

液体培地法での、グラム陰性桿菌に対する aztreonam の MIC 測定におよぼすフィラメント形成の影響

古谷 利通¹⁾・外山 圭助¹⁾・増田 剛太²⁾・山口 剛²⁾

¹⁾東京医科大学第一内科*

²⁾都立駒込病院感染症科

(平成6年8月16日受付・平成7年2月20日受理)

Aztreonam (AZT) を液体培地内で、グラム陰性桿菌に作用させたところ、著明なフィラメント形成が見られ、最小発育阻止濃度 (MIC) 測定に大きな影響をおよぼした。使用菌種は、*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* で以下の成績を得た。

① Broth 法で見られた、試験管底に形成された白色沈殿物を生菌数増加によるものと考えて測定した MIC 値は、Agar 法での MIC に比べ著明な高値を示した。沈殿物はどの菌種についても観察された。

② 試験管底の沈殿物を顕微鏡的に観察すると、著明なフィラメント状となった菌体であった。

③ Broth 内における菌数計算を経時的に行ったところ、試験管底に沈殿物は存在するが、上清の混濁が見られない Broth 内では、菌数は増加しておらず、沈殿は、生菌数増加によるものではないことが確認された。

④ 試験管底の沈殿物がフィラメントであることを確認後、上清の混濁の有無のみを指標として Broth 法で MIC を求めると、沈殿物形成を混濁の一部として判定した場合に比べ、低値であり、Agar 法での MIC に近似した値となった。

以上より、Broth 法で AZT の MIC を求める際は、フィラメント形成によってできた沈殿物は生菌数増加による混濁と区別する必要があると考えられた。

Key words: aztreonam, Broth MIC, フィラメント

モノバクタム系抗生物質である aztreonam (AZT) は、グラム陰性桿菌に対して強い殺菌力を示し、多くの β -lactamase に対して安定である^{1,2)}。AZT の各種グラム陰性桿菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を寒天平板法 (Agar 法) と液体培地法 (Broth 法) で測定したところ、液体培地内では、菌が著明に伸長化し、Broth 法における MIC 測定に影響をおよぼすという成績を得たので報告する。

I. 材料と方法

1) 使用菌種および使用薬剤

使用菌種は駒込病院での臨床分離菌株で *Escherichia coli* 27 株, *Klebsiella pneumoniae* 27 株, *Enterobacter* spp. 27 株, *Serratia marcescens* 26 株, *Pseudomonas aeruginosa* 27 株である。これらのうち、microdilution method では、*E. coli* 11 株, *K. pneumoniae* 16 株, *Enterobacter* spp. 14 株, *S. marcescens* 19 株, *P. aeruginosa* 20 株を使用した。AZT の標準品は、エーザイ株式会社から分与を受けた。

2) 感受性測定法

前培養には Mueller-Hinton Broth (Difco) (以下 M-

H Broth) を用い、保存菌株を 37°C にて一夜培養し、実験を行った。

Agar 法による MIC は日本化学療法学会の感受性測定法に従った³⁾。感受性測定用寒天培地には、Mueller-Hinton Agar (Difco) (以下 M-H Agar) を用いた。接種菌液は、37°C にて一夜培養した菌液をリン酸緩衝液で約 10⁶ CFU/ml に希釈調整した。希釈菌液を、AZT の 2 倍希釈濃度系列を含む寒天平板にマイクロプランターで 5 μ l 接種し、37°C で 18 時間培養後、被験菌の発育の認められない最小濃度を MIC とした。

Broth 法での MIC 測定は、培地として M-H Broth を 1 ml 使用する macrodilution method (以下 Macro 法) と、M-H Broth を 0.1 ml 使用する microdilution method (以下 Micro 法) で行った。Macro 法では AZT の 2 倍希釈濃度系列を含む液体培地 1 ml に、約 10⁶ CFU/ml となるように被験菌を接種し、37°C で 18 時間培養後、被験菌の発育が肉眼的に認められない最小濃度を MIC とした。Micro 法には、96 穴のマイクロプレートを使用し、Macro 法と同様に、AZT の 2 倍希釈濃度

