

動物由来細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度（MIC）測定法

（動物用抗菌剤研究会 2003 年改定標準法）

今後、動物由来細菌の抗菌性物質（抗生物質および合成抗菌剤）に対する感受性は、ここに示した寒天平板希釈法もしくは微量液体希釈法（動物用抗菌剤研究会 2003 年改定標準法）により測定することを推奨する。この方法は原則として、米国臨床検査標準委員会（NCCLS）により提唱された標準的試験法（2002）[1]に準拠した方法である。現行の動物用抗菌剤研究会標準法[2]による MIC 測定は、動物用抗菌剤研究会 2003 年改定標準法による成績と比較する目的以外では使用しないことが望ましい。

なお、これまでに動物用抗菌剤研究会が報告した豚呼吸器病原菌（*Actinobacillus pleuropneumoniae*、*Pasteurella multocida*、*Mycoplasma hyopneumoniae*）、牛呼吸器病原菌（*Pasteurella multocida*、*Mannheimia haemolytica*、*Mycoplasma* spp.）、豚・牛下痢病原菌（*Escherichia coli*）、牛乳房炎起因菌の薬剤感受性試験法[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]はマイコプラズマの薬剤感受性試験法を除き廃止する。

多くの研究者等による測定 MIC の共有、比較のためには MIC の精度管理が極めて重要となる。今般の改定に当たり、NCCLS 法と同様の精度管理用菌株を内部精度管理を目的として指定し、それらの菌株については、NCCLS が規定している薬剤の MIC の範囲（精度管理限界値）をそのまま記載した。さらに、NCCLS が規定していない薬剤、菌種についても、農林水産省動物医薬品検査所その他で実施された試験データに基づき設定した暫定的な精度管理限界値（参考値）を参考資料 1 および 2 に記載したので、薬剤感受性試験の実施に際しては、精度管理の参考とされたい。なお、外部精度管理も重要であるが、現時点ではその方法や実施機関が未定であることから今回の改定には含めないこととし、将来の課題とした。

参考資料 3 として、現在わが国で実施されている薬剤耐性モニタリング（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System：JVARM）[10]で対象となっている薬剤および菌種を示したので、あわせて薬剤感受性試験の参考にされたい。

1. 寒天平板希釈法

（1）一般細菌（ミューラーヒントン培地に 35、好气的条件で発育する細菌）

以下の項目以外の術式は、米国臨床検査標準委員会（NCCLS）により提唱された標準的試験法[1]に準拠する。

ア．供試材料

（ア）感受性測定用培地：ミューラーヒントン寒天培地（報告書などには製造所を明記する。）

（イ）増殖用培地：トリプチックブロー（報告書などには製造所を明記する。）

（ウ）薬剤原液の希釈用液：滅菌蒸留水または表 1 に示した 0.1M リン酸塩緩衝液（pH6.0 または pH8.0）

イ．薬剤の調製

（ア）薬剤の入手

常用標準品またはその同等品を入手して供試する。なお、動物専用の薬剤については農林水産省動物医薬品検査所で配布しているものもあるので相談願いたい。

（イ）薬剤（標準品粉末）の保存方法

薬剤は、吸湿防止のためにデシケーターに入れ - 20 以下で保存する。使用に際しては、常温に戻してから秤量する。吸湿性のものもあるので、秤量は相対湿度 45% 以下の条件下で行う。

表1 試験薬剤の溶解に使用する溶媒と希釈液

薬 剤	略 号	溶 媒	希 釈 液
ペニシリン系抗生物質			
アモキシシリン	AMPC	緩衝液-1 ¹⁾	緩衝液-1 ¹⁾
アンピシリン	ABPC	緩衝液-2 ²⁾	緩衝液-1 ¹⁾
ペニシリン	PC	蒸留水	蒸留水
セフェム系抗生物質			
セファゾリン	CEZ	緩衝液-1	蒸留水
セフトオフル	CTF	蒸留水	蒸留水
セフロキシム	CXM	緩衝液-1	蒸留水
アミノグリコシド系抗生物質			
アブラマイシン	APM	蒸留水	蒸留水
デストマイシン	DM-A	蒸留水	蒸留水
ジヒドロストレプトマイシン	DSM	蒸留水	蒸留水
ゲンタマイシン	GM	蒸留水	蒸留水
カナマイシン	KM	蒸留水	蒸留水
スペクチノマイシン	SPC	蒸留水	蒸留水
マクロライド系抗生物質			
エリスロマイシン	EM	95%エタノール	蒸留水
ジョサマイシン	JM	95%エタノール	蒸留水
キササマイシン	KT	95%エタノール	蒸留水
スピラマイシン	SP	95%エタノール	蒸留水
タイロシン	TS	95%エタノール	蒸留水
リンコマイシン系抗生物質			
リンコマイシン	LCM	蒸留水	蒸留水
ペプチド系抗生物質			
コリスチン	CL	蒸留水	蒸留水
ノシヘプタイド	NHT	ジメチルホルムアミド	蒸留水
バンコマイシン	VCM	蒸留水	蒸留水
バージニアマイシン	VGM	少量のメタノール + 蒸留水	蒸留水
ポリエーテル系抗生物質			
サリノマイシン	SLM	メタノール	蒸留水
テトラサイクリン系抗生物質			
オキシテトラサイクリン	OTC	少量の 0.1N HCl + 蒸留水	蒸留水
その他の抗生物質			
アピラマイシン	AVM	アセトン	蒸留水
バシトラシン	BC	蒸留水	蒸留水
ビコザマイシン	BCM	蒸留水	蒸留水
クロラムフェニコール	CP	95%エタノール	蒸留水
エフロトマイシン	EFM	メタノール	蒸留水
フロルフェニコール	FF	95%エタノール	蒸留水
ホスホマイシン	FOM	蒸留水	蒸留水

