

腸内細菌の Bacitracin 感受性並びに Bacitracin と 他抗生物質との併用効果について

小林 裕・元村吉且・小林祥男・高谷 淞世・金子吉孝

京都大学医学部小児科学教室 (指導 永井教授)

(昭和 29 年 12 月 29 日受付)

Bacitracin は JOHNSON 等の報告¹⁾ 以来多くの研究がなされ、既に米国においては臨床的に使用されている。しかしわが国における報告は少ない。我々は今回 Bacitracin 及びそれと Fradiomycin (Neomycin) の合剤である Baramycin (Neobacin) を入手したので、試験管内実験を行なった。

実験材料

供試菌株は *Sh. dysenteriae* 1, 2; *Sh. flexneri* 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4e (西貢荒井株), 5, 6, var. X; *Sh. sonnei* (以上市立京都病院より分与された伝研株); *Sal. typhi* 901 W, *Sal. paratyphi* A 1015, *Sal. paratyphi* B 8006, *Sal. enteritidis* 1831; *E. coli communior* FCR (京大微生物株), *E. coli* O₁₁₁, O₅₅, O₂₆ (以上予研株) 及び *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* 寺島株である。

Bacitracin (BC) は小野薬品工業株式会社提供の 1 瓶力価 50,000 unit のものを用いた。使用に当つては、1 瓶を 5 cc の滅菌蒸留水に溶解し 10,000 u/cc の原液を作った。提供された BC は溶解時水に非常にとけ難く、しかも粘稠で非常に細かい泡が形成されてなかなか消えないため、溶解後原液をそのまま 4°C の氷室に 1 夜放置して後、以下の稀釈を行なった。稀釈は 10,000 u/cc からの 2 倍稀釈系統とし、常にその 1 cc を 9 cc の培地と混合した。併用効果を検討する実験では、上記のほかに 7,500 u/cc からの 2 倍稀釈系列を作り、その 2 系列を交互に組合せて 1 系列とし、同様にその 1 cc を 9 cc の培地と混合した。したがって、培地に含まれた時の濃度は 1,000, 750, 500, 375, 250, 190, 125, 96, 63, 48, 31, 24, 16 u/cc として表現した。

Neomycin (NM), Chlortetracycline (Aureomycin) (AM), Chloramphenicol (CM), Oxytetracycline (Terramycin) (TM), 及び Streptomycin (SM) については既に記述した如くである。

培地は普通寒天培地 (栄研) pH 7.2 及び乾燥粉末ブイヨン (栄研) pH 7.2 を用いた。培地の pH の感受性測定値に及ぼす影響については、pH 6.8, 7.2, 7.6, 8.2 のブイヨンを用い、*Micrococcus pyogenes* var. *aureus* 寺島株及び *E. coli communior* FCR を供試菌株として検討したが、我々が使用した濃度系列の範囲内では有意

の差を認めなかつた (表省略)。それ故、実験はすべて pH 7.2 の培地で行なつた。併用実験の際、使用する抗生物質により至適 pH が異なるが、これは既に述べた²⁾ 如く、相対的な抗菌力の変動を常に単独の対照とともに観察するわけであるから差支えないと考える。

BC を普通寒天に混和凝固せしめると、寒天面に油膜状に水滴が附着して、すぐには劃線培養はできない。それ故 BC 加寒天平板を使用する場合は、平板作製後 4~5 時間 37°C の孵卵器に入れて寒天面を乾燥せしめた後使用した。この場合力価が減少する恐れがあるので、孵卵器内に 6 時間放置したものと、平板作製直後のものに同時に同一菌量の *E. coli communior* FCR を接種して感受性を測定したが、我々の使用した濃度系列の範囲内では力価の減弱は認められなかつた。BC をブイヨンと混合放置すると濃度の高い場合管底に沈殿する傾向がある。しかしこれについても、agar dilution method その他の成績と比較してみても、特にそのために著しく発育抑制が阻害されたとは考えられなかつた。BC と混和する際の融解した寒天の温度についても、一応 45°C の場合と 65°C の場合を比較したが、この程度では差がなかつた。それ故 AM, TM 等を同時に混和する時以外は厳密に 45°C にはしなかつた (以上いずれも表省略)。

