

1. 抗菌剤の抗菌力評価試験法

(1) 最小発育阻止濃度測定法 I (2018 年度版)

液体培地希釈法による MIC 測定法

1 適用範囲

本試験法は、抗菌剤のうち溶解し難い抗菌剤に適用する。

2 試験菌株¹

(1) *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 (ATCC 6538P)

(2) *Escherichia coli* NBRC 3972 (ATCC 8739)

3 試験の準備

試験で用いる薬品、器具等は特に指定がないかぎり、日本工業規格に規定するものおよび日本薬局方に規定するものを用いる。

3.1 器具、機器

(1) L 字形試験管 (蓋付ガラス製、長さ 130~140 mm、高さ 110~120 mm、外径 18 mm)

(2) 振とう培養機 (±1 °C 以内の精度で運転可能な機種)

(3) 恒温器 (±1 °C 以内の精度で運転可能な機種)

3.2 培地

(1) 普通寒天培地 (NA 培地)

肉エキス 5.0 g

ペプトン 10.0 g

塩化ナトリウム 5.0 g

寒天 15.0 g

精製水 1,000 ml

pH 7.0~7.2

(2) ミューラー・ヒントン・ブイヨン培地 (MHB 培地)²

肉抽出液 300.0 g

カザミノ酸 17.5 g

可溶性デンプン 1.5 g

精製水 1,000 ml

pH 7.3±0.1

¹ 試験菌は、グラム陽性菌またはグラム陰性菌の代表として各 1 種類を選択した。

² 日本化学療法学会の MIC 測定法では MHB 寒天培地が用いられている。MHB 培地は栄研化学 (寒天培地のみ)、DIFCO、BBL、Merck 製などがある。

4 試験方法

4.1 試験菌の培養

試験菌を普通寒天培地に移植し、 35 ± 1 °Cで24時間培養する。この培養菌をMHB培地に一白金耳量移植し、 35 ± 1 °Cで16～20時間培養する。

4.2 接種用菌液の調製

培養液をMHB培地¹を用いて希釈し、菌数が $1.0 \sim 5.0 \times 10^4$ /mlとなるように調製する。

4.3 試験用培地の調製²

滅菌したL字形試験管にMHB培地10mlと、試料^{3,4}を800 µg/mlを基準として順次2倍量または1/2倍量ずつ添加する⁵。その際培地のpHを測定し、試料添加前の培地pHの ± 0.5 の範囲に収まっていなければpH調製を行う。

このように調製した培地に接種菌液⁶0.1mlを接種する。

4.4 試験操作

試料が均一に混合されるように振とう数100～200rpm(水平振とうあるいは上下振とう)、振幅40～60mmで 35 ± 1 °Cで24時間振とう培養する。

¹ 希釈に用いたMHB培地は日本化学療法学会標準法を準用した。接種用菌液の菌数については、同標準法と同程度の接種菌数となるように設定した。

² L字形試験管は乾熱滅菌(180 °Cの場合30分間以上、170 °Cの場合60分間以上、160 °Cの場合120分間以上)、MHB培地は高圧蒸気滅菌(121 °Cで15分間)、栓は耐熱性等を考慮し、適切な方法で滅菌して試験に供すること。

³ 試料無添加のものも調製して対照試験を行うことが望ましい。

⁴ 培地に直接試料を入れるので試料由来の微生物が試験結果に影響を及ぼすことが考えられ、試料は無菌であることが望ましい。そのため滅菌が可能なものはあらかじめ試料を滅菌(滅菌方法としては乾熱滅菌以外に、高圧蒸気滅菌、ガス滅菌などがある。)しておくことが望ましい。

① 高温加熱が可能な試料

試料を180 °Cの場合30分間以上、170 °Cの場合60分間以上、160 °Cの場合120分間以上加熱して試料の滅菌および乾燥を行う。乾燥後はシリカゲルを入れたデシケータ中で放冷させる。

② 高温加熱が不可能な試料

試料を適当な方法で滅菌後、試料が変質しない温度範囲および時間内で乾燥させる。これをシリカゲルを入れたデシケータ中で放冷させる。この場合は乾燥および滅菌条件を明記する。加熱温度または時間が不十分であると*Bacillus*属の孢子が生残することがあるので注意する。

⁵ 規格値が800 µg/mlであることから、実用的には3,200、1,600、800、400、200 µg/mlを含む範囲で試験すればよい。

⁶ 日本化学療法学会標準法と同程度の菌数とするため接種菌液を0.1mlとした。

4.5 判定

培養後、肉眼観察により試験菌の発育の有無¹を調べ、発育²が認められない試料の最低濃度を最小発育阻止濃度とする。

以上

改訂：平成 30 年 12 月 11 日

本書の一部あるいは全部を無断で複写複製することは、法律で認められた場合を除き、著作権の侵害になります。

抗菌製品技術協議会

¹ 肉眼観察により試験菌の増殖が確認できる菌数はおよそ 10^6 /ml 以上である。

² 試験菌の発育の有無は肉眼観察により判定を行う。試料の濁りにより試験菌の発育の有無が判定できない場合は次の方法により判定する。培地をリン酸緩衝生理食塩水*で 10 000 倍に希釈し、白金またはニクロム線ループ（内径 1 mm）を用いて普通寒天培地に画線し、試験菌の発育の有無を調べる。

* リン酸緩衝生理食塩水：KH₂PO₄ 34 g を精製水 500 ml に溶解し、NaOH 水溶液で pH 7.2 に調整後、精製水を加えて 1 000 ml とする。この 1.25 ml を生理食塩水（0.85 % NaCl）で 1 000ml にし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。