

新抗生物質 Gentamicin に関する細菌学的研究

中 沢 昭 三

東京大学伝染病研究所

横田芳武・金森政人・吉田進彦・石田邦子

京都薬科大学微生物学教室

本論文の要旨は昭和 41 年 12 月 2 日京都における第 14 回日本化学療法学会中日本支部総会シンポジウム“Gentamicin”において基礎的面より報告した。

はじめに

Gentamicin(GM) は、1963 年アメリカシェリング社の WEINSTEIN らが、*Micromonospora purpurea* および *Micromonospora echinospora* より得たストレプトマイシン、カナマイシン、フラジオマイシンに類似の塩基性物質である。化学構造は未定で、Aminosugar に極めて近似した構造を持つと思われる成分 C_1 と C_2 の Complex である。グラム陽性、陰性菌に感受性を示す広域スペクトラム抗生物質であり、とくにグラム陰性桿菌たる緑膿菌、変形菌、肺炎桿菌、大腸菌に強い感受性を示し、そのうちことに変形菌に対する抗菌力は強力で本菌による尿路感染症に優れた効果が認められている。

今回、私たちはこの新抗生物質 Gentamicin を用いて細菌学的研究を行ない、2, 3 の興味ある成績を得たのでここに報告する。

1) 抗菌スペクトラム

諸種病原細菌、ならびに医真菌についてその抗菌スペクトラムを検討した。実験は対照薬剤として、Colistin(COS), Fradiomycin(FRM), Kanamycin(KM), Aminocyclitol(AMD) を置き、全く同一条件でその抗菌力を比較検討した。なお使用薬剤の単位は表の欄外に記載したごとくである。使用培地はほとんど大部分の細菌については pH 7.2 の肉汁寒天培地を使用、なお *Streptococcus hemolyticus*, *Diplococcus pneumoniae* III については、10% 血液を加えた寒天培地を使用、又、*Neisseria* 属については 10% 血液加 G・C 培地を使用した。次は嫌気性菌群の *Clostridium tetani*, *Cl. welchii*, *Cl. botulinum* に関しては、チオグリコール酸塩培地を使用した。また、医真菌群である *Candida*, *Trichophyton* についてはサブロー寒天培地を用いた。なお培養時間については、*Candida* は 27°C 48 時間、*Trichophyton* は 27°C 7 日目に判定し、その他の一般細菌については、いずれも 37°C 24 時間で判定している。その成績は、第 1 表に示されるごとくである。すなわち、グラム陽性菌群についてはブドウ球菌群に対して 0.09 mcg/ml 前後でその増殖を阻止し、ジフテリア菌に対しては 1.56 mcg/

ml、炭疽菌には 0.04 mcg/ml という強い感受性を示している。同じ陽性菌群でも連鎖球菌、あるいは肺炎球菌に対する感受性はあまり強くはない。グラム陰性菌については、変形菌に 0.78 mcg/ml、緑膿菌に対しては 3 株検討しているが、1.56 から 3.13 mcg/ml の範囲でその増殖をおさえている。また、肺炎桿菌に対しても 0.09 mcg/ml という強い感受性をもっており、大腸菌、エロゲネス菌に対しては 0.195 から 0.78 mcg/ml の範囲内で感受性を示し、サルモネラ菌群に対しても 0.39 から 0.78 mcg/ml、また、赤痢菌群に対しても 0.39 から 1.56 mcg/ml の範囲で増殖をおさえている。しかし嫌気性菌群ではいずれも 50 から 100 mcg/ml という感受性で無効である。医真菌についても同じ成績を示している。なお抗酸性菌である結核菌については、1.56 mcg/ml という強い抗菌力が認められる。以上の成績を他の薬剤と比較検討すると、Gentamicin は最も広い抗菌スペクトラムを有し、また最も強い抗菌力を持つている抗生物質である。

