

臨床的感受性検査法：とくにディスク法

〔第 17 回日本化学療法学会総会宿題講演 要旨〕

金 沢 裕

新潟鉄道病院内科

(昭和 44 年 5 月 19 日受付)

細菌の化学療法剤感受性測定法としては、キシヤク(以下、キと略記)法が最も基本的な方法であるが、ディスク(以下、Dと略記)法は操作が簡易で、しかも同時に多数の薬剤について検することができるので広く行なわれている。しかし、本法の手技判定基準は、学者により、Dの種類によりことなり一定していない。とくにわが国では本法に対して数多くのキビシイ批判が行なわれており、臨床家の期待に答える臨床検査としては、なお多くの問題点を残している。これらの批判について諸家の成績に私どもの知見を加えて検討してみたい。

ディスク法の成績に及ぼす諸条件の影響

さきに<sup>1)</sup>報告したように感受性シケン(シケン)の成績は各種の実験条件に左右されるが、これら実験条件の多くはD法

図 1 臨床的観点からの接種菌量の検討

培地：MUELLER-HINTON 変法(感性ディスク用)培地 pH 7.4  
培養：16 時間

臨床的観点からの要望	接種菌量 $5 \text{ cm}^2$ 附近概値				
	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$
サルファ剤の有効な菌株を見のがさないために	←	←	←	←	←
チアス菌族のCP有効性を血中濃度から推定しうる条件	←	←	←	←	←
PC耐性菌(PC-ase産生)の感受性を広く表現し、しかもPC-ase非産生株と区別しうる条件(PC-ase非産生株には劣るが、PC-ase産生株でもある程度 <i>in vivo</i> 臨床効果があるので)	←	←	←	←	←

表 1 接種菌量の Disc 法阻止円鮮明度に及ぼす影響

使用ディスク：CP, TC, KM

阻止円境界の鮮明度

—：菌発育なし，±：菌発育あるも阻止円不鮮明，+：阻止円判定可能なるも境界やや不鮮明，++：阻止円鮮明判定極めて容易

菌 種	使用 培 地	† 接種菌量(近似値) $\text{cm}^2$ 宛			
		$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$
* <i>Staph. aureus</i>	M. H. 変法**	++	++	++	+
* <i>E. coli</i>	"	++	++	++	+
* <i>Klebsiella</i>	"	+	++	++	++
* <i>Providencia</i>	"	+	++	++	+
<i>Sal. paratyphi A</i>	"	++	++	++	±
<i>Sh. flexneri 2a</i>	"	++	++	++	+
* <i>Ps. aeruginosa</i>	"	++	++	++	+
* <i>Enterococci</i>	"	++	++	+	±
"	" +5%メン羊血	++	++	++	+
* $\alpha$ -Hemolytic Str.	"	++	++	++	+
$\beta$ -Hemolytic Str. (A Group)	"	++	++	+	+
<i>Coryn. diphtheriae</i>	"	++	++	++	+
<i>N. gonorrhoeae</i>	"	++	++	+	±
<i>N. meningitidis</i>	"	++	++	++	±
* <i>H. influenzae</i>	"	+	+	—	—
"	" " チョコレート	++	++	++	±
<i>D. pneumoniae</i>	"	++	++	++	+

\* 新鮮分離株

\*\* MUELLER-HINTON 変法(感性ディスク用)培地

† ガラス玉接種 16 時間培養



図2 国内現行(3濃度法, 1濃度法)判定の比較

方法	感性感(#,---)などの基準		再現性 (-,##の)	臨床的判定 方法として
	基準となる MIC値	その中		
3濃度法	示されてない		よい (-,##の中 が広いので)	あまり いい
1濃度法	示されている		上に比し劣る (-,##の中 がせまいので)	よほど いい

レベルでの再現性の2つにわけて考えてみる必要があると考えられる。

+, - レベルでの再現性とは: 感受性の定性的表現としての感性, 耐性; -~##などに相当する MIC は, 学者により大差があり一定していない(表略)。

1例として PC の極めて感受性 # に相当する境界濃度は, 世界中で最も広く使用されている BBL, Difco ディスクでは 2μ であり, いつぼう, 世界的に最も有名な TUNEVALL<sup>14)</sup> の同一基準は 0.1 u/ml と大きな開きがある。また D 含有量が直接判定基準となる階級濃度 D の薬剤含有量も年により変更されていることもすくなくない(表略)。

またわが国で行なわれている単一 D 法と階級濃度 D 法では, 図2のように -~## の幅が前者では広く, からい判定になり, 後者ではせまく甘い判定になるわけで, 後者では - および # の幅が広く, したがって測定法の良否とは無関係に, 後者の -, # の再現性は理論的にも良いわけであろう。また定性的判定の境界 MIC に相当する菌株では再現性のわるいほうがむしろ正しい結果を示すことさえある。すなわち, 連続的な数値 MIC に基づく感受性を, 不連続な +, - で無理に区分し, 再現性を論じても無意味であろう。

**MIC レベルでの再現性の検討:** MIC レベルでの再現性を論じた場合についての報告では, D 法 MIC とキ法 MIC 値と不一致の場合はそれは直ちに D 法の誤りとされている。しかし生物学的反応の現われであるキ法の成績も当然バラツキを示すわけで, 1 回行なつたキ法の成績と一致しないから, 直ちにそれは D 法の成績が正しくないというのは明らかに片手落ちであろう。この問題について極めて貴重な資料を提供しているのは, 前述の藤井<sup>12,13)</sup>, 桑原教授の4つの菌株についてのキ法, D 法 MIC 測定成績の集計であろう。とくにこの点の検討に十分な資料を提供している 0.04~100 の幅にわたり MIC の示されている同時測定データの推計学的に検討すると<sup>13)</sup>, すべての組合せ 24 ケース中 23 に再現性の表現としての variance 値に有意差なく, 1 ケースでは D 法の

variance が有意差をもつて少ないという成績がえられた。すなわち, D 法でもキ法に近い再現性で MIC の推定可能なことがうかがわれた。

**ディスク法の精度管理についての試み**

D 法も他の臨床検査と同様に, そのバラツキをチェックする精度管理の必要があると考えられる。この点についての数的表現を行なうには, 一般臨床検査としての2倍キ法の測定値の変動の幅を求める必要がある。

**2倍キ法測定値の変動の幅: 検査室レベルでの2倍キ法測定値の変動の幅の検討に最も有用なデータを提供しているのは, 藤井<sup>15)</sup>, 桑原教授らによる一流化学療法研究機関における2倍キ法測定値の集計成績であろう。すなわち, 5つの菌株について, 接種菌量, 培養時間はいちおう規定され, 35カ所中それぞれ30(23+7), 3で同一培地使用の結果が示されている。その論文第6表 (Chemotherapy 16(5): 746) について測定値の変動の幅を求めると, 表3のようで, 棄却限界(α=0.05)であらわすと最小 3.4~0.29 から最大 14.0~**

表3 同一分与株についての全国集計成績(藤井 桑原ら論文 Chemotherapy 16: 743, 1968) における測定値変動の検討(金沢 計算)

薬剤	菌株	棄却限界** (α=0.05)	薬剤	菌株	棄却限界** (α=0.05)
P C	1	*	K M	1	*
	2	*		2	6.4~0.16
	3	*		3	6.8~0.15
	4	*		4	6.0~0.17
	5	*		5	*
C E R	1	*	C P	1	3.4~0.29
	2	*		2	6.0~0.17
	3	6.2~0.15		3	4.6~0.16
	4	6.4~0.16		4	*
	5	*		5	*
S M	1	6.0~0.17	T C	1	*
	2	*		2	*
	3	7.8~0.13		3	14.0~0.017
	4	6.4~0.16		4	13.0~0.076
	5	*		5	*

\* MIC値が測定域外に, はみでていると考えられ分散の計算が不能と考えられるので除外した

\*\*\* 平均 7.8~0.13

\*\*  $\pm S \cdot D \times t_{0.05} \sqrt{\frac{n+1}{n}}$

\*\*\*  $\sqrt{\frac{\sum S \cdot D^2}{N-1}} \times t_{0.05} \sqrt{\frac{N+1}{N}}$  から算出

n: 各組合せにおけるデータ数

N: 組合せの数

表4 寒天平板2倍キシャク法による測定値の変動の幅 棄却限界 ( $\alpha=0.05$ ) で表現

実験条件	使用薬剤	菌株	棄却限界
条件を厳密にそろえて実験室レベルで*	おもな化学療法剤 27種	<i>Staph. aureus</i> 209 P または <i>E. coli</i> NIHJ	最小 2.2~0.45(EM) 平均 2.7~0.38 最大 3.3~0.31(サルファ剤)
	PC, CER 類	不活化酵素 ( $\beta$ -lactamase) 産生 <i>Staph. aureus</i>	3.6~0.28
一流化学療法研究機関の検査室レベルで (接種菌量, 培養時間, 判定基準を規定, 培地は 35カ所中 23, 7, 3カ所でそれぞれ同一培地使用**)	PC, CER, TC, SM, KM, CP	<i>Staph.</i> 2 <i>E. coli</i> 1 <i>Klebsiella</i> 1 <i>Pseudomonas</i> 1	最小 3.4~0.29*** 平均 7.8~0.13 最大 14.0~0.071

\* 金沢 J. Antibiotics, Ser. A 19 : 175, 1966

\*\* 藤井, 桑原, 小酒井ら論文 (Chemotherapy 16 : 743, 1968)

