婦人性器内嫌気性菌の抗生物質に対する感受性 並びに感受性検査法に関する知見補遺

Newly Added, Knowledges of the Sensitivity of the Anaerobic Bacteria in the Female Genitals against Antibiotics and of the Methods of Sensitivity Test

日本医科大学附属医院真柄産科婦人科学教室（主任 真柄正直教授）

井 上 達 也 Tatsuya INOUE

緒 言

嫌気性菌の抗生物質に対する感受性についての研究は少く、嫌気性桿菌については殿田、渡邊、安田、伊藤、塚原、上田及び Newton 等の最近の業績が報告されているのであるが、産婦人科領域において検出率からも、亦病原性の点からも重要視されている嫌気性球菌については、真柄教授指導の下になされた高瀬等の研究があるに過ぎない。

高瀬の PE, SM, CM, TC 等について調べた結果によると、嫌気性菌の抗生物質に対する耐性獲得の程度は抗生剤の種類によつて難易はあるが、実験的に試験管内で耐性を獲得し、特に SM に対しては短期間内に高度の耐性を獲得する。これに次いで TC 系抗生物質であり、CM に対する耐性の獲得が最も軽度であつたとしている。しかし、新たに婦人性器内から分離した嫌気性菌は抗生物質、特に CM や TC に対しては何れも強い感受性を有するものであるが、PE、特に SM に対しては抵抗性の菌が認められ、これらはブドウ球菌とグラム陽性の桿菌に多いとしている。更に抗生物質投與前後における腔内嫌気性菌の変動と、これの抗生物質に対する感受性について検した結果、治療後、なお腔内に残存する嫌気性菌で感受性の低下したのも認められたが、この程度は軽度であり、また、耐性嫌気性菌の交代性出現も認められず、従つて嫌気性菌による感染症に抗生物質療法を行うならば比較的容易に治療の目的が達せられるのではなからうかとしているが、実験結果と臨床効果とが必ずしも平行するものでないことを指摘、注意している。

しかし、抗生物質療法を行うに当つては、起炎菌の抗生物質に対する感受性について検した結果から最も有効なる治療剤を選択使用することは抗生物質療法の常識である。

従つて著者は今回真柄教授指導の下に嫌気性菌に対する抗生物質の感受性検査法の基礎的な事項について検討し、更に婦人性器内嫌気性菌の抗生物質に対する感受性の年次の推移等について検した結果、いさゝかの知見を得たのでここに報告し、御批判を得たいと思う。

I 実験材料並びに実験方法

1) 実験材料

昭和31年12月から昭和32年6月に至る間の日本医科大学附属医院産婦人科を訪れた新患の中、無選擇に130名の腔内容を採取し、また、昭和34年7月から同年12月に至る間の日本医科大学附属医院産婦人科及び私立学校教職員共済組合下谷病院産婦人科を訪れた新患の中525名から腔内容を採取し、これらから嫌気性菌の分離を行った。

2) 実験方法

i) 嫌気性菌の分離並びに同定基準

内診に先立つて消毒した腔鏡を腔内に挿入して哆開し、後腔門蓋部の腔内容を滅菌線棒で採取する。これを Hall の試験管に盛つた vf プイヨンに接種し、37°C に 2～4 日間培養して増菌する。次で、これを vf 高層寒天に移植し 4～6 日間培養し、發育した集落を分離採取して新しい培地に移す。この操作を純培養となるまで繰返すのであるが、著者は分離菌株の抗生物質に対する感受性を検することを目的としたために単に 1 回の分離操作によつて純培養となつたもののみを対象とした。純培養となつた菌株は高層寒天中に繼代して保存する。

菌種の同定に必要な生物学的性状については検索せず、主としてグラム染色による菌の形態について検し、球菌は Diplococci, Streptococci, Staphylococci に、また、桿菌はグラム染色性によつて陽性及び陰性に区分して記載した。

ii) 感受性検査法

a) 液体培地による方法

培地は vf プイオンを使用し、試験管は Hall の試験管を使用した。即ち、pH 7.8 の vf プイオンを 9 cc 宛分注しておき、100°C、25分宛、3 回間歇滅菌をしておく。使用前に15~20分間煮沸して培地中の空気を驅出し、次で急冷する。これに被検薬剤の一定量を含む稀釋溶液を調製し、これの 1 cc を各試験管に注加して全量を 10cc とする。

被検剤の PE, SM, CM, TC, EM の稀釋系列は次のようである。即ち、PE1000u/ml, SM10mg/ml, CM1mg/ml, TC1mg/ml, EM1mg/ml を基始濃度とし、これを順次に倍数稀釋したものである。従つて培地中では更に10倍に稀釋されるので、第 1 管に含まれる濃度は PE 100u/ml, SM1mg/ml, CM, TC, EM は夫々 0.1mg/ml となる。

溶液の調製には滅菌溜水を使用した。特に CM, EM は少量の滅菌したプロピレングリコールで完全に溶解し、次いで、これを溜水で倍数稀釋を行った。

b) 固形培地による方法

培地は pH を 7.6~7.8 とした vf 寒天である。寒天の濃度は濾紙円盤法に規定された量を加えた。即ち、基底とする寒天下層には寒天を 1.5% 量加え、これの上に重層する菌接種用培地には寒天を 1% 量加えた。培養手技の詳細は次のようである。

滅菌して貯えておいた 1.5% vf 寒天を溶解し内径 10 cm のシャーレに 20cc 宛分注して水平に凝固させる。次で 1% vf 寒天を 10cc 宛分注滅菌して用意しておいたものを溶解し、50°C の恒温槽の中に保つておき、これに vf プイオン中に 24~48 時間培養し、十分に発育させた被検菌の均等浮游液 0.1cc を加えて十分に混和する。これの 3 cc を先の寒天平板上に注加して均等に重層して固める。重層した寒天菌液が完全に固まるのを待つて、被検薬剤の一定量を含有する濾紙円盤を配置する。円盤は夫々 3 cm 以上の間隔におく。以上の操作が完了したならば Rosenthal の培養法によつて 72~96 時間培養する。尚、基礎的実験及び稀釋法と比較するための平板法では夫々同一の条件の下に 3 枚の寒天平板を用意し、これの平均値をとつた。