実験 I. 感受性測定値に及ぼす接種菌量の影響

供試菌株としては *E. coli communior* FCR 及び *M. pyogenes* var. *aureus* 寺島株を用いた。その 18 時間ブイヨン培養を同じブイヨンで 10^{-1} ~ 10^{-8} に稀釈しその 0.1 cc づつを上述の BC 2 倍稀釈系列を含むブイヨンに接種して感受性を測定すると同時に、各 1 cc づつを 2 列普通寒天と混和培養して、48 時間後に colony count を行なつて、生菌数を測定した。又上記菌稀釈液 1 白金耳づつを BC 加寒天平板系列に塗抹して感受性を測定すると同時に、その 1 白金耳に含まれる生菌数をも測定した。その成績を第 1 表に示した。表では生菌数は order のみを示したが、tube dilution method では感受性測定値は接種菌量によつて影響され、すなわち接種菌量が大きいく程感受性は鈍となつたのに対して、agar dilution method では接種菌量による影響をうけない。ただし tube dilution method の場合もその差は NM の場合³⁾ ほど大きく

第1表 接種菌量の影響
I. Tube dilution method

生菌数	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
菌株						
<i>E. coli communior</i> FCR	500	250	250	250	250	125
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> 寺島株			6.3	6.3	3.1	3.1

II. Agar dilution method

生菌数	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
菌株					
<i>E. coli communior</i> FCR	125	125	125	125	125
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> 寺島株			1.6	3.1	1.6

数字：最小発育阻止濃度

ない。両方法の測定値のほぼ一致するのは、tube dilution method で 10^{3-3} の菌量を接種した場合であつた。

実験 II. 保存株感受性

上述の成績から、方法としては接種菌量の影響の少ない agar dilution method を用いた。成績は第2表に示した。葡萄球菌は感受性が敏で 3.1 u/cc で発育を完全に阻止されたが、他のグラム陰性桿菌は鈍で 31~500 u/cc

第2表 保存株感受性
Agar dilution method

菌株	最小発育阻止濃度
<i>Sh. dysenteriae</i> 1	31 u/cc
" 2	63
<i>Sh. flexneri</i> 1 a	250
" 1 b	125
" 2 a	63~125
" 2 b	63~250
" 3 a	250
" (西貢, 荒井) 4 e	125
" 5	63
" 6	63
" var. X	31
<i>Sh. sonnei</i>	125~250
<i>Sal. typhi</i> 901 W	250
<i>Sal. paratyphi</i> A 1015	500
" B 8006	250~500
<i>Sal. enteritidis</i> 1831	125~500
<i>E. coli communior</i> FCR	125~500
<i>E. coli</i> O ₁₁₁	63~125
" O ₅₅	63~250
" O ₂₆	125~250
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> 寺島株	3.1

で発育を阻止される程度であつた。赤痢菌, サルモネラ, 大腸菌の間には差を見出し得なかつた。

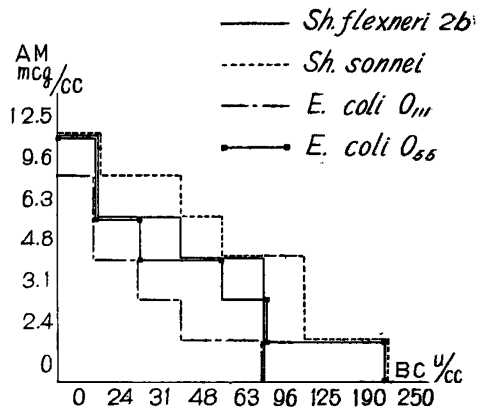
実験 III. 他抗生物質との併用効果

実験及び図示の方法は今までの報告³⁾⁵⁾で詳述した通りである。供試菌株はいずれの組合せにも *Sh. flexneri* 2b, *Sh. sonnei*, *E. coli* O₁₁₁ 及び *E. coli* O₅₅ の4株を用いた。