系列を含む液体培地 0.1 ml に、約 10^6 CFU/ml となるように被験菌を接種し、37°C で 18 時間培養した。Micro 法での MIC は、肉眼による菌液の混濁を指標とする方法と、吸光計 Dynatech MR 5000 を用い吸光度により測定する 2 つの方法で求めた。

3) 菌数計算

2 倍希釈系列の AZT を含む M-H Broth 3 ml に被験菌 (*S. marcescens*, *P. aeruginosa* の各々 1 株ずつ) を約 10^6 CFU/ml 接種する。37°C で培養し、0, 3, 6 および 24 時間後に培養菌液の一部を採り、生菌数を測定した。

II. 結 果

1) Agar 法での MIC

実験に用いた各菌株の Agar 法での MIC の分布を Table 1 に示す。*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* では MIC はすべて 0.78 μ g/ml 以下であった。*Enterobacter* spp. では、感受性の菌株 (0.025~0.39 μ g/ml) と、抵抗性の菌株 (6.25~50 μ g/ml) の 2 群に分

Table 1. Distribution of agar dilution MICs of aztreonam for clinical strains of selected gram-negative bacterial species

Organism (No. of strains)	MIC* (μ g/ml)														
	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50		
<i>E. coli</i> (27)			14	11	2										
<i>K. pneumoniae</i> (27)	3	4	18	2											
<i>Enterobacter</i> spp. (26)		5	5	8	2	1					1	1	2	1	
<i>S. marcescens</i> (27)		1	2	4	13	3	4								
<i>P. aeruginosa</i> (27)							1	3	5	12	6				

*Inoculum, 10^6 CFU/ml

Table 2. Comparison of agar dilution MICs with broth dilution MICs of aztreonam for clinical strains of selected gram-negative bacterial species

Organism (No. of strains)		MIC* (μ g/ml)															
		0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	>200
<i>E. coli</i> (27)	agar MIC			14	11	2											
	broth MIC			1	7	5	3	3	4	1			1	1			1
<i>K. pneumoniae</i> (27)	agar MIC	3	4	18	2												
	broth MIC						3	1		3	2	5	1	12			
<i>Enterobacter</i> spp. (26)	agar MIC		5	5	8	2	1				1	1	2	1			
	broth MIC		1	2	1	2		2					17		1		
<i>S. marcescens</i> (27)	agar MIC		1	2	4	13	3	4									
	broth MIC														3	21	3
<i>P. aeruginosa</i> (27)	agar MIC							1	3	5	12	6					
	broth MIC																27

*Inoculum, 10^6 CFU/ml

Broth MIC: Minimal aztreonam concentrations at which neither turbidity nor precipitation was observed.

かれている。*P. aeruginosa* では MIC は 0.78~12.5 μ g/ml と他の菌種に比べ高値であった。

2) Agar 法と Macro 法による MIC の比較

Agar 法と Macro 法での MIC の分布を Table 2 に示す。この際の Macro 法での MIC は、試験管底の沈殿物も、菌数増加による混濁の一部と考えて測定した成績である。その結果、Macro 法での MIC は、各菌種において、Agar 法での MIC 値よりも著しい高値を示した。特に、*S. marcescens*, *P. aeruginosa* でその傾向が強く、*S. marcescens* の Agar 法での MIC はすべて 0.78 μ g/ml 以下であったが、Macro 法では、100 μ g/ml のものが 3 株、200 μ g/ml のものが 21 株、200 μ g/ml 以上が 3 株と Agar 法とはかけはなれた結果が得られた。*P. aeruginosa* でも同様に、Agar 法での MIC は 0.78~12.5 μ g/ml だったが Macro 法での MIC は 27 株すべてで 200 μ g/ml 以上だった。

3) *S. marcescens* を AZT 0.2 μ g/ml の Broth 内で培養した時の写真を Fig. 1 に示す。上清に混濁はないが、試験管底に白色の沈殿物が認められる。

4) *S. marcescens* に AZT 0.2 μ g/ml を Broth 内で作用させた時に試験管底にできた白色の沈殿物を、グラム染色した時の顕微鏡写真を Fig. 2 に示す。これより、沈殿物は、菌が伸長化してできたフィラメントにより形成されていることが確認された。

