

感染モデルとしての連続流動培養法による各種抗菌薬の細菌発育抑制効果の観察

第1報 *E. coli* および *P. aeruginosa* 単独培養に対する場合

岡 田 敬 司

東海大学医学部泌尿器科学教室

(昭和 56 年 2 月 20 日受付)

連続流動培養装置を感染モデルと考え、これを利用して *E. coli*, *P. aeruginosa* に対する ABPC, NA, CFS, GM の抗菌効果を検討した。

薬剤濃度は MIC を規準とし、その 1, 4, 16 倍を *E. coli* に持続的に接触させた場合 ABPC, NA では 16 MIC で、GM では 1 MIC で菌が消滅した。*P. aeruginosa* ではどの薬剤の 16 MIC 濃度でも菌は消滅しなかった。

さらに、この装置で薬剤濃度を血中濃度の推移にある程度相似させ、菌数の変化と再増殖の様子をみた。*E. coli* の場合、GM では初濃度が 64 MIC で菌が消滅するが、他剤では $10^2 \sim 10^8$ ㎖/ml に減少するだけであった。*P. aeruginosa* に対してはいずれの薬剤の場合でも *E. coli* に対する場合より抗菌効果が弱かった。

以上のことから同じ MIC 値を示す薬剤でも細菌の種類、薬剤の種類で効果の異なることが示唆され、臨床効果と薬剤感受性試験の結果との不一致が出た場合の説明の一つとなると思われた。さらに、このモデルでは再増殖開始までの時間がわかるので、薬剤投与決定の指標ともしうと考えられた。

このように本装置を使用することによって、細菌と薬剤の関係を動的環境で検討でき、静置培養では不明な点の解明に役立つと考えられた。

感染症の治療に際して抗菌薬を選択する場合、薬剤感受性試験の結果を参考にすが、これにはディスク法や minimum inhibitory concentration (MIC) の測定が行なわれる。MIC の測定は接種菌量を 10^6 ㎖/ml と 10^8 ㎖/ml に日本化学療法学会では定めていたが、例えば尿路感染症の場合尿中から 10^6 ㎖/ml もしくは 10^5 ㎖/ml 以上検出された細菌を起炎菌としており^{1,2)}、起炎菌の菌数は様々である。臨床ではこの細菌側の条件のほか、患者側の条件、薬剤側の条件で抗菌効果に差が生じ、薬剤感受性試験の結果が臨床効果にそのまま反映されるとは限らない。

これは薬剤感受性試験が静置培養で行なわれ、対象とする一定接種菌量の細菌に抗菌薬を同一濃度で 18 時間接触させてその効果をみるものであるのに、生体内では薬剤濃度が経時的に変化し、病巣内細菌数も一定でなく、生体の感染防御機構も関与してくるためである。著者は生体内薬剤濃度の変化に着目し、抗菌薬濃度が経時的に変化する場合の薬剤効果を検討しようと考えた。

このような条件にかなう実験方法として連続流動培養法を用い、尿路感染症における代表的菌種である *E. coli*

と *P. aeruginosa* の臨床分離株を使用した。これらの細菌に対し、作用機序の異なる種々の抗菌薬を MIC を規準とした濃度で作用させ、各種抗菌薬の効果を観察し考察を加えた。

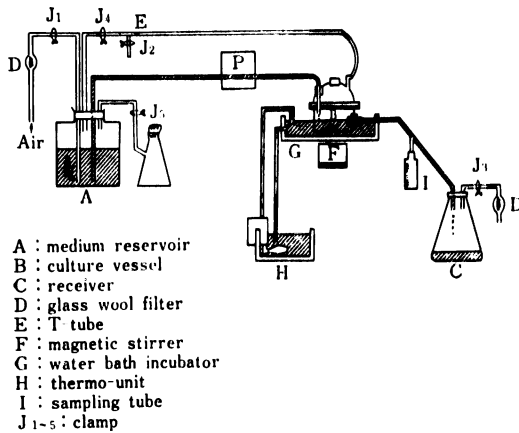
I. 材料と方法

1. 実験装置

連続流動培養装置には BRYSON³⁾ によって 1952 年に報告された Turbidostat と NOVICK & SZILARD⁴⁾ によって報告された Chemostat がある。

本報で使用した装置は原理的にはこれらと大差なく、概略は Fig. 1 のとおりである。図中の A は medium reservoir で液体培地 (本報では veal infusion broth) が入っており、定量ポンプ (P) で culture vessel (B) にこの液体培地が定量的に滴下される。vessel (B) 容量は 100 ml で、overflow した培地は receiver (C) に流出する。vessel (B) には攪拌子が入っており、magnetic stirrer (F) によって培地が攪拌される。攪拌子は毎分 180 回転に調節してある。water-bath incubator (G) と thermo-unit (H) を用いて 37°C に保った温水が vessel (B) の外側を灌流する。また medium reservoir (A) に

Fig. 1 Continuous flow culture system



は空気が送入され、培地の aeration が行なわれている。I は sampling tube である。

ここには示してないが vessel (B) 側壁に斜めに電極挿入用の孔があり、培地 pH と酸化還元電位 (oxidation reduction potential, ORP) が測定できる。この装置全体を滅菌するため medium reservoir (A) に必要量の veal infusion broth を入れ、J₁, J₂, J₃ を閉じ 121°C で 20 分間蒸気滅菌し、その後 J₄, J₅ を閉じると medium reservoir (A) 内の培地が vessel (B) 内に吸引されてくる。vessel (B) から培地が overflow したら微量定量ポンプで流量を調節し、J₁, J₃, J₄ を開き、空気を培地中に送入し、J₅ を閉じる。装置が冷えて室温になったら J₂ を開く。

