

## [原 著]

市販の薬剤感受性試験用プレート 4 種類を用いた  
*Haemophilus influenzae* の薬剤感受性測定結果の比較清水千裕・中村竜也・笠原麻友美・奥田和之・中田千代  
藤本弘子・大倉ひろ枝・高橋伯夫  
関西医科大学附属枚方病院臨床検査部

(平成 19 年 1 月 24 日受付, 平成 20 年 4 月 18 日受理)

*Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) の薬剤感受性試験には, *Haemophilus Test Medium* (HTM 培地)<sup>1), 2)</sup> と 5% 馬溶血血液加 Mueller-Hinton broth (b-MHB 培地)<sup>3)</sup> が用いられている。近年,  $\beta$ -lactamase 非産生 ampicillin (ABPC) 耐性菌 (BLNAR) が問題となっており, その正確な MIC 値の評価が重要である。そこで, フローズンプレート栄研 (栄研 F), ドライプレート栄研 (栄研 D), オプトパネル極東 (極東 O), および日水 RAISUS (日水 R) における *H. influenzae* 薬剤感受性試験の性能について比較, 評価した。検討した 77 株中, 栄研 F と栄研 D で 2 株, 日水 R で 10 株, 極東 O で 13 株が発育不良であった。CLSI 推奨の HTM 培地を採用している極東 O を基準とした各パネルでの ABPC の相関は, 各パネルともに 87% 以上と良好であった。BLNAR と判定される株の割合は, 栄研 F で 18.0%, 栄研 D で 19.7%, 極東 O で 39.3%, 日水 R で 37.7% と相違を認めた。ABPC の MIC 値と *PBP-3* 遺伝子変異との比較では,  $\beta$ -lactamase 非産生 ABPC 感受性株において 95% 以上の相関があった。HTM 培地に非発育であった 13 株中 4 株 (BLNAR 1 株, Low-BLNAR 3 株) の遺伝子変異株では, b-MHB 培地における発育が弱く, MIC 値が低く判定され, 感受性と判定される株があった。また, b-MHB 培地に発育し, HTM 培地で発育不良であった 9 株中 1 株を用いて, HTM 培地での発育を経時的に測定したところ, 接種後 5 時間までは増殖が認められたが, その後菌量が減少した。以上より, *H. influenzae* の薬剤感受性検査は, 培地や方法により MIC 値が変動するため, その特徴を理解して測定結果を判定する必要があると思われた。

**Key words:** *Haemophilus influenzae*, ampicillin, BLNAR, HTM, MHB

## 序 文

*Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) は, 呼吸器感染症や耳鼻科領域感染症における起炎菌として知られており, 特に小児領域ではこの菌による化膿性髄膜炎や難治性中耳炎などが問題となっている。一方, 治療薬選択の面では,  $\beta$ -lactamase 非産生 ampicillin (ABPC) 耐性株 (BLNAR 株) の増加が目され, 抗菌薬治療における問題も増加している。BLNAR 株は,  $\beta$ -ラクタム薬の標的であるペニシリン結合タンパク質

(PBP) の変異による耐性であると報告されている。ペニシリン系や一部のセフェム系薬で MIC 値が上昇し, 治療に難渋するケースが存在するために, 正確かつ迅速に BLNAR 株の有無を報告することが抗菌薬適正使用において重要であると考えられる。現在, BLNAR 株の判定には  $\beta$ -lactamase 産生と ABPC の MIC 値により決定していることより, 特に ABPC の MIC 値の妥当性を検証することは重要であると考えられる。また, 近年 Pharmacokinetics/Pharmacodynamics (PK/PD) 理論を用いた抗菌薬の投与量, 投与方法が実践されつつあり, 理論に基づく治療を行うためにも MIC の正確な測定が求められている。現在, *H. influenzae* の薬剤感受性試験には CLSI が推奨する *Haemophilus Test Medium* (以下, HTM 培地)<sup>1), 2)</sup> と日本化学療法学会が推奨する 5% 馬溶血

著者連絡先: (〒573-1191) 枚方市新町 2-3-1  
関西医科大学附属枚方病院臨床検査部  
清水千裕  
TEL: 072-804-0101 内線 (3259)  
FAX: 072-804-2959  
E-mail: shimizuc@hirakata.kmu.ac.jp

血液加 Mueller-Hinton broth (以下, b-MHB 培地)<sup>3)</sup> が用いられている。両方法ともに接種菌量や培養条件, 判定方法などにより結果が変動するために注意が必要で, 特に HTM 培地は, b-MHB 培地と比較して発育不良株が多く存在すると報告されている<sup>4)</sup>。そこで, 現在発売されている *H. influenzae* 薬剤感受性試験用パネルの性能について比較し評価した。HTM 培地と b-MHB 培地における増殖曲線を求め, それぞれの培地における発育の違いについても検討した。また, *PBP-3* の遺伝子変異を PCR 法にて検索し, 各測定用パネルによる ABPC の MIC 分布との関係を検討した。

