

# 細菌の薬剤耐性に関する研究

## 第 12 報

### 腸内細菌を用いての実験

#### 第 1 編 薬剤の管内抗菌作用について

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

村 上 康 正

（受付：昭和34年3月20日）

## 緒 言

Sulfamin および Penicillin の発見に端を発し各種の化学療法剤あるいは抗生剤が相次いで発見されるや感染症の治療は長足の進歩をとげたが、その反面細菌のこれら薬剤に対する耐性化が重大な問題となり、その対策が大きくなりあげられるようになってきた。すなわち薬剤耐性菌に対する新しい化学療法剤の追及が行われる一方、耐性菌の出現を阻止または遅延せしめ

る手段の探究が目下の重要な課題となつていゝる。そこで私は腸内細菌を用い試験管内において各種薬剤の併用がいかに薬剤耐性化に影響するかの一連の実験を行うにあたり、まずこれらの薬剤単独の抗菌作用を知る目的で各種薬剤の菌発育阻止濃度ならびに殺菌に要する濃度と時間の関係について観察したのでその成績を報告する。

## 実 験 方 法

### 1. 供試薬剤

Dihydrostreptomycin (SM) 三共、硫酸塩  
Chloromycetin (CM) 三共、末  
Aureomycin (AM) Lederle、可溶錠  
Terramycin (TM) Pfizer、溶性錠  
Penicillin (Pc) 武田薬品、Gカリウム  
Guanofuracin (GF) 富山化学、末  
Sulzol (Sul) 吉富製薬、20%注射薬  
para-Aminosalicylic acid (PAS) 第一製薬、末  
Isonicotinic acid hydrazide (INAH) 田辺製薬、末  
Phenol (Ph) Merck

SM は 1 gm を 4 ml の滅菌蒸留水に溶解 (200,000

r/ml), CM, AM, TM および GF は各 50 mg を 10 ml の滅菌蒸留水に溶解 (5,000r/ml), Pc は 10 万単位を 5 ml の滅菌蒸留水に溶解 (2 万単位/ml), PAS および INAH は各 3,000 mg を 30ml の滅菌蒸留水に溶解 (100,000r/ml), Ph は 2,500mg を 50 ml の滅菌蒸留水に溶解 (50,000r/ml) して原液とし、Sul は上記の注射薬を原液とした。

### 2. 供試菌株および菌液

金沢大学医学部微生物学教室より分与された *Salmonella paratyphi B* (8006) (*Salm. paraty. B*) および *Shigella flexneri* 2a (駒込 B<sub>III</sub> 原株) (*Shig. flex. 2a*) を用い、その 1 白金耳をペプトン水培地 10 ml に浮遊し 37°C、20 時間培養後の菌液を使用した。

\* 合成培地処方  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.5gm,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.35gm,  $\text{NaCl}$  5.0gm,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1gm, Glucose 1.0mg, Nicotinamid 2~10mg, Tryptophan 5~10mg, カゼイン水解アミノ酸 2.0gm, Vitamin B<sub>1</sub> 10mg, 以上を水 1,000ml に溶解 pH 7.0~7.2 とする。

### 3. 供試培地ならびに培養法

培地はペプトン水培地 (pH 7.2) (Sul 供試の場合には全実験を通じ無蛋白合成液体培地\*<sup>1)</sup>) および普通寒天培地 (pH 7.2) を使用した。

上記ペプトン水培地 2 ml をもって各種薬剤を通減的に希釈したそれぞれの単独系列に、前記ペプトン水培養菌液を 1 白金耳ずつ接種して 37°C, 48 時間培養後、混濁度の肉眼的観察によつて菌最小発育阻止濃度

を判定した。

ついで各種薬剤をその菌最小発育阻止濃度より高濃度に含有する 3 段階のペプトン水培地 10 ml に前記ペプトン水培養菌液 0.05 ml ずつを接種して 37°C に保ち、一定時間ごとにその 0.1 ml をペプトン水培地 10 ml に移植するとともに、更にまた 0.1 ml を普通寒天培地に混和し平板培養し、両方法により殺菌に要する各種薬剤の濃度と時間について検討した。

