

5 菌の抗生物質感受性測定法としての濾紙法と感応錠との比較

淋菌及び連鎖球菌についての実験

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)
技師 大屋 正
技師 齋藤 富保

結核、淋疾或は赤痢等の治療に当り、これ等病原菌の抗生物質に対する感受性の低下即ち耐性は逐年的に強くなる傾向を示し治療上に少なからず影響を与えつつあることは周知の事実である。従つて患者の治療に際しその材料から分離した赤痢菌或はその他の病原菌等の抗生物質に対する感受性(耐性)を測定することが益々行われるようになった。

この測定法の一つとして簡便であつて比較的好結果を示すものとして最近広く用いられつつあるのは感応錠 Sensitivity tablet である。

予め平板培地の表面に新鮮培養の可検菌を一様に塗抹しておき、その上に感応錠を載せて培養し感応錠の周囲に發育する細菌の發育抑制帯即ち發育阻止帯の大きさ等によつてその薬剤に対する感受性(耐性度)を測定する方法である。

この方法は直接薬剤に対する感受性の程度を数量的に測定することはできないが操作が比較的簡便であり又特別な準備も必要としないし且つ短時間で結果を知り得る利点があるので臨床的な立場から漸次歓迎されてきた。

この感応錠に匹敵すべき簡易法として各研究室で自製し得る濾紙法がある。

なお、その他の測定法として培地を使う方法がある。菌の感受性を検しようとする抗生物質の一定量を液状⁽¹⁾～⁽⁴⁾或は固形培地^{(5)～(8)}に加えておいたものに菌を植えて培養し、菌の發育如何を以て測定する法である。これも結核菌・赤痢菌などの抗生物質耐性を検するために大いに使われている。

この方法は感受性(或は耐性)の度を数量的に測定し得る長所もつが、培地の製法とか操作が複雑であり、又結果を知るまでに長時間を要する短所がある。

著者は先に^{(9)～(10)}淋菌について感応錠を用い各種抗生物質に対する感受性を観察し既に報告したが、更に淋菌及び連鎖球菌について余等の考察せる濾紙法(製法は後述)を用いて感応錠との比較を試みその応用的価値について観察した。茲にその所見を報告する。

供試菌株: 街娼婦の膿より分離した淋菌31株⁽¹⁴⁾及び連鎖球菌(A型株、γ型株)で分離培養後継代10～20代以内のものを最も多く使用した。

使用培地: 肉汁1000c.c.にペプトン10g、寒天30gを加えて煮沸溶解し、これに葡萄糖20g、チスチン1gを加えてPH 7.5に反応修正、三角コルベンに分注した後(但し連鎖球菌用培地にはチスチンを加えず)100°C 30分間滅菌し用に臨み、これを溶解して、これに20%の割合に血清を加え平板となし孵卵器内で軽く乾燥させてから用いた。

1. 検査方法

イ. 培養法：淋菌は2%葡萄糖，0.1%チスチン加血液斜面寒天，連鎖球菌は血液加斜面寒天に夫々1～2日間培養し，その新鮮培養菌を約2c.c.の2%葡萄糖加ブイオンに1cc：2mgの割合に掻き採った菌液を白金耳で2滴宛平板培地に滴下し，コンラージ棒で一様に塗抹した後平板を2～3等分し，同一平板内に感応錠及び薬液を浸した濾紙を置き連鎖球菌は37°Cに24時間，淋菌は48時間（ローソク法で培養す）納め，その成績を判定した。

判定要領は⁽⁹⁾，⁽¹⁴⁾に準じ，両者共同一方法で行つた。

2. 濾紙法の濾紙の作り方

培地製造用厚手濾紙をコルクボーラで直径9mmの大きさに丸く切り取り，シャーレに入れて乾熱滅菌。これを次に述べる各薬液（サルファチアゾール，ストレプトマイシン，テラマイシン，ペニシリン）中にピンセットで狭んで投入し暫時浸した後取りあげて滅菌濾紙の表面に垂直に立てて片縁より水滴を軽く吸取り速かに平板面におく（以下B法と仮称42頁連鎖球菌についての実験参照）。

