

## 試験管内抗菌作用と感染防御効果との相関について (1)

Ampicillin, Cyclacillin, Cephalexin の感受性測定法の検討

一 色 義 人

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 50 年 6 月 14 日受付)

抗菌薬の基礎的評価を行なう場合、もっとも問題となるのは *in vitro* の感受性値と、*in vivo* における感染防御効果ないしは治療効果との相関である。

感受性値は測定法によって大きく動揺することから、日本化学療法学会では 1968 年に寒天平板希釈法における標準法を設定した<sup>1)</sup>。これによって感受性値 (最小発育阻止濃度 minimum inhibitory concentration, 通常 MIC で表わされる) の相互比較が可能となったが、薬剤や菌種によっては、この標準法で行なっても、やはり測定条件のわずかな違いによる MIC の変動が問題視され、日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会において種々検討の結果、1974 年 MIC 測定法の改訂を行なった<sup>2)</sup>。これより先に感受性測定の再現性について藤井<sup>3)</sup>らは高感受性、高耐性の株においては動揺の少ないことを示しており、三橋<sup>4)</sup>らは 13 種の常用抗菌薬に対する赤痢菌の感受性をしらべ、Sulfonamide, Colistin, Furatrizine, Furazolidon が接種菌量を減らすことによって、MIC が著しく動揺することを明らかにしている。Sulfa 剤について野藤<sup>5)</sup>は接種菌量による MIC の変動が Sulfa 剤の作用機作に由来することを確かめており、日本化学療法学会の Sulfa 剤と Trimethoprim 合剤研究会の MIC 測定小委員会報告でも接種菌量についての検討がなされている<sup>6)</sup>。また Fosfomycin については、薬剤の作用機作による抗菌作用の変動が問題となり、変動要因についての検討が行なわれている<sup>7)</sup>。

本実験は Penicillin 系の Ampicillin (ABPC), Cyclacillin (ACPC), および Cephalosporin 系の Cephalexin (CEX) の 3 薬剤について、*in vitro* および *in vivo* 抗菌作用の相関を明らかにする目的で、まず *in vitro* の抗菌作用について、その測定に影響をあたえていると思われる要因の検討を行なった。

また当教室では多くの菌株を測定するために考案した菌接種装置を用いた押捺接種 (stamp 法) を行なっているので、その方法と従来の塗抹接種 (streak 法) とを比較、両測定法の関連について明らかにした。

## 実験材料および方法

## 1. 実験材料

## 1) 使用菌株

*Staphylococcus aureus* 209-P  
*Staphylococcus aureus* Smith  
*Staphylococcus aureus* B-5  
*Escherichia coli* NIHJ  
*Escherichia coli* 29  
*Escherichia coli* 45  
*Escherichia coli* C 1 1-1  
*Escherichia coli* C 1 2-1  
*Escherichia coli* C 1 6  
*Klebsiella pneumoniae* 16  
*Klebsiella pneumoniae* 25  
*Klebsiella pneumoniae* C 14  
*Proteus mirabilis* 1287  
*Proteus mirabilis* 19  
*Proteus mirabilis* 52  
*Proteus mirabilis* C 1 1-2  
*Proteus mirabilis* C 1 2-2  
*Enterobacter cloacae*

## 2) 薬剤

Ampicillin (ABPC) 867  $\mu\text{g}/\text{mg}$   
 Cyclacillin (ACPC) 1,000  $\mu\text{g}/\text{mg}$   
 Cephalexin (CEX) 952  $\mu\text{g}/\text{mg}$

## 3) 培地

## 前培養培地

トリプトソイブイオン (栄研)  
 普通ブイオン (栄研)  
 Heart infusion broth (栄研) H 1 broth  
 Brain heart infusion broth (Difco) BH 1 broth  
 Peptone water (Polypepton 大五栄養)

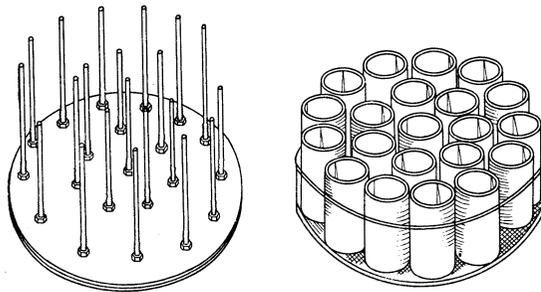
## 測定用培地

普通寒天 (栄研)  
 Heart infusion 寒天 (栄研)

## 2. 実験方法

## 1) 感受性測定法

Fig. 1 Apparatus for inoculation in stamp method



Apparatus for inoculation

Container of inocula fluids

塗抹接種では日本化学療法学会による標準法に準じたが、stamp法ではFig. 1のような装置を用いた。小試験管用のプラスチック製キャップをシャーレに21個立て、シャーレの蓋をして、あらかじめ高圧蒸気滅菌する。使用にあたり、キャップを立てたシャーレに溶解した寒天を流し込み、菌液接種用ステンレス円柱（直径2 mm、長さ3.4 cm）21本を埋込んだ木製円板を、それぞれのキャップの中に1本の円柱が入るように固定したまま、寒天が固まるまで置く。個々のキャップの中の接