## 対象と方法

### 1. 対象

関西医科大学附属病院にて 2004 年 9 月から 2005 年 4 月の間に臨床材料から分離された *H. influenzae* 77 株を対象とした。対象菌株はスキムミルクにて  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

### 2. 薬剤感受性試験

基礎培地が b-MHB 培地である栄研化学のフローズンプレート栄研 (栄研化学, 以下栄研 F) およびドライプレート栄研 (栄研化学, 以下栄研 D), また, 基礎培地が HTM 培地であるオプトパネル極東 (極東製薬工業, 以下極東 O) および日水 RAISUS (日水製薬, 以下日水 R) の 4 種類のパネルを使用し測定した。測定薬剤は, Ampicillin (ABPC), Cefaclor (CCL), Cefo-

taxime (CTX), Cefotiam (CTM), Sulbactam/Ampicillin (SBT/ABPC), Meropenem (MEPM), Clarithromycin (CAM), Minocycline (MINO) とした。測定方法や接種菌液については表 1 に示すように, 各種パネルの添付文書に従った。また, 極東 O で発育不良であった株について, 薬剤未添加の HTM プロスでの発育を試験した。測定方法や接種菌液については表 1 の極東 O と同じように実施し,  $35^{\circ}\text{C}$  で 20~24 時間培養後, 目視判定した。

### 3. PCR 法による各種遺伝子の検索<sup>5)</sup>

チョコレート寒天培地 (極東製薬工業) で培養した *H. influenzae* のコロニーを  $30\ \mu\text{l}$  の lysis solution に懸濁後, サーマルサイクラーにて,  $60^{\circ}\text{C} \cdot 10$  分間,  $94^{\circ}\text{C} \cdot 5$  分間溶菌したものをテンプレートとした。プライマーおよび PCR 法は Hasegawa らの方法に従った。すなわち, *H. influenzae* に特異的な P6 膜タンパク質をコードする *P6* 遺伝子, TEM-1 型  $\beta$ -lactamase をコードする *TEM-1* 遺伝子, ROB-1 型  $\beta$ -lactamase をコードする *ROB-1* 遺伝子, *ftsI* 遺伝子上の Asn 526 の Lys526 へのアミノ酸置換を検索するプライマー (*PBP3-S*), Asn526 を Lys526 へ Ser385 を Thr 385 へと 2 カ所のアミノ酸置換を検索するプライマー (*PBP3-BLN*) である。PCR 増幅条件は,  $94^{\circ}\text{C} \cdot 2$  分間を 1 サイクル後,  $94^{\circ}\text{C} \cdot 15$  秒,  $53^{\circ}\text{C} \cdot 15$  秒,  $72^{\circ}\text{C} \cdot 15$  秒を 30 サイクル, 最後に  $72^{\circ}\text{C} \cdot 2$  分間を 1 サイクル実施した。増幅産物は, 1.5% アガロースゲルを用いて 100 V で 40 分電気泳動後, エチジウムブ

表 1. 各薬剤感受性プレートの測定方法

	①接種菌液濃度	②感受性測定用培地
フローズンプレート栄研	1 ウェル: $100\ \mu\text{l}$ , 約 $5 \times 10^5$ cfu/ml (0.5 McFarland を 200 倍希釈)	5% 馬溶血血液加 Mueller-Hinton 培地 (二価イオン調製 MHB に, 馬溶血液, NAD: $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , 酵母エキス: $5\ \text{mg}/\text{ml}$ 含有)
ドライプレート栄研	1 ウェル: $100\ \mu\text{l}$ , 約 $2 \times 10^5$ cfu/ml (ヘモフィリステスト用菌濁度液 H 栄研と同じ濁度の菌液を 520 倍希釈)	ストレプト・ヘモサプリメント栄研を 5.5 ml の滅菌蒸留水で溶解し, その 1 ml を 12 ml の Mueller-Hinton ブイヨンに加える。(二価イオン調製 MHB に, 終濃度が 2~5% 馬溶血液, NAD: $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , 酵母エキス: $5\ \text{mg}/\text{ml}$ 含有)
オプトパネル極東	1 ウェル: $100\ \mu\text{l}$ , 約 $5 \times 10^5$ cfu/ml (0.5 McFarland を 240 倍希釈)	HTM ブイヨン (二価イオン調製 MHB に, ウシヘマチン: $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , NAD: $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , 酵母エキス: $5\ \text{mg}/\text{ml}$ 含有)
日水 RAISUS	約 $5 \times 10^5$ cfu/ml (0.5 McFarland を 200 倍希釈)	<i>Haemophilus</i> Test Medium (二価イオン調製 MHB に, ウシヘマチン: $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , NAD: $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , 酵母エキス: $5\ \text{mg}/\text{ml}$ 含有)

