

動物用抗菌性物質の微生物学的影響についての調査報告書

平成 29 年 3 月 17 日

一般財団法人生物科学安全研究所

調査の概要

本調査では平成 25 年度と平成 26 年度の「動物用抗菌性物質の微生物学的影響についての調査」事業で分離された *Escherichia coli*、*Enterococcus* species、*Bacteroides* species、*Bifidobacterium* species、*Lactobacillus* species、*Clostridium* species、*Fusobacterium* species、*Eubacterium* species、*Peptococcus* / *Peptostreptococcus* species、*Prevotella* species、*Propionibacterium* species のストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、スルファモイルダプソンに対する最小発育阻止濃度 (MIC) を Clinical and Laboratory Standards Institute (米国臨床検査標準委員会 (CLSI)) の方法に基づいて測定し、これらの抗菌性物質の MIC₅₀ 及び MIC_{calc} を算出した。

また、スルファモイルダプソンについては CLSI 法に加え、他の方法による MIC 測定も検討した。

目次

| | | |
|------|---|----|
| 1. | 表題 | 1 |
| 2. | 調査番号 | 1 |
| 3. | 調査目的 | 1 |
| 4. | 委託者 | 1 |
| 5. | 調査機関名 | 1 |
| 6. | 調査責任者 | 1 |
| 7. | 調査担当者 | 1 |
| 8. | 調査スケジュール | 1 |
| 8.1 | 微量液体希釈法で使用する薬剤と感受性試験用プレートの作製準備 | 1 |
| 8.2 | スルファモイルダプソンの MIC 測定法の検討 | 1 |
| 8.3 | 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定 | 2 |
| 8.4 | 報告書作成 | 2 |
| 9. | 調査の材料と方法 | 2 |
| 9.1 | MIC 測定 | 2 |
| 9.2 | SMD の MIC 測定法に関する追加検討 | 5 |
| 10. | 調査結果と考察 | 6 |
| 10.1 | 微量液体希釈 MIC 測定試験の妥当性 | 6 |
| 10.2 | 対象菌種に対する各薬剤の MIC | 6 |
| 10.3 | MIC _{calc} の算定結果 | 8 |
| 10.4 | SMD の MIC 測定法検討 | 8 |
| 11. | 参考文献 | 9 |
| 12. | 謝辞 | 11 |
| 付録 1 | CLSI が規定した通性嫌気性菌精度管理株に対するストレプトマイシン (SM)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM) 及びスルファモイルダプソン (SMD) の MIC (µg/mL) | 12 |
| 付録 2 | CLSI が規定した偏性嫌気性菌精度管理株に対する SM、DSM 及び SMD の MIC (µg/mL) | 13 |
| 付録 3 | <i>E. coli</i> に対する各薬剤の MIC | 14 |
| 付録 4 | <i>Enterococcus species</i> に対する各薬剤の MIC | 15 |
| 付録 5 | <i>Bacteroides species</i> に対する各薬剤の MIC | 16 |
| 付録 6 | <i>Fusobacterium species</i> に対する各薬剤の MIC | 17 |
| 付録 7 | <i>Eubacterium species</i> に対する各薬剤の MIC | 18 |
| 付録 8 | <i>Clostridium species</i> に対する各薬剤の MIC | 19 |

| | | |
|-------|--|----|
| 付録 9 | <i>Bifidobacterium</i> species に対する各薬剤の MIC | 20 |
| 付録 10 | <i>Prevotella</i> species に対する各薬剤の MIC | 21 |
| 付録 11 | <i>Lactobacillus</i> species に対する各薬剤の MIC | 22 |
| 付録 12 | <i>Propionibacterium</i> species に対する各薬剤の MIC | 23 |
| 付録 13 | <i>Peptococcus</i> / <i>Peptostreptococcus</i> species に対する各薬剤の MIC | 24 |
| 付録 14 | 各菌種に対するストレプトマイシンの MIC 分布 | 25 |
| 付録 15 | 各菌種に対するジヒドロストレプトマイシンの MIC 分布 | 26 |
| 付録 16 | CLSI 法に準拠して測定した各菌種に対するスルファモイルダプソンの MIC 分布 | 27 |
| 付録 17 | ストレプトマイシンの MIC _{calc} の算定結果 | 28 |
| 付録 18 | ジヒドロストレプトマイシンの MIC _{calc} の算定結果 | 29 |
| 付録 19 | スルファモイルダプソンの MIC _{calc} の算定結果 | 30 |
| 付録 20 | <i>Escherichia coli</i> に対するミューラヒントン培地及び CTG 培地を用いたスルファモイルダプソンの MIC の比較 | 31 |
| 付録 21 | <i>Enterococcus</i> species に対するミューラヒントン培地及び CTG 培地を用いたスルファモイルダプソンの MIC の比較 | 31 |
| 付録 22 | 偏性嫌気性菌の 5%馬血液加-CTG 培地における発育試験結果 | 32 |
| 付録 23 | <i>Clostridium</i> species に対する馬血液加 CTG 培地と羊血液加ブルセラ培地を用いたスルファモイルダプソンの MIC 分布 | 32 |

1. 表題

動物用抗菌性物質の微生物学的影響についての調査

2. 調査番号

16-032

3. 調査目的

動物用医薬品及び飼料添加物における抗菌性物質の食品健康影響評価における微生物学的影響評価に用いるため、ヒト（健常者）由来腸内細菌における動物用抗菌性物質の MIC (最小発育阻止濃度)について調査する。

4. 委託者

内閣府 食品安全委員会事務局 評価第二課

5. 調査機関名

一般財団法人生物科学安全研究所 事業部
神奈川県相模原市緑区橋本台 3-7-11
電話: 042-762-2775

6. 調査責任者

理事長 濱岡隆文

7. 調査担当者

事業部 主任研究員 馬場光太郎
事業部 首席研究員 丸山賀子
事業部 主任技術員 宮澤和歌子
参与 宮崎 茂
参与 甲斐明美

8. 調査スケジュール

8.1 微量液体希釈法で使用する薬剤と感受性試験用プレート作製準備

平成 28 年 5 月 10 日～平成 28 年 10 月 25 日

8.2 スルファモイルダプソンの MIC 測定法の検討

平成 28 年 6 月 1 日～平成 28 年 11 月 30 日

8.3 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

- (1) MIC 測定 平成 28 年 11 月 1 日～平成 29 年 1 月 31 日
(2) MIC₅₀ 算定 平成 29 年 2 月 1 日～平成 29 年 2 月 14 日

8.4 報告書作成 平成 29 年 2 月 23 日～平成 29 年 3 月 17 日

9. 調査の材料と方法

9.1 MIC 測定

表 1 のストレプトマイシン (SM)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、スルファモイルダプソン (SMD) の表 2 に記載されている通性嫌気性菌 2 菌種と偏性嫌気性菌 9 菌種の総計 293 株に対する MIC を CLSI 法 (2011) と CLSI 法 (2012) に記載されている方法に準拠して微量液体希釈法で測定した。なお、*Fusobacterium species* 25 株中 13 株の MIC は、寒天平板希釈法で測定した。