雑菌の混入していないことを 24~36 時間後に確認し、*E. coli* あるいは *P. aeruginosa* を vessel (B) 中へ 10² コ/ml もしくは 10⁴ コ/ml となるよう接種する。流量は 20 ml/hr に調節してあり、希釈率は 20% per hour となる。すなわち vessel (B) 容量の 20% の滅菌した培地が毎時間添加され、同量が receiver (C) に排出される。

pH, ORP 測定用の pH メーターと電極は日立・堀場 pH メーター M-7 とその複合電極同等品を複製 (コトウ科学) し、使用した。このメーターに千野製作所製 EM 800-06 記録計を接続し、経時的に pH, ORP の変動を記録した。

2. 使用菌種、抗菌薬および MIC

使用菌種は東海大学病院泌尿器科患者由来の *E. coli* と *P. aeruginosa* で、抗菌薬は ampicillin (ABPC), nalidixic acid (NA), gentamicin (GM), cefsulodin (CFS) を用いた。各薬剤のこれら菌種に対する MIC を Table 1 に示した。MIC の測定は日本化学療法学会標準法に準じたが接種菌量は 2 × 10⁷ コ/ml とし、培地は veal infusion agar (Difco) を使用した。菌数計算は生

Table 1 MIC () : MIC value after regrowth

	<i>E. coli</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>P. aeruginosa</i> ($\mu\text{g/ml}$)
ABPC	6.25 (12.5)	>1,000
NA	6.25 (200)	50 (>1,000)
GM	1.56	12.5 (200)
CFS	100	3.13 (200)

理食塩水による 10 倍希釈法により平板上の集落数を数えた。この培地には heart infusion agar (Difco) を用いた。抗菌薬濃度測定は日本抗生物質医薬品基準解説などに従った。

予備実験

1. *E. coli* と *P. aeruginosa* の増殖

希釈率 20% per hour で、culture vessel (B) 内に medium が定常的に流入している状態で 10² コ/ml の *E. coli*, *P. aeruginosa* を別々に接種し、経時的な菌数変化、pH, ORP を記録した。

2. culture vessel 内の抗菌薬濃度

medium reservoir 内に NA, ABPC, GM, CFS を 100 $\mu\text{g/ml}$ となるよう加えた場合の vessel (B) 内での濃度を測定した。また culture vessel 内に NA, ABPC, GM, CFS を 100 $\mu\text{g/ml}$ および 400 $\mu\text{g/ml}$ となるよう加えた場合の vessel (B) 内濃度変化も測定した。

実験 1

E. coli, *P. aeruginosa* が vessel (B) 内で“結果”で述べるように定常状態となつてから medium reservoir (A) 内に抗菌薬を加え、vessel (B) 内の細菌数の消長を経時的にみた。添加薬剤濃度は対象となる菌種に対する MIC の 1, 4, 16 倍とした。

実験 2

E. coli, *P. aeruginosa* が vessel (B) 内で定常状態となつてから culture vessel (B) 内に抗菌薬を加え、細菌数の消長を経時的に観察した。

添加薬剤濃度は対象菌種に対する MIC の 4, 16, 64 倍とした。この際 pH と ORP の測定も行なった。

II. 結 果

予備実験

1. culture vessel 内での *E. coli* と *P. aeruginosa* の増殖曲線は Fig. 2 のとおり、ほぼ 10~16 時間で 10⁷ コ/ml となり定常状態となる。増殖曲線から *E. coli* よりも *P. aeruginosa* の増殖は緩徐で、ORP は菌数の変動に一致して動き、菌数が増加すると低下する。pH は菌数の増加につれて上昇するが著明なものではない。

2. culture vessel 内の抗菌薬濃度

medium reservoir (A) 内に抗菌薬を 100 $\mu\text{g/ml}$ となるよう加えた場合 vessel (B) 内の濃度は Fig. 3 のよう

Fig. 2 —viable countspH of the liquid medium -- -ORP of the liquid medium. Bacterial growth, pH and ORP measurements in the culture vessel

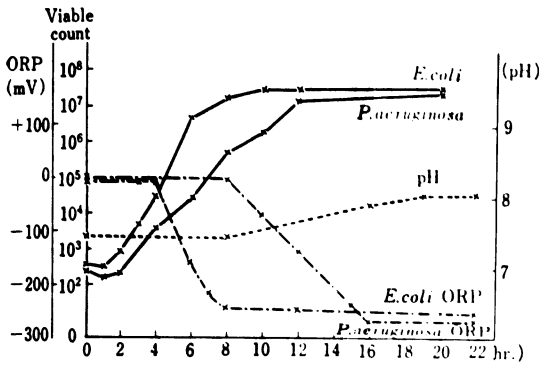
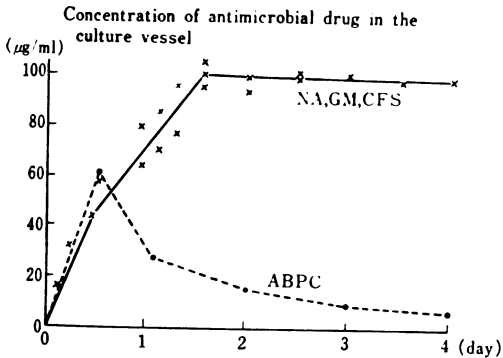


Fig. 3 Medium without antimicrobial drug in the vessel was diluted with the medium containing 100 µg/ml of NA, GM, CFS or ABPC at the rate of 20% per hour. The curves indicate actual concentrations of drugs determined at each time points.



