

濾紙法による細菌の薬剤感受性測定に関する研究

第 I 報 測定用乾燥保存濾紙片の作製について

昭和33年1月10日 受付

信州大学医学部細菌学教室 (主任: 田崎忠勝教授)

勝 又 昭 司 宮 島 吉 広
高 幣 常 郎 本 田 菊 王

まえがき

近來続々と発見市販されている各種抗生物質は、その抗菌スペクトルに夫々特徴があり、又一方これに対する細菌側は所謂耐性菌が出現し、これ等の組み合わせは次第に複雑となつて来ている。これら抗生物質を使用するにはその疾病を起した原因菌を分離して、この菌に最も有効な薬剤と、その薬剤に対する感受性を定量的に測定し、有効濃度以上が患部に作用する様、充分な量を与える事が、治療の面からはもちろん耐性菌出現を予防する上からも重要である。

この意味から細菌の薬剤感受性測定法は種々考案され実用化されているが^①~^④近來は薬剤を一定濃度にした錠剤又は濾紙片 (Disc) が多くの会社から売り出され、その細菌発育阻止直径で感受性を推定する方法が推賞され広く用いられている^⑤^⑥^⑦。

しかし市販の Disc が発売される以前は、多くは自作していたものであり、最近臨床検査室の整備に伴い、感受性検査の件数も多くなり、経費節約其他の意味から Disc を自作する事が望まれるようにもなつた。こゝに標準菌を用いる事により、1枚の Disc の薬剤含量の絶対量を問題とせず、割合簡単に Disc を作る事ができしかも定量的測定が可能であり、乾燥保存のできる事を認めたので報告して批判を仰ぎたい。

材料と方法

抗生物質: すべて市販の製剤を使用した。ペニシリン (以下 Pc と略す)。ペニシリン G カリウム塩 (第 1 製薬) 表記 10 万単位。

ストレプトマイシン (以下 SM と略す)。ジヒドロストレプトマイシン硫酸塩 (杏林製薬) 表記 1g 力価。

クロラムフェニコール (以下 CM と略す)。Chloromycetin (Park Davis) 50mg 力価のカプセル。

クロールテトラサイクリン (以下 AM と略す)。Aureomycin hydrochloride (Lederle) 250mg 力価のカプセル。

オキシテトラサイクリン (以下 TM と略す)。Terramycin (Chas. Pfizer) 250mg 力価カプセル。

以上の抗生物質をカプセルはカプセル共、Pc, SM

は pH 6.0 の滅菌 M/15 Sørensen 磷酸緩衝液, CM, AM は局方無水アルコール, TM は局方メタノールに溶かし不溶解物は懸濁液のまま倍數稀釈して使用した。

濾紙: 東洋濾紙製定量濾紙 No. 5 B. を用い孔明け器で直径 7mm の円形に打ち抜き、120°C 20 分高圧蒸気滅菌後解卵器で一昼夜乾燥した後デシケーターに納め保存した。

乾燥濾紙片の作製: 前記薬剤倍數稀釈液を滅菌小ベトリー皿に注ぎ入れ、上記滅菌濾紙片を充分に浸した後、火焰に通して滅菌したピンセットで一枚宛つまみ上げ大判濾紙 (これはあらかじめ 120°C 20 分高圧蒸気滅菌して解卵器に一夜納め乾燥しておく) 上に約 30 秒程ならべて余分の水分を吸い取る。この濾紙片を再びピンセットでつまみ上げ別に濾紙を敷いて乾熱滅菌しておいた大型シャーレに並べ、デシケーターに納めて真空ポンプで排気乾燥する。この際対照として 5% 塩化コバルト水溶液に全く同様に濾紙片を浸しデシケーターに納め、その青変するのを乾燥の目安とした。この乾燥の良否が保存に関する事を経験したので充分注意した。かくして作つた濾紙片の保存は小試験管に入れ綿栓した後、小試験管のままシリカゲルを底に敷いた中試験管に納め、ゴム栓で密閉し室温に放置保存した。