## 実 験 成 績

### 〔Ⅰ〕 各種薬剤の菌最小発育阻止濃度：

第 1 表に一括した。すなわち *Salm. paraty. B* に対する最小発育阻止濃度は SM 100  $\gamma$ /ml, CM 5  $\gamma$ /ml, AM 10  $\gamma$ /ml, TM 5  $\gamma$ /ml, Pc 10 u./ml, GF 25  $\gamma$ /ml, Sul 5,000  $\gamma$ /ml, PAS 25,000  $\gamma$ /ml, INAH 5,000  $\gamma$ /ml, Ph 2,500  $\gamma$ /ml であり, *Shig. flex. 2a* に対しては SM 5  $\gamma$ /ml, CM 1  $\gamma$ /ml, AM 10  $\gamma$ /ml, TM 5  $\gamma$ /ml, Pc 50 u./ml, GF 5  $\gamma$ /l, Sul 25  $\gamma$ /ml, PAS 10,000  $\gamma$ /ml, INAH 10,000  $\gamma$ /ml, Ph 2,500  $\gamma$ /ml であつた。

### 〔Ⅱ〕 各種薬剤の殺菌濃度と所要時間：

第 2 表 (A, B) に示した。この表から明らかに、一定濃度の薬剤を含有するペプトン水培地に移植された菌が死に至るまでの時間については、ペプトン水培養で観察した場合と寒天平板培養で観察した場合では必ずしも一致し

た結果が得られなかつたが、殺菌までの所要時間の長い方をとつた。

そのうち最小殺菌濃度と所要時間との関係をみると, *Salm. paraty. B* に対しては SM 500  $\gamma$ /ml 24 時間, CM 500  $\gamma$ /ml 24 時間, AM 250  $\gamma$ /ml 48 時間, TM 250  $\gamma$ /ml 48 時間, Pc 500 u./ml 24 時間, GF 250  $\gamma$ /ml 12 時間, Sul 25,000  $\gamma$ /ml 48 時間, Ph 5,000  $\gamma$ /ml 4 時間であつたが PAS および INAH は 50,000  $\gamma$ /ml 72 時間にも殺菌能力は認められなかつた。また *Shig. flex. 2a* に対しては SM 100  $\gamma$ /ml 24 時間, CM 100  $\gamma$ /ml 24 時間, AM 250  $\gamma$ /ml 12 時間, TM 50  $\gamma$ /ml 12 時間, Pc 2,500 u./ml 24 時間, GF 100  $\gamma$ /ml 24 時間, INAH 50,000  $\gamma$ /ml 72 時間, Ph 5,000  $\gamma$ /ml 4 時間であつたが, Sul 500  $\gamma$ /ml および PAS 50,000  $\gamma$ /ml では 72 時間にも殺菌能力は認められなかつた。

## 考 案

一般に化学療法剤では菌最小発育阻止濃度と最小殺菌濃度との差異は小さいが、抗生剤では一様でない。石山<sup>2)</sup>はブドー球菌について Pc と SM は一定濃度以上では明らかに殺菌力がある点できわめて相似た性質を示しており、ただ Pc には最適殺菌濃度ともいふべき限界があつてそれ以上濃度を限りなく高めても一層有効であるということがないのに比し、SM は濃度を高めれば高めるほどいよいよ菌滅数効果が著しい点で相違しているが、これに反して AM, CM,

TM の抗菌作用はかなり高濃度でもほとんど静菌的でわずかに菌滅数なのであつて、Pc, SM とは著しくその様相を異にしていると論じている。しかし腸内細菌を用いた本実験においても *Salm. paraty. B* に対する SM の最小発育阻止濃度は 100  $\gamma$ /ml, 最小殺菌濃度は 500  $\gamma$ /ml (24 時間) であるが, CM の最小発育阻止濃度は 5  $\gamma$ /ml, 最小殺菌濃度 500  $\gamma$ /ml (24 時間) で SM に比して最小発育阻止濃度と最小殺菌濃度の差異は明らかに大きくその抗菌作用はかな

