

病巣由来の各種細菌に対する Doxycycline の抗菌作用について

橋本 一・三橋 進

群馬大学医学部微生物学教室

緒 言

近年抗生剤の普及により、種々の感染症は激減したが、一方多剤耐性菌が、赤痢症¹⁾、ブドウ球菌感染症²⁾、グラム陰性菌感染症³⁾などで増加し、憂慮されている。これらの疾患に対処するために新しい薬剤の開発が続けられる一方、常用薬剤を改良する努力も続けられ、特に合成ペニシリンの進歩改良にはめざましいものがある。テトラサイクリン(TC)においても、従来のクロールテトラサイクリン(CTC)、オキシテトラサイクリン(OTC)に加えてこのたびドキシサイクリン(DOTC)が合成せられ⁴⁾、その抗菌力について、2,3の報告がなされている⁵⁾⁶⁾が、まだわが国における検討はない。わが教室には耐性ブドウ球菌研究会によつて集められた6,000株のブドウ球菌、耐性赤痢研究会によつて集められた10,000株の赤痢菌、およびグラム陰性桿菌研究会によつて集められた約2,000株のグラム陰性桿菌が種々の薬剤耐性を測定されて保存されているが、今回各会長、会員の了解を得て、これらの保存菌から選択された菌に対するDOTCの最大発育許容濃度(MAC)を測定しえたので、耐性獲得形式とも合わせここに報告する。

実験材料ならびに方法

薬剤:Chlortetracycline(CTC), Oxytetracycline(OTC), Tetracycline(TC), Doxycycline(DOTC)は台糖ファイザーより送付されたものである。力価はそれぞれ990, 1,000, 945, 852 mcg/mgのものを使用した。

菌株:ブドウ球菌は耐性ブ球菌研究会(班長:市川篤二博士)によつて集められた約6,000株の内、ファージ型、耐性型の異

なる100株を揃えて使用した。これらはいずれも人病巣由来のコアグラエ陽性株である。

赤痢菌は江崎唯人博士を班長として、わが国6大都市立病院および2,3の県衛生研究所を中心として整理、保存された約10,000株の内、種々の血清型および耐性型を示す100株を検査の対象とした。

グラム陰性桿菌は石山俊次教授を班長として編成された研究会によつて分離されたものおよび教室保存の標準株を用いた。

耐性測定:耐性値は最大発育許容濃度を用いた。各菌の18時間ペプトン水中培養菌を100倍にうすめ、それよ

第1表 種々のグラム陰性桿菌に対する4種TC誘導体の最大発育許容濃度

Strain	Drug-resistance (mcg/ml)			
	CTC	OTC	TC	DOTC
1 <i>Salmonella paratyphi</i> A 1015	0.8	0.8	0.8	1.6
2 <i>Salmonella paratyphi</i> B 8006	0.8	0.8	0.8	0.8
3 <i>Salmonella typhi</i> (Vi) 901	0.8	0.8	0.8	1.6
4 <i>Salmonella enteritidis</i> 11554	0.8	0.8	0.8	0.8
5 <i>Shigella flexneri</i> 2a (r ₄) JS 2997	100	100	100	100
6 <i>Shigella flexneri</i> 2a JS 700	0.4	0.8	0.8	0.4
7 <i>Shigella flexneri</i> 3a (r ₄) JS 2529	100	100	25	25
8 <i>Shigella flexneri</i> 3a JS 833	0.8	0.8	0.8	1.6
9 <i>Shigella sonnei</i> (r ₄) JS 949	100	100	25	25
10 <i>Shigella sonnei</i> JS 1337	0.4	0.8	0.8	0.8
11 <i>Escherichia coli</i> O-26	0.8	0.8	0.8	1.6
12 <i>Escherichia coli</i> O-111	0.4	0.8	0.8	0.4
13 <i>Escherichia coli</i> K-12 W 3630	0.2	0.8	0.8	0.2
14 <i>Escherichia freundii</i> Bal-107	0.4	0.8	0.8	0.4
15 <i>Escherichia freundii</i> Bal-315 F	0.4	0.8	0.4	0.4
16 <i>Arizona</i> D. C. 5	0.4	0.8	0.4	0.4
17 <i>Arizona</i> S. O. 50	0.8	0.8	0.8	1.6
18 <i>Proteus mirabilis</i> OX 19	0.4	0.8	0.8	0.4
19 <i>Proteus mirabilis</i> OX 2	1.6	0.8	1.6	0.4
20 <i>Pseudomonas pyogenes</i> GN 81	25	6.25	25	50
21 <i>Pseudomonas pyogenes</i> GN 350	50	50	50	100
22 <i>Klebsiella</i> GN 343	0.8	0.8	0.8	1.6
23 <i>Klebsiella</i> GN 350	0.8	0.8	1.6	1.6
24 <i>Vibrio parahemolyticus</i> 344-61	0.2	0.2	0.2	0.2
25 <i>Vibrio parahemolyticus</i> 3283-61	0.2	0.2	0.2	0.2

