

ディスク拡散法

毛細管現象により、寒天中の水分がディスクの濾紙に吸収され、ディスク中の薬剤が溶解する。溶解した薬剤は直下の培地に移行し、培地上の細菌に作用しながら拡散していく。拡散した薬剤濃度と細菌の増殖能との関係により阻止円が形成される。すなわち阻止円が小さければ、その薬剤に対する感受性が低いということになる。本法は、Kirby-Bauer 法による拡散法を測定原理とし、CLSI 法に準拠した方法で実施している。

ディスク拡散法の実際

Kirby-Bauer 法を測定原理とし CLSI 法に準拠した薬剤感受性ディスクを用いたディスク拡散法のフローチャートを図 2-1 に示す。

1) ディスク拡散法に必要な試薬・器具

ディスク拡散法に必要な試薬・器具を以下に示す（図 2-2）。



- | | |
|----------------|-----------------|
| ① 3 ml 滅菌生理食塩水 | ⑦ ピンセット |
| ② 薬剤感受性ディスク | ⑧ 滅菌白金耳（エーゼ） |
| ③ 薬剤感受性試験用平板 | ⑨ 滅菌綿棒（綿径 5mm） |
| ④ ディスク型紙 | ⑩ McFarland 標準液 |
| ⑤ 消毒容器 | ⑪ 被検菌株 |
| ⑥ 火炎滅菌用アルコール | ⑫ ノギス |