使用菌株: 以前予研より分与を受け教室に保存してある。Staphylococcus aureus 209 P 株 (以下ブドウ球菌と略す) Sarcina lutea 1001 株 (以下八連球菌) 及び Bacillus subtilis P. C. I. 219 株 (以下枯草菌) の 3 株を測定に使用した。ブドウ球菌及び八連球菌は新しい斜面培養より 1 白金耳接種したパイオンを 37°C 18 時間培養し、この 2cc を一旦溶解後約 50°C に冷却した種層寒天 (後述) の 100cc に加え、枯草菌は抗生物質検定基準に従つて 1 mg/cc の芽胞浮遊液を作り、同じく種層寒天 100cc につき 2cc を加えた。

細菌発育阻止直径の測定: 基層としてミクニ肉エキス 10g, 武田ポリベプトン 10g, 食塩 2g, 寒天 30g, 蒸溜水 1l, pH 7.0 の普通寒天を用い、内径約 90cm のシャーレに各々約 20cc 宛流し込んで固まらせる。凝

固後上記要領で菌と混和した1%普通寒天(基層寒天のうち寒天が10g他は同様組成)をその上に一平板に夫々2cc宛流し種層とする。種層寒天凝固後37°Cの孵卵器で軽く乾燥させた後濾紙片を各平板に2乃至3枚適当な間隔でピンセットでのせる。濾紙は寒天の水分を吸って全面が平板面に密着する。もし密着しない場合は軽く圧して密着させる。平板は倒置して37°Cの孵卵器に納め、ブドウ球菌及び枯草菌は18時間、八連球菌は24時間培養後濾紙片の周囲に生じた細菌発育阻止円の直径を測定した。

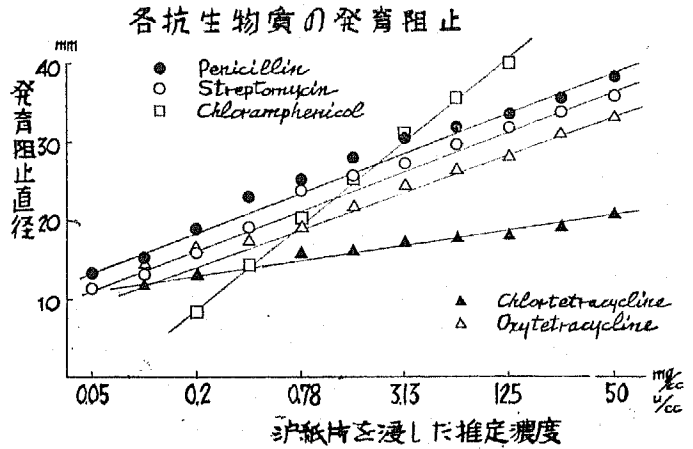
実験成績

標準曲線：横軸に濾紙片を浸すに用いた抗生物質の濃度の対数を目盛り、縦軸に細菌発育阻止直径を目盛り、各濾紙片の阻止直径をグラフ上にとると、或る範囲内ではこれらの間に近似的に直線関係が成立する。第1図~第4図にその結果を示す。図に示すようにこの直線の傾斜は主として抗生物質の側の条件によつて定まり、検定菌の性質による事は少い。これは抗生物質の検定のカップ法では広く周知の事であるが乾燥保存濾紙片に於いても正しい事が確かめられた。

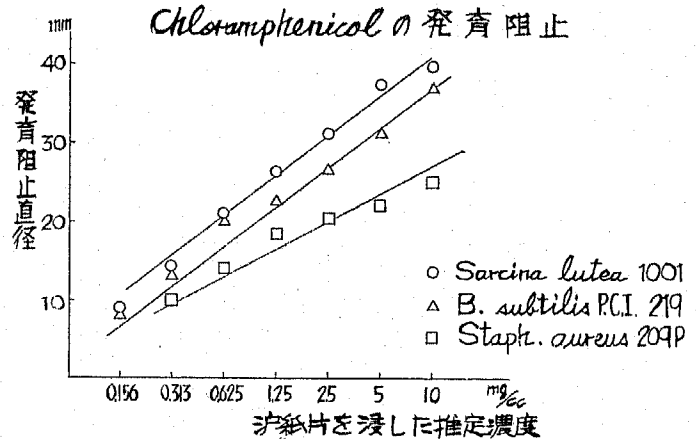
乾燥濾紙片の精度：代表としてPcを選び検定菌にブドウ球菌をとり濾紙片は1濃度毎に12枚使用しその精度をしらべた。成績は第1表に示す。乾燥せずに濾紙片に付いた余分の液を試験管壁で取り去つて直接阻止直径を測定した結果は悪く、比較するまでもなかつた。