り 1 白金耳ずつ、2 倍階段希釈された TC 誘導体を含む Heart infusion (HI) 寒天(日水製薬)に滴下した。MAC の判定には対照平板に比し同程度の発育を示した最高濃度で表わした。

実験結果

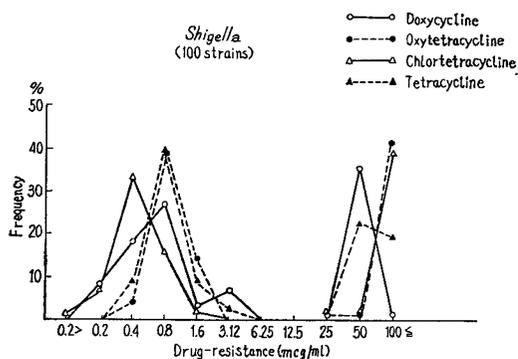
1. 腸内細菌の種々の属に対する最大発育許容濃度

種々の腸内細菌に対する耐性を第 1 表に示す。発育阻止効果は DOTC は他の 3 剤の TC と比し著明な優劣はない。従来の常用抗生剤が効かぬ多剤耐性菌には、やはり効果はなく、緑膿菌にも効果はなかつた。併し 3a および *sonnei* の 4 剤耐性赤痢菌 2 株に対しては、DOTC, TC はその他の CTC, OTC に比しやや効果あり、耐性値が 4 分の 1 であつた。

2. 種々の耐性型の赤痢菌 100 株に対する耐性度分布曲線

第 1 図に 100 株の赤痢菌の MAC 分布曲線を示した。耐性度分布の平均は感受性菌に関しては DOTC, OTC, TC 共に 0.8 mcg/ml であつた。CTC だけが分布の山が 1 段ずれて 0.4 mcg/ml であり、やや有効である傾向がみえた。耐性菌に対しては、CTC, OTC 共に 100 mcg/ml 以上であり、DOTC, TC が他の 2 者に比し 1 段低い値を示し 50 mcg/ml であつた。

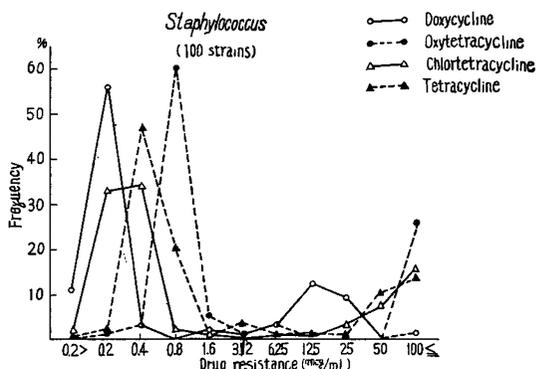
第 1 図 赤痢菌の耐性度分布



3. 病巣由来ブドウ球菌 100 株に対する耐性度分布曲線

種々の耐性型のブ菌 100 株に対する耐性値分布曲線を第 2 図に示した。DOTC は他の 3 薬剤に対し、明らかに有効であつた。感受性菌に対しては DOTC の分布の頂は 0.2 mcg/ml で TC, OTC に比してそれぞれ 1/2, 1/4 であり、CTC に比してもやや低い。更に耐性菌になると DOTC が独立した分布の山をつくり、12.5 mcg/ml に頂があつた。他のものはすべて 100 mcg/ml 以上であつた。すなわち DOTC は他の TC 誘導体より 8 分の 1 以下の MAC をもつことがわかつた。