図 2-2 ディスク拡散法に必要な試薬・器具

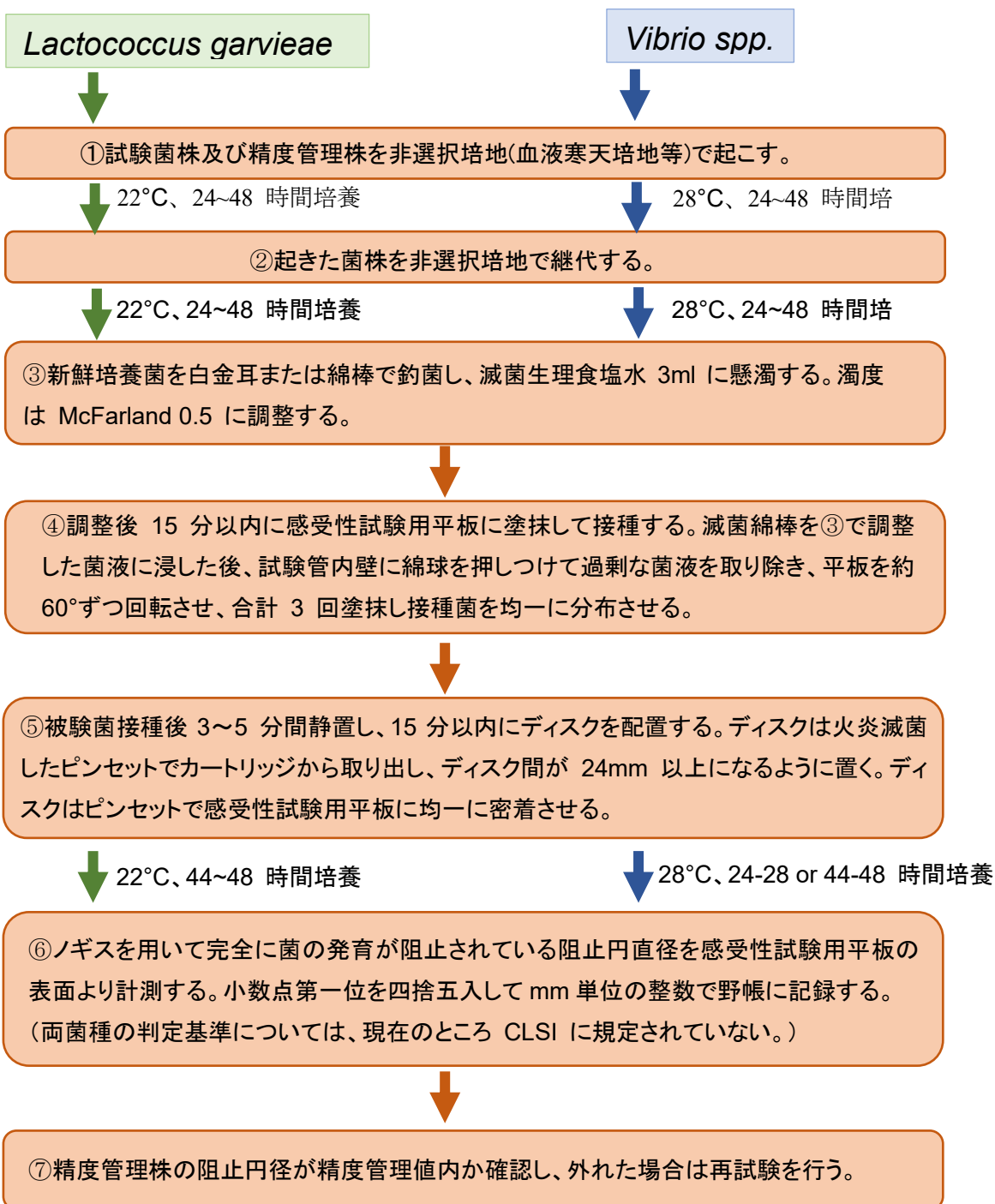


図 2-1 ディスク拡散法のフローチャート

2) 感受性試験用培地

Lactococcus garvieae

表面を乾燥した 5% sheep blood 添加ミューラーヒントン寒天培地（培地の厚み 4 mm、直径 90 mm 丸シャーレに培地 20 ml 分注、目視で厚みを確認すること）を用いる。培地の厚みが足りないと、薬剤感受性を過小評価することがある。5% sheep blood 添加ミューラーヒントン寒天培地は、日本ベクトンデキンソン社製 BD BBL (TM) ミューラーヒントン 5% ヒツジ血液寒天培地（商品型番：251176、20 枚入り）を購入可能。

自作の場合は、羊脱繊維血液を購入しミューラーヒントン寒天培地に加えて作成する。羊脱繊維血液は、使用期限が短くかつ生産スケジュールが決まっているため、実験スケジュールの調整が必要となる。なお、株式会社ジャパン・バイオシーラム等で購入可能。

Vibrio spp.

表面を乾かしたミューラーヒントン寒天培地（（培地の厚み 4 mm、直径 90 mm 丸シャーレに培地 20 ml 分注、目視で厚みを確認すること）を用いる。

他菌種を行う際は、表 1-1 を確認

3) 薬剤感受性ディスクの用意

CLSI 法に準拠した薬剤感受性ディスクは、栄研化学株式会社または日本ベクトンデキンソン社から購入可能。ただし、水産用医薬品として使用される薬剤は一部しか取り扱いが無い。現在販売されていない薬剤感受性ディスクの一部は、Appendix 水産用医薬品の薬剤感受性ディスク入手先（令和 5 年 12 月時点）に示す様に入手可能である。推奨はしないが、自作の薬剤感受性ディスクを作成する場合の手順を下記に示す。

薬剤感受性ディスクの作成法（参考例）

養殖研究所が公開している、CLSI 法に準じた研究用薬剤感受性検査ディスクの作成法を紹介する。（<http://nria.fra.affrc.go.jp/sindan/kenkyu/pdf/yakuzai.pdf>）ここでは、参考例としてフロルフェニコール (FF) のディスク作成法を紹介するが、FF の薬剤感受性ディスクは、Appendix に示す様入手可能である。

1. 試薬類

- ・ 滅菌・乾燥済みのペーパーディスク（円形濾紙）
（ADVANTEC 製抗生物質検定用濾紙，薄手，直径6 mmなどを使用）
- ・ 薬剤原末
- ・ 溶媒および滅菌蒸留水
- ・ 0.22 μ m フィルター

2. フロルフェニコール (FF) 30 μg (力価) 含有薬剤感受性ディスク作成法

- ① 精密天秤で薬剤30 mg (力価) を計り取る。
- ② 計り取った薬剤に95%エタノールを滴下して溶解する。このとき95%エタノールはなるべく少量になるように注意する。
- ③ 滅菌蒸留水で20 mLにメスアップする (1.5 mg/mL)。
- ④ 0.22 μm フィルターでろ過滅菌する。
- ⑤ クリーンベンチで滅菌・乾燥済みのディスクに薬剤を20 μL ずつ染み込ませる (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$)。できれば滅菌した金網の上で行うとよい。
- ⑥ そのままクリーンベンチ内で2～3時間乾燥させる。紫外線を当てないようにする。
- ⑦ 滅菌済みの容器に収容し、冷蔵庫で保管する。

