

濾紙法による細菌の薬剤感受性測定に関する研究

第II報 ブドウ球菌及び4連球菌の感受性測定について

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

前報で我々は滅菌濾紙片に各種抗生物質を含ませ乾燥保存し、これを用いて被検菌と発育阻止濃度既知の標準菌との感受性比を測り、簡便に細菌の抗生物質感受性を測定し得る事を報告した^①。今回この方法により副鼻腔内膿汁より分離したブドウ球菌及び4連球菌と、膿瘍疹の病原菌と推定されるブドウ球菌について5種の抗生物質に対する感受性を測定し、併せて濾紙法の再現性を検討したので報告する。

細菌の薬剤感受性の測定には種々の方法があり、各々特色があつて目的に応じて選ばれている^{②③④⑤⑥⑦⑧}。測定に正確を要する場合には平板希釈法又は試験管法が用いられるが、臨床的には抗生物質を一定量含んだ錠剤又は濾紙片が市販され、簡便である事から推賞されている^{⑨⑩}。

自作濾紙片によるこの方法は簡便であり、而も標準菌を用いる事により、各種の誤差を起す因子を消去出来る事から便利な方法と信ずる。

材料と方法

測定用濾紙片の作製: 第1報^①に報告した通り、東洋濾紙製 No. 5B 定量濾紙を直径7mmの円型に打ち抜き滅菌後、各抗生物質溶液に浸した。実験に用いた溶液の濃度は第1表に掲げた。

第1表 濾紙片を浸した抗生物質の推定濃度

	高濃度 H	低濃度 L
Penicillin	156u/cc	39u/cc
Streptomycin	3.2mg/cc	0.8 mg/cc
Chloramphenicol	2.5mg/cc	0.625mg/cc
Chlortetracycline	6.2mg/cc	1.55 mg/cc
Oxytetracycline	6.2mg/cc	1.55 mg/cc

抗生物質: 実験に用いた抗生物質は5種。即ち、

Penicillin (以下PCと略す)
Streptomycin (以下SMと略す)
Chloramphenicol (以下CMと略す)
Chlortetracycline (以下AMと略す)
Oxytetracycline (以下TMと略す)

測定方法: 第1報^①に準じ上記濾紙片を同一濃度4枚、培地上に適当な間隔をおいて並べ、平板を倒置して37°C 18時間培養後、濾紙片の周囲に現われた発育阻止輪の直径を測定した。標準菌として *Staphylococcus aureus* 209 P株を用いた。この菌の最少発育阻止濃度は寒天平板希釈法によると、Pcには0.1u/cc, SM及びCMには1.6mcg/cc, AM及びTMには0.4mcg/ccであつた。

時として細菌発育阻止輪は2重の同心円、即ち中心部の完全発育阻止輪の周囲に其の他の部分より発育が劣るが、完全には発育を阻止されない部分を認めたが、中心輪の直径をとり、副尺附のノギスを用い、0.1mmまで読んだ。

被検菌株: 本学耳鼻咽喉科学教室の好意により松本市内小学校児童で身体検査の結果、慢性副鼻腔炎と診断された者20名をシュミット氏法により両側上顎洞から膿汁を無菌的に吸引し、直ちにこれを普通寒天平板に白金耳で塗抹培養、翌日生じた集落を鏡見、明らかにブドウ球菌、又は4連球菌と思われる菌を選び純培養し、検査に供した。得られた菌株はブドウ球菌21株4連球菌と思われるもの5株であつた。

又本学皮膚科学教室の外來を訪れた膿瘍疹患者6名から殆ど純培養の状態で得られた6株のブドウ球菌を検査に供した。

測定公式: 第1報^①に報告した公式を用い、 $k=4$ として計算した。

実験成績

1. 副鼻腔より得られたブドウ球菌: 分離した21株の各抗生物質に対する感受性は第2表に示した。実験は一部を除き2回づつ繰り返し、その平均を表示した。空欄は感受性低下のため発育阻止輪を示さず、測定不能を示す。 θ は公式に示す感受性の比即ちSu/Ssで、u/cc、及びmcg/ccの欄は標準菌の最少発育阻止濃度から計算した各菌株の最少発育阻止濃度である。(この説明は以下第2表及び第3表も同様)。