ハ. 薬液の作り方

サルファチアゾール：0.5gを蒸留水（PH7.5に修正）100ccに加え軽く煮沸溶解した後，冷却沈澱等を起さないうちに使用する。温度が低下すれば沈澱を生じ結晶が出来てくる。これは使用してはならない。

ペニシリン：瓶入りの結晶10万単位に滅菌蒸留水10ccを加えて振盪溶解し，これを予め丸く切つておいた滅菌濾紙をサルファチアゾールと同一方法で浸しその儘使用する。

なお，この液は保存に堪えないので，冷蔵庫に保存し一昼夜以内に使用しなければならない。

ストレプトマイシン及びテラマイシン：前者は一錠（50mg）を滅菌蒸留水5ccに，後者は1g（水溶性のものを使用する）を10ccに溶解し，これに濾紙を入れ以下上述の方法に準じて使用した。

実験成績

淋菌31株についての実験

ペニシリン：第1表に示す通り感応錠を使用した場合，その抑制価は平均19.6mmで，これを感受性の程度によつて分類すれば抵抗性を有するもの（0<15mm）が4例12.9%（この内1例は全く発育抑制環を認めず）。比較的抵抗性を有するもの（+=16～24mm）22株71.0%で両者を合算すれば26株83.9%において抵抗性を示した。可成の感受性を有するもの（++=25～29mm）は5株16.1%で最も感受性を有するもの（+++>30mm）は1例もなかつた。

これに対して濾紙法を使用した場合の平均抑制価は28.7mmであつた。即ちこれを感応錠に比較すれば9.1mm大である。

これは濾紙法の方が感応錠を用いた場合よりも感受性が更に鋭敏であり，菌の発育抑制環も亦大きく，従つて感応錠では測知出来ない抵抗性の強いもの（このようなものは感応錠では反応が現われないことが多い）でも濾紙法では知ることが出来た。

サルファチアゾール：感応錠では平均抑制価14.9mmで，3種の抗生物質中最も抵抗性を有し，発育抑制環の全く認められなかつたものが15例，比較的抵抗性を有するもの3例で，両者を合算すると18株58.1%が抵抗性を示した。可成の感受性を有するものは13株41.9%で最も感受性を有するものは1例もなかつた。

濾紙法では殆どすべてが抵抗性を有し，0>15mmのものが16株61.5%で，比較的抵抗性のものが9株34.6%で，両者を合算すればその程度において多少の差はあるが，96.1%において抵抗性を

第 I 表 淋菌の感応錠及び濾紙法による抗生物質に対する感受性の比較

菌株名	ペニシリン		サルファチアゾール		ストレプトマイシン		テラマイシン	
	感 応 錠	濾 紙 法	感 応 錠	濾 紙 法	感 応 錠	濾 紙 法	感 応 錠	濾 紙 法
1	0	-	31	16	31	30	23	37
2	19	26	0	0	31	28	28	27
3	18	26	31	0	34	30	22	25
4	15	21	0	0	23	36	23	33
5	22	24	0	0	31	30	31	33
6	20	26	23	0	27	25	31	28
7	20	30	36	21	19	20	41	30
8	13.5	36	26	16	26	25	31	26
9	27	26	0	0	7	6	33	33
10	21	-	23	-	24	25	28	-
11	6	-	0	-	30	28	21	-
12	26	36	31	18	5	-	33	35
13	25	21	0	0	27	27	35	30
14	28	31	0	0	11	12	28	32
15	19	31	0	0	35	30	31	28
16	16	26	23	11	31	26	28	24
17	22	31	27	8	26	-	29	23
18	24	31	0	0	9	27	31	35
19	19	21	0	0	31	24	27	30
20	26	31	0	0	41	35	61	-
21	24	33	0	0	31	25	35	32
22	19.5	33	27	16	31	23	34	26
23	19.5	36	44	23	51	32	44	26
24	18.5	31	0	0	11	30	28	35
25	23	31	25	16	28	30	30	21
26	20	28	0	0	11	15	27	29
27	18.5	21	0	0	26	25	25	21
28	21	30	25	25	26	22	28	25
29	23.5	-	36	-	47	-	41	-
30	18	-	26	-	19	-	27	-
31	16	-	27	-	25	-	26	-
例 数	31	25	31	26	31	26	31	25
平均抑制価	19.6	28.7	14.9	6.6	26.0	25.6	30.9	29.0