注) エタノール溶媒の場合ディスクが20 μL をそのまま添加するとディスクから流出する場合がある。その際は、10 μL ずつ2回に分けて添加するか、薬剤濃度を3.0 mg/mL (2倍) とし、10 μL をディスクに添加する。

4. 力価について

- ・ 薬剤の種類やロットにより力価は異なるため、上記のプロトコルで力価 X mgの薬剤を秤量する際には次の計算式で秤量すべき薬剤の量を算出する。

$$\text{秤量 (mg)} = (1000 X) \div \{\text{薬剤の重量当たりの力価 (}\mu\text{g/mg)}\}$$

- ・ 通常は薬剤の力価は、薬剤の機能性部分の重量で示す。例えばホスホマイシンカルシウムであれば、カルシウムを除いたホスホマイシン ($\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{P}$) 部分のみの重量を力価とする。塩酸オキシテトラサイクリンであれば、オキシテトラサイクリンのみの重量を力価とする。一部の抗生物質については「動物用抗生物質医薬品基準 (平成24年9月農水省)」 (下記URL) を参照のこと。

http://www.maff.go.jp/nval/kentei_kensa/kousei/pdf/241226iyakuhinkijyun.pdf

5. 備考

薬剤は原則として滅菌蒸留水で溶解するが、水に溶解しない薬剤や難容性の薬剤はなるべく少量のエタノールや水酸化ナトリウムなどの溶媒で溶解した後、滅菌蒸留水でメスアップする。代表的な薬剤と溶媒を次ページの表1に示す。

表 1 代表的な水産用医薬品とその溶解に用いる溶媒

薬剤	略号	溶媒
アモキシシリン	AMPC	0.1M PBS
アンピシリン	ABPC	DW
エリスロマイシン	EM	95%エタノール
ジョサマイシン	JM	95%エタノール
スピラマイシン	SP	95%エタノール
リンコマイシン	LCM	DW
オキシテトラサイクリン	OTC	DW
ドキシサイクリン	DOXY	DW
チアンフェニコール	TP	95%エタノール
フロルフェニコール	FF	95%エタノール
ホスホマイシンカルシウム	FOM	DW
ビコザマイシン	BCM	DW
スルファモノメトキシ	SMMX	0.5N NaOH
オキシリン酸	OA	0.5N NaOH
スルフィソゾールナトリウム	SIZ	DW

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 0.5 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^8$ CFU/ml) と同じ濁度に合わせる。

McFarland 標準液は、菌液濃度を確認するための標準液として使用される（図 2-3）。McFarland 標準液の組成および対応する菌数濃度を表 2-1 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 A を使用することが出来る。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 2-4）。

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 A と同じ濁度になる様ストライプカードをかざしながら目視で調整する（図 2-4）。