※栄研フローズンプレートと栄研ドライプレートの培地組成は同じ。

ロマイドにて染色し確認した。遺伝子変異から見た ABPC に対する耐性型を Hasegawa らの基準に従い、次の 6 タイプに分類した。耐性遺伝子を保持しない ABPC 感性株を BLNAS 株、 $\beta$ -lactamase 産生株を BLPAR 株、*ftsI* 遺伝子上に Asn526 変異を保持する軽度耐性株を Low-BLNAR 株、*ftsI* 遺伝子上に Asn526Lys と、Ser385Thr への 2 カ所のアミノ酸変異を保持する耐性株を BLNAR 株とした。また、 $\beta$ -lactamase 産生で *ftsI* 遺伝子上に Asn526 変異をもつ株を BLPACR I 株、 $\beta$ -lactamase 産生で *ftsI* 遺伝子上に Asn526Lys と、Ser385Thr への 2 カ所の変異をもつ株を BLPACR II 株とした。上記で分類した耐性遺伝子型における各種抗菌薬の MIC 値との相関は、湧永製薬のインフルエンザ菌遺伝子検出試薬の添付文書に掲載されている MIC 値と遺伝子変異との相関データ（ペニシリン耐性肺炎球菌研究会による）における MIC 値のレンジを引用し、解析した。また、デンカ生研の抗血清と PCR 法を用いて type b の莖膜血清型別<sup>6)</sup>についても検索した。PCR 増幅条件は、94°C 1 分・60°C 1 分・72°C 1 分を 25 サイクル、最後に 72°C 10 分間を 1 サイクル実施した。増幅産物は、2% アガロースゲルを用いて 100 V で 40 分電気泳動後、エチジウムブロマイドにて染色し確認した。

#### 4. HTM 培地と b-MHB 培地における *H. influenzae* 増殖曲線

ATCC No. 49247 株、BLNAR 株 1 株、HTM 培地および b-MHB 培地ともに発育不良であった 1 株、b-MHB 培地では発育が認められたが HTM 培地で発育不良であった 1 株を用いて、抗菌薬を添加していない HTM と b-MHB の基礎培地で培養時間ごとの生菌数を測定した。チョコレート寒天培地で培養したそれぞれのコロニーを用いて 0.5 McFarland 濃度の菌液を作り、それをさらに 10 倍希釈した菌液 600  $\mu$ l を、12 ml の HTM、b-MHB それぞれに加えて、薬剤感受性試験測定時の接種菌濃度に合わせた。この濃度調製菌液を原液として、 $10^7$  倍までの 10 段階希釈系列を作り、各希釈段階の菌液を 10  $\mu$ l ずつチョコレート寒天培地にそれぞれ接種した。同じ操作を、菌液作製直後から 1 時間ごとに 7 時間まで実施し、さらに翌日の 24 時間後にも行い、各時間における菌数を求めた。また同様の方法を用いて、ABPC 耐性遺伝子型と ABPC の MIC 値が乖離した株についても培養時間ごとの生菌数を測定した。

## 結 果

### 1. 使用菌株の背景

試験菌株の年齢は、3 歳以下で 27.3%、4~14 歳で 19.5%、15~64 歳で 29.9%、65 歳以上で 23.4% であった。また、検出材料は、喀痰 (36.4%)、咽頭 (19.5%)、鼻腔 (11.7%)、扁桃 (7.8%)、気管支洗浄液 (5.2%)、関節液 (3.9%)、血液 (3.9%)、髄液 (2.6%)、膿 (2.6%) であった。抗血清による血清型別では 8 株で type b の凝集を認めた。PCR 法でも 8 株すべてに type b の遺伝子が確認された。それら 8 株は、血液・髄液・関節液由来株であり、その他の材料由来株はすべて血清型別が不能であった。

### 2. PCR 法による *PBP-3* 遺伝子変異および $\beta$ -lactamase 遺伝子保有の検討

検討した 77 株を分類すると、BLNAS 株が 27 株 (35.1%)、Low-BLNAR 株が 18 株 (23.4%)、BLNAR 株が 26 株 (33.8%)、BLPAR 株が 1 株 (1.3%)、BLPACR I 株が 1 株 (1.3%)、BLPACR II 株が 1 株 (1.3%) であった。3 株は *PBP3-S* と *PBP3-BLN* の両遺伝子をもっていた。

### 3. 薬剤感受性試験結果と各種パネルにおける測定値の比較

検討した 77 株うち、測定プレートに発育しなかった株が存在し、すべてのプレートで発育しなかった株が 2 株、極東 O と日水 R で 8 株、極東 O でのみ 2 株発育しなかった。極東 O で発育しなかった 13 株を薬剤の入っていない HTM 培地に接種した結果、13 株中 2 株が発育した。再検によって発育した株は、1 株は極東 O にのみ発育不良であった株で、1 株は極東 O と日水 R に発育不良であった株であった。4 種類の測定法にて結果がすべて得られた 61 株について、以下の項目について評価した。

#### 1) 極東 O を基準とした各パネルでの ABPC の MIC 値の一致率と相関

ABPC の MIC 値を評価するため、表 2-1 に各種プレートで測定した ABPC の MIC 値の分布を示し、図 1 に ABPC の MIC 値に対する極東 O を基準とした各種測定パネルとの相関図を示す。極東 O と各パネルの測定値は 87% 以上が  $\pm 1$  管差に判定され良好な一致率を示した。各種パネルで ABPC が  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  を示した MIC 値による BLNAR 株の割合は、栄研 F で 18.0%、栄研 D で 19.7%、極東 O で 39.3%、日水 R で 37.7% であった。極東 O および日水 R の HTM ドライプレートでは、MIC 値が高い傾向にあった。

