

細菌の酵素活性力を指標にする、新しい迅速薬剤感受性試験測定法

第一報 新規の反応液と呈色系の構築

狩山 英之

大阪府立身体障害者福祉センター附属病院・研究臨床検査室*

(平成3年12月9日受付・平成4年3月10日受理)

薬剤感受性試験の迅速化をめざし、新しい観点からの測定法を検討した。目標は培地培養による増菌操作の省略にある。その手段として細菌の酵素活性力を指標にすべく、反応液は新たに半合成のものを、指示薬に Resazurin を組み合わせる呈色反応系を考察した。この呈色法は高感度を有し、Lag-Time がほとんどなく、測定も簡便であった。この新法で ATCC 標準菌株 8 菌種を用い既報の迅速法と比較した結果、次の事項が判明した。

1) Resazurin 呈色法では接種菌濃度に比例した菌酵素活性反応値が得られ、その測定感度は培地培養による濁度モニター法より数十～数百倍、高感度であった。

2) Resazurin 呈色法が高感度を得られたのは、補酵素にビタミン K₃ 添加の有用性を見いだしたことが大きい。

3) 細菌用自動機器法と同等の接種菌濃度、約 3.0×10^6 CFU/ml で、Resazurin 呈色法は反応スタート時より Lag-Time のない鋭敏な菌の酵素活性力が捉えられた。

4) Resazurin 呈色法は *Candida albicans*, *Streptococcus pyogenes* など特殊な発育培地が必要な菌種が、*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* と同様に同じ反応液で鋭敏な呈色が現れた。

Key words: 迅速薬剤感受性試験法, 細菌還元酵素活性力, 新規反応溶液, Resazurin 呈色法, Vitamin K₃

今まで細菌検査には菌を培養する時間が、どうしても必要とされてきた。薬剤感受性試験法各種も通常、菌接種後 18~20 時間程培養してから判定する。患者投薬の指針ともなる本試験の迅速化は、かなり以前からの要望事であるが、なかなか実現し難い。やっとならぬ迅速法として定着の兆しが見えるものに細菌用自動機器法がある。これら機器には振とう培養法が採用され¹⁻⁵⁾、光学的に菌増殖に伴う濁度上昇を精密にモニターする仕様が多い。その結果、発育の速い菌種では 4~5 時間程の培養で成績がプリントアウトされる。しかし、いかに自動機器を駆使すると言っても、菌を培養して増殖を待つ姿勢は変わらない。本当の迅速化とは、この培養過程の省略を目指すことではないかと考えた。その手段として細菌の酵素活性力を呈色反応として捉える方法を検討した。むろん、この細菌の酵素活性力を応用する迅速化法は Bartlette⁶⁾ の TTC 還元法をはじめとし、多数の報告⁷⁻¹⁹⁾がある。これらの報告も既存培地を使用したものばかりであるが、薬剤感受性測定法はどの方法でも、接種菌量や使用培地の違いにより影響を受けるた

め^{1,24)}、頻用される Mueller-Hinton 培地の使用が無難と思われる。そこで実験当初は Mueller-Hinton 培地を用い、指示薬に Resazurin を選択して反応を検索することにした。Resazurin を選択した理由は広範囲の菌種が持つ還元反応を捉えられること、試薬の調整が簡単かつ安定性が良いこと、可視波長しかも長波長に吸収ピークを持つこと、色調が鮮やかで肉眼的に見やすいこと、培地に事前添加ができ菌発育の阻害がなく、すでにチオグリコレート培地での利用や歯科領域において、う蝕活動試験²⁰⁻²²⁾の迅速検索に活用されているためである。

しかし、Mueller-Hinton 培地そのままの活用では Resazurin 指示薬を添加しても濁度モニター法の測定感度を上回る反応値が短時間内 (2~3 時間以内) では得られなかった。そこで、別途に独自の反応液を構築して検討を重ねた。最終的に独自の反応液に Resazurin を組み合わせた呈色系は既報の迅速測定法 3 種¹⁰⁻¹⁵⁾および自動機器の濁度モニター法に比べて高感度を有していたので報告する。

* 大阪府堺市旭ヶ丘中町 4-3-1

I. 材料と方法

1) 使用菌株

ATCC 標準株 8 菌種 8 株を用いた。これらの菌株はゼラチンディスクから立ち上がらせたが、数代継代培養して、コンタミがないのを確認の後、実験に供した。日常検査に近い条件で実施できるように、各菌は各種寒天平板培地で 16~20 時間培養の定常期初期の菌苔より直接採取して（プロスによる数時間の事前培養は実施せず）接種菌液を作製した。菌種の内訳は、*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Eutercoccus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Candida albicans* ATCC 10231, *Haemophilus influenzae* ATCC 49795, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 である。接種菌濃度は Cobas-bact (Roche) や ms-2 (Dynabotte) で実施の濃度と同等の $2.0 \sim 4.0 \times 10^6$ CFU/ml を以下に示す検討各方法に接種した。