\*\*\* 表3から

表5 感受性ディスク法精度管理としての標準株の阻止円直径の存在範囲とその意味づけ (試案) (国内現行1濃度法について)

薬剤ディスク	標準株	キシャク法による MIC $\mu\text{g/ml}$ : 2倍キシャク法の値 (16~20個) の幾何平均の $\frac{1}{\sqrt{2}}$	キシャク法 MIC 値に相当するディスク法阻止円直径の存在範囲 (mm)		
			標準偏差の幅** : $\pm 2 \text{ S. D.}$	両者の中間	棄却限界* ( $\alpha=0.05$ ) : $\pm 2 \text{ S. D.}$
クロラムフェニコール	<i>Staph. aureus</i> 209 P	1.0 $\mu\text{g/ml}$	30.0~36.0		26.5~39.5
ナリジキシックアシッド	<i>E. coli</i> NIHJ	0.78 $\mu\text{g/ml}$	29.5~34.0		27.0~37.0

意味づけ  
↓  
対策

↓  
ほぼ正しい実験が行なわれたと思われる  
↓  
測定値は信頼できる

↓  
許容範囲にある

↓  
誤った実験が行なわれたと思われる  
↓  
測定値は信頼できない  
↓  
資材(ディスク, 培地)判定基準, 実験操作をふくめて再検討ならびに再検査を要す

\* ルーチン検査としての2倍キシャク法測定値の存在範囲は棄却限界 (2 S. D.) は 3.4~1/3.4 程度以上と考えられるのでその値から算出

\*\* したがって 1 S. D. = 1.85 として計算

0.071 で平均 7.8~0.13 であつた。ルチン検査としての2倍キ法の測定値の変動の幅を, その最小値 3.4~1/3.4 とすると, その標準偏差の幅は 1.85~1/1.85 にほぼ相当した。

標準菌株を用いる精度管理: 私どもは手持ちの標準菌株として *Staph. aureus* 209 P 株および *E. coli* NIHJ に

ついて繰返し行なつた2倍キ法の前項からえた MIC 値の変動にもとづいて, 棄却限界を 3.4~1/3.4, 標準誤差範囲を 1.85~1/1.85 とし, それをD法の阻止円直径に換算し, 表5のような精度管理の試案を調製した。しかし最近あらたに化学療法学会から標準菌株が分与されたので, これらの株を含めて感受性を測定すると, オリジ

ナルは同一でも図3のように、かなり異なる MIC を示すことに気づいた。したがって今後は化学療法学会分与株で実験を追加し、改めて各薬剤 D ごとの数値を決定すれば精度管理に役立つ可能性があると思われる。しかし標準株といえどもこのように植えつき中に MIC 値の変動を来すおそれがあるので、ときどきキ法を行ない MIC 値をチェックする注意が必要であろう。

図 3 供試黄色ブドウ球菌 209 P 各株

- 1. 新大細菌教室保存株 ○
- 2. 新潟鉄道病院 " ●
- 3. 化学療法学会分与株 ●
- 4. 北海道衛生検査技師会配布株 ●
- 5. 南九州 " " □
- 6. 北里研究所分与株 △

2倍平板キヤク法による MIC( $\mu\text{g/ml}$ )  
(2プレートの平均)

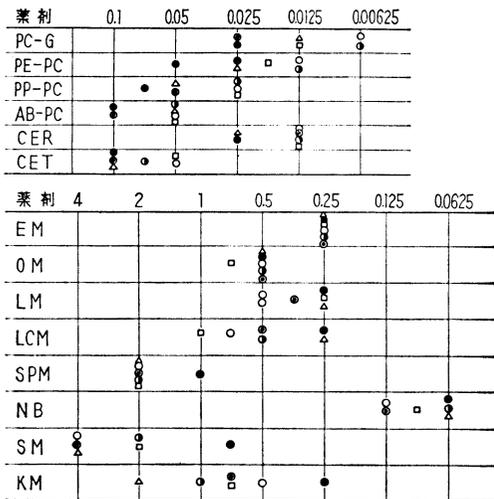


表 6 本症例の1濃度 Disc 法による分離菌 ( $\alpha$ -連鎖球菌) の感受性

抗生物質	mcg/ml または u/ml	感受性の 程度
Penicillin G	0.048	卅
Phenoxyethyl penicillin	0.092	卅
Phenoxypropyl penicillin	0.060	卅
Methylchlorophenyl isoxazolyl penicillin	0.86	卅
Aminobenzyl penicillin	0.20	卅
Tetracycline	0.2	卅
Chloramphenicol	0.98	卅
Kanamycin	>100	一
Streptomycin	20	卅
Erythromycin	0.042	卅
Oleandomycin	0.10	卅
Leucomycin	0.14	卅

臨床検査としての MIC 値の有用性

前述のように +, - などの定性的判定はかなり不定なものである。したがって +, - などの判定のみが天下り式に検査室から臨床家に与えられることは、臨床家側からは大きな不安がある。もしその成績が世界共通の基準である MIC で与えられるならば、他のいかなるデータとも比較することが出来、さらに体液中、とくに病巣内薬剤濃度と対比することにより、治療薬剤の選択投与についてすすんで具体的な資料がえられるわけであろう。

亜急性細菌性心内膜炎の症例：1例<sup>16)</sup>としての亜急性細菌性心内膜炎症例(図略)では、アレルギー体質のため PC の大量注射にふみ切れなかつたが、分離緑レン菌の D 法による MIC 値の 10 倍以上の血中濃度を Phenoxypropyl-PC の内服で持続できることを本症例自身の測定成績でたしかめ(図 4)、本剤の内服のみで全治せしめた。この際、表 6 のように定性的判定では多くの薬剤に 卅 を示し、これのみでは血中濃度との対比には具体的なデータはえられないわけであり、MIC が求められて始めて治療に役立つわけである。同様な症例をその後も経験しているが、本症の治療に MIC の数倍の血中濃度の持続が必要であると云う三方教授の主張に、さらに最近 長谷川、富岡<sup>17)</sup>らは、血餅を用いた *in vitro* の実験から、MIC 値は本症の有効治療にあずかる 1つ

表 7 感受性の表現、一、+, 卅, 卅などの基準に対する要望(私見)

臨床的見地から	「一、+」の境界 MIC は少しでも有効性の薬剤を見落さないように → すなわち低すぎないように 「卅, 卅」の境界 MIC は極めて有効なケースをチェックできるように → すなわち高すぎないように
臨床検査としての測定精度の見地から	「一、+, 卅, 卅」の各々に相当する MIC のひらきは、一般検査レベルでの MIC の差(2倍キヤク法による)をディスク法でも表現しうるよう → 2倍キヤク法の測定値のバラツキの幅(棄却限界≒3.4)を上回るよう、したがって「一、+, 卅」の幅はすくなくとも 12 倍以上を要する

図 4 本症例についての P.P.-PC 5 時間ごと服用中の血中濃度

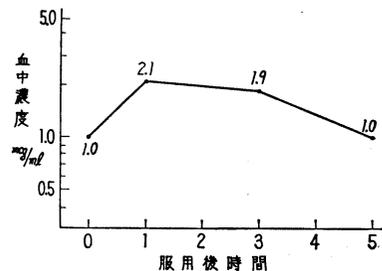


表 8 感受性試験を行なう薬剤選択の基準 (案)

◎ 感受性シケンの値が大い、○ ときに感受性シケンの成績が参考となる、} ほぼいずれかで代用できる

化学療法剤	投与経路		用記号	商品名	A) 疾病の種類が如何にかかわらず施行		B) 病気の部位(34果検体の種類によりA)に追加				尿路感染	
	注	内外			1) グラム陽性菌(双球菌)	腸内菌(グラム陰性球菌)	グラム陰性桿菌	局所感染(創傷・皮膚)	眼・耳鼻・歯科	腸管感染(赤痢・腸炎)		
天然ペニシリン				PC-G	ペニシリン	◎						
合成ペニシリン				PE-PC	シンシリン, シンセベン, マキシペン	◎						
				PP-PC	シンセベンP, トレスシリン	◎						
				MCI-PC	スタフシリンA	○	◎					
					プロスタフィリン, メトシリ ンS	○	◎					
				AB-PC	ビクシリン, ベントレックス, シレラール, アンピシリン, ペンブリティン	◎			◎			
				ヘタシリン								
合成セフェン				CER	セボラン, ケフリジン	◎			◎			
				CET	ケフリン	◎			◎			
				SM	ストレプトマイシン, ジヒド ロストレプトマイシン, デス オキシマイシン	◎			◎			
				KM	カナマイシン							
					カナマイシン							
					カネンドマイシン							
テトラサイクリン系				TC	アクロマイシン, テトラシン, ネオサイクリン, プリサイ, コサテトラシン……							
				OTC	テラマイシン							
				DMCT	レダマイシン	◎			◎			
					ロンドマイシン, アドラマイ シン							
				PRM-TC	ピロサイクリン, ホスタサイ クリン							
				CP(CM)	クロロマイセチン, ケミセチ ン, パラキシン, クロラムフ ェニコール, アンタシン	◎			◎			
					ネオマイゾン							
マクロライド系				EM	アイロゾン, アイロタイシン, エリスロシン	◎						
				LM	ロイコマイシン	◎						
				OM	オレアンドマイシン, トリア セチルオレアンドマイシン	◎						
				SP	スピラマイシン	◎						