種用ステンレス柱が、スタンプのたびごとにずれないように、位置を定めてしるしをつける。接種用菌液を各キャップにそれぞれ2.5 mlずつ入れる。薬剤含有寒天平板上に1度に21菌株の菌液をスタンプ接種する。この条件で接種された菌液量は、ほぼ1白金耳量である。菌株を数多くしらべる時には、接種用ステンレス柱をシャーレに入れたアルコールに浸して菌液を洗い落した後、直ちにバーナーで火焰滅菌する。

## 2) 生菌数測定法

平板混積法により測定した。

## 3) 培養濾液中の抗生物質活性の測定法

培養菌液を遠心した上清に、同じ培地に溶解した抗生物質を加え（500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）37°Cで2時間接触させた後、100°C 1分間加熱して酵素を不活化させる。反応液中の抗生物質の残存力価はカップ法により、CEXでは *Bacillus subtilis* ATCC 6633, ABPCでは *Sarcina lutea* 9341を用いて測定した。

## 実験成績

## 1. 接種菌液によるMICの変動 (Table 1)

試験菌株をトリプトソイブイオンに20時間培養した菌液、およびその100倍希釈液をstamp法で接種した

Table 1 Effect of size of inoculum on MICs of three antibiotics

Medium: tryptosoy broth (for inoculum) and heart infusion agar

stamp method

Antibiotics Organisms	CEX			ABPC			ACPC		
	* 0	100×	Sensitivity pattern	0	100×	Sensitivity pattern	0	100×	Sensitivity pattern
<i>Staph. aureus</i> 209 P	6.25	3.12	Se-Se	<0.39	<0.39	Se-Se	1.56	1.56	Se-Se
<i>Staph. aureus</i> Smith	6.52	6.25	Se-Se	6.25	<0.39	Se-Se	3.12	1.56	Se-Se
<i>Staph. aureus</i> B-5	>200	25	Re-Re	>200	50	Re-Re	>200	25	Re-Re
<i>E. coli</i> NIHJ	>200	12.5	Re-Se	12.5	6.25	Se-Se	>200	>200	Re-Re
<i>E. coli</i> 29	12.5	6.25	Se-Se	3.12	1.56	Se-Se	50	50	Re-Re
<i>E. coli</i> 45	>200	12.5	Re-Se	6.25	6.25	Se-Se	>200	>200	Re-Re
<i>E. coli</i> C1 1-1	>200	12.5	Re-Se	6.25	6.25	Se-Se	>200	100	Re-Re
<i>E. coli</i> C1 2-1	>200	12.5	Re-Se	12.5	12.5	Se-Se	>200	>200	Re-Re
<i>E. coli</i> C1 6	>200	6.25	Re-Se	3.12	1.56	Se-Se	12.5	12.5	Se-Se
<i>Klebsiella</i> Araki	>200	6.25	Re-Se	>200	50	Re-Re	>200	>200	Re-Re
<i>Klebsiella</i> 16	>200	6.25	Re-Se	>200	50	Re-Re	>200	>200	Re-Re
<i>Klebsiella</i> 25	>200	6.25	Re-Se	>200	50	Re-Re	>200	>200	Re-Re
<i>Klebsiella</i> C1 14	>200	6.25	Re-Se	>200	>200	Re-Re	>200	>200	Re-Re
<i>P. mirabilis</i> 1287	>200	12.5	Re-Se	>200	3.12	Re-Se	>200	50	Re-Re
<i>P. mirabilis</i> 19	12.5	6.25	Se-Se	6.25	0.78	Se-Se	25	6.25	Re-Se
<i>P. mirabilis</i> 52	>200	25	Re-Re	>200	50	Re-Re	>200	50	Re-Re
<i>P. mirabilis</i> C1 1-2	>200	12.5	Re-Se	>200	1.56	Re-Se	>200	50	Re-Re
<i>P. mirabilis</i> C1 2-2	>200	12.5	Re-Se	>200	1.56	Re-Se	>200	50	Re-Re
<i>E. cloacae</i>	>200	>200	Re-Re	>200	200	Re-Re	>200	>200	Re-Re

\* dilution of tryptosoy broth culture

Se 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ >Re 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ <

場合の MIC を示したものである。

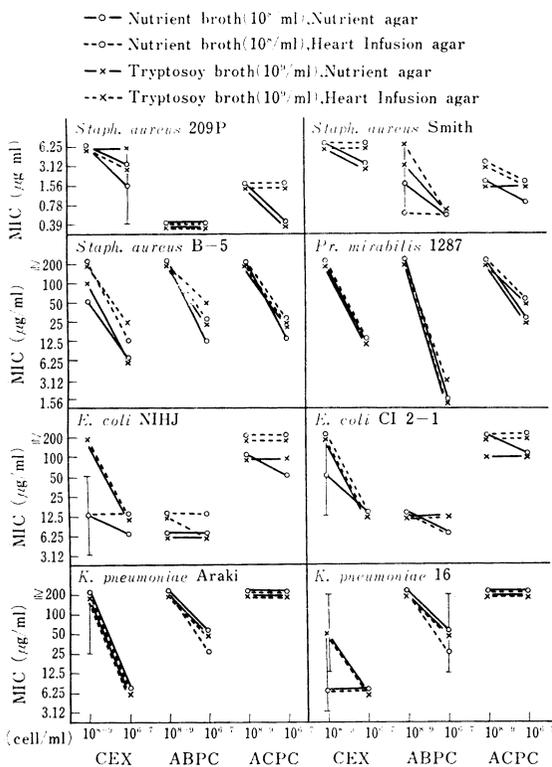
日本化学療法学会標準法で行なっても 1 夜培養菌液と 100 倍希釈液との間に同傾向の MIC の変動が見られ、とくに CEX においては接種菌量による MIC の差が著しい。そのパターンは菌株によって培養原液と 100 倍希釈液との間の差が、著しく耐性値から感性値となるもの (Re-Se)、どちらも感性のもの (Se-Se)、双方とも耐性値を示すもの (Re-Re) の 3 種にわけられる。

2. 各種増菌用培地, 測定用培地における MIC と接種菌量 (Fig. 2)

接種用菌液とする増菌用液体培地をトリプトソイブイオン, 普通ブイオン, 測定用培地をハートインフュージョン培地, 普通寒天培地とし, 各々を相互に組合せた 4 組について, 1 夜培養菌液とその 100 倍希釈菌液を接種し, 3 薬剤の MIC を測定した成績を Fig. 2 にまとめた。

菌株による差はあるが原菌液接種の MIC に比べ, 100 倍希釈液の MIC が小さい値を示す場合が多く, とくに CEX におけるグラム陰性桿菌の場合, もっとも顕著であった。

Fig. 2 Effect of size of inoculum and sort of medium on MICs of three antibiotics



ABPC, ACPC では MIC が変動しない株もみとめられる。

グラム陰性桿菌では同一菌株においてはどの培地の組合せでも, 100 倍希釈菌液での MIC はほぼ同程度の数値を示したが, 多剤耐性の *Staphylococcus aureus* B 5 株では, 100 倍希釈でもかなりの変動がみられた。

3. 接種用増菌培地の検討

1) 1 夜培養における菌数と pH (Fig. 3)

これまでの実験で接種菌液が 1 夜培養 (18~20 時間) そのままの場合と, 100 倍に希釈した場合とではほとんどの株の MIC に差のあることがわかったので, 接種用菌液について検討することとし, トリプトソイブイオン (栄研), Nutrient broth (Difco), 普通ブイオン (栄研), Heart infusion broth (Difco), およびペプトン水 (ポリペプトン) について, *S. aureus* 209-P, *E. coli* NIHJ を試験菌として, 37°C, 20 時間培養における増殖菌数と pH の変動をしらべた。成績は Fig. 3 にまとめた。

両菌株ともトリプトソイブイオン, BH 1 broth における発育菌数が多く, ペプトン水がもっとも少ない。

pH は両株ともトリプトソイブイオンと BH 1 broth の pH が培養前に比べて低く, とくに *S. aureus* ではトリプトソイブイオンの培養後の pH は 5.4 以下となった。ペプトン水では pH は全く変わらず, 2 種の普通ブイオン (Nutrient broth) では *E. coli* は不変, *S. aureus* だけやや下降がみられた。

2) 培養時間による生菌数の変動 (Fig. 4)

*E. coli* を試験株としてトリプトソイブイオン, Nutrient broth における菌の発育を 37°C, 18, 22, 26 時間にそれぞれの生菌数によって比較すると, 18 時間と 26 時間ではかなりの差のみられる場合があり, 同一培地に 37°C で 1 夜培養といっても, 時間によっては 1 ml あたり  $10^8 \sim 10^9$  の幅で差のあることが示された。

Fig. 3 Ratio of growth of organisms and fluctuation of pH in various culture fluids

