMMに対する感受性と耐性株を30°Cで振盪培養し、菌数が 10^8 オーダーになるまで培養した。その菌液を滅菌生理食塩水で10倍段階希釈して、 $10^8 \sim 10^2$ cells/ml までの希釈系列をつくり、2% NaCl 加MHAに接種しMICを測定した。

3. 結果

(1) 培養量の差によるMICの結果は表-2に示した。

培地量15mlの場合、 10^5 cells/ml 接種したときのMICは0.2~0.39であり、20mlの場合は 10^5 cells/ml 接種のMICは0.2であった。両者間には大きな差はみられなかった。

(2) MHAとSDNのMICの比較の結果は表-3に示した。

MHAの場合、 10^5 cells/ml接種したときのMICは0.2であり、SDNの場合、同じく 10^5 cells/ml接種のときMICは0.1で両者には大きな差はみられなかった。ただし、日本化学療法学会(1981)ではMHAを基礎とした培地を使用するよう指示している。

表-2 培地量の差によるMICの比較

培地量	スタムNo.	接種量	MIC
15ml	KUK8001	10^9	100以上
		10^7	100以上
		10^5	0.39
	YGS8102	10^9	100以上
		10^7	100以上
		10^5	0.2
	K G8109	10^9	100以上
		10^7	100以上
		10^5	0.39
20ml	KUK8001	10^9	100以上
		10^7	100以上
		10^5	0.2
	YGS8102	10^9	100以上
		10^7	100以上
		10^5	0.2
	K G8109	10^9	100以上
		10^7	100以上
		10^5	0.2

使用株 *V. anguillarum* (KS-type)
使用薬剤 SMM

表-3 MHAとSDNの比較

スタムNo.	接種量	MHA	SDN
KUK8001	10^9	100以上	100以上
	10^7	100以上	100以上
	10^5	0.2	
YGS8102	10^9	100以上	100以上
	10^7	100以上	100以上
	10^5	0.2	
K G8109	10^9	100以上	100以上
	10^7	100以上	100以上
	10^5	0.2	

使用株 *V. anguillarum* (KS-type)
使用薬剤 SMM

表-4 培地に添加法の塩分量の差による
V. anguillarum SMMに対するMIC

NaCl%	スタムNo.	MHA	SDN
無調整	KUS8001	0.1	0.1
	YGS8102	0.1	0.1
	K G8109	0.1	0.1
1.0	KUS8001	0.39	0.39
	YGS8102	0.39	0.2
	K G8109	0.39	0.39
2.0	KUS8001	1.56	1.56
	YGS8102	0.39	1.56
	K G8109	1.56	1.56
3.0	KUS8001	0.78	1.56
	YGS8102	0.2	0.78
	K G8109	0.78	1.56

接種菌量 10^5 cells/ml

表-5 血液添加培地によるMIC

培地	スタムNo	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	0.05	0.025	0
MHA	YMS 8201	(±)	(±)	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
	KMS 8201	(±)	(±)	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
	MZK 8201	(±)	(±)	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
	OTK 8201	(±)	(±)	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
5%血液 (ウマ)添 加MHA	YMS 8201	(±)	(±)	±	+	+	++				
	KMS 8201	(±)	(±)	±	+	+	++				
	MZK 8201	(±)	(±)	±	+	++	++				
	OTK 8201	(±)	(±)	±	+	+	++				
溶血液 10%添加 MHA	YMS 8201	(±)	(±)	±	+	+	++				
	KMS 8201	(±)	(±)	±	+	+	++				
	MZK 8201	(±)	(±)	±	+	++	++				
	OTK 8201	(±)	(±)	±	+	+	++				

使用菌 V. anguillarum
 使用薬 SMM
 使用培地 2% NaCl 加 MHA
 菌接種量 10⁶ cells/ml

ため NaCl 添加培地の方が菌の生育がよく、MIC が高くなったと思われる。

以後のMIC測定はすべて2% NaCl 添加とした。

(4) 血液添加試験の結果は表-5に示した。

5%血液添加培地でも、10%溶血添加培地でも、血液無添加培地のMHAと差はみられなかった。

(5) MHAと変法學研培地とのMICの比較は表-6に示した。

接種菌量を10⁶ cells/mlとしたので、完全に菌の生育が陰性(-)となる所がなく、凝視しなければ判読できない所を(±)として表現し、そのところをもってMICとした。その場合、変法學研培地でのMICは0.39となり、MHAでは3.13であった。しかし、変法學研培地は菌そのものの発育が非常に悪く、そのためMICが低く出現すると思われた。

表-6 MHAと学研培地の比較

V. ang	使用培地	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	0.05	0.025	0
YMK	学研	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	±	±	+	+	+
	MHA	(±)	(±)	(±)	±	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
KMK	学研	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	±	±	+	+	+
	MHA	(±)	(±)	(±)	±	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MZK	学研	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	±	±	+	+	+
	MHA	(±)	(±)	(±)	±	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
OTK	学研	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	±	±	+	+	+
	MHA	(±)	(±)	(±)	±	(±)	+++	+++	+++	+++	+++	+++