ノボピオシン	NB	蒸留水	蒸留水
キノロン系合成抗菌薬			
エンロフロキサシン	ERFX	下記 ³⁾ 参照	蒸留水
ミロキサシン	MLX	下記 ³⁾ 参照	蒸留水
ナリジクス酸	NA	下記 ³⁾ 参照	蒸留水
オキシリン酸	OA	下記 ³⁾ 参照	蒸留水
オフロキサシン	OFLX	下記 ³⁾ 参照	蒸留水
サルファ剤			
スルファジメトキシシン	SDMX	下記 ⁴⁾ 参照	蒸留水
スルファモノメトキシシン	SMMX	下記 ⁴⁾ 参照	蒸留水
その他合成抗菌薬			
フルメキン	FMQ	下記 ³⁾ 参照	蒸留水
オラキンドックス	ODX	ジメチルホルムアミド	蒸留水
チアンフェニコール	TP	95% エタノール	蒸留水
トリメトプリム	TMP	1/10 量 0.05 N HCl + 蒸留水	温かい蒸留水

1) 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH6.0) の調製法

リン酸二水素カリウム (KH₂PO₄) 7.0g, リン酸一水素ナトリウム Na₂HPO₄・12H₂O) 6.0g に蒸留水約 750mL を加え, 1 分間以上煮沸して溶かす。必要があれば, 1N NaOH またはリン酸を用いて pH を 5.9 - 6.1 に調製した後, 更に蒸留水を加えて 1,000mL とする。

2) 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH8.0) の調製法

(1) リン酸一水素カリウム (16.73 g) / リン酸二水素カリウム (0.523 g)

(2) リン酸一水素カリウム (無水) (13.2 g) / リン酸二水素カリウム (0.91 g)

(1) または (2) の処方による。いずれも上記分量をとり, 蒸留水約 750 mL を加えて溶かし, 必要があれば, リン酸を用いて pH を 7.9 - 8.1 に調整した後, 更に蒸留水を加えて 1,000 mL とする。

3) 蒸留水 1/2 容量を加えた後, 1N NaOH を溶解するまで滴下し, 蒸留水でメスアップする。

4) 熱い蒸留水 1/2 容量を加えた後, 2.5N NaOH を溶解するまで滴下し, 蒸留水でメスアップする。

(ウ) 薬剤の溶解

水溶性の薬剤は原則として, 全て滅菌蒸留水を用いて溶解する。ただし, 水に不溶性ないし難溶性の薬剤については, 必要に応じてエタノールや水酸化ナトリウム溶液などの溶媒を用いて, できるだけ少量に溶解した後, 滅菌蒸留水で希釈して薬剤原液を調製する。

薬剤原液は通常, 5,120 µg / mL または µg (力価) / mL の濃度に調製する。

ほとんどの薬剤原液はガラス, ポリエチレン, ポリプロピレンまたはポリスチレン製の滅菌バイアルに入れて, - 70 以下の保存条件で, 約 6 ヶ月間は保存可能である。ただし, 一度溶解したものは, 全てその日のうちに使用しなければならない。

(I) 薬剤濃度の調整法

供試薬剤を秤量後, 表 1 に例示した規定

の溶媒で溶解する。溶解に必要な溶媒の量は下記の計算式により計算する。

$$\text{溶媒量 (mL)} = \text{薬剤の力価 (}\mu\text{g/mg)} \times \text{秤量 (mg)} \div \text{原液の濃度 (}\mu\text{g/mL)}$$

ウ. MIC 測定法の実際

(ア) 薬剤の希釈

表 2 の (1) に例示した方法などにより, 5,120 µg/mL を薬剤原液とした 2 倍段階希

表 2 薬剤の希釈調製法の例

(1) 寒天平板希釈法のための希釈例
マスター希釈

5,120 µg/mL	A 液	
1,280 µg/mL	B 液	A 液 1 容 + 蒸留水 3 容
160 µg/mL	C 液	B 液 1 容 + 蒸留水 7 容
20 µg/mL	D 液	C 液 1 容 + 蒸留水 7 容
2.5 µg/mL	E 液	D 液 1 容 + 蒸留水 7 容