(1) BC + AM

成績を第1図に示した。図に見られる如く、いずれもかなり強い協同作用を認めた。

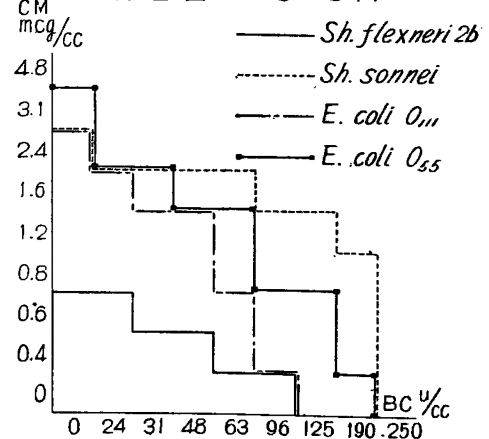
第1図 BC + AM



(2) BC + CM

成績を第2図に示した。いずれもかなり強い協同作用を認めた。

第2図 BC + CM

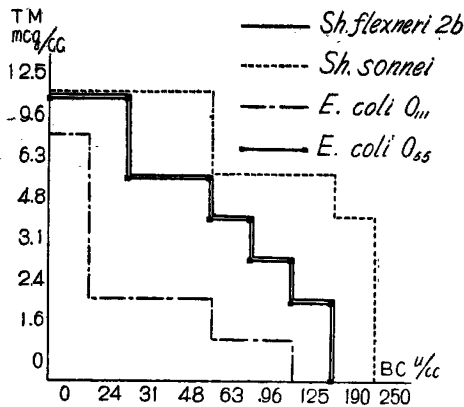


(3) BC + TM

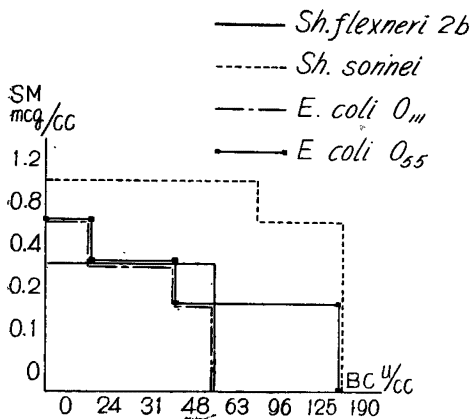
成績を第3図に示した。この場合も前2者と同様の成績である。

(4) BC + SM

カ 3 図 BC+TM

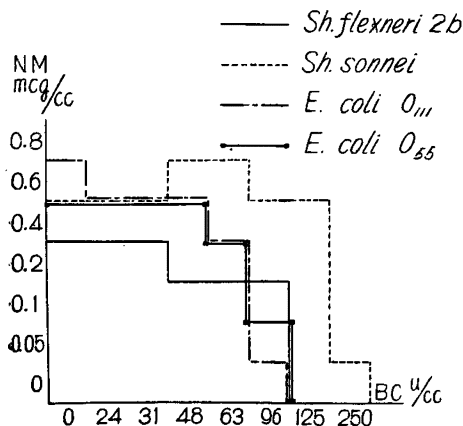


カ 4 図 BC+SM



成績を第4図に示した。図の如く、大腸菌には2株と、かなり強い協同作用を認めたが、赤痢菌では、*Sh. flexneri* 2b は indifferent, *Sh. sonnei* には弱い協同作用しか認められなかった。

カ 5 図 BC+NM



(5) BC + NM

成績は第6図に示した。この場合も大腸菌では2株とも協同作用が認められたが、赤痢菌では、*Sh. flexneri* 2b には弱い協同作用しか認められず、*Sh. sonnei* には却つて軽度の拮抗作用が認められた。拮抗作用は NM 側にのみ起つた。すなわち BC が NM の抗菌作用を阻害している。逆に BC 側では協同作用が認められた。この成績は数回繰返し行なつてみたが、常に同様であつた。

実験 IV. Baramycin の抗菌力について

NM と BC の合剤である Baramycin の腸内細菌に対する抗菌力を検討した。Baramycin (BA) は NM 10 mcg, BC 1 u の比率の合剤であるが、前述の BC の腸内細菌に対する抗菌力より見て、BC 単独としての効果は通常の投与量では大して問題にならないと考えられ、稀釈法によつて BA 感受性を測定する場合にも、最小発育阻止濃度附近では、その中に含有される BC 濃度は、単独では大して発育阻止的な意味を持ち得ず、単に NM の抗菌力を強めるかどうかという補助的な役割が問題となるのみであろう。したがつて BA 感受性を測定してその中に含まれる BC 濃度を算出し、それと BC 単独の抗菌力を比較することは無意味である。それ故我々は BA 1 瓶中に含まれる NM の力価をもととして、すなわち一応 NM のみが含まれているものとして溶解稀釈を行なつた。したがつて表示した BA 濃度は、実は含有されている NM の濃度であつて、それ以外にその 1/10 u の BC を併せ含んでいるわけである。このようにして測定した BA 感受性を同時に測定した NM 感受性と比較した。供試菌株は *Sh. flexneri* 2b, *E. coli* O₁₁₁ 及び *E. coli* O₅₅ の3株、方法は tube dilution method である。成績を第3表に示した。表の如く、*E. coli* O₁₁₁ では BA