第 2 図 ブドウ球菌の耐性度分布



4. TC 誘導体間の交叉耐性

グラム陰性菌でもブドウ球菌でも、4 種の TC 誘導体は殆んど完全な交叉耐性を示す。TC 以外に他の抗生剤に対する相関は認められなかつた。この 4 種の TC 誘導体相互の相関関係を更に詳しくみる目的で、1 つ 1 つの菌での耐性度の相関を図にしたのが第 3a, 3b, 3c 図である。

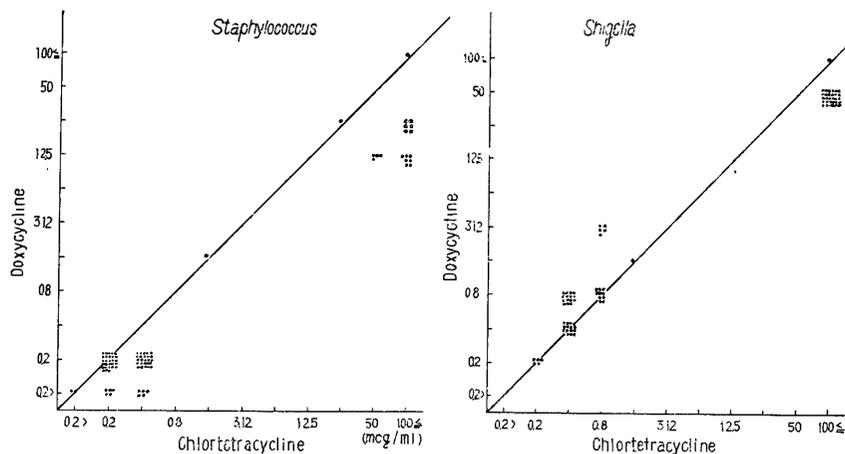
第 3a 図は DOTC と CTC との関係である。赤痢の感受性菌グループでは種々の点が 45° の直線上に分布しており耐性度の差がみられないが、耐性菌グループでは明らかに 45° 線の下にあり菌は DOTC へ感受性がより高いことがわかる。この傾向はブドウ球菌を対象とする一層明らかで、耐性菌には DOTC のほうが抗菌作用が強いことが示されている。

DOTC と OTC との相関は、第 3b 図にみられるように上にあげた傾向がより著しく表われている。特にブドウ球菌の感受性群は 4 倍以上 MAC が異なることがよく示されている。DOTC と TC との関係は第 3c 図に示される如く、第 3b 図と類似する。ブ菌でも赤痢菌でも、耐性菌では OTC や TC よりも DOTC に感受性を示すものが多いことが一目して明らかである。赤痢菌において僅か数株が DOTC 耐性だけが低く、他の誘導体に耐性なものが見られた。