表 1 MIC 測定用抗菌性物質

| 番号 | 物質名 | 英名 |
|----|---------------------|---------------------|
| 1 | ストレプトマイシン (SM) | Streptomycin |
| 2 | ジヒドロストレプトマイシン (DSM) | Dihydrostreptomycin |
| 3 | スルファモイルダプソン (SMD) | Sulfamoyldapsone |

表 2 対象菌種及び菌株数

| | 対象菌種 | 株数 |
|--------|--|-----|
| 通性嫌気性菌 | <i>Escherichia coli</i> | 30 |
| | <i>Enterococcus species</i> | 30 |
| 偏性嫌気性菌 | <i>Bacteroides species</i> | 30 |
| | <i>Fusobacterium species</i> | 25 |
| | <i>Eubacterium species</i> (<i>Eggerthella</i> を含む) | 12 |
| | <i>Clostridium species</i> | 28 |
| | <i>Bifidobacterium species</i> | 30 |
| | <i>Prevotella species</i> | 28 |
| | <i>Lactobacillus species</i> | 30 |
| | <i>Propionibacterium species</i> | 30 |
| | <i>Peptococcus species</i> / <i>Peptostreptococcus species</i> | 20 |
| | 計 | 293 |

9.1.1 微量液体希釈法

微量液体希釈法による測定に用いた薬剤感受性試験用フローズンプレート（以後「薬剤プレート」と略）は栄研化学株式会社に作製を外注した。プレートの各薬剤濃度はすべての薬剤で 0.063、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32、64、128 µg/mL とした。

(1) 通性嫌気性菌

CLSI 法 (2011)で規定している精度管理株 *Staphylococcus aureus* ATCC29213、*Enterococcus faecalis* ATCC29212、*Escherichia coli* ATCC25922、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 に対する 3 薬剤 (表 1) の MIC を測定した。

トリプトソイブロス（栄研化学株式会社）で培養した新鮮培養菌体を滅菌生理食塩水 1 mL に McFarland 1 の濁度で浮遊させた。さらに滅菌生理食塩水 9 mL と混合し、菌液トレイに流し込み、96 ピンの接種器を用いて薬剤プレートに接種した。最終接種菌量は 5×10^4 CFU/well とした。培養条件は表 3 に記載した。

(2) 偏性嫌気性菌

CLSI 法 (2012)で規定している精度管理株 *Bacteroides fragilis* ATCC 25285、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741、*Eubacterium (Eggerthella) lentum* ATCC43055、*Clostridium difficile* ATCC 700057 に対する 3 薬剤 (表 1) の MIC を測定した。

5%馬血液加 BL 寒天培地（日水製薬株式会社）に培養した新鮮培養菌体を ABCM ブイヨン（栄研化学株式会社） 1 mL に McFarland 2 の濁度に調整し浮遊させた。さらに滅菌生理食塩水 9 mL に混合し 10 倍希釈した。菌液調整後できるだけ早く、菌液 10 mL を菌液トレイに流し込み、96 ピンの接種器にて薬剤プレートに接種した。最終接種菌量は 1×10^5 CFU/well とした。培養条件は表 3 に記載した。

表 3 各菌種の微量液体希釈法での MIC 測定条件

| 対象菌種 | 使用培地 | 培養条件 | 温度、時間 |
|--------|---|------|-----------------|
| 通性嫌気性菌 | ミューラヒントンブロス (Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺ 添加) | 好気 | 36°C 20時間 |
| 偏性嫌気性菌 | 5%羊溶血加ブルセラブロス (ビタミンK1、ヘミン添加) | 嫌気 | 36°C 42-48時間 |

(3) MIC 判定

菌の発育が認められない最小の薬剤濃度を MIC とした。判定基準は「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」と「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」は発育しているものとした。

9.1.2 寒天平板希釈法

微量液体法によって MIC を測定した際、各希釈列の薬剤を含有したウェルだけではなく、薬剤を含有していないコントロールウェルでも発育が認められなかった *Fusobacterium species* 25 株中 13 株の MIC を寒天平板希釈法で測定した。SM と DSM の溶解は常温の滅菌蒸留水を用いた。SMD の溶解は 100°C の滅菌蒸留水を 1/2 量加えた後、2.5N-NaOH を薬剤が溶解するまで滴下し、蒸留水でメスアップした（動物用抗菌剤研究会 2003）。MIC 測定は CLSI 法 (2012) に準拠した。

9.1.3 MIC₅₀ 及び MIC_{calc} の算出

VICH（動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力会議）の GL36 (2013) に記載されている算出方法に準拠し、MIC₅₀、MIC_{calc} を算出した。

9.1.4 MIC₅₀ と Lower 90% Confidence Limit の計算

各対象菌種に対する各薬剤の MIC 値より MIC₅₀ を算出した。物質ごとに Lower 90% Confidence Limit (Lower 90% CL) を計算した。

$$\text{Lower 90\% CL} = \text{Mean MIC}_{50} - \frac{\text{Std Dev}}{\sqrt{n}} \times t_{0.10 \text{ df}}$$

Mean MIC₅₀: Log₂(各対象菌種に対する MIC₅₀) – Log₂(minimum MIC₅₀ / 2) の平均

Std Dev: Log₂(各菌種に対する MIC₅₀) – Log₂(minimum MIC₅₀ / 2) の標準偏差

t_{0.10}: t 分布 片側検定

df: 自由度 = n-1

9.1.5 MIC_{calc} の計算

薬剤毎に MIC_{calc} を計算した。

$$\text{MIC}_{\text{calc}} = 2^{(\text{Lower 90\% CL} + \text{Log}_2(\text{minimum MIC}_{50}/2))}$$

MIC_{calc} は小数点以下第 4 位まで求めた後、四捨五入して、小数点以下第 3 位まで表示した。MIC₅₀ が 128 µg/mL 以上の場合は R とし、計算対象外とした。また、MIC₅₀ が 0.063 µg/mL 以下のものは 0.03125 µg/mL として計算した。

9.2 SMD の MIC 測定法に関する追加検討

CLSI 法 (2011) で使用するミューラヒントン培地 (M-H 培地) 以外の培地として、表 4 に示す主に Casamino Acids (カザミノ酸)、Tryptophan (トリプトファン)、Glucose (ブドウ糖) で組成された培地 (以下「CTG 培地」という。) を用いて SMD の MIC 測定を試みた。

