

寒天平板拡散法による Nalidixic acid の体液中濃度測定法
ならびに感受性測定法

金 沢 裕・倉 又 利 夫

新潟鉄道病院

(昭和 38 年 11 月 25 日受付)

グラム陰性桿菌に抗菌力を有する Nalidixic acid である“Win 18,320”¹⁾に関する臨床検査としての体液中濃度測定法^{2,4,5)}ならびにディスクによる感受性測定法^{6,7)}について検討したので報告する。

I. 薄層カップ法による体液中濃度測定法

実験方法

検定菌：E. coli NIHJ

培地：MUELLER-HINTON 変法 (感性ディスク用培地)³⁾ pH 7.5

実験操作：検定菌 1 白金耳を 1 ml の滅菌水に懸濁し、その菌液を 0.2% の割合に培地に混和接種し、5 ml 宛規格型平板に分注する。平板にカップをたて、標準、被検体 (pH 7.5 の Buffer で希釈または pH 7.5 に修正) をみだし、4 時間放置後 37°C に培養し、12~16 時間後に阻止円直径を測定する。

実験成績

Fig. 1 に示すように阻止円直径と薬剤の対数濃度と

の間にはほぼ直線関係が成立し、最低 Buffer 中 0.2 μg/ml、血漿中 1 μg/ml まで測定可能であった。

ついて成人に 500 mg 1 回投与して血中、尿中の生物学的活性濃度を測定した。Fig. 2 に示すように、血中濃度は 1, 2, 4, 7 時間値は、2.8, 13, 9, 2.4 μg/ml で、尿中濃度は 4, 6, 10 時間値は 450, 200, 36 μg/ml で、10 時間における尿中回収率は 18% であった。

II. 一濃度定量 (MIC-Single) ティスク法による感受性測定法

実験材料

培地：感性ディスク用培地 pH 7.4 ならびに 5% 血液添加同培地

供試菌株 日常検査の対照となることが多いと考えられる細菌 17 種、58 株を用いた (Table 1)。

接種菌量：私どもが臨床的接種菌量と考えている菌量すなわちコロニー形成の常に早いブドウ球菌、腸内細菌及びその類似菌は、cm² 宛 10⁴ をやや下まわる程度 (1ml

Fig. 1 Relation between the concentration of nalidixic acid "Win 18,320" in plasma and the diameter of inhibition zone by the thin agar cylinder-plate method. Test organism: E. coli NIHJ. Assay medium: modified Mueller-Hinton agar "Sensitivity Disc medium" (Nissan)

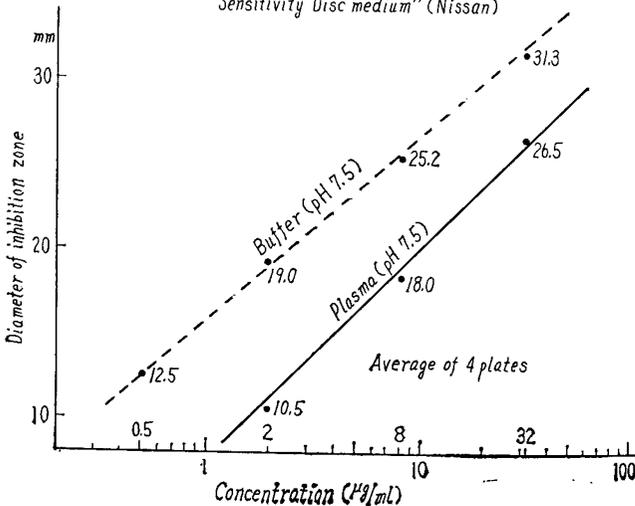


Fig. 2 Microbiologically active blood level, urinary level and urinary excretion following single 500mg oral administration of "Win 18,320" in adult