になる。NA, CFS, GM はほぼ同様の濃度変化を示すが、ABPC は13時間で最高濃度を示した後、抗菌活性が低下してゆく。

culture vessel (B) 内に各種抗菌薬を 100 および 400 µg/ml となるよう加えた場合、vessel (B) 内の薬剤濃度実測値を Fig. 4 に示した。この 100, 400 µg/ml の濃度は 6.25 µg/ml の 16, 64 倍の濃度で、この実測濃度推移が One compartment model による血中濃度推移のパターンと比較的類似していることを示したものである。

実験1

E. coli が vessel 内で定常状態となつてから、medium reservoir に ABPC, NA, GM を MIC の 1, 4, 16 倍濃度で加えた場合の菌数変化を Fig. 5~7 に示し

Fig. 4 Antimicrobial drugs (ABPC, NA, CFS or GM) of 400 µg/ml or 100 µg/ml were added in the culture vessel at time zero. The curve indicate actual concentrations of drugs determined at each time points. Medium in the vessel was diluted with fresh medium without antimicrobial drugs at the rate of 20% per hour

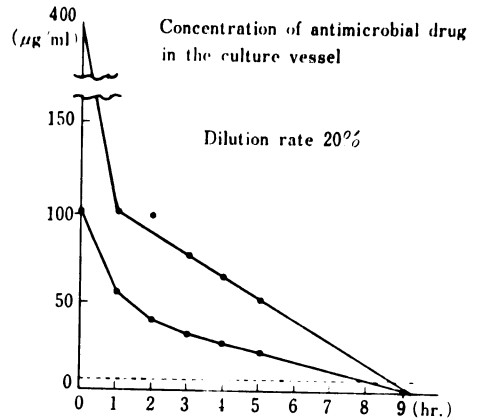
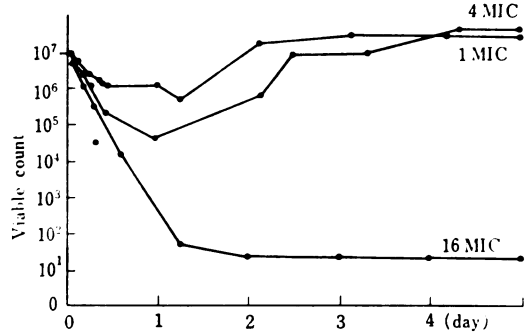


Fig. 5 Experimental details were described in legend to Fig. 3. Viable cell numbers of *E. coli* in the culture vessel to which 1, 4 or 16 folds MIC of ampicillin was added continuously



た。ABPC と NA の場合、1, 4 MIC では一過性の菌数減少があるが、2~3日でもとに戻る。16 MIC では NA の場合3日で菌が検出されなくなり、ABPC では数十個/ml の菌が継続して検出された。GM の場合は 1 MIC でほとんどの菌が検出されなくなる。

P. aeruginosa が定常状態となつてから、NA, CFS, GM をそれぞれ 1, 16 MIC となるよう medium reservoir(A) に加えた場合の菌数変化は Fig. 8~10 に示

Fig. 6 Viable cell numbers of *E. coli* in the culture vessel to which 1, 4 or 16 folds MIC of nalidixic acid was added continuously

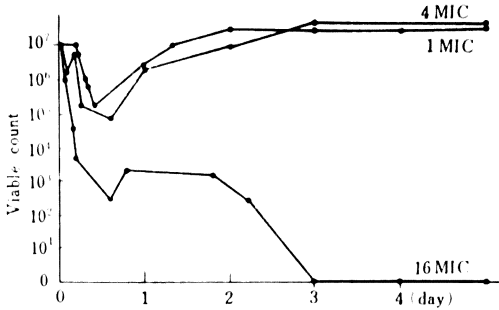


Fig. 7 Viable cell numbers of *E. coli* in the culture vessel to which 1, 4 or 16 folds MIC of gentamicin was added continuously

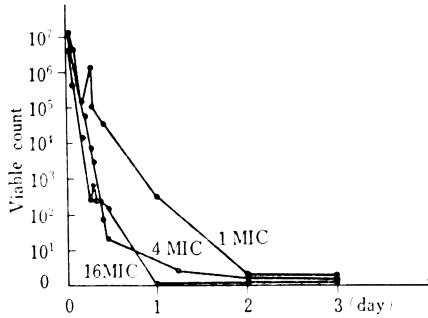
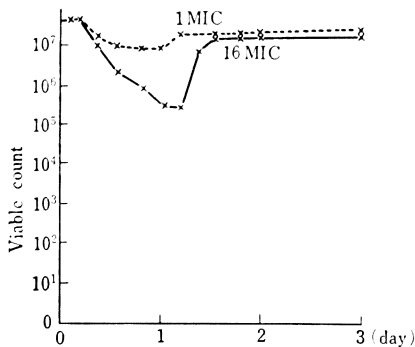


Fig. 8 Viable cell numbers of *P. aeruginosa* in the culture vessel to which 1 or 16 folds MIC of nalidixic acid was added continuously



した。*P. aeruginosa* の場合どの薬剤でも菌は残存するが、菌数減少度は薬剤によって異なる。減少度のもっとも大きいのは GM であるが、NA では 16 MIC でも 2

Fig. 9 Viable cell numbers of *P. aeruginosa* in the culture vessel to which 1 or 16 folds MIC of gentamicin was added continuously

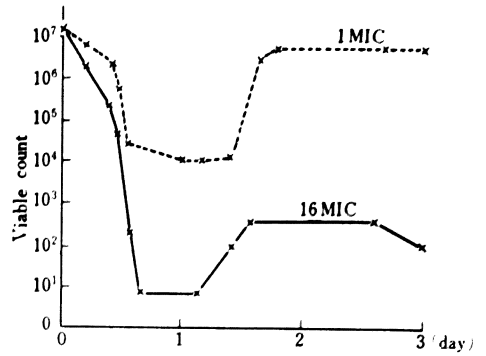
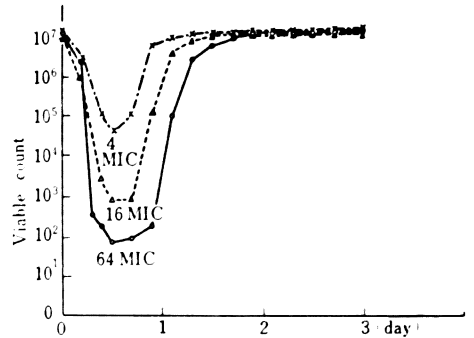


