

ヒト血中濃度動態下における抗菌薬の殺菌作用評価のための auto-simulation 装置についての検討

佐々木 繁¹⁾・西村 欣也¹⁾・吉田 勇¹⁾

宗 景 正¹⁾・今村 信彦¹⁾・伊藤 昌男²⁾

¹⁾ 塩野義製薬株式会社研究所神崎川分室*

²⁾ 同 製品部

(平成5年4月26日受付・平成5年6月23日受理)

抗菌薬の殺菌効果, 特に *in vitro* における time-kill curve をより生体内に近い条件下で調べることを目的として, 我々はマイクロコンピューター制御により自動的にヒト血中濃度推移をシミュレートできる装置, “Auto-simulator Shionogi (dilution type)” (AS 装置) を初めて考案作製した。AS 装置を使いこれまでに種々の抗菌薬の殺菌作用について検討してきた。実験を進める中で本装置使用に伴う問題点のあることが判り, その解決策等について検討した。

1) 従来の AS 装置の培地供給管ではその先端部に菌が局在し, その菌が徐々に培養槽に送り込まれることによってみかけ上の“再増殖”が見られる場合があった。これに対する対策として培地供給管の先端が培養液に接しない構造に改良し解決することができた。

2) AS 装置の培養槽内壁に付着した菌が培養途中に培養液中に入り込み, 異常な time-kill curve を生じることがあり, これを防ぐためには実験途中で高濃度の薬剤を含む培養液で, 培養槽の液面上方の内壁をリンスする方法が効果的であった。

3) 被験菌の中には AS 装置, 特にサンプリングチューブ内の培養液が滞留する部分に biofilm 様の菌の塊を生成する株が見られた。この場合には time-kill curve が乱れ, データに再現性が得られない結果となって反映された。

以上のように AS 装置使用時に種々の原因によって, time-kill curve に artifact が生じることがあるので, 得られた成績を解釈する際にはこのような点についても考慮すべきと考えられる。

Key words: *in vitro* auto-simulation, stepwise simulation, flomoxef, vancomycin, biofilm

In vitro における抗菌薬の殺菌効果を検討する方法としては, 従来から培地内で一定濃度の抗菌薬を作用し続けて生菌数変化を調べる, いわゆる一定濃度作用が採用されてきた。しかしヒトの体内において, 抗菌薬は投与後吸収, 代謝および排泄等によりその濃度は経時的に変化し, 同一濃度で維持されているわけではない。そこで我々は *in vitro* での殺菌効果検討をする際, 抗菌薬のヒト血中での濃度推移を培地中でシミュレートする方法として, 最初は段階的薬剤濃度調製法 (stepwise model) を採用した^{1,2)}。しかしこの方法は用手法で段階的に薬剤の濃度を変化させるため実際の血中濃度変化に近似していない点や, 操作の煩雑性の点で問題があった。この問題点を解決するために, マイクロコンピューター制御により自動的に血中濃度

推移を培養中で再現できる装置 “Auto-simulator Shionogi (dilution type)” (AS 装置) を初めて考案作製した³⁾。stepwise model 使用時と auto-simulator 使用時との比較検討等を行った後, 今日まで本装置を種々の抗菌薬の殺菌作用検討に使用してきた^{3,4)}。しかし, 実験を進める中で, 本装置使用に伴う問題点があることが判り, その解決策について検討を行ったので報告する。

I. 材料と方法

1) 使用薬剤

Cephalothin (CET), cephalixin (CEX), tobramycin (TOB), lomefloxacin (LFLX), fosfomycin (FOM), flomoxef (FMOX), vancomycin (VCM) のいずれも力価の明らかな原末を使用した。

* 豊中市二葉町3丁目1番1号

2) 使用菌株

Staphylococcus aureus No.1525, SR 5766, SR 5695, SR 3636, SR 6109, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, No.2506, A-106-186 を用いた。

3) 薬剤感受性試験

日本化学療法学会標準法に準じた。Mueller-Hinton broth (MHB, Difco) を用い 37°C 一夜培養した菌液を 10^8 CFU/ml に希釈し、マイクロプランターを用い、Mueller-Hinton agar (MHA, Difco) に接種し MIC を測定した。

4) 殺菌作用検討

(1) 一定濃度作用

37°C で 3~4 時間培養した対数増殖期の菌を用い、実験開始時の菌量が 10^8 CFU/ml となるように調整し使用した。培養は培地に MHB を用い 37°C で攪拌しながら行った。