乾燥濾紙片の保存：最も保存に耐えないと思われるPcで作つた濾紙片で作製後1週、1ヶ月、3ヶ月と別々にブドウ球菌の阻止直径を測り標準曲線を作つた。結果は第5図に示す。図で明らかな如く少くとも3ヶ月は充分有効である事が判明した。阻止直径は別々に測定したため、多少の異同を示したが、此の濾紙法は直線の傾斜さえ変化しなければ使用出来るから保存使用

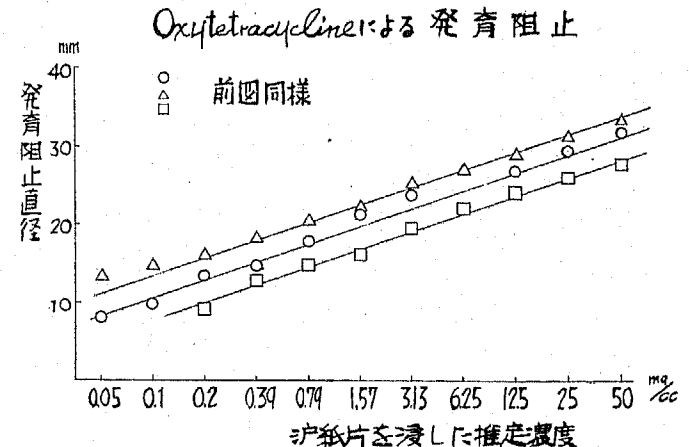
第1図



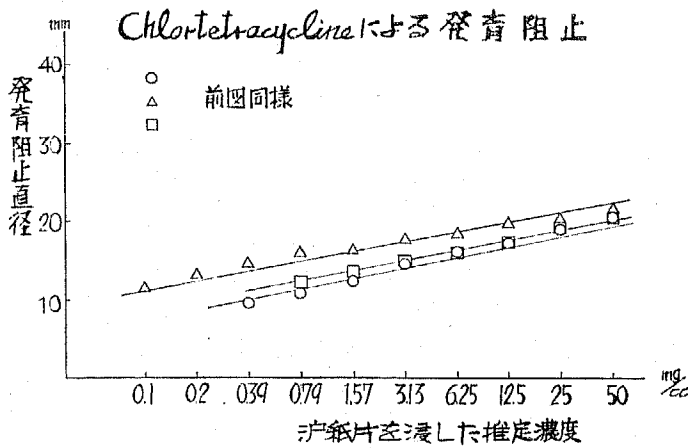
第2図



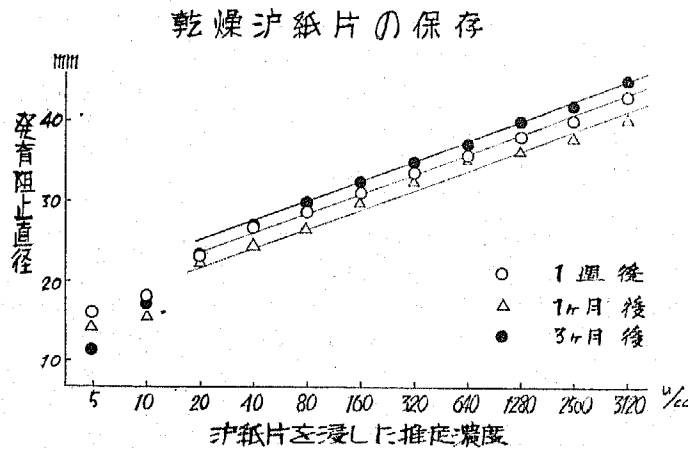
第3図



第 4 図



第 5 図



には充分耐え得ると思われる。

稀釈溶媒の影響：抗生物質定量に用いられる濾紙法は Loo et al⁽⁶⁾によればその薬剤の溶媒による影響は少いといわれている。高濃度の液に浸して濾紙片を作るために溶媒の種類と標準曲線の関係をAMを用いて次の実験を行った。pH 6.0の磷酸緩衝液、局方無水アルコール、局方メタノールにAMを溶解させこれを用いて乾燥保存濾紙片を作つたが標準曲線には著明な変化は認められなかつた。対照として溶媒のみで抗生物質を含まない濾紙片では細菌発育阻止は見られなかつた。