薬剤の溶液

段階	濃度 μg/mL	容量 mL	+ 蒸留水* mL	中間濃度 μg/mL	寒天での 1:10 希釈における 最終濃度 (μg/mL)	log ₂
1	5,120 (A液)	-	-	5,120	512	9
2	5,120 (A液)	1.0	1.0	2,560	256	8
3	5,120 (A液)	1.0	3.0	1,280	128	7
4	1,280 (B液)	1.0	1.0	640	64	6
5	1,280 (B液)	1.0	3.0	320	32	5
6	1,280 (B液)	1.0	7.0	160	16	4
7	160 (C液)	1.0	1.0	80	8	3
8	160 (C液)	1.0	3.0	40	4	2
9	160 (C液)	1.0	7.0	20	2	1
10	20 (D液)	1.0	1.0	10	1	0
11	20 (D液)	1.0	3.0	5	0.5	- 1
12	20 (D液)	1.0	7.0	2.5	0.25	- 2
13	2.5 (E液)	1.0	1.0	1.25	0.125	- 3

* : ABPC の場合は 0.1M リン酸塩緩衝液, pH6.0 を用いる。

(2) 微量液体希釈法のための希釈例
マスター希釈

1,280 μg/mL	A液
160 μg/mL	B液 A液 1容 + 蒸留水 7容
20 μg/mL	C液 B液 1容 + 蒸留水 7容
2.5 μg/mL	D液 C液 1容 + 蒸留水 7容

薬剤の溶液

段階	濃度 μg/mL	容量 mL	+ CAMHB* mL	最終薬剤濃度 μg/mL	log ₂
1	1,280 (A液)	2.0	18.0	128	7
2	1,280 (A液)	1.0	19.0	64	6
3	1,280 (A液)	0.5	19.5	32	5
4	160 (B液)	2.0	18.0	16	4
5	160 (B液)	1.0	19.0	8	3
6	160 (B液)	0.5	19.5	4	2
7	20 (C液)	2.0	18.0	2	1
8	20 (C液)	1.0	19.0	1	0
9	20 (C液)	0.5	19.5	0.5	- 1
10	2.5 (D液)	2.0	18.0	0.25	- 2
11	2.5 (D液)	1.0	19.0	0.12	- 3
12	2.5 (D液)	0.5	19.5	0.06	- 4

*CAMHB : 陽イオン調整ムーラーヒントン液体培地。

積列（3連続以上の希釈を行わない）を
製する。

(イ) 薬剤含有感受性測定用寒天培地の調製

ミュラーヒントン寒天培地を溶解，滅菌して 48 - 50 に保持する。前項で調製した薬剤の各希釈液 1：培地 9 の割合（直径 90mm のシャーレを使用する場合には希釈液 2mL と培地 18mL）で十分に混合し，混合液をシャーレに分注した後に固化させる。最終的な寒天培地の厚さは，約 4mm になければならない。同時に，薬剤無添加の対照平板も作成する。室温で固化させた寒天培地は，使用前に，約 30 分間ふ卵器内で寒天表面を乾燥させ，表面に水滴が付いていないことを確認する。

(ロ) 接種用菌液の調製

寒天平板培地で純粋培養した被検菌株の 3 - 5 コロニーの先端を白金耳で触れ，増殖用培地に接種し，35 で培養後、約 1 - 2 × 10⁸CFU/ml（McFarland 標準液 No.0.5 に相当）となるように濃度を調整する。接種用に直径 1mm の金属製ピン（0.5μL/spot）を使用する場合には，希釈せずにそのまま接種用菌液とする。ただし接種用に直径 3mm の金属製ピン（2μL/spot）を使用する場合には，さらに 10 倍希釈して接種用菌液とする。なお，濃度調整した菌液は，調製後 30 分以内に使用しなければならない。

(ハ) 接種用菌液の平板への接種

前項で調製した接種用菌液を，マイクロプランターなどにとり，これを薬剤含有平板もしくは対照平板に静かにスポットする。接種の順番は最初に対照平板へ接種し，次いで薬剤ごとに最も低濃度の薬剤を含む平板培地から接種を開始し，次第に高濃度の培地に接種していく。雑菌の混入がないことを確かめるために，少なくとも最初と最後に対照平板に接種する。平板表面の菌液が乾いた後，シャーレを反転し，35 で 16 - 20 時間培養し，判定を行う。

(ニ) エンドポイントの決定

原則として，接種菌の薬剤含有培地での発育が完全に阻害された薬剤の最小濃度をエンドポイントと判定し，その値を最小発育阻止濃度（Minimum Inhibitory Concentration：MIC）とする。

単一のコロニーの発育または軽微な発育は無視し，発育阻止とみなす。

(ホ) 精度管理

薬剤感受性試験法の精度と正確性を確保する目的で，*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (JCM 2874)，*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (JCM 7783)，*Escherichia coli* ATCC 25922 (JCM 5491) および *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (JCM 6119) を精度管理用菌株に定め，NCCLS が提示している各菌株に対する薬剤ごとの MIC の精度管理限界値（MIC 範囲）を表 3 に示した。なお，NCCLS が規定していない薬剤については，下記に示す NCCLS ガイドラインに記載されているその基本的な考え方に準拠し，薬剤ごとに精度管理限界値を各試験施設が独自に規定しなければならない。更に詳細な精度管理の手法については，NCCLS ガイドラインを参照されたい。試行的に本稿では，NCCLS が規定していない薬剤についても，農林水産省動物医薬品検査所で実施された試験成績に基づき暫定的に設定した精度管理限界値（参考値）を参考資料 1 に示した。

a. NCCLS の精度管理限界値設定における基本的考え方

- ・3 ロットのミュラーヒントン寒天培地を用い，複数の試験施設で上記の精度管理用菌株について実施した少なくとも 7 回の試験で得られた成績に基づき，NCCLS 小委員会が一定のルールに従って精度管理限界値を設定する。
- ・理想的には設定する MIC 範囲は，少なくとも 95% 信頼限界を含むことが望ま

