

Pipemidic acid の感受性ディスク法に関する検討

金 沢 裕

豊栄病院内科

倉 又 利 夫

新潟鉄道病院薬剤科

松 本 清 幸

昭和薬品化工株式会社研究所

(昭和 55 年 9 月 16 日受付)

Pipemidic acid は大日本製薬総合研究所で開発された合成抗菌剤で主としてグラム陰性菌に有効な薬剤であると報告されている¹⁻⁴⁾。今回われわれは、臨床検査としてのディスク法による感受性測定法を検討したので報告する。

Pipemidic acid のように新しく出現した薬剤の臨床的な感受性、耐性に相当する最小発育阻止濃度 (MIC) 値の基準は全く不明で、暫定的には推定される体液中有効濃度との関連から一応の基準が論ぜられたとしても最終的には多くの起炎菌について得た MIC 値と、薬剤投与による臨床効果との集計の上に、将来定められるべきものであり、したがって現時点においては適当に規定された実験条件での MIC 値を推定することが、臨床的感受性検査の目的と考えられる。この目的に沿うようにわれわれは、単一ディスク (single-disc) を用いる MIC 測定を含めた化学療法剤の感受性測定法についてたびたび報告した⁵⁻⁸⁾。今回は Pipemidic acid についても本法が適用されるかどうかを検討した。

I. 実験材料

培地：次のような組成の MUELLER-HINTON 変法培地 (感性ディスク用培地ニッスイ) を用いた。

Heart infusion	200.0ml	L-Tryptophan	0.05 g
Casamino acid	16.5g	L-Cystine	0.05 g
Soluble starch	1.5g	Biotin	0.005g
Glucose	2.0g	Agar	15.0 g
Distilled water	1,000ml		

pH 7.3~7.5, NaCl 濃度 0.8%, 5% メン羊血液添加または非添加

供試菌種(株)は Fig.1 に示すように、臨床検査の対象になることが多いと考えられる 24 種, 229 株を用いた。

II. 実験方法および実験成績

1. 希釈法による MIC 値測定

Pipemidic acid の 2 倍希釈系列 (800, 400, 200, 100, 50, …… $\mu\text{g/ml}$) 濃度含有の寒天平板培地を作製した。発育がよくコロニー形成の比較的早い菌 (腸内細菌, 緑膿菌を含む非発酵グラム陰性桿菌, ブドウ球菌など) は 1 白金耳量を 1ml の滅菌生理食塩液または MUELLER-HINTON Broth に浮遊し, その 400 倍希釈液をマイクロプランター (佐久間製) で寒天平板培地上に接種した。このさいの接種菌浮遊液濃度は 1ml 中 10^6 Colony-forming units (CFU) 程度で, ほぼ日本化学療法学会の改訂⁹⁾法に一致し, また寒天平板培地上におかれた最終接種菌量は $10^4 \sim 10^6$ CFU/cm² にあたること, たびたびの実験でたしかめられている¹⁰⁾。またコロニー形成の多少ともおそい, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* などはその 10 倍濃い菌浮遊液を接種した。ついで 37°C に 16~24 時間培養し, 肉眼的に MIC 値を測定した。これを 6 回繰返して得た値の幾何平均の $1/\sqrt{2}$ を最も信頼すべき MIC 値とした。

その成績は, Fig. 1 に示すように *Pseudomonas aeruginosa* を含む多くのグラム陰性桿菌は本剤に小さい MIC 値を示したが, *Streptococcus* などのグラム陽性菌は大きい MIC 値を示す傾向がみられた。しかし, *Staphylococcus* は *Streptococcus* より, やや小さい MIC 値を示した。

2. 血液添加の影響

Table 1 に示すような 7 種 74 株を用いて, メン羊血液 5% 添加, 非添加のさいの MIC 値の変動を検討した。その結果は, 表示のように平均 0.95 程度であることから, 5% メン羊血液添加の影響は必ずしも著しくないものと考えられた。

Fig. 1 Microorganisms employed for constructing regression lines and their sensitivities against pipemidic acid expressed in terms of MIC

Confidential MIC value: $\left(\frac{\text{Geometrical mean}}{\sqrt{2}} \right)$ of so-called MIC obtained by