接種菌量 10⁶ cells/ml

+++ 発育が良い
 ++ 発育
 + 発育がどうか観れる
 (±) 培地をすかしてみるとどうかぼんやりと観える

(3) NaCl 添加量の差によるMICの比較試験の結果は表-4に示した。

NaCl 無添加の場合よりもNaClを2%添加した培地の方がMICが高い値を示した。これはもともとV. anguillarum が海産由来のため、発育にNaClを要求し、その

又、変法學研培地は、培地の調製の際に塩類の析出がみられた。変法學研培地はサルファ剤のMIC測定用培地として適当であるとは思われない。

(6) 接種菌量を変化させた場合のMIC変動の結果は表-7に示した。

日本化学療法学会(1981)の定めるところでは接種菌量は 10^6 cell/mlと規定されている。しかし、 10^6 cell/mlでは(±)の判定がただらとつづき、エンドポイントの判定が困難である。

接種菌量を 10^5 cells/mlにすると、YMS 8201で3.13のサルファ剤濃度で完全に生育の阻止がみられた。

表-7 SMMに対する菌接種量の差によるMIC

V. ang	接種量	25	125	625	313	156	0.78	0.39	0.2	0.1	0.05	0
YMS 8201	10^8	±	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10^7	±	±	±	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
感受性菌 (KS-type)	10^6	(±)	(±)	(±)	(±)	±	+	+++	+++	+++	+++	+++
	10^5	-	-	-	-	(±)	(±)	±	+	+	+	++
	10^4	-	-	-	-	-	-	(±)	±	±	±	±
	10^3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

使用培地 2% NaCl 加MHA

4. 考 察

V. anguillarum (KS-type)のサルファ剤(SMM)に対するMICについて、二・三の試験を試みた結果、使用培地はMHAかその変法のSDNが良く、変法学研培地には菌の発育が悪く、かつ作成方法にも難点があり、MICの測定培地としては不相当であると考えられた。

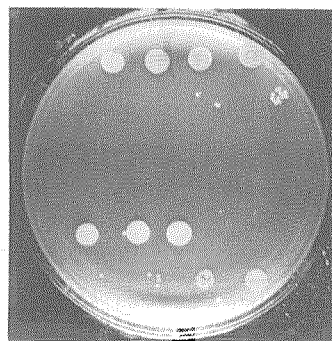
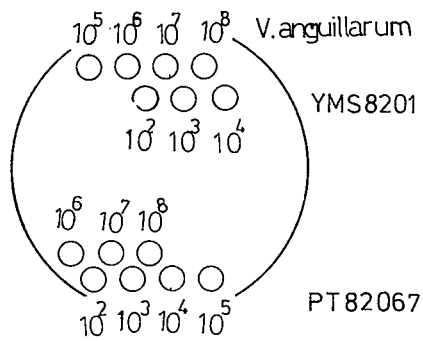
又、MHAに血液を添加してもMICには差はみられなかった。

*V. anguillarum*の接種菌量を日本化学療法学会(1981)の定める 10^6 cells/mlではなく、菌量を 10^5 cells/ml接種にすると完全な阻止濃度がみられた。すなわち、接種量を 10^5 cells/mlとした方が最も良い結果が得られることが判明した。

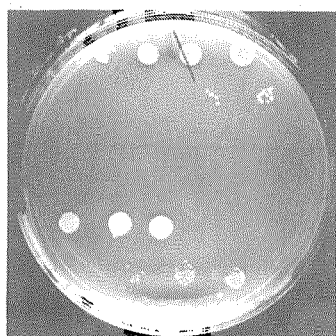
5. 成果の要約

*V. anguillarum*のサルファモノメトキシに対するMICを検討した結果

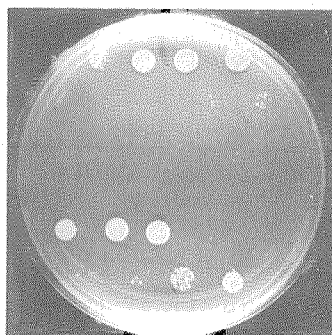
- (1) 培地量15mlと20mlではMICに差はみられなかった。
- (2) MHAとSDNのMICに差はみられなかった。
- (3) NaCl添加によるMICの差は2% NaCl添加の方が良かった。
- (4) 血液添加によるMICの差はみられなかった。
- (5) 変法学研培地では菌の発育が悪くMIC測定には不相当と考えられる。
- (6) 接種菌量を 10^6 cells/mlではなく 10^5 cells/mlとした方が良いと思われる。



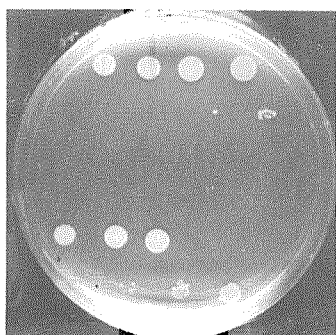
0.1



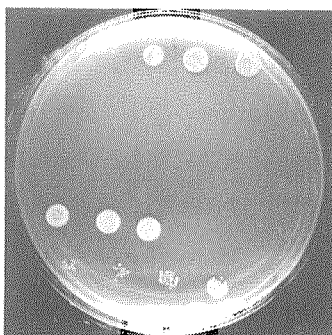
Cont.