2) 臨床分離細菌に対する GM の感受性

a) 緑膿菌に対する感受性

東京大学伝染病研究所の本間教授より分与された緑膿菌 18 株に対する GM の成績は、第 2 表に示されるごとくである。

すなわち標準株の感受性は既に上述した如く、1.56~3.13 mcg/ml の範囲にあり分離株 18 株の中 15 株は同様に 1.56~3.13 mcg/ml 残り 2 株は 6.25 mcg/ml 1 株、0.78 mcg/ml 1 株と殆んど標準株に近い感受性を示した。なお 1 株 100 mcg/ml 以上の耐性株が認められた。

b) 大腸菌に対する感受性

東京大学伝染病研究所付属病院検査室より分与された大腸菌 18 株の感受性は同じく第 2 表に示されるごとくである。

すなわち緑膿菌の場合と同様に標準株とほぼ同一感受性を示した。

3) GM 水溶液の安定性

GM 1,000 mcg/ml の水溶液をつくり、5°C、室温、37°C にそれぞれ保存し、一定期間ごとにその力価の減少を大腸菌を用いて抗菌作用の変動より検討した。その成績は第 3 表に示されるごとくである。すなわち約 3 カ

第1表 抗菌スペクトラム

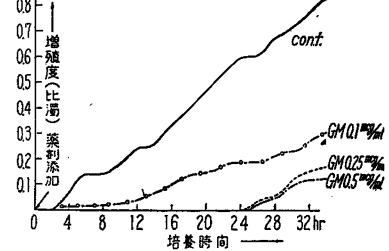
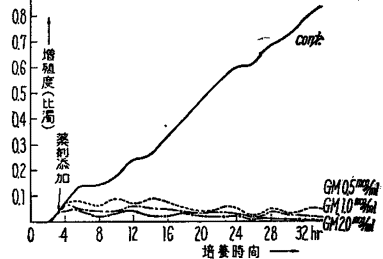
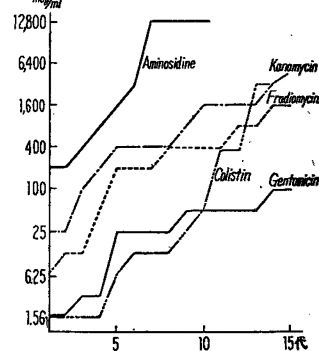
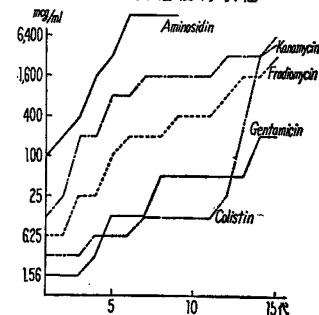
菌 種	COS	FRM	KM	GM	AMD
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	50	0.195	0.195	0.09	0.78
" " Terashima	12.5	0.195	0.39	0.09	0.39
" " Smith	25	0.195	0.39	0.04	0.39
" " Newman	50	0.39	0.78	0.09	0.78
<i>Staph. albus</i>	12.5	0.195	0.78	0.09	<0.09
<i>Staph. citreus</i>	12.5	0.78	3.13	0.09	12.5
<i>Sarcina lutea</i>	6.25	0.195	0.78	0.09	1.56
<i>Streptococcus hemolyticus</i> S-23	>100	50	50	25	100
<i>Str. viridans</i>	>100	50	50	12.5	>100
<i>Str. faecalis</i>	>100	50	>100	12.5	>100
<i>Diplococcus pneumoniae</i> III	>100	100	50	12.5	12.5
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	12.5	1.56	3.13	1.56	3.13
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-219	6.25	0.39	0.78	0.02	0.195
<i>B. anthracis</i>	50	0.195	0.78	0.04	1.56
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	25	25	50	12.5	50
<i>N. meningitidis</i>	12.5	100	100	50	50
<i>Proteus vulgaris</i>	3.13	1.56	0.78	0.78	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 1	1.56	6.25	25	1.56	>100
" " No. 2	3.13	6.25	12.5	3.13	>100
" " No. 3	3.13	6.25	12.5	3.13	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.78	0.195	0.78	0.09	3.13
<i>Escherichia coli</i> Denken	1.56	1.56	1.56	0.78	3.13
" " NIH	0.78	0.78	1.56	0.39	1.56
<i>Aerobacter aerogenes</i>	1.56	0.78	1.56	0.195	3.13
<i>Salmonella typhosa</i> T-287	0.78	1.56	0.78	0.78	3.13
" " H-901	1.56	0.78	1.56	0.39	3.13
" " O-901	1.56	1.56	0.39	0.78	3.13
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.78	3.13	6.25	1.56	25
<i>Shigella dysenteriae</i>	0.78	0.78	0.39	0.39	0.78
<i>Sh. flexneri</i> -2a	0.78	1.56	1.56	1.56	12.5
<i>Sh. boydii</i>	0.78	1.56	1.56	0.39	1.56
<i>Sh. sonnei</i>	0.78	1.56	1.56	0.78	12.5
<i>Clostridium tetani</i>	>100	100	>100	50	>100
<i>Cl. welchii</i>	100	100	100	50	>100
<i>Cl. botulinum</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Candida albicans</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Trichophyton rubrum</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>M. Tuberculosis</i> 607	25	3.12	1.56	1.56	3.12