Fig. 10 Viable cell numbers of *P. aeruginosa* in the culture vessel to which 1 or 16 folds MIC of ceftulodin was added continuously



オーダー程度しか減少しない。また再増殖開始までの時間も GM がもっとも長い。この実験 1 で再増殖してきた *E. coli* と *P. aeruginosa* に対する各薬剤の MIC は、Table 1 の () 内に示した。

ABPC の *E. coli* に対する MIC に差はないが、NA の場合著明に MIC が上昇している。

実験 2

定常状態となった *E. coli* に対し vessel (B) 内に、ABPC, NA, GM, CFS を加えた場合の菌数変動は Fig. 11~14 に示した。これら 4 剤の効果を比較してみると、どの濃度でも NA を加えた場合がもっとも菌数減少度が小さく、再増殖に要する時間も短い。しかし菌数減少、再増殖のパターンは ABPC, CFS の場合と類似した形を示し、24~36 時間で菌数が元のレベルに戻る。

Fig. 11 Viable cell numbers of *E. coli* in the culture vessel to which 4, 16 or 64 folds MIC of ampicillin was added at time zero. Experimental details were described in legend to Fig. 4

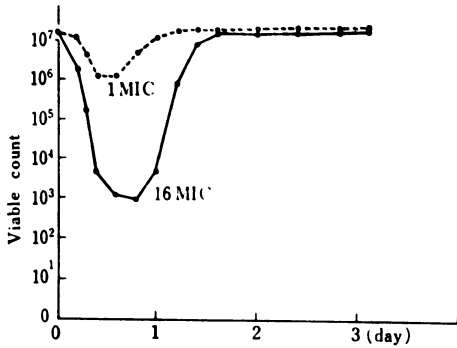
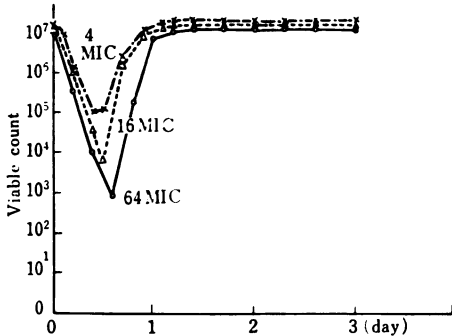


Fig. 12 Viable cell numbers of *E. coli* in the culture vessel to which 4, 16 or 64 folds MIC of nalidixic acid was added at time zero



CFS と ABPC を比較すると菌数減少度に差がなく、増殖開始までの時間が CFS の方が短いといえる。GM の場合 64 MIC で菌が消滅し、16 MIC でも静菌時間は他剤に比して長い。

P. aeruginosa に対して GM, NA, CFS を vessel(B) に加えた場合を Fig. 15~17 に示した。各抗菌薬濃度での菌数減少度は *E. coli* の場合より小さく、GM の 64 MIC の場合でも再増殖がみられた。

CFS を加えた場合の菌数減少度は GM の場合とそれほど差がないが、再増殖までの時間は短い。この実験 2 で NA と GM を加えた際の pH, ORP の変動を Fig. 18~19 に示した。

Fig. 13 Viable cell numbers of *E. coli* in the culture vessel to which 4, 16 or 64 folds MIC of gentamicin was added at time zero

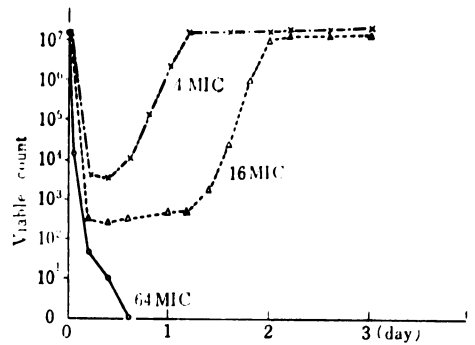
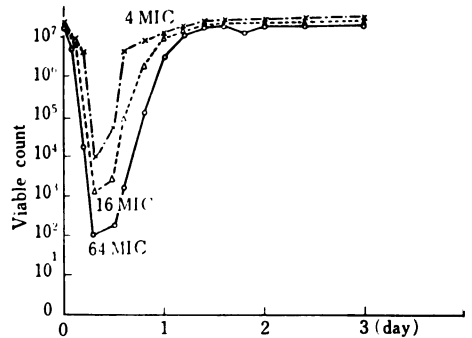


Fig. 14 Viable cell numbers of *E. coli* in the culture vessel to which 4, 16 or 64 folds MIC of cefsulodin was added at time zero



予備実験で示したように菌数が減少すると ORP は上昇し、pH は少しずつ低下し、薬剤の種類による差は認められない。

III. 考 察

試験管内で細菌が増殖する場合、栄養素の減少と代謝産物の蓄積が起こるが、これを避けるために連続流動培養法が開発され、本邦では小沢^{5,6)}が、欧米では FRETER⁷⁾が腸管内における各種細菌の拮抗現象解明に用いている。

連続流動培養装置には Turbidostat と Chemostat があり、前者は培養した細菌密度を光電的に測定し、それによって培地の添加量を調節し、細菌密度を定常状態に保つ装置である。培地には必須栄養素が過剰に存在するため細菌は常に対数増殖の状態を示す。ここでの増殖

Fig. 15 Viable cell numbers of *P. aeruginosa* in the culture vessel to which 4, 16 or 64 folds MIC of nalidixic acid was added at time zero