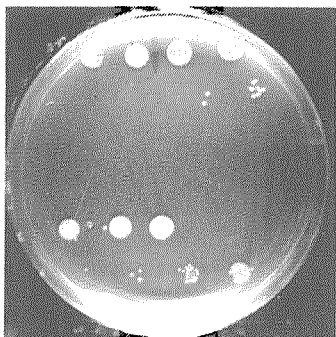
0.2



0.025



0.39

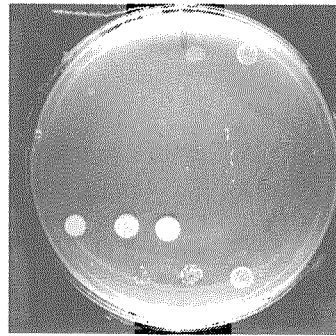
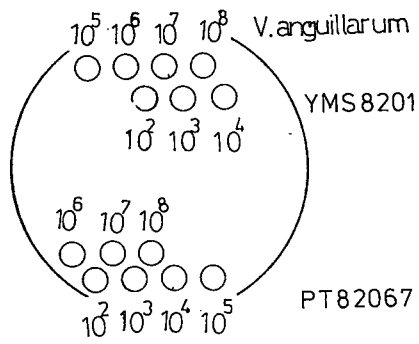


0.05

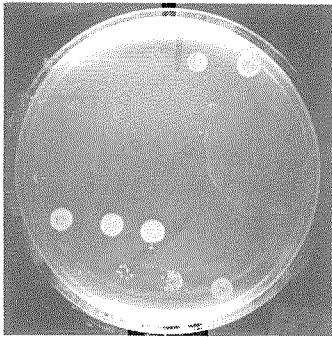


0.78

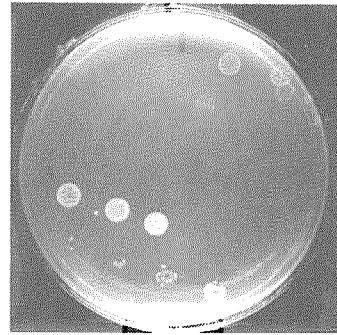
図-1 接種菌量差によるサルファ剤のMIC



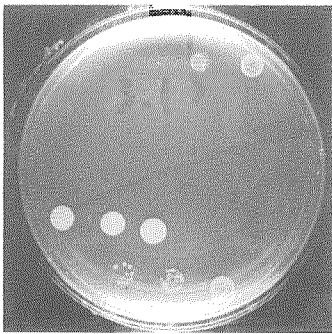
12.5



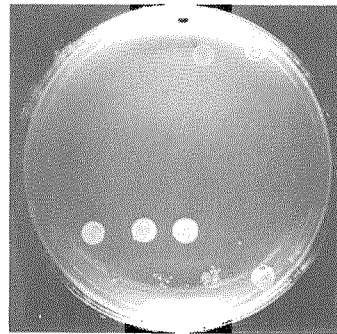
1.56



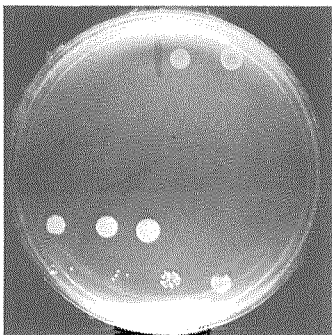
25



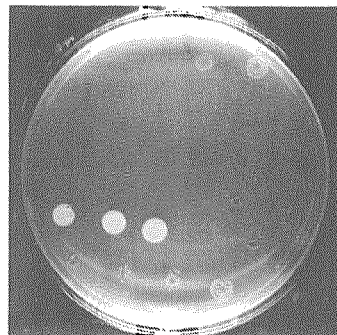
3.13



50



6.25



100

図-2 接種菌量差によるサルファ剤のMIC

文 献

日本化学療法学会（1981）最小発育阻止濃度（MIC）測定法再改訂についてCHEMOTHERAPY Vol.29 No.1 P.76～79

大島・長崎・館（1962）新サルファ剤4-Methoxy-6-Sulfanilamidopyridine（DS-36）に関する基礎的研究(1)日本薬理学会誌Vol.58 No.1

三橋 進 編（1980）薬剤感受性測定法—薬剤耐性菌の理論と実際—講談社 東京

医科学研究所学友会編（1976）細菌学実習提要（改訂5）丸善 東京