表 2. 各種測定法による MIC 分布 ( $n=61$ )

## 1. Ampicillin

	MIC 分布 (%)								一致率* (%)
	MIC for ampicillin ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	$\leq 0.125$	0.25	0.5	1	2	4	8	$> 16$	
フローズンプレート栄研	5	28	11	13	20	16	2	5	89
ドライプレート栄研	5	33	10	11	15	13	8	5	92
オプトパネル極東	0	7	34	11	8	15	16	8	—
日水 RAISUS	7	28	8	5	11	31	7	3	87

\* オプトパネル極東を基準とした場合に前後 2 倍以内 MIC を示した株の割合。

## 2. Cefaclor

	MIC 分布 (%)					一致率* (%)
	MIC for cefaclor ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	$\leq 2$	4	8	16	$32 \leq$	
フローズンプレート栄研	28	24	12	11	26	84
ドライプレート栄研	34	20	13	8	25	78
オプトパネル極東	18	20	6	3	53	—
日水 RAISUS	19	15	15	26	25	87

\* オプトパネル極東を基準とした場合に前後 2 倍以内 MIC を示した株の割合。

## 3. Cefotaxime

	MIC 分布 (%)					一致率* (%)
	MIC for cefotaxime ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	$\leq 0.25$	0.5	1	2	$4 \leq$	
フローズンプレート栄研	68	8	23	1	0	90
ドライプレート栄研	66	12	20	3	0	97
オプトパネル極東	70	18	11	2	0	—
日水 RAISUS	68	4	18	7	3	87

\* オプトパネル極東を基準とした場合に前後 2 倍以内 MIC を示した株の割合。

## 4. Sulbactam/Ampicillin

	MIC 分布 (%)								一致率* (%)
	MIC for sulbactam/ampicillin ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	$\leq 0.12$	0.25	0.5	1	2	4	8	$16 \leq$	
フローズンプレート栄研	7	25	9	16	22	18	3	0	91
ドライプレート栄研	11	25	9	13	17	18	7	0	94
オプトパネル極東	2	6	35	8	9	21	17	3	—
日水 RAISUS	0	26	16	4	10	32	9	1	95

\* オプトパネル極東を基準とした場合に前後 2 倍以内 MIC を示した株の割合。

表 2. 各種測定法による MIC 分布 ( $n=61$ )

## 5. Minocycline

	MIC 分布 (%)				一致率* (%)
	MIC for minocycline ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	$\leq 0.5$	1	2	4	
フローズプレート栄研	95	3	3	0	4
ドライプレート栄研	91	7	3	0	5
オプトパネル極東	0	6	85	9	—
日水 RAISUS	16	68	16	0	85

\* オプトパネル極東を基準とした場合に前後 2 倍以内 MIC を示した株の割合。

## 2) ABPC 以外の薬剤の各種パネルでの測定値の一致率

極東 O での測定値を基準値として、他の測定パネルとの相関を求めた (表 2-2, 3, 4, 5)。 $\pm 1$  管差の一致率は、MINO 以外の薬剤で、78% 以上の一致率が認められた。しかし ABPC と同様、その他の薬剤でも HTM 培地では全体に MIC 値が高い傾向にあった。特に MINO については、日水 R との  $\pm 1$  管差の一致率は 85% であったが、栄研 F と栄研 D ではそれぞれ 4%、5% の一致率であり、HTM 培地と b-MHB 培地で差が認められた。

## 3) PBP-3 の変異解析結果と各抗菌薬の MIC 値分布との妥当性

PCR 法による PBP-3 の変異解析結果による分類 (Low-BLNAR 株: 1 カ所変異 Asn526Lys, BLNAR 株: 2 カ所変異 Ser385Thr, Asn526Lys) と ABPC, CCL, CTX の MIC 値との相関を表 3 ( $\beta$ -lactamase 産生株は除外。) に示す。ABPC に関して、BLNAS 株と BLNAR 株ではすべてのプレートで一致率が 93% 以上と良好であったが、Low-BLNAR 株では栄研 F, 栄研 D, 極東 O で 82%, 日水 R で 55% と一致率の低下が認められた。栄研 F では BLNAR 株で ABPC の MIC 値が低値で BLNAS 株と判定される株があった。ABPC 以外の薬剤では、CCL, SBT/ABPC, CTM, MEPM で、BLNAS 株から BLNAR 株へと遺伝子変異の数が多くなるにつれて、MIC 値が耐性側に分布しており、特に、HTM 培地では遺伝子変異に対する MIC 値の上昇が大きかった。CTX では BLNAS 株と Low-BLNAR 株で MIC 値の分布に差異はなかったが、BLNAR 株では MIC 値の上昇が顕著であった。また、CAM, MINO では、BLNAS 株, Low-BLNAR 株, BLNAR 株の分布にほとんど差は認められなかった。