表 4 ミューラヒントン培地 (M-H 培地) と CTG 培地の組成比較

| | ミューラヒントン培地 | CTG 培地 |
|-----|------------------------------------|-----------------------------|
| 窒素源 | 牛肉エキス粉末 3.0 g カゼイン酸化水分解物 17.5 g | カザミノ酸 2 g トリプトファン 10 mg |
| 炭素源 | 澱粉 1.5 g | ブドウ糖 2 g |
| その他 | | ニコチン酸 1 mg チアミン塩酸塩 10 mg |

9.2.1 CTG 培地を用いた大腸菌に対する MIC 測定

CTG 培地を用いて大腸菌に対する MIC を寒天平板法で測定した。接種菌濃度、培養温度と培養時間は CLSI 法 (2011) に準拠した。さらに、pH7.0 に調整した 1% ペプトンブロスで前培養し、この培養液を 1% ペプトンブロスで 100 倍希釈して、接種菌量を CLSI 法 (2011) で規定されている 1/100 量の 5×10^3 CFU/spot まで減少させ、CTG 培地に接種して MIC を測定した。培養温度と培養時間は CLSI 法 (2011) に準拠した。

9.2.2 CTG 培地を用いた腸球菌に対する MIC 測定

CTG 培地を用いて、腸球菌に対する MIC を寒天平板法で測定した。接種菌濃度と培養温度、培養時間は CLSI 法 (2011) に記載されている方法に準拠した。培養時間は CLSI 法 (2012) で規定されている 20 時間に加え、24 時間、28 時間、44 時間でも MIC を判定した。

また、腸球菌は、フォリン酸を培地に添加すると発育が促進される可能性があることが報告されている (Zervos and Schaberg 1985) ことから、ろ過滅菌したフォリン酸液を $10 \mu\text{g/mL}$ となるように添加した CTG 培地も用いて MIC を測定した。

9.2.3 CTG 培地を用いた偏性嫌気性菌に対する MIC 測定

偏性嫌気性菌 9 菌種の各菌 15 株を 5% 馬脱繊維血液添加 CTG 培地に塗抹後直ぐに、アネロパック嫌気を用いて 37°C で 48 時間嫌気培養し、発育の有無を確認した。

その後、5%馬脱纖維血液加 CTG 培地を用いて *Clostridium species* に対する MIC を測定した。接種菌量、培養温度、培養時間は CLSI 法（2012）に準拠した。

10. 調査結果と考察

10.1 微量液体希釈法による MIC 測定の妥当性

10.1.1 通性嫌気性菌

Staphylococcus aureus ATCC29213、*Enterococcus faecalis* ATCC29212、*Escherichia coli* ATCC25922、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 を精度管理株として使用し、各菌株に対する SM、DSM、SMD の MIC を付録 1 に示した。精度管理株の MIC を 2 回測定したが、どの薬剤も MIC の変動は希釈倍率 1 管以内に収まった。本年度調査対象の 3 薬剤は CLSI 法（2011）に精度管理値が規定されていないが、DSM については動物用抗菌剤研究会（2003）が上記 4 菌株の精度管理参考値を設定しており、今回測定した MIC 値は全てこの管理参考値内で測定された。

10.1.2 偏性嫌気性菌

Bacteroides fragilis ATCC 25285、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741、*Eggerthella lenta* ATCC43055、*Clostridium difficile* ATCC 700057 を精度管理株とし、各菌株に対する SM、DSM、SMD の MIC を付録 2 に示した。通性嫌気性菌と同様に 3 薬剤は CLSI 法（2012）に精度管理値が規定されていない。しかしながら、*Bacteroides fragilis* ATCC 25285、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741 及び *Clostridium difficile* ATCC 700057 の MIC 値は $>128 \mu\text{g/mL}$ であった。*Bacteroides species* と *Clostridium species* に対する SM、DSM への MIC は $>128 \mu\text{g/mL}$ であるとの報告があり（Ingham 1968、Bryan 1979、Pirs 2013）、本調査での MIC もこれらの報告と同様の結果となった。

10.2 対象菌種に対する各薬剤の MIC

10.2.1 各薬剤の各菌種に対する MIC

各菌種に対する各薬剤の MIC を付録 3～13 に示した。

10.2.2 各薬剤の各菌種 MIC 分布表

各薬剤の各菌種に対する MIC 分布を付録 14～16 に示した。

10.2.3 MIC₅₀の測定結果

3 薬剤の各菌種に対する MIC₅₀ を表 5 に示した。

表 5 各菌種に対する各薬剤の MIC₅₀

| 物質名 | MIC ₅₀ (μg/mL) | | | | | | | | | | |
|---------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------------|---|
| | 通性嫌気性菌 | | 偏性嫌気性菌 | | | | | | | | |
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Enterococcus</i> species. | <i>Bacteroides</i> species | <i>Fusobacterium</i> species | <i>Eubacterium</i> species | <i>Clostridium</i> species | <i>Bifidobacterium</i> species | <i>Prevotella</i> species | <i>Lactobacillus</i> species | <i>Propionibacterium</i> species | <i>Peptococcus</i> / <i>Peptostreptococcus</i> species |
| ストレプトマイシン | 4 | 32 | >128 | 64 | 128 | >128 | 8 | 16 | 16 | 8 | >128 |
| ジヒドロストレプトマイシン | 4 | 32 | >128 | 64 | 128 | 128 | 4 | 8 | 16 | 4 | >128 |
| スルファモイルダブゾン | >128 | >128 | >128 | >128 | 128 | >128 | >128 | >128 | >128 | 128 | >128 |

10.3 MIC_{calc} の算定結果

SM の MIC_{calc} は 8.724、DSM の MIC_{calc} は 5.848 であった。SMD の MIC_{calc} 値は全ての菌種の MIC₅₀ 値が $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ であったため、MIC_{calc} は算出できなかった。各薬剤の計算式と結果を付録 17~19 に示した。

10.4 SMD の MIC 測定に関する検討結果

10.4.1 CTG 培地を用いた大腸菌に対する MIC 測定結果

M-H 培地と CTG 培地を用いて測定した大腸菌の MIC は $>128 \mu\text{g/mL}$ であり、両培地で発育の差は見られなかった（付録 20）。大腸菌の発育速度は好気状態で発育に適した温度で培養すると、培地の炭素源の量に依存して発育速度が異なることが報告されている (Marr 1991)。2 つの培地での炭素源量には顕著な差は見られないことから（表 4）、CTG 培地を用いても発育の速度に差がなかったと推定した。

CTG 培地の窒素源は M-H 培地の約 1/10 量であった（表 4）が、大腸菌は 20 時間で発育した。CTG 培地はカザミノ酸とトリプトファンを含有していて大腸菌発育に必要な窒素を大腸菌に十分量供給したため SMD が抗菌作用を発揮する前に、感受性菌が増殖した可能性がある。