示し感応錠に比較して遙かに感応度は弱い。

これは、サルファチアゾールはペプトンを含む培地では感受性（発育阻止帯）が著しく阻止されると云う先人の報告にもある通り、平板面に表われた発育環は実際の抗生物質に対する感受性と相当の相違があるので、これを直ちに本剤の薬効との関係について批判することは出来ないが、現今のように淋疾の治療は単にスルファ剤のみによつて殆ど根治し難いと云われている点から考えれば、上述の成績は淋菌がスルファ剤に対して相当耐性になつてゐることを意味するものであらう。

ストレプトマイシン：感応錠では平均抑制価26mmで、サルファチアゾール、ペニシリンよりも感受性は鋭敏、テラマイシンより弱い（後述）。即ち最も感受性を有するものが13例41.9%、可成り感受性のあるものが8例25.8%で両者を合算すれば感受性菌は21例67.7%である。これに対して

抵抗性のものは（比較的抵抗性のものを含む）32.3%であつた。

濾紙法では平均抑制価は25.6mmで、これを感応錠に比較すれば、その差は僅かに0.3に過ぎず両者間に殆ど差は認められない。即ちこれを感受性の程度によつて分類すれば、抵抗性を有するもの（比較的抵抗性を含む）7例26.9%、感受性を有するもの（比較的感受性を含む）が19例73.1%で感応錠と大体一致した。

テラマイシン：感応錠の平均抑制価は31.9mmで上述サルファアチアゾール、ペニシリン、ストレプトマイシンに比較して何れよりも感受性が高く抵抗性を有するものは1例もなかつた。比較的抵抗性を有するものは4例12.9%で、その他は27例87.1%が何れも感受性を有している。

これに対して濾紙法では平均抑制価29mmで感応錠との差は僅かに1.9mmにすぎない。これを感受性の程度によつて分類すれば、比較的抵抗性のもの（抵抗性はない）が4例16%、感受性のもの（比較的感受性を含む）が21例84%で感応錠に比較すれば少々感受性は弱いが大體一致した。

連鎖球菌についての實驗

サルファアチアゾール：感応錠に対する平均抑制価は7.3mmで、その内訳は最も感受性及び比較的抵抗性を有するものが各2例、他は何れも抵抗菌（比較的抵抗性のものを含む）(87.5%)であつた。

濾紙法ではB法即ち既述の方法の外に、別のA法と比較した。

A法：抗生物質の液中に既述B法に準じて丸く切りとつた滅菌濾紙を浸した後、余分の抗生物質をとり除くために、その一端をピンセットで挟み、これを他の滅菌濾紙と濾紙との間に狭んで軽く触れて余剰の薬剤を吸取らせてから使用する方法である。

後に示す成績でわかるように濾紙法においてはA法よりもB法の方が優秀である。

その成績は平均抑制価（A法58頁第Ⅱ表中上段及び下段の数字を比較）4.2mm、B法4.7mmで、感応錠に比較して何れも弱く、抵抗菌のみであつた（第Ⅱ表1, 2, 3, 4参照）。これはサルファアチアゾールは水に極めて溶解度が低いか或は培地中にペプトンが含有しているために感応度の減少を來したのではないかと考えられた。それで続いてペプトンを加えない20%血清加培地を使用し、実験を反復してみたが殆ど大差がなかつた。

感応錠を用いた成績においても少数例ではあるが第Ⅱ表1, 2に示すように平均抑制価は7.3mmで大部分の菌株（87.5%）が抵抗性を有し濾紙法（B法）と略ぼ一致した。

以上の実験成績から推すと、余等が腔より分離した連鎖球菌は、その大部分がサルファ剤に対して抵抗性をもつていることが考えられる。従つて臨床的には腔より之等の連鎖球菌を完全に消失させるためにはサルファ剤のみに止らず、その他の薬剤との併用療法をも考へべきではなからうか。