## 4) HTM 培地非発育株に対する b-MHB 培地での ABPC 測定値の結果

HTM ドライパネル発育不良株 13 株のうち、11 株は b-MHB 培地で発育した。それらの株で、遺伝子変異と b-MHB 培地での ABPC の MIC 値の相関を見ると、Low-BLNAR 株で ABPC の MIC 値が  $0.06 \mu\text{g/ml}$  の株と BLNAR 株で ABPC の MIC 値が  $0.25 \mu\text{g/ml}$  の株の 2 株において、遺伝子変異と MIC 値に乖離のあるものが存在した。

4. HTM 培地, b-MHB 培地における *H. influenzae* の増殖曲線

HTM 培地, b-MHB 培地における *H. influenzae* の増殖曲線の測定結果を図 2 に示した。図 2-a には ATCC No. 49247 株の増殖曲線を示したが、HTM 培地と b-MHB 培地で増殖率に差はなかった。また、ATCC No. 49247 株と BLNAR 株でも、増殖率に差はなかった (図 2-a)。しかし、HTM 培地と b-MHB 培地ともに発育不良であった株では、時間経過とともに菌量は減少しており、24 時間後では b-MHB 培地で菌数は 0 個、HTM 培地で  $4 \times 10^3$  個となった (図 2-b)。b-MHB 培地では発育が認められたが HTM 培地で発育不良であった株で、b-MHB 培地では  $10^8$  個まで増殖したが、HTM 培地では時間経過とともに菌量が減少し、24 時間後では  $8 \times 10^4$  個となった (図 2-c)。遺伝子変異と MIC 値に乖離のあった BLNAR 株では、b-MHB 培地, HTM 培地ともに、7 時間までは増殖を示していたが、24 時間後には菌量が急激に減少していた (図 2-d)。

## 考 察

CLSI では、*Haemophilus* 属の MIC 測定方法には HTM 培地を使用した方法を推奨している。現在、日本における *Haemophilus* 属の薬剤感受性試験は HTM 培地を使用した方法または日本化学療法学会が

		オプトパネル極東									MIC値管差率(%) <sup>※</sup>	
栄研フローズン	$\mu\text{g/ml}$	$\leq 0.125$	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	MIC値管差	栄研F
		32									3	-3
	16										-2	9.8
	8									1	-1	57.4
	4						1	8		1	0	31.1
	2					3	7	2			1	0.0
	1				5	2	1				2	0.0
	0.5			5	2						3	0.0
	0.25		2	15							1管差以内 88.5	
	0.125											
	0.06		2	1								

※オプトパネル極東を基準とした場合に前後2倍以内MICを示した株の割合

		オプトパネル極東									MIC値管差率(%) <sup>※</sup>	
栄研ドライ	$\mu\text{g/ml}$	$\leq 0.125$	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	MIC値管差	栄研D
		32									3	-3
	16										-2	9.8
	8									1	-1	65.6
	4						1	8		1	0	26.2
	2					3	7	2			1	0.0
	1				5	2	1				2	0.0
	0.5			2	4						3	0.0
	0.25		2	18							1管差以内 91.8	
	0.125											
	0.06		2	1								

※オプトパネル極東を基準とした場合に前後2倍以内MICを示した株の割合

		オプトパネル極東									MIC値管差率(%) <sup>※</sup>	
日水RAISUS	$\mu\text{g/ml}$	$\leq 0.125$	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	MIC値管差	極東O
		>16									2	-3
	16										-2	8.2
	8										-1	45.9
	4		1		1	2	5	8	1	1	0	34.4
	2				1	3	3				1	6.6
	1				3						2	1.6
	0.5			4	1						3	0.0
	0.25		2	14	1						1管差以内 86.9	
	$\leq 0.125$		1	3								

※オプトパネル極東を基準とした場合に前後2倍以内MICを示した株の割合

図1. オプトパネル極東の測定値を基準とした Ampicillin の MIC 値

推奨する 5% 馬溶血血液加 MHB 培地を使用した方法である。今回、それらの方法での結果の妥当性を検討した結果、HTM 培地に発育可能であった 61 株の各薬剤における MIC 値の一致率は、MINO 以外で 78% 以上と良好であった。BLNAR 株の判定薬剤である ABPC についてオプトパネル極東を基準として各種測定パネルとの相関を求めたところ、 $\pm 1$  管差の一致率は 87% 以上と良好であった。しかし、各種パネルでの BLNAR 株と判定される株の割合は栄研 F の 18.0%、栄研 D の 19.7% に対して、極東 O で 39.3%、日水 R で 37.7% と、HTM 培地における測定

値は高値を示し、若干相違を示した。Barry らの報告では、HTM の液体培地および 3% 馬溶血血液加 MHB の液体培地による微量液体希釈法、HTM の固形培地および 3% 馬溶血血液加 MHB の固形培地、5% 馬全血液加 MHB、チョコレート培地など計 6 種類の培地を用いた寒天平板希釈法による測定と E test による測定で、ABPC の MIC 値を求めたところ、測定培地や測定方法によって差が認められていた<sup>7)</sup>。微量液体希釈法による結果では両培地での MIC 値に差はなく、ABPC の MIC が  $4 \mu\text{g/ml}$  以上を示して BLNAR 株と判定される株の割合もそれぞれ 31%、