菌の発育を遅らせるために接種菌量を 1/100 にして MIC を測定したが、数値の変動は観察されなかった。サルファ剤の MIC 測定においては、接種する菌量により MIC は大きく変動すると報告されている（藤井 1973）。サルファ剤感受性大腸菌はサルファ剤への MIC 測定培地に接種後 4 時間は発育を続け、一度増殖した菌は培地上に残存し、増殖したと判定されるため、接種菌量は 10^4CFU/spot 以下にすべきであると報告されている（藤井 1973）。本検討では 10^3CFU/spot の菌量を接種したが、MIC に変化は認められなかった。

培地、培養時間、接種菌量を変更しても大腸菌に対する SMD の MIC は変動が認められなかった。

10.4.2 CTG 培地を用いた腸球菌に対する SMD の MIC 測定結果

ATCC 株を含めた全ての腸球菌株は培養開始後 20 時間で CTG 培地上では発育しなかったが、全腸球菌株は培養開始後 44 時間で発育し、MIC は $>128 \mu\text{g/mL}$ であった（付録 21）。腸球菌は大腸菌と比較して、発育のための栄養要求は高く、アミノ酸要求量も多い (Murray 1993)。CTG 培地は M-H 培地と比較してアミノ酸の供給源は 1 割程度であり（表 4）、腸球菌成長のためのアミノ酸量を十分に供給できないため、CTG 培地での発育は M-H 培地での発育より遅延したと推定した。

フォリン酸添加 CTG 培地での腸球菌に対する MIC はフォリン酸無添加の培地と同様に、接種後 20、24、28 時間では発育せず、44 時間で発育が確認でき、全株の MIC は $>128\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。フォリン酸はサルファ剤の腸球菌における葉酸生成阻害を適度に抑制すると報告されている (Bourne ら 2014)。発育の遅延原因はサルファ剤の葉酸生成阻害ではなく、発育のためのアミノ酸量が十分供給されず、腸球菌の CTG 培地での発育は M-H 培地での発育より遅延したと推定した。

培養時間、培地と培地への添加物を変更しても腸球菌に対する SMD の MIC は M-H 培地と比較し変動がみられなかった。

10.4.3 CTG 培地を用いた偏性嫌気性菌に対する SMD の MIC 測定結果

薬剤を添加していない 5%馬血液加 CTG 培地における発育試験の結果を付録 22 に示した。*Clostridium species* 以外の偏性嫌気性菌の血液加 CTG 培地における発育は不良であった。偏性嫌気性菌は一般的に発育に金属、ポルフィン、ビタミン等が必要で、発育のための要求性が高い (Varel and Bryant 1974、Morgenstein ら 1980、Eschenbach ら 1989)。CTG 培地はそれらの物質を含有しておらず、偏性嫌気性菌の発育が不良であったと推定した。

5%馬血液加 CTG 培地で発育した *Clostridium species* の MIC 測定結果を付録 23 に示した。MIC₅₀ は $64\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、CLSI 法 (2012) にて規定されている羊血液加ブルセラ培地での MIC₅₀ の $>128\mu\text{g}/\text{mL}$ と異なった。本調査で供試した *Clostridium species* 以外の偏性嫌気菌株は CTG 培地では発育なしか、発育微弱であった。

11. 参考文献

Bourne CR, Wakeham N, Webb N, Nammalwar B, Bunce RA, Berlin KD, Barrow WW. The structure and competitive substrate inhibition of dihydrofolate reductase from *Enterococcus faecalis* reveal restrictions to cofactor docking. *Biochemistry*, 2014, 53(7): 1228-1238.

Bryan LE, Kowand SK, Van Den Elzen HM. Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, 15(1): 7-13.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First informational Supplement, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of

Anaerobic Bacteria; Approved Standard Eighth Edition, 2012.

Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, Holmes KK. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol, 1989, 27(2): 251-256.

Ingham HR, Selkon JB, Codd AA, Hale JH. A study in vitro of the sensitivity to antibiotics of *Bacteroides fragilis*. J Clin Pathol, 1968, 21(4):432-436.

Marr AG. Growth rate of *Escherichia coli*. Microbiol Rev, 1991, 55(2): 316-333.

Morgenstein AA, Citron DM, Finegold SM. New medium selective for *Fusobacterium* species and differential for *Fusobacterium necrophorum*. J Clin Microbiol, 1981, 13(4): 666-669.

Murray BE, Singh KV, Ross RP, Heath JD, Dunny GM, Weinstock GM. Generation of restriction map of *Enterococcus faecalis* OG1 and investigation of growth requirements and regions encoding biosynthetic function. J Bacteriol, 1993, 175(16): 5216-5223.

Pirš T, Avberšek J, Zdovc I, Krt B, Andlovic A, Lejko-Zupanc T, Rupnik M, Ocepek M. Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. Med Microbiol, 2013, 62(Pt 9): 1478-1485.

Varel VH, Bryant MP. Nutritional features of *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. Appl Microbiol, 1974, 28(2): 251-257.

Veterinary International Conference on Harmonization Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: General Approach to Establish a Microbiological ADI GL36 2013

Zervos MJ, Schaberg DR. Reversal of the in vitro susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid. Antimicrob Agents Chemother, 1985, 28(3): 446-448.

動物用抗菌剤研究会. 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). 動物抗菌会報 2003. 25: 49-73.

藤井 良知 Sulfamethoxazole と Trimethoprim の感受性測定法. *Chemotherapy*, 1973, 21 (2): 67-76

12. 謝辞

SMD の MIC 測定に関して貴重な御助言を頂いた池康嘉群馬大学名誉教授に深く感謝します。

付録1 CLSIが規定した通性嫌気性菌精度管理株に対するストレプトマイシン (SM)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM) 及びスルファモイルダブゾン(SMD) のMIC (µg/mL)

| | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Escherichia coli</i> | | |
|-----|------------------------------|-----|------|-------------------------------|-----|------|
| | ATCC 29213 | | | ATCC 25922 | | |
| | SM | DSM | SMD | SM | DSM | SMD |
| 1回目 | 4 | 4 | >128 | 4 | 2 | >128 |
| 2回目 | 4 | 4 | >128 | 4 | 2 | >128 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | |
| | ATCC 29212 | | | ATCC 27853 | | |
| | SM | DSM | SMD | SM | DSM | SMD |
| 1回目 | 32 | 32 | >128 | 8 | 8 | >128 |
| 2回目 | 32 | 32 | >128 | 16 | 16 | >128 |

動物用抗菌剤研究会 (2003)が規定した DSMへの精度管理参考値 *S.aureus* : (1-8 µg/mL)、*E.coli* : (1-4 µg/mL)、*E.faecalis* : (16-64 µg/mL)、*P.aeruginosa* : (4-32 µg/mL)