ノボビオシン		○	NB	アルビオシン, キャソマイシン	◎					○ 変形菌
リンコマイシン	○	○	LCM	リンコシン	◎					
バシトラシン			BC	バシトラシン				◎		
パロモマイシン		○	PRM	フマチン					◎	
アミノサイジン	○			アミノサイジン	◎		◎			
ゲンタマイシン	○		GM		◎		◎			
ポリミキシンB	○	○	PL-B	ポリミキシン				◎		
コリスチン	○	○	CL	コリスチン				◎		
フラジオマイシン		○	FRM	デスクトロマイシン, エグザマイシン, フランセチン, フラザオマイシン, ネオマイシン				◎	◎	
各種サルファ剤	○	○			◎		◎			
ニトロフラン系	フラゾリドン		○	メダロン, ブラジン, フラゾリドン, フリドン					◎	
	ジハイドロオキソメチルフラトリジン		○	パンフランS, フラトン					◎	○
	ニトロフラントイン		○	フラダンチン						◎
ナリジキシックアシッド		○	NA	ウイントマイロン			◎			

金沢, 臨床検査 8(7):70(1946) に追補

表 9 供試 *Staph. aureus* に対する CER の MIC\* (mcg/ml)

菌 株	キシャク法	ディスク法	
No. 1 S21	0.062	0.49	β-lactamase 産 生
2 S10 中川	"	0.92	
3 SO-39	"	1.4	
4 SO-55	"	1.4	
5 SE-30	"	0.048	
6 S4-2	"	0.052	" 非産生
7 SB-28	"	0.026	
8 S1033	"	0.052	

\* 平板キシャク法 16 時間判定 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 接種

の重要な因子であることを明らかにした。

**MIC 値と臨床効果について**

MIC 値と臨床効果については, ABBOUD<sup>18)</sup> の敗血症についての成績でも, 私ども<sup>11)</sup>が 1960 に全国の方々の御協力をえて行なつた全国集計における, 敗血症, 尿路感染, およびそれら全部の合計でも両者の間にはかなりの相関がみられた。したがって暫定的基準である +, - などの表現も実際的見地からはかかせないが, 前項のように MIC の重要性をも考慮し要求があれば何時でも MIC を示しうる態勢が必要であろう。

+, - などの定性的判定と MIC の関係についての要望: 実際問題として日常行なわれているように, D法による感受性を +, - などの定性的判定で表現することは

実用的であると考えられる。前述のようにその基準は今日なお不定であるが, 臨床的観点ならびに臨床検査としての観点から, つぎの点がその基準制定の1つの参考事項に加えられるべきと考えている (表 7)。

**感受性検査を行なう薬剤の組合せ**

現在数多くの化学療法剤が供給されつつあり, いっぱい, これら薬剤の感受性シケン用の D もほとんど常に使用可能である。多忙な検査室で必要で十分な薬剤 D を使用して能率をあげて臨床面の期待にも充分答えるべきであろう。この意味で表 8 のような感受性シケンを行なう薬剤選択の私案を示す。

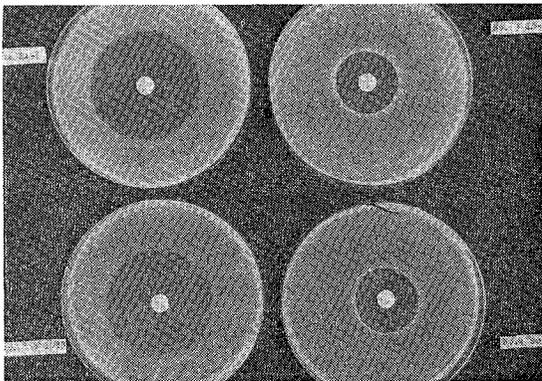
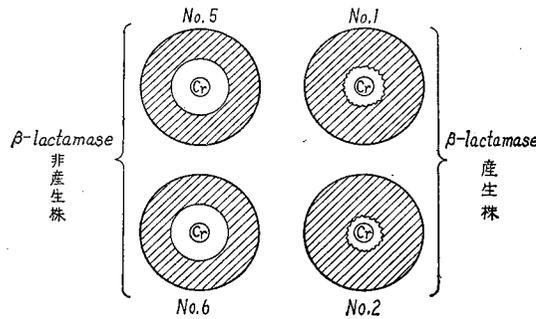
**ディスク法による MIC とキシャク法による MIC 値の本質的に不一致の場合の検討**

私どもは D 法による MIC 値と, キ法による MIC 値の不一致の場合の有無についてたえず検討してきたが, 本質的に両者の値が一致しない, すくなくとも 2 つのケースを経験することができた。

その 1 つは β-lactamase, すなわち PC-ase, Cephalosporinase 産生菌の PC 類, Cephalosporin C 剤感受性値と, 他の 1 つは三橋ら<sup>19)</sup>により明らかにされた Macrolide 誘導耐性菌の感受性値である。そのいずれも D 法ではキ法に比し数倍耐性に傾いた MIC 値を示す傾向があきらかにみられた。

キシャク法, ディスク法不一致のケースの *in vivo* 効果からの観察: この際 PC 類とブドウ球菌の組合せて

図5 キンチャク法で同一 MIC を示す *Staph. aureus* のディスク法における阻止円



は、キ法、D法ともに PC-ase 産生、非産生株はほぼ分離し、当然それが *in vivo* 効果との関連が考えられ問題はないようである。しかしブ菌と CER, CET の組合せ、またはブ菌と EM(OL) などの組合せでは、キ法で同一 MIC を示しても D法では数倍耐性に傾いた成績がみられることが多い。この際D法とキ法のいずれが臨床検査として *in vivo* 効果を反映するかのつぎのような動物的実験で検討した。

田所<sup>20)</sup>変法による *in vivo* 効果の観察：表 9, 図 5 のように CER がキ法で同一 MIC を示す β-lactamase 産生、非産生黄色ブ菌各 4 株、また図 6, 表 10 のように EM がキ法で同一 MIC を示す EM 誘導耐性株 1 株、および非耐性株 2 株をそれぞれ求めた。dd 系 5 週マウス雄各群を 5~6 匹とし、上記ブ菌液に 1% に SiO<sub>2</sub> 添加し 10<sup>6</sup>/0.1 ml ずつ背部皮下に接種し、菌接種直後から CER, EM を 0.3, 1.0, 3.0 mg/マウスずつ 8 時間間隔で皮下投与を行なった。48 時間後剖検し、膿瘍径測定、生菌数測定を行なって薬剤の効果を観察した。その結果は図 7, No. 1, No. 2 に示すようにキ法で同一 MIC を示しても D法で耐性に傾いた成績を示す β-lactamase 産生ブ菌に対しては、CER の治療効果はあきらかに非産生菌に対するものより劣ることがみられた。また図 8 No. 1, No. 2 に示されるように、同様キ法で同一 MIC

図6 ディスク法 (16 時間判定)

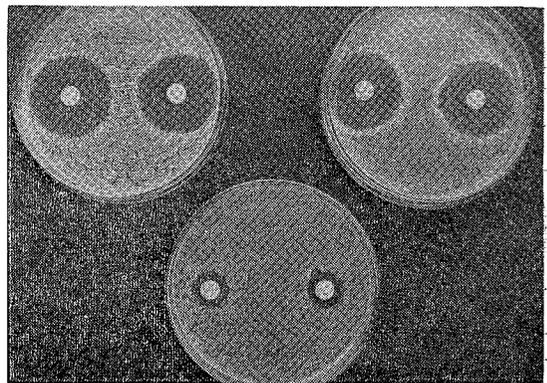
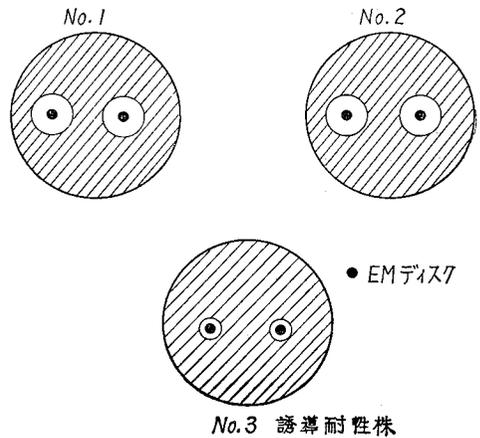


表 10 供試 *Staph. aureus* に対する EM の MIC\* (mcg/ml)

菌 株	キンチャク法	ディスク法
No. 1 S-PS-R-1	0.78	0.29
2 B-28	0.78	0.35
3 MS 353 C 36	0.78	9.4

\* 平板キンチャク法 16 時間判定 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 接種

を示しても D法で耐性に傾いて判定される EM 誘導耐性株に対する効果も、非耐性株に劣る傾向がみられた。また誘導耐性株感染治療の場合は、生体内でも誘導によると思われる耐性株の出現がたしかめられた(図 8, No. 1)。これはD法では発育しつつある菌に対して、薬剤が低濃度から高濃度に漸増しながら作用するので、*in vivo* で当然発揮されると考えられる病原菌の適応作用としての不活化酵素産生、または誘導耐性獲得が十二分に表現されるためであろう。あたかも投与された薬剤が血流を介して組織へ浸透して病巣の病原細菌に作用し、いつば菌がこれに対処する生体内の状態をD法ではよく反映されるものと思われた。