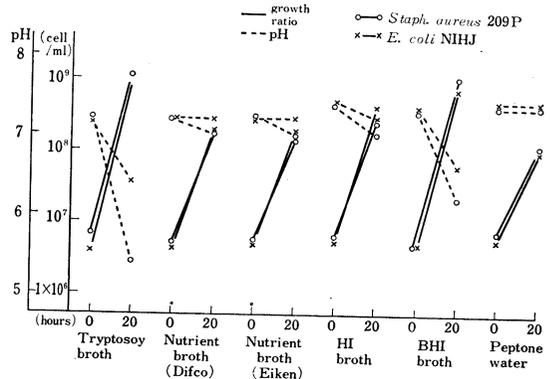


Fig. 4 Growth curve of two organisms cultured in various liquid media

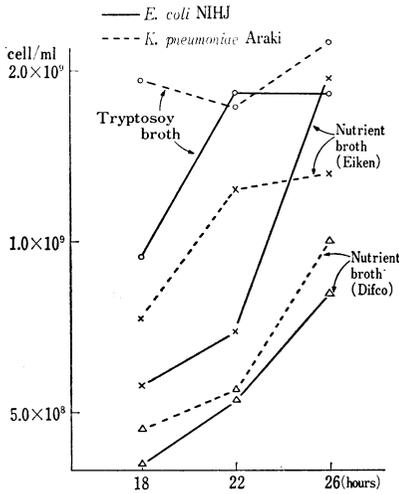
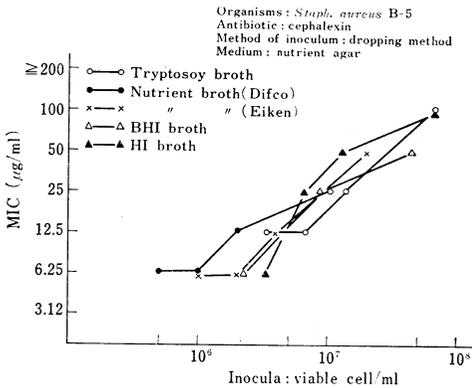


Fig. 5 Correlation between number of viable cell in various culture fluids used as inocula suspensions and MIC (1)



このことは培養時間の違いが接種菌量に影響し、ひいては MIC にも影響をおよぼす可能性を示している。

4. 接種用各種培養菌液と接種菌量による MIC の変動 (Fig. 5, 6, 7, 8)

上述の実験によって MIC の変動が接種菌量によって大きく影響されていることが明らかとなったので、接種菌量と MIC の関連をさらに詳細にしらべた。前述の Fig. 2 に示した成績から、MIC の動揺の大きい菌株と薬剤の組合せを選んで試験した成績の一部を Fig. 5, 6, 7, 8 に示した。

Fig. 5 は *S. aureus* B5 株の CEX に対する MIC と接種菌量の関係である。この株は多剤耐性株で PC に対しても感受性は低い。この株は CEX に対し接種菌量を減らすほどだんだんに MIC が小さくなり、 $10^8/\text{ml}$  以

Fig. 6 Correlation between number of viable cell in various culture fluids used as inocula suspensions and MIC (2)

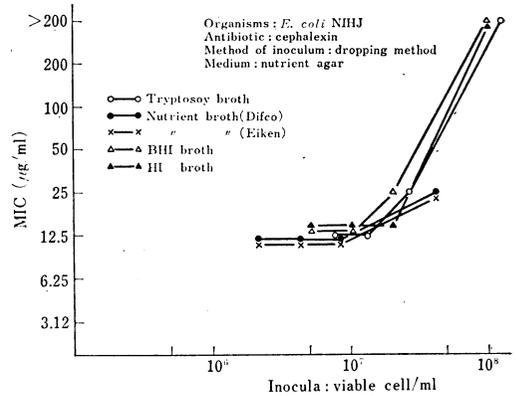


Fig. 7 Correlation between number of viable cell in various culture fluids used as inocula suspensions and MIC (3)

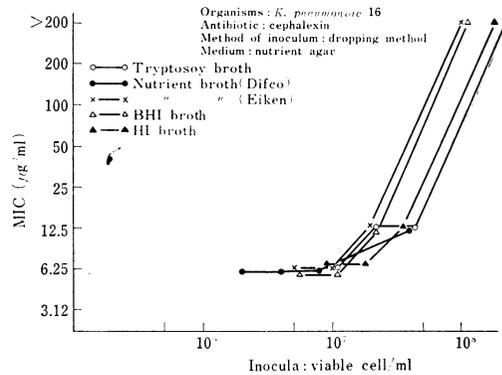
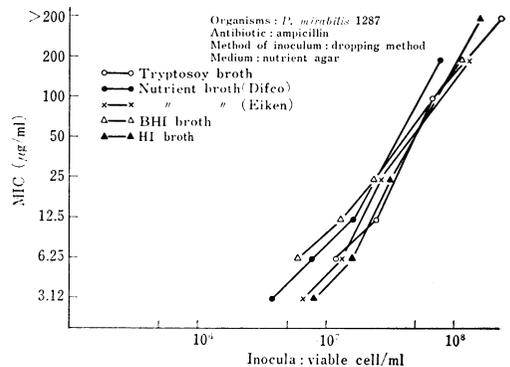