調整した菌液は、調整後 15 分以内に培地に塗抹する。



図 2-3 栄研化学社製の標準菌濁度液 A



図 2-4 ストライプカードと菌液調整

表 2-1 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) 菌液の接種法とディスクの配置

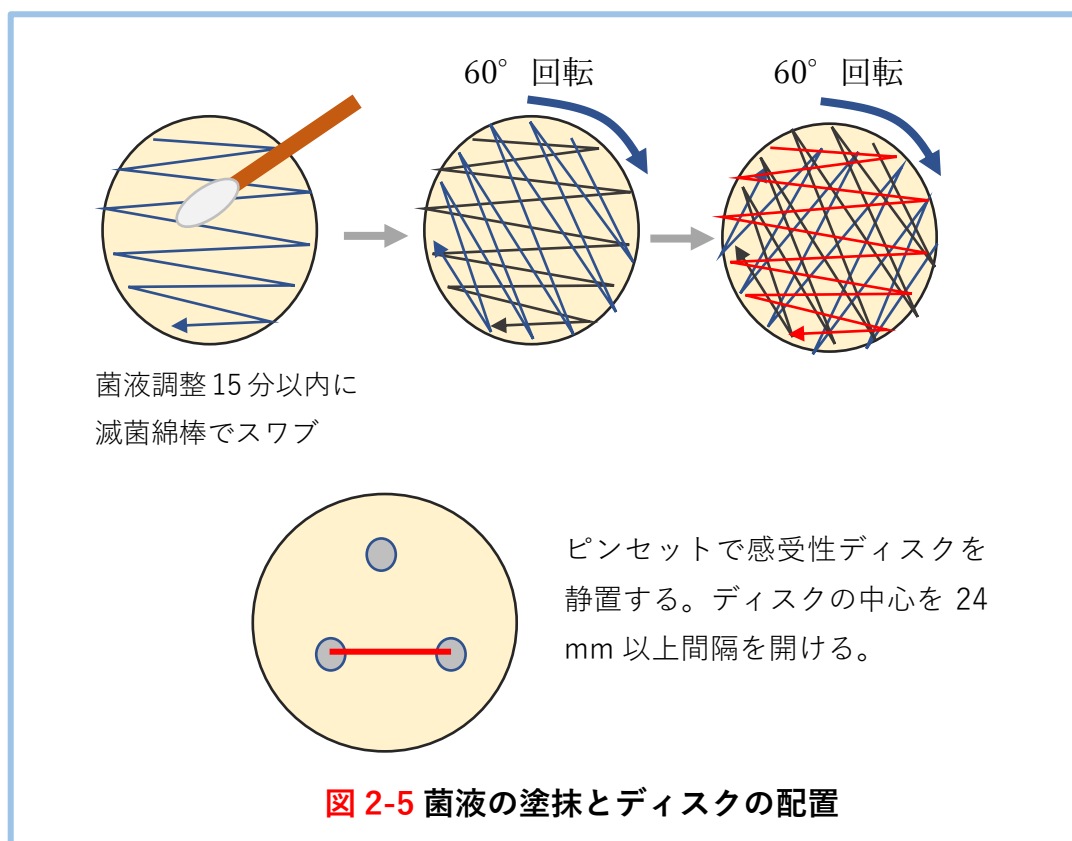
調整後 15 分以内の菌液を、滅菌綿棒で寒天培地に画線する (図 2-5)。綿棒は、綿径 5 mm 程度の綿棒 (日水製薬等) が使い易い。ディスクは密栓したままの状態室温に戻した後に、開封し使用する。ディスクは、お互いが 24 mm 以上の間隔が空く様に配置する。均一に薬剤を拡散させるため、ディスクは感受性試験用培地上に密着させる。