2) 使用培地および既存反応液

濁度モニター法および既報の酵素反応応用迅速法 3 種、ブドウ糖消費追跡法^{10,11)}, MTT-PMS 呈色法^{12,13,39)}, Resazurin 呈色法^{14,15)}の検討に当初、Mueller-Hinton Broth (BBL, 以下 M. H. B と略) を使用した。同時に M. H. B に替えて Otto 23) らがグラム陰性ブドウ糖非発酵かん菌の同定に使用した細菌用リン酸緩衝液を少し変更した溶液とサルファ剤検討時に用いる半合成のスルホンアミド試験溶液²⁴⁾に Resazurin を添加して M. H. B との差を求めた。リン酸緩衝液の組成は $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14.4 g, KH_2PO_4 2.72 g, 酵母エキス 3.0 g, 硫酸マグネシウム 0.1 g/L, pH=7.4 で、スルホンアミド用液の組成は Na_2PO_4 8 g, KH_2PO_4 2 g, クエン酸ナトリウム 0.4 g, 硫酸アンモニウム 1.0 g, 硫酸マグネシウム 0.1 g, カザミノ酸 2.0 g, トリプトファン 0.01 g, ニコチン酸 0.002 g, ビタミン B₁ 0.01 g, ブドウ糖 2.0 g/L pH=7.3 を調査した。

3) 新規の反応液

スルホンアミド試験溶液組成を基に、酵母エキスやブドウ糖などの添加による Resazurin 呈色の増強を求め、補酵素 9 種、ビタミン B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, H, K₃, NAD, PABA を種々濃度を添加して新規反応液の構築を模索した。

4) 濁度モニター法

M. H. B にいずれの添加物も入れず、そのまま 8 菌種に使用した。菌接種後 37°C にて振とう培養し、経時的に 600 nm における混濁度を測光セル部が 37°C

保温が可能な Gilford stasar 3 (CORNING) により測定した。

5) ブドウ糖消費追跡法

ブドウ糖を 200 mg/dl になるよう M. H. B に添加し、各菌を接種後、振とう培養しながら経時的にプロス中の残存ブドウ糖量を計測した。計測法は glucose oxidase/peroxidase 呈色法²⁰⁾ (KAINOS GL-5) を用いた。

6) MTT-PMS 呈色法

本法も振とう培養中、経時的に 0.1% MTT (3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide: SIGMA) と、0.05% PMS (phenazine methosulfate: SIGMA) を等量添加し、約 10 分呈色を待ち紫赤色の呈色と沈澱を求めた。

7) Resazurin 呈色法

Resazurin (WAKO) を 17.5 mg/L 濃度 M. H. B に事前添加した。Resazurin (600 nm λ_{max} ・紫青色) が菌によって還元されると、Resolfin (570 nm λ_{max} ・桃色) に変化する。振とう培養中 Resolfin の出現時間を観察した。あわせて、リン酸緩衝液とスルホンアミド用液にも Resazurin を添加して反応を求めた。

8) 新規反応液での Resazurin 呈色法

独自に作製した半合成溶液 (18 物質配合) に Resazurin を添加し、Gilford stasar 3 にて 600 nm における吸光度の減少を追跡した。

II. 結果

1) 濁度モニター法

被検菌 8 株の濁度上昇曲線を Fig. 1 に示す。培養開始後、2.0 時間 (以下、h と略) ほどはどの菌も濁度の上昇は肉眼的には認められない。しかし、濁度上昇は認められないものの生菌数の動きは徐々に増加し、腸内細菌 2 種は初発時の菌量から 3.5×10^7 CFU/ml になっていた。この時間後、腸内細菌 2 菌種は素早い濁度上昇が認められ、4 h 後には吸光度 (以下、O.D と略) 0.207 となり、生菌数は 7.5×10^8 CFU/ml になった。*S. aureus*, *E. faecalis* は腸内細菌よりやや遅れ、2.5 h 頃からの濁度上昇が見られた。*H. influenzae* や *S. pyogenes*, *C. albicans* は 4~5 h 時でも濁度の明瞭な上昇は認められない。*P. aeruginosa* は 4 h 頃に少し、濁度上昇の兆しが認められ、O.D は 0.028 ほどで、増菌による生菌数は 6.7×10^7 CFU/ml になっていた。

2) ブドウ糖消費追跡法

ブドウ糖の減少が最も早く認められたのは *E. coli* と *K. pneumoniae* の 2 菌種で、振とう培養開始後 2 h 時であった。他の菌種も含め、ブドウ糖残存量の変化

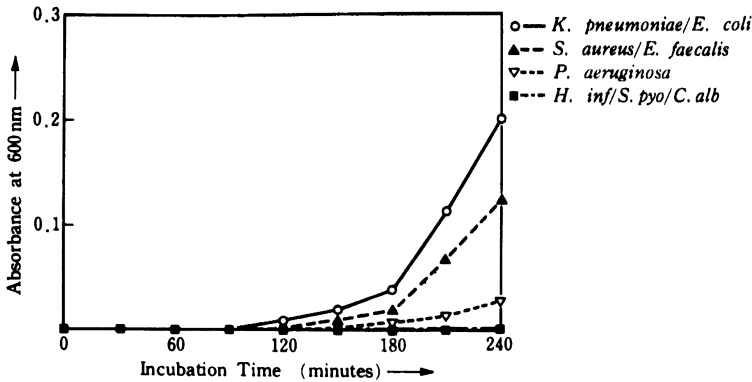


Fig. 1. Time course of turbidity for 8 ATCC strains.