表3 NCCLSが規定する薬剤におけるMIC(μg/mL)の精度管理限界値

(1) 一般細菌の精度管理限界値

薬剤 精度管理用菌株		ABPC	CEZ	CTF	APM	GM	KM	EM	TS	VCM	CP	NA	ERFX	TMP
		<i>S. aureus</i>	ATCC29231	0.5-2	0.25-1	0.25-1	2-8	0.12-1	1-4	0.25-1	0.5-2	2-8	-	0.03-0.12
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	0.5-2	-	-	-	4-16	16-64	1-4	1-4	4-16	-	0.12-1	1	0.5-4
<i>E. coli</i>	ATCC25922	2-8	1-4	0.25-1	2-16	0.25-1	1-4	-	-	2-8	1-4	0.008-0.03	0.5-2	>32
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	-	-	16-64	2-16	0.5-2	-	-	-	-	-	1-4	>64	>32

(2) *Campylobacter* spp.の精度管理限界値

薬剤 精度管理用菌株		EM	GM	NA	CPFX	DOXY	TC
		<i>C. jejuni</i>	ATCC33560	1-8	0.5-4	8-32	0.12-1

(3) 微量液体希釈法による *Actinobacillus pleuropneumoniae* および *Haemophilus somnus* の精度管理限界値

薬剤 精度管理用菌株		CTF	ERFX	FF	GM	PCG	TC	TML	TMS	TMP-SMX (1/19)
		<i>A. pleuropneumoniae</i>	ATCC27090	0.004-0.015	0.015-0.06	0.25-1	8-32	0.12-1	0.25-2	8-32
<i>H. somnus</i>	ATCC700025	0.0005-0.004	0.015-0.06	0.12-0.5	8-32	0.015-0.06	0.12-1	-	2-16	0.03-0.125

薬剤の略号は動物用抗菌剤研究会報最新号の動物用抗生物質・合成抗菌剤略語表を参照。

しい。

- ・精度管理限界値は3管以内での設定が望ましいが、実際には4管以内の設定が必要となる場合もある。

b. 精度管理用菌株の入手法

理化学研究所(JCM 菌株番号)およびATCCの規程上,他機関へ当該菌株を再分与することは禁じられている。従って,薬剤感受性試験を実施する場合には,各機関は理化学研究所あるいはATCC(国内代理店を通じて)から直接,精度管理用菌株を購入されたい。

c. 精度管理用菌株の保存

各精度管理用菌株は安定剤中で-60以下または凍結乾燥状態で保存する。保存菌株は寒天平板培地で2回継代培養した後使用する。

(2) 特殊細菌(特殊な発育条件を必要とする細菌)

以下の項目以外は,1.寒天平板希釈法,(1)

一般細菌の試験法に準拠して実施することとする。

ア. *Actinobacillus pleuropneumoniae* および *Haemophilus somnus*

(ア)感受性測定用培地:チョコレート寒天培地(基礎培地はミューラーヒントン寒天培地)。

(イ)MIC判定のための培養温度ならびに時間:35、5-7%CO₂,20-24時間

(ウ)精度管理:精度管理限界値の設定については今後、検討することとする。

イ. *Campylobacter* spp.

(ア)感受性測定用培地:5%の割合に羊脱線維素血液を添加したミューラーヒントン寒天培地(報告書などには製造所を明記する。)

(イ)菌浮遊用液:ミューラーヒントン液体培地(報告書などには製造所を明記する。),滅菌蒸留水または生理食塩液

(ウ)薬剤含有感受性測定用寒天培地の調製:ミューラーヒントン寒天培地を溶解,滅菌して48-50に保持する。使用時に5%の割合で羊脱線維素血液を添加し,感受性測定用寒天

培地とする。以降の調製は一般細菌と同様に行う。

(I) 接種用菌液の調製：5%羊脱線維素血液加ミューラーヒントン寒天平板培地で37 48時間または42 24時間、微好気下（10% CO₂、5% O₂、85% N₂）で培養した被検菌株のコロニーをミューラーヒントン液体培地、蒸留水または生理食塩液に直接浮遊させる。その菌液は約 1 - 4 × 10⁸CFU/mL（McFarland 標準液 No.0.5 に相当）となるように濃度調整する。以降の調製方法は一般細菌と同様に行う。

(オ) 接種用菌液の平板への接種：一般細菌の平板への接種法に準拠して接種した後、35 - 37 微好気下（10% CO₂、5% O₂、85% N₂）で培養し、判定を行う。