MIC(mcg/ml)

Gentamicin sulfate, 629 mcg/mg
 Colistin sulfate, 19,650 u/mg
 Fradiomycin sulfate, 589 mcg/mg
 Kanamycin sulfate, 800 mcg/mg
 Aminocidin sulfate, 1,000 mcg/mg

月間の成績まで報告すると、全くいずれの条件においてもその力価の減少はみられなかつた。

4) GM の抗菌力に及ぼす諸因子の影響

第1図 *E. coli* Denken 増殖曲線に及ぼすGMの影響 (比濁法)第2図 *E. coli* Denken 増殖曲線に及ぼすGMの影響 比濁法第3図 *Pseudomonas aeruginosa* Na1の耐性獲得状態第4図 *Pseudomonas aeruginosa* Na2nの耐性獲得状態

GM の抗菌作用に及ぼす pH, 及び血清(馬血清)及び接種菌量による影響を検討した。

その成績は第4表に示されるごとくである。すなわち培地の pH の影響は、pH 6, 7, 8 の場合、抗菌力にはほとんど変動ないが、pH 5 あるいは9という場合は、GM の力価に影響を及ぼしたためと思われるが、表のようにやや抗菌力の減少を認めている。血清の影響をみると、加えておらない場合と 50% まで種々の添加量で検討しているが、全く抗菌力に変動がみられない。接種菌

量の影響をみると、表のようにやはり接種菌量が多くなるとその抗菌力に影響がみられている。

5) 細菌増殖曲線に及ぼす GM の影響

大腸菌伝研株を使ってその増殖曲線を比濁法により検討した。その成績は第1図及び第2図に示されるごとくである。まず第1図の培養当初に種々の濃度の GM を添加した場合には著明な誘導期の延長と対数期の抑制が認められた。また第2図のごとく対数期の当初に種々の

濃度の薬剤を添加した場合には、著明な対数期の抑制が認められた。

6) 耐性獲得状態

緑膿菌3株及び変形菌1株を用いて、

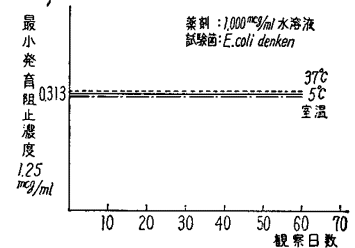
第2表 臨床分離緑膿菌及び大腸菌のGM感受性分布

試験菌種	GM	MIC mcg/ml										総数
		>100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	
緑膿菌		1				1	5	10	1			18
大腸菌							1	7	1	9		18

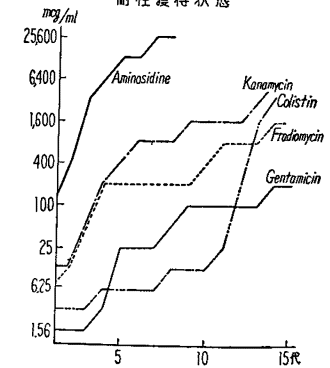
第4表 Gentamicin の抗菌力に及ぼす諸因子の影響
(*Pseudomonas aeruginosa* No.12 株使用)

	mcg/ml	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.195	0.09	cont.
pH	5	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	6	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	7	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	8	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	9	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
血清	0%	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	5	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	10	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	25	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	50	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
接種菌量	1.7×10^8	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	1.7×10^7	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	1.7×10^6	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	1.7×10^5	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	1.7×10^4	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+