(2) stepwise simulation 作用

被験菌液の調製は一定濃度作用と同様の方法で行った。培養は培地に Antibiotic Medium No.3 (ABM 3, Difco) broth を用い、37°C で攪拌しながら行った。培養中の薬剤濃度の段階的な調節は、0.5 または 1.0 時間毎に行い濃度を高くする場合は、高濃度の薬剤液を stepwise に添加し、逆に濃度を低下させる場合は培養液を所定量除去した後、所定量の新鮮培地を stepwise に加え調整した。

(3) auto-simulation 作用

ヒト血中濃度推移にシミュレートした濃度変化を培地中で再現できる装置 "Auto-simulator Shiongi (dilution type)" (AS 装置) を考案、作製した (Fig. 1)。本装置はあらかじめ入力された血中濃度動態パラメーター値をもとに、コンピューター制御によりポンプが駆動し自動的に培養槽中で血中濃度推移を再現し、さらに自動サンプラーによりあらかじめ指定した

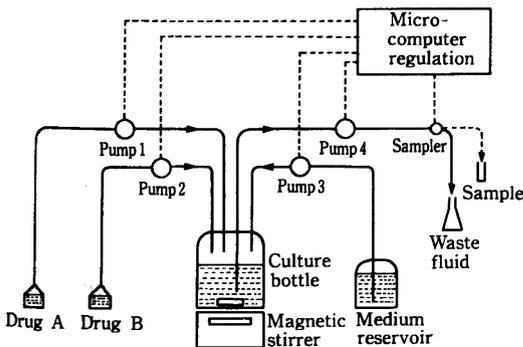


Fig. 1. Schema of Auto-simulator Shiongi.

時刻にサンプリングも行うことができる。得られたサンプルについて生菌数測定を行い培養槽中での生菌数変化を調べるものである。制御動作は 1 分毎に実行され、濃度変化の不連続は少なく連続モデルに近い精度となっている。本装置を用い auto-simulation 作用を行う場合の培地は ABM 3 broth または MHB を用いた。被験菌液の調製は一定濃度作用と同様の方法で行い、培養は 37°C で攪拌しながら行った。

II. 結果

1. stepwise simulation 作用と auto-simulation 作用の比較

(1) CET 作用時

注射剤 CET を 2g 1 時間点滴静注時のヒト血中濃度推移 (実測値) にシミュレートした濃度変化曲線およびそれより求めた段階的な濃度変化のグラフを

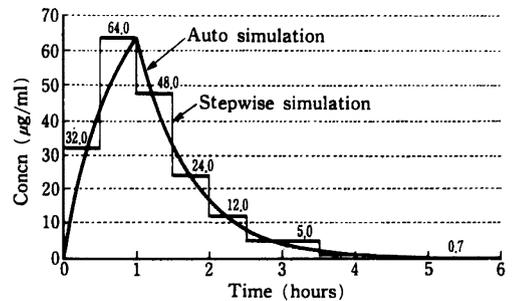


Fig. 2. Concentration time curve stepwisely or automatically simulated in serum of human administered 2 g of cephalothin in 1 hour by intravenous drip infusion.

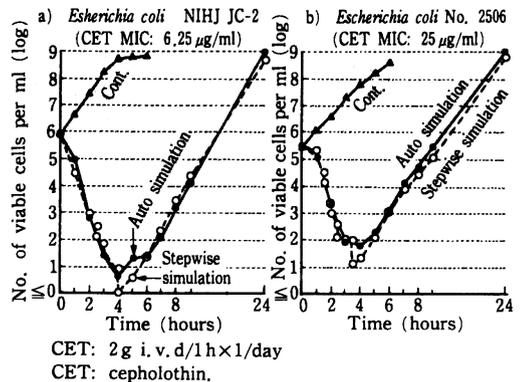


Fig. 3. Bactericidal activity of cephalothin against *Escherichia coli* in an *in vitro* model stepwisely or automatically simulated in human serum.