平板法に使用した被検資料は 3 種濃度による濾紙円盤 (栄研)、1 種濃度による濾紙円盤 (昭和)、及び 1 種濃度による感應錠 (Roskilde) の 3 種である。

供試菌には Diplococcus magnus, Streptococcus anaerobius, Staphylococcus anaerobius 及び Clostridium

属の夫々 3 菌株を使用した。これらは基礎的実験に使用したものである。

II 実験成績

1) 基礎的事項についての検討

i) 培地の種類

一般には Heart-Infusion 培地 (H.I) が賞用されており、特に Sulfa 剤の場合には Mueller-Hinton 培地 (M.H) が用いられているが、嫌気性菌の固形培地として適している vf 寒天を使用した場合、他の培地との間に阻止帯の形成等について相違があるかどうかについて検討した。培地は vf 寒天, H.I 培地, M.H 培地, 普通寒天培地を使用した。供試菌には Clostridium 属の 401 株を用い、EM に対する感受性を 1 種濃度法と 3 種濃度法について検した結果は表 1 の如くである。

表 1 培地の種類による影響 (EM に対する 401 株の感受性)

培地	1種濃度法	3種濃度法
Vf.	14 mm	5 mm 7 mm 10 mm
H.I.	22 mm	5 mm 10 mm 18 mm
M.H.	集落 (±)	集落 (±)
普通寒天	"	"

菌の接種法は 1% vf 寒天 10cc に 24 時間培養の菌液 0.1 cc を加え、十分に混和した後、これの 3 cc を重層した。

M・H 培地、普通寒天培地での菌の発育は不良であつて、集落の発生は見られるが、計測可能な阻止帯の形成は見られなかつた。1 種濃度法では円盤周縁からの阻止帯の長さは vf 寒天で 14mm, H.I 培地で 22mm であつた。

また、3 種濃度法では vf 寒天と H.I 培地共に最低濃度では耐性を示し、中及び最高濃度では感受性が認められた。従つて、401 株の EM に対する感受性は 0.5~2 mcg の間にあることが判る。(液体培地稀釋法による発育阻濃度は 0.75mcg/ml である)。vf 及び H.I の兩培地を比較すると、阻止帯円の形成が H.I 培地では vf 寒天に比して少々大きい。

ii) 培地の組成、特に寒天含量の関係

寒天下層を 1.5% vf 寒天とし、重層する寒天培地は 1% 寒天としたものと、下層を 1% とし、重層する培地を 0.5% としたものとを比較したのであるが表 2 の如く

表 2 寒天濃度による影響 (EM に対する 401 株の感受性)

1.5% 寒天に 1% 寒天 3cc 重層	1% 寒天に 0.5% 寒天 3cc 重層
13 mm	13 mm

兩培地共に阻止帯の長さは13mmであつて、兩者に差異は認められなかつた。

iii) 培地量

寒天下層を20ccとするもの、或は22ccとするものがあるが、この培地量による影響について検するため1.5% vf 寒天を基底培地とし、これの10cc, 20cc, 30ccに夫々1% vf 寒天3cc宛を重層接種した場合の阻止帯の長さを測定した結果は表3の如くであつて、寒天下層が多い程阻止帯の長さは短縮する。即ち、培地量と阻止帯の大きさは反比例する傾向が認められた。

表3 培地量による影響 (EMに対する401株の感受性)

10ccに3cc重層	20ccに3cc重層	30ccに3cc重層
13 mm	12 mm	11 mm

iv) 接種菌量

嫌気性菌では菌株によつて発育速度が異なり、好気性菌の場合に比して発育速度は一般に緩慢である。Clostridium 屬である401株の24時間培養の菌液を使用し、これの10倍、100倍、500倍液を接種した場合の阻止帯円の形成に及ぼす影響について検討した結果は表4の如くであつて、濃厚菌液を使用した場合阻止帯の長さは短縮する。即ち、接種菌量と阻止帯内の大きさは前項と同様逆比例するものである。

表4 接種菌量による影響 (EMに対する401株の感受性)

10倍菌液	100倍菌液	500倍菌液
10 mm	12 mm	14 mm
0.5 mcg	0.2 mcg	0.08 mcg

この標準曲線による換算値は10倍菌液では0.5mcg, 100倍液では0.2mcg, 500倍液では約0.08mcgであつて、液体培地稀釋法による発育阻止濃度は0.75mcgであるから比較的濃厚菌液を使用した場合、稀釋法に近い値を示した。

v) 接種方法

菌の接種方法としては基底寒天層のみを使用し、これに直接塗抹する方法と1%寒天培地で100倍菌液としたものを3cc宛重層する方法、及び同一培地上で多数の菌種を同時に検しようとする劃線接種法等がある。これらの接種方法が阻止帯の形成にどのような影響を及ぼすものであるかについて調べた結果は表5のようである。表に示した如く重層接種或は重層して塗抹した場合、また、直接塗布ないし劃線塗抹した場合でも、著明なる差

表5 接種方法による影響 (EMに対する401株の感受性)