5) 菌数計算 (Fig. 3)

S. marcescens, *P. aeruginosa* 両菌種とも、Broth 法での MIC 測定の際には 100 μ g/ml, 200 μ g/ml といった高濃度でも、沈殿物が見られたが、菌数を測定してみると *S. marcescens* では、0.2~12.5 μ g/ml では静菌的作用、25 μ g/ml 以上では殺菌的作用を示した。*P. aeruginosa* では、6.25 μ g/ml 以上では静菌的作用である。以上より、沈殿物は、菌数の増加により形成されたものではないことが確認された。

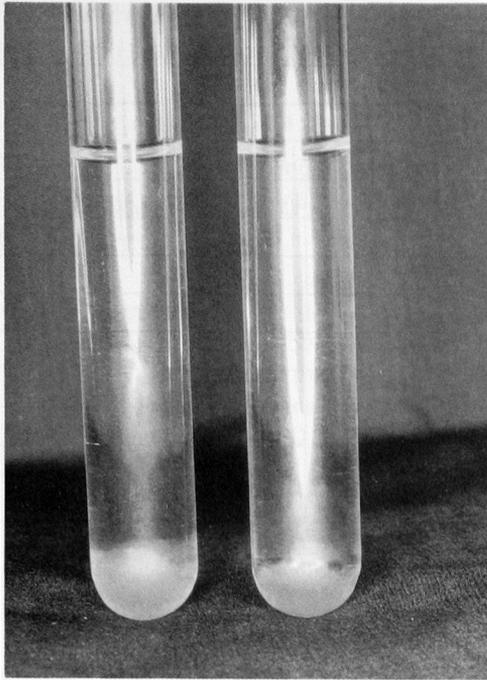


Fig. 1. Photograph of a test tube in which aztreonam acted on *Serratia* in the liquid medium. The supernatant was clear while precipitates were observed at the bottom.



Fig. 2. Light microscopic picture of gram-stained precipitates formed at the bottom of the test tube in which aztreonam acted on *Serratia* in the liquid medium. The cells were markedly elongated and formed filaments.

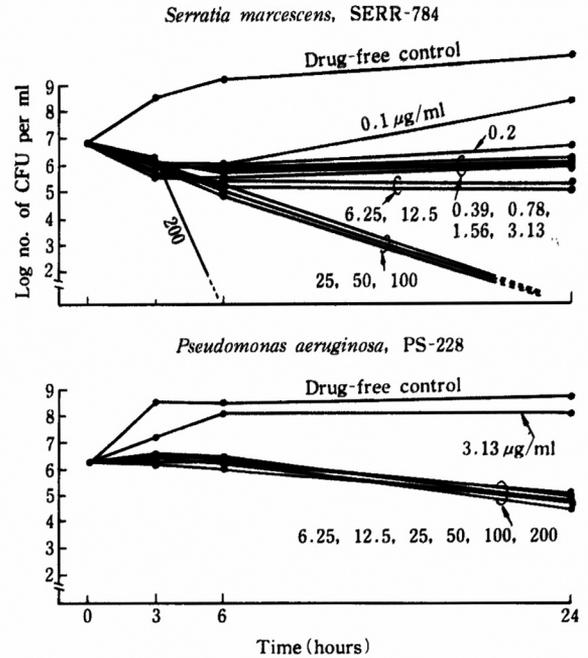


Fig. 3. Effect of aztreonam on clinical isolates of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* in the liquid medium.