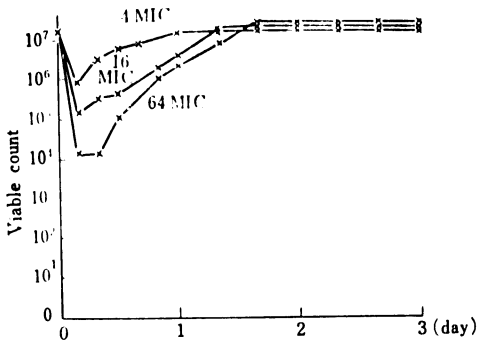


Fig. 16 Viable cell numbers of *P. aeruginosa* in the culture vessel to which 4, 16 or 64 folds MIC of gentamicin was added at time zero

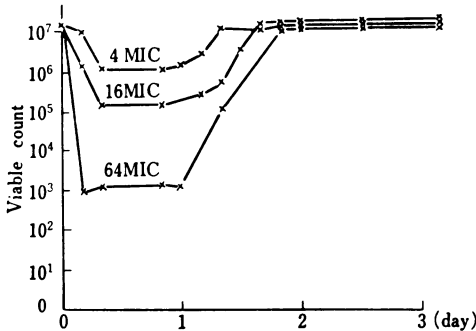


Fig. 17 Viable cell numbers of *P. aeruginosa* in the culture vessel to which 4, 16 or 64 folds MIC of cefsulodin was added at time zero

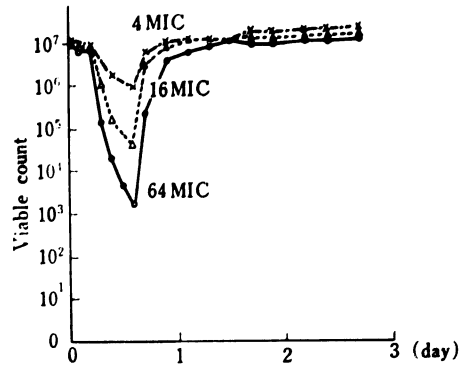
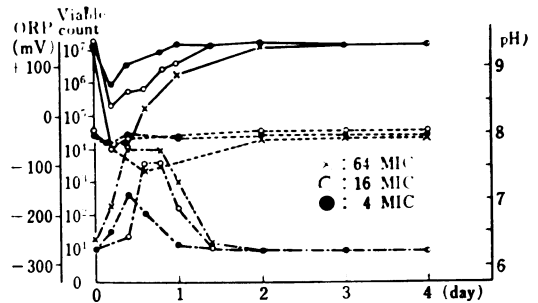


Fig. 18 The change of viable cell, pH and ORP in the culture vessel to which 4, 16 or 64 folds MIC of nalidixic acid was added at time zero



率が大きくなればその分だけ細菌が流出し、菌数が減少する。

この方法で抗菌薬の細菌制圧効果をみた詳細な報告は、本邦では著者が1977年の第24回日本化学療法学会東日本支部総会で発表するまで本邦文献ではみられず、最近、村川ら⁹⁾が本法に比較的類似した方法で cephalosporin 系薬剤の抗菌効果について報告しているにすぎない。欧米では GRASSO ら⁹⁾の報告が1978年にあり、O'GRADY ら^{10,11)}によっても類似の方法による実験が1976年に行なわれている。

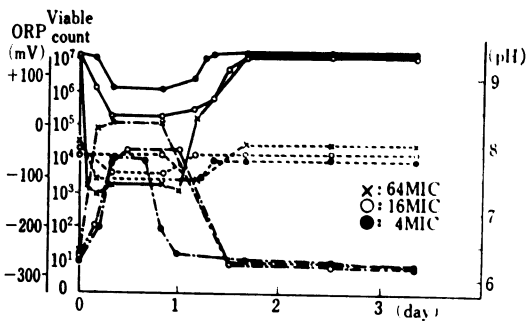
使用菌種の *E. coli* は泌尿器科外来患者からもっとも高頻度に分離され、*P. aeruginosa* は入院患者からの検出率が高く、尿路感染症の主役と考えられている¹²⁾。

使用抗菌薬は作用機序の異なる ABPC, NA, GM, CFS を選んだ。CFS は新しい cephalosporin 系薬剤で、*P. aeruginosa* に対して特異的に抗菌作用があるとされ

速度は設定された環境条件、細菌の種類、培地などによって左右され、Chemostat は培地流入速度と限定因子濃度の制御により細菌密度と増殖速度を一定に保つことができる。

限定因子としての低濃度栄養素はすぐ利用しつくされ、vessel 内栄養素濃度はほぼ 0 に保たれる。ここでもっとも重要な因子は細胞の分裂速度を規制する希釈率で、培養液の流入速度を調節することで増殖速度が変えられる。今回の実験方法では宿主側からの攻撃の因子はないものの、新しい栄養源が次々と供給され、代謝産物が排除されてゆくの、従来の静置培養で測定された抗菌力よりも正常尿路内での抗菌効果に近い結果が示されるといえる。vessel 内で細菌が増殖する場合、加えた培養液でそれが希釈されるため細菌増殖速度よりも希釈

Fig. 19 The change of viable cell, pH, ORP in the culture vessel to which 4, 16 or 64 folds MIC of gentamicin was added at time zero
 Fig. 18, 19 — viable counts
pH of the liquid medium
 - - -ORP of the liquid medium



ている。

この装置で reservoir を腎, vessel を膀胱と考えればこの実験系はカテーテル留置患者と条件的に一致すると考えられる。すなわち尿が膀胱へ送り出されると希釈によって細菌密度が減少し, 一方では増殖による細菌密度の増加もある。したがって尿量が多ければ細菌密度は減少し, 尿量が少なければ増加するわけで, この尿量の増減を本装置の希釈率にあてはめて考えれば, 腎で産生した尿が膀胱へ流れ, 留置カテーテルの存在が多少の残尿を伴うことを考えれば, 本装置が *in vivo* の条件に近いということがわかる。