(カ) 精度管理：薬剤感受性試験法の精度と正確性を確保する目的で、*Campylobacter jejuni* ATCC 33560（本菌種の基準株）を精度管理用菌株に定め、NCCLS が提示している各菌株に対する薬剤ごとの MIC の精度管理限界値を表 3 に示した。

ウ．魚類由来病原細菌

魚類由来病原細菌の薬剤感受性は、以下の項目以外は 1．寒天平板希釈法、(1) 一般細菌の試験法に準拠して実施することとする。なお、精度管理限界値の設定については今後、検討することとするが、参考資料 2 に暫定的に設定した精度管理限界値（参考値）を示した。

(ア) *Aeromonas hydrophila*

a．接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：25 ，24 時間

b．MIC 判定のための培養温度ならびに時間：25 ，24 時間

(イ) *Aeromonas salmonicida*

a．接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：20 ，24 時間

b．MIC 判定のための培養温度ならびに時間：20 ，24 時間

(ウ) 非定型 *Aeromonas salmonicida*

a．接種用菌液調整のための培養温度ならび

に時間：25 ，24 時間

b．MIC 判定のための培養温度ならびに時間：25 ，24 時間

(I) *Edwardsiella tarda*

a．接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：25 - 30 ，24 時間

b．MIC 判定のための培養温度ならびに時間：25 - 30 ，24 時間

(オ) *Flavobacterium columnare* (syn. *Chondrococcus columnaris*)

a．感受性測定用培地：Cytophaga 寒天培地 [0.05% (w/v) tryptone , 0.05% (w/v) yeast extract , 0.05% (w/v) sodium acetate , 0.02% (w/v) beef extract , 1.0% (w/v) agar , pH 7.2 - 7.4 , 滅菌方法：121 ，15 分]

b．増殖用培地：Cytophaga 液体培地（Cytophaga 寒天培地から寒天を除いた培地）

c．接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：20 - 25 ，48 時間

d．MIC 判定のための培養温度ならびに時間：20 - 25 ，48 時間

(カ) *Flavobacterium psychrophilum* (syn. *Cytophaga psychrophila*)

a．感受性測定用培地：Cytophaga 寒天培地もしくは TYE 寒天培地 [0.4% (w/v) tryptone , 0.04% (w/v) yeast extract , 0.05% (w/v) MgSO₄ · 7H₂O , 0.05% (w/v) CaCl₂ · 2H₂O , 1.0% (w/v) agar , pH 7.2 , 滅菌方法：121 ，15 分]

b．増殖用培地：Cytophaga 液体培地もしくは TYE 液体培地（TYE 寒天培地から寒天を除いた培地）

c．接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：15 - 20 ，96 時間

d．MIC 判定のための培養温度ならびに時間：15 - 20 ，96 時間

(キ) *Flavobacterium branchiophilum*

a．感受性測定用培地：Cytophaga 寒天培地

b．増殖用培地：Cytophaga 液体培地

- c. 接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：15 - 20 , 96 時間
- d. MIC 判定のための培養温度ならびに時間：15 - 20 , 96 時間
- (ク) *Lactococcus garvieae*
- a. 接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：25 , 24 時間
- b. MIC 判定のための培養温度ならびに時間：25 , 24 時間
- (ケ) *Mycobacterium* sp .
- a. 感受性測定用培地：Middlebrook ADH enrichment 添加 Middlebrook 7H11 寒天培地
- b. 増殖用培地：Middlebrook ADH enrichment 添加 Middlebrook 7H11 液体培地
- c. 接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：25 , 144 時間
- d. MIC 判定のための培養温度ならびに時間：25 , 144 時間
- (コ) *Nocardia seriolae*
- a. 感受性測定用培地：Middlebrook ADH enrichment 添加 Middlebrook 7H11 寒天培地
- b. 増殖用培地：Middlebrook ADH enrichment 添加 Middlebrook 7H11 液体培地
- c. 接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：25 , 96 時間
- d. MIC 判定のための培養温度ならびに時間：25 , 96 時間
- (カ) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Pasteurella piscicida*)
- a. 感受性測定用培地：2% NaCl - ミューラー-ヒントソ寒天培地
- b. 増殖用培地：2% NaCl - ミューラーヒントソ液体培地
- c. 接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：25 - 30 , 24 - 48 時間
- d. MIC 判定のための培養温度ならびに時間：25 - 30 , 24 - 48 時間
- (キ) *Pseudomonas* spp. (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. plecoglossicida*, *P. anguilliseptica*)
- a. 接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：25 , 24 時間
- b. MIC 判定のための培養温度ならびに時間：25 , 24 時間
- (ク) *Renibacterium salmoninarum*
- a. 感受性測定用培地：KDM-2 寒天培地 [0.05% (w/v) yeast extract , 0.1% (w/v) L-cystein-HCl, 1.0% (w/v) tryptone , 20% (v/v) bovine serum , 1.5% (w/v) agar , pH7.2 , 滅菌方法：121 , 15 分]
- b. 増殖用培地：KDM-2 液体培地
- c. 接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：18 , 24 時間
- d. MIC 判定のための培養温度ならびに時間：18 , 24 時間
- (ケ) *Streptococcus iniae*
- a. 接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：25 , 24 時間
- b. MIC 判定のための培養温度ならびに時間：25 , 24 時間
- (コ) *Tenacibaculum maritimum* (syn. *Flexibacter maritimus*)
- a. 感受性測定用培地：30%以上の海水を用いて作製した Cytophaga 寒天培地もしくは TCY 寒天培地 [0.1% (w/v) tryptone , 0.1% (w/v) casamino acids , 0.02% (w/v) yeast extract , 3.13% (w/v) NaCl , 0.07% (w/v) KCl , 1.08% (w/v) MgCl₂ · 6H₂O , 0.1% (w/v) CaCl₂ · 2 H₂O , 1.0% (w/v) agar , pH 7.2 , 滅菌方法：121 , 15 分]
- b. 増殖用培地：30%以上の海水を用いて作製した Cytophaga 液体培地もしくは TCY 液体培地 (TCY 寒天培地から寒天を除いた培地)
- c. 接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：20 - 25 , 48 時間
- d. MIC 判定のための培養温度ならびに時間：20 - 25 , 48 時間
- (カ) *Vibrio* spp. (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela*)
- a. 感受性測定用培地：2% NaCl - ミューラー