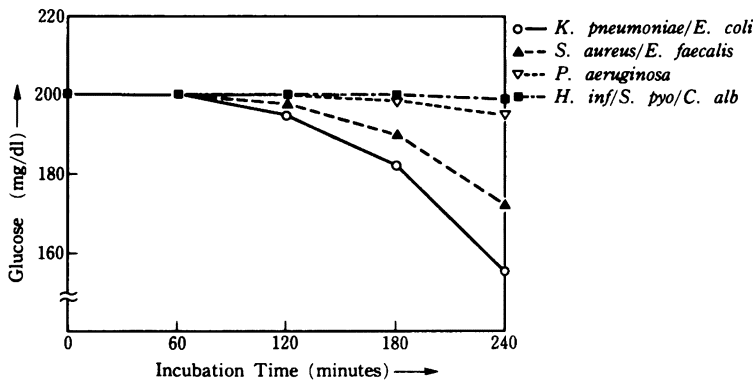


Fig. 2. Glucose concentration in M.H. broth.

を Fig. 2 に示した。この図から、8 菌種ではブドウ糖の消費が認知され出す時間は濁度モニター法の濁度初期感知時間と差はなかった。ブドウ糖の消費減少量は腸内細菌 2 菌種では 1 h で 2~3 mg/dl と極少量で、2 h で 10 mg/dl ほどが消費された。*E. faecalis* や *S. aureus* ではさらに少なく 2 h で 3~5 mg/dl 量ほどで、その他の菌種の消費はほとんど 0 に等しかった。この 2 h 以降、前記 4 菌種のブドウ糖消費は活発になり、3 h では 20 mg/dl に、5 h では 50~90 mg/dl 量が消費されるまで反応が進んだ。一方、*P. aeruginosa* は消費の進行が遅く、5 h でも 10 mg/dl ほどであった。また、*S. pyogenes*、*C. albicans*、*H. influenzae* では 5 h でもほとんどブドウ糖の消費はなかった。本法では呈色試薬を添加すると、以後の菌増殖は期待できず、連続モニターは叶わなかった。

3) MTT-PMS 呈色法

MTT は 0.05%、PMS は 0.005% 濃度でグラム陽性球菌の発育を阻害したため、ブドウ糖消費追跡法と

同様、経時的な試薬の添加を行った。本法の呈色態度を Fig. 3 に示した。この図に示すごとく、本呈色法でも反応出現が早かったのは *E. coli* と *K. pneumoniae* であり、その出現時間はブドウ糖消費追跡法と同様の 2 h であった。8 菌種全体でもブドウ糖消費追跡法と同様、濁度モニター法と、その検出最短時間は変わらなかった。ただ、呈色色調は強く、得られる O.D 値は大きかった。5 h で色調が得られた菌種は 6 菌種で、*H. influenzae*、*S. pyogenes* は無呈色のままであった。しかし、明瞭な色調を示したのは 4 菌種で *P. aeruginosa*、*C. albicans* の 2 菌種は呈色があっても色調はきわめて弱く、肉眼的に見ずらかった。また、調整後の試薬は光と温度に不安定で保存がきかず、添加後は菌の増殖進行は阻まれ、連続モニターは叶わなかった。

4) Resazurin 呈色法

S. aureus を接種した M. H. B およびリン酸緩衝液、スルホンアミド試験溶液の 3 種での呈色態度を

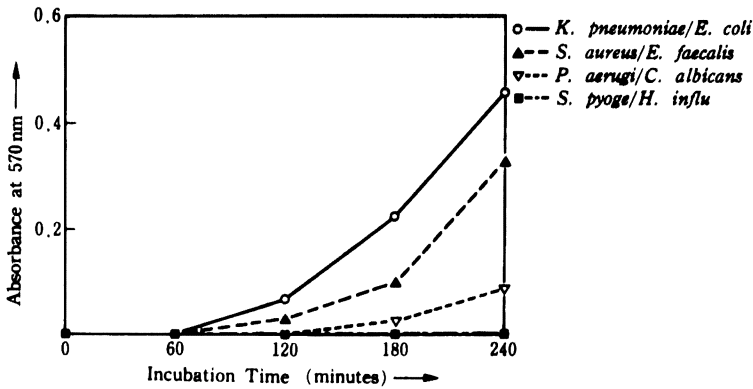


Fig. 3. Time course of MTT-PMS color change for 8 ATCC strains.

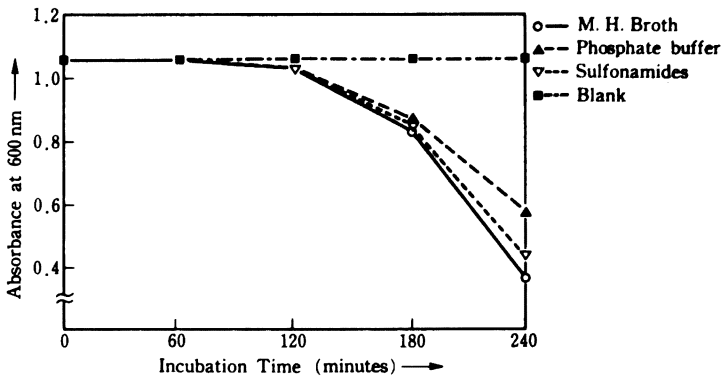


Fig. 4. Time course of resazurin color change at M. H. B and two reaction buffer against *Staphylococcus aureus*.