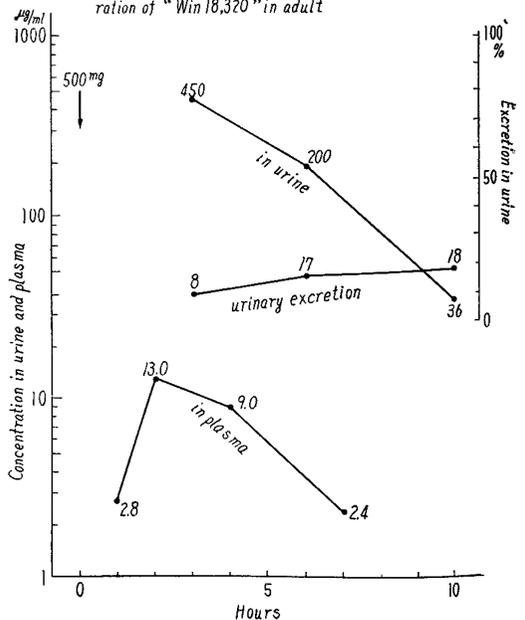
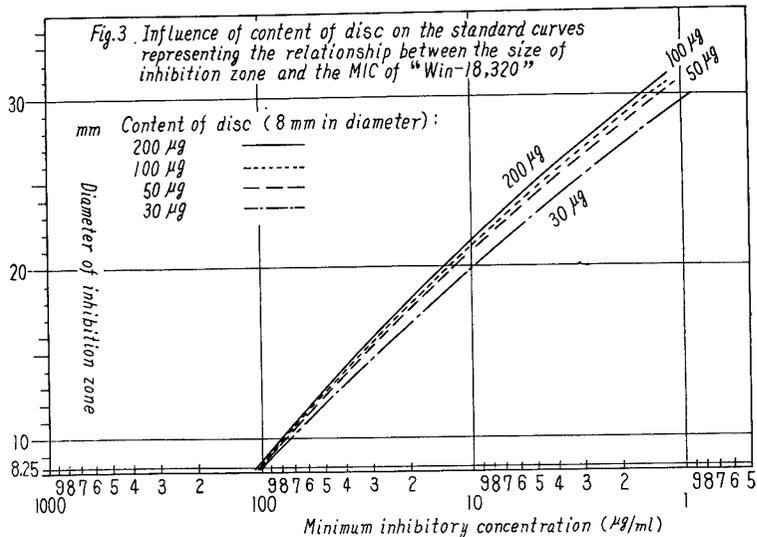


Table 1 Organisms used in the experiment for constructing standard curves and minimum inhibitory concentration of "Win-18,320" against the organisms

Organism	No. of strains	Minimum inhibitory concentration $\mu\text{g/ml}$				
		141	100	10	1	0.1
Staphylococcus	19	•••••	•••••	•••••		
*Diplococcus pneumoniae	4	••••				
*Streptococcus hemolyticus	3	•••				
*Streptococcus viridans	1	•				
*Streptococcus faecalis	1	•				
*Bordetella pertussis	1		•			
*Hemophilus influenzae	1			•		
*Neisseria gonorrhoeae	1				•	
*Corynebacterium diphtheriae	2		••			
Escherichia coli	8			••	•	•••
Achromobacter	1					•
Alcaligenes faecalis	1				•	
Morganella	1				•	
Pseudomonas aeruginosa	4	••	••	•		
Klebsiella	5			•	•••	•
Salmonella	2				••	
Shigella	3					•••
Total	58					

Inoculum size : *.....approximately $10^5/\text{cm}^2$ except *.....approximately $10^4/\text{cm}^2$



に1白金耳を浮遊し、その1白金耳を平板上においてガラス玉法でひろげる)。コロニー形成度のややおそい菌(レンサ球菌、肺炎菌、インフルエンザ菌など)は、 cm^2 宛 10^5 程度(2白金耳を1mlに浮遊し、その1滴(0.03 ml)をガラス玉法で平板にひろげる)。