Fig. 2 に示した。 *E. coli* NIHJ JC-2 または *E. coli* No. 2506 に CET の stepwise simulation または auto-simulation 作用を行った際の生菌数変化を比較した (Fig. 3)。

E. coli NIHJ JC-2 (CET MIC; 6.25 $\mu\text{g/ml}$) では、両作用とも生菌数は作用後徐々に減少し 4 時間で 10^1 CFU/ml 以下となった。 *E. coli* No. 2506 (CET MIC; 25 $\mu\text{g/ml}$) では、両作用とも、生菌数は作用後徐々に減少し 3 時間で 10^2 CFU/ml 以下になったが、その後再増殖した。両株の生菌数変化の間には MIC を反映した差がみられた。またいずれの株の生菌数変化とも、stepwise simulation 作用と auto-simulation 作用との間に差は見られなかった。

(2) CEX 作用時

経口剤 CEX 250 mg を経口投与した場合のヒト血中濃度推移にシミュレートした濃度変化曲線およびそれより求めた段階的な濃度変化のグラフを Fig. 4 に

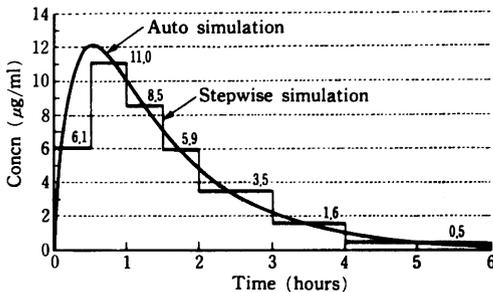


Fig. 4. Concentration time curve stepwisely or automatically simulated in serum of human orally administered 250 mg of cephalaxin.

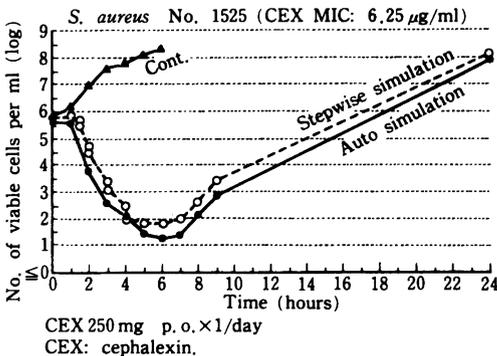


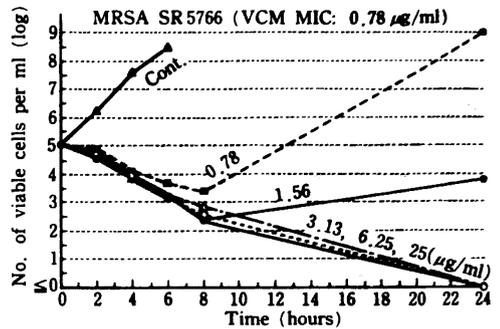
Fig. 5. Bactericidal activity of cephalaxin against *Staphylococcus aureus* No. 1525 in an *in vitro* model stepwisely or automatically simulated in human serum.

示した。また各々の simulation 作用を *S. aureus* No. 1525 に対して行った時の生菌数変化を調べた (Fig. 5)。両作用とも、作用後徐々に生菌数は減少し 6 時間では 10^2 CFU/ml 以下となり、生菌数変化パターンはほぼ同様であった。

2. 一定濃度作用と auto-simulation 作用の比較

メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) SR 5766 株に VCM の一定濃度作用を行った場合の殺菌曲線を Fig. 6 に示した。0.78 または 1.56 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で作用した場合には生菌数は作用後徐々に減少するがその後再増殖する傾向が見られたが、3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では減少し続け 24 時間後には検出限界以下となった。

SR 5766 株に、VCM 1 g 1 時間点滴静注時の血中濃度推移にシミュレートした auto-simulation 作用を行った場合の濃度変化を Fig. 7 に、生菌数変化を Fig. 8 にそれぞれ示した。接種菌量 10^8 , 10^7 CFU/ml



MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Fig. 6. Time-kill curve of vancomycin against MRSA SR 5766.

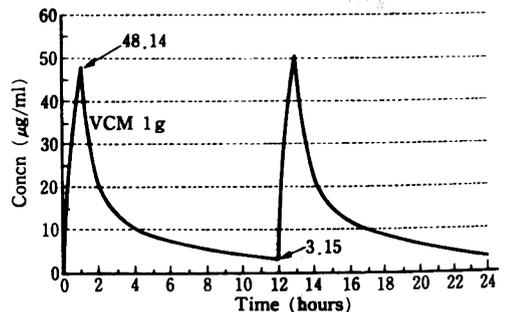


Fig. 7. Concentration time curve automatically simulated in serum of human administered 1 g of vancomycin by 1 hour intravenous drip infusion.