ペニシリン：感応錠に対する平均抑制価は31.8mmで、その内訳は抵抗性を有するものが3例、比較的抵抗性を有するものが4例、可感受性を有するものが2例、大なる感受性を示すものが8例で、その比は抵抗菌7（41.1%）：感受性菌10（58.9%）であつた（第Ⅱ表1, 2参照）。

濾紙法では（A法）平均抑制価22.9mmで感応錠に比較すれば8.9mm弱く満足な結果は得られなかつた。

B法では平均抑制価31.4mmで殆ど感応錠に一致した。これを感受性の程度によつて分類すれば

比較的抵抗性を有するものが3例（抵抗性を有するものは1例もない）可成感受性を有するものが2例、最も感受性を有するものが9例で78.6%が感受性を有し総体的にみれば少々鋭敏である（第Ⅱ表1、4参照）。

ストレプトマイシン：感応錠の平均抑制値は18.4mmで濾紙法（A法）では15.8mmで2.6mm弱い。B法では18.5mmで殆ど感応錠に一致した（第Ⅱ表の1参照）。

第Ⅱ表の1 連鎖球菌の感応錠及び濾紙法による抗生物質に対する感受性の比較

菌 株	錠 劑	ペニシリン		サルファチアゾール		ストレプトマイシン		テラマイシン	
		錠劑法	濾紙法	錠劑法	濾紙法	錠劑法	濾紙法	錠劑法	濾紙法
γ 1	40	30	-	0	0	40	26	40	23
		44					33		28
β.E 2	15	14	0	0	0	11	9	13	15
		20					10		22
γ.E 3	50	45	0	0	0	15	26	16	28
		-					-		-
β.E 4	27	20	0	0	0	16	12	14	11
		31					19		12
γ 5	50	32	0	-	-	-	-	5	22
		36					-		26
γ 6	50	27	0	-	-	-	-	6	18
		50					-		30
γ 7	-	-	-	-	12	11	10	6	6
		-					10		14
β.E 8	17	20	0	0	0	13	19	12	10
		30					-		12
γ 12	25	18	16	13	15	18	21	9	16
		30					15		-
γ 13	53	20	16	8	8	12	20	21	14
		-					8		14
β 14	11	21	0	0	0	8	12	12	10
		36					0		12
γ 16	16	21	0	0	0	14	21	17	12
		-					0		20
γ 18	55	32	50	19	18	-	-	8	16
		35					18		20
γ 21	50	22	34	11	20	23	18	21	16
		33					20		35
γ 24	-	24	-	-	-	-	9	-	24
		-					-		24
γ 26	-	-	-	-	-	20	13	18	20
		-					-		22
γ 31	20	15	0	0	0	15	11	11	9
		26					0		14
β.E 43	17	15	0	0	0	10	9	16	16
		20					0		12
γ 45	40	19	0	0	0	12	14	11	21
		26					0		16
β.E 49	15	18	0	-	-	11	10	11	14
		22					-		16
例 数	17	18	16	15	15	16	17	19	20
		14					15		12
平均抑制値	31.8	22.9	7.3	4.2	4.7	18.4	15.8	14.1	16.5
		31.4					4.7		18.5

表中 (1) 濾紙法欄において上段に記載しあるはA法、下段はB法の成績を意味する。

(2) β.Eとあるはβ型腸球菌、γとあるはγ型連鎖球菌を意味する。

これを感受性の程度によつて分類すれば、感応錠では抵抗性を有するものが11株68.7%，比較的抵抗性を有するものが4例25%で両者を合算すれば93.7%が抵抗菌で最も感受性のものは僅か1例であつた（第Ⅱ表の1，2参照）。

これに対し濾紙法では（A法）抵抗性のものが52.9%，比較的抵抗性を有するものが35.3%で両者を合せて88.2%が抵抗性を有し，比較的感受性のものが11.8%で最も感受性のものは1例もなかつた（第Ⅱ表の3参照）。

B法では抵抗性のものが33.3%，比較的抵抗性のものが50%で両者を合せれば83.3%，その他最も感受性のものが2例で感応錠に比較して少々鋭敏である（第Ⅱ表の4参照）。