6) 培養条件と温度

Lactococcus garvieae : 22°C、44~48 時間

Vibrio spp. : 28°C、24 時間

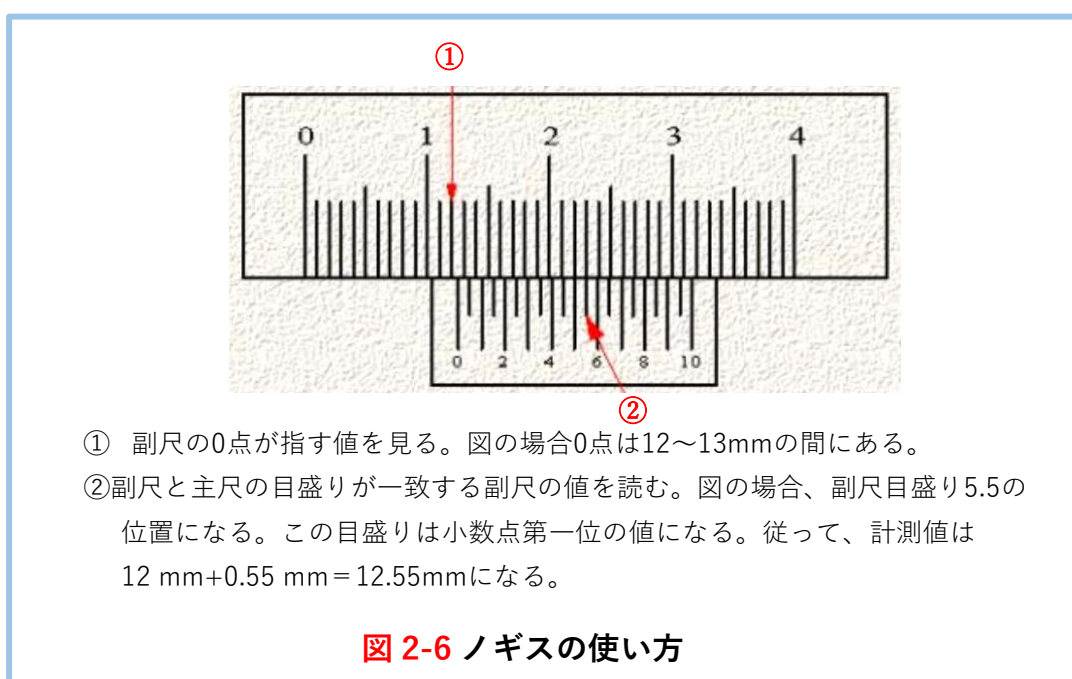
他菌種を行う際は、表 1-1 を確認

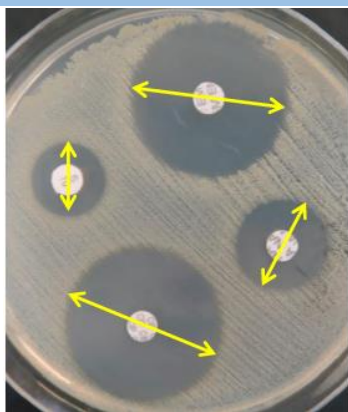


7) 阻止円直径の測定

完全に菌の発育が阻止されている阻止円の直径を平板の表側から測定する。小数点以下は四捨五入し、mm 整数で記録用紙に記録する。測定には、ノギスを使用する。ノギスの使用法は、図 2-6 示す。