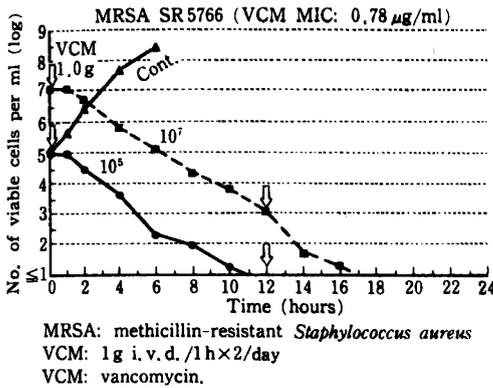


Fig. 8. Bactericidal activity of vancomycin against MRSA SR 5766 in an *in vitro* model automatically simulated in human serum.

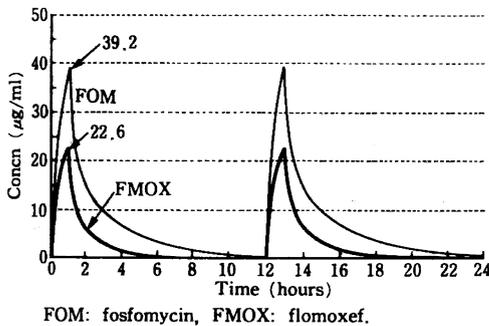


Fig. 9. Concentration time curve automatically simulated in serum of human administered 0.5 g flomoxef and 0.5 g fosfomycin by 1 hour intravenous drip infusion.

とも、生菌数は作用とともに減少し続け11時間または17時間後には検出限界以下となり、再増殖は見られなかった。

3. auto-simulation 作用における実験間の変動幅について

auto-simulation 作用時の生菌数変化データの実験間の変動幅について調べるために MRSA SR 5695 株に FMOX および FOM を 0.5 g 1 時間点滴静注 (12 時間 \times 2 回/日, 同時併用) 時にシミュレートした auto-simulation 作用を日を変え 3 回同様の方法で実験を行った。両剤の濃度変化を Fig. 9 に示すように制御しながら行った各実験時の生菌数変化を Fig. 10 に示した。1 回目作用後の生菌数の最大減少値, 12 時間後の生菌数, および 2 回目作用後の最大減少値は, 実験間で約 10 倍以上異なる場合のあることが示

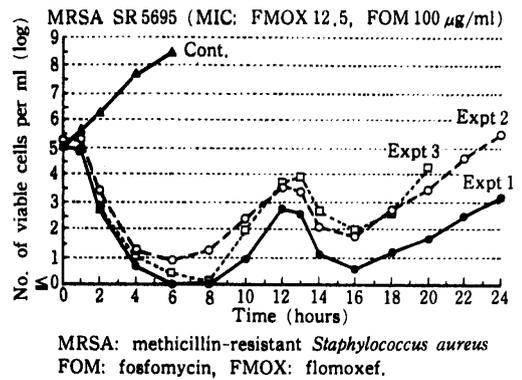


Fig. 10. Bactericidal activity of flomoxef and fosfomycin in simultaneous combination against MRSA SR 5695 in an *in vitro* model automatically simulated in human serum.

された。

4. AS 装置使用時の諸問題について

(1) 培地供給管内での菌の局在

E. coli NIHJ JC-2 株に, TOB (60 mg, 筋注) と LFLX (100 mg, 経口投与) を同時併用時にシミュレートした auto-simulation 作用を行う実験系において, 培養 2.5, 3.0, 3.5 時間後に培地供給管 (Fig. 11 a) 内から直接採取した試料と, 培養槽内からオートサンプラーによって採取された試料について生菌数測定を行った (Fig. 12)。培地供給管内の生菌数は培養槽のそれに比べ 10 倍, 11.2 倍, 4.4 倍といずれの時間においても多くなっていた。培地供給管内に菌が局在していることが判ったので, この問題を解消するために従来の培地供給管 (従来管) を, 培養液に接しないように短くカットし, さらに滴下時の培養液の飛散防止のために管を細くしたもの (改良管) に加工した (Fig. 11 b)。改良管と従来管を用い, *E. coli* NIHJ JC-2 と *E. coli* A-106-186 株に TOB と LFLX の同時併用時の auto-simulation 作用を行い生菌数変化を比較した (Fig. 13)。従来管を使用した場合には両株とも生菌数は 2 時間後までは減少しその後“再増殖”する結果となった。改良管を使用した場合には, 両株とも作用後生菌数は徐々に減少して, 3 または 7 時間後に検出限界以下となった。