ーヒントン寒天培地

- b. 増殖用培地：2%NaCl - ミューラーヒントン液体培地
- c. 接種用菌液調整のための培養温度ならびに時間：25℃ , 24 時間
- d. MIC 判定のための培養温度ならびに時間：25℃ , 24 時間

2. 微量液体希釈法

(1) 一般細菌 (ミューラーヒントン培地に 35℃ , 好氣的条件で發育する細菌)

以下の項目以外の術式は、NCCLS により提唱された標準的試験法 [1] に準拠する。

ア. 供試材料

(ア) 感受性測定用培地：陽イオン調整ミューラーヒントン液体培地 (CAMHB) (報告書などには製造所を明記する。)

Ca²⁺ : 20 - 25mg/L および Mg²⁺ : 10 - 12.5mg/L に調整された市販品を使用する。

Ca²⁺ および Mg²⁺ が調整されていないミューラーヒントン液体培地 (MHB) (報告書などには製造所を明記する。) を使用する場合は、精製水で下記に示す CaCl₂ および MgCl₂ の溶液を事前に作製し、ろ過滅菌 (メンブランフィルター) 後、4℃ に保存しておく。これらの溶液は MHB の 1L 当たり CaCl₂ 溶液は 5mL , MgCl₂ 溶液は 2.5mL を添加・混和して感受性測定用液体培地とする。

CaCl₂ 溶液 : CaCl₂ · 2H₂O の 3.68g を 100mL に溶解する (Ca²⁺ ; 10mg/mL)

MgCl₂ 溶液 : MgCl₂ · 6H₂O の 8.36g を 100mL に溶解する (Mg²⁺ ; 10mg/mL)

(イ) マイクロプレート：滅菌処理された U 型の 96 穴マイクロプレート

(ウ) 薬剤原液の希釈用液：1. 寒天平板法 , (1) 一般細菌 , ア. 供試材料 , (ウ) 薬剤原液の希釈用液と同じ。

イ. 薬剤の調製

薬剤の調製は 1. 寒天平板法 , (1) 一般細菌 , イ. 薬剤の調製と同じ。

ウ. MIC 測定法の実際

(ア) 薬剤含有感受性測定用液体培地の調製

表 2 の (2) に例示した方法などにより , 1,280µg/mL の薬剤原液を 128 , 64 , 32 , 16 , 8 , 4 , 2 , 1 , 0.5 , 0.25 , 0.12 , 0.06µg/mL となるよう CAMHB で希釈 (3 連続以上の希釈は行わない) し , 薬剤含有感受性測定用液体培地を作製する。この感受性測定用液体培地をマイクロプレートの 1 ウエルあたり 0.1 ± 0.02mL 分注する。

感受性測定用培地は検査当日に作製する。もし、当日使用しない場合は 4℃ あるいは氷水中で保存する。

(イ) 接種用菌液の調整

MHB で McFarland 標準液の No.0.5 の濁度まで増菌 , あるいは寒天平板培地の新鮮培養菌を用いて McFarland 標準液の No. 0.5 の濁度に調整する (1 - 2 × 10⁸CFU/mL)。いずれの場合も CAMHB で 10 倍希釈し、接種用菌液とする (1 - 2 × 10⁷CFU/mL)。

(ウ) 接種用菌液の感受性測定用液体培地への接種

マイクロプレートに分注した 0.1mL の感受性測定用液体培地に接種用菌液を 0.005mL (5µL) 添加する。したがって、各ウエルの菌数は約 5 × 10⁴CFU になる。