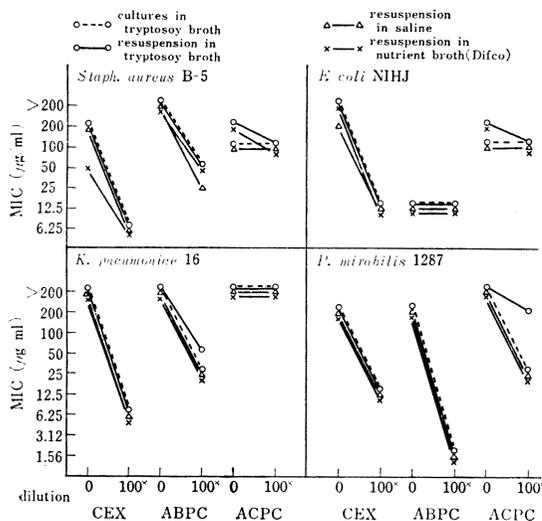
Fig. 8 Correlation between number of viable cell in various culture fluids used as inocula suspensions and MIC (4)



上では  $100 \mu\text{g/ml}$  以上の耐性を示すが  $10^6 \sim 10^7/\text{ml}$  の菌数では  $6.25 \mu\text{g/ml}$  となる。

*E. coli* NIHJ は CEX に対し、 $10^8/\text{ml}$  以上の菌量で

Fig. 9 Comparison of MICs obtained from tryptosoy broth cultures and from resuspension of organisms cultured in the tryptosoy broth as inocula suspensions



は 200 µg/ml 以上の MIC を示すが 10<sup>7</sup>/ml では 12.5 µg/ml となり、接種菌量をそれ以下にしても MIC は動かない (Fig. 6)。

同様のパターンが *Klebsiella* 16 と CEX の組合せでもみられる (Fig. 7)。

*P. mirabilis* は ABPC に対し接種菌量が少なくなるほど MIC が小さくなり Fig. 5 のパターンと類似している (Fig. 8)。

5. 培養上清の検討

以上の実験により増菌用培地に培養した菌液をそのまま接種すると MIC が大きくなり、希釈した菌液を使うと小さな MIC を示すことが確認されたが、この現象に培養上清の影響があるか否かを調べるため次の実験を行

なった。

1) 培養菌液と洗浄菌液の MIC の比較 (Fig. 9)

トリプトソイブイオンに 37°C、20 時間培養した菌液を対照とし、それを遠心沈殿して培養上清を除き、等量のトリプトソイブイオン、普通ブイオン、生理食塩液をそれぞれ加えて菌を再浮遊させたもの、およびその 100 倍希釈液を用いて MIC を測定した。

Fig. 9 に示すように 4 種の菌液の MIC はほとんど同程度で菌液間の差がなく、MIC の変動には菌の培養上清の影響はなく、もっぱら菌量によるものであることが明確となった。

2) 培養上清の不活化作用 (Table 2)

培養上清 (上清) の影響をさらに検討する目的で次の実験を行なった。

トリプトソイブイオンに培養した菌液を遠心し、その上清、および菌体を再び新しいトリプトソイブイオンに懸濁したものに CEX, ABPC をそれぞれ加え、37°C に置き、2 時間後に残存活性を測定したところ、対照の培地だけで行なったものと比べ、抗菌活性の低下のみられたのは ABPC における *S. aureus* B5 と *Klebsiella* の 2 株であった。しかし CEX では活性の低下はみとめられない。

以上の実験により MIC 変動の直接の原因は、培養上清または菌体の不活化酵素の作用ではないと判断された。

6. 日本化学療法学会標準法 (Streak 法) と Stamp 法との比較 (Table 3)

この成績は化学療法学会標準法と、当教室で行なっている Stamp 法を比較したもので、もっとも MIC の変動幅の大きい CEX を用い、2 つの方法をとくに接種菌量の面から比較してある。すなわち、測定用平板上に接種した菌数、接種面積、および 1 cm<sup>2</sup> あたりの菌数を明らかにし、MIC との関連を示した。

Table 2 Inactivation of antibiotics by culture broth and cell suspensions

Test organism	Cephalexin				Ampicillin			
	Residual activity		MIC		Residual activity		MIC	
	culture broth	cell suspension	inoculum size (cells/ml)		culture broth	cell suspension	inoculum size (cells/ml)	
			10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>			10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> B-5	99	99	200<	25	26.6	44.7	200<	50
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	103	102	200<	12.5	99	100	12.5	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 16	100	100	200<	6.25	81.9	79.5	200<	50
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	98	99	200<	12.5	99	99	200<	3.12
Control (tryptosoy broth)	100	100			100	100		

Amount of antibiotics added : 500 µg/ml tryptosoy broth, pH 7.2, incubated at 37°C, 2 hrs.