(2) 菌の器壁への付着

MRSA SR 5766 株に, VCM を 1 g 1 時間点滴静注 (12 h \times 2 回/日) 時にシミュレートした auto-simulation 作用の実験系において, 培養 1 時間後に最高濃度の VCM (48.14 $\mu\text{g/ml}$) を含む培養液で, 培養槽

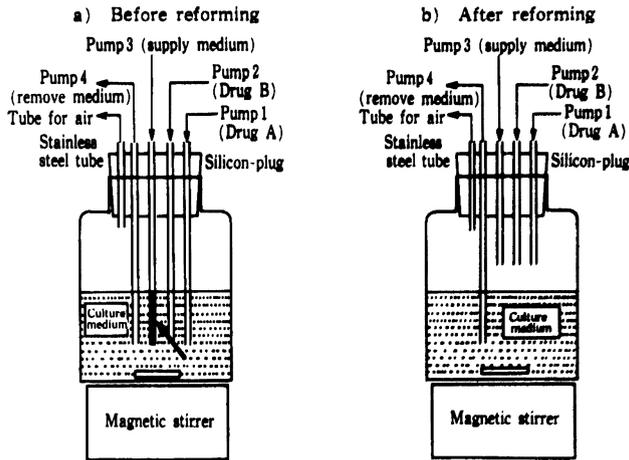


Fig. 11. Schema of culture bottle in Auto-simulator Shionogi. The part where an abnormally high density of bacteria appeared is indicated by the arrow.

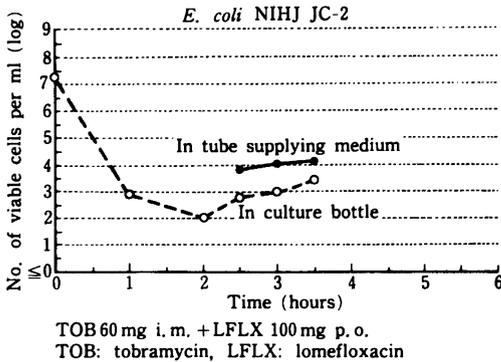


Fig. 12. Comparison of viable cells in culture bottle and in the tube supplying the medium.

の液面上方の内壁をリンスするという操作を加えた場合と加えない場合について生菌数変化を比較した (Fig. 14)。リンスを行った場合には作用後生菌数は徐々に減少 18 時間後には検出限界以下となったのに対し、リンス操作を行わない方は 18 時間以降に“再増殖”が認められた。

(3) biofilm の発生

① *S. aureus* SR 3636 株 (FMOX MIC; 1.56 μ g/ml) に対して FMOX 1 g 1 時間点滴静注 (12 h \times 1 回/日) 時にシミュレートした auto-simulation 作用を行った (Fig. 15)。生菌数は作用後減少し続け 6 時間後には検出限界以下となった。その後も菌は検出されなかったが、14 時間後に異常に高い増加率での菌

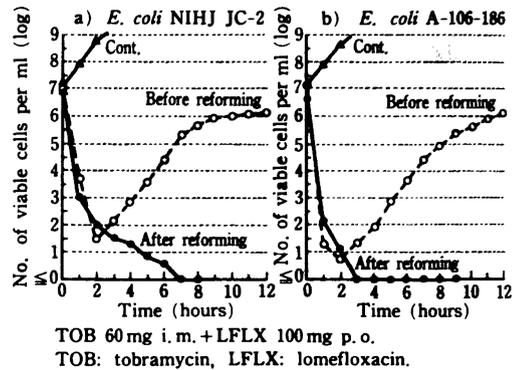


Fig. 13. Comparison of time-kill curves obtained before and after reforming the tube supplying the medium.

数上昇が見られその後も徐々に増加し続けた。しかし実験後、サンプリングチューブ内を観察すると局所にバイオフィーム様の菌の塊 (バイオフィーム) が生成しているのが認められた。同株を用いた再実験においてもバイオフィームの生成は再現された。

② *S. aureus* SR 6109 株 (FMOX MIC; 0.78 μ g/ml) に対して FMOX 1 g 1 時間点滴静注 (12 h \times 1 回/日) 時にシミュレートした auto-simulation 作用を同様に行った。この場合には、生菌数は作用とともに減少し 10^0 CFU/ml のオーダーが続き、14 時間以降から再増殖が見られたが、異常な菌数上昇はなく、