測定理論と公式

以上の実験により抗生物質溶液に浸した濾紙片は乾燥保存した場合に於いてもその抗生物質の濃度と細菌発育阻止直径は直線関係をなす事が確かめられた。この事から乾燥保存濾紙片に於ても或る濃度の抗生物質に浸して作つた濾紙片Lとそのk倍の濃度の抗生物質溶液に浸して作つた濾紙片Hの被検菌発育阻止直径(夫々Ul, Uhとする)と標準菌発育阻止直径(夫々Sl, Shとする)を比較すれば、その感受性の相対的關係を見る事が出来る。この際標準菌は他の方法によつて正確に抗生物質

第 1 表

Pc 濾紙片の発育阻止直径測定値

| Pc 濃度* | 発 育 阻 止 直 径 | | | | | | | | | | | | 平 均 |
|--------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|
| 5,000 | 38.2 | 36.5 | 38.0 | 37.5 | 38.0 | 37.5 | 36.9 | 37.6 | 37.4 | 37.8 | 37.8 | 37.6 | 37.6±0.14 |
| 2,500 | 34.3 | 35.2 | 35.0 | 35.9 | 35.0 | 35.2 | 35.8 | 35.2 | 36.0 | 35.9 | 35.9 | 35.9 | 35.4±0.56 |
| 1,250 | 32.4 | 32.8 | 33.1 | 33.6 | 33.4 | 33.8 | 33.6 | 33.0 | 33.4 | 33.6 | 33.0 | 33.6 | 33.3±0.67 |
| 625 | 30.7 | 31.8 | 32.2 | 32.0 | 32.1 | 31.4 | 31.0 | 31.5 | 31.8 | 31.8 | 32.0 | 31.7 | 31.7±0.29 |
| 312.5 | 30.8 | 29.0 | 30.8 | 30.9 | 30.8 | 30.0 | 30.1 | 30.1 | 30.6 | 31.3 | 30.9 | 29.9 | 30.4±0.76 |
| 156.3 | 28.4 | 27.5 | 27.9 | 27.0 | 28.8 | 28.0 | 27.2 | 28.4 | 27.8 | 27.1 | 28.0 | 27.2 | 27.8±0.60 |
| 78.2 | 24.0 | 25.0 | 25.9 | 25.2 | 25.3 | 24.8 | 24.8 | 24.8 | 25.8 | 25.0 | 24.9 | 24.5 | 25.0±0.23 |
| 39.1 | 23.9 | 23.0 | 22.4 | 23.1 | 22.0 | 22.7 | 23.6 | 22.7 | 22.7 | 22.0 | 22.0 | 23.2 | 22.8±0.67 |
| 19.6 | 19.5 | 19.8 | 19.3 | 17.7 | 18.0 | 19.8 | 19.5 | 19.4 | 19.0 | 19.0 | 17.3 | 18.9 | 18.9±0.69 |
| 9.8 | 15.0 | 16.2 | 15.0 | 15.3 | 14.7 | 15.1 | 15.8 | 15.0 | 15.3 | 15.5 | 14.5 | 14.7 | 15.2±0.46 |
| 4.9 | 13.8 | 12.3 | 14.5 | 12.8 | 13.4 | 11.6 | 12.2 | 13.7 | 13.2 | 12.3 | 12.3 | 12.3 | 12.9±0.87 |

* 濾紙片を浸すに用いた Pc 溶液の推定濃度
 使用菌株は Staphylococcus aureus 209 P

の感受性を測定しておけば、未知菌の感受性 S_u と標準菌の感受性 S_s との比 $\theta = S_u/S_s$ は第6図公式によつて計算出来る。何等かの理由、或は簡便に行うために、標準菌或は被検菌の発育阻止直径のどちらか1点しか測定出来なかつた場合には(2)以下の公式によればよい。