CATTEL ら¹³⁾は尿流量を増加させると数時間で尿中細菌数が 10^2 コ/ml 以下に減少すると述べている。また HINMAN¹⁴⁾¹⁵⁾は排尿機構による感染防御に関して, 排尿前後の尿中細菌数は早朝第 1 尿にもっとも多く, 夕方をもっとも少なく $10^3 \sim 10^2$ コ/ml となるが利尿状態で異なるとしている。

薬剤の抗菌力は MIC で示されているが, minimum bactericidal concentration(MBC) を重視するものもある¹⁶⁾。しかしながら, これは抗菌薬を 18 時間同一濃度で一定接種量の細菌に接触させた結果であって, これと対比する意味で実験 1 を行なった。しかし culture vessel 内の薬剤濃度が medium reservoir 内の濃度とはほぼ等しくなるのに約 36 時間を要し, 濃度上昇も直線的ではなかった。また ABPC の抗菌活性低下がみられたが, 本剤は溶解すると経時的に力価が低下してゆくもので¹⁷⁻¹⁹⁾, 室温から 37°C では抗菌活性がかなり低下すると考えられる。単に MIC を求める場合と異なり, 本法では抗菌効果として菌数減少度と再増殖開始までの時

間すなわち静菌時間をとりあげることができる。

実験 1 ではこの 2 つの観点からみると *E. coli* に対しては GM がもっとも抗菌力に優れ, 1 MIC で十分な抗菌効果を示すが, NA, ABPC では 16 MIC が必要である。ABPC と NA の MIC が $6.25 \mu\text{g/ml}$, GM で $1.56 \mu\text{g/ml}$ と 4 倍の差であるのに本実験では 16 倍の差があるといえる。また ABPC, NA の 1, 4 MIC のどの場合でも 18 時間までは抗菌活性が認められ菌数の減少がみられたが, その後再増殖が認められた。Fig. 5, 6 から明らかなように, ABPC, NA では 16 MIC の濃度がないと再増殖を始める。1 MIC の濃度があれば細菌の発育が阻止されるはずであるが, ABPC の場合はすでに Fig. 3 に示したように抗菌活性の低下が大きな原因と考えられ, NA の場合は再増殖後の MIC をみればわかるように耐性菌が出現することによって考えられる。再増殖開始までの時間は NA の方が早く, 同じ MIC でも ABPC の方が優れていると思われた。

P. aeruginosa の場合の菌数減少度は GM でもっとも著明で, CFS, NA と続く。再増殖までの時間は GM 添加でもっとも長く, NA と CFS の場合は同程度と評価された。

実験 2 では薬剤消失時間は 10 時間程度で, 細菌の再増殖までの時間が約 12 時間であることから Fig. 18 に示すように薬剤濃度が 1 MIC 以下となって 2~3 時間後と考えられる。これは GRASSO ら⁹⁾が細菌の再増殖は薬剤濃度が 1 MIC 以下になってから起こると CEZ に関して述べているのにはほぼ一致する。

再増殖して定常状態になるまでの時間は高濃度薬剤に接触した場合ほど長い傾向がみられるが, NA と CFS ではあまり差がない。

P. aeruginosa の場合, 各薬剤添加後の菌数減少, 再増殖のパターンは *E. coli* の場合と似ているが, 菌数減少度は小さい。また NA, CFS 添加の場合各菌種に対する抗菌パターンに差はないが, GM の場合は再増殖までの時間が長い。薬動力学的には, 実験 2 は Rowe ら²⁰⁾が示しているように one compartment model に相当し, vessel 内の抗菌薬濃度の推移は 1 回静注法による血中濃度の推移に近いと考えられる。したがって実験 2 は感染症に対する抗菌薬投与モデルの一つと考えられ, 希釈率を一定にすれば血中薬剤濃度持続時間, あるいは半減時間 ($t_{1/2}$) も一定と考えられる。

GRASSO ら⁹⁾は *E. coli* に対して投与時薬剤濃度が同じなら, 血中半減時間が変わっても殺菌力は同じで再増殖までの時間が異なるとし, 逆の場合は再増殖までの時間に差がないとしている。実験 2 はこの逆の場合に相当し, GM の場合を除いては比較的よく一致しており, cep-

halosporin 系薬剤だけでなく ABPC, NA についても同様のことがいえると思われた。

GREENWOOD ら²¹⁾は dilution system を使用し, benzil penicillin(PCG) と ABPC の *E. coli*, *P. mirabilis* に対する抗菌力をみており, *E. coli* に対する ABPC の場合 4 MIC で rapid lysis, 1 MIC で delayed lysis を認めており, 本実験結果と一致している。

また御原屋²²⁾は感染症治療モデルを設定し, cephalothin (CET) の培地内濃度が MIC 以下になると菌の再増殖が盛んとなるが, erythromycin (EM) では培地内濃度が MIC 以下になっても再増殖が認められず, 12 時間ごとの投与方法が効果的であるとしている。

五島ら²³⁾は cefatrizine (CFT) と cephalixin (CEX) の抗菌力を比較するため *E. coli* NIHJ JC-2 株を用い, 振盪培養下で 1 MIC 濃度の CEX が 6 時間までしか抗菌作用がないのに CFT は 8 時間でも抗菌作用を示し, 4 MIC の濃度では CEX でも 8 時間で抗菌作用を認めたとしている。