Figs. 2, 3の結果より、試験管底の沈殿物は、菌数が増加したために形成されたものではなく、菌がフィラメントを形成し、巨大に成ったためにできたものであることが確認できた。

6) Macro法での試験管底の沈殿物はフィラメントであると確認できたので、Macro法でのMIC値の判定を、上清の混濁の有無のみを指標として行った結果をTable 3に示す。つまり、上清の混濁がまったく見られない最小の濃度をMICとした。その結果、Broth法でのMICは、試験管底の沈殿物もMICの判定の指標とした場合 (Table 2) に比べ低値となり、Agar法でのMICとほぼ同様の成績となった。

7) Micro法でのMIC

Micro法でも、Macro法と同様に菌の伸長化による白色の沈殿物の形成が見られ、肉眼的にMICを判定すると、Macro法と類似した成績が得られた。また、Micro法のうち、フィラメントを除外して、肉眼的に判定したMICと、吸光計により判定したMICとの比較をTable 4に示す。吸光計によるMICの方がやや低値に分布しているが、肉眼的判定のMICに近似の値を示している。

III. 考 察

AZTのグラム陰性桿菌に対するMICをAgar法とBroth法で測定したところ、両方法間で大きく異なった成績が得られた。この差異が、主として、液体培地内でAZT作用下に形成された、グラム陰性桿菌のフィラメント形成によるものであることが確認された。

Table 3. Comparison of agar dilution MICs with broth dilution MICs of aztreonam for clinical strains of selected gram-negative bacterial species

Organism (No. of strains)		MIC* ($\mu\text{g/ml}$)													
		0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
<i>E. coli</i> (27)	agar MIC			14	11	2									
	broth MIC			6	12	8	1								
<i>K. pneumoniae</i> (27)	agar MIC	3	4	18	2										
	broth MIC	17	2	4	4										
<i>Enterobacter</i> spp. (26)	agar MIC		5	5	8	2	1				1	1	2	1	
	broth MIC		6	8	3		1	1	2	1		3			1
<i>S. marcescens</i> (27)	agar MIC		1	2	4	13	3	4							
	broth MIC			1	6	10	3	5		2					
<i>P. aeruginosa</i> (27)	agar MIC							1	3	5	12	6			
	broth MIC							1	8	16	2				

*Inoculum, 10^6 CFU/ml

Broth MIC: Minimal aztreonam concentrations at which no turbidity of broth was observed with or without precipitation.

Table 4. Comparison of aztreonam MICs of microdilution method determined by two different methods for clinical strains of selected gram-negative bacterial species

Organism (No. of strains)			MIC* ($\mu\text{g/ml}$)												
			0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	
<i>E. coli</i> (11)	broth (micro)	MIC ^A)			6	2		1				2			
		MIC ^B)	3		5	2	1								
<i>K. pneumoniae</i> (16)	broth (micro)	MIC ^A)	1	5	6		3				1				
		MIC ^B)	5	2	5	1	3								
<i>Enterobacter</i> spp. (14)	broth (micro)	MIC ^A)		1	2		3	3			3	1	1		
		MIC ^B)			2	1	6	2	2	1					
<i>S. marcescens</i> (19)	broth (micro)	MIC ^A)					5	6	1		6				1
		MIC ^B)			1		16	2							
<i>P. aeruginosa</i> (20)	broth (micro)	MIC ^A)							1		9	10			
		MIC ^B)						2	9	5		1	3		

*Inoculum, 10^6 CFU/mlMIC^A): Minimal aztreonam concentrations at which no turbidity of broth was observed with or without precipitationMIC^B): Minimal aztreonam concentrations measured by optical density

E. coli, *P. aeruginosa* に AZT を作用させると、菌が著しく伸長化するという報告は、大槻ら⁴⁾によりなされている。横田らは⁵⁾, *E. coli*, *S. marcescens* は、PBP 3 に高い親和性を示すために隔壁合成が障害され、sub MIC の AZT 存在下に培養するとフィラメント化しているが、今回の我々の検討では、sub MIC だけでなく、MIC をはるかに上回る高濃度においてもフィラメント形成が見られた。また、臨床的にも、AZT を投与された患者の尿中の *E. coli* が、AZT の低濃度、高濃度いずれの場合にもフィラメントを形成するという報告もある⁶⁾。しかし、Broth 法での MIC 測定の際、菌が伸長化したフィラメントのために、MIC 測定が困難になるといった報告は見られない。また、今日、microdilution method よりも一般的に用いられることの多い microdilution method においても同様の結果が得られた。吸光計により microdilution method の MIC を