重層接種	重層塗抹	直接塗抹	劃線塗抹
12 mm	12 mm	13 mm	13 mm

異は認められないが、重層した場合には直接塗布したものにして阻止帯の長さは少々短縮している。

vi) 小括並びに考按

a) 濾紙円盤法による場合、被検薬剤、例えば Sulfa 剤の検査では Pepton を含まない培地を使用するか、また、抗生物質の検査には Heart-Infusion 培地が適しているとか、使用すべき培地が指定されている。そこで Mueller-Hinton 培地、Heart-Infusion 培地、普通寒天培地等を対照として vf 寒天培地を使用した場合の成績を比較した。Mueller-Hinton 培地や普通寒天培地を使用した場合、集落の発生は見られるが、集落の密度が極めて少く、阻止帯円の計測は不可能なこともあるので、これらの培地は嫌気性菌の感受性検査には不適當であると思われる。

vf 寒天と Heart-Infusion 培地での成績を1種濃度による方法と、3種濃度による方法とによつて比較するのに、形成される発育阻止帯の大きさは概して vf 寒天よりも Heart-Infusion 培地の方が大であつて、vf 寒天での発育阻止濃度の判定結果は Heart-Infusion 培地に比して感度が劣るように思われるのであるが、これは高濃度の場合においてであつて、最低濃度の場合には兩培地での成績は略々同一であつた。従つて vf 寒天での成績から最低発育阻止濃度を知らうとする場合 Heart-Infusion 培地と同様に評價判定してよいのではないかと考える。臨床検査の目的としては正確な発育阻止濃度を知ることが勿論重要ではあるが、寧ろ大凡の発育阻止濃度の範囲を知ることがより重要である。この点からすると vf 寒天が Heart-Infusion 培地に劣ると思われれない。尚、vf 寒天は Pepton を加えてない。従つて Sulfa 剤の検定培地としても充分使用し得るものであると考える。

b) 以上の如く一般に好適な培地として使用されている Heart-Infusion 培地に比較して、抗生物質の嫌気性菌に対する発育阻止濃度を知る意味では劣ることのない vf 寒天を使用した場合、これの寒天濃度及び使用する培地量によつてどのような差異があるものであるかについて検した。嫌気性菌の培養には普通 0.5~1% vf 寒天を使用しているのであるが、下部の寒天層に1~1.5%のものを使用し、上部に重層接種する寒天を 0.5~1

%のものを使用して両者を比較してみたのであるが、この程度の差異では両者の間に殆んど相違は認められなかった。

また、培地量は下部寒天層には20~22cc使用するようにな規約されているが、下部寒天層を10cc, 20cc, 30ccとし、これに夫々3ccの1% vf 寒天を重層接種した場合の成績を比較してみると、下部寒天層の少ないもの程阻止帯円は拡大される傾向が認められた。

c) 接種菌量及び接種法について検討した結果は次のようである。一般に好気性菌の場合接種菌量は18~24時間培養の菌液の0.1ccを1%寒天の10cc(100倍)に混和稀釋し、これの3ccを重層接種するものとされている。そこで10倍, 100倍, 500倍に1% vf 寒天と混和稀釋したものを接種した場合について検討したのであるが、菌量の多いもの程阻止帯は縮少して現われる傾向が認められた。阻止帯の計測値から標準曲線によつて最低発育阻止濃度を算出した値によると約2~6倍の差異が見られた。1種濃度法による耐性検査の場合形成された阻止帯の徑を測定し、この値を標準曲線によつて最低発育阻止濃度を算出する方法は臨的に便利な方法ではあるが、測定による僅かな差異が、換算した阻止濃度には大きなずれを生ずる。従つて測定値を正確にすることが重要であるが、更にこの阻止帯の長さは諸種の条件によつて左右され易いので、判定に当つては注意を要する。

次に接種方法についてであるが、寒天混和菌液を重層接種した場合、重層して塗抹した場合、或は重層することなく直接塗抹或は劃線塗抹した場合等について検討した結果では、これらの間に殆んど、阻止帯円の長さに差異はなく、特に重層して接種或は塗抹した場合と重層することなく直接塗抹或は劃線培養した結果は全く同一の阻止帯の長さを示した。しかし、寒天混合稀釋菌液を重層した場合最も鮮明な阻止帯の形成が見られ成績の判定が容易であつた。

d) 以上の諸実験の結果からすると、特に培地の種類及び量と接種菌量等は発育阻止帯形成の大小に密接なる関係を有するものである。

ところで vf 寒天は一般に賞用されている Heart-Infusion 培地と比較して発育阻止濃度の判定に劣るとは思われぬ。従つて以下の実験には下部寒天は1.5%の vf 寒天20ccを使用し、接種菌量は液状培地での菌の発育の遅速を考慮して24~48時間培養の菌液の0.1ccを1% vf 寒天10ccに混和稀釋し、これの3ccを重層接種することとした。

2) 平板法と稀釋法の比較について

i) 平板法による成績

a) 3種濃度による成績

12株の供試菌の感受性を3種濃度法(栄研 Disk)によつて調べた成績は表6の如くである。表に示したようにSMを除く他のPE, CM, TC等に対しては何れの菌株も強い感受性を有するものであつて、僅かにPEに対して203株, CMに対して401及び403株が夫々比較的感受性(++)であつた以外は、何れも最も強い感受性(++)を示した。SMに対してはDiplococceの1株とClostridium属の3株は共に抵抗性(-)であり、Streptococceの1株とStaphylococceの2株は比較的抵抗性(+)で残余のDiplococceの2株, Streptococce及びStaphylococceの夫々1株は比較的感受性(++)であつた。

表6 濾紙円盤(3種濃度)による成績

菌種	菌株	PE	SM	CM	TC
Diplococce	101	++	-	++	++
	102	++	+	++	++
	103	++	+	++	++
Streptococce	201	++	+	++	++
	202	++	+	++	++
	203	++	++	++	++
Staphylococce	301	++	+	++	++
	302	++	+	++	++
	303	++	+	++	++
Clostridium属	401	++	-	++	++
	402	++	-	++	++
	403	++	-	++	++

b) 1種濃度による成績

101, 201, 301, 401の4株について1種濃度を使用する濾紙円盤(昭和 Disk.)を使用して検した結果は表7の如くである。阻止帯の長さはPE 8.5~14.5mm, SM 1~3.5mm, CM 8.5~13mm, TC 6.5~8mmであつて、これの計測値から標準曲線によつて算出した夫々

表7 濾紙円盤(1種濃度)による成績

菌種	菌株	PE	SM	CM	TC
Diplococce	101	14.5mm	3.5mm	8.5mm	6.5mm
Streptococce	201	8.5 "	2 "	12 "	6.5 "
Staphylococce	301	9.5 "	3.5 "	13 "	8 "
Clostridium属	401	8.5 "	<1 "	11.5 "	7.5 "