第3表 Gentamicin 水溶液の安定性



第5図 *Pseudomonas aeruginosa* No.3 の耐性獲得状態



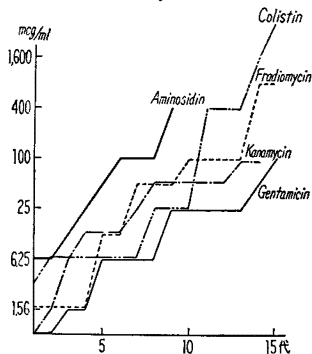
第5表 交叉耐性

(*Ps. aeruginosa*)

菌株	抗生物質	COS	PMX-B	FRM	VM	KM	KSM	GM	AMD
原株		3.13	3.9	12.5	1,000	100	500	3.13	62.5
COS-R 14 代目		400	250	6.25	2,000	200	500	6.25	62.5
FRM-R 15 代目		3.14	7.8	800	2,000	6,400	2,000	25	>16,000
VM-R 14 代目		6.25	7.8	50	8,000	200	4,000	12.5	1,000
KM-R 10 代目		6.25	3.9	800	1,000	>12,800	500	12.5	>16,000
KSM-R 14 代目		6.25	7.8	12.5	1,000	100	32,000	3.13	250
GNT-R 14 代目		6.25	7.8	400	8,000	800	500	100	>16,000
AMD-R 8 代目		6.25	3.9	200	2,000	1,600	500	12.5	>16,000

MIC(mcg/ml)

ホ6図 *Proteus vulgaris* の耐性獲得状態



pH 7.2 の肉汁ブイヨンを用いて 37°C 24 時間を 1 世代として常法の増量の継代法による耐性獲得状態を検討した。

この時、同一条件で抗菌スペクトラムの場合と同様に、COS, FRM, KM, AMD を比較対照薬剤として用いた。その成績は第 3, 4, 5, 6 図に示されるごとくである。まず緑膿菌 3 株の耐性獲得状態をみると、いずれの薬剤についてもほとんど同じような階段の上昇がみられる。とくにどの薬剤が最も耐性化が困難であるという成績は得られなかった。変形菌についてもほとんど同様な成績が得られた。

7) 交叉耐性 Cross Resistance

前項のごとくにして得られた緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* のそれぞれ薬剤に対する耐性菌を用いて各各交叉の薬剤間の交叉耐性を検討した。この場合、対照薬剤として先に述べた比較薬剤の他に Polymyxin B (PMX-B), Viomycin (VM), Kasugamycin (KM) をさらに追加している。その成績は第 5 表に示されるごとくである。それぞれ各薬剤の耐性度にはいろいろ差があるが、まず COS の耐性菌、すなわち原株は 3.13 mcg/ml のものが 400 mcg/ml に上昇した。これを考えてみると、これに対しては PMX-B は 3.9 mcg/ml の原株感受性が 250 mcg/ml となつてくるのでこの場合は予想通り COS と PMX-B の間には完全な交叉耐性がみられる。しかし、この COS 耐性菌は他の FRM, VM, KSM, GM, AMD についてみると原株とあまり変つていないから交叉耐性は認められないわけである。

次に、FRM については原株は 12.5 mcg/ml であったが、800 mcg/ml という高度耐性菌にすると、COS, PMX-B には交叉耐性は示さないが、VM に 2 倍に、KM には 100 mcg/ml から 6,400 mcg/ml というかなりの交叉が、また、KSM の 500 mcg/ml から 2,000 mcg/ml, GM は 3.13 mcg/ml から 25 mcg/ml と、こ