表 3. PBP-3 の変異解析の結果による分類と推定 MIC との関係 (n=58)

## 1. Ampicillin

	PBP-3 の変異による分類と ampicillin の推定 MIC との関係 (%)									
	BLNAS (n=27) 0.125~0.5 µg/ml <sup>a</sup>			Low-BLNAR (n=11) 0.5~2 µg/ml <sup>a</sup>			BLNAR (n=20) 1~16 µg/ml <sup>a</sup>			VM <sup>e</sup> (%)
	L <sup>b</sup>	範囲内 <sup>c</sup>	H <sup>d</sup>	L <sup>b</sup>	範囲内 <sup>c</sup>	H <sup>d</sup>	L <sup>b</sup>	範囲内 <sup>c</sup>	H <sup>d</sup>	
フローズプレート栄研	0	96	4	9	82	9	5	95	0	5
ドライプレート栄研	0	96	4	9	82	9	0	100	0	0
オプトパネル極東	0	93	7	9	82	9	0	100	0	0
日水 RAISUS	0	96	4	9	55	36	0	100	0	0

## 2. Cefaclor

	PBP-3 の変異による分類と cefaclor の推定 MIC との関係 (%)								
	BLNAS (n=27) 1~8 µg/ml <sup>a</sup>			Low-BLNAR (n=11) 8~64 µg/ml <sup>a</sup>			BLNAR (n=20) 16~64 µg/ml <sup>a</sup>		
	L <sup>b</sup>	範囲内 <sup>c</sup>	H <sup>d</sup>	L <sup>b</sup>	範囲内 <sup>c</sup>	H <sup>d</sup>	L <sup>b</sup>	範囲内 <sup>c</sup>	H <sup>d</sup>
フローズプレート栄研	0	96	4	27	73	—	45	55	—
ドライプレート栄研	4	93	4	46	55	—	35	65	—
オプトパネル極東	0	78	22	27	73	—	15	85	—
日水 RAISUS	0	89	11	9	91	—	15	85	—

## 3. Cefotaxime

	PBP-3 の変異による分類と cefotaxime の推定 MIC との関係 (%)								
	BLNAS (n=27) 0.008~0.031 µg/ml <sup>a</sup>			Low-BLNAR (n=11) 0.031~0.125 µg/ml <sup>a</sup>			BLNAR (n=20) 0.125~1 µg/ml <sup>a</sup>		
	L <sup>b</sup>	範囲内 <sup>c</sup>	H <sup>d</sup>	L <sup>b</sup>	範囲内 <sup>c</sup>	H <sup>d</sup>	L <sup>b</sup>	範囲内 <sup>c</sup>	H <sup>d</sup>
フローズプレート栄研	—	96	4	—	100	0	5	90	5
ドライプレート栄研	—	96	4	—	100	0	5	85	10
オプトパネル極東	—	96	4	—	100	0	5	90	5
日水 RAISUS	NT	96	4	NT	100	0	0	70	30