(I) 培養

菌接種後 35℃ で 16 - 20 時間培養し、判定する。なお、標準的には菌接種後、15 分以内に培養を始める。

(オ) エンドポイントの決定

接種菌の薬剤含有培地での發育を対照培地での發育と比べ、肉眼的に見て發育が完全に阻止された最小濃度を MIC とする。

(カ) 精度管理

精度管理は 1. 寒天平板希釈法 , (1) 一般細菌 , ウ. MIC 測定法の実際 , (カ) 精度

管理と同じ。

(2) 特殊細菌

以下の項目以外は、2. 微量液体希釈法

(1) 一般細菌の試験法に準拠して実施することとする。

ア. *Actinobacillus pleuropneumoniae* および

Haemophilus somnus

(ア) 感受性測定用培地：1L あたり下記の成分を含む VFM 培地 (Veterinary Fastidious Medium)。

CAMHB	22 g
Beef extract	3 g
Acid hydrolysis casein	17.5 g
Starch	1.5 g
Yeast extract	20 g
馬溶血液 *	20 mL
Supplement C (Difco)	20 mL

* 馬溶血液の作製法

馬血液を 3 回、凍結融解 (凍結温度：

- 20 もしくはそれ以下) した後、3,000 × g で 20 分間遠心し、その上清を馬溶血液として使用する。

(イ) 接種用菌液の調製：一夜 (20 - 24 時間)

培養した寒天平板から直接釣菌し、滅菌した CAMHB、蒸留水あるいは 0.9% 食塩水を用いて McFarland 標準液の No. 0.5 に調整したものを接種菌液とする。粘性を示す *Actinobacillus pleuropneumoniae* の菌株では菌数調整が難しいこともあるので注意が必要である。

(ウ) 培養：35 ， 5 - 7% CO₂ ， 20 - 24 時間

(エ) 精度管理用菌株：VFM 培地を使用した微量液体希釈法における精度管理用菌株

Actinobacillus pleuropneumoniae ATCC 27090 および *Haemophilus somnus* ATCC 700025 の MIC (μg/mL) の精度管理限界値を表 3 に示した。

参考文献

- 1) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performances standards for anti-microbial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Second edition, Approved Standard. NCCLS document M31-A2, 22(6) (2002)
- 2) 動物用抗菌剤研究会 MIC 測定法改訂委員会 (高橋勇, 内田幸治, 吉村治郎, 高橋敏雄, 澤田拓士), 動物由来の細菌に対する薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法, 動物用抗菌剤研究会報, 18, p40-41 (1997)
- 3) 動物用抗菌剤研究会臨床評価検討委員会, 豚呼吸器病原菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) の薬剤感受性試験法, 動物用抗菌剤研究会報, 18, p51-52 (1997)
- 4) 動物用抗菌剤研究会臨床評価検討委員会, 豚呼吸器病原菌 (*Pasteurella multocida*) の薬剤感受性試験法, 動物用抗菌剤研究会報, 18, p52 (1997)
- 5) 動物用抗菌剤研究会臨床評価検討委員会, 豚呼吸器病原菌 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) の薬剤感受性試験法, 動物用抗菌剤研究会報, 18, p52-53 (1997)
- 6) 動物用抗菌剤研究会臨床評価検討委員会, 牛呼吸器病原菌 (*Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*) の薬剤感受性試験法, 動物用抗菌剤研究会報, 18, p53 (1997)
- 7) 動物用抗菌剤研究会臨床評価検討委員会, 牛呼吸器病原菌 (マイコプラズマ) の薬剤感受性試験法, 動物用抗菌剤研究会報, 18, p53-54 (1997)
- 8) 動物用抗菌剤研究会臨床評価検討委員会, 豚・牛下痢病原菌 (*E. coli*) の薬剤感受性試験法, 動物用抗菌剤研究会報, 18, p54 (1997)
- 9) 動物用抗菌剤研究会臨床評価検討委員会, 牛乳房炎起因菌の薬剤感受性試験法, 動物用抗菌剤研究会報, 19, p45 (1998)
- 10) 田村 豊, 動物用抗菌性物質と薬剤耐性, モダンメディア, 47 (9), p219-226 (2001)

参考資料1 NCLSが規定していない薬剤の寒天平板希釈法によるMC (µL) の精度管理限界値 (参考値)

精度管理用菌株		薬剤								
		CXM	DM	DSM	LCM	CL	BC	NHT	VGM	SNM
<i>S. aureus</i>	ATCC29231	0.5-2	32-256	1-8	0.25-2	64-128	32-128	0.008	0.25-1	0.5-2
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	64	256	16-64	8-32	256	32-128	0.015	1-4	0.25-2
<i>E. coli</i>	ATCC25922	2-8	16-128	1-4	256	0.5-2	256	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	128	16-128	4-32	256	0.5-2	256	-	-	-

精度管理用菌株		薬剤							
		OTC	AVM	BCM	EFM	OA	OFLX	ODX	SDMX
<i>S. aureus</i>	ATCC29231	1	0.5-2	512	128	0.25-2	0.5	-	-
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	4-16	0.25-2	512	128	4-32	1-4	-	256
<i>E. coli</i>	ATCC25922	0.25-2	-	16-64	128	0.25	0.25	8-32	256
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	2-16	-	512	128	8-64	1-4	-	512

参考資料2 魚類由来病原細菌のMIC (µg/mL) の精度管理限界値 (参考値)