第3表 Baramycin と Neomycin の抗菌力の比較
Tube dilution method

菌 株	判 定 時 間	数字： 最小発育阻止濃度 mcg/cc	
		Neomycin	Baramycin (含有される NM の力価)
<i>Sh. flexneri</i> 2b	18	0.8	0.4
	48	0.8	0.8
<i>E. coli</i> O ₁₁₁	18	1.6	0.8
	48	1.6	0.8
<i>E. coli</i> O ₅₅	18	1.6	1.6
	48	1.6	1.6

の方が NM の 1/2 となつており、一応 BC が NM の抗菌力を強めたかの観を与えるが、他の2株では殆んど差を認めなかった。すなわち *E. coli* O₁₁₁ の場合も実験

誤差の範囲を出ないものである故、BC が NM の抗菌力をこのように少量で強める効果を持つとは考え難い。

考 按

BC がグラム陽性球菌其他 2~3 の病原体に対しかなり強い抗菌力を有することは SCUDI 等の報告⁷⁾によつても明らかであつて、米国においては既に臨床的に応用されている。しかしこれら球菌感染とは別に、アメーバ赤痢、^{8,9)}あるいは細菌性赤痢¹⁰⁾に対する治験例も報告されている。又 NM との合剤たる BA は乳児下痢症に対して有効^{11,12)}であり、NM と BC の間に相乗作用があるともいわれている。我々が今回主として腸内細菌について、BC の抗菌力及び他抗生物質との併用効果に関する実験を行つたのは、これらを検討する目的である。

BC に対する感受性を測定するに先立つて、感受性測定値に影響する諸種の因子について検討したが、これらの成績は我々が既に NM について得た成績と相似である。就中 tube dilution method と agar dilution method における接種菌量の影響の相違については PARKER,¹³⁾ MAY 等,¹⁴⁾ PAINE 等,¹⁵⁾ SCHATTEN 等¹⁶⁾が BC 及び他の抗生物質について述べている所と一致する。

保存株の BC 感受性を測定した成績では葡萄球菌にはかなり強い抗菌力が認められるが、腸内細菌には抗菌力が弱い。それ故このような菌の感染に対しては BC に直接の効果は期待できないと思われる。

各種抗生物質の併用効果については多くの報告があり、就中 JAWETZ 等,¹⁷⁾石山¹⁸⁾は抗生物質を 2 群に分類して一般的な推論を行なつている。JAWETZ 等によれば Penicillin, SM, NM, BC は第 1 群に属する抗生物質であつて、これら同志の併用では相乗作用のみが期待され、拮抗作用はないといわれる。しかし上述の成績では赤痢菌において、BC + SM で必ずしも協同作用が強くはなく、又 BC + NM で 1 株に軽度ではあるが拮抗作用を認めた。このような JAWETZ 等の仮説と一致しない成績の現われた理由が使用菌株の相違に由来するものであるにせよ、或は実験方法の相違に由来するものであるにせよ、いずれにしても抗生物質の併用効果について単純な一般的指針の得られないことを示すものであろう。元来併用効果は非常に複雑な多くの条件が重なり合つて生起するものと考えられ、それを単に抗生物質の組合せというような簡単な面から律しようとする時にはかなりの無理が生ずるものと考えられる。

我々の併用効果に関する実験に用いた BC の濃度は最小発育阻止濃度附近のものであつた。しかるに BA に含まれている BC は NM の 1/10 に相当し、NM, BC の腸内細菌に対する抗菌力から考える時、NM に較べて極

めて微量だと言わねばならぬ。このような条件下でなお BC が NM の抗菌力を増強するかどうかということは、前述の併用効果の実験では、範囲外におかれていた。そこで BA の抗菌力を改めて検討したわけである。大久保等¹⁹⁾は試験管内で稀釈法により BA の抗菌力を検討し、赤痢菌、大腸菌においても NM 単独よりも BA の方が抗菌力が強いと述べている。しかし我々の成績はこれと一致しなかつた。一般的に云つて、ほとんど完全に sublethal と思われる微量の抗生物質の添加が他の抗生物質の抗菌力を増強するということは考え難いではなからうか。