Pc感受性: 上述の感受性測定不能株が6株を占めるが、これはほぼ0.01u/cc以下の感受性と推定され

第 2 表

副鼻腔より得たブドウ球菌の感受性

菌 株	Pc			SM			CM			AM			TM		
	log θ	θ	u/cc	log θ	θ	u ^{mg} /cc	log θ	θ	u ^{mg} /cc	log θ	θ	u ^{mg} /cc	log θ	θ	u ^{mg} /cc
1- 1	-2.029	0.01	10.0				0.095	1.2	1.33	1.076	11.9	0.034	0.552	3.6	0.11
1- 3	-1.217	0.06	1.67	0.042	1.1	1.45	0.316	2.1	0.77	0.243	1.8	0.22	0.182	1.5	0.27
1- 4	-1.746	0.02	5.0	0.102	1.3	1.23	0.019	1.0	1.6	-0.310	0.5	0.8	-0.045	0.9	0.44
1- 8				0.229	1.7	0.94	0.190	1.5	1.07	0.064	1.2	0.33	-0.024	0.9	0.44
1-14-2	-1.408	0.04	2.5	0.216	1.6	1.0	0.070	1.2	1.33	-0.984	0.1	4.0	-0.379	0.4	1.0
1-15	0.021	1.1	0.09	0.060	1.1	1.45	0.132	1.4	1.14	0.582	3.8	0.11	0.181	1.5	0.27
1-16	-0.187	0.7	0.14	0.315	2.1	0.77	0.134	1.4	1.14	0.740	5.5	0.073	0.108	1.3	0.31
1-17	0.169	1.5	0.07	0.331	2.1	0.77	0.819	6.6	0.24	1.122	13.2	0.03	0.842	7.0	0.57
1-18				-0.264	0.5	3.2	-0.019	1.0	1.6	-0.295	0.5	0.8	-0.074	0.8	0.5
2- 1	-0.646	0.2	0.5	0.754	5.7	0.28	0.012	1.0	1.6	-0.571	0.3	1.33	0.451	0.4	1.0
2- 5	0.103	1.3	0.08	0.537	3.4	0.47	0.242	1.7	0.94	1.099	12.6	0.032	0.393	2.5	0.16
2- 6-2	-0.974	0.1	1.0	0.049	1.1	1.45	0.264	1.8	0.89	0.809	6.4	0.063	0.006	1.0	0.4
2- 7							0.189	1.5	1.07	0.696	5.0	0.08	0.179	1.5	0.27
2- 9-4	0.122	1.3	0.03	0.524	3.3	0.48	0.019	1.0	1.6	0.921	8.3	0.048	0.371	2.4	0.17
2-10				1.194	15.6	0.10	0.032	1.1	1.45	0.928	3.5	0.047	0.651	4.5	0.089
2-11	-0.749	0.2	0.5	0.117	1.3	1.23	0.061	1.2	1.33	0.728	5.3	0.075	0.278	1.9	0.21
2-13	0.030	1.1	0.09	0.888	7.7	0.21	0.234	1.7	0.94	1.091	12.3	0.033	0.536	3.4	0.12
2-14-1	-1.405	0.04	0.5	0.354	2.3	0.7	-0.111	0.8	2.0	-0.261	0.5	0.8	0.024	1.1	0.36
2-14-2				0.247	1.8	0.89	0.720	5.2	0.31	0.394	2.5	0.16	0.391	2.5	0.16
2-15				0.524	3.3	0.48	0.017	1.0	1.6	0.469	3.0	0.13	0.156	1.4	0.29
2-17	-0.319	0.5	2.5	0.402	2.5	0.64	0.170	0.7	2.29	-0.362	0.4	1.0	-0.112	0.8	0.5