テラマイシン：感応錠の平均抑制価は14.1mm，濾紙法ではA法が16.5mm，B法では19.3mmで感応錠に比較して何れも1.6mm～5.2mm感受性が鋭敏である（第Ⅱ表の1参照）。即ち感応錠では抵抗性のものが19株中12例（63.2%），比較的抵抗性のものが6例（31.6%）で両者を合算すれば94.8%を示し，感受性のものは僅かに1例しかない（第Ⅱ表の2参照）。

濾紙法ではA法では抵抗性のものが8例（40.0%）比較的抵抗性のものが11例（55.0%）両者を合算すれば95.0%が抵抗菌で，殆ど感応錠に一致した。

B法では感受性は少々強く抵抗性が36.8%，比較的抵抗性のものが42.1%両者を合せて78.9%でかなり感受性のものが15.8%，最も感受性が1例であり，両者とも感応錠に比較して感受性は鋭敏

第Ⅱ表の2 連鎖球菌の感応錠を以て行つた抗生物質に対する感受性

感 応 錠 发育抑制価	サルファ チアゾール		ペニシリン		ストレプト マイシン		テラマイシン	
	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
+++>30mm 最も感受性	2	12.5	8	47.1	1	6.3	1	5.2
++25~29mm 可成感受性	0	0	2	11.8	0	0	0	0
+16~24mm 比較的抵抗性	2	12.5	4	23.5	4	25.0	6	31.6
○≤15mm 抵 抗 性	12	75.0	3	17.6	1	68.7	12	63.2

第Ⅱ表の3 連鎖球菌の濾紙法（A法）を以て行つた抗生物質に対する感受性

濾紙法（A法） 发育抑制価	サルファ チアゾール		ペニシリン		ストレプト マイシン		テラマイシン	
	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
+++>30mm 最も感受性	0	0	4	22.2	0	0	0	0
++25~29mm 可成感受性	0	0	1	5.6	2	11.8	1	5.0
+16~24mm 比較的感受性	1	6.7	10	55.5	6	35.3	11	55.0
○≤15mm 抵 抗 性	14	93.3	3	16.7	9	52.9	8	40.0

第Ⅱ表の4 連鎖球菌の濾紙法（B法）を以て行つた抗生物質に対する感受性

濾紙法（B法） 发育抑制価	サルファ チアゾール		ペニシリン		ストレプト マイシン		テラマイシン	
	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
+++>30mm 最も感受性	0	0	9	64.3	2	16.7	1	5.3
++25~29mm 可成感受性	0	0	2	14.3	0	0	3	15.8
+16~24mm 比較的抵抗性	2	13.3	3	21.4	6	50.0	8	42.1
○≤15mm 抵 抗 性	13	86.7	0	0	4	33.3	7	36.8

である（第Ⅱ表の3, 4参照）。

上述の成績からみればテラマイシンにおいては感応錠で測知することの出来ない相当強い抵抗菌でも濾紙法（B法）によれば或る程度知ることが出来る。

綜 括 及 び 結 論

抗生物質に対する感受性（耐性）を測知する方法として最近感応錠が益々応用されつゝあるが濾紙法を用いて行つた報告は殆どなく、殊に両者の比較を試みたものはない。

著者は街娼婦の膣より分離した淋菌及び連鎖球菌について自家製による濾紙法を用い感応錠とこれを比較し、その利用的価値について検討し、併せてこれ等菌種の各抗生物質に対する感受性の態度について観察した。その成績を概括すれば次のようである。

1. 淋 菌；平均発育抑制価はペニシリンでは感応錠19.6mm：濾紙法28.7mm（B法58頁参照）サルファチアゾールでは14.9mm：6.6mm， ストレプトマイシンでは26.0mm：25.6mm， テラマイシンでは30.9mm：29mmで、ペニシリンにおいては濾紙法の方が感応錠より感応度も強く、従つて発育抑制環も亦大である。ストレプトマイシン， テラマイシンでは感応錠を使用した場合も濾紙法の場合も略一致した成績を示した。サルファチアゾールでは濾紙法は感応錠に比較して感応度が遙かに弱い。