り高濃度でも発育抑制的であることがわかる。また AM の最小発育阻止濃度は  $10 \gamma/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度は  $250 \gamma/\text{ml}$  (48 時間), TM の最小発育阻止濃度は  $5 \gamma/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度は  $250 \gamma/\text{ml}$  (48 時間) で両者とも CM に相似して最小発育阻止濃度と最小殺菌濃度の差異は大きい。Pc は最小発育阻止濃度は  $10 \text{u.}/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度は  $500 \text{u.}/\text{ml}$  (24 時間) でその差異は大きく抗菌作用はむしろ発育抑制的であつた。GF では最小発育阻止濃度は  $25 \gamma/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度は  $250 \gamma/\text{ml}$  (24 時間), Sul では最小発育阻止濃度は  $5,000 \gamma/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度は  $25,000 \gamma/\text{ml}$  (48 時間) でその差異は小さく殺菌的であつた。Shig. flex. 2a に対しても SM の最小発育阻止濃度は  $5 \gamma/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度  $100 \gamma/\text{ml}$  (24 時間) であるが, CM の最小発育阻止濃度は  $1 \gamma/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度  $100 \gamma/\text{ml}$  (24 時間) で SM に

比してその差異は大きく, したがつて発育抑制的である。また AM の最小発育阻止濃度は  $10 \gamma/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度は  $250 \gamma/\text{ml}$  (24 時間), TM の最小発育阻止濃度は  $5 \gamma/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度は  $250 \gamma/\text{ml}$  (48 時間) で CM 同様発育抑制的である。Pc は最小発育阻止濃度は  $50 \text{u.}/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度  $2,500 \text{u.}/\text{ml}$  (24 時間) である。GF では最小発育阻止濃度は  $5 \gamma/\text{ml}$ , 最小殺菌濃度は  $100 \gamma/\text{ml}$  (24 時間) でむしろ殺菌的であるが, Sul の最小発育阻止濃度は  $25 \gamma/\text{ml}$  で  $500 \gamma/\text{ml}$  では 72 時間でも殺菌能力はなく, かなりの高濃度でも発育抑制的であつた。Salm. paraty. B および Shig. flex. 2a に対する PAS および INAH の抗菌作用はほとんど認めることはできなかったが, その他の使用薬剤の抗菌作用はほぼ同様であり, 本実験では Pc 以外は前記石山の報告に一致した。

## 結 論

2 種の腸内細菌 Salm. paraty. B と Shig. flex. 2a を用いて各種薬剤の管内抗菌作用について検討した。その結果は次のごとくである。

1) SM は最小発育阻止濃度と最小殺菌濃度の差異は小さく殺菌的であるが, CM, AM,

TM および Pc ではその差異は大きくかなり高濃度でも発育抑制的であつた。

2) Sul は Salm. paraty. B に対しては殺菌的で, Shig. flex. 2a に対しては発育抑制的であつた。

## 文 献

- 1) 御藤納孝次郎: 日本伝染病学会雑誌, 26 (4/6), 135, 1952. 2) 石山俊次: 日本臨牀, 10 (8),

637, 1952.



## 2. CM

薬 剤 濃 度	観察時間		20分	40分	60分	90分	2時間	4時間	6時間	12時間	24時間	48時間	72時間
	観察培地												
1,000 $\gamma$ /ml	ペプトン水 培 地		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
500 $\gamma$ /ml			+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
250 $\gamma$ /ml			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
1,000 $\gamma$ /ml	普 通 寒 天 培 地		冊	冊	冊	+	—	—	—	—	—	—	—
500 $\gamma$ /ml			冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	—	—	—
250 $\gamma$ /ml			冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	+

## 3. AM

薬 剤 濃 度	観察時間		20分	40分	60分	90分	2時間	4時間	6時間	12時間	24時間	48時間	72時間
	観察培地												
1,000 $\gamma$ /ml	ペプトン水 培 地		+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
500 $\gamma$ /ml			+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
250 $\gamma$ /ml			+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
1,000 $\gamma$ /ml	普 通 寒 天 培 地		冊	冊	+	+	—	—	—	—	—	—	—
500 $\gamma$ /ml			冊	冊	冊	冊	+	+	—	—	—	—	—
250 $\gamma$ /ml			冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	+	+	—	—