<sup>a</sup>: ペニシリン耐性肺炎球菌研究会による耐性遺伝子が識別した *H. influenzae* の推定 MIC 値。

<sup>b</sup>: 基準値以下の MIC を示した株の割合。

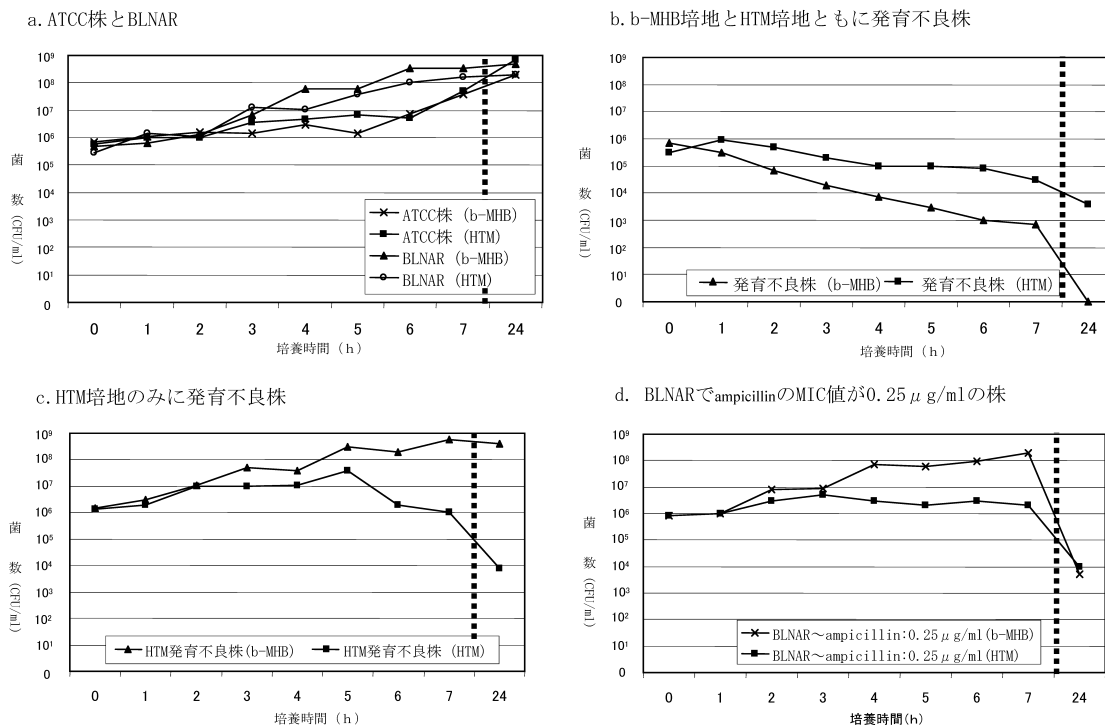
<sup>c</sup>: 基準値内の MIC を示した株の割合。

<sup>d</sup>: 基準値より大きい MIC を示した株の割合。

<sup>e</sup>: 遺伝子上 BLNAR と判断されるが MIC 0.25 µg/ml 以下を示した株の割合。

33%であった。しかし、固形培地での測定では、チョコレート培地など栄養価の高い培地では ABPC の MIC 値が 4 µg/ml 以上を示す株の割合が 44% と、MIC 値が高値を示す傾向にあった。一方で、E test による結果では ABPC の MIC が 4 µg/ml 以上を示す

株の割合は 25~30% で、MIC 値は低値を示す傾向にあった。また、固形培地を用いたディスク法での結果はさらに感受性の傾向があり、HTM 培地におけるディスク法での BLNAR 株検出率は 5% であった。測定方法や測定培地の違いによって、BLNAR 株検出



● カッコ内は検討した培地の種類

b-MHB: 5% 馬溶血血液加 Mueller-Hinton broth: *Haemophilus* Test Medium, BLNAR:  $\beta$ -lactamase 非産生 ampicillin (ABPC) 耐性菌

図 2. b-MHB 培地, HTM 培地における *H. influenzae* の増殖曲線.

率が 5~44% まで変動したこととなる。

今回の検討では、ABPC と MINO 以外の薬剤については、各種パネルでの MIC 値で良好な一致率を示したが、HTM 培地における測定値は全体的に高値を示した。また、MINO においては、MHB 培地に比べて HTM 培地では 1~2 管 MIC は高値を示した。同じように、オプトパネル極東とドライプレート栄研のパネルを比較検討した真崎らの報告でも、MINO では、HTM 培地の方が MHB 培地よりも 2~3 管の MIC 高値を示しており、 $\pm 1$  管差の一致率が 8.1% であった<sup>8)</sup>。この原因は、基礎培地や添加するサプリメントの影響によるものではないかと考えられている<sup>9)</sup>。

*PBP-3* 遺伝子変異と ABPC の MIC 値の相関では、Low-BLNAR 株や BLNAR 株で b-MHB において MIC 値と遺伝子変異との結果に乖離が見られた。従来から HTM 培地では発育不良株が存在したが、今回の検討でも HTM 培地発育不良株は存在した。一方、b-MHB 培地ではすべて発育したため、結果として b-MHB 培地が発育良好と考えられる。しかし、BLNAR

株や Low-BLNAR 株で、判定可能な微発育では低い MIC 値を示すため、*PBP-3* 遺伝子変異の結果と乖離し、b-MHB 培地での発育がそのまま正確な感受性結果であるとは限らないと考えられる。今回の検討から、HTM 培地では、全体的に MIC 値が高い傾向にあったが、オプトパネル極東を用いた HTM 培地では、*PBP-3* 遺伝子変異から見た BLNAR 株の検出率は 100% であり、very major error は回避できる結果であった。このことより *PBP-3* 遺伝子変異による ABPC の MIC 値上昇が認められる株では、HTM 培地を用いて測定した MIC 値のほうが *PBP-3* 遺伝子変異との相関があり妥当であると考えられた。また ABPC 以外の薬剤と遺伝子変異の相関では、CCL, S-ABPC, CTM, MEPM で、BLNAS 株から BLNAR 株へと *PBP-3* 遺伝子変異が進むにつれて、MIC 値が高くなる傾向をしたため、CCL では  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ , SBT/ABPC では  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ , CTM では  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  の株に *PBP-3* 遺伝子変異が存在すると推測できた。CTX では BLNAS 株と Low-BLNAR 株で MIC 値の分布に



差異はなかったが、BLNAR 株では MIC 値の上昇が顕著であった。これらの  $\beta$  ラクトム系薬の MIC を注意深く観察することでも、BLNAR 株の判定の一助になると考えられた。また、*PBP-3* 遺伝子変異の検索において、*PBP-3* と *PBP3-BLN* の両遺伝子をもつ株を 3 株 (3.8%) 検出したが、これは、セリン 385→スレオニン、アルギニン 517 がヒスチジンに置換している BLNAR 株<sup>10), 11)</sup>で、臨床検体から約 8% の割合で分離されると報告されている。