鈴木ら²⁴⁾との共同研究で著者は *E. coli* を起炎菌とする急性単純性膀胱炎患者 40 名にこの両薬剤を投与し, 尿中細菌減少度と尿中薬剤濃度, 起炎菌に対する MIC の関係を検討した。投与量は両剤とも 1 回 25 mg である。その結果, 最高尿中濃度が 16 MIC に達している CFT 投与群では 8 時間後の尿中に細菌を認めず, そこまで濃度の上昇していない CEX 投与群では 1 例を除き菌数減少しか認められなかった。

1 回 25 mg の投与量は通常の 1/10~1/20 の量であるが, 最高尿中濃度が MIC 値の 16 倍となって菌が消滅していることは感染防御機構の問題があるとしても, 実験 2 の *E. coli* に対する各薬剤の抗菌効果をみればうなずけるものである (NA の場合以外は 10^8 コ/ml 以下となっている)。

GREENWOOD ら²⁵⁾も *E. coli*, *P. mirabilis* に対する β -lactam 抗生剤の投与量は通常の 1/4 で充分としている。しかしながら *P. aeruginosa* では 16 MIC でも 10^8 コ/ml 程度にしか菌数が減少せず, 同じ MIC 値を示す薬剤でも菌種によって効果が異なり, 有効と思われた薬剤が無効の場合もあることをうかがわせる。一方, 尿路感染症では尿中薬剤濃度が高くなるので, いわゆる耐性菌に対しても有効な場合がある²⁶⁻²⁸⁾。

以上, 連続流動培養という動的環境下における薬剤の抗菌効果発現のパターンについて述べたが, これらは菌種あるいは薬剤の相異によって左右されると考えられ, 各薬剤の細胞外膜透過性, 作用機序などに関わる問題であり, 臨床面との比較を含めてさらに検討を要すると思われる。

以上のことをまとめると, 実験 1 では同じ MIC でも ABPC に認められた抗菌活性の低下, NA に認められた耐性菌の早期出現, GM で認められた MIC 以下の濃度での抗菌効果など薬剤によって動的環境における抗菌力に差のあることが判明した。また *E. coli* と *P. aeruginosa* に対する各薬剤の効果から菌種によっても動的環境下では抗菌力に差のあることが判明した。

実験 2 では連続流動培養法が感染モデル, とくに尿路感染モデルたりうることを述べ, Fig. 11, 12, 14, 15, 17 に示すように, *E. coli*, *P. aeruginosa* に対しては GM を除き, 各薬剤間の作用機序の差はともかく, 添加時薬剤濃度が菌数減少度に関係することを示した。GM では他剤より静菌時間が長かった。

E. coli に対する 16 MIC 濃度の薬剤添加では菌数が 10^8 コ/ml 程度に減少し, すでに報告した急性単純性膀胱炎の治療成績と対比しえた。また *E. coli* に対する CFS, *P. aeruginosa* に対する NA の成績からいわゆる耐性菌といわれる菌株に対しても薬剤濃度によっては抗菌作用を示す場合があることを示した。

連続流動培養という動的条件下で得られた薬剤の抗菌効果についての成績は, 薬剤の細胞外膜透過性, 作用機序, 投与方法, 投与間隔などに関連した多元的情報を提供しており, 静置培養における薬剤効果についての結果が一元的な情報しか求められないものであることを考えると, 薬剤の抗菌効果の動的把握という面から重要な意義をもつと考えられた。

稿を終るにあたり研究の機会を与えられ, 終始御指導御助言頂きました大越正秋教授, 微生物学教室小沢敦教授に深甚の謝意を表します。

なお本論文の要旨は第 24 回日本化学療法学会東日本支部総会および第 26 回日本化学療法学会で発表した。

文 献

- 1) KUNIN, C. M.: Detection, Prevention and Management of Urinary Tract Infections, 2nd Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 25~27, 1974
- 2) 大越正秋, 河村信夫: 尿路感染症における薬効評価基準. 臨泌 34: 85~91, 1980
- 3) BRYSON: cited from 6)
- 4) NOVICK, A. & L. SZILARD: Cold Spring Harbor Aymp. Quart. Biol. 16: 337~343, 1951
- 5) OZAWA, A. & R. FRETER: Ecological Mechanism Controlling Growth of *Escherichia coli* in Continuous Flow Cultures and in the Mouse Intestine. J. Inf. Dis. 114: 235~242, 1964
- 6) 腸管感染研究会編: 感染モデルの組み方, VI 動的