標準曲線による換算値

菌種	菌株	PE	SM	CM	TC
Diplococce	101	0.28u ⁽⁺⁺⁾	36mcg ⁽⁺⁾	8.4mcg ⁽⁺⁺⁾	3.6mcg ⁽⁺⁺⁾
Streptococce	201	0.38u ⁽⁺⁺⁾	70u ⁽⁺⁾	2.4u ⁽⁺⁺⁾	3.6u ⁽⁺⁺⁾
Staphylococce	301	0.28u ⁽⁺⁺⁾	36u ⁽⁺⁾	1.8u ⁽⁺⁺⁾	2.8u ⁽⁺⁺⁾
Clostridium属	401	0.5u ⁽⁺⁺⁾	>100u ⁽⁻⁾	2.9u ⁽⁺⁺⁾	2.5u ⁽⁺⁺⁾

の発育阻止濃度と、本法に規定された濃度によつて抵抗性(一)～感受性(卅)の4種に区分記載した結果、PEは4株共に比較的感受性(卅)、SMはClostridiumが抵抗性(一)で他は比較抵抗性(十)であり、CMはDiplococccenが比較的感受性(卅)で残余のものは感受性(卅)であつた。TCは4株共に比較的感受性であつた。

c) 感應錠による成績

201, 301, 401株を供試菌として検した成績は表8に示した。本法による場合の判定基準、即ち、阻止帯の長さ30mm以上(卅)―最も感受性、25～29mm(卍)―可成感受性、16～24mm(十)―比較的感受性、15mm以下(一)―抵抗性とする方法によつて表わした成績は、括弧内に記した。これによると先の3種濃度法、1種濃度法によつて得られた結果比較してみるのに同一の供試菌であるにも拘らず同一の抗生物質に対する感受性が著しく低下しているが如くに表現されている。即ち、何れの菌株でも30mm以上の阻止帯を形成したものはなく、StaphylococccenがCMに対して可成感受性で示し、Clostridium属の401株がSM, OTCに抵抗性(一)であつた以外は全て比較的感受性(十)であつた。

表8 感應錠による成績表

菌種	菌株	PE	SM	CM	OTC
Streptococccen	201	19mm(+)	18mm(+)	18mm(+)	18mm(+)
Staphylococccen	301	22mm(+)	22mm(+)	25mm(+)	19mm(+)
Clostridium属	401	16mm(+)	8mm(-)	17mm(+)	13mm(-)

ii) 液体培地稀釋法による成績

供試菌はDiplococcus magnus, Streptococcus anaecobius, Staphylococcus anaecobius, Clostridium属の夫々3菌株を用いた。また、被検薬剤としてはPenicillin G, Dihydro Streptomycin, chloramphenicol, Tetracyclin, Erythromycinの5種で、これら薬剤の所定量を培地に加えた後は充分に混和する。これに各菌種の48時間培養の菌液0.1ccをHallの試験管の下部に移植し、24時間毎4日間に互つて観察し、成績の判定の困難なものは更に高層寒天に移植して集落発生の有無について検した。

成績は表9の如くである。

Diplococcus magnusではPE, 0.08～0.16u/ml, SM 8～32mcg/ml, CM, 何れの菌株も3mcg/ml, TC, 0.5～1.5mcg/mlであつた。

Streptococcus anaecobiusではPE, 0.3～1.5u/

表9 稀釋法による発育阻止濃度

菌種	菌株	PE	SM	CM	TC	EM
Diplococccen	101	0.08u	32mcg	3mcg	1.5mcg	0.075mcg
	102	0.16"	16"	3"	0.75"	0.037"
	103	0.16"	8"	3"	0.75"	
Streptococccen	201	0.75"	30"	3"	3"	<0.037"
	202	0.37"	30"	1.5"	3"	(0.037"
	203	1.5"	30"	1.5"	1.5"	
Staphylococccen	301	0.15"	15"	1.5"	1.5"	1.5"
	302	0.15"	7.5"	3"	1.5"	0.37"
	303	0.15"	7.5"	1.5"	0.75"	
Clostridium属	401	1.5"	150"	6"	0.75"	0.75"
	402	3"	600"	3"	0.75"	0.37"
	403	1.5"	300"	6"	0.75"	

ml, SM, 30mcg/ml, CM, 1.5～3mcg/ml. TC 1.5～3mcg/mlであつた。

Staphylococcus anaecobiusではPE, 0.15u/ml, SM, 7.5～15mcg/ml, CM, 1.5～3mcg/ml, TC, 0.75～1.5mcg/ml.である。

Clostridium属ではPE 1.5～3u/ml, SM, 150～600mcg/ml, CM, 3～6mcg/ml, TC, 何れも0.75mcg/mlであつた。

尚、EMは各菌種の夫々2株について検した結果、Diplococccenでは0.037～0.075mcg/ml, Streptococccenでは0.037mcg/ml, 以下、Staphylococccenでは0.37～1.5mcg/ml, Clostridium属では0.37～0.75mcg/mlであつた。以上のように同一の菌種に属する菌株が同一の抗生物質に対して完全に一致した阻止濃度の得られることは少い。即ち、DiplococccenのCM, StreptococccenのSM, EM, StaphylococccenのPE, ClostridiumのTCに対する感受性等は、3試験菌株とも同一の値であつた。

次に3菌株の最低発育阻止濃度が最も感受性の強いものと、弱いものとの間に4倍の濃度差の認められたものはDiplococccenのSM, StreptococccenのPE, StaphylococccenのEM, Clostridium属のSMに対する場合であつた。他の場合には何れも2倍の差異が見られた。

4菌種、12菌株の5種の抗生物質に対する発育阻止濃度を比較してみるのに、各菌種共に大凡同一の傾向が見られ、特にSMに対しては各菌株共に感受性の弱いことは特長的である。特に桿菌類では球菌類に比してPE, 特にSMに対して感受性が弱い。

iii) 稀釋法及び平板法との比較

a) 稀釋法と3種濃度法との比較

稀釋法によつて得られた値を3種濃度法に規定された表現法によつて区分記載した結果は表10の如くである。

表10 稀釈法と平板法との比較 (1)