図7 平板キynch法で CER に同一 MIC を示した *Staph. aureus* ( $\beta$ -lactamase 産生, 非産生株) のマウス背部皮下接種膿瘍に対する CER の効果

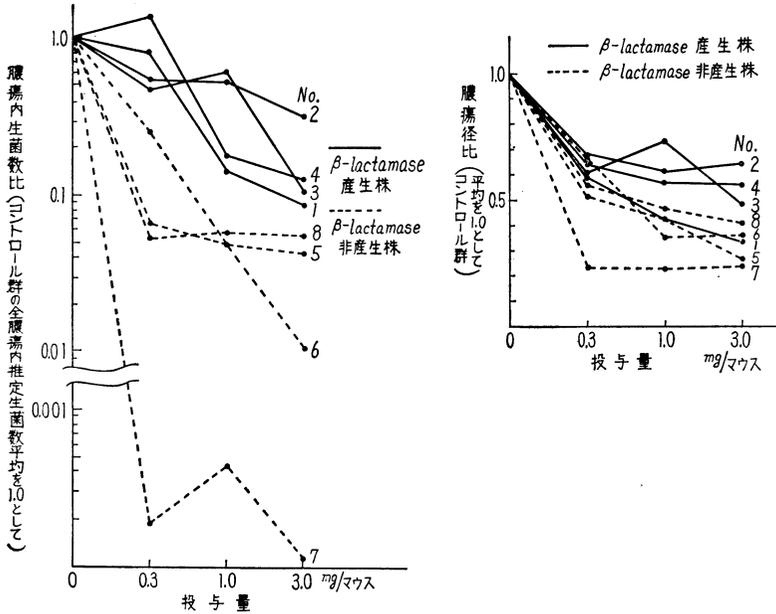
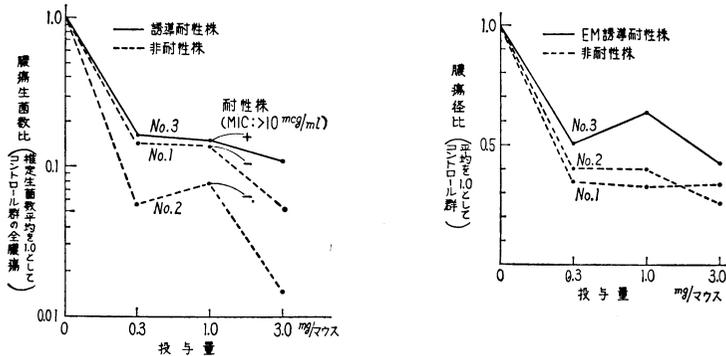


図8 平板キynch法で EM に同一 MIC を示した *Staph. aureus* (誘導耐性, 非耐性株) のマウス背部皮下接種膿瘍に及ぼす EM の効果



ディスクの安定性に関する検討

現在までD法で明らかに誤った結果のえられた場合について検討すると、その大部分はDの力価低下に基づくことが判明したので、その安定性について検討を加えた。

実験方法：標準菌株として *Staph. aureus* 209 P, 一部 *E. coli* NIHJ 株を用い、D法を行ない、16 時間後に出現した阻止円直径を測定し、力価表現の指標として安定性を検討した。

測定成績：図9に示すように PC 類, Cephalosporin C 剤Dは冷室に乾燥剤封入, 密栓の上保存すれば7カ

月間は安定であつたが、室温保存では5カ月以上で力価低下の傾向が、一部でみられた。しかし図10にみられるように、これらのDは一度開封使用すると、冷所保存でも力価低下が2カ月後には明らかであつた。しかし図11に示されるようにその他の薬剤では、乾燥剤封入密栓保存すれば、2年半にわたり安定と考えられた。また PC 類, CER, CET, Bacitracin を除く他の薬剤Dは、フラン器 (37 °C) に開封保存しても力価低下が1カ月後にもほとんどみられなかつた (図12)。

要するに PC 類, Cephalosporin C 系薬剤は安定性が低いので、厳密な乾燥剤同封, 密栓, 冷室保存を要し、一度開封使用した場合は、冷室保存でも2カ月までが使用限度と考えられた。しかし Bacitracin (PC, CER 類よりは安定であるが多少力価低下傾向を示す) をのぞけば、その他の薬剤は室温保存でも一般使用に際して安定であろう。

ディスク法の臨床検査としての利点

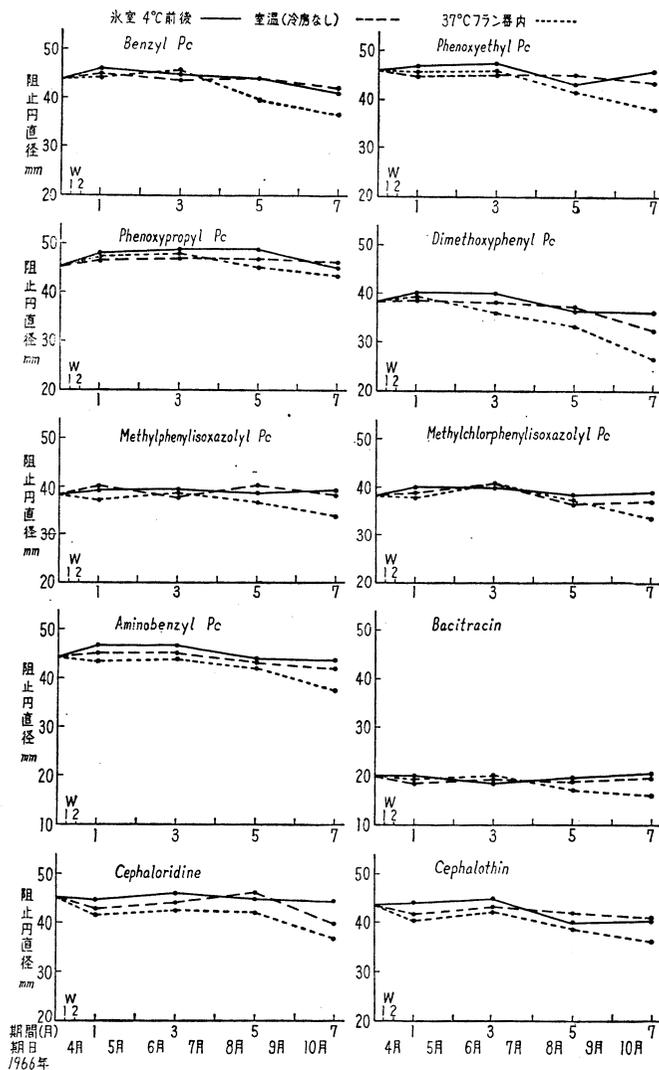
D法は常にキ法の基礎の上に成立すべきことはいうまでもないが、つぎのような点はキ法に比してすぐれていると考えられる。

経過を追つて観察できる：キ法はいかに研究室といえども菌分離のたびに行なうことは不可能で、まとめて施行するのが実状である

う。菌株は植えつき保存中に感性値の変化をきたすことが知られている。とくにこの問題について系統的に検討した紺野博士<sup>21)</sup>は、この変動が PC, TC, SM, CP のいずれにも予想外に大きくみられ、これが感受性と臨床効果不一致の1因となる可能性がすくなくないとのべている。いつぼう、D法は極めて手軽に行なうことができるので経過を追つて頻回に検し、充分な資料をたえず提供しうる可能性が多い。

細菌の薬剤不活化作用がディスク法阻止円状態から推定しうる：また本法で始めて観察しうる阻止円の状態か

図 9 乾燥剤封入密栓保存した場合の力価の変動



ら 2, 3 の性状を推定しうる特徴がある。すなわち図 13 のようにブ菌の  $\beta$ -lactamase (PC-ase, Cephalosporinase) の産生がその阻止円境界の不整、過剰発育で推定される<sup>1,2,4)</sup>。図 13 左不活化、右非不活化を示す。また同様各種細菌の Nitrofurantoin 不活化<sup>22)</sup>、CP 耐性ブ菌、CP 耐性赤痢菌の CP 不活化、多くの細菌の Colistin<sup>22)</sup>、Polymyxin B<sup>22)</sup> の不活化、および多くの嫌気性菌<sup>23,24)</sup> の CP 不活化など potential の高い extracellular の薬剤不活化も、ほぼ同様所見をもつて表現されているのを観察することができ (図 14)、臨床効果推定上重要な資料を提供することがあると考えられる。

二重リング (阻止帯内菌発育) 形成からの耐性菌の混在の推定：すでに塩田<sup>25)</sup>らの報告にもあるように、同一

菌株中の耐性菌の混在が、1例として TC について図 15 に示したように二重リングとなつて表現される。したがつて本法で容易に耐性菌の混在の有無程度がはあくされ、臨床効果の解析に貴重な資料を提供しうる可能性がある。

この最後の 2 つはキ法ではほとんど推定不能で、D 法で始めて可能であろう。

#### ディスク法のその他の応用

D 法は簡易な操作でありながら、連続的な薬剤の濃度勾配をうることのできる利点があり、各種の応用が行なわれている。以下その試みについて簡単に解説する。

直接法：尿、滲出液、髄液、膿など起因菌のみが見出された場合に本法を行なうことができる。本法の成功率、検出菌種、検体などについては小酒井<sup>26)</sup>の詳細な検討がある。また私<sup>3)</sup>どもはさきに検体のトマツ直接鏡検を行なつた場合の 1 視野の菌数から D 法としての好適な接種菌量をコントロールする試みについても報告した。これらの所見ならびに諸家の直接法に対する見解を総合し、私見を加えてその評価を表 11 のようにまとめることができた。