の場合交叉耐性がみられる。また、AMD には 62.5 mcg/ml より 16,000 mcg/ml 以上になり、たいへん強い交叉耐性が認められる。次に、VM あるいは KM に耐性にした場合には GM はそれぞれ 3.13 mcg/ml の原株は、12.5 mcg/ml というように約 4 倍の耐性が上昇してくるから交叉耐性はややみられるようである。同様に AMD に 62.5 mcg/ml の原株を、16,000 mcg/ml という高度耐性菌にした場合の GM は 3.13 mcg/ml から 12.5 mcg/ml と約 4 倍の耐性上昇がみられるからややこの場合も交叉耐性が認められている。しかし、これらの逆の場合、すなわち GM に高い、すなわち 100 mcg/ml という耐性菌にした場合をみると、AMD には 62.5 mcg/ml が 16,000 mcg/ml に上つてしまい、その他、KM は 100 mcg/ml から 800 mcg/ml に、VM も 1,000 mcg/ml から 8,000 mcg/ml, FRM も 12.5 mcg/ml から 400 mcg/ml と、このように軒なみに交叉耐性がでてしまう。

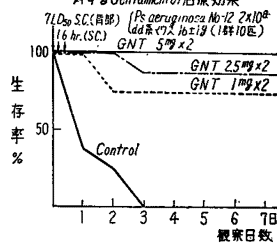
しかし、PMX や COS などにはあまり交叉耐性は認められていない。

8) 実験的細菌感染症に対する GM の治療効果

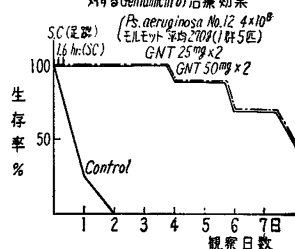
a) マウス実験的緑膿菌感染症に対する GM の効果

体重 16 ± 1 g の純系マウス (1 群 10 匹) に対して、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* No. 12 を 2×10^8 個 (7 LD₅₀) をマウスの背部皮下に接種し、1 時間後 6 時間後の 2 回に GM を 1 mg/マウス、あるいは 2.5 mg/マウス 5 mg/マウスをそれぞれ皮下注射し、その延命効果を 10 日間観察した。その成績は第 7 図に示されるご

ホ7図 マウス実験的緑膿菌感染症に対する Gentamicin の治療効果



ホ8図 モルモット実験的緑膿菌感染症に対する Gentamicin の治療効果



第6表 マウス実験の大腸菌感染症に対する治療効果

投与量 抗生物質	1 mg/mouse (%)	0.5 mg/mouse (%)	0.25 mg/mouse (%)	Cont.
GM	80	80	50	生存率 0%
KM	30	30	0	
AMD	70	40	20	

感 染 菌 : *E. coli* NIH 30 LD₅₀ I. P.

治療方法 : 2時間後1回皮下注射

とくである。すなわち対照群は3日以内にそれぞれ感染死するが、5 mg×2回投与群は100%、2.5 mg×2回投与群は約90%、1 mg×2回投与群はそれぞれ80%の生存率を示し、かなり優れた治療効果を認めた。

b) モルモット実験の緑膿菌感染症に対するGMの効果

平均体重270gのモルモット(1群5匹)に緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* No. 12 を 4×10^8 個足蹠皮下に接種し、前項と同様1時間後、6時間後に、GM 50 mg, 25 mg, 12.5 mg, 6.25 mg を2回皮下に投与、その延命効果をみた。その成績は第8図に示されるごとくである。すなわち7日間の観察においてはそれぞれ投与量に応じた延命効果が認められた。

c) マウス実験の大腸菌感染症に対するGMの効果

体重17g前後のマウス(1群10匹)に30 LD₅₀の大腸菌を3% ムチンを使用して腹腔内に接種し、2時間後に1回、GM及び対照薬剤としてKM, AMDを1 mg/マウス、0.5 mg/マウス、0.25 mg/マウス、皮下注射し、それぞれの治療効果を1週間観察し、その生存率を求めた。その成績は第6表に示されるごとくである。すなわちこの成績よりGMはKMよりもさらにすぐれ、また、AMDよりすぐれた治療効果を示した。

