

3

微量液体希釈法

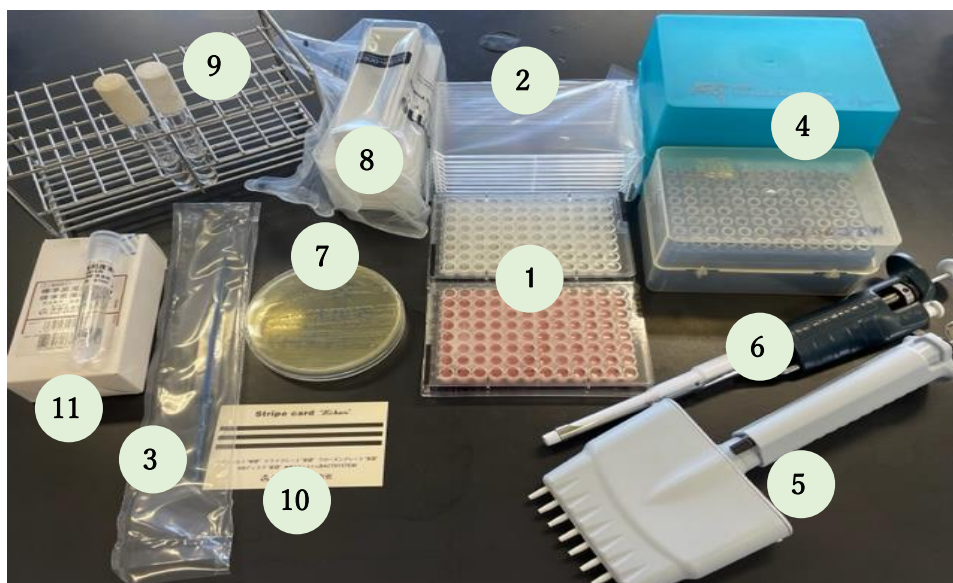
微量希釈法は、液体希釈法でもマイクロプレートを使用し微量の液体培地(100 μ l)で希釈法を行う方法である。細菌の発育が阻止される抗菌剤の濃度から定量的な MIC 値を測定することが出来る。ここでは、CLSI 法に準拠したフローズンプレート(栄研化学)を用いた微量希釈法を紹介する。

微量液体希釈法の実際

CLSI 法に準拠したフローズンプレート(栄研化学)を使用した微量液体希釈法のフローチャートを図 3-1 に示す。

1) フローズンプレートを使用した微量液体希釈法に必要な試薬・器具

フローズンプレートを使用した微量液体希釈法に必要な試薬・器具を以下に示す(図 3-2)。



- | | |
|--------------------------|-----------------------|
| ① フローズンプレート | ⑦ 菌株 |
| ② フローズンプレート用フタ | ⑧ リザーバー |
| ③ 滅菌白金耳(エーゼ) | ⑨ 3ml, 2.7 ml 滅菌生理食塩水 |
| ④ 滅菌フィルターチップ | ⑩ ストライプカード |
| ⑤ 8連ピペット | ⑪ McFarland 標準液 |
| ⑥ マイクロピペット(1000 μ l) | |