迅速法について：濃厚菌接種により短時間 (3~4, 5~6 時間) で出現した阻止円の大きさから、あらかじめ実験的に述べられた迅速法の判定基準を利用して、短時間で感受性のスクリーニングができる。また起因菌のみ検出された材料では検体入手後 3~4 時間で成績をすることができ (図 16)。

殺菌作用の推定：D 法を行なつた平板をレプリカ法で新しい平板にうつし、阻止円中の菌の発育を観察して、簡単に殺菌作用の有無程度をたしかめることができる (図 17)。

同一検体のコロニーごとの感受性の相異の簡易検査法：同一検体内のコロニーごとの感受性の相違をするには D をおいてその周囲に放射状に菌を接種し出現した阻止帯の長さを計測し、同時に多数の菌株の感性値 (MIC をふくめて) をある程度推定することができる。

併用効果の推定：ことなる 2 つの D によつて生ずる阻止円の重なる部分の形状を観察し、協力作用、拮抗作用をある程度推定できることはよく知られている。図 18

図 10 Week day に毎日 30 分間宛開栓後保存

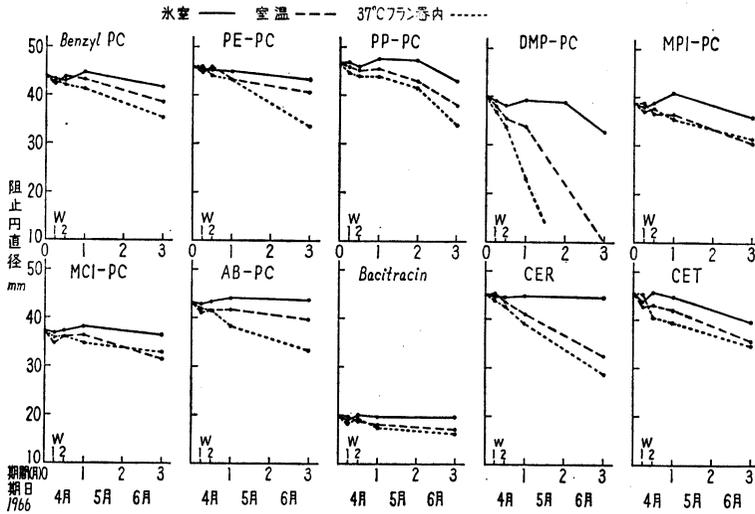
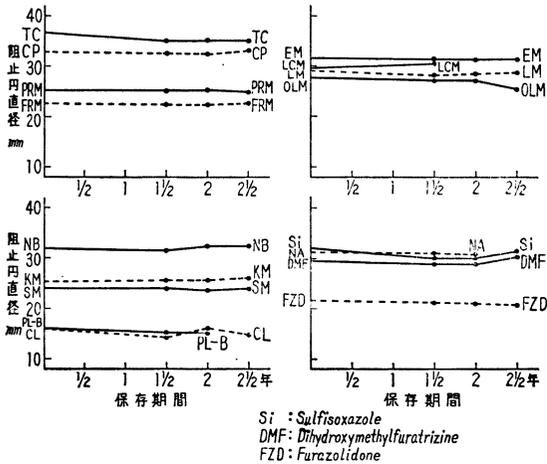


図 11 乾燥剤封入，密栓，室温（冷房なし）保存による感受性ディスク力価の変動

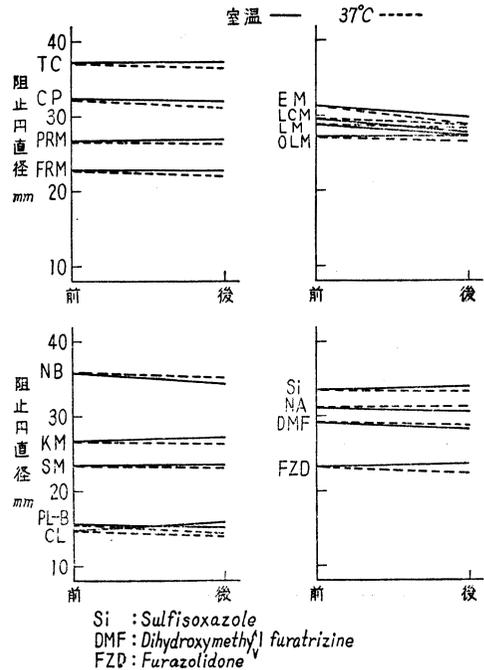


は  $\beta$ -lactamase 産生グラム(-) 桿菌に対する Cephalosporin C 剤と，抗 PC-ase PC の相乗効果を示したものである。

つぎは私も<sup>27,28,29</sup>がさきに報告した Nalidixic acid の *Proteus-Providencia* に対する抗菌力が Nitrofurantoin により拮抗される状態を示している。これらの関係はいずれもキ法でも全く同一の結果がえられている(図 19)。

**誘導耐性の簡易検査法：**耐性を誘導する可能性のある薬剤Dを，菌トマツ平板におき，その周囲に被検薬剤Dを配置すれば，後者の阻止円の縮小から誘導耐性の有無が容易に推定しうる。図 20 は黄色ブ菌が EM にふれることにより EM, OL, SPM, LCM などの Macrolide に同時に耐性になることを明瞭に示している。Macrolide 系

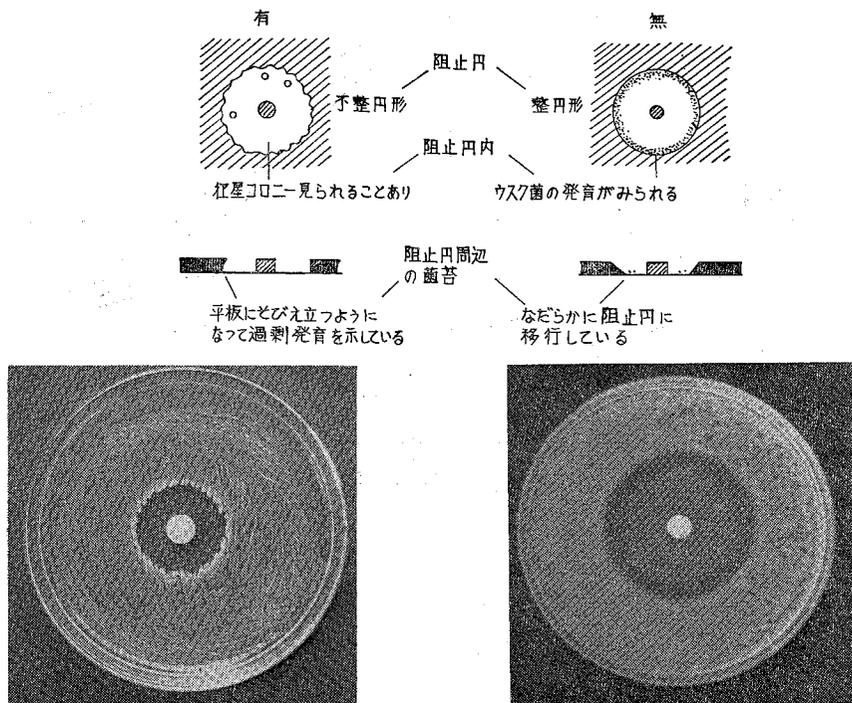
図 12 乾燥剤封入，密栓，1年間室温（冷房なし）保存後，開封のまま 37°C フラン器内及び室温（冷房なし）に1ヵ月（1966年9月）放置した際の力価の変動



薬剤相互の使用変更に対してこのような簡易検査からきめの細かい情報をうる事ができよう。

**耐性獲得の簡易検査法：**D法を行なった平板の阻止円境界に近い部分の菌苔をもつて，D法をくり返すことにより耐性獲得の難易を阻止円の大きさの不変，縮小から容易に観察できると考えられる(図 21)。

図 13 ブドウ球菌の  $\beta$ -lactamase に相当する Penicillinase, Cephalosporinase 産生の有無による Disc 法阻止円の形状の差 (不活性化)



Staph. aureus の CER ディスク法平板を示す  
 左 不活化 ( $\beta$ -lactamase) 産生株      右 非不活化 ( $\beta$ -lactamase) 非産生株

表 11 直接法 (Disc 法) による感受性シケンの特徴及び欠点

長 所	短 所
1 日早く結果が判明する (迅速法を併用すれば数時間以内で)	つねに成功するとは限らない→やり直しの必要のあることあり
生体内にある程度近い状態で、菌の混合 (耐性, 感性をふくめて) とその割合が判明することあり	
	接種菌量の規制がやや困難であるので、成績のブレが大きい (ある程度規制することはできる)
ただし、喀痰でも肺炎球菌、ヘモフィルス、黄色ブドウ菌優勢の場合は有意のことあり	常在菌の混入のある材料 (喀痰) などでは、起因菌の感性が判明しないことが多い
	混合菌の各々に対しての有効薬剤の異なる場合は、耐性の成績しか得られないので、有効薬剤の併用による有効ケースを見逃すおそれがある