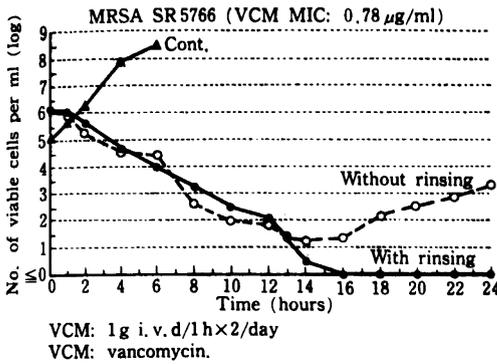


Fig. 14. Comparison of time-kill curves obtained from experiments with or without rinsing the inner surface of the culture bottle with medium containing a high concentration of antibiotics.

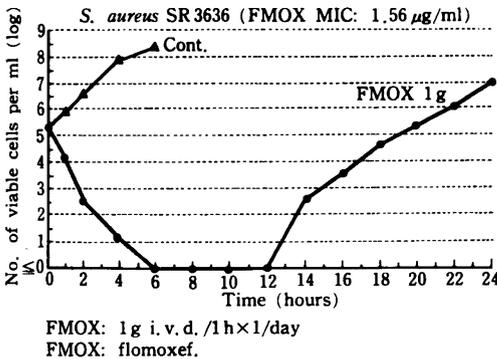


Fig. 15. Bactericidal activity of flomoxef against *Staphylococcus aureus* SR 3636 in an *in vitro* model automatically simulated in human serum.

またバイオフィルムの生成も観察されなかった。同時に FMOX 0.5g および 2.0g 作用についても同様に検討したが、0.5g 作用では再増殖が起こり 2g 作用では再増殖はなく、1.0g 作用の結果とあわせると作用 dose と生菌数変化との間には相関関係が見られた (Fig. 16)。

III. 考 察

In vitro における抗菌薬の殺菌効果 (time-kill curve) を、生体内により近づけた条件下で調べるためにこれまでに多くの努力がなされてきた。これらの中で抗菌薬の血中濃度推移にシミュレートしながら殺菌効果を検討する試みは村川ら⁵⁾、Randolph ら⁶⁾、

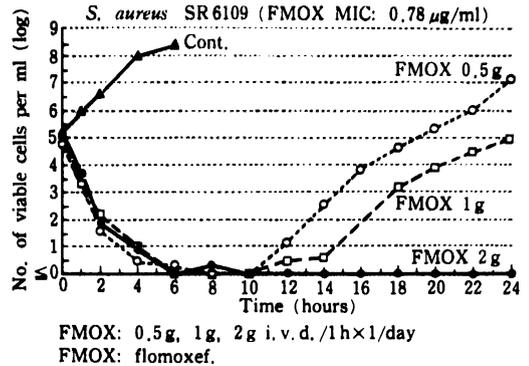


Fig. 16 Bactericidal activity of flomoxef against *Staphylococcus aureus* SR 6109 in an *in vitro* model automatically simulated in human serum.

Leitner ら⁷⁾ によってすでに報告されてきた。これらは血中濃度推移へのシミュレートは stepwise model で行っており、以前我々もこの方法で検討した^{1,2)}。しかしこの stepwise simulation は用手法で段階的に薬剤濃度を変化させる方法のため、実験精度や操作の煩雑性の点に問題があった。そこで我々はコンピューターによって自動的にかつ連続的にシミュレートできる装置、“Auto-simulator Shionogi (dilution type)” (AS 装置) を初めて考案作製した。次に CET または CEX を用い用手法による stepwise simulation 作用時と AS 装置使用による auto-simulation 作用時とについて殺菌作用成績を比較したが、いずれの薬剤の場合にも両作用方法間にほとんど差異は見られなかった。この結果、自動的に精度良く濃度制御できる AS 装置は実用可能と判断された。またその後 AS 装置には、夜間等の無人運転時に備え採取した試料を冷却保存できる装置も考案し追加装備している。

MRSA SR 5766 に VCM (1g) auto-simulation 作用した場合に生菌数は減少し続け再増殖は見られなかった。この場合 VCM は最低でも 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度が維持されており、一定濃度作用実験において 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上では再増殖は起こらなかった結果と一致していた。このように本実験においては、一定濃度作用成績が auto-simulation 作用成績に反映されており、両作用間に関連性が認められた。

auto-simulation 作用実験における実験間の変動幅については、培養後の各時点における生菌数は実験間で約 10 倍程差が開く場合が見られた。AS 装置の諸機能の精度には問題がないことより、実験間の変動は