Table 3 Correlation between fluctuation of cephalixin MIC according to different method of inoculation and number of viable cell of inoculum broth

Organisms		<i>S. aureus</i> B-5		<i>E. coli</i> NIHJ		<i>K. pneumoniae</i> 16	
No. of viable cell in 1 ml of broth (cell/ml)		$3.8 \times 10^8$		$1.4 \times 10^9$		$3.0 \times 10^9$	
Method of inoculation		Streak	Drop	Streak	Drop	Streak	Drop
No. of viable cell per inoculum		$7.5 \times 10^5$	$9.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	$3.3 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$
Inoculated area (cm <sup>2</sup> )		0.8	0.28	0.8	0.28	0.8	0.28
No. of viable cell per inoculated area and MIC	cell/cm <sup>2</sup>	$9.9 \times 10^5$	$3.3 \times 10^6$	$1.6 \times 10^5$	$6.4 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$	$1.4 \times 10^7$
	MIC (μg/ml)	25	200	12.5	200 <	200	200 <
	cell/cm <sup>2</sup>	$9.9 \times 10^4$	$3.3 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$	$6.4 \times 10^5$	$4.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^6$
	MIC (μg/ml)	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25	6.25
	cell/cm <sup>2</sup>	$9.9 \times 10^3$	$3.3 \times 10^4$	$1.6 \times 10^3$	$6.4 \times 10^4$	$4.1 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$
	MIC (μg/ml)	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25	6.25

Incubation ; tryptosoy broth, 37°C, 20 hrs.

Table 4 Effect of inoculum size on growth and morphology of organisms on agar plate containing cephalixin

		Concentration of CEX (μg/ml)													MIC	Size of inoculum (cell/ml)	
		1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.7	0			
<i>E. coli</i> NIHJ	growth (macroscopic)				+	+	+	+	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	200	10 <sup>9</sup>
	filamentous shape* (microscopic)				‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	+	-	-	-		
	growth				-	-	-	-	-	‡	‡	‡	‡	‡		12.5	10 <sup>8</sup>
	filamentous shape*				‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	+	-	-			
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3 K 20	growth (macroscopic)						‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	200 <	10 <sup>9</sup>
	filamentous shape* (microscopic)				‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	+	-	-		
	growth				+	+	+	+	+	+	‡	‡	‡	‡		200 <	10 <sup>8</sup>
	filamentous shape*				‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	+	-	-		
<i>Proteus vulgaris</i> 4	growth (macroscopic)	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	1600 <	10 <sup>9</sup>
	filamentous shape* (microscopic)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	growth	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	1600 <	10 <sup>8</sup>
	filamentous shape*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	growth	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	1600 <	10 <sup>7</sup>
	filamentous shape*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Medium : tryptosoy broth (for inoculum), nutrient agar

\* ‡ filamentous shape only, † many filamentous shape, + filamentous shape of 1/2 cells,

- no filamentous shape, intact cell only

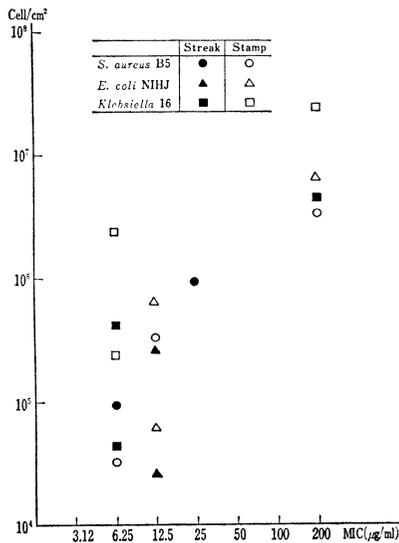
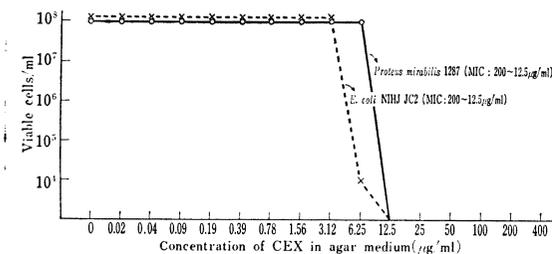
Fig. 10 Correlation between fluctuation of cephalixin MIC and size of inoculum per cm<sup>2</sup>

Fig. 11 Distribution of CEX sensitivities in cell populations



*S. aureus* B-5 のトリプトソイブイオン培養菌液は  $3.8 \times 10^8$ /ml の生菌数で、それを Streak 法(標準法)と Stamp 法で行なうと、1 回の接種菌量は  $7.5 \times 10^5$ ,  $9.3 \times 10^5$  となっており、ほぼ等しい。しかし接種面積は Streak 法は  $0.8 \text{ cm}^2$ 、Stamp 法は  $0.28 \text{ cm}^2$  で、 $1 \text{ cm}^2$  あたりの菌量は Streak 法で  $9.9 \times 10^5$ 、Stamp 法で  $3.3 \times 10^6$  となる。その場合の MIC はそれぞれ 25,  $200 \mu\text{g/ml}$  となる。しかしその菌液の 10 倍希釈を用いると、それぞれ 6.25,  $12.5 \mu\text{g/ml}$  となり、100 倍希釈では双方とも  $6.25 \mu\text{g/ml}$  となる。