図 3-2 微量液体希釈法に必要な試薬・器具

これ以外にも可能であればリーディングミラー（栄研、60,000 円）を用意する。

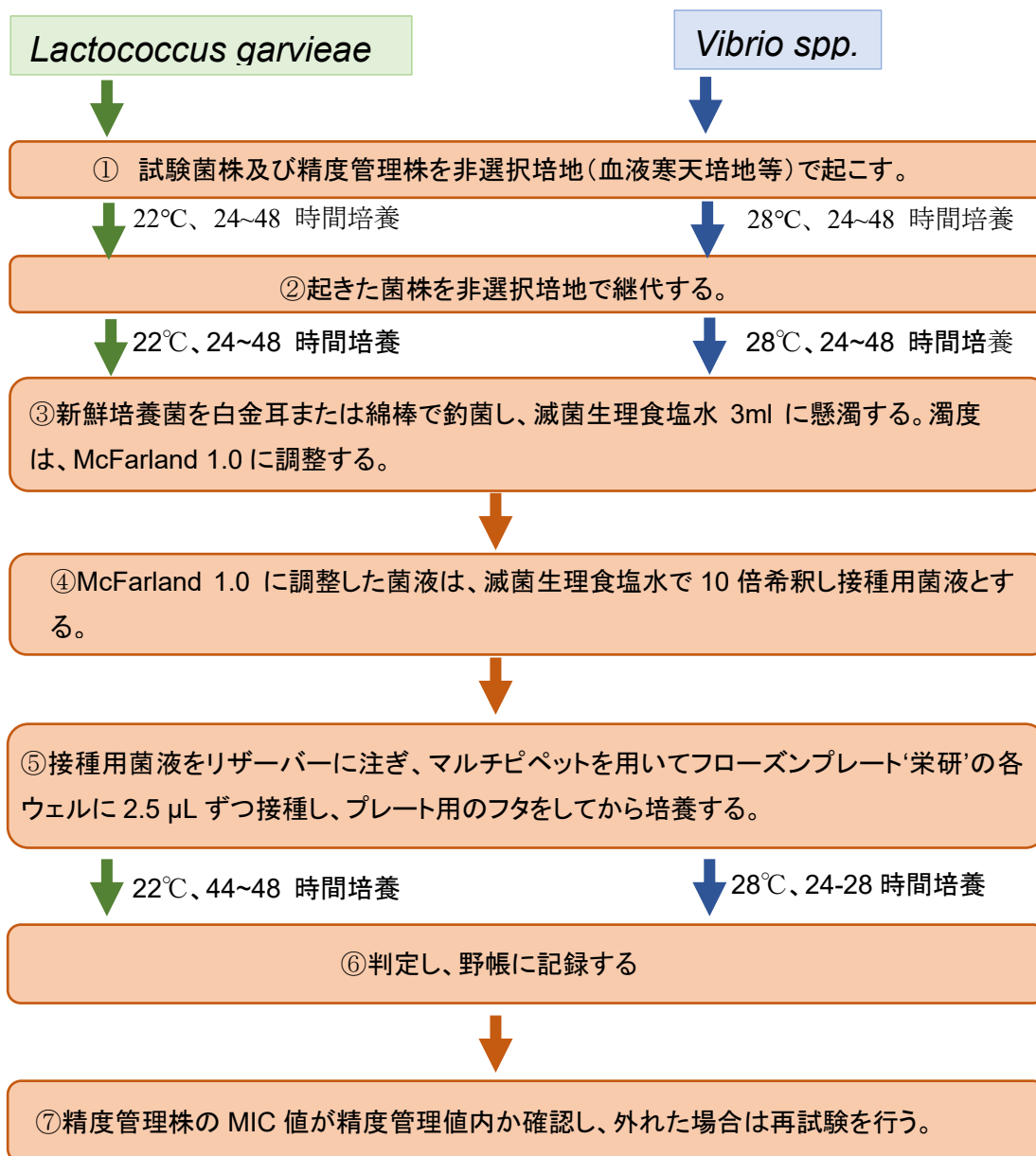


図 3-1 フローズンプレートを使用した微量液体希釈法のフローチャート

2) 感受性試験用培地

液体希釈法で用いる培地は、Muller-Hinton 液体培地の Ca^{++} 、 Mg^{++} 濃度をそれぞれ 1 mg/L に調整した CAMHB（cation-adjusted Muller-Hinton broth）を用いる。

Lactococcus garvieae

表 1-2 に示す様に、*L. garvieae* の液体希釈法は CAMHB に 2.5% LHB（ウマ溶血液）を加えたものを薬剤感受性試験に用いる。

Vibrio spp.