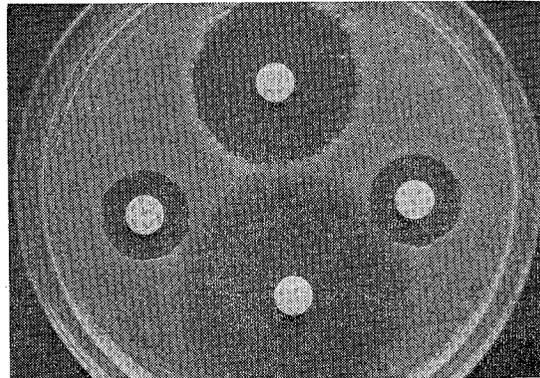
(白羽, 小酒井, 田中, 岡本, 水谷, 戸塚氏等の記載を参考に)

細菌の化学療法剤不活化能の簡易検査法: 大久保教授の帯培養法と同様に、検定菌接種帯状薄層寒天平板を作製し、その中心に被検薬剤の D をおき、その一方に被検菌を濃厚にトマツし、検定菌阻止帯の縮小を観察し、細菌の extracellular の薬剤不活化能の有無、程度をすることができるとはさきに<sup>22,30)</sup>報告した。起因菌の薬剤不活化能が判明すれば使用薬剤の選択、化学療法剤効果

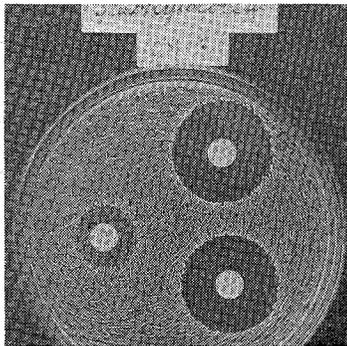
の解析に有要な資料を提供する可能性がある。最近私どもの経験したフリードレンデル肺炎では、分離原因菌が CER にキ法で高感受性を示しながら CER の効果すくなく、KM、つづいて SM の使用で軽快したが、本法により分離肺炎桿菌が CER 不活化能を示したことは、この間の事情の解析に 1 つの示唆を与えるものと考えられた。

図 14 細菌の薬剤不活化作用と阻止円境界の形状

被検菌 *Sh. sonnei* (感性株)  
 CP(上) 不活化(-)で境界整円 Polymyxin B(左)  
 CL(右) Dihydroxymethylfuratrizine (下) はいずれも不活化(+)で不整円を呈している



CP 耐性ブ菌(CP 不活化+)の CP ディスク(2,000 μg 含有) に対して阻止円の不整がみられる



嫌気性菌, 1例として *Bacteroides convexus* のディスク平板

PC(不活化-)で整円  
 CP(不活化+)で阻止円境界不整

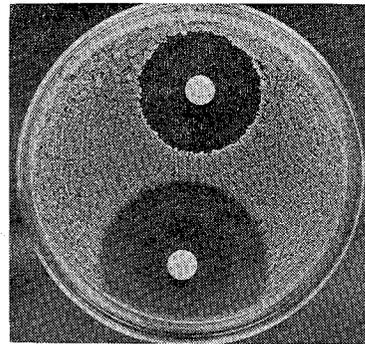
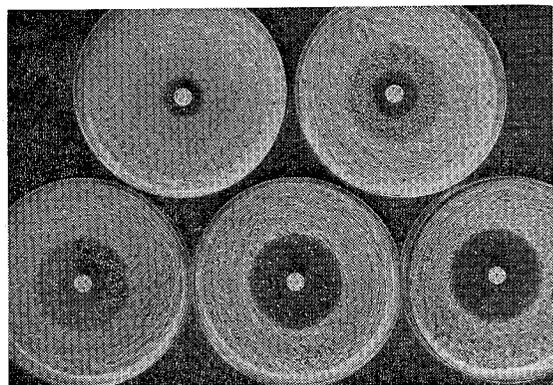
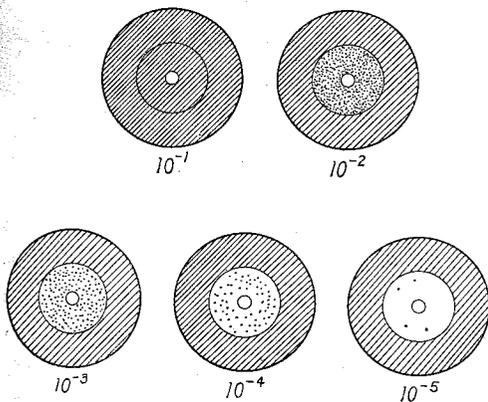


図 15 耐性菌混合の推定 (人工的に混合した場合の成績から)



(PC, TC, SM, CP にほぼ共通にみられた)

表 12

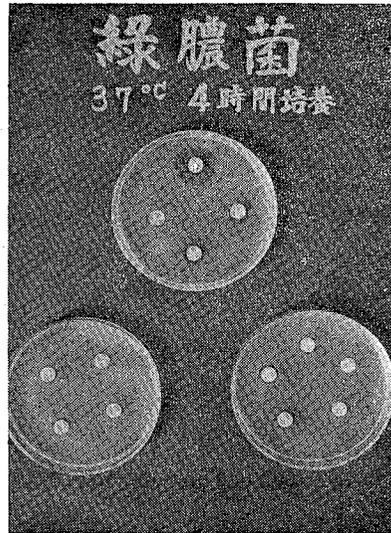
使用菌株	株数	記号
<i>Clostridium tetani</i>	3	○
<i>tetamorphum</i>	2	
<i>sporogenes</i>	1	
<i>cochlearium</i>	1	
<i>perfringens</i>	2	
<i>Peptococcus</i>	4	●
<i>Peptostreptococcus</i>	2	●
<i>Corynebacterium anaerobium</i>	1	■
<i>pyogenes</i>	2	
<i>granulosum</i>	1	
<i>liquefaciens</i>	1	
<i>Cillobacterium moniliforme</i>	1	△
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	×
<i>convexus</i>	1	
<i>thetaiotaomicron</i>	1	
<i>Sphaerophorus funduliformis</i>	2	⊗
<i>Fusobacterium fusiforme</i>	2	●
<i>nucleatum</i>	1	
<i>Ristella perfaetens</i>	1	⊠
<i>Fusocillus girans</i>	1	
<i>Veillonella</i>	3	■
計	34株	

表 13 薬剤の抗菌スペクトラムの差を利用して混合している菌を分別する

使用薬剤ディスク	分別分離できる菌 感受性がないのでディスク周辺まで発育する	除外できる菌 感受性があるのでディスク周辺では発育が阻止される
バントラシン	インフルエンザ菌 その他 グラム(-)桿菌	ブドウ球菌
カナマイシン	レンサ球菌	ブドウ球菌 グラム(-)桿菌
フラジオマイシン	肺炎球菌 レンサ球菌	ブドウ球菌 グラム(-)桿菌
ペニシリン (とくに MPI MCI)	百日ぜき菌	ブドウ球菌
ナリジキシン酸 コリスチン ポリミキシン	ブドウ球菌 肺炎球菌 レンサ球菌	グラム(-)桿菌
ナリジキシン酸	緑膿菌	他の グラム(-)桿菌

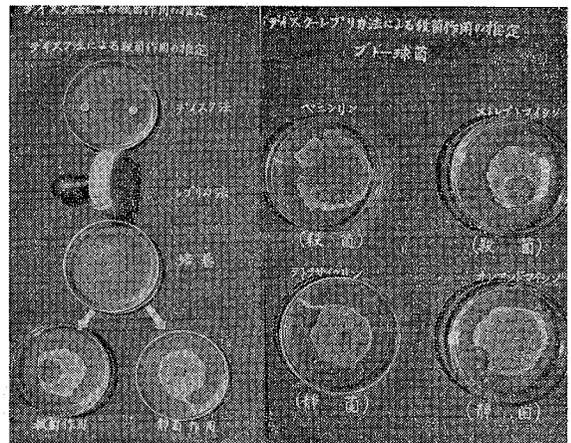
嫌気性菌の感受性シケンとしてのディスク法：臨床検査としての嫌気性菌の重要性が認識されつつある。表12のような岐阜大 上野博士分与株を供試菌株、岐阜大式消化血清加寒天培地<sup>31)</sup>を測定培地として用い検討した。

図 16 直接迅速法の 1 例



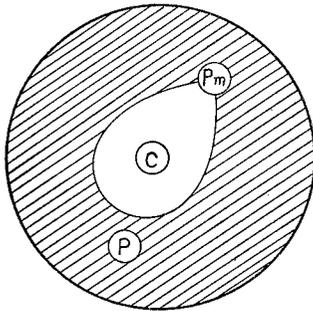
尿沈渣の濃厚トマツにより検体入手4時間後に感受性スクリーニングの出来た平板を示す

図 17 殺菌作用の推定



10<sup>4</sup>~10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup> 程度(数白金耳を 1 ml に浮游し、その 1 白金耳を普通平板に拡げる)に菌を接種し D をおいて、D 法を行ない、いつぼう、キ法でも cm<sup>2</sup> 宛同様接種菌量になるように考慮した。高価な市販の嫌気性ジャーを多数用意することは不可能であったので検討の結果、家庭で梅酒をつくるための市販のゴムパッキンのある大型のガラス容器は、容易に気密にすることができ、取扱いも便利なのが判明した。本容器に飽和重曹水を同封、スチールウール法を行ない、同時に多数の平板を処理して

図 18 併用効果の推定  
 グラム(-)桿菌, Arizona ( $\beta$ -lactamase 産生) に対する  
 Cephalosporin C 剤と 抗  $\beta$ -lactamase PC 剤の併用効果