ミューラーヒントン寒天培地を用いた際の測定例を図 2-7 に、5% sheep blood 添加ミューラーヒントン寒天培地を用いた際の測定例を図 2-8 示す。

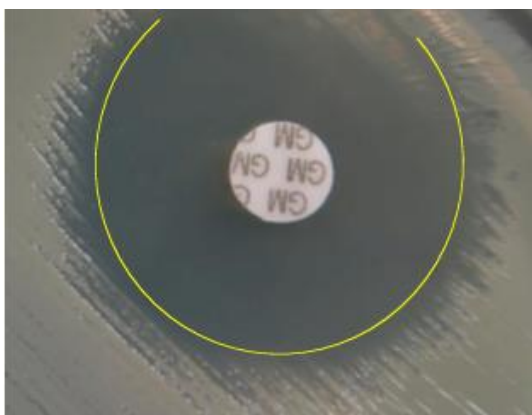




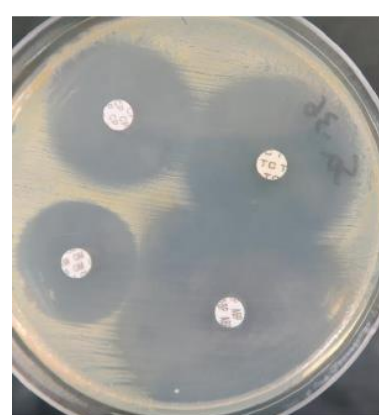
阻止円がしっかりと確認出来る例
阻止円直径を測定する



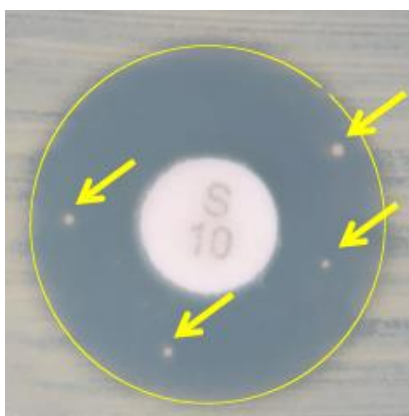
阻止円が確認出来ない例
ディスクの直径(6 mm)を記録する。



上記の様な阻止円の場合、完全阻止円（肉眼的に判別可能な菌の発育と発育が阻止されている境界）を測定する。



阻止円が重複、いびつな例
ディスクの配置を変更し、再試験。



阻止円の内側にコロニーが見られる例
菌のコンタミネーションを疑い、再単離。
それでも同じ結果の場合は、その内側を阻止円とする。

図 2-7 ミューラーヒントン寒天培地の阻止円直径の測定例

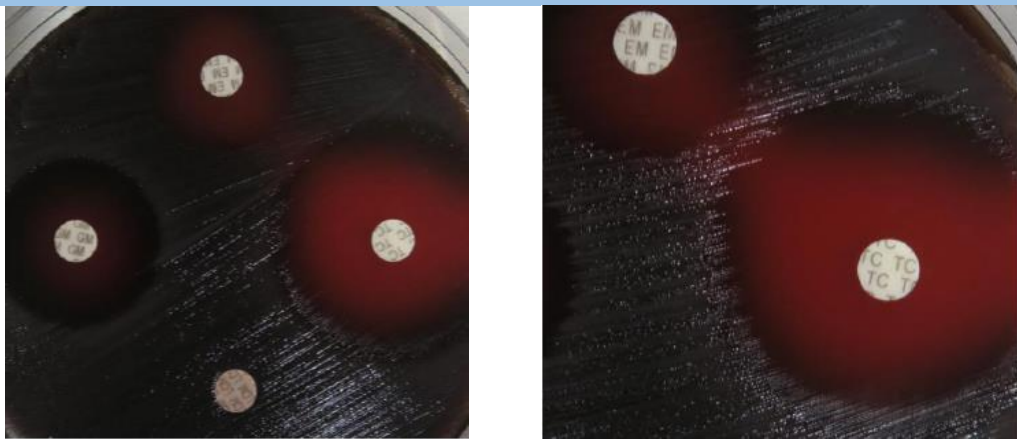


図 2-8 5% sheep blood 添加ミューラーヒントン寒天培地の阻止円直径の測定例

8) 判定

薬剤感受性試験の判定は、CLSI が提供している判定基準を用いる。しかし、現在 CLSI が提供している判定基準は、*Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* の 2 菌種のみである。

現在、判定基準として Ecological cut-off value (CO_{wt}) が推奨されている⁴⁾。これは、感受性株である wild-type (WT) と薬剤感受性が低下した株 (NWT) を分ける手法である。ここでは、我々が 100 株の *L. garvieae* で行ったディスク拡散法試験結果による暫定的な判定基準を示す(表 2-2)。この判定基準に従った場合、判定の表記は野生型 (WT) または、非野生型 (NWT) と表記する。耐性および感受性という言葉を用いない。

表 2-2 *Lactococcus garvieae* (MHA + 5% sheep blood、22°C、44～48 時間) のディスク拡散法における判定基準 (Cut-off 値) 参考値

薬剤	ディスク薬剤 含有量	CO_{wt} (mm)	
		<i>L. garvieae</i> I 型	<i>L. garvieae</i> II 型
Erythromycin	15 μ g	≥ 21	≥ 26
Lincomycin	2 μ g	-	-
Tetracycline	30 μ g	≥ 23	≥ 24
Florfenicol	30 μ g	≥ 24	≥ 25

9) 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 2-3）。

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 2-4）。

表 2-3 *Lactococcus garvieae* のディスク拡散法における精度管理暫定値

薬剤	ディスク 薬剤 含有量	阻止円直径（mm）			
		22 °C for 48 hr on Muller-Hinton Agar supplemented with 5% sheep blood (本マニュアルの暫定値)		22 °C for 48 hr on Muller-Hinton Agar (CLSI VET04, 3 rd Edition 参照)	
		<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658
Erythromycin	15 µg	13-20	20-23	13-20	19-31
Tetracycline (Oxytetracycline)	30 µg	32-35	38-40	25-35*	28-38*
Florfenicol	30 µg	23-25	40-45	20-32	34-47
Lincomycin	2 µg	6	6	-	-

*, Quality control ranges for Oxytetracycline

表 2-4 *Vibrio* spp.（MHA、28℃、24～28 時間）のディスク拡散法における精度管理値

薬剤	ディスク薬剤 含有量	阻止円直径（mm）	
		<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC33658
Oxytetracycline	30 µg	23-29	28-34
Nalidixic acid *	30 µg	-	-
Florfenicol	30 µg	20-30	33-41

*：－は CLSI において精度管理値を規定していない薬剤

10) 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(被検菌)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 口によるピペッティングはしないこと。

(2) ディスク使用上の注意

- ① 試薬は指定の貯蔵方法で保存すること。
- ② 使用期限を過ぎたディスクは使わないこと。
- ③ ディスクは汚染しないように無菌的に取り扱うこと。
- ④ 開封後のディスクは乾燥剤を入れた密閉容器内で保管し、15°C以下に保存すること。開封後はなるべく早く（約 2 か月以内）使用すること。
- ⑤ ディスクは輸送上及び保管上で乾燥剤を入れた密閉容器内で保管し、15°C以下の状態を維持すること。
- ⑥ 使用中のカートリッジは、カートリッジの入っているビンに戻さないこと。

(3) 廃棄上の注意

- ① 使用後の平板は、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°C、20 分間以上）による滅菌処理を行うこと。
- ③ 滅菌後のシャーレや器具等は、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。