第 3 表

副鼻腔より得た 4 連球菌の感受性

菌 株	Pc			SM			CM			AM			TM		
	log θ	θ	u/cc	log θ	θ	u ^{mg} /cc	log θ	θ	u ^{mg} /cc	log θ	θ	u ^{mg} /cc	log θ	θ	u ^{mg} /cc
1- 5-1	-0.903	0.1	1.0	0.198	1.6	1.0	0.619	4.2	0.38	0.739	5.5	0.073	0.237	1.7	0.24
1- 5-2	-0.189	0.6	0.17	0.325	2.1	0.77	0.007	1.0	1.6	1.013	10.3	0.039	0.305	2.0	0.2
2- 9-1	-0.998	0.1	1.0	0.791	0.6	2.67	0.837	6.9	0.23	-0.009	1.0	0.4	0.145	1.4	0.29
2- 9-2	-0.449	0.4	0.22	0.347	2.2	0.73	0.006	1.0	1.6	0.175	1.5	0.27	0.083	1.2	0.33
2-12-1	0.005	1.0	0.1	0.576	3.8	0.42	0.222	1.7	0.94	0.893	7.8	0.051	0.565	3.7	0.11

る。標準菌と比較して $1/2$ 以下の感受性を示す株は 15 株であつて、他の抗生物質に対する感受性と比較して Pc に対する感受性の巾が広い事が特徴である。

SM 感受性：感受性が標準株より高いか、又はほぼ等しい株は 18 株、85.7% を占める。測定不能株は 2 株あつた。SM の場合は標準株のおよそ $1/50$ 以下の感受性を示した場合測定不能となると思われる。これは適当な濃度の濾紙片を用いる事により正確に計算出来るものであろう。

CM 感受性：すべての菌が標準菌の感受性にほぼ等しいか、又はより高い菌株であつた。

AM 感受性：大多数が感受性株であるが、感受性の低い菌株もあり比較的感受性域は広い。

TM 感受性：大多数は感受性株である。

2. 副鼻腔より分離した 4 連球菌：副鼻腔内でブドウ球菌の病原性に関する意味づけは簡単ではないが、通常病原性はないとみなされている 4 連球菌の抗生物質感受性を測定し、次の膿瘍疹の病原体と思われるブドウ球菌の感受性と比較した。

Pc 感受性は大多数は標準株と類似の感受性を示し、測定表示不能株は 1 株もなかつた。其他の抗生物質に対しても標準株の $1/2$ 以下の感受性を示したものはな

かつた。

4 連球菌の感受性の標準に *Staphylococcus aureus* をとつた事は、必ずしも当を得てないかも知れないが、4 連球菌の一般的性状と関連して今後の研究にまたねばならない。成績は第3表及び第6表に示す。

3. 膿痂疹より分離したブドウ球菌：成績は第4表に示した。

Pc 感受性は著しく低下し、最高の感受性を示す菌株でも標準株の $1/25$ の感受性を示し、6株中4株まで高度の耐性を示した。他の4種の抗生物質に対しては、殆どすべての菌株が標準株と等しいか、又はより高い感受性を示したが、たゞAMに対して2株が僅かの感受性低下を示した。

第5表及び第6表は以上の成績をわかり易く表示し

第4表 膿痂疹より得たブドウ球菌の感受性

	Pc			SM			CM			AM			TM		
	log θ	θ	u/cc	log θ	θ	mcg/cc	log θ	θ	mcg/cc	log θ	θ	mcg/cc	log θ	θ	mcg/cc
No. 1				0.027	1.1	1.45	-0.054	0.9	1.78	0.600	4.0	0.1	0.018	1.0	0.4
No. 3				-0.047	0.9	1.78	-0.031	1.0	1.6	-0.273	0.5	0.8	-0.142	0.7	0.57
No. 4				-0.061	0.9	1.78	-0.165	0.7	2.29	-0.198	0.6	0.67	-0.161	0.7	0.57
No. 5				0.423	2.6	0.62	-0.289	1.9	0.85	0.289	1.9	0.21	0.499	3.2	0.125
No. 6	-1.106	0.08	1.25	0.277	1.9	0.85	-0.083	0.8	2.0	-0.359	0.4	1.0	-0.104	0.8	0.5
No. 7	-1.366	0.04	2.5	-0.238	0.6	2.67	-0.075	0.8	2.0	-0.089	8.8	0.5	0.369	2.3	0.13