菌の最少発育阻止濃度は感受性と反比例するから標準菌の最少発育阻止濃度を θ で割ればよい。

第6図 計算公式

$$\log \theta = \frac{(U_h + U_l) - (S_h + S_l)}{(U_h + S_h) - (U_l + S_l)} \cdot \log k \quad (1)$$

$$\log \theta = \frac{U_h - S_h}{S_h - S_l} \cdot \log k \quad (2)$$

$$\log \theta = \frac{U_l - S_l}{S_h - S_l} \cdot \log k \quad (3)$$

$$\log \theta = \frac{S_h - U_h}{U_h - U_l} \cdot \log k \quad (4)$$

$$\log \theta = \frac{S_l - U_l}{U_h - U_l} \cdot \log k \quad (5)$$

$$\theta = \frac{S_u}{S_s}$$

考え方とまとめ

Pc 定量法にカップの代りに濾紙片が用いられて以来^①、Bondi 等^②を始めとして細菌の薬剤感受性測定に濾紙を用いる方法が広く行なわれ、種々の錠剤又は Disc が市販されている。多くは Spaulding 等^③に従つて1濃度段階の Disc を用い、周囲に生ずる発育阻止輪の大きさによつて感受性を定めるか、又は数段階の Disc を用い、発育阻止輪の有無によつて定性的に感受性を判定している。

宮村^④は既に寒天平板拡散法による感受性測定について、寒天平板打ち抜き法により拡散理論曲線を応用し、感受性既知の標準菌を用いてカップ法により感受性を計算できる事を示し、カップの代りに濾紙片でも代用できると述べている。

ここに述べた方法は宮村とは別に Disc を浸すに用いた抗生物質の濃度の対数と、その標準曲線上にのる発育阻止直径は、標準菌との感受性の比を示す事に着目し基礎条件を検討したものである。

Disc を自作するに当つては種々な点で困難があつたが目標とした点は、

- 1) 定量的に感受性を最少発育阻止濃度で表示できる事。
- 2) 市販の Disc と異なりうすい濾紙を使用するため、Disc の一枚当りの含有力価の絶対値を問題にしないようにする事。

いようにする事。

3) 市販抗生物質で Disc を作るため、製品毎の力価の相違を無視できる事。

4) 抗生物質各々の拡散速度の相違による誤差、接種菌量、培地成分等による誤差を消す事のできる事。

5) 乾燥保存ができる事。

等であつた。

1) から 4) までの目標はここに述べたように、検査の際に宮村の方法と同様感受性既知の標準菌を同時に測定する事により、大体満足させられた。

特に濾紙片を浸すに用いる抗生物質溶液が、1cc あたりの厳密な単位を必要とせず高濃度と低濃度の濃度差さえ厳格に規定して作るならば市販の製剤で充分である事は、自作を容易ならしめる。

4) の点は純粋に Disc 作製上の問題であるが、この乾燥濾紙片は室温で少くとも3ヶ月は効力を失なわない。黒須等^⑤は自作濾紙片は6ヶ月の保存で Difco 製の Disc と比較して効力の低下はなかつたと述べ、

Tunevall^⑥は2ヶ月は効果はあると述べているように、充分保存に耐え得るものと思われる。又乾燥の結果精度の向上する事も認められた。

金沢^⑦の行つているように、もし標準菌を枯草菌の芽胞として数年間も使用できるならば、操作は更に簡便になるであろう。

近來更に多くの抗生物質が次々と市販され、臨床に用いられているが、それ等に対する感受性測定用 Disc はすぐには市販されていないようである。我々の Disc を自作する方法は新抗生物質を使用する場合、その最少発育阻止濃度を決定した標準菌を定め、更にその抗生物質を含む Disc を作れば、その後は上述の方法で感受性を測定する事ができるから、新抗生物質の出現には対処できるものと考えられる。

むすび

我々は簡便にしかも定量的に細菌の抗生物質感受性を測定する方法を検討し、最少発育阻止濃度既知の標準菌を用い、一定量の抗生物質を含んだ乾燥濾紙片を自作し、標準菌と被検菌に対する平板上の発育阻止円を比較する事により定量的に感受性を計算できる事を認め、その基礎的事実を検討した。