主に被験菌側の因子によるものと考えられる。厳密な比較実験を行う場合には、同一の被験菌液を用い同時に複数の AS 装置を使用する必要がある。

auto-simulation 作用実験において、生菌数が徐々に減少した後に“再増殖”に急転する現象が時々見られた。この点について追求したところ培地供給管の先端部分（内径 2.84 mm 長さ 150 mm のステンレスチューブ）に菌が局在するために起こる artifact であることが判明した。培地供給管の先端部分は培養液に浸る構造となっていたが、この部分への薬液の拡散が不十分となり、そのため菌は増殖し培養槽内の他の部分に比べ高い菌濃度となったものと考えられた。培養開始後薬剤濃度が上昇している間は培地供給は行われず、ピークを過ぎると濃度を下げるために培地供給管から培地が 1 分毎に供給される。これに伴い管内の菌も槽内に流れ込むため、みかけ上の“再増殖”となるものと思われる。この現象は培地供給管を短くし培養液に浸らなくすることにより解決された。

auto-simulation 作用において、培地供給管の改良後も異常に早い速度での“再増殖”が発生した。この原因として実験開始時に菌液を培養槽内に接種する際、または培養開始時の攪拌の際の液面の変動によって菌が内壁に付着し、これが培養途中に培養液に入り込むことが考えられた。そこで MRSA に対する VCM の auto-simulation 作用実験において、培養 1 時間後に最高濃度の VCM を含む培養液で、培養槽の液面上方の内壁をリンスする操作を加えたところ“再増殖”は起こらなかった。これと同様の現象は、データには示していないが VCM の一定濃度作用の実験においても発生した。この場合には容器（フラスコ）を外側からバーナーで加熱することにより防ぐことができた。これらの現象は VCM の MRSA に対する殺菌作用は短時間では弱い⁴⁾ ことにより、VCM 作用時に特に顕著に現れたものと考えられるが、いずれの薬剤を使用する場合にも器壁への菌の付着には注意する必要がある。

MRSA SR 3636 株に FMOX を auto-simulation 作用した実験において、作用 12 時間から 14 時間の間に 400 倍に増加した。この株の倍加時間は約 27 分であり 2 時間では約 20 倍程度の増加と推定されるのでこの増加は異常と判断され、検討した結果サンプリングチューブ内にバイオフィーム様の菌の塊（バイオフィーム）の生成による artifact であることが判明した。これは FMOX 作用が 12 時間×1 回だけのため薬剤濃度が低くなった時点で、しかもサンプリングチューブの接続部で送液が滞留しやすい部分に菌の塊が生成し

たものである。またバイオフィームを作らない SR 6109 株に同様な作用を行った場合には、FMOX の作用 dose (0.5, 1.0, 2.0 g) に関連した生菌数変化成績が得られた。

以上のように auto-simulation 作用実験で得られた生菌数変化データの中に異常と判断される“再増殖”曲線が見られた時には artifact の可能性も考慮する必要があると考えられる。

次に本装置はいわゆる“dilution type”⁹⁻¹¹⁾ であり、薬剤濃度を低下させる場合に新鮮培地を追加するがこの時、培養液量を一定に保つために培養液の一部を除去せざるをえない。この時菌も同時に除去され、みかけ上の菌数減少が伴う。これに対する方策としては、除去液量をもとに補正計算を行うということが考えられるが、これは培地置換による影響等を無視したあくまでも計算上の値と考えられる。菌液が除去されるという点は“dilution type”にとって避けられない問題点であるが、auto-simulation 作用による成績は対照等との比較という点では意義のあるものと考えられる。dilution type 以外にも、メンブレンを利用し菌数を変えることなく薬剤濃度だけを変える方法も報告¹²⁾ されているが、薬剤の濃度変化は拡散に頼らざるを得ず、種々の濃度変化、特に急激な濃度変化を行う際には限界があるものと思われる。本装置使用に関する今後の課題としては、生体内により近づけるために、培地の代わりにヒト等の血液を用いる実験が挙げられる。血液使用に伴う諸問題、たとえば使用血液量を少なくするための実験系の縮小化や、血液添加による培地の粘性化に対する対策等について現在検討中である。