菌種	菌株	稀釈法				濾紙円盤法(3種濃度法)			
		PE	SM	CM	TC	PE	SM	CM	TC
Diplococccen	101	##	+	##	##	##	-	##	##
	102	##	+	##	##	##	+	##	##
	103	##	##	##	##	##	##	##	##
Streptococccen	201	##	+	##	##	##	+	##	##
	202	##	+	##	##	##	+	##	##
	203	##	+	##	##	##	##	##	##
Staphylococccen	301	##	+	##	##	##	##	##	##
	302	##	##	##	##	##	+	##	##
	303	##	##	##	##	##	+	##	##
Clostridium属	401	##	-	##	##	##	-	##	##
	402	+	-	##	##	##	-	##	##
	403	##	-	##	##	##	-	##	##

表に明らかな如くCMとTCとは稀釈法による結果と平板法による成績とは全く同一の結果が得られた。特にCMに対する401, 402株の感受性は稀釈法では6mcgであり、平板法で5~10mcgの濃度範囲内にあつて殆んど平行した値を示している。

しかし、PE, 殊にSMの場合は稀釈法と平板法との間に稍々相違が認められる。PEの201, 401, 402, 403株に対する発育阻止濃度は稀釈法で0.75~1.5~3uであるのに平板法では何れも0.5u以下であつて、兩者の間に1.5~6倍の差異が見られた。

SMの場合、稀釈法と平板法とが全く平行したものは103, 201, 202, 401, 402, 403株の6株であつて、他は多少とも相違している。即ち、稀釈法による発育阻止濃度が平板法よりも低いものは101, 302, 303の3株であつた。

b) 稀釈法と1種濃度法との比較

この場合も前項と同様、稀釈法によつて得られた値を1種濃度法に規定された表現法によつて区分し、兩者を併記した結果は表11の如くである。稀釈法、1種濃度法とは共に略々平行した結果が得られるのであるが、PEに対する101, 401株, SMに対する301株, CMに対する101, 401株, 及びTCに対する401株の感受性は多少相違が認められた。

c) 稀釈法と感應錠による方法との比較

表11 稀釈法と平板法との比較 (2)

菌種	菌株	稀釈法				濾紙円盤法(1種濃度)			
		PE	SM	CM	TC	PE	SM	CM	TC
Diplococccen	101	##	+	##	##	##	+	##	##
Streptococccen	201	##	+	##	##	##	+	##	##
Staphylococccen	301	##	##	##	##	##	+	##	##
Clostridium属	401	+	-	##	##	##	-	##	##

感應錠による方法は阻止帯の長さを計測し、これの長さによつて感受性の程度を4種に区分しているのであるが、計測値から発育阻止濃度を換算する方法は示されていない。従つて、便宜上1種濃度に規定された表現法によつて、稀釈法によつて得られた値を現わした結果とを対記して示すと表12の如くである。これによると感應錠によつて得られた成績は稀釈法に比して、発育阻止に更に高濃度を必要とするように推測される。

表12 稀釈法と平板法の比較 (3)

菌種	菌株	稀釈法				感應錠			
		PE	SM	CM	TC	PE	SM	CM	OTC
Diplococccen	101	##	+	##	##				
Streptococccen	201	##	+	##	##	+	+	+	+
Staphylococccen	301	##	##	##	##	+	+	##	+
Clostridium属	401	+	-	##	##	+	-	+	+

d) 臨床的意義から見た稀釈法と平板法との比較

分離菌株の抗生物質に対する感受性は勿論液体培地での稀釈法が最も確実な値を示すものであると思われる。従つて、これと比較する意味において前項までに記載した結果を一括表示すると表13, 表14の如くである。

表13 稀釈法と平板法の比較 (4)

菌株	稀釈法				濾紙円盤法(3種濃度)				濾紙円盤法(1種濃度)				感應錠				
	PE	SM	CM	TC	PE	SM	CM	TC	PE	SM	CM	TC	PE	SM	CM	TC	
101	##	(##)	+	(+)	##	(##)	##	(##)	##	##	+	##	##	##	##	##	##
201	##	(##)	+	(+)	##	(##)	##	(##)	##	##	##	##	##	##	##	##	##
301	##	(##)	+	(+)	##	(##)	##	(##)	##	##	##	##	##	##	##	##	##
401	##	(+)	-	(-)	##	(##)	##	(##)	##	##	##	##	##	##	##	##	##

(注 稀釈法の成績の1列は3種濃度法, 2列は1種濃度法による判定標準による現わした)

表14 稀釈法と平板法との比較

菌種	菌株	稀釈法				濾紙円盤法(3種濃度)				濾紙円盤法(1種濃度)			
		PE	SM	CM	TC	PE	SM	CM	TC	PE	SM	CM	TC
Diplococccen	101	0.08u	32mcg	3mg	1.5mcg	<0.5u	>50mcg	<5	<5	0.28u	36mcg	8.4mcg	3.6mg
Streptococccen	201	0.75u	30	3	3	<0.5u	10~50	<5	<5	0.38u	70	24	3.6
Staphylococccen	301	0.15u	15	1.5	1.5	<0.5u	5~10	<5	<5	0.28u	36	1.8	2.8
Clostridium属	401	1.5u	150	6	0.75u	<0.5u	>50	5~10	<5	0.5u	100	2.9	2.5

以上の結果からすると3種濃度法と1種濃度法とは殆んど同様の結果を示すものであるが、3種濃度法が稀釈法に稍々近似の成績を示している。これらに比較すると勿論判定の表現法に疑義はあるにしても、感應錠では実際の効果との間に著しい差異が認められる。