乳児下痢症等に対して BA が NM より有効であるとすれば、それは、恐らくは起炎菌であろうグラム陰性桿菌に対して、NM, BC が相乗的に働くということよりもむしろ、グラム陰性桿菌に対しては NM が直接作用し、BC は他の共生菌に作用して平衡を破り、全体として臨床経過を有利に導いたという可能性を考えねばならぬと思われる。しかし、かくの如きを相乗作用と称するならば、それは現在抗生物質の併用効果を論ずる上に用いられている「相乗作用」という用語の概念を越えたものというべきであらう。

結 論

BC について試験管内実験を行ない、以下の結論を得た。

(1) 先ず感受性測定値に影響する諸種因子について検討した。就中接種菌量の影響については、tube dilution method では接種菌量が大となる程感受性が鈍となるが、agar dilution method では変化がなかつた。

(2) Agar dilution method により赤痢菌、サルモネラ、大腸菌及び葡萄球菌の感受性を測定した。葡萄球菌に対しては最小発育阻止濃度 3.1 u/cc であつたが、他のグラム陰性桿菌に対しては抗菌力弱く 31~500 u/cc であつた。

(3) BC と AM, CM, TM, SM, NM との併用効果を検討した。BC+AM, BC+CM, BC+TM では赤痢菌、大腸菌ともかなりの協同作用を認めた。BC+SM, BC+NM では大腸菌ではかなりの協同作用を認めたが、赤痢菌は BC+SM で 1 株は極めて軽度の協同作用、1 株は indifferent, BC+NM で 1 株は極めて軽度の協同作用、1 株は軽度の拮抗作用を認めた。このような成績は JAWETZ 等の仮説と一致せず、抗生物質の併用効果を単に抗生物質の組合せ方といったような簡単な面からのみ割切ろうとするのは無理だと考えざるを得ない事実を得た。

(4) Baramycin の抗菌力を稀釈法で測定し NM 単

独の場合と比較した結果、微量の BC の添加は NM の抗菌力に影響するものではないことを観た。

拙筆するに当り、御指導、御校閲を賜った永井教授、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った結核研究所 佐川教授、並びに御援助頂いた教室員諸氏に深甚の謝意を表す。なお薬品を提供された小野薬品工業、三共製薬、武田薬品工業各株式会社に感謝する。

本論文の要旨は第 2 回日本化学療法学会総会において発表した。

主 要 文 献

- 1) JOHNSON, A. B., *et al.*: Science 102; 376, 1945.
- 2) 小林他: Chemotherapy 2 (5); 162, 1954.
- 3) 小林他: J. Antibiotics 掲載予定。
- 4) 小林他: J. Antibiotics 掲載予定。
- 5) 小 林: 京都大学結研紀要 2 (1); 52, 昭 28.
- 6) SCUDI, J. V. *et al.*: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 64; 503, 1947.
- 7) SCUDI, J. V. *et al.*: *ibid.* 65; 9, 1947.
- 8) GRAUPNER, I. *et al.*: Quart. Bull. Northwest. Univ. Med. School 24; 111, 1950.
- 9) MOST, H. *et al.*: J. A. M. A. 143; 792, 1950.
- 10) SIKERMAN, D. N.: Gastroenterology 19; 320, 1951.
- 11) FELSENFELD, O. *et al.*: Am. J. Pub. Health 41; 1078, 1951.
- 12) KADISON, E. R. & BOROVSKY, M. P.: J. Pediat. 38; 576, 1951.
- 13) PARKER, R. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 63; 443, 1946.
- 14) MAY, J. R. & MORLEY, C. W.: Lancet 1, 636, 1952.
- 15) PAINE, *et al.*: Ann. N. Y. Acad. Sci. 51; 228, 1948.
- 16) SCHATTEN, W. E. & PARKER, R. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 82; 574, 1953.
- 17) JAWETZ, E. *et al.*: J. Bact. 64; 29, 1952.
- 18) 石 山: 日本臨床 10 (8); 638, 昭 27.
- 19) 大久保他: 最新医学 9 (12); 183, 昭 29.