付録2 CLSIが規定した偏性嫌気性菌精度管理株に対するSM、DSM 及びSMDのMIC (μg/mL)

| | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | | | <i>Clostridium difficile</i> | | |
|-----|-------------------------------------|------|------|------------------------------|------|------|
| | ATCC 29741 | | | ATCC 700057 | | |
| | SM | DSM | SMD | SM | DSM | SMD |
| 1回目 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 |
| 2回目 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 |
| 3回目 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 |
| | <i>Bacteroides fragilis</i> | | | <i>Eggerthella lenta</i> | | |
| | ATCC 25285 | | | ATCC 43055 | | |
| | SM | DSM | SMD | SM | DSM | SMD |
| 1回目 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 |
| 2回目 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 |
| 3回目 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 |

付録3 *E. coli*に対する各薬剤のMIC

| MIC (μg/mL) | | | |
|-------------|------|------|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | 8 | 8 | >128 |
| 2 | 4 | 2 | >128 |
| 3 | 4 | 4 | >128 |
| 4 | 4 | 4 | >128 |
| 5 | 4 | 4 | >128 |
| 6 | 4 | 4 | >128 |
| 7 | 4 | 4 | >128 |
| 8 | 4 | 4 | >128 |
| 9 | 4 | 4 | >128 |
| 10 | 4 | 4 | >128 |
| 11 | 4 | 2 | >128 |
| 12 | 4 | 4 | >128 |
| 13 | 4 | 4 | >128 |
| 14 | 32 | 64 | >128 |
| 15 | 4 | 2 | >128 |
| 16 | 4 | 4 | >128 |
| 17 | 4 | 4 | >128 |
| 18 | 4 | 4 | >128 |
| 19 | 8 | 4 | >128 |
| 20 | 32 | 64 | >128 |
| 21 | 8 | 4 | >128 |
| 22 | 4 | 4 | >128 |
| 23 | 2 | 2 | >128 |
| 24 | 4 | 8 | >128 |
| 25 | >128 | >128 | >128 |
| 26 | 4 | 4 | >128 |
| 27 | 8 | 32 | >128 |
| 28 | 8 | 8 | >128 |
| 29 | 4 | 4 | >128 |
| 30 | 8 | 8 | >128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダプソン

付録4 *Enterococcus species* に対する各薬剤の MIC

| MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|--------------------------|------|------|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | 32 | 32 | >128 |
| 2 | 8 | 8 | >128 |
| 3 | 32 | 32 | >128 |
| 4 | 32 | 32 | >128 |
| 5 | 32 | 32 | >128 |
| 6 | 32 | 32 | >128 |
| 7 | 16 | 32 | >128 |
| 8 | 32 | 32 | >128 |
| 9 | 16 | 32 | >128 |
| 10 | >128 | >128 | >128 |
| 11 | 32 | 32 | >128 |
| 12 | 32 | 32 | >128 |
| 13 | 32 | 32 | >128 |
| 14 | 32 | 32 | >128 |
| 15 | 32 | 32 | >128 |
| 16 | 32 | 32 | >128 |
| 17 | 8 | 8 | >128 |
| 18 | 16 | 16 | >128 |
| 19 | 32 | 32 | >128 |
| 20 | 16 | 16 | >128 |
| 21 | 32 | 32 | >128 |
| 22 | 16 | 16 | >128 |
| 23 | 32 | 32 | >128 |
| 24 | 8 | 16 | >128 |
| 25 | 16 | 16 | >128 |
| 26 | 128 | 128 | >128 |
| 27 | >128 | >128 | >128 |
| 28 | 8 | 16 | >128 |
| 29 | 32 | 32 | >128 |
| 30 | 32 | 32 | >128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダブソン

付録5 *Bacteroides species*に対する各薬剤のMIC

| MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|--------------------------|------|------|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | >128 | >128 | >128 |
| 2 | >128 | >128 | >128 |
| 3 | 32 | 64 | >128 |
| 4 | >128 | >128 | >128 |
| 5 | >128 | >128 | >128 |
| 6 | >128 | >128 | >128 |
| 7 | >128 | 128 | >128 |
| 8 | >128 | >128 | >128 |
| 9 | 128 | 128 | >128 |
| 10 | >128 | >128 | >128 |
| 11 | 128 | 64 | 64 |
| 12 | >128 | >128 | >128 |
| 13 | >128 | >128 | >128 |
| 14 | >128 | >128 | >128 |
| 15 | >128 | 128 | >128 |
| 16 | >128 | >128 | >128 |
| 17 | >128 | >128 | >128 |
| 18 | 64 | 64 | 128 |
| 19 | >128 | >128 | >128 |
| 20 | >128 | 128 | >128 |
| 21 | >128 | >128 | >128 |
| 22 | >128 | 128 | >128 |
| 23 | 128 | 64 | >128 |
| 24 | >128 | >128 | >128 |
| 25 | >128 | >128 | >128 |
| 26 | >128 | >128 | >128 |
| 27 | >128 | >128 | >128 |
| 28 | >128 | >128 | >128 |
| 29 | 128 | >128 | >128 |
| 30 | 128 | 64 | >128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダプソン

付録6 *Fusobacterium species* に対する各薬剤の MIC

| MIC (μg/mL) | | | |
|-------------|------|------|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | 64 | 64 | >128 |
| 2 | >128 | 128 | >128 |
| 3 | 16 | 16 | >128 |
| 4 | 8 | 16 | >128 |
| 5 | 16 | 16 | >128 |
| 6 | 32 | 32 | >128 |
| 7 | 128 | 64 | >128 |
| 8 | >128 | >128 | >128 |
| 9 | 16 | 16 | 64 |
| 10 | 1 | 2 | >128 |
| 11 | 64 | 64 | >128 |
| 12 | 64 | 64 | >128 |
| 13 | 64 | 64 | >128 |
| 14 | >128 | >128 | >128 |
| 15 | >128 | >128 | >128 |
| 16 | 64 | 128 | 64 |
| 17 | >128 | >128 | >128 |
| 18 | 16 | 16 | 64 |
| 19 | 32 | 16 | 128 |
| 20 | 128 | 64 | >128 |
| 21 | >128 | >128 | >128 |
| 22 | 16 | 16 | >128 |
| 23 | 4 | 4 | >128 |
| 24 | >128 | >128 | >128 |
| 25 | 128 | 128 | >128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダプソン

付録7 *Eubacterium species*に対する各薬剤のMIC

| MIC (μg/mL) | | | |
|-------------|------|------|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | >128 | >128 | 32 |
| 2 | >128 | >128 | 16 |
| 3 | >128 | 128 | 16 |
| 4 | >128 | >128 | 128 |
| 5 | 16 | 16 | >128 |
| 6 | 128 | >128 | >128 |
| 7 | 8 | 8 | >128 |
| 8 | >128 | >128 | 128 |
| 9 | 8 | 8 | >128 |
| 10 | >128 | >128 | 128 |
| 11 | 8 | 8 | 128 |
| 12 | 1 | 1 | >128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダブソン

付録8 *Clostridium species*に対する各薬剤のMIC

| MIC (μg/mL) | | | |
|-------------|------|------|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | >128 | 128 | >128 |
| 2 | >128 | 128 | >128 |
| 3 | 128 | 128 | >128 |
| 4 | 32 | 32 | >128 |
| 5 | >128 | >128 | >128 |
| 6 | >128 | >128 | >128 |
| 7 | >128 | >128 | >128 |
| 8 | >128 | >128 | >128 |
| 9 | 64 | 32 | >128 |
| 10 | 128 | 128 | >128 |
| 11 | >128 | >128 | >128 |
| 12 | >128 | >128 | >128 |
| 13 | >128 | >128 | >128 |
| 14 | >128 | 128 | >128 |
| 15 | 16 | 8 | >128 |
| 16 | >128 | >128 | >128 |
| 17 | >128 | >128 | >128 |
| 18 | >128 | >128 | >128 |
| 19 | 16 | 128 | >128 |
| 20 | 64 | 16 | >128 |
| 21 | 128 | 64 | >128 |
| 22 | 8 | 8 | >128 |
| 23 | >128 | >128 | >128 |
| 24 | >128 | >128 | >128 |
| 25 | 64 | 32 | >128 |
| 26 | 128 | 128 | >128 |
| 27 | 8 | 8 | >128 |
| 28 | >128 | 128 | >128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダプソン

付録9 *Bifidobacterium* speciesに対する各薬剤のMIC

| MIC (μg/mL) | | | |
|-------------|------|------|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | >128 | >128 | >128 |
| 2 | 16 | 8 | 32 |
| 3 | 4 | 1 | >128 |
| 4 | >128 | >128 | >128 |
| 5 | 2 | 1 | >128 |
| 6 | 4 | 4 | 32 |
| 7 | 8 | 4 | 128 |
| 8 | 2 | 4 | 16 |
| 9 | 8 | 4 | 128 |
| 10 | 16 | 16 | 32 |
| 11 | 16 | 4 | 8 |
| 12 | 128 | 128 | 16 |
| 13 | 32 | 16 | 64 |
| 14 | 1 | 1 | >128 |
| 15 | 4 | 4 | 128 |
| 16 | >128 | >128 | >128 |
| 17 | 1 | 0.5 | 128 |
| 18 | 8 | 4 | 128 |
| 19 | >128 | >128 | >128 |
| 20 | 32 | 32 | >128 |
| 21 | 1 | 0.5 | >128 |
| 22 | 4 | 2 | >128 |
| 23 | 2 | 1 | 64 |
| 24 | 1 | 0.5 | >128 |
| 25 | >128 | >128 | >128 |
| 26 | 4 | 1 | >128 |
| 27 | >128 | >128 | >128 |
| 28 | 2 | 1 | >128 |
| 29 | 8 | 4 | >128 |
| 30 | 8 | 4 | 128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダプソン

付録10 *Prevotella species*に対する各薬剤のMIC

| MIC (μg/mL) | | | |
|-------------|------|------|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | 16 | 16 | >128 |
| 2 | 16 | 16 | >128 |
| 3 | 8 | 8 | 128 |
| 4 | 2 | 2 | 128 |
| 5 | 32 | 4 | >128 |
| 6 | 128 | 64 | >128 |
| 7 | 4 | 4 | >128 |
| 8 | 1 | 1 | >128 |
| 9 | 1 | 1 | >128 |
| 10 | 16 | 16 | >128 |
| 11 | 8 | 4 | 32 |
| 12 | 1 | 2 | 64 |
| 13 | 4 | 8 | 64 |
| 14 | 1 | 1 | 128 |
| 15 | 32 | 32 | >128 |
| 16 | 4 | 2 | 32 |
| 17 | 128 | 64 | 32 |
| 18 | >128 | >128 | >128 |
| 19 | >128 | >128 | >128 |
| 20 | 128 | 128 | >128 |
| 21 | 1 | 1 | >128 |
| 22 | 4 | 8 | >128 |
| 23 | 32 | 32 | >128 |
| 24 | 128 | 128 | >128 |
| 25 | >128 | >128 | >128 |
| 26 | 32 | 32 | >128 |
| 27 | 4 | 4 | >128 |
| 28 | 64 | 64 | >128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダプソン

付録11 *Lactobacillus* speciesに対する各薬剤のMIC

| MIC (μg/mL) | | | |
|-------------|------|------|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | 8 | 16 | >128 |
| 2 | 16 | 16 | >128 |
| 3 | 32 | 32 | >128 |
| 4 | >128 | >128 | >128 |
| 5 | 16 | 16 | >128 |
| 6 | 16 | 16 | >128 |
| 7 | >128 | >128 | >128 |
| 8 | 16 | 32 | >128 |
| 9 | 64 | 64 | >128 |
| 10 | 8 | 16 | >128 |
| 11 | 8 | 16 | >128 |
| 12 | 8 | 16 | >128 |
| 13 | 16 | 16 | >128 |
| 14 | 8 | 16 | >128 |
| 15 | 16 | 16 | >128 |
| 16 | 16 | 16 | >128 |
| 17 | 8 | 16 | >128 |
| 18 | 64 | 128 | >128 |
| 19 | 8 | 16 | >128 |
| 20 | 8 | 16 | >128 |
| 21 | 1 | 1 | >128 |
| 22 | >128 | >128 | >128 |
| 23 | 1 | 0.5 | >128 |
| 24 | 8 | 16 | >128 |
| 25 | 64 | 64 | >128 |
| 26 | 4 | 4 | >128 |
| 27 | 1 | 0.5 | >128 |
| 28 | 4 | 4 | >128 |
| 29 | 64 | 64 | >128 |
| 30 | 16 | 16 | >128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダプソン

付録 12 *Propionibacterium* species に対する各薬剤の MIC

| MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|--------------------------|----|-----|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | 8 | 4 | >128 |
| 2 | 8 | 4 | 128 |
| 3 | 8 | 4 | 128 |
| 4 | 4 | 4 | 128 |
| 5 | 8 | 8 | >128 |
| 6 | 4 | 4 | >128 |
| 7 | 4 | 4 | >128 |
| 8 | 16 | 8 | >128 |
| 9 | 8 | 8 | 128 |
| 10 | 8 | 8 | 128 |
| 11 | 8 | 8 | 128 |
| 12 | 2 | 4 | 128 |
| 13 | 4 | 4 | 128 |
| 14 | 8 | 8 | >128 |
| 15 | 8 | 8 | 128 |
| 16 | 8 | 4 | 128 |
| 17 | 8 | 8 | >128 |
| 18 | 8 | 8 | 128 |
| 19 | 8 | 8 | >128 |
| 20 | 8 | 8 | >128 |
| 21 | 8 | 16 | 64 |
| 22 | 8 | 8 | >128 |
| 23 | 4 | 4 | 128 |
| 24 | 4 | 4 | 128 |
| 25 | 4 | 4 | 128 |
| 26 | 4 | 4 | >128 |
| 27 | 2 | 4 | 128 |
| 28 | 2 | 4 | 128 |
| 29 | 8 | 8 | 128 |
| 30 | 8 | 8 | >128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダプソン

付録13 *Peptococcus / Peptostreptococcus* speciesに対する各薬剤のMIC

| MIC (μg/mL) | | | |
|-------------|------|------|------|
| No. | SM | DSM | SMD |
| 1 | >128 | >128 | >128 |
| 2 | >128 | >128 | >128 |
| 3 | >128 | >128 | >128 |
| 4 | >128 | >128 | >128 |
| 5 | >128 | >128 | >128 |
| 6 | >128 | >128 | >128 |
| 7 | >128 | >128 | 8 |
| 8 | >128 | >128 | 8 |
| 9 | >128 | >128 | >128 |
| 10 | >128 | >128 | >128 |
| 11 | >128 | >128 | >128 |
| 12 | >128 | >128 | >128 |
| 13 | >128 | >128 | 16 |
| 14 | >128 | >128 | >128 |
| 15 | >128 | >128 | >128 |
| 16 | 128 | 128 | 8 |
| 17 | 64 | 32 | 8 |
| 18 | >128 | >128 | >128 |
| 19 | >128 | >128 | >128 |
| 20 | >128 | >128 | >128 |

SM : ストレプトマイシン
 DSM : ジヒドロストレプトマイシン
 SMD : スルファモイルダプソン

付録 14 各菌種に対するストレプトマイシンの MIC 分布

| | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------|------|------|-----|---|---|----|----|----|----|----|-----|--------|
| | ≤ 0.063 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | >128 |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | | | 1 | 20 | 6 | | 2 | | | 1 |
| <i>Enterococcus</i> species | | | | | | | | 4 | 6 | 17 | | 1 | 2 |
| <i>Bacteroides</i> species | | | | | | | | | | 1 | 1 | 5 | 23 |
| <i>Fusobacterium</i> species | | | | | 1 | | 1 | 1 | 5 | 2 | 5 | 3 | 7 |
| <i>Eubacterium</i> species | | | | | 1 | | | 3 | 1 | | | 1 | 6 |
| <i>Clostridium</i> species | | | | | | | | 2 | 2 | 1 | 3 | 4 | 16 |
| <i>Bifidobacterium</i> species | | | | | 4 | 4 | 5 | 5 | 3 | 2 | | 1 | 6 |
| <i>Prevotella</i> species | | | | | 5 | 1 | 5 | 2 | 3 | 4 | 1 | 4 | 3 |
| <i>Lactobacillus</i> species | | | | | 3 | | 2 | 9 | 8 | 1 | 4 | | 3 |
| <i>Propionibacterium</i> species | | | | | | 3 | 8 | 18 | 1 | | | | |
| <i>Peptococcus</i> / <i>Peptostreptococcus</i> species | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 18 |

付録 15 各菌種に対するジヒドロストレプトマイシンの MIC 分布

| | MIC (μg/mL) | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------|------|------|-----|---|---|----|----|----|----|----|-----|------|
| | ≤0.063 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | >128 |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | | | 4 | 18 | 4 | | 1 | 2 | | 1 |
| <i>Enterococcus</i> species | | | | | | | | 2 | 6 | 19 | | 1 | 2 |
| <i>Bacteroides</i> species | | | | | | | | | | | 5 | 5 | 20 |
| <i>Fusobacterium</i> species | | | | | | 1 | 1 | | 7 | 1 | 6 | 3 | 6 |
| <i>Eubacterium</i> species | | | | | 1 | | | 3 | 1 | | | 1 | 6 |
| <i>Clostridium</i> species | | | | | | | | 3 | 1 | 3 | 1 | 8 | 12 |
| <i>Bifidobacterium</i> species | | | | 3 | 6 | 1 | 9 | 1 | 2 | 1 | | 1 | 6 |
| <i>Prevotella</i> species | | | | | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 |
| <i>Lactobacillus</i> species | | | | 2 | 1 | | 2 | | 16 | 2 | 3 | 1 | 3 |
| <i>Propionibacterium</i> species | | | | | | | 15 | 14 | 1 | | | | |
| <i>Peptococcus</i> / <i>Peptostreptococcus</i> species | | | | | | | | | | 1 | | 1 | 18 |

付録 16 CLSI 法に準拠して測定した各菌種に対するスルファモイルダプソンの MIC 分布

| | MIC (μg/mL) | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------|------|------|-----|---|---|---|---|----|----|----|-----|------|
| | ≤0.063 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | >128 |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | | | | | | | | | | 30 |
| <i>Enterococcus</i> species | | | | | | | | | | | | | 30 |
| <i>Bacteroides</i> species | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 28 |
| <i>Fusobacterium</i> species | | | | | | | | | | | 3 | 1 | 21 |
| <i>Eubacterium</i> species | | | | | | | | | 2 | 1 | | 4 | 5 |
| <i>Clostridium</i> species | | | | | | | | | | | | | 28 |
| <i>Bifidobacterium</i> species | | | | | | | | 1 | 2 | 3 | 2 | 6 | 16 |
| <i>Prevotella</i> species | | | | | | | | | | 3 | 2 | 3 | 20 |
| <i>Lactobacillus</i> species | | | | | | | | | | | | | 30 |
| <i>Propionibacterium</i> species | | | | | | | | | | | 1 | 17 | 12 |
| <i>Peptococcus</i> / <i>Peptostreptococcus</i> species | | | | | | | | 4 | 1 | | | | 15 |

付録 17 ストレプトマイシンの MIC_{calc} の算定結果

| <i>Escherichia coli</i> (n=30) | <i>Enterococcus</i> (n=30) | <i>Bacteroides</i> (n=30) | <i>Bifidobacterium</i> (n=30) | <i>Fusobacterium</i> (n=25) | <i>Eubacterium</i> (n=12) | <i>Clostridium</i> (n=28) | <i>Prevotella</i> (n=28) | <i>Lactobacillus</i> (n=30) | <i>Propionibacterium</i> (n=30) | <i>Peptococcus/Peptostreptococcus species</i> (n=20) |
|---|-------------------------------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--|
| MIC ₅₀ | | | | | | | | | | |
| 4 | 32 | >128 | 8 | 64 | 128 | >128 | 16 | 16 | 8 | >128 |
| Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2) | | | | | | | | | | |
| 1 | 4 | R | 2 | 5 | R | R | 3 | 3 | 2 | R |
| Mean Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の平均 =2.857 Std Dev (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の標準偏差 =1.345 t 0.10, (n-1)= t 0.10, (7-1)=1.440 Lower 90% Confidence Limit=2.857-1.345/√7 x 1.440=2.125 MIC _{calc} =2 ^{(2.125+log₂(2))} =2 ^{3.125} = <u>8.724</u> | | | | | | | | | | |