*E. coli*, *Klebsiella* でも同様の傾向がみられ、Fig. 10 はこの中  $1 \text{ cm}^2$  あたりの生菌数と MIC との関係を図示したものである。ここに示されたように、どの方法で行なっても  $1 \text{ cm}^2$  あたりの生菌数が  $10^6$  以下であれば MIC 値はほぼ一定の値が得られるが、 $10^8/\text{cm}^2$  を超える菌量が接種される時は、MIC は耐性値を示すことが明らかである。

他の ABPC, ACPC においても CEX ほど著しくはないが同様の傾向がみとめられ、したがって安定した MIC を示すには  $10^6/\text{cm}^2$  以下の菌量、すなわちトリプトソイブイオンで 1 夜培養した菌液を 100 倍に希釈したものをを用いれば Streak 法でも Stamp 法でもほぼ同様の MIC を得られることになる。

### 7. CEX による菌の形態変化と MIC (Table 4)

ペニシリンやセファロスポリン系薬剤は、桿菌に作用すると菌体が長く伸びて、いわゆるフィラメント像を示すことが知られている。CEX に対して Re-Se 型の感受性を示す *E. coli*, *Klebsiella* および Re-Re 型を示す *P. vulgaris* を試験菌とし、化学療法学会標準法によって MIC を測定、肉眼的に菌の発育を判定し、かつ染色標本によって形態の変化をしらべた結果を Table 4 に示した。

Re-Re の *P. vulgaris* では接種菌量を  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  としても  $1,600 \mu\text{g/ml}$  以上の MIC で耐性であり、この菌の形態変化はみられない。Re-Se 型の 2 株は  $10^9$  接種では MIC は  $200 \mu\text{g/ml}$  であるが  $10^8$  または  $10^7$  とすると  $6.25 \mu\text{g/ml}$  となり、MIC が  $200 \mu\text{g/ml}$  以上を示す接種菌量では、 $200 \mu\text{g/ml}$  のところまで著明なフィラメント形成がみとめられる。MIC が  $6.25 \mu\text{g/ml}$  を示す接種菌量では、MIC の濃度以下でフィラメントはみとめられるが、MIC の濃度では肉眼的な発育も、フィラメントもみとめられない。このことから CEX の Re-Se 型では接種菌量による MIC の変動は形態変化によって影響されていると考えられる。

### 8. 一定の菌集団中の耐性細胞の分布

CEX に対し Re-Se の感受性パターンを示す *P. mirabilis* 1287 と *E. coli* JC-2 について  $10^8/\text{ml}$  の菌液を、CEX の  $400 \mu\text{g/ml}$  から  $0.02 \mu\text{g/ml}$  までの各濃度を含むカンテン平板上にコンラージ棒で接種し、各濃度における生菌数を数え、耐性細胞の出現率をしらべた成績が Fig. 11 である。

*P. mirabilis* 1287, *E. coli* NIHJ-JC-2 と Table 1 に示すように MIC は大量菌接種で  $200 \mu\text{g/ml}$  以上、100 倍希釈菌液接種で  $12.5 \mu\text{g/ml}$  であるが、この実験によれば  $25 \mu\text{g/ml}$  以上の平板には発育した集落はなく、耐性細胞はみとめられなかった。

このことは Table 1 に示した大量菌接種の場合の MIC は耐性細胞の存在を示したものではないといえることができる。

### 考察と結論

MIC は種々の測定条件によって変動する。CEX, ABPC, ACPC について増菌用培地の種類および pH, 培養時間、菌の薬剤不活化酵素産生、測定用培地の pH と種

類、接種菌量などの検討を行なった結果、MIC 変動の主な原因は接種菌量に帰すること大であることが明らかになった。

接種菌量と MC の関係は  $10^8$ /ml 以上の点と  $10^6$ /ml 以下の 2 点の MIC をしらべた場合、次のような 3 つのタイプに分けられた。

1. 接種菌量が少なくとも多くても MIC が感性を示すもの (Se-Se)
2. 接種菌量が多いときは耐性値、少ない時は感性値を示すもの (Re-Se)
4. 接種菌量が多くて少なくとも耐性値を示すもの (Re-Re)

以上のうちもっとも問題となるのは Re-Se 型の菌群であって、このパターンのものが測定条件によってもっとも動揺が大きく、また再現性に乏しい。このことは藤井らの報告にも指摘されている。またこのパターンを示す菌株は *in vivo* との関連が当然問題となる筈である。

本実験成績では CEX, ABPC, ACPC のうち、とくに MIC の動揺幅の大きい CEX について、その原因解析を行なったのであるが、接種菌量による MIC の変動が主として菌の形態変化によるものであることが明らかにされた。