次に稀釈法と平板法との最低発育阻止濃度の関係を見るのに、稀釈法と3種濃度法ではCMとTCとは完全に一致した結果が得られたが、PEとSMでは多少の相違が見られ2~3倍以上の濃度差を示すものがある。また、稀釈法と1種濃度法では略々一致した値を示すものは少く、2~3倍の濃度差の見られる場合が多い。

iv) 小括並びに考按

a) 3種濃度による濾紙円盤法によつて *Diplococcus magnus*, *Streptococcus anaerobius*, *Staphylococcus anaerobius*, *Clostridium* 属の夫々3株について感受性を検した結果, 3種の嫌気性球菌は被検抗生物質に強い感受性を有し, 発育阻止濃度は $PE < 0.5u$, $SM > 50 \sim 20mcg$, $CM < 5mcg$, $TC < 5mcg$ であつた. 形成する阻止帯内の大小には差異があり, 3cm以上離して円盤を配置した場合にも阻止帯円が大きく, 各円盤間に離散した集落が見られるのみで明確なる阻止帯円の形成が観察出来ない場合もあつた. *Clostridium* 属の3株では $PE < 0.5u$, $TC < 5mcg$, $CM < 5 \sim 10mcg$ で強い感受性を有するが SM のみは $50mcg$ 以上であつて, 何れも感受性は認められなかつた.

b) 1種濃度法による円盤法では *Clostridium* 属の SM に対して阻止帯の形成が見られなかつたものを除くと PE , $8.5 \sim 14.5mm$, SM $2 \sim 3.5mm$, CM $8.5 \sim 13mm$, TC $6.5 \sim 8mm$ の阻止帯が形成された. この阻止帯長から有効阻止濃度を換算した値を, 規定の方法に従つて感受性を4種に区分した結果では, 3種濃度法の成績に比して PE と TC とは同一の被検菌に対し多少効果が劣るように表現されている.

阻止帯の長さから, 標準曲線によつて発育阻止濃度を算出した結果と, 稀釋法による発育阻止濃度とを比較するのに, 両者が略々一致した値を示すことは少く, 2~6倍の差異が見られた.

次に1種濃度法である感應錠による成績と濾紙円盤法の結果とを比較すると, 感應錠による成績では円盤法に比して同一の供試菌に対して, 被検抗生物質の効果は著しく劣るように表現されている. 即ち, 3種の平板法による抗生物質の効果判定を比較すると, 同一の被検菌に対する抗生物質の適應範囲の廣さは3種濃度法 $>$ 1種濃度法 $>$ 感應錠の順位となる.

c) 液体培地稀釋法によつて *Diplococcus magnus*, *Streptococcus anaerobius*, *Staphylococcus anaerobius*, 及び *Clostridium* 属の夫々3株について検した結果, 共通する点は SM に対して何れの菌株も感受性が弱いことである. 被検抗生物質に対して同種の菌株が何れも同一の値を示したものもあつたが, これは少く, 2~4倍の濃度差の認められたものが多い.

液体培地稀釋法によつて得られた成績と平板法で得られた発育阻止濃度とを比較するのに, 1種濃度法と略々同一の値の得られることは少く, 一般に稀釋法に比して

発育阻止に高濃度を必要とするような結果が得られた.

3種濃度による場合は PE , 殊に SM を除くと稀釋法と略々平行した結果の得られる場合が多いのであるが, 詳細に追求するためには更に低濃度含有の濾紙円盤が必要である. しかし, これは臨床的に特に必要なこととは思われぬ.

感應錠による成績と稀釋法によつて得られた数値を3種, 或は1種濃度法によつて現わし, 兩成績を比較すると感應錠による成績では同一の供試菌でも被検剤に対して感受性が低下しているが如くに表現される.

3) 臨床に関係ある事項について

i) 昭和32年度に外来新患の腔内から嫌気性菌の分離された頻度は表15の如くであつて, 最も多く検出されたものは妊婦であり, 被検対象58例中14例(約24%)に検出された. 他の場合の被検例は少いのであるが, これの中ではトリコモナス腔炎の場合が多く14例中7例に検出された.

130例から検出された嫌気性菌は総数41株で, これの検出率は約32%であつた. 検出菌の染色標本によつて区分した結果は表16の如くである.

表15 嫌気性菌の検出状況(昭和32年)

疾患名	例数	検出例数
妊 婦	58	14
トリコモナス腔炎	14	7
腔 炎	7	5
子宮筋腫	6	4
卵巣機能不全	6	4
流 産	4	1
附属器疾患	3	2
其 の 他		4
計		41

これら嫌気性菌の PE , SM , CM , OTC に対する感受性を3種濃度を使用する濾紙円盤法によつて検した結果, 一般に何れの菌株も抗生物質に対しては強い感受性を有し, 抗生物質療法の対象になり難い比較的抵抗性を示した菌株は41株の中 PE に *Diplococcus* の1株が, SM に対して *Staphylococcus* の2株とグラム陽性桿菌の1株, 計4株のみであつて, 他は全て比較的的感受性, 或は感受性菌であつた. 特に CM と OTC に対しては強い感受性を有し, 何れも最も強い感受性を示した.

ii) 昭和34年度に外来を訪れた新患の腔内から嫌気性

表16 昭和32年度分離菌株の感受性

球 菌	菌株 数	PE		SM		CM		TC	
		-	+	-	+	-	+	-	+
Diplococccen	6	1	5	1	5	6		6	
Streptococccen	16		16		16		16		16
Staphylococccen	17		17	2	13		17		17
桿 菌	グラム陽性桿菌	1	1	1			1		1
	グラム陰性の桿状菌	1	1		1		1		1

表17 嫌気性菌の検出状況(昭和34年)

疾・患名	例数	検出例数
妊 娠	329	58
機能性出血	43	8
膣 炎	25	9
トリモノス膣炎	19	8
流 産	17	7
卵巣機能不全	15	7
子宮筋腫	15	7
附属器疾患	14	8
子 宮 癌	11	6
其 の 他		15
計		133

菌の分離されたものは表17のようである。この年度も最多数を占めたのは妊婦であつて 329例中58例(約17%)に検出された。以下表の如くである。

嫌気性菌は 525例の新患膣内から 123例(約23%)に検出された。総数 133株の中の 127株について感受性を検した結果は表18の如くである。

表18 昭和34年度分離菌株の感受性

球 菌	菌株 数	PE		SM		CM		TC	
		-	+	-	+	-	+	-	+
Diplococccen	16	2	14	1	4	11		16	1
Streptococccen	46	2	44	2	1	5	33	46	2
Staphylococccen	47	3	2	3	39	4	7	5	31
桿 菌	グラム陽性桿菌	16	1	1	14	4	2	10	2
	グラム陰性の桿状菌	1		1		1		1	
	連鎖桿菌	1		1		1		1	