表 1-2 に示す様に、*Vibrio* spp. の液体希釈法は CAMHB（通常 NaCl は加えない）を用いる。

他菌種の薬剤感受性試験を行う際は、表 1-2 を確認すること。

CAMHB（cation-adjusted Muller-Hinton broth）調整の実際

Mg stock solution

MgCl₂・6H₂O 8.36g を 100ml の DW に溶解

0.2 μm シリンジフィルター（ADVANTEC DIMIC-25CS 等）による滅菌

Ca stock solution

CaCl₂・2H₂O 3.68g を 100ml の DW に溶解

0.2 μm シリンジフィルターによる滅菌

CAMHB

21 g の Muller-Hinton Broth (Beckton Dickinson) を蒸留水 1 ℓ に溶解し、オートクレーブで 121℃・15 分滅菌する。冷却後、0.1ml の Mg および Ca stock solution をそれぞれ加え CAMHB とする。

3) フロースンプレートの発注

CLSI 法に準拠したフロースンプレートは、栄研化学株式会社に発注可能（以降、栄研と略す）。ただし、発注から納品までに時間を要する場合があることから時間的な余裕を考慮すること。

フロースンプレートの発注にあたっては、プレートのデザイン（使用薬剤、薬剤濃度範囲、Ca²⁺、Mg²⁺および血液等の添加）が必要となる。また、薬剤により栄研に用意が無い場合がある。その場合、自分で薬剤を用意（購入または原末請求）し、それを栄研に送付する。講習会用のフロースンプレートのデザインを図 3-3 に示す。*L. garvieae* の薬剤感受性試験に、EM（エリスロマイシン）、OTC（オキシテオラサイクリン）、FFC（フロルフエニコール）を、*Vibrio* spp. に OTC と OXA（オキシリン酸）を用いる。

フロースンプレートの保存はディープフリーザー（-70℃以下）が必要となる。試験場やラボに施設整備されているか確認または整備を行う。

Lactococcus garvieae 用フローズンプレート (濃度は $\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EM 128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	Control
B	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	Control
C	Control	Control	FFC 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	Control

1 株あ
たり

培地	添加物
Mueller Hinton broth	Ca^{++} , Mg^{++} , 馬溶血 (2.5%)

Vibrio spp.用フローズンプレート (濃度は $\mu\text{g/ml}$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	Control
B	Control	OXA 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	Control

1 株あ
たり

培地	添加物
Mueller Hinton broth	Ca^{++} , Mg^{++}

図 3-3 本講習会で用いるフローズンプレートのデザイン

4) 菌液の調整

培養した寒天培地上の被検菌を釣菌して滅菌生理食塩水に懸濁する方法（直接法）により調整する。菌液濃度は McFarland 1.0 (3.0×10^8 CFU/ml) と同じ濁度に合わせる。

McFarland 標準液は、菌懸濁液の濃度を確認するための標準液として使用される（図 3-4）。McFarland 標準液の組成および対応する菌数濃度を表 3-1 に示す。なお、McFarland 標準液の代わりに栄研化学社製の標準菌濁度液 B を使用することが出来る（図 3-4）。調整に当たっては、ストライプカードと呼ばれるストライプ柄のカードとともに濁度を確認すると調整しやすい（図 3-5）。

3 ml の生理食塩水に滅菌白金耳で菌体を懸濁し、標準菌濁度液 B と同じ濁度になる様ストライプカードをかざしながら調整する（図 3-5）。濁度を調整した菌液 300 μl を 2.7 ml の滅菌生理食塩水に加え 10 倍希釈したものを接種用菌液とする。接種用菌液は、調整後 15 分以内にフローズンプレートに接種する。



図 3-4 栄研化学社製の標準菌濁度液



図 3-5 ストライプカードと菌液調整

表 3-1 McFarland 標準液の組成および菌数濃度

McFarland 標準液	McFarland 標準液組成		菌液濃度 (CFU/ml)
	1% BaCl ₂ (ml)	1% H ₂ SO ₄ (ml)	
0.5	0.05	9.95	1.5×10 ⁸
1.0	0.1	9.9	3.0×10 ⁸
2.0	0.2	9.8	6.0×10 ⁸
3.0	0.3	9.7	9.0×10 ⁸
4.0	0.4	9.6	1.2×10 ⁹
5.0	0.5	9.5	1.5×10 ⁹