C: Cephalexin  
 P<sub>m</sub>: MCI-PC  
 P: PC

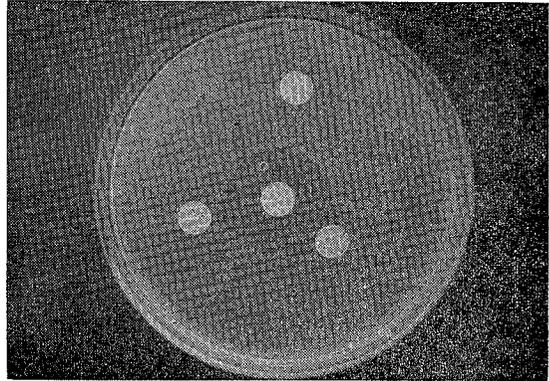
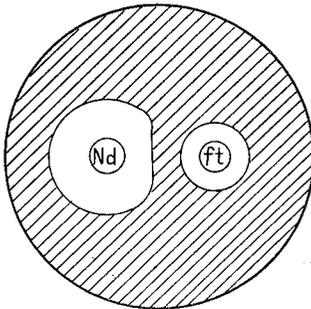


図 19 拮抗作用  
 Nalidixic Acid(Nd) の *Proteus* 群に対する Nitrofurantoin  
 剤の拮抗作用



ft: Nitrofurantoin

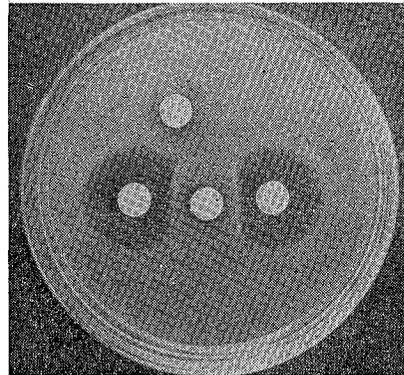
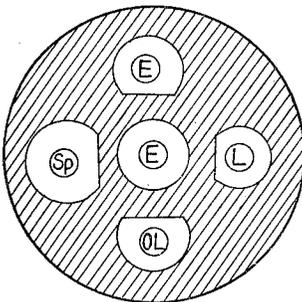


図 20 誘導耐性の簡易確認法  
 Inducer の考えられる薬剤 disc をおいて、その周囲に  
 各種薬剤 disc を置き、阻止円縮小を観察する



EMにより誘導される  
 ブ菌のマクロライド耐性  
 の一例

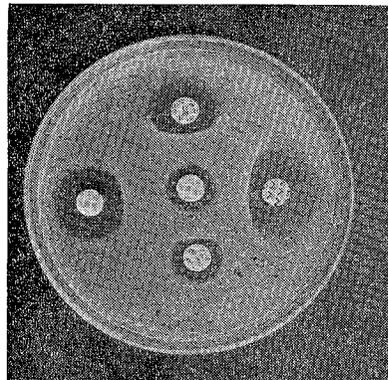
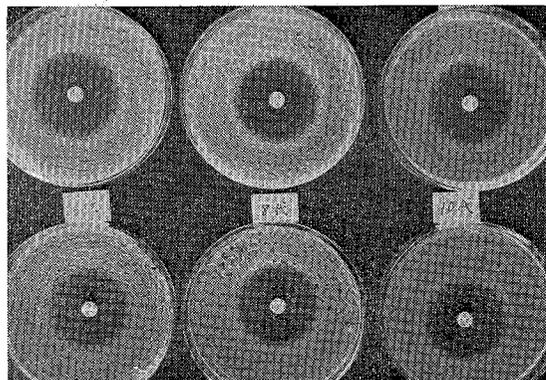
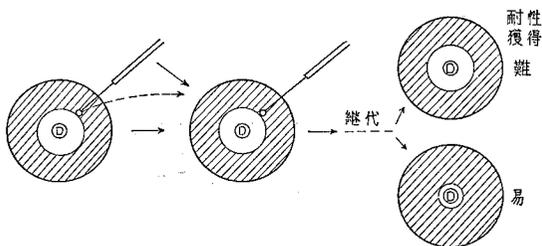
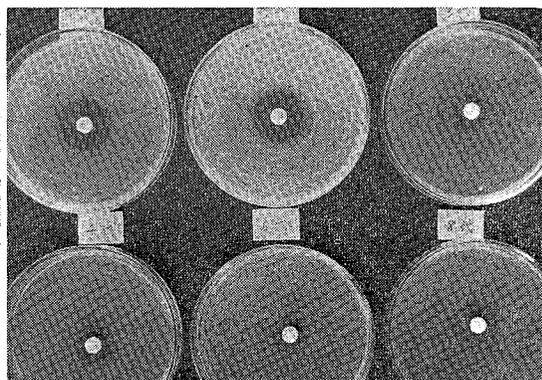


図 21 耐性獲得の簡易検査法



*Staph. aureus* に対する継代 TC ディスク法, 阻止円の縮小なく耐性獲得難の成績を示している

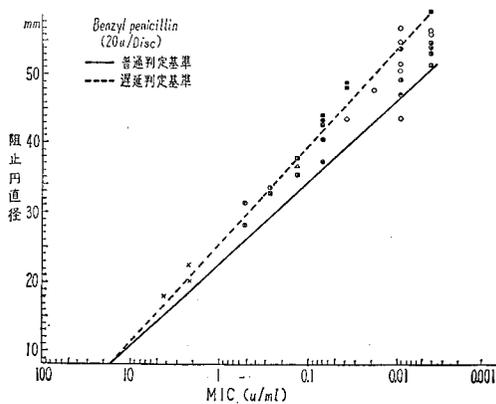
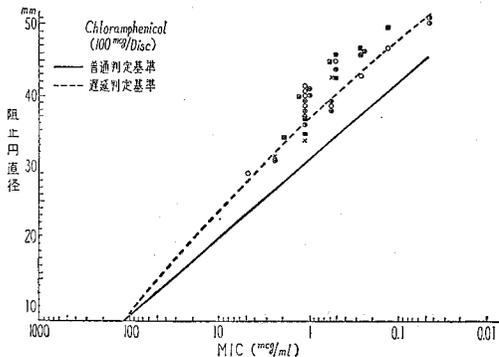
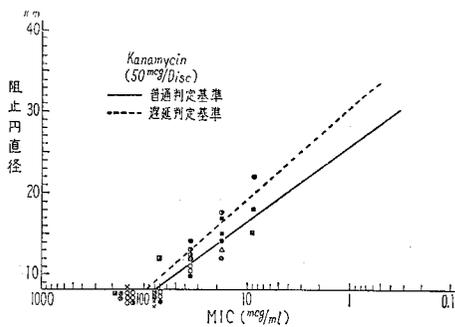
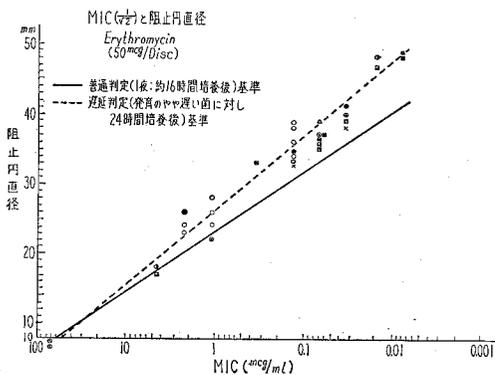


*E. coli* に対する継代 KM ディスク法, 阻止円縮小し耐性獲得を示している

図 22 嫌気性菌のディスク法直径とキジャク法 MIC の関係

嫌気条件: スチールウール法, 飽和  $\text{NaHCO}_3$  水同封  
培養:  $37^\circ\text{C}$  24 時間

培地: 岐阜大式消火血清加寒天培地 pH 7.4



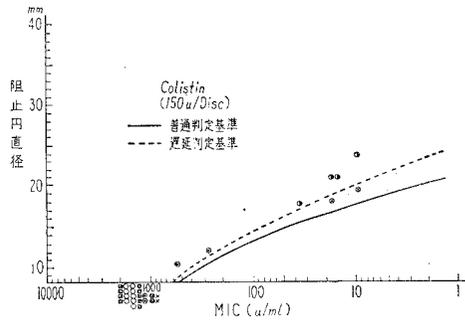
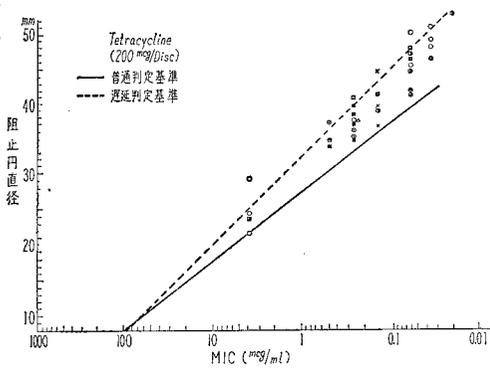
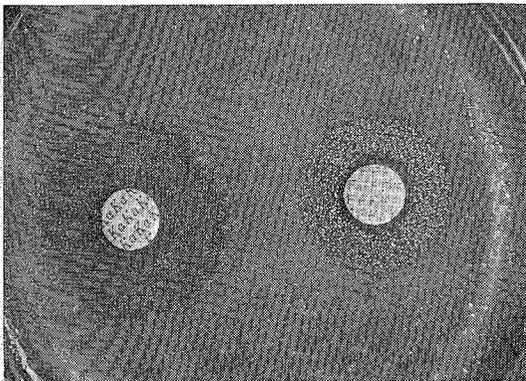