この自作濾紙法による測定は次のような利点が認められる。

- 1) 菌の感受性を最少発育阻止濃度で表わす事ができる。
- 2) Disc 一枚に含まれる抗生物質の力価は、その絶対量は重要でなく、2段階の Disc に含まれる力価の

比が関係するから。市販薬剤で簡単に自作できる。

3) 1度に多数の Disc を安く作製できるから、気軽に精度の検討ができる。

4) 少くも3ヶ月は保存使用する事ができた。その実例は第2報で述べる。

稿を終るに臨み、御指導及び御校閲賜りました田崎教授、山本前助教授に深く感謝致します。尚御校閲いただきました田波助教授、及び種々御協力下さいました本学医学部学生成田四郎、福島政雄、上条信郎の諸君に御礼申し上げます。

文 献

- ① Jackson, G. G., and Finland, M.: Comparison of methods for determining sensitivity of bacteria to antibiotics in vitro, *A. M. A. Arch. Int. Med.*, **88**: 446~460, 1951. ② Schatten, W. E. and Parker, R. F.: Evaluation of agar dilution method for determination of sensitivity of bacteria to antibiotics. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **82**: 574~577, 1953. ③ 福見秀雄・中谷林太郎・小酒井望・広明竹雄・小張一峰・渡辺晶子: 赤痢菌のストレプトマイシン, クロラムフェニコール感受性測定法について. *日本医事新報*, **1513**: 1598~1607, 1953. ④ Rammelkamp, C. H. and Maxon, T.: Resistance of staphylococcus aureus to the action of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **51**: 386~389, 1942. ⑤ Spaulding, E. H., and Anderson, T. G.: Selection of antimicrobial agents by laboratory means, *J. A. M. A.*, **147**: 1339~1340, 1951. ⑥ Tunevall, G., and Ericsson, H. Sensitivity tests by disc method as a guide for chemotherapy. *Antibiot. & Chemotherapy*, **4**: 889~1954. ⑦ 中沢進・大石久・小川義市・新井蔵吉・高野修: 邦製 Sensitivity Disks を中心として. *小児科診療*, **18**: 323~329, 1955. ⑧ Loo, Y. H. et al.: Assay of streptomycin by the paper-disc plate method, *J. Bact.* **50**: 701~709, 1945. ⑨ Vincent, J. G., and Vincent, M. W.: Filter paper disc modification of the oxford cup penicillin determination, *Proc. Fxp. Biol. and Med.*, **55**: 160~163, 1944. ⑩ Bondi, A. Jr., Spaulding, E. H., Smith, D. E., and Dietz, C. C.: A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics, *Am. J. Med. Scie.*, **213**: 221~225, 1947. ⑪ 宮村定男: 寒天平板拡散法による抗生物質に対する細菌の感受性測定法について (抗生物質の拡散. 第3報) *J. Antibiot., Ser. B.* **6**: 93~95, 1953. ⑫ 黒須己之吉・黒須正

夫・河野恵・上杉雍子: Sensitivity paper disks の作製法と其応用. *耳鼻咽喉科*, **27**: 723~729, 1955.

⑬ 金沢裕: Sensitivity Disk (昭和) を用いる細菌感受性の定量的測定法. *J. Antibiot. Ser. B.*, **8**: 122~125, 1955.

Studies on the Determination of Bacterial Sensitivity to Antibiotics with Filter Paper Disc Method

I. Procedures to Make Dried Filter Paper Discs for Determining the Sensitivity

Shoji Katsumata, Yoshihiro Miyajima, Tunero Takahei and Kikuo Honda
Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. T. Tazaki)

The determination of bacterial sensitivity to antibiotics are now considerably important for clinical practice. The tube dilution or agar dilution method was time-consuming and laborious. The determination has been simplified by the use of tablets or disc agar diffusion methods, but it is likely to be inaccurate and often misleading.

Using our filter paper disc method with standard bacteria, it was found that the bacterial sensitivity could be determined quantitatively and be corrected the several factors of error, could be avoided such as the difference of the results due to culture media, due to the diffusion of antibiotics, as well as the difference of the results due to the size of inoculum.

The procedures and fundamental experiments of this method were described here.