TABLE V Sensitivities of the Staphylococci

Antibiotics	Minimum Concentration of Growth Inhibition u/cc, mcg/cc											Total
	<.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	<		
Penicillin	0	5	2	0	2	1	3	1	1	6	21*	
Streptomycin	0	1	0	2	7	8	1	0	0	2	21	
Chloramphenicol	0	0	0	2	1	16	2	0	0	0	21	
Chlortetracycline	6	4	3	2	3	2	0	1	0	0	21	
Oxytetracycline	0	1	3	8	5	2	0	0	0	0	21	

* isolated from maxillary sinuses

Penicillin	0	0	0	0	0	1	1	0	0	4	6*
Streptomycin	0	0	0	0	1	2	3	0	0	0	6
Chloramphenicol	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	6
Chlortetracycline	0	1	0	1	3	1	0	0	0	0	6
Oxytetracycline	0	0	2	1	3	0	0	0	0	0	6

* isolated from cutaneous infections

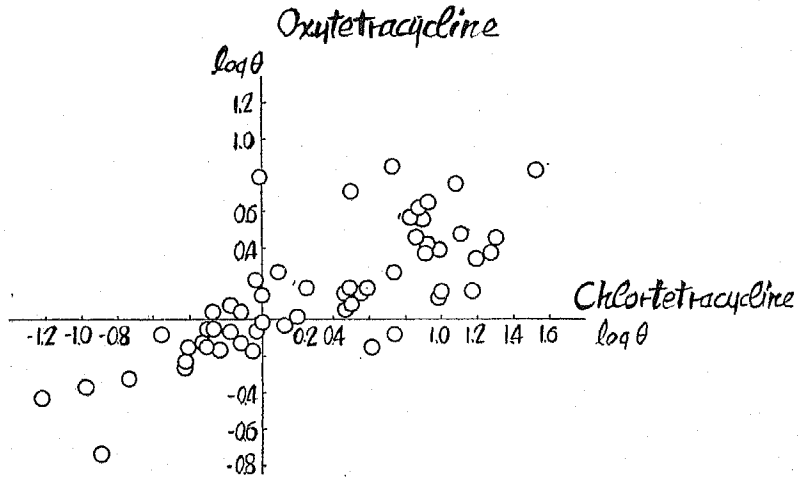
TABLE VI Sensitivities of the Tetrad Cocci

Antibiotics	Minimum Concentration of Growth Inhibition u/cc, mcg/cc										Total
	<.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	<	
Penicillin	0	1	1	1	0	2	0	0	0	0	5*
Streptomycin	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	5
Chloramphenicol	0	0	0	2	0	3	0	0	0	0	5
Chlortetracycline	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	5
Oxytetracycline	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	5