Fig. 4 に示した。呈色が出現してくる最短時間に 3 種の溶液に大きな差はでなかった。Resazurin 呈色法 (以下, Res 呈法と略) は *E. coli*, *K. pneumoniae* の他に *E. faecalis*, *S. aureus* も 2 h 頃に呈色変化がとらえられた。しかし, この最短検出時間はブドウ糖消費追跡法や MTT-PMS 呈色法, さらに濁度モニター法とほぼ同等であった。また, *P. aeruginosa* と *S. pyogenes* はどの溶液でも呈色は遅く 5 h 以上を要し, 色調もかなり弱い。*C. albicans*, *H. influenzae* は 3 溶液とも呈色が認められなかった。呈色が明瞭だった 4 菌種での 600 nm での O.D 減少量は濁度モニター法の獲得 O.D 量より大きかった。その差は *E. coli* の場合, Res 呈法が反応 4 h で O.D 差が 0.75 であったのに対し, 濁度モニター法では 0.197 であった。3 種類の培地および反応液での長時間培養 (オーバーナイト) 後の残存生菌数は M・H・B が最も多く, リン酸緩衝液とスルホンアミド溶液は混濁度も弱く, 生菌数

も少なかった。

5) 新規反応液の組成

新しい反応液の組成を Table 1 に示す。スルホンアミド試験溶液を基に検討し, 添加物質は 18 種になった。溶液の pH の維持はリン酸塩と NaHCO_3 で $\text{pH}=7.25\pm 0.05$ に調整した。炭素源はクエン酸ナトリウムを使用, 特に *P. aeruginosa* の活性増になったが, 2 価イオン Ca^{2+} , Mg^{2+} の効力を妨げない量の 0.2 g/L にした。 NaCl は反応溶液の浸透圧を考慮し 6.5 g/l にした結果, 305 mosm/L となり, M. H. B の浸透圧 327 mosm/L に近似したものとなった。アルギニンは *S. aureus* や *E. faecalis* の活性を若干上昇させ, ニコチン酸アミドおよびシスチンは腸内細菌の活性力を少し上昇させた。酵母エキスは被検菌全種の酵素活性上昇に役立つことが判明し, 反応液組成からは外せなかった。さらに, 補酵素 9 種を添加検討した結果はビタミン B_2 , B_6 , C はそれぞれ自身, 強い還元性を

持つため、 B_{12} は赤色色調を強く帯びるために Res 呈法には当初から活用できなかった。また、 B_1 、H、NAD、PABA 4 種は反応の増長が認められなかった。しかし、ビタミン K_3 は Res 呈法の感度を大いに助長させた。

6) ビタミン K_3 の添加量

Table 1. Composition of the new reaction buffer

Content	maker	Yolium
Na_2PO_4 (unhydrate)	Wako	3.2 g
KH_2PO_4 (unhydrate)	"	0.8 g
$NaHCO_3$	"	0.4 g
Sodium Citrate	"	0.2 g
$(NH_4)_2SO_4$	"	2.0 g
KNO_3	"	0.1 g
NaCl	"	6.5 g
Glucose	"	1.5 g
Sodium pyruvate	"	0.4 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	"	0.209 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	"	1.184 g
Nicotinic Acid	"	0.2 g
L-Aruginin	"	0.2 g
Yeast Extract	Oxoid	4.0 g
Hemin	"	10 mg
NAD	Sigma	15 mg
Cystine	Wako	2 mg
Vitamin K_3 (1)	"	0.3 mg
" " (2)	"	5.0 mg
" " (3)	"	20.0 mg
Resazurin	"	17.5 mg
* Distilled Water		1,000 ml
Filter Sterilization		pH=7.25±

ビタミン K_3 は脂溶性であるため、エタノールに 10 mg/ml 濃度に溶解させて新規反応液に種々濃度に添加した。ビタミン K_3 の代わりに Menazon-disulfate (SIGMA: 水溶性) を用いると調整が便利であるが、反応液ブランクのシフト化 (時間とともに O.D の下降) がおき、測定しづらかった。種々濃度に添加されたビタミン K_3 による Res 呈法の反応態度を Fig. 5 に示す。また Fig. 6 に生菌数を求め、添加量による発育阻害の程度を被検菌全種について示した。この 2 つの成績より発育阻害を最小に、酵素活性は最大に捉えられる添加量を調べた結果、*S. aureus*、*E. faecalis*、*S. pyogenes* のグラム陽性球菌と *H. influenzae* は 0.3 mg/L が適切であった。一方、腸内細菌は 5.0 mg/L で高活性が得られるが、*P. aeruginosa* は 5.0 mg/L でも活性は弱く 20.0 mg/L 濃度で最も還元反応力が強く出現した。また、*C. albicans* は腸内細菌と同じ 5.0 mg/L で高感度であった。以上の結果、新規の反応液はビタミン K_3 添加量の違いで 3 種類になり、対応菌種に合わせて使用することにした。

7) 新規反応液での Res 呈法

今までの検討を総括し、M. H. B による濁度モニター法、M. H. B による Res 呈法、新規反応液による Res 呈法の計 3 方法での 3.5 h 間の獲得 O.D を比較した成績を Fig. 7 に示した。検討 8 菌種すべてで新規反応液の Res 呈法が一番高感度な O.D の進行が認められる。その反応感度 (反応スタートから 2.5 h まで) は濁度モニター法に比べると菌種にもよるが、数十~数百倍以上を示した。新規の反応液による Res 呈法で最も酵素活性の強かった *K. pneumoniae* と最も弱かった *P. aeruginosa* の感度差は約 4.5 倍ほどであった。しかし、弱かった *P. aeruginosa* も図に示すごとく 4.5 h 間に獲得する O.D 変化量は大きい。ま