2-fold agar dilution method repeated 6 times) $\mu\text{g/ml}$

Agar medium used: Modified MUELLER-HINTON agar pH 7.4

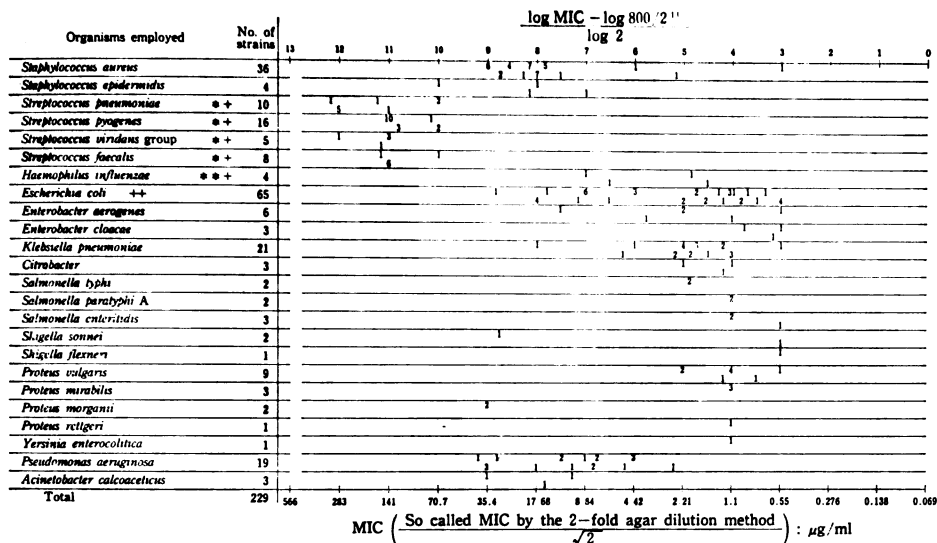
* Modified MUELLER-HINTON agar pH 7.4 with 5% sheep blood

** Chocolate agar

Inoculum size: Approximately $10^8 \sim 10^6$ CFU/cm²

+ Approximately $10^4 \sim 10^3$ CFU/cm²

Strain: † Contains 3 strains of *Alkalescens-Dispar*



3. ディスク法の実施

内径 85~90 mm の規格型ペトリ皿に培地を 20 ml ずつ注し、水平に固めた。供試菌コロニーの 1~2 白金耳量程度を 1 ml の滅菌生理食塩液または MUELLER-HINTON Broth に懸濁し、*Staphylococcus*、腸内細菌の場合はその 1 白金耳量を、*Streptococcus*、*Haemophilus* などはその 1 滴 (0.03 ml 程度) を 1 枚の寒天平板培地におとし、20 個程度の小ガラス玉 (直径 3~4 mm) を入れ、ゆり動かして均等に広げる。このさい接種菌量は、前者で 1 cm² 当り $10^8 \sim 10^4$ CFU 程度、後者では $10^6 \sim 10^3$ CFU 程度であることがたしかめられている¹¹⁾。

ディスクを置いて直ちに 37°C で培養し、16 時間程度後に阻止円の直径を計測した (普通法)。

寒天平板培地表面 1 cm² 当り $10^6 \sim 10^7$ CFU 程度の濃厚な菌を接種して 5~6 時間で阻止円が出現した場合 (迅速 5~6 時間法)、3~4 時間で阻止円が出現したとき (迅速 3~4 時間法) に分けて判定した。

普通法と同様に菌を接種し、ディスクを置き、直ちに

10°C 前後に 12 時間程度放置、つづいて 37°C で培養、合計 16 時間 (37°C、4 時間) 後に十分な阻止円形成がみられず、24 時間程度 (37°C、12 時間) 後に十分な阻止円が出現した菌株についてだけ阻止円を計測した (遅延判定)。