ま と め

新抗生物質 Gentamicin について細菌学的研究を行ない、その結果、GMは非常に広範囲の抗菌スペクトラムを有し、とくに緑膿菌にもすぐれた感受性をもっており、しかもこれらのグラム陽性、及び陰性菌に対する抗菌力は化学構造的に近似したFradiomycin, Kanamycinよりもさらにすぐれた作用を示した。

またそのGMは臨床的に分離された緑膿菌、あるいは大腸菌に対しても標準株と同様な良い感受性を示した。

次にGMの水溶液は非常に安定であり、約2ヵ月間、5℃室温37℃に保存してもその力価の減少は認められなかった。また、GMの抗菌力に及ぼすpH、血清蛋白の影響を調べたが、菌量の増加によりやや抗菌力の低下

を示す他、血清蛋白などの影響はあまり受けない事が認められた。次に、抗菌作用の型式を細菌の増殖曲線より検討したが、他の抗生物質同様、誘導期、及び対数期の抑制が認められた。

次に緑膿菌、及び変形菌を用いて試験管内耐性獲得状態を検討した。その獲得状態は階段的で比較薬剤たるKanamycin, Fradiomycin, Colistinなどと大差はみられなかった。

また、これら緑膿菌の各種薬剤耐性菌を作製し薬剤交互間の交叉耐性をも検討した。とくに、Fradiomycin耐性菌にはGMも耐性となり、また、Viomycin, Kanamycin, Aminocidinについてもやや交叉耐性が認められたことは化学構造の類似性を考えるならば、当然かと思われる。いつぼう、GM耐性菌になるとCOS, PMX-B, KSMを除いてFRM, VM, KM, AMDに対しては非常に高い交叉耐性が認められた。

次に、マウス、あるいはモルモットを用いた実験的緑膿菌感染症に対するGMの治療効果は従来の抗生物質で認められなかったほどすぐれた効果を得た。また、マウス実験的大腸菌感染症に対する治療効果も、比較薬剤であるKM, AMDをしのぐほどの治療効果を認めることができた。

稿を終るに当り、本研究に大へん便宜を与えて下さいました恩師、東大伝染病研究所 山本郁夫所長、緑膿菌に関する指導をして下さいました伝研 本間教授、宮崎講師に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) MARVIN J. WEINSTEIN, GEORGE M. LUEDEMANN, EDWIN M. ODEN & GERALD H. WAGMAN: Gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*-1963: 1~7
- 2) JACK BLACK, BENJAMIN CALESNICK, DAVID WILLIAMS & MARVIN J. WEINSTEIN: Pharmacology of gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*-1963: 138~147
- 3) MARY RUBENIS, VERA M. KOZIJ & GEORGE G. JACKSON: Laboratory studies on gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*-1963: 153~156
- 4) DANIEL R. SWEEDLER, CHARLES F. GRAVENKEMPER, ROGER J. BULGER, JEAN L. BRODIE & WILLIAM M. M. KIRBY: Laboratory and clinical studies on gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*-1963: 157~160
- 5) C. D. GRABER, H. H. STONE, L. KOLB & J. D. MARTIN, Jr.: *In vitro* sensitivity of bacterial flora from burned patients to gentamicin sulfate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*-1963: 161~163

BACTERIOLOGICAL STUDIES OF GENTAMICIN, A NEW ANTIBIOTIC

SHOZO NAKAZAWA

Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo

YOSHITAKE YOKOTA, MASATO KANEMORI, NOBUHIKO YOSHIDA
& KUNIKO ISHIDA

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical College

A new antibiotic substance gentamicin was studied bacteriologically. Its antibacterial spectrum including clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* was thereby found still broader and its antibacterial activity still better than fradiomycin and kanamycin of similar structure to gentamicin. In experimental treatment of *Esch. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* infected animals, too, gentamicin proved as effective as in *in vitro* experiments. Studies were also performed on the stability; effect of pH, serum and bacterial counts; mechanism of antibacterial action; resistance aquisition of bacteria; cross resistance, and so forth.