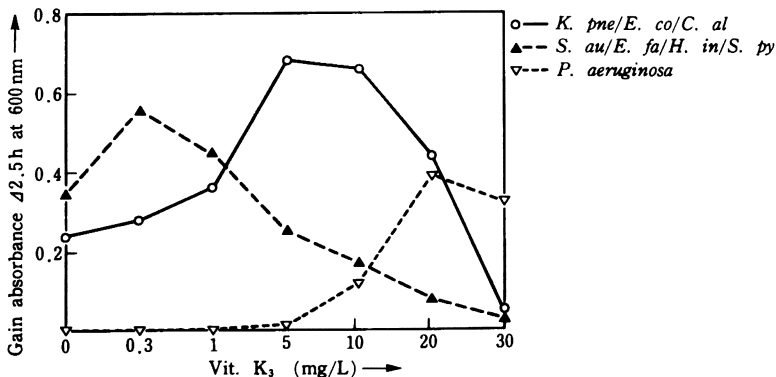


Fig. 5. Resazurin color change and vit. K_3 content.

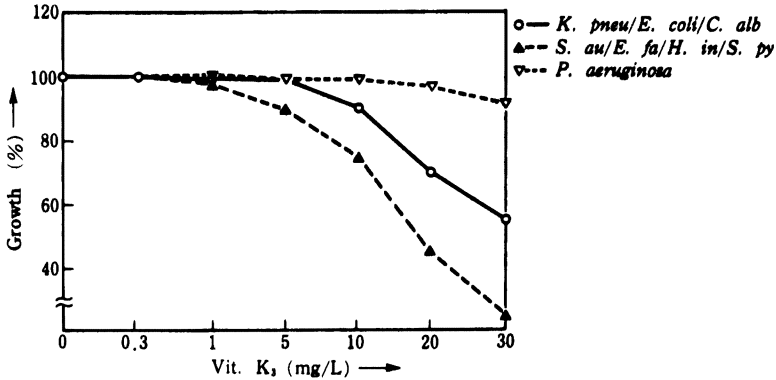


Fig. 6. Cell viability and vitamin K₃ content.

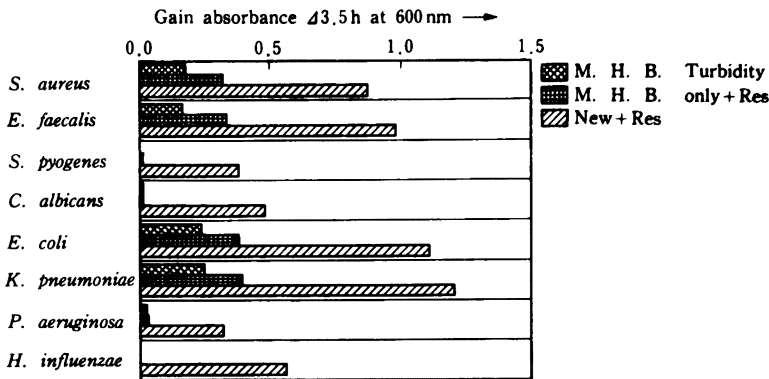


Fig. 7. Sensitivity of resazurin method against 8 ATCC strains.

た、ビタミン K₃ 添加量の異なる 3 種類の反応液は対応被検菌の酵素活性を引き出すのみならず、短時間での発育支持能は M. H. B より若干、強い結果を示した。*K. pneumoniae* では 5.0×10^5 CFU/ml 接種で、3 h 後では新規反応液では 2.3×10^7 CFU/ml に、M. H. B では 7.6×10^6 CFU/ml であった。しかし、オーバーナイトの培養では新規反応液での生菌数は M. H. B の生菌数より少なく、濁度は高いものの死滅が早い結果を示した。

8) 接種菌量差による Res 呈法

E. faecalis を種々の菌濃度で新規反応液に接種し、Res 呈法を追った成績を Fig. 8 に示した。菌還元力による呈色変化割合は接種される菌量に比例した。他の 7 菌種も同様、接種菌量に比例する呈色変化を示した。*E. faecalis* の場合、接種菌濃度 2.0×10^8 CFU/ml 以上の菌濃度で反応スタート直後より Res 変化による O.D 値の減少 (Lag-Time がほとんどない) が認められた。反応スタート直後から菌活性がとらえら

れる各菌種の最少接種菌濃度は *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* は *E. faecalis* と同等であった。*P. aeruginosa*, *H. influenzae* は 4.0×10^6 CFU/ml で、*S. pyogenes*, *C. albicans* は 6.0×10^6 CFU/ml であった。腸内細菌や *E. faecalis* ではさらに高菌濃度の 3.0×10^7 CFU/ml 接種でのスタートでは反応 1.0 h ほどで Res をすべて Resolfin に変化させてしまった。むしろ、菌を接種しない Res 呈法反応ブランク液の O.D 変化はほぼ認められず、時間経過とともに極小の O.D の上昇 (4 h 間で 0.005 ほど) があるにすぎない。次に、微量液体希釈法²⁶⁾に指定される接種菌濃度 5.0×10^5 CFU/ml での Res 呈法の感度を検索した。その結果は発育の早い腸内細菌でも反応スタート後、約 2 h までは O.D 変化がなく、色調は青色のままであった。結局、増菌を待っての呈色変化が始まり、呈色の兆しが認められるのは 2.5 h 頃で紫青色への変化を示した。他の菌種では鮮明な桃色に至るまでの反応時間は *S. aureus* や *E. faecalis* では 4.0~4.5 h 時に、