## 4. TM

薬 剤 濃 度	観察時間		20分	40分	60分	90分	2時間	4時間	6時間	12時間	24時間	48時間	72時間
	観察培地												
1,000 $\gamma$ /ml	ペプトン水 培 地		+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
500 $\gamma$ /ml			+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
250 $\gamma$ /ml			+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
1,000 $\gamma$ /ml	普 通 寒 天 培 地		冊	冊	+	+	—	—	—	—	—	—	—
500 $\gamma$ /ml			冊	冊	冊	冊	+	+	+	—	—	—	—
250 $\gamma$ /ml			冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	+	+	—	—



## 8. PAS

[illegible]

## 9. INAH

[illegible]

10. Ph

[illegible]

B) Shig. flex. 2a をもつての実験

11. SM

薬 剤 濃 度	観察時間	20分	40分	60分	90分	2時間	4時間	6時間	12時間	24時間	48時間	72時間
	観察培地											
500 $\gamma$ /ml	ペプトン水 培 地	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
250 $\gamma$ /ml		+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
100 $\gamma$ /ml		+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
500 $\gamma$ /ml	普 通 寒 天 培 地	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
250 $\gamma$ /ml		++	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
100 $\gamma$ /ml		+++	+++	++	++	+	+	+	+	—	—	—

12. CM

薬 劑 濃 度	観 察 時 間		20分	40分	60分	90分	2時間	4時間	6時間	12時間	24時間	48時間	72時間
	観 察 培 地												
500 r/ml	ペプトン水 培 地		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250 r/ml			+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
100 r/ml			+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
500 r/ml	普 通 寒 天 培 地		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
250 r/ml			++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
100 r/ml			+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-

13. AM

薬 剤 濃 度	観 察 時 間		20分	40分	60分	90分	2時間	4時間	6時間	12時間	24時間	48時間	72時間
	観 察 培 地												
1,000 $r/ml$	ペプトン水 培 地		+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
500 $r/ml$			+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
250 $r/ml$			+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
1,000 $r/ml$	普 通 寒 天 培 地		+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
500 $r/ml$			++	++	+	+	+	—	—	—	—	—	—
250 $r/ml$			+++	+++	+++	++	++	+	+	—	—	—	—



## 14. TM

薬 剤 濃 度	観察時間		20分	40分	60分	90分	2時間	4時間	6時間	12時間	24時間	48時間	72時間
	観察培地												
1,000 $\gamma$ /ml	ペプトン水 培 地		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
500 $\gamma$ /ml			+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
250 $\gamma$ /ml			+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1,000 $\gamma$ /ml	普 通 寒 天 培 地		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500 $\gamma$ /ml			++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
250 $\gamma$ /ml			+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-

## 15. Pc

薬 剤 濃 度	観察時間		20分	40分	60分	90分	2時間	4時間	6時間	12時間	24時間	48時間	72時間
	観察培地												
5,000 u./ml	ペプトン水 培 地		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2,500 u./ml			+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1,000 u./ml			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5,000 u./ml	普 通 寒 天 培 地		+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
2,500 u./ml			+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-
1,000 u./ml			+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+

## 16. GF

薬 剤 濃 度	観察時間		20分	40分	60分	90分	2時間	4時間	6時間	12時間	24時間	48時間	72時間
	観察培地												
500 $\gamma$ /ml	ペプトン水 培 地		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
250 $\gamma$ /ml			+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
100 $\gamma$ /ml			+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
500 $\gamma$ /ml	普 通 寒 天 培 地		++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
250 $\gamma$ /ml			+++	+++	++	+	+	+	-	-	-	-	-
100 $\gamma$ /ml			+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-



20. Ph

薬 剤 濃 度	観 察 時 間											
	観 察 培 地	20分	40分	60分	90分	2時間	4時間	6時間	12時間	24時間	48時間	72時間
10,000 r/ml	ペプトン水 培 地	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5,000 r/ml		+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
2,000 r/ml		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10,000 r/ml	普 通 寒 天 培 地	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5,000 r/ml		冊	冊	冊	冊	+	—	—	—	—	—	—
2,500 r/ml		冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊

＋：コロニー数      1個～ 99個  
冊：                    100個～499個  
冊：                    500個～999個  
冊：                    1,000個以上