4. ディスク薬剤含有量の決定

感受性ディスクの薬剤含有量は、臨床的に有効な菌に対して阻止円形成がみられるが、無効な菌には阻止円がみられないことが望ましく、したがって人体内で薬剤が治療効果をあげうる MIC 値以下の菌は阻止円を生じ、それ以上の MIC 値をもつ菌では阻止円が生じないのが合理的と考えられる。多くの化学療法剤は、腎臓から集中的に排泄され、尿中で最高濃度を示すことが多い。しかし、このさい尿中薬剤濃度が直ちに尿路感染症の治療に直結するとはいえないようである。西村ら¹²⁾、足立ら¹³⁾はこの点についても検討しているが、尿路感染症の病巣に有効に作用するのは尿中最高濃度の 1/5~1/20 程度であるとの成績が得られている。

Table 1 Influence of adding 5% sheep blood to the test medium on the MIC values obtained by the agar dilution method

Basal medium used: Sensitivity disc medium (modified MUELLER-HINTON agar, pH 7.4)

Bacterial strains employed:

<i>Staphylococcus aureus</i>	26
<i>Escherichia coli</i>	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
<i>Citrobacter</i>	4
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
<i>Proteus vulgaris</i>	6
Total	74

(Ratio of MIC with blood without blood)	Number of data obtained
2	10
1	48
1/2	16

Geometrical mean=0.95

Pipemidic acid の成人使用量としては、1日量 3~6 g を 2~3 回に内服することが常用量とされている。那須、原ら¹⁴⁾、石山、水足ら¹⁵⁾によると内服時の尿中濃度ピークは 2 時間前後で、そのおおよその薬剤濃度についての平均は 1 回、1 g のとき約 500 $\mu\text{g/ml}$ 程度であり、また 2 g では約 800 $\mu\text{g/ml}$ であった。このことから、本剤を投与する場合、平均 650 $\mu\text{g/ml}$ 程度の Pipemidic acid 濃度が尿中薬剤濃度となり、その数分の 1 に相当すると考えられる。したがって、本剤の有効性のある菌は見逃さず、しかも無効の菌を除外するには、MIC 値 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の菌では阻止円の形成が少なく、MIC 値 100 $\mu\text{g/ml}$ 以下の菌では阻止円が形成されるようなディスク薬剤含有量が適当と考えられる。

これを MIC 値測定的基本的方法である 2 倍希釈法を加味して表現すると、MIC 値 100 $\mu\text{g/ml}$ の値では阻止円出現の頻度が少なく、MIC 値 100 $\mu\text{g/ml}$ 以下の菌で

Table 2 Relationship between pipemidic acid content in a disc and MIC to the organism which produces inhibition zone

Disc used: 8 mm in diameter; water absorption 0.027 \pm 0.004 ml

No. of strains tested:

<i>Staphylococcus aureus</i>	6
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Proteus morgani</i>	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
<i>Streptococcus pyogenes</i>	5
<i>Streptococcus viridans</i> group	4
<i>Streptococcus faecalis</i>	3
Total	29

Content in a discs (μg)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	400	200	100	50	25
	No. of strains				
	6	8	4	5	6
	No. of strains which produce inhibition zone				
100	0	8	4	5	6
50	0	2	4	5	6
30	0	0	1	4	6

は阻止円出現の頻度が高いことを意味するものと考えられる。そこで MIC 値 100~200 $\mu\text{g/ml}$ 付近に分布する菌種(株)として、*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus morgani*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans* group, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* など計 8 種、29 菌株をえらんで、ディスク薬剤含有量と阻止円出現の関係を検討した。その結果は、Table 2 に示すように、50 μg の薬剤含有ディスクが最も上記の目的に適すると考えられたので、以下 50 μg 含有ディスクを用いて実験を進めた。

5. 阻止円の計測

上述のそれぞれの方法によって現われた阻止円の直径を直角 2 方向から計測し、平均値を求めた。また、迅速

Table 3 Regression equation representing the relationship between MIC and diameter of inhibition zone (pipemidic acid)

Content of disc	Determination method	Incubation time in hours	Number of data employed	Regression equation
50 μg	Conventional method	Approx. 16	1158	$D=30.23-10.72 \log \text{MIC}$
		Approx. 24 (delayed assay)	180	$D=38.27-14.73 \log \text{MIC}$
	Rapid method	3~4 hours 5~6 hours	42 66	$D=17.04-4.34 \log \text{MIC}$ $D=23.0-7.28 \log \text{MIC}$

D=Diameter of inhibition zone

Fig. 2 Standard curves representing the relationship between the MIC and the diameter of inhibition zone