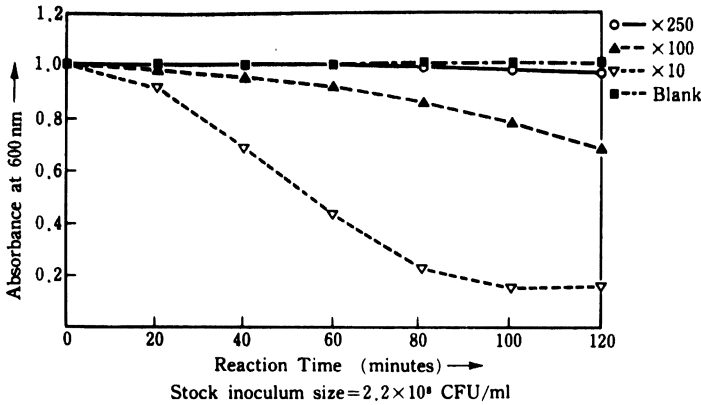


Fig. 8. Sensitivity of the new resazurin solution method against *Enterococcus faecalis* and inoculum size.

P. aeruginosa は 5.5 h ほどで, *H. influenzae*, *S. pyogenes*, *C. albicans* などは 6 h を要した。

III. 考 察

濁度モニター法を基に, 既報の細菌酵素反応 3 測定法の迅速性を M. H. B を用いて検討した。16~20 h 培養の平板上菌苔から直接採取の 3.0×10^8 CFU/ml 濃度では, いずれの迅速法も 3.5×10^7 CFU/ml ほどに菌数が増え (反応スタートから約 2 h), 対数期に移った時点での初期検出であった。ブドウ糖消費追跡法を検討した菅原らの成績¹⁰⁾はプロスでの事前培養を数時間行った後, 対数期に移行した菌を 1.0×10^7 CFU/ml 濃度接種して培養 4~5 h ほどで結果が得られたと報告している。この点, 濁度モニター法でも O.D 値が低いものの発育の早い菌では, ほぼ同時間の 2.5 h で認知だけは可能である。

元来, 平板上に発育した菌は定常期初期でも, それなりの酵素活性を持つため²⁷⁻³⁰⁾, 何かしらの反応値が得られるものとする。広範囲の細菌が保有するブドウ糖消費力や MTT-PMS 法の電子伝達力, Res の還元反応力が M. H. B の使用では 2 h 以内には引き出せなかった。その一要因として, 反応環境が適していないことが推測された。次の段階として Res を (色調が鮮やかで, 可視波長での測定が可能で, 菌発育に阻害がなく培地あるいは反応液に事前添加が可能などの理由から) 選択固定し, 菌還元酵素力が Res によって鋭敏にとらえられる環境設定 (新規反応液) に力を注いだ。考案した反応液は半合成のスルホンアミド試験溶液をもとに改良を加えたもので, 臓器エキスやカザミノ酸は用いていない。この新規反応液に Res を添加した呈色反応系は同じく Res を添加した M.

H. B の組合せでは得られなかった鋭敏性を示した。その感度は従来の方法が時間単位を必要とするのと異なり, 分単位で反応がとらえられ, また接種菌量に対応した酵素活性力を引き出させた。Lag-Time がほとんど認められない最少菌接種濃度は 10^6 CFU/ml 前半オーダーであり, これ以上になると O.D 測定限度を短時間内に越えてしまう。むしろ, 実験に際しては反応液を事前に 37°C に暖めておかななくては菌接種直後の反応活性はきわめて小さい。また, 薬剤感受性試験はいかなる方法にしろ接種菌量の影響を受ける^{1,24)}。迅速化を計るための一方法に接種菌濃度を上げる手段が考えられるが, MIC 値測定標準法^{26,31)}や頻用されるディスク拡散法との成績一致の面から, 新しい迅速法は接種菌濃度の問題を, まず対等にしなければならないと思われる。その菌濃度とは $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml ほどが頻用されているが, 今回検討の Res 呈法はこの菌濃度相当で短時間化が望めそうである。加えて, 接種菌は平板培地に 16~20 h 培養後に発育した集落をそのまま利用し, 微量プロスによる事前培養の手間が省略できる。日常の細菌検査が当面する一次分離平板上の集落と菌世代が同じであることから菌検出時点から即刻, 高感度で短時間の感受性試験が実施できるものと思われる。

Res 呈法が鋭敏で高感度になったのは新規反応液の組成内容, 硫酸アンモニウムやクエン酸ナトリウム, ブドウ糖, Mg^{2+} , Ca^{2+} などのバランスがとれたこともあるが, 大きな影響があったのは酵母エキスと Mg^{2+} イオンと, 特にビタミン K_3 の添加である。ビタミン K_3 は合成ビタミン K と呼ばれ, 天然に存在するビタミン K_1 , K_2 に比べると, 1 分子当たりの活