文 献

- 1) 加藤 博, 西村欣也, 永井修吾, 北井征二, 桑原佑一, 中村光男, 大西一也, 真山三賀雄, 伊藤昌男, 安田正俊: Cefalothin sodium の殺菌効果 (第 2 報) — Cefalothin sodium の血中濃度に 3 回 simulate した *in vitro* model system による *E. coli* 3 株の生菌数変化および感受性に関する population analysis 一。最新医学 35: 1887~1894, 1980
- 2) 加藤 博, 西村欣也, 永井修吾, 桑原佑一, 中村光男, 大西一也: Cefaclor の *in vitro* 殺菌効果。Chemotherapy 27 (S-7): 150~157, 1979
- 3) 園山高康, 西村欣也, 今村信彦, 樋口勝美, 伯田宏, 伊藤昌男, 安田正俊: *In vitro* における抗生物質の殺菌効果。基礎と臨床 18: 71~80, 1984
- 4) 坂元照男, 河合定雄, 土居義男, 相田佑次, 園山高康, 西村欣也, 松田繁雄, 伊藤昌男, 今川哲郎, 安田正俊, 飯田政明: Cefaclor 持続性製剤の設計。Jap. J. Antibiotics 38: 813~821, 1985

- 5) 村川武雄, 上村利明, 岡田直彦, 坂本 博, 横田好子, 西田 実: 生体内に simulate した *in vitro* model system における cephalosporin 類の殺菌作用。Chemotherapy 25: 585~590, 1977
- 6) Leitner F, Richard A G, Robert E B, Kenneth E R: Bactericidal activity of cefadroxil cephalixin, and cephadrine in an *in vitro* pharmacokinetic model. J. Antibiotics 32: 718~726, 1979
- 7) Randolph J A, Robert E B, Kenneth E R, Leitner F: Comparative bactericidal effect of ceforanide (BL-S 786) and five other cephalosporins in an *in vitro* pharmacokinetic model. J. Antibiotics 32: 727~733, 1979
- 8) Aoki Y, Kashiwagi H: Bactericidal activity of vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Chemotherapy 40: 997~1004, 1992
- 9) Grasso S, Meinardi G, Carneri I, Tamassia V: New *in vitro* model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. Antimicrob. Agents Chemother. 13: 570~576, 1978
- 10) Rustige C, Wiedermann B: Antibacterial activity of lomefloxacin in a pharmacokinetic *in vitro* model. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1107~1111, 1990
- 11) Wiedermann B, Jansen A: Antibacterial activity of cefpodoxime proxetil in a pharmacokinetic *in vitro* model. J. Antimicrob. Chemother. 26: 71~79, 1990
- 12) Mark W G, Kyle V, Tom A L, Jhon P T, Jhon C R: Assesment of effects of protein binding on daptomycin and vancomycin killing of *Staphylococcus aureus* by using an *in vitro* pharmacodynamic model. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1925~1931, 1990

Study of an auto-simulation apparatus for evaluating bactericidal activity of antibiotics in human serum

Shimaru Sasaki¹⁾, Kinnya Nishimura¹⁾, Isamu Yoshida¹⁾,
Tadashi Munekage¹⁾, Nobuhiko Imamura¹⁾
and Masao Ito²⁾

¹⁾Kanzakigawa Laboratory Shionogi Research Laboratories, Shionogi and Co., Ltd., 3-1-1
Futaba-cho, Toyonaka, Osaka 561, Japan

²⁾Market Development Department, Shionogi and Co., Ltd.

We devised the "Auto-simulator Shionogi" (AS apparatus) which uses a microcomputer to automatically regulate the concentration time curve to simulate that in human serum in order to evaluate the bactericidal activity of antibiotics under conditions closely resembling those in the human body. We have used the AS apparatus in conducting many experiments to evaluate the bactericidal activities of various antibiotics. We encountered some problems, but these were solved as described below.

1) An abnormally high density of bacteria occasionally appeared in the tube supplying the medium, which had its tip immersed in the medium of the culture bottle. These bacteria led to false "regrowth" in the time-kill curve. To prevent this problem, the tube tip was reformed so that it was not immersed in the medium.

2) During the auto-simulation experiment, bacteria that attached to the inner surface of the culture bottle were released into the culture medium, and abnormal time-kill curves resulted. To avoid this problem, the inner surface of the bottle was rinsed with culture medium containing a high concentration of antibiotics.

3) Some bacterial strains formed biofilm-like lumps in the sampling tube. When this occurred, random time-kill curves were obtained and the reproducibility of the data could not be assured.

In using the AS apparatus, the artifacts should be taken into consideration when interpreting the data obtained.