Pipemidic acid: 50 $\mu\text{g}/\text{disc}$

Disc: 8 mm in diameter, Water absorption: $0.027 \pm 0.004 \text{ ml}$

Conventional method:

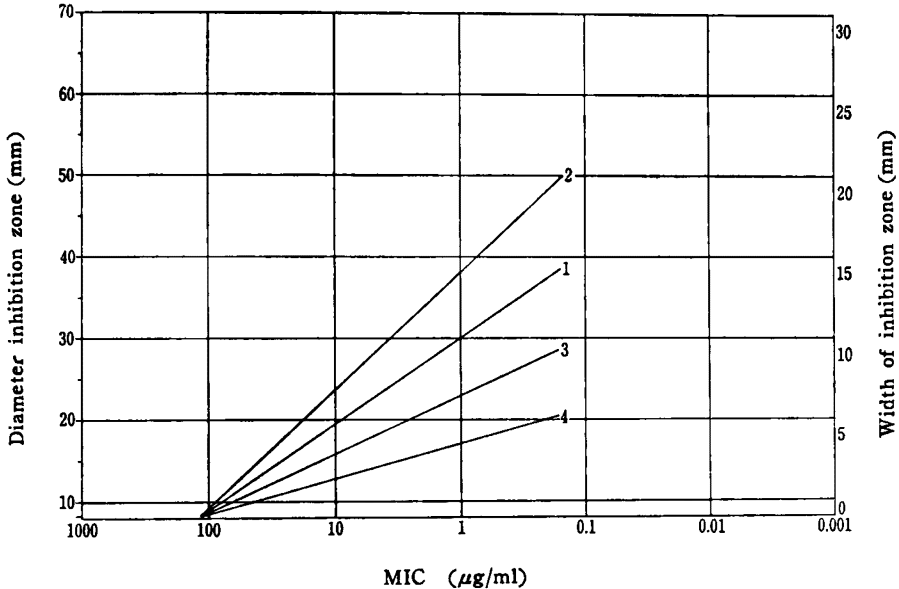
Usual determination (over-night: approx. 16 hours incubation)1

Delayed determination (approx. 24 hours incubation)2

Rapid method with heavy inoculum:

5~6 hours incubation3

3~4 hours incubation4



法は肉眼的に十分な阻止円が4時間以内に現われた場合と、6時間以内に現われた場合の2つのグループに分けて阻止円の直径を測定した。

6. 標準曲線の調製

普通法、迅速法、遅延判定のいずれも6回に分けて実施し、それぞれの菌株に対する阻止円直径の平均値を求めた。ついで片対数方眼紙上の整数目盛に阻止円直径をとり、希釈法によるMIC値を対数目盛にとって、おのおの実験条件下でのMIC値と阻止円直径の関係を示す1次回帰式を求めた (Table 3, Figs 1, 2)。

7. 感受性測定法

普通法において、16時間程度の培養で測定に十分な阻止円が出現した場合は普通法、16時間程度で十分な阻止円が出現せず、24時間程度で出現した場合は遅延判定とおのおのの曲線を用いれば近似MIC値が推定でき、また迅速に感受性をしるためには、0.1 mlの滅菌生理食塩液に10白金耳量程度の菌が濃厚に浮遊した菌浮遊液をつくり、その1白金耳量を寒天平板培地上に置

き、ガラス玉法で接種したのち37℃にて培養、4時間以内に阻止円が出現した場合は迅速3~4時間の曲線で、5~6時間で阻止円の出現をみた場合には迅速5~6時間の曲線によって、感受性をスクリーニングすることができるわけである。さらに被検体(膿、尿など)を直接に接種した寒天平板培地にディスクを置いて感受性試験を行なう Primary culture sensitivity disc法のさいは、接種菌量を測定することが時に困難なことがあるので、測定に十分な阻止円が出現した時間に応じて迅速3~4時間法、迅速5~6時間法、普通法(16時間程度培養)、遅延判定(24時間程度培養)のいずれかを適用して感受性値を推定することが可能であろう。