性は等しいが、重量当たりではビタミンK₃が最も活性が大きい³²⁾。ビタミンK₁は緑葉植物の光合成におけるリン酸化の必須要素であり³³⁾、動物組織でも同様の酸化リン酸化に必要な副成分の機能を有する³⁴⁾。3種のビタミンK₁、K₂、K₃およびきわめて近縁のキノン物質が動物肝細胞内ミトコンドリアの酸化リン酸化に重要な役割を演じている³⁴⁾。今回のRes呈法でのビタミンK₃の働きは、Crane³⁵⁾がキノン物質、Coenzyme Q (Ubiquinone=2,3-Dimethoxy-5-methylbenzoquinone)のC-6にPolyisoprenoid鎖がついたものが電子伝達系の最終段階で、おそらくは酸化リン酸化での電子運搬体としての働きがあると述べる。また、KANBE C³⁶⁾も*Pediococcus halophilus*の還元力としてのNADHデヒドロゲナーゼ活性の検討で本酵素はNADHに特異的で、電子受容体としてビタミンK₃添加で活性が上昇したとの報告などから推測すると、Res呈法におけるビタミンK₃の働きは電子運搬体として菌還元反応の助長を行い、指示薬のRes色調変化を増長したものと考えている。

一方、従来の方法では*C. albicans*や*S. pyogenes*は感受性測定にさいしては培地を変えたり、血液成分の添加が必要である³⁷⁻³⁹⁾。しかし、それは菌増殖を促すため、細菌細胞の酵素活性面から考えると、同じ内容組成の反応液で酵素活性はとらえられるはずである。今回の新規反応液では、この意図通り、*C. albicans*や*S. pyogenes*にも呈色が得られていた。特に、真菌に対する抗真菌剤感受性試験は、その使用培地の種類や培養時間の長さなど、手技が複雑であり³⁷⁾、標準となる測定法が確立されていない。この真菌用感受性試験面にも今回開発の呈色反応系が利用できればと考えている。次に、*Heamophilus*にはヘミンとNADH₂の添加が必要であるが、Res呈法は600 nmでの減少反応として測定するため、ヘミンによる反応液への色調干渉も大きな影響はなく測光可能であった。

以上、Res呈法は菌種により接種菌濃度に若干の違いはあるが、反応開始直後から菌酵素活性が捉えられるため、今までのオーバーナイト培養法では得られなかった短時間下の抗生物質や抗真菌剤の作用を簡便に見られる特徴を有する方法との期待がもてる。ただ、微量液体希釈標準法とまったく同じ接種菌濃度の 5.0×10^5 CFU/mlでは測定感度がやや低く、2~3hの増菌を待たなくてはならない。これでは本呈色法の特徴が半減し、真の迅速化がなされていないようにも感じられた。まだ基礎検討の域で、肝心の抗菌剤を添加した場合、薬剤作用により細菌のRes反応態度が

どう変化して出現するかは記していない。抗菌剤の細菌に対する作用は薬剤各々で異なり、複雑である。第二報にて薬剤添加時のRes呈法の詳細を報告したい。

文 献

- 1) Millicent C Goldschmidt: 微生物検査の機器化、自動化、微量化。グラッドウォール臨床検査学IV 微生物(松本慶造、本間守男 監訳)、医歯薬出版 216~269, 1985
- 2) 三輪谷俊男: 微生物に関する簡易・迅速検査法。臨床病理 37: 79~95, 1979
- 3) 坂崎利一、春田三佐夫、森地敏樹: 食品微生物検査の簡易化、自動化、迅速化。サイエンスフォーラム 11~23, 1985
- 4) 山根試久: 薬剤感受性試験の反省と将来展望(4) 自動化測定機器。臨床病理 36: 1268~1273, 1988
- 5) Thornsberry C: Automation and mechanization in antimicrobial susceptibility testing. Antibiotics Labo. Medicine, 2nd Edit. 151~158, 1985
- 6) Bartlette R C, Mazens M F: Rapid antimicrobial susceptibility test using tetrazolium reduction. Antimicrobial Agents Chemotherapy 15: 769~774, 1979
- 7) 外岡立人、松本隆任、今井 浩: ATP-Bioluminescence (Luciferase Assay) を利用した抗生物質感受性試験の試み 第一報: 従来法との比較。臨床と微生物 13: 499~504, 1986
- 8) 佐和 章、尾家重春、神代 昭: 細菌性酵素を利用した*E. coli*のMIC迅速測定へのアプローチ。山口医学 34: 399~402, 1985
- 9) Jackson J L, Mitchell R B: Use of hemoglobin indicator for rapid method of determining antibiotic sensitivity of microorganisms. Tesisas Rep. Biol. Med. 12: 171~172, 1954
- 10) 菅原和行: 薬剤感受性試験の反省と将来展望(3) ミクロブイオン希釈法。臨床病理 36: 1261~1267, 1988
- 11) 林智恵子、菅原和行、山口恵三: 薬剤感受性試験におけるグロースインジケーターについて。モダンメディア 36: 31~37, 1990
- 12) Van Noorden C: The involvement of superoxide anions in the nitro blue tetrazolium chloride reduction mediated by NADH and phenazine methosulfate. Anal Biochem. 175: 170~174, 1989
- 13) Aikoh H: Reduction of mercuric ion to metallic mercury in vitro by some enzymes. Okayama Univ. Science. 21: 25~32, 1985
- 14) Pesch K L, Simmert U: Milchw. Forsch. 8: 551, 1929
- 15) Maki Y, Yamamoto H, Takaesu Y, Sibuya M, Kinoshita Y, Asami K: A rapid caries activity test by resazurin disk. Bull Tokyo Dent Coll. 27: 1~13, 1986
- 16) 杉浦正士: 細菌検査の迅速化、ヘモグロビン還元デ