5) 菌液の接種と培養

フローズンプレートは、使用約 1 時間前に冷凍庫から取り出し、室内温度に十分戻してから使用する。凍結融解の繰り返しは避けること。

接種用菌液は、滅菌リザーバーに移し 8 連マルチチャンネルピペット等で 2.5 μ l ずつフローズンプレートに接種する。これにより最終接種菌量は約 5 × 10⁴ CFU/ウェルとなる。菌液接種後、フローズンプレート用のフタ（型番：M-C314）で覆う。

菌液を接種したフローズンプレートは、表 1-2、図 3-1 に示す様に、*L. garvieae* は、22℃・44~48 時間培養、*Vibrio* spp. は 28℃・24~28 時間培養を行う。

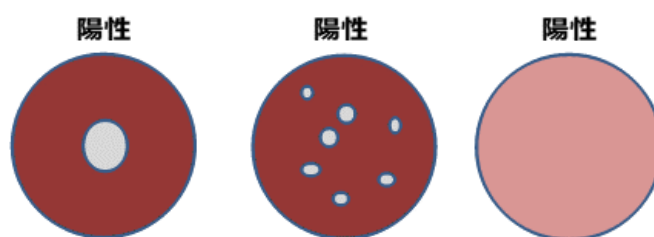
プレートを重ねて培養する場合は、各ウェルの培養温度を均一にするため、3 枚以上重ねるのは避けること。

6) 菌の増殖判定と記録

下記の判定基準に従い、明らかに菌の発育を認めたものを発育陽性、菌の発育が認められないものを発育陰性とする。菌の増殖が確認されない抗菌剤の最小濃度を確認し、その濃度を最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration: MIC）とする。

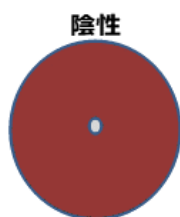
【発育陽性の判定基準】

- ①肉眼的に混濁又は直径 1 mm 以上の沈殿が認められた場合
- ②沈殿物の直径が 1 mm 未満であっても沈殿塊が 2 個以上認められた場合



【発育陰性の判定基準】

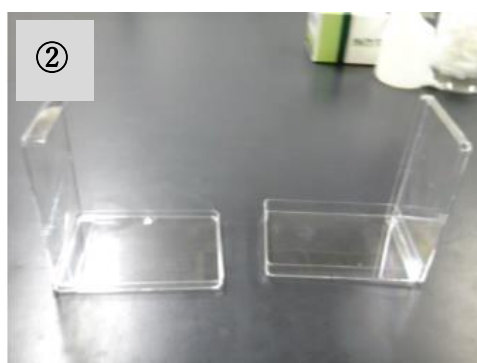
- ①肉眼的に混濁又は沈殿が認められない場合
- ②沈殿物があっても直径が 1 mm 未満で 1 個の場合



なお、菌の増殖確認時にリーディングミラーを用いると判定がしやすいが、価格の問題や資産管理のため準備するのが難しい場合がある。その場合、以下の様に簡易的かつ安価にリーディングミラーを用意することができるので紹介する（図 3-6）。



① の様にスタンドの鏡（100 円ショップで購入）と角シャーレ 2 セットを用意する。



②～④の様に角シャーレと鏡を組み立てる。



⑤の様に、プレートを上に乗せ、鏡の角度を変えて菌の発育状態を判定する。

図 3-6 簡易リーディングミラーの作り方

7) 判定

薬剤感受性試験の判定は、CLSI マニュアルが判定基準を提供している場合はそれを用いる。しかし、現在 CLSI が提供している判定基準は、*Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *F. psychrophilum* の 4 菌種のみである。

L. garvieae および *Vibrio* spp. は、CLSI の判定基準が提供されていない。現在、病魚由来細菌の薬剤感受性調査では、細菌学ブレイクポイントが採用されている。

8) 精度管理

CLSI 法に準拠した薬剤感受性試験は、精度管理が必要である。しかしながら、*L. garvieae* の培養条件の精度管理基準は CLSI から示されていない。ここでは、我々が行った試験結果を基準に暫定的な精度管理の参考値を示す（表 2-2）。