HTM 培地発育不良株が存在することより、その原因を解明するために両基礎培地における菌の増殖率について増殖曲線を求めて検討した。ATCC No. 49247 株、BLNAR 株ともに差はなかった。しかし、HTM 培地に発育不良であった株では b-MHB 培地の発育は良好であったが、HTM 培地では時間経過とともに菌は死滅した。HTM 培地で菌の発育が弱い原因は、HTM 培地に含まれる X 因子にあるという報告がある。*H. influenzae* の発育に必要な X 因子は、溶解性に乏しく非常に不安定な物質であるため、HTM 培地での発育不良株が多いのではないかと報告されている<sup>4)</sup>。また、*PBP-3* 遺伝子変異と MIC 値に乖離のあった BLNAR 株で増殖曲線を求めたところ、b-MHB 培地、HTM 培地ともに緩やかな増殖の後に菌の死滅が認められた結果、MIC 値が低値を示すことがわかった。これは、BLNAR 株を BLNAS 株と報告してしまい very major error ということになる。測定培地に微弱な発育が認められたときは、他の方法、例えばディスク法や E test などを用いて MIC 値の妥当性を検証することが必要であると思われる。以上より、*H. influenzae* の薬剤感受性検査は基礎培地や測定方法により MIC 値が変動するほか、測定誤差も生じることがわかった。接種菌量や培養条件を工夫することで CLSI の精度管理や遺伝子変異との相関をより合わせることも可能となると考えられる。今後は、各薬剤感受性試験用プレートの特徴を理解し測定結果を判定する必要があると思われる。

#### 引用文献

- 1) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement. CLSI document M 100-S 16, CLSI, Wayne, Pennsylvania.
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard seventh edition. CLSI document M7-A7, CLSI, Wayne, Pennsylvania.
- 3) 齊藤 厚, 他. 1993. 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告 (1992). 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 (修正・補足). *Chemotherapy* 41: 184-189.
- 4) Scriver, S. R., D. E. Low, R. Jaeger, et al. 1992. Broth microdilution testing of *Haemophilus influenzae* with haemophilus test medium versus lysed horse blood broth. Canadian *Haemophilus* Study Group. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2284-2289.
- 5) Hasegawa, K., K. Yamamoto, K. Ubukata, et al. 2003. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microbiol. Drug Resistance* 9: 39-46.
- 6) Falla, T. J., D. W. Crook, L. N. Brophy, et al. 1994. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2382-2386.
- 7) Barry, A. L., P. C. Fuchs, S. D. Brown, 2001. Identification of beta-lactamase-negative, ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* with four methods and eight media. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1585-1588.
- 8) 真崎純子, 黒川いく, 葛西清美, 他. 2006. インフルエンザ菌の微量液体希釈法によるオプトパネル MP (極東製薬工業) とドライプレート '栄研' (栄研化学) の比較検討. *医学検査* 55: 934-939.
- 9) 長沢光章, 結城 篤, 岡沢 豊, 他. 2003. 微量液体希釈法 "オプトパネル MP" の協同評価. *機器・試薬* 26: 285-292.
- 10) Ubukata, K., Y. Shibasaki, M. Konno, et al. 2001. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with  $\beta$ -lactam resistance in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1693-1699.
- 11) 村上 忍, 宮本仁志, 村瀬光春, 他. 2004. *Haemophilus influenzae* における *ftsI* 遺伝子解析と薬剤感受性—*ftsI* 遺伝子変異のスクリーニング薬剤の検討—. *医学検査* 53: 106-111.

Comparison of the Four Drug Susceptibility Testing Plates for  
*Haemophilus influenzae*, and Comparison with the Gene  
Mutations of Penicillin-Binding Protein 3

Chihiro Shimizu, Tatsuya Nakamura, Mayumi Kasahara, Kazuyuki Okuda,  
Chiyo Nakata, Hiroriko Fujimoto, Hiroe Okura, Hakuo Takahashi  
Clinical Central Laboratory, Kansai Medical University Hirakata Hospital,  
2-3-1 Shinmachi, Hirakata-shi, Osaka 573-1191, Japan

In drug susceptibility tests of *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Haemophilus* test medium (HTM) and Mueller-Hinton broth (MHB) supplemented with 5% defibrinated horse blood are used. We compared performance levels among the 4 types of plates for the drug susceptibility test of *H. influenzae* on the market. For ampicillin, there was a good correlation (387%) between each type of measurement panel. The BLNAR detection rate was 18.0%, 19.7%, 39.3%, 37.7% by each panel. The correlation between the MIC of ABPC and gene mutation was evaluated, some BLNAR and ABPC-low resistant strains that did not grow in HTM were shown to be BLNAS by MHB. Since MIC differs among media and methods in the drug susceptibility test of *H. influenzae*, measurement results should be evaluated with the understanding of its characteristics.