- イスク法。衛生検査 28: 1327~1331, 1979
- 17) Frederick S N, Karen K K, Luisa A B, Nanncy P C, Gail E S: Rapid and overnight microdilution antibiotic susceptibility testing with the sensitive break point autoreader system. J. Clin. Microbiol. 26: 1079~1084, 1988
 - 18) Chappelle E W, Levin G V: Use of the firely bioluminescent reaction for rapid detection and counting of bacteria. Biochem. Medicine. 2: 41~50, 1968
 - 19) Coudron P E, Ford J M, Datton H P.: Tetrarazorium reduction an aid for streptococcal growth detection with agar dilution susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. 18: 765, 1983
 - 20) 真木吉信, 山本秀樹, 松久保隆, 高江州義則, 渋谷むつみ: Resazurin disk 法によるう蝕活動迅速判定試験とう蝕発病の予測性。口腔衛生学会誌 34. 3: 208~214, 1984
 - 21) 真木吉信, 山本秀樹, 松久保隆, 高江州義則, 渋谷むつみ: Resazurin disk test 唾液によるう蝕活動迅速判定法。歯科学報 84: 369~371, 1984
 - 22) 内倉義宣, 戸坂俊一, 高橋建作, 奥村智信: う蝕活動試験について 第一報 MSBB 法, Cariostat 法, Resazurin-disk 法の比較検討。歯学 7: 682~693, 1989
 - 23) Otto L A, Pickett M J: A rapid method for identification of gram negative nonfermentative bacilli. J. Clin. Microbiol. 3: 566, 1977
 - 24) 三橋 進: 薬剤感受性測定法 薬剤耐性菌の理論と実際。講談社サイエンティフィック 79, 1980
 - 25) Trinder P: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with a alternative oxygen acceptor. Ann. Clin. Biochem. 6: 24, 1969
 - 26) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会: 微量液体希釈法による MIC 測定法。Chemotherapy 38: 103~105, 1990
 - 27) 上野一恵, 渡辺邦友: 新しい嫌気性菌同定キット (ABL システム) の評価。嫌気性菌感染症研究 261~269, 1988
 - 28) 三木寛治: 臨床微生物検査の迅速化 感染尿の簡易スクリーニング。衛生検査 37: 499, 1988
 - 29) 菅原和行: 臨床微生物検査の迅速化 酵素検出法。衛生検査 37: 488, 1988
 - 30) 高松厚志, 成田真奈美: *Escherichia coli* の迅速同定について。衛生検査 37: 584, 1988
 - 31) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
 - 32) Harold A Harper: ハーパー・生化学 (三浦義彰: 監訳), 丸善株式会社。93~94, 1971
 - 33) Anderson W W, Dallam R D: The effect of vitamin K1 on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria irradiated with ultraviolet light. J. Biol. Chem. 234: 409~411, 1959
 - 34) Beyer R E: The effect of ultraviolet light on mitochondria II Restoration of oxidative phosphorylation with vitamin k 1 after near ultraviolet treatment. J. Biol. Chem. 234: 688, 1959
 - 35) Crane F L, Hafezi Y, Lester R L, Widmer C: Isolation of quinone from beef heart mitochondria. Biochem. et biophys. acta 25: 220, 1957
 - 36) Kanbe C, Uchida K: NADH Dehydrogenase activity of *Pediococcus halophilus* as a factor determining its deducing force. Agric Biol Chem. 51: 507~514, 1987
 - 37) 山口英世: 抗真菌剤の感受性試験。検査と技術 17: 889~894, 1989
 - 38) Galgiani J N: Why not standardize antifungal susceptibility testing. Antimicrob. Newsl. 1: 40, 1984
 - 39) 杉浦 朗, 高山 保, 城野久美子: 微量液体希釈法による *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* および *B. catarrhalis* の抗菌薬に対する感受性測定用培地の検討と本法による臨床分離株の感受性分布。Chemotherapy 38: 1160~1170, 1990

NEW RAPID DRUG SUSCEPTIBILITY TESTS BASED ON MICROORGANISM ENZYME ACTIVITY

PART: 1 ESTABLISHMENT OF REACTION SOLUTION AND DETECTION SYSTEM

Hideyuki Kariyama

Department of Clinical Laboratory, Osaka Prefectural Rehabilitation Center Hospital,
4-3-1 Asahigaoka-Nakamachi, Sakai, Osaka, Japan

In order to speed up susceptibility tests, a new approach to the measurement method was investigated. The objective was to omit some of the culture procedures. I devised a special reaction mixture using a color indicator (resazurin) for bacterial enzyme activity as the index. This coloration system had a high sensitivity with no lag time, and was easily measured. Eight standard ATCC strains were tested using system, and the following results were obtained.

- 1) The intensity of resazurin coloration increased in proportion to the inoculum size. The sensitivity of the resazurin coloration method was tens to hundreds of times greater than that of turbidity elevation in M.H. Broth.
- 2) Vit. K₃ had a significant influence on the reducing activity of the microorganisms used in the present study.
- 3) A high sensitivity with no lag time was obtained for $3-5 \times 10^6$ CFU/ml inoculum size as well as for the bacterial autoanalyzer inoculum size.
- 4) The same intensity was obtained by *Candida albicans*, *Streptococcus pyogenes* as well as by *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* in the new color mixture solution.