一方、*Vibrio* spp. の薬剤感受性試験条件（ミューラーヒントン寒天培地、28℃、24 時間または 48 時間）の精度管理基準は、CLSI から示されている（一部薬剤除く）（表 3-1、表 3-2）。

表 3-1 *Lactococcus garvieae* (CAMHB+2.5% LHB) の液体希釈法における精度管理用参考値

薬剤	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922		<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658	
	Modal 1 ± log2 (μg/ml)	% of MIC results within QC range	Modal 1 ± log2 (μg/ml)	% of MIC results within QC range
EM	16-32	100	4-16	100
FF	8-16	100	0.25-1	100
OTC	1-2	100	0.25-0.5	100

表 3-2 *Vibrio* spp. の液体希釈法における精度管理値

薬剤	MIC QC Ranges (μg/ml)	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658
OTC	0.5-2	0.12-1
OA	0.06-0.25	0.008-0.03

CLSI VET04, 3rd Edition 参照

9) 危険防止または取り扱い上の注意

(1) 危険防止の注意

- ①操作は全て微生物の取り扱いに習熟した人の指導の下に、バイオハザード対策を実施した上で行うこと。
- ② 検体被験菌及び培養後の菌類は全て感染の危険があるものとして十分に注意して取り扱うこと。
- ③ 感染を避けるため、検査時は使い捨て手袋を着用すること。
- ④ 口によるピペティングはしないこと。
- ⑤プレートは輸送上及び保管上-70℃の状態を維持すること。

(2) 使用上の注意

- ①試薬は指定の貯蔵方法で保存すること。
- ②使用期限を過ぎた試薬は使わないこと。
- ③プレートは汚染しないように無菌的に取り扱うこと。
- ④プレートの直射日光への暴露は抗菌剤の力価低下の原因となるため、注意すること。

(3) 廃棄上の注意

- ①使用後のプレートは、オートクレーブ等で滅菌処理した後、廃棄すること。オートクレーブを使用する場合は、蒸気を吸い込まないように注意すること。
- ②検体に接触した器具や廃液等は、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 1,000ppm 以上、1 時間以上浸漬）又はグルタルアルデヒド（2%, 1 時間以上浸漬）による消毒処理、あるいはオートクレーブ（121℃, 20 分間以上）による滅菌処理を行うこと。ただし接種機及び判定機の付属機器についてはその取扱説明書に従うこと。
- ③プレートはポリスチレン（PS）、プレートシールはポリエチレンテレフタレート（PET）、ケースは紙を主な材質としている。
- ④滅菌後のプレートや器具等は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理すること。

参考文献

- 1) 動物用抗菌剤研究会 MIC 測定法標準化委員会 (2004); 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)測定法の改定について. *Fish Pathol.*, **39**, 47-67.
- 2) Clinical and laboratory standards institute (2020); Methods for antimicrobial broth dilution and disk diffusion susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, 2nd Edition, VET03. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute.
- 3) Clinical and laboratory standards institute (2020); Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, 3rd Edition. VET03. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute.
- 4) Kronvall G, Smith P. (2016); Normalized resistance interpretation, the NRI method: Review of NRI disc test applications and guide to calculations. *APMIS.*, **124**, 1023-1030.