測定したところ、おおむねフィラメントを除外して判定した MIC と一致していた。このことより、吸光計を用いて MIC を測定すれば、たとえフィラメントによる沈殿物があっても、cut-off 値を適切にとれば、正確な MIC の測定が可能であることが示唆された。今回検討した 5 菌種すべてで、フィラメントの形成が見られたが、*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides bivius* でもフィラメント化が見られたという報告があり⁷⁾, Broth 法で AZT の MIC を測定する場合にはどの菌種においても、フィラメント形成に留意することが重要である。

Broth 法による MIC 測定は、Broth の混濁を菌数増加の指標としているわけであるが、AZT を用いた場合には、フィラメントの形成により、一見 Broth が混濁したように見えることがあることを、念頭に置いて、MIC を判定することが必要である。

なお、本論文の要旨は、第 41 回日本化学療法学会総

会 (1993年6月, 東京), 第40回日本化学療法学会東日本支部総会 (1993年10月, 青森) において発表した。

謝 辞

本研究に使用した各菌種菌株の, 分離, 同定にご協力頂いた, 都立駒込病院臨床検査科細菌検査室のスタッフに感謝いたします。

文 献

- 1) Fainstein V, Weaver S, Bodey G P: Comparative in vitro study of SQ 26, 776. *Antimicrob. Agents Chemother* 21: 294~298, 1982
- 2) Livermore D M, Williams J D: in vitro activity of the monobactam, SQ 26776, against gram-negative bacteria and its stability to their beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 8: 29~37, 1981
- 3) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 4) 大槻雅子, 後藤季美, 西野武志, 谷野輝男: Azthreonam (SQ 26, 776) に関する細菌学的評価。 *Chemotherapy* 33 (S-1): 54~73, 1985
- 5) 横田 健, 吉田玲子, 鈴木映子: Azthreonam (SQ 26, 776) の抗菌力, β -lactamase 安定性および補体と白血球との協力的殺菌作用。 *Chemotherapy* 33 (S-1): 14~23, 1985
- 6) Tsugaya M, Washida H, Sakagami, H, Iwase Y: Morphological studies of *Escherichia coli* in the urine of patients with acute simple cystitis treated with Azthreonam. *Acta Urol Jpn* 32: 1883~1886, 1986
- 7) 沢 赫代, 青木 誠, 武内美登利, 賀川和宜, 渡辺邦友, 上野一恵: Azthreonam (SQ 26, 776) の嫌気性菌に対する抗菌作用。 *Chemotherapy* 33 (S-1): 75~86, 1985

Effect of filament formation of gram-negative rods on MIC measurement of aztreonam by liquid culture method

Toshimichi Furuya¹⁾, Keisuke Toyama¹⁾, Gohta Masuda²⁾ and Tsuyoshi Yamaguchi²⁾

¹⁾First Department of Internal Medicine, Tokyo Medical College,
6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

²⁾Department of Infectious Disease, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital

When aztreonam (AZT) acted on gram-negative rods in liquid culture (1 ml macrodilution method and 0.1 ml microdilution method), remarkable filament formation was observed. This filament formation significantly affected the minimum inhibitory concentration (MIC) results obtained by a broth method. The strains used were *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa*, and the following results were obtained.

(1) Assuming that the precipitates formed in the test tubes by the broth dilution method were due to an increase in CFUs, the MICs were markedly higher than those obtained by the agar method. The precipitates were observed in a significant proportion of the strains.

(2) When the precipitates at the bottom of the test tube were microscopically examined, prominent filament formation was found.

(3) Cell counting in the broth was periodically performed, and it was found that the test tube in which precipitates were observed at the bottom but on turbidity was seen in the upper broth showed no increase in cell count. Thus, it was determined that the precipitates were not due to an increase in cell number.

(4) After confirming that the precipitates at the bottom of the test tube were filaments, MICs were measured by the broth method using only the turbidity of the supernatant as a marker. The value obtained was lower than that obtained including the precipitates, which was about the same as the MIC obtained by the agar method.

From the above results, it was found that when the MIC of AZT is measured by the broth method (macrodilution and microdilution method), the precipitates formed by filament formation should be excluded.