- 環境(連続流動培養)。pp. 207~221, '73, 近代出版
- 7) FETER, R.: *In vivo* and *in vitro* Antagonism of Intestinal Bacteria against *Shigella flexneri*. 2. The Inhibitory Mechanism. *J. Inf. Dis.* 110: 38~46, 1962
 - 8) 村川武雄, 広瀬俊治, 西田 実: 生体内濃度に Simulate した *In vitro* Model における抗生物質の殺菌作用(2)。*Chemotherapy* 28: 26~30, 1980
 - 9) GRASSO, S.; G. MEINARDI, I. De CARVERI & V. TAMASSIA: New *in vitro* Model to Study the Effect of Antibiotic Concentration and Rate of Elimination on Antibacterial Activity. *A. A. C.* 13: 570~576, 1978
 - 10) O'GRADY, F. & J. H. PENNINGTON: Bacterial Growth in an *in vitro* System Simulating Conditions in the Urinary Bladder. *Brit. J. Exp. Path.* 47: 152~157, 1966
 - 11) O'GRADY, F.; C. L. GAUCI, B. S. WATSON & B. HAMMOND: *In vitro* Models Simulating Conditions of Bacterial Growth in the Urinary Tract. *Urinary Tract Infection. Proceedings of Second National Symposium Held in London, March 1972.* pp. 80~91, 1973. Oxford University Press
 - 12) 岡田敬司, 村上泰秀, 河村信夫, 大越正秋, 佐竹幸子, 河喜多龍祥: 東海大学病院泌尿器科における尿中分離細菌について, 第1報: 1976~1978年の分離細菌とディスク感受性について。泌尿紀要 26: 1245~1261, 1980
 - 13) CATTEL, W. R.; K. I. FREY, F. I. SPIRO, J. M. SARDESON, M. B. SUTCHIFFE & F. O'GRADY: Effect of Diuresis and Frequent Micturition on the Bacterial Content of Infected Urine: A Measure of Competence of Intrinsic Hydrokinetic Clearance Mechanisms. *Brit. J. Urol.* 42: 290~295, 1970
 - 14) HINMAN, F. Jr. & C. E. COX: The Voiding Vesical Defence Mechanism: The Mathematical Effect of Residual Urine, Voiding Interval and Volume on Bacteriuria. *J. Urol.* 96: 491~498, 1966
 - 15) HINMAN, F. Jr.: Bacterial Elimination. *J. Urol.* 99: 811~828, 1968
 - 16) 川島尚志: 緑膿菌性腎う腎炎の化学療法に関する実験的研究。*Chemotherapy* 24: 1668~1673, 1976
 - 17) LYNN, B.: Pharmaceutics of the Semi synthetic Penicillins. *Chemist. Druggist.* 187: 134~136, 1967
 - 18) JACOBS, J.; I. NATHAN, E. SUPERSTINE & T. SACKS: Ampicillin and Carbenicillin Stability in Commonly Used Infection Solutions. *Drug Intelligence Clin. Pharm.* 4: 204~208, 1970
 - 19) SABELLO, D. R. & R. F. SHANGRAW: Stability of Sodium Ampicillin Solutions in the Frozen and Liquid States. *Am. J. Hosp. Pharm.* 28: 754~759, 1971
 - 20) ROWE, F. L. & W. MOROZOWICH: A Simple Dilution Analog Computer for Simulation of Drug Distribution Process. *J. Pharma. Sci.* 58: 1375~1378, 1969
 - 21) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: Differential Effects of Benzylpenicillin and Ampicillin on *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* in Condition Simulating those of Urinary Bladder. *J. Inf. Dis.* 122: 465~471, 1970
 - 22) 御旅屋寛一: 化学療法剤の感受性と薬剤投与量の算出法。臨床と細菌 1: 51~58, 1974
 - 23) 五島瑛智子, 滝田聖親, 金子康子, 小川正俊, 堂ヶ崎 勲, 桑原章吾: 経口 Cephalosporin 剤 Cefatrizine (S-640 P) の基礎的評価。*Chemotherapy* 24: 1668~1673, 1976
 - 24) 鈴木恵三, 名出頼男, 藤田民夫, 置塩則彦, 浅野晴好, 山越 剛, 岡田敬司: 抗菌剤少量投与法の薬効の動力学的観察, Cefatrizine と Cephalexin の急性単純性膀胱炎治療における比較。*Chemotherapy* 28: 115~128, 1980
 - 25) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: Is your dosage really necessary? Antibiotic Dosage in Urinary Infection. *Brit. J. Med.* 10 Sept., 665~667, 1977
 - 26) NAUMAN, P.: The Value of Antibiotic Levels in Tissue and in Urine in the Treatment of Urinary Tract Infections. *J. Antimicrob. Chemothera.* 4: 9~17, 1978
 - 27) KAWADA, Y.; D. GREENWOOD, & F. O'GRADY: Factors Affecting Antibiotic Concentrations in Bladder Urine. *Inv. Urol.* 17: 484~486, 1980
 - 28) STAMY, T. A.; W. R. FAIR, M. M. TIMOTHY, M. A. MILLER, G. MIHARA, & Y. C. LOWLEY: Serum versus Urinary Antimicrobial Concentrations in Cure of Urinary Tract Infections. *N. E. J. M.* 29: 1159~1163, 1974

EFFECT OF ANTIBIOTICS ON THE GROWTH OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN CONTINUOUS FLOW CULTURE

I: STUDIES ON SINGLE CULTURE OF *ESCHERICHIA COLI* AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

KEISHI OKADA

Department of Urology, School of Medicine, Tokai University

A continuous flow culture has been developed as *in vitro* model of bacterial growth and drug concentrations in the body. On the other hand, the antibiotic sensitivity of bacteria has been tested by static culture using liquid and solid media. This study was designed to analyze the antimicrobial activities of several antibiotics (ampicillin, nalidixic acid, cefsulodin and gentamicin) on gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, cultured by the continuous flow system.

When a portion of medium containing 16 times the MIC of the test antibiotic was introduced to the culture vessel containing steady state bacterial cells (2×10^7 /ml), a marked decrease in the bacterial cells in the culture vessel was observed. *Escherichia coli* was completely eradicated or reduced to 10^2 to 10^3 per ml by 64 times MIC of gentamicin or other drugs such as nalidixic acid, ampicillin and cefsulodin. The effect of the antibiotics in eliminating *Pseudomonas aeruginosa* was not as significant as with *Escherichia coli* when the same antibiotic concentration was added to the reservoir medium or introduced directly to the vessel.

We also determined the time required to attain the steady state of cell growth after drastic reduction of the cell density by introduction of antibiotics to the vessel as a one-compartment model of drug absorption and excretion.

Our results suggest that the inhibitory effects of antibiotics on the growth of steady state gram-negative bacteria are quite different from the effects determined by the conventional static culture. Since the dilution rate of the drug is not proportional to the dilution rate of the cells in the culture vessel, the results obtained from such experiments should be interpreted carefully. However, the information obtained might provide a basis for making a time schedule for drug administrations to patients. Thus, we believe that use of a continuous flow culture system to study the effect of antimicrobial agents in the dynamic state is meaningful and provides important information concerning the chemotherapy of bacterial infections.