8. 実験誤差について

本ディスク法の実験誤差を検討するために普通法について行なったすべての成績について、標準曲線からのへだたりの存在範囲を棄却限界式($\alpha=0.05$)を適用して計算し、Table 4の値が得られた。一方、参考として寒天平板2倍希釈法によるMIC値を同一菌株について6

Table 4 Range of deviation of MIC obtained by the disc method from the MIC by the dilution method expressed in terms of rejection limits

Content of disc	Determination method	Incubation time in hours	Range of deviation of MIC expressed in terms of rejection limits ($\alpha=0.05$)*†						
			8.0~20.0~30.0~40.0~50.0~60.0						
50 μ g	Conventional method	Approx. 16	H	2.72	2.72	2.72	2.72	2.74	2.75
			L	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.36
		Approx. 24 (delayed assay)	H	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.02
			L	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.49
	Rapid method	5~6 hours	H	3.77	3.79	4.04	4.55		
		L	0.27	0.26	0.25	0.22			
	3~4 hours	H	5.43	5.26	5.98				
	L	0.18	0.19	0.17					

* Rejection limits were obtained by the formula: $M \pm t_{0.05} \sqrt{S^2 y x \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x-\bar{x})^2}{S^2 x^2}\right)}$

Where, x =diameter of inhibition zone, $y = \frac{\log \text{MIC} - \log 800/2^{16}}{\log 2}$

S^2 =variance from regression line

† Where MIC obtained by the agar dilution method is taken as 1.0

M : sample mean, t : distribution coefficient of STUDENT

Table 5 Range of MIC values of pipemidic acid obtained by the 2 fold agar dilution method

No. of organisms employed (n)	Rejection limit* ($\alpha=0.05$)	No. of data employed
193	1.54~0.65	1,158

* Where sample mean is taken as 1.0, rejection limit: $\pm St_{0.05} \sqrt{\frac{n+1}{n}}$

S : Sample standard deviation $\sqrt{\frac{\sum R^2}{n}}$

$R = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{n}}$

(Sample mean deviation in 6 times repeated experiment for each organism)

回ずつ行ない、その各菌株ごとの成績を総合して、MIC値の存在範囲について棄却限界幅を求め、Table 5の成績が得られた。

両者は、実験条件がすべて同一ではなく、またディスク法評価の基準となるMIC値が寒天平板2倍希釈法の実験誤差を必然的に含んでいるので厳密な比較がやや困難と思われるが、測定が存在範囲の幅から推定すると、本ディスク法の精度は、寒天平板2倍希釈法のそれに劣るが、ある程度これに近く、臨床的感受性測定法としては十分用いられるものと推定された。

III. 結論

Pipemidic acidについて、24種、229株の菌を用いて寒天平板2倍希釈法によるMIC値と、50 μ g含有ディスクによる阻止円直径を測定した。その結果として、普通法(1夜培養判定:16時間程度培養)、遅延判定

(24時間程度培養)、迅速5~6時間法、迅速3~4時間法などのおおのについてMIC値と阻止円直径との関係を示す1次回帰曲線を求めることができ、Single-disc法の成立することがたしかめられた。そのさい、普通法の1次回帰式は、Diameter (mm)=30.23mm-10.72 log MIC (μ g/ml)であった。

ついでディスク法として阻止円の直径からMIC値を推定した場合における推定MIC値の変動幅を寒天平板2倍希釈法によるMIC値の変動幅と比較して求め、本ディスク法による推定MIC値に対する実験誤差の参考とした。

