ブドウ球菌に対する抗生物質併用に関する基礎実験

第2編 ブドウ球菌に対する Oleandomycin-Chloramphenicol

の併用による耐性獲得阻止について

Basic Studies on the Combined Therapy of Antibiotics to the Staphylococcal Infections.

(II) Combined Effect of Oleandomycin and Chloramphenicol to *Staphylococcus aureus*.

森 邦 義*

Kuniyoshi MORI

抗生物質療法の普及に伴って菌が抗生物質に耐性を獲得することはさけられない事実であるが、このような耐性獲得を阻止するために現在それらの抗生物質の2剤乃至それ以上の併用療法が行われている。ことに結核化学療法においてこの併用療法が耐性獲得阻止の点で大きな効果を挙げている。しかし単に結核のみでなく他の慢性感染症、或いは亜急性感染症に抗生物質を使用する場合、その抗生物質を単独投与すると早晚耐性を獲得し、大抵は薬剤の治療効果が消失することになる。

最近ブドウ球菌感染症の問題が注目されて来ている、先に私はブドウ球菌に対する数種抗生物質の試験管内における併用実験を試み、ブドウ球菌が現在未だあまり耐性を獲得していない Chloramphenicol, Oleandomycin Neomycin, Kanamycin の4種薬剤を用い、その2剤を組合せての併用実験を行つた結果何れの組合せての併用実験を行つた場合にも菌株によつて多少の差はあるが、併用効果が認められた。そこでこれら4剤相互の組合せて併用効果を認める場合に、はたして耐性獲得阻止が可能であるか、試験管内実験を行なうと考え、まず Chloramphenicol と Oleandomycin の組合せについて実験した。

従来ブドウ球菌感染症の抗生物質療法における菌の耐性獲得阻止の基礎実験については矢野¹⁾の Erythromycin と Chloramphenicol の併用実験があり、Chloramphenicol の併用によつて Erythromycin に対する菌の耐性獲得がある程度阻止される事を実験している。

実験材料及び実験方法

供試菌株はブドウ球菌感染症から最近分離した Coagulase 陽性の黄色ブドウ球菌約10株で、それらは何れもマンニトを分解し、溶血能を有する株である。

使用した Chloramphenicol (以下 CP と略す)。Oleandomycin (OM) はいづれも力価の明かな粉末で実験前秤量し、いづれも 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 および 0.19 ml の2倍稀釈濃度の系列を作り、その各濃度がお互に組合せられるようにブイヨン 5cc 中に含有さ

せ (1組49本)、それに供試菌株のブイヨン18時間培養 0.05ml づつを接種した。そして 37°C に 24, 48, 72 時間培養し肉眼的に菌の発育の有無を観察した。次に同じ濃度の組合せの試験管1組 (49本) を用意し、同一の濃度の組合せの各試験管をよく振盪して、その 0.05 ml をそれぞれの新しい試験管に移植した。そして同時に 72 時間を経過した旧培養の各試験管からその1滴ずつを薬剤を含まないブイヨン培地に移し、24時間培養した後、その各試験管に発育した菌について CP, OM 耐性検査を平板割線法によつて行つた。

次に新たに移植された試験管の1組は同じく 24, 48, 72 時間後肉眼的に菌の発育の有無を観察し、72 時間後に再び各試験管をよく振盪してその 0.05ml をそれぞれ新しい薬剤の組合せ試験管の1組に移植した。そして1回目と同じく、旧培養の各試験管の1滴を薬剤を含まないブイヨンに移植して24時間後発育した菌について CP, OM の耐性を平板割線法で検査した。

次に新たに移植した1組は再び 24, 48, 72 時間と肉眼的に観察し、次に各試験管から1滴ずつを薬剤を含まないブイヨンに植え、前2回と同様 24 時間後に発育した菌について平板割線法によつて耐性を測定した。その実験方法を図示すれば図1の如くなる。つまり同一濃度の薬剤の組合せに9日間接触させ、途中薬剤の力価の低下を考慮して継代し菌の感受性に变化があるかどうかを検査したわけである。