表に示した如く4種抗生物質の中CM, TCに対しては何れの菌株も強い感受性を有し, 比較的抵抗性を示したものはCMに対して Staphylococccen の2株と, TCに対して Diplococccen の1株の計3株のみであつて, 他の殆んど全ての菌株は最も強い感受性を有するもので

あつた。

しかし, PE, SMに対してはCM, TCの場合に比して明らかに感受性の低下している菌株が多く, 特に最高濃度に対しても感受性を有しない抵抗性の菌株が認められた。殊に Staphylococccen のSMに対する感受性を見るのに47菌株の中, 抵抗性或は比較的抵抗性の菌株が11株, 約23%を占めている。グラム陽性の桿菌類も球菌類と略々同様の傾向を有し, SMに対しては抵抗性, 比較的抵抗性を占すものが16株中6株, 約38%を占めている。しかし, CM, TCには強い感受性を有するものであつた。

次にPE, SM耐性菌の交叉耐性について調べた結果は表19の如くである。

表19 PE耐性菌の交叉耐性

	PE	SM	CM	TC
1 Diplococccen	-	-	##	##
2 "	-	+	##	##
3 Streptococccen	-	-	##	##
4 "	-	-	##	##
5 Staphylococccen	-	-	##	##
6 "	-	-	##	##
7 "	-	+	+	##
8 gr(+) Bacillen	-	-	##	##

即ち, PE耐性菌は8株であつて, Diplococccen, Staphylococccen の夫々1株を除いた他の6株はPEとSMとの間に2重耐性が認められた。しかしCMとTCに対する感受性を見るのに Staphylococccen の1株がCMに比較的耐性を示す以外は全て最も強い感受性を有するものであつた。SM耐性菌は11株であつて表19に示したPE, SM2重耐性菌を除く他の5株の感受性は表20に示した如くPE, CM, TCに感受性の低下している菌株もあつたが, 交叉耐性の認められたのはPE, SM2重耐性の Staphylococccen の1株があつたに過ぎない。

表20 SM耐性菌の交叉耐性

	PE	SM	CM	TC
1 Staphylococccen	+	-	##	##
2 "	##	-	##	##
3 gr(+) Bacillen	##	-	+	##
4 "	##	-	##	##
5 "	##	-	##	##

また、CMに比較的抵抗性の菌株は2株表21のようであつて、これの1株はPEに耐性、SMに比較的耐性であり、他の1株はPE、SM、TC共に最も強い感受性を示すものであつた。TC比較的耐性菌はDiplococconの1株のみであり、これは表22の如くTCを除く他の3種抗性物質には最も強い感受性を有するものであつた。

表21 CM比較的抵抗性菌株の交叉耐性

	PE	SM	CM	TC
Staphylococcon	—	+	+	##
"	##	##	+	##

表22 TC比較的抵抗性菌株の交叉耐性

	PE	SM	CM	TC
Diplococcon	##	##	##	+

iii) 小括並びに考按

a) 昭和32年度の被検対象からの検出率は130例中41例、約32%であつて検出菌株は41株であつた。

昭和34年度の被検対象からの検出率は525例中123例、約23%で、検出菌株は133株であり、検出率は32年度に比して低率であつた。

この腔内からの嫌気性菌の検出率は諸家の報告に比して低率である。即ち、越野、佐伯等は妊婦、褥婦腔内から46~48%の率に嫌気性菌を検出し、天本も妊婦腔内から36%に検出している。著者の成績では32年度の妊婦腔内からは24%に、また、34年度の妊婦腔内からの検出率は19%であつた。これの相違は検出嫌気性菌の抗生物質に対する感受性を検することを目的としたために、分離操作を簡略にして、単に1回の分離操作によって純培養として得られた菌株のみを集計したためかと思われる。

b) 昭和32年度に検出された嫌気性菌41株の内訳は球菌類が39株、桿菌類が2株であつて、これら菌株の抗生物質に対する感受性を検した結果、CM、OTCに対しては何れも強い感受性を有し、耐性菌、或は感受性の低下しているものは1株も認められなかつた。PEに耐しても略々同様であつて、Diplococconの1株が比較的抵抗性を示したに過ぎない。SMに対してはStaphylococconの2株、グラム陽性の桿菌の1株が比較的抵抗性、Staphylococconの2株が比較的感受性であつた。

昭和34年度に検出された嫌気性菌133株の中、感受性検査を行つた127株のPE、SM、CM、TCに対しては何れも強い感受性を有し、比較的抵抗性の菌株はCMに2株、TCに1株あつたに過ぎない。これに比較する

とPEやSMに対しては明らかに感受性の低下している菌株が多い。即ち、PE、SMに対するStreptococcon, Staphylococcon, グラム陽性桿菌の感受性菌(3種濃度に感受性を有するもの)の頻度は夫々87%, 82%, 83% 65%, 87%, 63%であつた。)これは高瀬が昭和32~33年度に検した121株の嫌気性菌について調べた成績と比較するのに、著者の成績では感受性菌の頻度が稍々高い値を示している。著者の32年度の集計結果と、34年度の成績とは例数に差異があるために同一に評価判定することは妥当ではないかも知れないが、34年度に検出された菌株では感受性の低下しているものが稍々増加の傾向にあるように窺知されるのである。しかし、高瀬の報告に比較すると特に感受性が低下しているようには思われない。

c) 以上のように外来患者の腔内から検出された嫌気性菌は一般的には強い感受性を有するものが多く、特に2重、或は3重耐性を示すような菌株は少いのであるが、PE耐性菌はSMにも耐性を示すものが多い。しかし、CMとTC、或はこれらとPEやSMとの間に交叉耐性の認められることは稀である。