2. 連鎖球菌；感応錠と濾紙法の平均抑制価を比較するにペニシリンでは感応錠31.8mm：濾紙法22.9mm（A法57頁参照）， B法では31.4mm， サルファチアゾールでは7.3mm：4.2mm（A法）—4.7mm（B法）であつた。

ストレプトマイシンでは18.4mm：15.8mm（A法）—18.5mm（B法）， テラマイシンでは14.1mm：16.5mm（A法）—19.3mm（B法）。即ちペニシリン及びストレプトマイシンにおいては濾紙法（B法）と感応錠とは殆ど一致した。サルファチアゾールでは感応錠より濾紙法の方が感応度が弱く、従つて発育抑制環も亦小さい。

テラマイシンではA法， B法何れも濾紙法の方が遙かに感応度が強く鋭敏である。このことは感応錠で測知し得ない感受性の少々低下した比較的耐性菌でも濾紙法ではこれを知ることができる。

以上濾紙法：感応錠による抗生物質に対する感受性の態度を比較するに、サルファチアゾールを除き他のペニシリン， ストレプトマイシン， テラマイシンでは自家製の濾紙法を使用し充分価値あるものとする。

3. 次に淋菌と連鎖球菌の抗生物質に対する感受性（耐性）について、以上の成績から、特に臨床的即ち治療的の立場から考察してみると、淋菌はサルファチアゾールに対しては感受性が著しく低下し（時には全く喪失）している。これによつて淋疾は現今サルファ剤のみの単独療法では期待した効果は望み難いことがわかる。ペニシリンに対して淋菌は感受性は相当低下しているが、なお薬効は認められ、ストレプトマイシン， テラマイシンは効果極めて顕著なることが認められた。

連鎖球菌；街娼婦の膣内に生存する大部分の菌株が感受性を有するが、なお感応錠では41.1%濾紙法（B法）では21.4%の抵抗性を有する（耐性）菌を認めた。ストレプトマイシン， テラマイシンに対してはサルファチアゾールに次で感受性は弱い。これは膣内に生存する連鎖球菌はこれ等の抗生物質に対して比較的抵抗性の強いγ型連鎖球菌或は腸球菌が多いことも考えられるが（後日膣

より分離した連鎖球菌について報告), 斯くの如く抗生剤に対して感受性の弱い即ち耐性菌が相当多数認められたことは臨床的な立場からみて注目すべきことである。

文 献

1. 福見秀雄, 総合医学 昭和23年 5巻 477頁
2. " 化学療法とホルモン療法 昭和24年 2巻 57頁
3. 秋葉朝一郎 " 昭和23年 1巻 54頁
4. 落合国太郎他, 日本臨床 昭和26年 9巻 7号 593頁
5. 小川, 長田, 日本細菌学雑誌 8巻 特別号 489頁 28年
6. 後 藤, 総合臨床 2巻 5号 19頁 昭和28年
7. 柳沢謙, 日本医事新報 第1516号 昭和28年5月
8. 福見, 小酒井, 小張, 日本医事新報 第1513号 昭和28年
9. 高原, 大屋, 齋藤, 北海道産科婦人科学会々誌 第4巻 第2号 昭和28年6月
10. 大屋, 齋藤, 中川, 国立公衆衛生院同窓協議会 細菌病理検査部会々報 第1巻 昭和28年6月
11. 長谷川, 浅野, 齋藤, 海波, 治療 34巻 10号 昭和27年10月 87頁
12. 安齊, 中尾, 森, 札幌医学雑誌 第4巻 3号 昭和28年6月
13. 羽田止一 薬局 昭和27年 3巻 11号 873頁
14. 大屋, 齋藤, 中川, 北海道立衛生研究所報 第5号 昭和29年3月 33頁
15. 東京田辺製薬株式会社 細菌感受性試験例(感応錠 Scnsitivity Tablets) 文献集 昭和28年~29年
16. 市 川, 東京医事新報 昭和25年 11巻 67頁
17. 徳 永, 性病 昭和27年 37巻 4号
18. 秋 葉, 性病 昭和27年 37巻 5号