図 1

* 順天堂大学医学部中央検査部

1960年12月2日受付

平板劃線法による耐性測定法は、CP 及び OM をそれぞれ 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 および 0.7/ml に含有させた Heart Infusion 寒天平板を作り、それに内径 1mm 前後の白金耳でブイヨン培養から劃線塗抹し、37°C 18 時間培養後菌の発育を認めた最高濃度をもって耐性を表わした。

実験成績

3 株についての実験結果を示すと図 2, 3, 4 の如くに

図 2

図 3

図 4

なる。

即ち 24, 48, 72 時間の肉眼的菌の発育の有無から見ると、何れの菌についても明かな併用効果が認められる。そして菌の感受性の変化を眺めると、No.5 株では第1回の検査、即ちそれぞれの薬剤の組合せに 3 日間接触させた場合には、殆んど変化は見られないが、途中 2 回継代し、9 日間薬剤に接触させると CP, OM の比較的高濃度の組合せにおいて CP 又は OM あるいはその双方に 4 倍程度の感受性の低下がみられる。No.6 株では CP 又は OM に 4 倍程度の感受性の低下が見られると

ころも一部にあるが、まず 9 日間の薬剤の接触によつては、感受性に顕著な差はなかったと考えられる。No.7 株では 3 日間の接触でも 6 日間の接触でも殆んど変化はないが、9 日間の接触では CP の高濃度の部分で CP に対する感受性の 4 倍程度の低下があり、又 OM に対し 4 倍程度の感受性の低下の見られる部分もある。

即ち 3 株とも 3 日間の薬剤の接触、あるいは途中 1 回継代して 6 日間の接触では、菌の感受性に著明な変化は見られないが、途中 2 回継代し、9 日間接触させると、感受性に 4 倍程度の低下のおこる場合がある。それは薬剤の比較的高濃度のところで、しかも菌の発育が許される濃度で見られ、CP にのみ感受性の低下のおこることもあれば、OM のみのこともあり、又 CP, OM の双方に対して感受性の低下することもある。

考 按

菌の耐性獲得阻止の基礎実験については今日多数の報告があり、実験方法 そのものも種々多様である。特に多く用いられている方法は増量的継代法²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾である。これには一方の薬剤の量を一定にして、他方の薬剤を次第に増量させて行く方法がある。添加する薬剤は発育阻止量以下である事は云うまでもない。このような方法を用いて各種の菌種、各種の薬剤の組合せについて多数の実験が行われている。同じ増量的継代法の 1 つであるが併用する薬剤を等量或いは一定の比率で混じた 1 系列の培地の低濃度から高濃度に順次移して行く方法⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾があるが、この方法を用いた報告も多数見られている。

次に恒量的継代法¹⁰⁾がある。これは併用する薬剤を各々発育阻止濃度以下で、而も菌の発育し得る濃度に混合した培地に菌を移植させ、更に同じ濃度の培地に継代を続ける方法である。

最後に一定期間、混合した薬剤に菌を接触させる方法がある。これは併用する薬剤を一定濃度に含んだ培地に菌を入れ、一定期間培養し、後菌を取り出し、その菌の各々の薬剤の感受性の変化を検べる方法である。

これら3つの方法はどれも実験方法としての欠点を持っている。とくに増量的継代法は生体内を考えたならば実情に即さない実験法である。殊に一方の薬剤の量を一定にし、他方の薬剤の量を増量して行く方法は、まず菌が量の一定した一方の薬剤に耐性となつてしまえば、あとは他方の薬剤には比較的容易に、時には単独薬剤に対すると同様耐性を獲得してしまう。

恒量的継代法は前者より生体内の実情にあつてはいるが、継代する時期と継代する菌量が問題であろう。菌が充分発育できるような低濃度の薬剤の組合せの場合ならばそれは問題ないけれども、そのような低濃度の組合せの実験が果して耐性獲得阻止の基礎実験となるか疑問がある。その点最後の一定期間菌をそのまま培養し続ける方法は、菌の発育を阻止する濃度から発育を許す濃度まで、いろいろの組合せについて検討ができるが、培地中の薬剤の力価の低下を防ぎ得ない。そこで私は、この第2第3の方法を組合せた方法を考案して実験した。たとえば新しい薬剤の組合せに9日間接触させる目的であるが、勿論継代法自体にまだ問題はある。そして3日間の培養の間にも薬剤の力価の低下があるように思われる。それは継代直後の24時間目の発育阻止帯の形が、初代のそれとよく似ている点から推定される。なお私はこの実験方法については、今後更に検討改良して行きたいと思う。