* isolated from maxillary sinuses

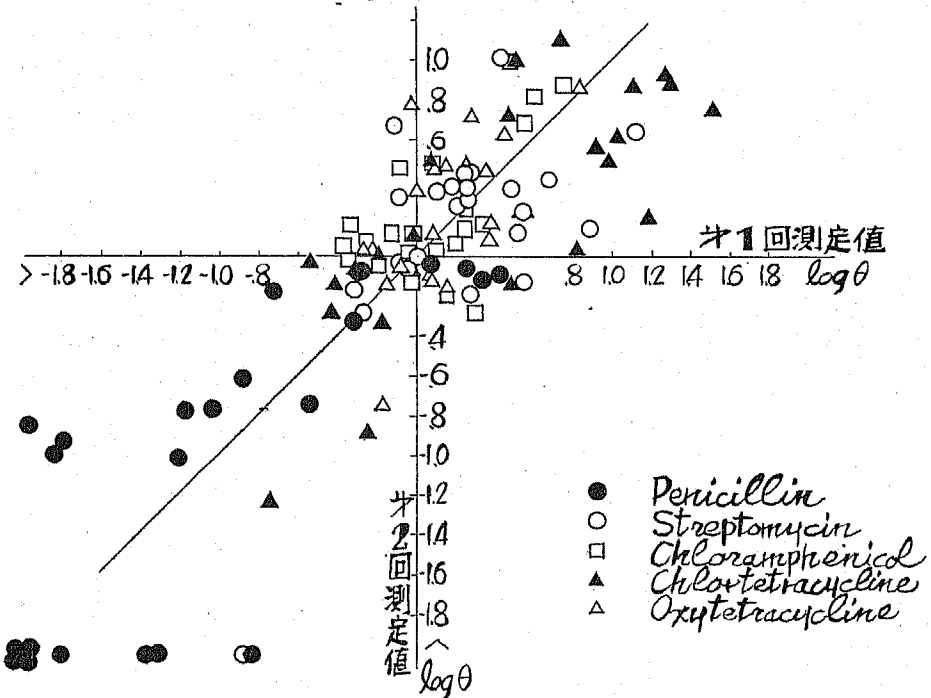
第 1 図

Chlortetracycline と Oxytetracycline の相関



第 2 図

濾紙法による測定値の再現性



たものである。

分離菌の5種抗生物質に対する交叉耐性

すべての分離菌株の5種の抗生物質に対する感受性を測定したので、夫々の抗生物質同志の相関を検定したが、TMとAMを除いては殆ど相関はあるとは認められなかつた。TMとAMとの関係は第1図に示した。夫々の感受性比を一方を縦軸に他方を横軸にとると、対応する点が相関を現わす。相関係数は0.92であつた。

濾紙法による成績の再現性

成績は第2図に示した。実験を2回繰返し横軸に第1回の成績、縦軸に第2回の成績を感受性比の対数即ち $\log\theta$ でとると、図の丸印は同一菌株の2回の測定により坐標が定まる。第1回及び第2回の成績が全く一致しているならば原点を通り45度の角度をなす直線上にある筈である。図で見ると原点付近ではかなりの程度に一致をみているが、原点をずれるに従い再現性が低下していると思われる。相関係数は0.70であつたが推計学的に同一母集団に属すとの假定はすてられない。

原点を遠ざかるに従い感受性の低下する事は、今後標準菌の選定及び濾紙片を浸す抗生物質濃度を変える事によつて解決出来るものと思われる。

考 え 方

ブドウ球菌の抗生物質感受性はPc発見当時は相当高かつたが年を逐つて次第に低くなり、特にPcに対して著明であると云われている^⑩。自作濾紙片を用いてブドウ球菌の感受性を測定した結果Pcに対しては大部分標準菌より低い感受性を示し、特に膿瘍疹の病原菌と思われる株は殆ど耐性を獲得し、6株中4株は高度に耐性を獲ていた。

Rammelkamp等^⑫は1942年ブドウ球菌はPcに対し感受性が高いと同時にその感受性域も狭く殆ど治療上問題とならないと述べたが、現在では耐性が増したと同時に感受性域が拡がった事が知られている。Finland等^⑬は9種の抗生物質に対するブドウ球菌の感受性を見、大部分はPcに最も感受性が低い、而も20%は他のどれよりも、Pcに対して感受性が高かつたと報告している。

4連球菌に関しては感受性検査の報告は少く、僅かに村井^⑭がPcについて言及しているに過ぎない。口腔、鼻腔内に常在し、通常非病原性と云われている菌であるが時には2次的に全身感染又は化膿症の原因となることもある。標準株としてStaphylococcus aureus 209Pをとり、その感受性を比較してみたが、Pcに対し多少の感受性低下を示すのみで、他の4種

抗生物質に対してはいずれも標準株と等しいか又はそれ以上の感受性を示している。

TMとAMの交叉耐性に関しては既に示されているが^⑮、Finland等^⑬はこの他にPcとAM、PcとAMが多少相関があると述べているが、我々は確認する事ができなかつた。