図 23 感受性ディスクによる混合感染分別の1例



交通災害による腸管損傷例の腹膜炎膿汁から *Morganella*(カナマイシン Ka フラジオFに感受性があるので阻止円外側にのみ発育) および腸球菌(KaFに感受性がないので阻止円内でディスク周辺まで発育)を分別同定した寒天平板を示す

表 14 抗菌スペクトラムを利用した菌種の簡易推定法(薬剤感受性の差を利用して菌株同定の参考とする)

使用薬剤 ディスク	感受性あり S	感受性なし R
バシトラシン	A群の溶連菌の大部	A群以外の溶連菌の大部
オプトヒン	肺炎球菌	レンサ球菌
ポリミキシンB* (コロスチン)	<i>Sphaerophorus</i> , <i>Fusobacterium</i>	<i>Bacteroides</i>
ネオマイシン** (フラジオマイシン)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
ノボビオン	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>

\* 鈴木(祥) 1968 より

\*\* FÜZI, M. 1963 より

24時間培養後判定し、能率をあげることができた。図22に示すように阻止円直径とMIC(2倍キ法のMIC  $1/\sqrt{2}$ )の間に充分な並行関係があり、その座標は好気性

菌における、遅延判定の曲線に近い傾向が明らかであった。したがって24時間培養感受性値判定のためには、遅延判定の基準が適用されることが考えられた。

抗菌スペクトラムの差を利用して混在している菌を分別する：抗菌スペクトラムの差を利用して表13に示すように、混在している菌を分別分離することができる。1例として腹膜炎膿の直接トマツ平板にFradiomycin, KMのDにおいて混合菌の分離に役立つ平板を示す(図23)。

菌の薬剤感受性の差を利用して菌種同定の参考とする：表14のように菌種の薬剤感受性の差を利用して、菌種の同定の参考とすることができる。

おわりに

以上を要約すると、臨床的感受性測定法としてのD法は、あくまでもキ法のデータの上に成立すべきものとして検討が行われてきた。その結果として、ある程度キ法によるMICの推定可能なD法の完成も近いようにも思われる。しかし方法の性質上キ法と一致しない場合があきらかに存在するが、現在までのところこのような場合にはD法がむしろ生体内の状況をよく反映している成績がえられている。

D法と同一原理の寒天平板拡散法であるカップ法、またはペーパーD法が簡易検査でありながら、抗生剤の力価検定法として精度がよいので、キ法に代つて国際的に製剤基準として広く用いられている事実、さらに抗生剤発見の端緒とも云うべきFLEMINGのPC発見のプレートは、現在のD法に直接つながるものであることを認識し、臨床家も、細菌検査部門の方もD法を大いに活用すべきであろう。また使用D、使用培地の製造担当者も、本法の臨床検査としての重要性を充分認識し、充分な製品管理の上、精度管理を含めて多くの批判に耐えるガラス張りの資料を提供するよう、この機会をかりて念願する次第である。

おわりに本講演の機会を与えられた大久保会長に厚く

感謝するとともに、有意義な企画を実施され、集計の上研究参加者に資料を配布され、自由な検討を許された藤井、桑原博士、また本部におけるD法のパイオニアとして基礎的検討をおこなわれた故鳥居敏雄教授、故村山翁助博士にこの機会を借りて敬意を表する。共同研究者の新潟鉄道病院 倉又利夫、御指導いただいた新大細菌宮村教授、菌株提供いただいた岐阜大 上野博士、群馬大三橋教授、橋本博士、新潟衛研 篠川博士、資料提供頂いた昭和薬品化工、日水製薬、日本栄養化学株式会社 に厚く感謝の意を表します。

#### 参 考 文 献

- 1) 金沢 裕：細菌の化学療法剤感受性測定法としてのディスク法。Chemotherapy 9(1)：50~67, 1961
- 2) KANAZAWA, Y.: Clinical use of the disc sensitivity test. Antimicrob. Agents & Chemoth. 1961：926~924, 1962
- 3) 金沢 裕, 倉又利夫：臨床応用を目的とした感受性ディスク法の研究, とくに接種菌量ならびに直接法に関する検討。J. Antibiotics, Ser. B 17(5/6)：256~263, 1964
- 4) KANAZAWA, Y.: Single disc method for MIC determination. J. Antibiotics, Ser. A 19(4)：175~189, 1966
- 5) 田中脩示：Penicillinase 産生ブドウ球菌のPenicillin G 感受性に関する研究。Chemotherapy 14(5)：410~419, 1966
- 6) 金沢 裕：感受性測定の標準化 (1. ブドウ球菌)。Chemotherapy 10(5)：352~357, 1962
- 7) 金沢 裕：臨床的立場からの感受性測定法の検討。医人 14(2)：90~97, 1965
- 8) 金沢 裕：ディスク法における菌接種法について。臨床検査 3(5)：178~179, 1959
- 9) 金沢 裕：Sensitivity Tablets 法による細菌の化学療法剤に対する感受性の定量的測定法。J. Antibiotics, Ser. B 7(9)：317~324, 1954
- 10) 金沢 裕：臨床応用を目的とする感受性ディスク法の研究。J. Antibiotics, Ser. B 10(3)：85~91, 1957
- 11) 三宅 修：ディスク法による感受性測定に関する基礎的検討 (1)。Chemotherapy 15(6)：690~698, 1967
- 12) 藤井良知, 桑原章吾, 石山俊次：昭和41年12月12日付 配付印刷物, 1966
- 13) 金沢 裕, 倉又利夫：感受性ディスク法の測定精度について (とくに13回東日本化療学会におけるキッシュ法とディスク法測定値の集計成績 (藤井, 桑原博士による) の推計学的観察)。Chemotherapy 16(7)：847~857, 1968
- 14) TUNEVALL, G. & H. ERICSSON: Sensitivity tests by disc method as a guide for chemotherapy. Antibiot. & Chemoth. 4(8)：886~893, 1954
- 15) 藤井良知, 紺野昌俊, 古屋暁一, 小酒井 望, 桑原章吾：感受性測定の実験条件による動揺について。Chemotherapy 16(5)：743~749, 1968
- 16) 金沢 裕, 寺井元一, 丸山 勇, 高橋吉郎, 倉又利夫：Phenoxypropyl-PC および Aminobenzyl-PC の臨床経験。J. Antibiotics, Ser. B 17(1)：20~23, 1964
- 17) 長谷川弥人, 富岡 一：細菌性心内膜炎の治療。臨床と研究 45(7)：84~91, 1968
- 18) ABBOUD, F. M. & B. A. WAISBREN: Correlation between *in vitro* studies and response to antibiotic therapy in *Staphylococcus* bacteremia. Arch. Int. Med. 104(2)：226~233, 1959
- 19) KONO, M., HASHIMOTO, H. & MITSUHASHI, S.: Drug resistance of *Staphylococci* III. Resistance to some macrolide antibiotics and inducible system. Jap. J. Microb. 10(1)：59~66, 1966
- 20) 田所一郎：ブドウ球菌のマウス皮下に感染実験法。モダンメディア 13(4)：110~118, 1967
- 21) 紺野昌俊：同一病巣内における菌の感受性の差について。最新医学 22(8)：1881~1885, 1967
- 22) KANAZAWA, Y. & T. KURAMATA: Simple method for determination of ability of bacteria to inactivate chemotherapeutics using sensitivity disc. J. Antibiotics, Ser. A 19(6)：272~277, 1966
- 23) 金沢 裕：交通災害と化学療法。交通医学 20(2)：101~116, 1966
- 24) 金沢 裕, 宮村定男, 倉又利夫：Clostridia の化学療法剤不活化能について。日本細菌学雑誌 22(7)：430, 1967
- 25) 塩田憲三, 三木文雄, 東朋 嗣, 岩崎 嶋, 尾崎達郎, 杉山浩士, 赤尾 満：抗生剤感受性と臨床効果の合致性に関する検討, 抗生剤感受性検査法の検討 (その3)。日本伝染病学会雑誌 41(8)：315~316, 1967
- 26) 小酒井 望：化学療法に関連した細菌学的検査のあり方。Chemotherapy 15(2)：140~152, 1967
- 27) 金沢 裕, 倉又利夫, Nalidixic acid の基礎的検討 (活性濃度測定法ならびに *in vitro* 併用効果)。ウイントマイロン文献集, 第一製薬, 18~21, 1965
- 28) 金沢 裕, 倉又利夫：Nalidixic acid の基礎的検討 (活性濃度測定法ならびに *in vitro* 併用効果)。Chemotherapy 14(1)：39~42, 1966
- 29) 金沢 裕, 倉又利夫：Proteus-Providence 菌群に対する Nalidixic acid と Nitrofuran 系薬剤の拮抗作用。日本細菌学会雑誌 21(4)：210~215, 1966
- 30) 金沢 裕：臨床検査としての細菌の化学療法剤不活化能の簡易測定法。臨床病理 16 (総会号)：238, 1968
- 31) 上野一恵：嫌気性菌と嫌気性菌症, 第1版。医学書院 p. 338, 1968
- 32) 鈴木祥一郎：嫌気性菌と嫌気性菌症, 第1版。医学書院 p. 108, 1968