MIC_{calc} を計算する際、小数点以下第四位以降は四捨五入し、小数点第三位まで表示した。
 MIC₅₀ が >128 µg/mL もしくは 128 µg/mL は R とし、計算対象外とした。MIC₅₀ が 0.06 µg/mL 以下のものは 0.03125 µg/mL として計算した。

付録 18 ジヒドロストレプトマイシンの MIC_{calc} の算定結果

| <i>Escherichia coli</i> (n=30) | <i>Enterococcus</i> (n=30) | <i>Bacteroides</i> (n=30) | <i>Bifidobacterium</i> (n=30) | <i>Fusobacterium</i> (n=25) | <i>Eubacterium</i> (n=12) | <i>Clostridium</i> (n=28) | <i>Prevotella</i> (n=28) | <i>Lactobacillus</i> (n=30) | <i>Propionibacterium</i> (n=30) | <i>Peptococcus/Peptostreptococcus species</i> (n=20) |
|---|-------------------------------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--|
| MIC ₅₀ | | | | | | | | | | |
| 4 | 32 | >128 | 4 | 64 | 128 | 128 | 8 | 16 | 4 | >128 |
| Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2) | | | | | | | | | | |
| 1 | 4 | R | 1 | 5 | R | R | 2 | 3 | 1 | R |
| Mean Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の平均=2.429 Std Dev (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の標準偏差=1.618 t 0.10, (n-1)= t 0.10, (7-1)=1.440 Lower 90% Confidence Limit=2.429-1.618/√7 x 1.440=1.548 MIC _{calc} =2 ^{(1.548+log₂(2))} =2 ^{2.548} = <u>5.848</u> | | | | | | | | | | |

MIC_{calc}を計算する際、小数点以下第四位以降は四捨五入し、小数点第三位まで表示した。
 MIC₅₀が >128 µg/mL もしくは 128 µg/mL は R とし、計算対象外とした。MIC₅₀が 0.06 µg/mL 以下のものは 0.03125 µg/mL として計算した。

付録 19 スルファモイルダプソンの MIC_{calc} の算定結果

| | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> (n=30) | <i>Enterococcus</i> (n=30) | <i>Bacteroides</i> (n=30) | <i>Bifidobacterium</i> (n=30) | <i>Fusobacterium</i> (n=25) | <i>Eubacterium</i> (n=12) | <i>Clostridium</i> (n=28) | <i>Prevotella</i> (n=28) | <i>Lactobacillus</i> (n=30) | <i>Propionibacterium</i> (n=30) | <i>Peptococcus/Peptostreptococcus</i> species (n=20) |
| MIC ₅₀ | | | | | | | | | | |
| >128 | >128 | >128 | >128 | >128 | 128 | >128 | >128 | >128 | 128 | >128 |
| Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2) | | | | | | | | | | |
| R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| サンプル数 n=0 のため、MIC _{calc} を計算できず。 | | | | | | | | | | |

MIC₅₀が >128 µg/mL もしくは 128 µg/mL は R とし、計算対象外とした。

付録 20 *Escherichia coli* に対するミューラヒントン培地及び CTG 培地を用いたスルファモイルダプソンの MIC の比較

| 培地 | 培養時間 | MIC (µg/ mL) | | | | |
|--------|-------|-------------------------|-----------------|-------------------|---------------|---------------------|
| | | <i>E.coli</i> (30 株) | 精度管理株 | | | |
| | | | <i>S.aureus</i> | <i>E.faecalis</i> | <i>E.coli</i> | <i>P.aeruginosa</i> |
| M-H 培地 | 20 時間 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 |
| CTG 培地 | 20 時間 | >128 | 64 | NG ¹ | >128 | >128 |
| | 24 時間 | >128 | 64 | NG ¹ | >128 | >128 |
| | 28 時間 | >128 | 64 | NG ¹ | >128 | >128 |
| | 44 時間 | | 64 | >128 | | |

*M-H 培地への接種菌量は 10⁵CFU/spot、CTG 培地へは 10⁵CFU/spot に加えて 10³CFU/spot 量でも接種して、同様の結果を得た。

¹NG: 発育せず

付録 21 *Enterococcus species* に対するミューラヒントン培地及び CTG 培地を用いたスルファモイルダプソンの MIC の比較

| 培地 | 培養時間 | MIC (µg/ mL) | | | | |
|--------|-------|-------------------------------|-----------------|-------------------|---------------|---------------------|
| | | <i>Enterococcus</i> (30 株) | 精度管理株 | | | |
| | | | <i>S.aureus</i> | <i>E.faecalis</i> | <i>E.coli</i> | <i>P.aeruginosa</i> |
| M-H 培地 | 20 時間 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 |
| CTG 培地 | 20 時間 | NG* | 64 | NG* | >128 | >128 |
| | 24 時間 | NG | 64 | NG* | >128 | >128 |
| | 28 時間 | NG | 64 | NG* | >128 | >128 |
| | 44 時間 | >128 | 64 | >128 | | |

*NG: 発育せず

付録 22 偏性嫌気性菌の 5%馬血液加 CTG 培地における発育試験結果

| 菌種 | 15 菌株中 の発育株数 | 備考 |
|---|-----------------|----------------------------------|
| <i>Bacteroides</i> species | 4 | 発育が認められた 4 株の発育は微弱で MIC 測定に供試不可 |
| <i>Fusobacterium</i> species | 0 | MIC 測定に供試不可 |
| <i>Eubacterium</i> species (<i>Eggerthella</i> を含む) | 0 | MIC 測定に供試不可 |
| <i>Clostridium</i> species | 13 | 発育が認められた 13 株の発育は良好で MIC 測定に供試可 |
| <i>Bifidobacterium</i> species | 0 | MIC 測定に供試不可 |
| <i>Prevotella</i> species | 0 | MIC 測定に供試不可 |
| <i>Lactobacillus</i> species | 14 | 発育が求められた 14 株の発育は微弱で MIC 測定に供試不可 |
| <i>Propionibacterium</i> species | 15 | 発育が認められた 15 株の発育は微弱で MIC 測定に供試不可 |
| <i>Peptococcus</i> / <i>Peptostreptococcus</i> species | 4 | 発育が認められた 4 株の発育は微弱で MIC 測定に供試不可 |

付録 23 *Clostridium* species に対する馬血液加 CTG 培地と羊血液加ブルセラ培地を用いたスルファモイルダプソンの MIC 分布

| 培地 | MIC 分布(μg/mL) | | | | | | | | | | |
|----------------|---------------|-----|---|---|---|---|----|----|----|-----|------|
| | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | >128 |
| 馬血液加 CTG 培地 | 2 | | | 1 | | 1 | | | 11 | 9 | 1 |
| 羊血液加 ブルセラ培地 | | | | | | | | | | | 28 |

*馬血液加 CTG 培地では 3 株は発育しなかった。