む す び

抗生物質溶液に浸して自作した感受性測定用濾紙片を用いて、副鼻腔由来ブドウ球菌21株、同じく4連球菌5株、膿瘍疹由来ブドウ球菌6株について、Pc、SM、CM、AM、TMの5種抗生物質に対する感受性を測定し、濾紙法の実際的应用と其の再現性を検討した。

副鼻腔由来のブドウ球菌は21株中15株がStaphylococcus aureus 209Pより感受性低下し、膿瘍疹由来株はすべて感受性低下を示した。

4連球菌のPc感受性低下はさほど著明でない。

大多数の菌株は其他の抗生物質に対し、感受性の低下は認められなかつた。

TMとAMに対する感受性は密接な相関々係を有している。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました田崎教授及び山本前助教授に深く感謝致します。御多忙中御校閲いただきました田波助教授、及び御協力いただきました本学耳鼻科及び皮膚科学教室の諸先生に感謝致します。

文 献

- ①勝又昭司：濾紙法による薬剤感受性測定法、第1報、信州医学雑誌、投稿中。
- ②Bondi, A. Jr., Spaulding, E. H., Smith, E. 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.
- ③Spaulding, E. H. and Anderson, T. G.: Selection of antimicrobial agents by laboratory means, J. A. M. A., **147**: 1336~1340, 1951.
- ④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**: 63~95, 1953.
- ⑤Jackson, 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.
- ⑥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の測定法について。日本医事新報, **1513**: 1598~1607, 1953.
- ⑦Streitfeld, M. M., and Saslaw, M. S.: A strip gradient method for in vitro assay of

bacterial sensitivity to antibiotics paired in various concentration ratios. *J. Lab. & Clin. Med.*, **43**: 946~956, 1954. ⑧Hilson, G. R. F., and Elek, S. D.: Routine testing of the bactericidal action of antibiotics for clinical purposes. *J. Lab. & Clin. Med.*, **44**: 589~594, 1954. ⑨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. ⑩Hoyt, R. E. and Goolden, E. B.: Antibiotic sensitivity testing; a survey of commercially available testing sets. *Antibiot. & Chemother.* **2**: 375~380, 1952. ⑪Finland, F.: Changing patterns of resistance of certain common pathogenic bacteria to antimicrobial agents. *New Eng. J. Med.*, **253**: 570~580, 1955. ⑫Rammelkamp, C. H., and Maxon, T.: Resistance of staphylococcus aureus to the action of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **51**: 386~389, 1942. ⑬Finland, M. and Haight, T. H.: Antibiotic resistance of pathogenic staphylococci: study of five hundred strains isolated at Boston City Hospital from October 1951, to February 1952. *A. M. A. Arch. Int. Med.*, **91**: 143~158, 1953. ⑭村井繁樹: Penicillin に対する病原微生物の感受性, (1) 球菌族, *新潟医学会雑誌*, 61年: 487~487, 1947. ⑮Gramberen, V. V.: Etude comparative de trois tetracyclines. *Rev. belg. pathol.* **24**: 177~182, 1955.

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

II. Determination of the Sensitivity of Staphylococci and Tetrad Cocci to several Antibiotics

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

This paper deals with the determination of sensitivity of 27 staphylococci and 5 tetrad cocci strains to five antibiotics with a filter paper disc method. The antibiotics used were penicillin, streptomycin, chloramphenicol, chlortetracycline, and oxytetracycline.

Compared with the standard staph. aureus 209P, the sensitivity of which to the antibiotics had been determined previously with agar dilution plate method, in term of the minimum concentration of the antibiotics to inhibit its growth, it was found that 15 strains in 21 staphylococci isolated from maxillar cavity were resistant to penicillin, and all of 6 staphylococci isolated from cutaneous infection were also resistant to penicillin, and their sensitivity range was fairly wide. The sensitivity range of 5 tetrad strains to penicillin isolated from maxillar cavity was not so wide as that of staphylococci tested here.

Most of the test cultures did not show the reduction of sensitivity to other 4 antibiotics.

This filter paper disc method may be useful for practical use because of its easy reproducibility.