さて私の実験結果からみると、CP, OM は併用効果を持つてはいるか、この両者のかなり高濃度を組合せても、菌の発育を許すようなところでは、いずれかの薬剤ないしはその双方に菌が軽度ながら耐性を獲得することはまぬかれないように思われる。

私はまだ、CP, OM の組合せについて実験したのみであり、今後更に他の薬剤の組合せについて、私の考案した方法を用いて実験を続けるつもりである。

結 論

私は菌の抗生物質に対する耐性獲得阻止に関する基礎実験の1方法を考案し、ブドウ球菌を用いて Chloramphenicol, Oleandomycin の組合せについて実験した。

この両剤の組合せは併用効果を示すけれども、菌の発育を許すような濃度の組合せでは、菌がいずれかの薬剤又は両剤に軽度ながら耐性を獲得することはまぬかれなかつた。

終りに御指導を賜った細菌学教室上屋毅教授、中央検査部長山川邦夫教授、並びに中央検査部小酒井望博士に感謝する。

引 用 文 献

- 1) 矢野成敏：ブドウ球菌感染症に対する Erythromycin-Chloramphenicol 併用療法の基礎実験, J. Antibiotics, Ser. B, 12, (6), 1959.
- 2) PULSKI, E. J. and BAKER, H. J.: In vitro effects of gram-negative bacteria of Streptomycin combined with Penicillin and or Sulfadiazine, J. Lab. Clin. Med., 34: 186, 1949.
- 3) 佐藤一, 佐藤克明, 飯田広夫：化学療法を行つた赤痢患者菌保有状態, 日本伝染病学会雑誌, 27, 73, 1953.
- 4) 小林裕：抗菌性物質の併用に関する研究, 赤痢菌に対する Streptomycin, Guanofuracin の併用について, J. Antibiotics, Ser. B, 7, 118, 1954.
- 5) 河盛勇造, 高橋久雄, 堀本清次郎, 螺良英郎, 奥村寛三：化学物質併用による抗生物質耐性防止の研究, J. Antibiotics, Ser. B, 6, 121, 1954.
- 6) 御廉納孝次郎：赤痢菌のサルファ剤並びに抗生剤に対する耐性獲得に関する研究 第3報, 日本伝染病学会雑誌, 27, 344, 1953b.
- 7) 岩田和夫, 牛飼俊博：赤痢菌の薬剤耐性獲得防止に関する研究, 最新医学, 8, 240, 1953.
- 8) 内藤寛：抗生物質の作用機序に関する研究, 第4報, 併用による耐性獲得の防止に就いて, J. Antibiotics, Ser. B, 6, 86, 1953.
- 9) WRIGHT, S. S., PURCELL, E. M., WILCOX, C., BRODERICK, M. K. and FINLAND, M.: Antibiotic combinations and resistance to antibiotics. Development of resistance during repeated subcultures of staphylococci and certain streptococci on media containing Penicillin, Streptomycin, Erythromycin, Terramycin, and Chloramphenicol used singly and in pairs. J. Lab. Clin. Med., 42, 877, 1953.
- 10) 伊藤喜八：赤痢菌のス剤及び抗生物質に対する耐性獲得防止に関する実験, 総合医学, 10, 810, 1953.

Summary

A new method for testing the drug fastness of the microorganisms was devised. By the method the combined effect of chloramphenicol and oleandomycin to *Staphylococcus aureus* was investigated. As a consequence, these combination seemed to be effective. but when the subinhibitory concentrations of both drugs were combined drug fastness occurred to both drugs or one of them.

Central Clinical Laboratory, Juntendo University, School of Medicine.