実験方法ならびに成績

血液添加の影響: 5%血液添加によるMICの上昇(感性の低下)は、平均1.27程度で比較的すくないと考えられた(Table 2)。

MICの測定: ディスク法と同一接種菌量に近いように配慮して、寒天平板2倍希釈法を行ない、 37°C 16時間後の肉眼的発育阻止濃度(完全耐性と完全阻止の間

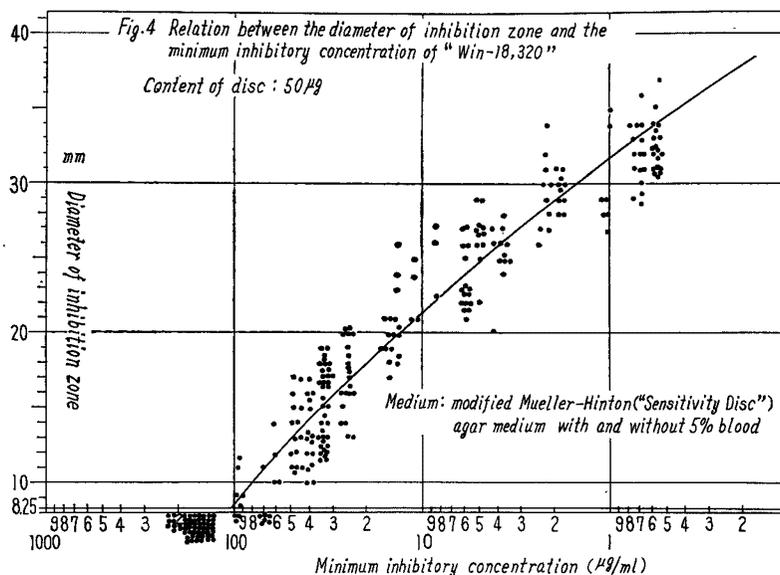
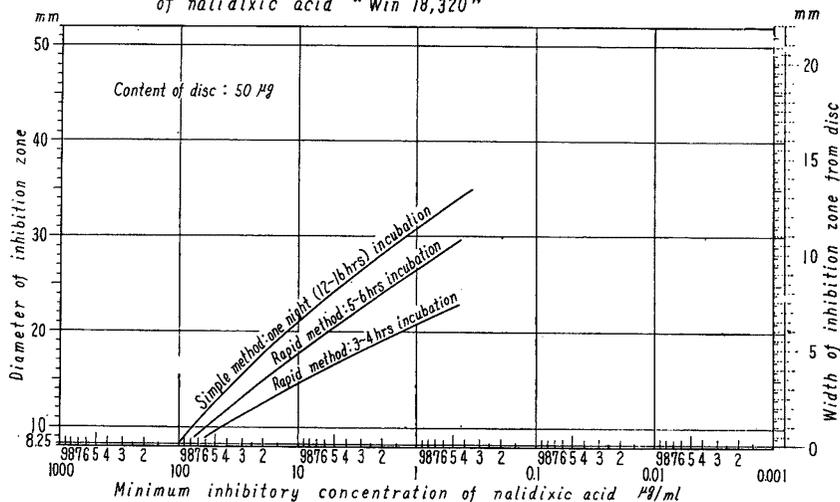


Fig. 5 Standard curves representing the relation between the size of inhibition and the M.I.C. of nalidixic acid "Win 18,320"



値)を測定した。同一菌株について6回くりかえして行なった値の平均を $\sqrt{2}$ で除した数値を、その菌の最も信頼すべきMICとした。

ディスク含有量の検討: 200, 100, 50, 30 μ g 含有ディスク (直径 8 mm) について、MIC と阻止円の関係を求めたが、いずれのディスクも 100 μ g/ml 程度から阻止円を生じ大差はなかつた。これは本剤の溶解度が低いためと考えられた。尿中濃度の平均値に近い 100 μ g/ml の MIC から阻止円を生じ、過剰な含有量でない 50 μ g が適当なディスクの含有量と考えられた (Fig. 3)。

阻止円と MIC の関係を示す標準曲線: ディスク法として 1) 血液非添加, 5%血液添加培地使用, 標準接種菌量, 16 時間培養による方法 (普通簡易法) 2) 高濃度 (標準量の 50~200 倍程度) に菌を接種して 4 時間以内, または, 3) 6 時間以内に阻止円の出現した場合の 3 つに分けて阻止円を測定した。4 つの異なる培地ロットを用い, 簡易法は 6 回, 迅速法は 2 回に分けて実験をくりかえしてえた成績から, 1) 簡易法 (Fig. 4) 2) 迅速 5~6 時間, 3) 迅速 3~4 時間の各々について, MIC と阻止円直径の関係を示す標準曲線を調製することが出

Table 2 Influence of 5% human blood added to "Sensitivity Disc Medium" on the minimum inhibitory concentration of "Win-18,320" by two-fold dilution method