Appendix 水産用医薬品の薬剤感受性ディスク入手先（令和5年3月時点）

抗生物質/ 合成抗菌剤	系統名	抗菌剤名	供給元 (製造販売業者/輸入業者/製造者)	製品名	関連会社 問い合わせ先	入手方法
抗生物質	β-ラクタム系	アンピシリン(ABPC)	栄研化学(株)	KBディスクR'栄研'アン ピシリン(10μg)		医薬品等販売店を通じて販売さ れています。
	テトラサイクリン系	塩酸オキシテトラサイクリン (OTC)*	栄研化学(株)	KBディスクR'栄研' テトラサイクリン (30μg)		医薬品等販売店を通じて販売さ れています。
		アルキルトリメチルアンモニウ ムカルシウムオキシテトラサイ クリン(QTC)*		*OTC及びQTCはテトラ サイクリンで代用可能		
		塩酸ドキシサイクリン(DOX)		KBディスクR'栄研' ドキシサイクリン (30μg)		
	マクロライド系	エリスロマイシン (EM)	栄研化学(株)	KBディスクR'栄研' エリスロマイシン (15μg)		医薬品等販売店を通じて販売さ れています。
	リンコマイシン系	塩酸リンコマイシン (LCM)	栄研化学(株)	KBディスクR'栄研' リンコマイシン (2μg)		医薬品等販売店を通じて販売さ れています。
	その他	ホスホマイシン (FOM)	栄研化学(株)	KBディスクR'栄研' ホスホマイシン (50μg)		医薬品等販売店を通じて販売さ れています。
合成抗菌剤	キノロン系	オキシリン酸	栄研化学(株)	オキシリン酸ディスク (パラザン製品群用)	物産ファーマアニマルヘルス株式会社 畜水産事業部 事業プロモーションG 〒541-0053 大阪市中央区本町2-5-7 Tel: 06-4705-8067	左記連絡先へ お問い合わせください。

					https://ah.sumitomo-pharma.co.jp/	
	チアンフェニコール系	フロルフエニコール (FF)	栄研化学(株)	V K Bディスク'栄研' フロルフエニコール (30 µg)	MSD アニマルヘルス株式会社 〒102-8667 東京都千代田区九段北1-13-12 Tel : 03-6272-0770 mail : susumu.matsukura@merck.com 共立製薬株式会社 学術 〒102-0073 東京都千代田区九段北1-11-5 Tel : 03-3264-7559	左記連絡先へ お問い合わせください。

ディスク拡散法記録用紙

_____年 AMR 講習会

都道府県：

実施者：

実施日：

Lactococcus garvieae

菌株	阻止円直径(mm)		
	OTC (30μg)	EM (15μg)	FF (30μg)
<i>E. coli</i> ATCC25922			
<i>A. salmonicida</i> ATCC33658			

Vibrio spp.

菌株	阻止円直径(mm)		
	OTC (30μg)	OA (30μg)	
<i>E. coli</i> ATCC25922			
<i>A. salmonicida</i> ATCC33658			

微量液体希釈法記録用紙

_____年 AMR 講習会

都道府県：

実施者：

実施日：

*Lactococcus garvieae**E. coli* ATCC25922

(μg/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EM 128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
C	Control	Control	FFC 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control

A. salmonicida ATCC33658

(μg/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EM 128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
C	Control	Control	FFC 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control

L. garvieae _____

(μg/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EM 128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
C	Control	Control	FFC 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control

微量液体希釈法記録用紙

_____年 AMR 講習会

都道府県：

実施者：

実施日：

Vibrio spp.

E. coli ATCC25922

($\mu\text{g/ml}$)

.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OXA 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control