他の薬剤において菌の形態変化によって MIC の変動する例は Sulfa 剤に見られる。WOOD<sup>11)</sup> は Sulfa 剤の抗菌作用が、菌の約 4 回分裂後にあらわれると報告しているが、その時には菌数が接種時の約 16 倍となるわけである。野藤はこれらの関連を詳細に検討し、接種菌量が  $10^6$  以上になると Sulfa 剤の作用がはじまる前に菌数は  $10^7$  以上となって、肉眼的に発育とみなされてしまうと報告している。

CEX もその作用機作は異なるが、細胞壁の合成阻害のため、菌体が分裂を阻止されて長くのび、容積を増した filament 状の菌が発育とみなされるため MIC の判定がまぎらわしく、大量菌接種では耐性と判断されるのである。

ABPC では少量菌接種でも MIC 値の大きい *S. aureus* B-5 と *Klebsiella* 16 が 2 株とも Penicillinase を産生することから、不活化酵素の影響が明瞭にみとめられた。

接種法は streak 法でも stamp 法でも、接種面積あたりの菌量と同じであれば両者の間に差はなく、測定用

培地  $1 \text{ cm}^2$  あたりの菌数が  $10^6/\text{cm}^2$  以下であれば MIC の再現性も良好であった。

終りに御指導いただいた五島瑛智子教授、桑原章吾教授に感謝すると共に、実験を御援助下さいました教職員各位に厚く御礼申し上げます。

この論文の内容は第 18 回日本化学療法学会総会で報告した。

#### 参考文献

- 1) 日本化学療法学会 MIC 小委員会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法の標準化について。Chemotherapy 16(1) : 98~99, 1968
- 2) 日本化学療法学会 MIC 測定法改定委員会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 22(6) : 1126~1128, 1974
- 3) 藤井良知, 紺野昌俊, 古屋暁一, 小酒井 望, 桑原章吾：感受性測定値の実験条件による動揺について。Chemotherapy 16(5) : 743~749, 1968
- 4) 三橋 進, 永井 裕, 田中徳満, 橋本 一：赤痢菌の耐性値測定法について。Chemotherapy 17(10) : 1956~1962, 1969
- 5) 野藤隆夫：Sulfa 剤の試験管内抗菌力と感染防御効果の相関, I. 感受性測定値の再検討——とくに接種菌量の問題について——。Chemotherapy 20(5) : 638~645, 1972
- 6) 藤井良知, 他 ST 合剤研究会 MIC 測定法のための小委員会：Sulfamethoxazole と Trimethoprim の感受性測定法。Chemotherapy 21(2) : 67~74, 1973
- 7) 五島瑛智子, 堂ヶ崎勲, 金子康子, 小川正俊, 滝田聖親, 桑原章吾：Fosfomycin の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用。Chemotherapy 23(5) : 1653~1661, 1975
- 8) MUGGLETON, P. W., et al.: Laboratory Appraisal of cephalixin. Antimicrob. Agents & Chemother. -1968 : 353~360, 1969
- 9) 中沢昭三, 西野武志：目でみる抗菌作用——抗生物質による細菌の cell wall 合成阻害。Medicina 7(12) : 31~36, 1970
- 10) FUJII, R.; M. KONNO & K. UBUKATA: The filamentous shape of *Escherichia coli* treated with cephalixin in higher concentration and its clinical significance. Progress in antimicrobial and anticancer. Chemotherapy Vol. I : 374~378, 1970, University of Tokyo press (Tokyo)
- 11) WOODS, D. D.: The biochemical mode of action of the sulfonamide drugs. J. Gen. Microbiol. 29 : 687~702, 1962

THE CORRELATION BETWEEN *IN VITRO* ANTIBACTERIAL  
ACTIVITY OF ANTIBIOTICS AND THEIR PROTECTING  
EFFECTS IN EXPERIMENTAL MICE INFECTIONS

- (1) Studies on the Method of Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of Ampicillin, Cephalexin and Cyclacillin

YOSHIHITO ISSHIKI

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan

The *in vitro* sensitivities of bacteria to the antimicrobial agents, even if measured by the standard method recommended by Japan Society of Chemotherapy, fluctuate depending upon the used test strain and the sort of test antibiotic.

This experimental report with cephalexin(CEX), ampicillin(ABPC) and cyclacillin(ACPC), based on the studies on the factors that may cause the fluctuation in MICs, confirms that the size of inoculum was most responsible for the fluctuation of MIC. The comparison of the standard streak method with the stamp method proved that, if inoculated bacterial counts were less than  $10^6$  cells per  $1\text{ cm}^2$  of culture plate, either of the methods produced no different result in the determined MIC values.

Among the three antimicrobial agents, the fluctuation of MIC by the sizes of inocula was most remarkable with CEX, and it was evidenced that this was mainly caused by the morphologic change of the bacterial cell induced by the drug action. In the bacillus in particular, the range of the drug concentration to allow a filament formation was widest with CEX as compared with the other two antibiotics, clearly demonstrating the relation to the fluctuation of MIC.