Ratio of MIC ($\frac{\text{with blood}}{\text{without blood}}$)	No. of strains	
4	0	Geometrical mean=1.27
2	41	
1	52	
1/2	7	
1/4	0	

Total.....100

Table 3 Range of deviation from the standard curve by the MIC-single disc method of "Win-18,320"

Range of MIC ($\mu\text{g/ml}$)	100 ~ 10	10 ~ 1	1 ~ 0.1
No. of data obtained	123	66	39
Rejection limit ($\alpha=0.05$)	2.5~0.40	2.9~0.34	2.9~0.34

Table 4 Range of MIC values obtained by the 2-fold agar dilution method of "Win-18,320"

Test organism: *E. coli* NIHJ

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	No. of data obtained	Rejection limit ($\alpha=0.05$)
1.56	8	2.8~0.29 $\mu\text{g/ml}$ (3.1~0.33)*
0.78	8	
0.39	4	

* Where sample mean is taken as 1.0

来た (Fig. 5)。

測定法ならびに実験誤差について

これらの標準曲線を利用してそれぞれの方法で MIC を推定し、また迅速法で感受性をスクリーニングすることが出来るわけである。

ついで本法の実験誤差を推定するために、普通簡易法でえられたすべての測定値の存在範囲を、標準曲線からのへだたりで棄却限界の式 ($\alpha=0.05$) を適用して算出した。MIC の 100~10~1~0.1 $\mu\text{g/ml}$ に相当する範囲に区分して計算すると、それぞれ 2.5~0.4, 2.9~0.34, 2.9~0.34 となつた (Table 3)。一方 2 倍希釈法による

E. coli NIHJ 株の MIC の存在範囲を同様棄却限界の中で表わして 3.1~0.33 の成績がえられた (Table 4)。

Disc 法評価の基準となる MIC は必然的に希釈法の実験誤差を含んでいることなどを考慮すれば、本ディスク法は 2 倍希釈法に近い精度で MIC を推定できるものと思われた。すなわち本剤は培地中で拡散がよいので、MIC-Single ディスク法に適する薬剤の 1 つと考えられた。

なお本ディスクは乾燥剤添加、室温放置で 4 カ月間力価の減弱のないことがたしかめられている。

III. 結 語

1) Win 18,320 の体液中濃度測定法として *E. coli* NIHJ を検定菌とする薄層カップ法が適用された。

2) 本剤は内服で十分な血中濃度を示し、また尿中にも高濃度に排泄されることがたしかめられた。

3) ディスク法による感受性測定法として、一濃度定量法が適用されることがたしかめられた。迅速法をふくめて本法実施時の実験条件ならびに実験誤差について検討した。

文 献

- 1) Sterling-Winthrop Research Institute: A summary of experimental data in animals and human volunteer subjects on Win 18,320, Sterling-Winthrop Research Institute Rensselaer, New York, 1962.
- 2) 宮村定男・金沢 裕・カップ法による体液中抗生物質濃度測定法について、臨床 4(7): 678~689, July 1951.
- 3) 金沢 裕: 細菌の化学療法剤感受性測定法としての感受性ディスク法, Chemotherapy 9(1): 50~67, Jan 1961.
- 4) 金沢 裕・宮村定男・倉又利夫: カップ法による体液中カナマイシン濃度測定法, J. Antibiotics, Ser. B 13(5): 295~296, Oct. 1960.
- 5) 金沢 裕・倉又利夫: サルファ剤の生物学的活性濃度測定法ならびに 2, 3 サルファ剤についての測定成績, Chemotherapy 5(8): 478~485, Sept. 1960.
- 6) 金沢 裕・倉又利夫・七里義雄・堀 祐久・富樫和夫・田沢和内・大倉憲吾: Phenoxypopyl penicillin および Aminobenzyl penicillin の体液中濃度測定法, ディスクによる感受性測定法ならびに臨床経験, J. Antibiotics, Ser. B 16(1): 50~57, 1963.
- 7) YUTAKA KANAZAWA: Clinical use of the disc sensitivity test. Antimicrob. Agent & Chemotherapy 1961: 926~942, 1961.