おわりに臨床分離株の分与およびご協力を下さった札幌医大 永井龍夫、関東通信病院 除慶一郎、東京女子医大 長田富香、岡山済生会総合病院 笠原和恵の諸先生に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 井上 了, 田中徳満, 三橋 進: Pipemidic acid の *in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 23 : 2635~2639, 1975
- 2) 五島達智子, 堂ヶ崎 勲, 金子康子, 小川正俊, 滝田聖親, 辻 明良, 高橋邦子, 桑原章吾: Pipemidic acid の細菌学的評価, とくに *in vitro*, *in vivo* の抗緑膿菌作用について。Chemotherapy 23 : 2640~2646, 1975
- 3) 中沢昭三, 西野武志, 浜洲泰久: 合成化学療法剤 Pipemidic acid に関する細菌学的研究。Chemotherapy : 2647~2658, 1975
- 4) 清水当尚, 高瀬善行, 中村信一, 片江宏巳, 南明, 中田勝久, 井上 了, 石山正光, 久保雄嗣: Pipemidic acid の抗菌作用。Chemotherapy 23 : 2659~2667, 1975
- 5) 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 : 50~67, 1961
- 6) KANAZAWA, Y.: Clinical use of the disc sensitivity test. Antimicrob. Agents & Chemother. -1961 : 926~942, 1961
- 7) KANAZAWA, Y.: Single disc method for minimum inhibitory concentration (MIC) determination. J. Antibiotics, Ser. A 19 : 175~189, 1966
- 8) KANAZAWA, Y. & KURAMATA, T.: Problem in the determination of bacterial sensitivities to chemotherapeutic agents. Prog. Anti-micr. & Anticancer Chemoth. (Proc. 6th Internat. Cong. Chemoth.), Vol.2, PP. 939~942, 1970 (Tokyo)
- 9) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (日本化学療法学会標準法) 改訂について。Chemotherapy 22 : 1126~1128, 1974
- 10) 金沢 裕: 希釈法による化学療法剤感受性測定法。検査と技術 7 : 727~736, 1979
- 11) 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・続報: とくに接種菌量ならびに直接法に関する検討。J. Antibiot. Ser. B 17 : 256~263, 1964
- 12) 西村洋司, 河村 毅: 尿路感染症の化学療法, 尿に排泄される抗菌物質による臨床効果の意義について。日本泌尿器科学会雑誌 59 : 520~525, 1968
- 13) 足立卓三: 膀胱内注入抗菌性物質の膀胱壁内移行, 尿路感染症に対する尿中抗菌性物質の意義について。日本泌尿器科学会雑誌 62 : 220~240, 1971
- 14) 那須 勝, 齊藤 厚, 森 信興, 堤 恒雄, 広田正毅, 岩永正明, 中富昌夫, 堀内信宏, 原 耕平: Pipemidic acid に関する基礎的研究ならびに呼吸器感染症における評価。Chemotherapy 23 : 2861~2869, 1975
- 15) 石山俊次, 中山一誠, 岩本英男, 岩井重富, 鷹取陸美, 川辺隆道, 坂田育弘, 村田郁夫, 大橋 満, 水足裕子: 外科における Pipemidic acid の抗菌力, 吸収・排泄, 臓器内分布, 代謝および臨床応用について。Chemotherapy 23 : 2906~2917, 1975

A STUDY ON THE DISC SENSITIVITY TEST FOR PIPEMIDIC ACID

YUTAKA KANAZAWA

Department of Internal Medicine, Toyosaka Hospital

TOSHIO KURAMATA

Department of Pharmacy, Niigata Railway Hospital

KIYOYUKI MATSUMOTO

Research Laboratories, Showa Yakuhin Kako Co., Ltd.

Susceptibilities to pipemidic acid of 229 strains of 24 bacterial species were determined by the 2-fold agar dilution method in parallel with the diameter of inhibition zones by the single-disc method.

The experiments demonstrated significant correlation between MIC by the dilution method and diameter of inhibition zone in each of conventional assay of the over-night (about 16 hours) incubation, delayed assay (about 24 hours incubation), and rapid assay (after 3~4 or 5~6 hours incubation), thus confirming applicability of the single-disc assay for pipemidic acid.

Analysis of the data obtained by using pipemidic acid disc containing 50 μg revealed the primary regression equation to be: D (diameter mm) = $30.23 - 10.72 \log \text{MIC} (\mu\text{g/ml})$ in conventional assay, $D = 38.27 - 14.73 \log \text{MIC} (\mu\text{g/ml})$ in delayed assay, $D = 17.04 - 4.34 \log \text{MIC} (\mu\text{g/ml})$ in 3~4 hours rapid assay, and $D = 23.0 - 7.28 \log \text{MIC} (\mu\text{g/ml})$ in 5~6 hours rapid assay, respectively.

The range of variations in MICs estimated from the diameter of inhibition zone by the disc test was then calculated in comparison with that in MIC determined by the two-fold agar dilution assays, as reference for the experimental errors which may be involved in the estimation of MIC of pipemidic acid by the single-disc assay.