A. salmonicida ATCC33658

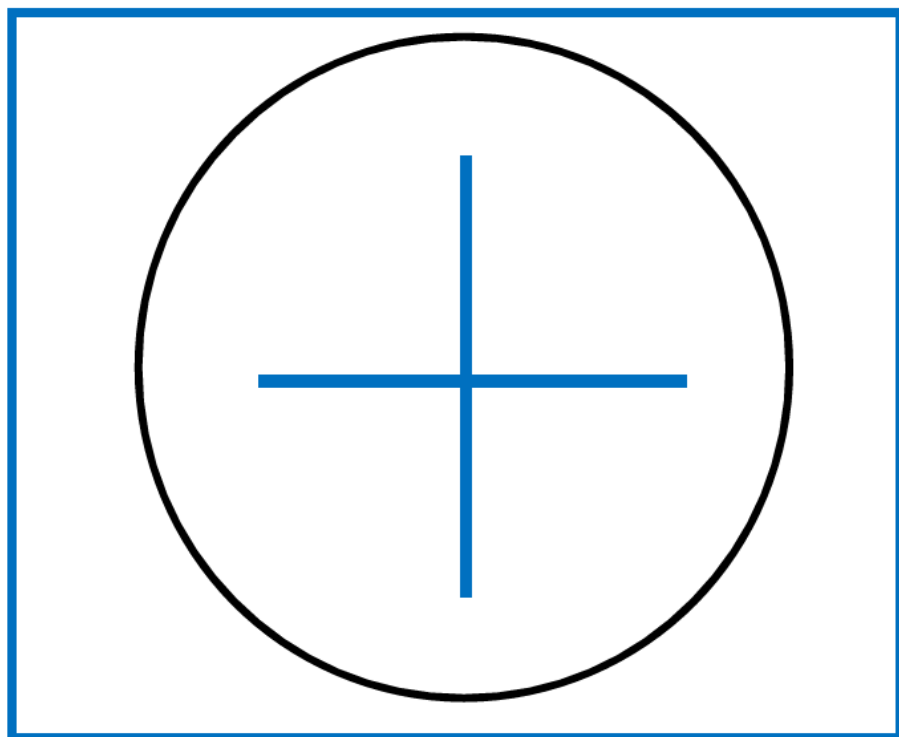
($\mu\text{g/ml}$)

.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OXA 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control

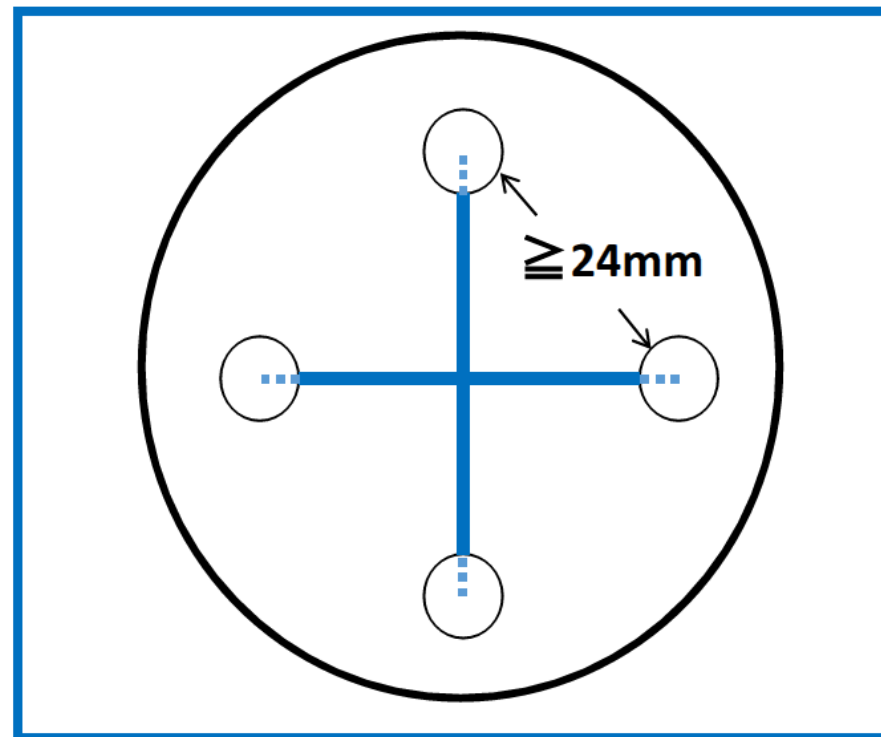
Vibrio spp. _____

($\mu\text{g/ml}$)

.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control	OTC 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control
B	Control	OXA 64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control



被検菌を接種し3～5分静置した平板
をディスク型紙に合わせて置く。



火炎滅菌したピンセットで型紙に合わせて
ディスクを置く。
ディスクはピンセットで平板に均一に密着
させる。

水産分野における薬剤耐性に関する技術研修会テキスト
水産分野における薬剤感受性試験マニュアル

2023 年 3 月 初版

2023 年 12 月 訂正版

著、編集 水産大学校 古下 学

発行 農林水産省 消費安全局