嫌気性菌は被検4種抗性物質の中PE、特にSMに対して感受性の低下している菌株が比較的多く認められた。検出菌の感受性検査は3種濃度を使用する濃紙円盤法によつて検したものであるが、この平板法による阻止濃度を稀釋法による発育阻止濃度との間には多少の差異があるために、稀釋法によつて厳密に検するならば感受性菌、或は耐性菌等の検出頻度に稍々変動が見られるのではないかと思われる。しかし、PE、CM、TC等は稀釋法による発育阻止濃度と平板法で得られた成績とは大凡平行した結果が得られた。従つて病的腔内等に常住的、或は病原的狀態で存する嫌気性菌の感受性を略々呈示し得たものと考えられる。

結 論

1) Rosenthalの平板培養法によると嫌気性菌はvf寒天平板によく発育し、本培養法によると濃紙円盤法等による嫌気性菌の感受性検査は可能である。感受性検査用培地として指定されているHeart-Infusion培地に嫌気性菌はよく発育するがSulfa剤検定用培地としてのMueller-Hinton培地での発育は不良であつて、特に嫌気性の場合の検査用培地としては不適であると思われる。vf寒天にはPeptonが加えてないのでSulfa剤検定用培地としても好適であると考えられる。

2) 平板法による場合、使用する培地の種類、培地量、接種菌量等は形成される阻止帯の大小と密接な関係

が認められた。寒天2層に1.5% vf 寒天20ccを使用し、これに1% vf 寒天10ccに24~48時間培養の菌液の0.1ccを加えてよく混和したもの、3ccを重層する方法によつて3種濃度法、1種濃度法（濾紙円盤、感應錠）による感受性検査の結果によると、同一の被検菌に対する抗生物質の適應範囲の廣さは大凡3種濃度法>1種濃度法>感應錠の順序となる。

3) 液体培地稀釋法によつて Diplococccen, Streptococccen, Staphylococccen, Clostridium 屬の4菌種の夫々3菌株について検した結果、何れの菌株もSMを除くPE, CM, TC等に対して強い感受性を有する。稀釋法によつて得られた発育阻止濃度でも、同一の菌種に屬する夫々の3菌株が同一の値を示すことは少く、多くは2~4倍の差異が認められた。

液体培地稀釋法による発育阻止濃度と1種濃度による平板法によつて阻止帯の長さから換算した値とが近似することは比較的少く、2~3倍の濃度差の認められる場合が多い。3種濃度法による場合にはPEとSMには該当しないものもあるが、発育阻止濃度は略々被検濃度内に含まれ、稀釋法と大凡平行した結果が得られた。

稀釋法によつて得られた値を3種濃度、1種濃度に規定された濃度によつて感受性の程度を4種に区分して表現し、これと平板法と比較するのに、3種濃度法でも1種濃度法でもCMとTCとは略々合致した結果が得られたが、PEとSMとは必ずしも一致した結果は得られなかった。

以上の諸法を實際に起炎菌に対する薬剤の選擇検査法として採用する場合、合目的なものから列擧すると稀釋法、3種濃度法、1種濃度法となり、これらに比較すると感應錠による結果は實際の効果と判定上の結果との間に著しい差異があるように思われる。

4) 腔内から分離した嫌気性菌の抗生物質に対する感受性を3種濃度を使用する濾紙円盤法によつて検した結果PE, CM, TC等に対して嫌気性菌は一般に強い感受性を有し、特にCMやTCは優れた効果を示す。しかし、PE殊にSMに対しては感受性の低下している菌株が認められ、これはブドウ球菌、グラム陽性桿菌の中に比較的多い。

年次的推移による感受性の変異を検した結果、昭和32年度、34年度共に略々同様の傾向が認められ、PE, SMに対しては感受性の低下しているものがCM, TCに比して多く、これは多少とも第1回の検索成績を照合すると増加しているように思われるのであるが、第1回及び第2回の調査対象の例数に差異があるために明確なる結果は得られなかった。

34年度に検出された菌株ではCM, TCに少数ながら感受性の低下しているものも認められたが、この頻度も少く、また、感受性低下の程度も軽度であつて、抗生物質療法に支障を来たす程のものとは考えられない。

尚、交叉耐性について調べた結果、PEとSMとの間には2重耐性を示すものが多い。しかし、CMとTC、或はこれらとPE, SMとの間に2重耐性や3重耐性の認められた菌株は極めて稀であつた。

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わつた真柄教授に衷心感謝と敬意を捧げ、研究に協力を得た教室員各位に深謝する。

文 献

- 1) 真柄：東京医誌，3081, 1221 (1938). 3189, 1239 (1940). —2) 真柄：日産婦誌，3, 341 (1951). —3) 真柄：臨婦産，7, 729 (1953). —4) 真柄：産と婦，21, 166, (1945). —5) 真柄他：産婦の實際，3, 431 (1954). —6) 真柄：産婦の實際，4, 203 (1955). —7) 揚：日医大誌，24, 547, (1957). —8) 真柄他：医事新報，1743, 3 (1957). —9) 真柄：嫌気性細菌学（改訂増補），(1955). —10) 真柄：日産婦全書，25 (1958). —11) 越：台湾医学会誌，42, 4号附録 (1943). —12) 佐伯：日医大誌，18, 208 (1951). —13) 山田：日医大誌，20, 112 (1952). —14) 蛭名：日産婦誌，12, 69 (1960). —15) 高瀬：日産婦誌，11, 1759 (1959). —16) 天本：日医大誌，27, 9号掲載予定. —17) 梅沢：抗菌性物質 (1954). —18) 小酒井：細菌の薬剤耐性，(1955). —19) 金沢：J. Antibiot. Ser. B, 8, 122, 340, 401 (1955). 10, 85 (1957). —20) Widholm, O. et al.: Ann. Med. Exp. & Biol, 31, 385 (1953). —21) Tunevall. et al.: Antibiotics & Chemotherapy, 4, 886 (1954). —22) Newton, A. et al.: Surgery, 37, 392 (1955). (No. 1314 昭35・10・7受付)