(1) *Lactococcus garvieae* のMIC測定条件時

精度管理用菌株		薬剤						
		ABPC	CP	DSM	EM	ERFX	FOM	FF
<i>S. aureus</i>	ATCC29231	0.5	0.5-2	1-4	<0.125	<0.125	1-4	0.5-2
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	0.25-1	0.5-2	16-64	0.5-2	0.5	8-32	0.5-2
<i>E. coli</i>	ATCC25922	2-4	2-8	1-4	4-16	<0.125	2-8	2-8
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	256	16-64	2-8	8-32	0.5	2-8	16-64
<i>A. salmonicida</i>	ATCC33658	0.125	0.25-1	2-8	1-4	<0.125	0.5-2	0.25-1
<i>L. garvieae</i>	ATCC49156	0.25-1	0.5-2	32-128	<0.125	0.25-1	64-256	0.5-2
<i>L. garvieae</i>	ATCC49157	0.25-1	0.5-2	16-64	<0.125	0.25-1	8-32	0.5-2

精度管理用菌株		薬剤						
		FMQ	GM	KM	LCM	OTC	SMMX	TMP
<i>S. aureus</i>	ATCC29231	0.25-1	0.5	0.5-2	0.25-1	<0.125	8-32	0.5
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	8-32	8-32	16-64	4-16	1-4	>512	<0.125
<i>E. coli</i>	ATCC25922	0.5	0.25-1	0.5-2	256	0.5	128-512	0.5-1
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	2-8	0.25-1	>512	256	0.5-2	512	64-256
<i>A. salmonicida</i>	ATCC33658	<0.125	0.25-1	1-4	128-512	<0.125	>512	0.25-1
<i>L. garvieae</i>	ATCC49156	8-32	4-16	16-64	<0.125	<0.125	>512	4-16
<i>L. garvieae</i>	ATCC49157	8-32	2-8	8-32	<0.125	<0.125	>512	2-8

(2) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* のMIC測定条件時

精度管理用菌株		薬剤						
		ABPC	BCM	CP	DSM	ERFX	FF	FMQ
<i>S. aureus</i>	ATCC29231	0.25-1	>512	1-4	8-32	<0.125	1-4	0.25-1
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	0.25-1	>512	1-4	32-128	0.25-1	1-4	16-64
<i>E. coli</i>	ATCC25922	1-4	16-64	1-4	4-16	<0.125	2-8	0.5
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	>512	>512	64-256	8-32	0.5-2	64-256	8-32
<i>A. salmonicida</i>	ATCC33658	<0.125	8-32	0.5	4-16	<0.125	0.25-1	<0.125
<i>L. garvieae</i>	ATCC49156	<0.125	2-8	0.25-1	8-32	<0.125	0.5	<0.125
<i>L. garvieae</i>	ATCC49157	<0.125	2-8	0.25-1	4-16	<0.125	0.5	<0.125

薬 剤		精度管理用菌株						
		FOM	GM	KM	OA	OTC	SMMX	TMP
<i>S. aureus</i>	ATCC29231	2-8	2-8	4-16	0.25-1	0.5	8-32	0.25-1
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	16-64	32-128	64-256	8-32	4-16	>512	<0.125
<i>E. coli</i>	ATCC25922	1-4	1-4	4-16	<0.125	0.5-2	64-256	1-4
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	4-16	2-8	>512	4-16	1-4	512	64-256
<i>A. salmonicida</i>	ATCC33658	0.5-2	0.5-2	2-8	<0.125	0.5	128-512	1-4
<i>L. garvieae</i>	ATCC49156	1-4	4-16	8-32	<0.125	<0.125	32-128	0.25-1
<i>L. garvieae</i>	ATCC49157	0.25-1	2-8	4-16	<0.125	<0.125	4-16	0.5

参考資料 3 国内家畜衛生分野におけるモニタリングの調査対象薬剤および菌種

薬剤感受性 検査の対象抗菌性物質	対象菌種			
	サルモネラ	大腸菌	カンピロバクター	腸球菌
アンピシリン (AMPC)			×	
セファゾリン (CEZ)			×	×
セフトロフル (CTF)			×	×
アブラマイシン (APM)			×	×
ジヒドロストレプトマイシ (DSM)				
ゲンタマイシン (GM)				
カナマイシン (KM)			×	
エリスロマイシン (EM)	×	×		
リンコマイシン (LCM)	×	×	×	
コリスチン (CL)			×	×
ノシヘプタイド (NHT)*	×	×	×	
バンコマイシン (VCM)	×	×	×	
バージニアマイシン (VGM)*	×	×	×	
サリノマイシン (SNM)*	×	×	×	
オキシテトラサイクリン (OTC)				
アピラマイシン (AVM)*	×	×	×	
バシトラシン (BC)	×	×	×	
ピコザマイシン (BCM)			×	×
クロラムフェニコール (CP)				
エフロトマイシン (EFM)*	×	×	×	
ナリジクス酸 (NA)				×
エンロフロキサシン (ERFX)				
スルファジメトキシ (SDMX)				×
オラキンドックス (ODX)*				×
トリメトプリム (TMP)			×	×

*は飼料添加物専用抗菌性物質