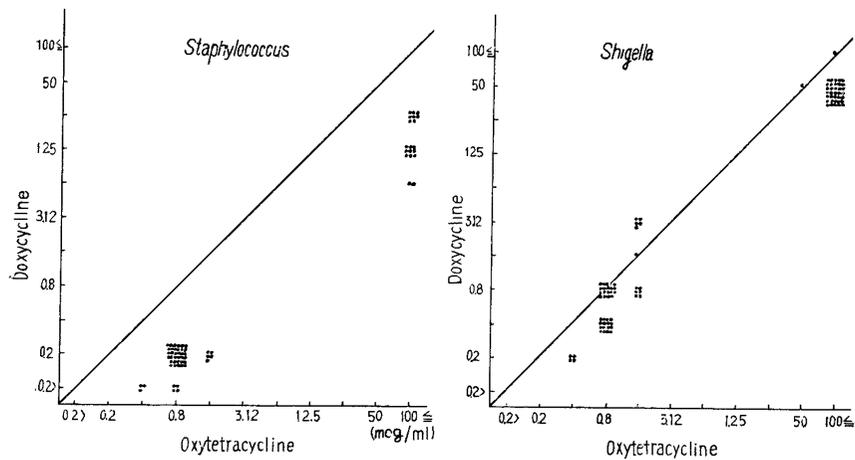
5. 耐性獲得試験

従来 TC 耐性菌は *in vitro* では得られにくく、得たとしても少しずつ段階的に耐性値が上昇するもので、自然耐性菌のような高度耐性を一挙にうることは難いとされている。DOTC を用いてブ菌、赤痢菌、大腸菌耐性上昇を *in vitro* で行なつても第 4 図の如く、段階的上昇がみられた。それを詳述すると使用菌株にブドウ球菌には教室保存の SA 1 剤耐性菌 MS 353, 赤痢菌としては *Sh. flexneri* 3a JS 833, *Sh. flex.* 2a JS 700, *Sh. sonnei* JS 1337, 大腸菌 K-12 株, W 3630 を用いた。

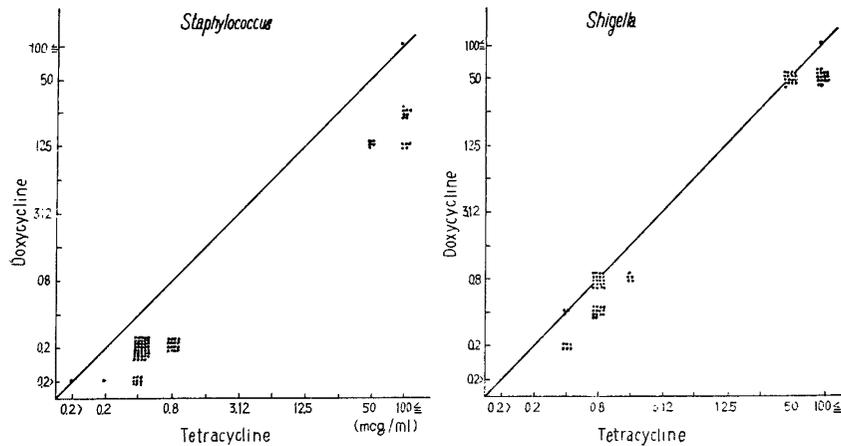
第3a図 DoxycyclineとChlortetracycline間の交叉耐性



第3b図 DoxycyclineとOxytetracycline間の交叉耐性

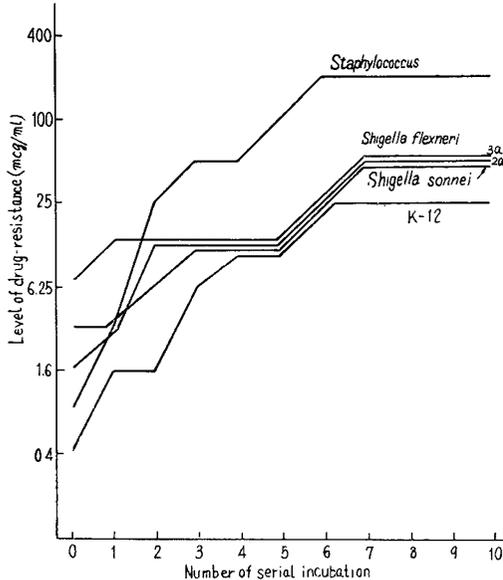


第3c図 DoxycyclineとTetracycline間の交叉耐性



Brain heart infusion (BHI) 培地中に増殖した被検菌 10^9 菌を、種々の濃度の DOTC 加 HI 平板上に接種、生育をみた最高濃度の平板上より菌苔を 1 白金耳とり、新しく BHI で増殖せしめて後、再び 10^9 菌を薬剤平板上に接種、この方法をくりかえし、10 度耐性上昇を試みた。

第 4 図 種々の感受性菌の *in vitro* における DOTC 耐性獲得



耐性化は頻度が計算されるような明瞭なコロニー形成を伴わず、またえられた耐性も非常に不安定である。3~4回のうえつきでブドウ球菌は 50 mcg/ml, 他のもは 12.5 mcg/ml まで生育するが、それ以後は耐性上昇は困難で、すぐ上記 50 mcg/ml, 12.5 mcg/ml まで耐性値が低下し易い。ブドウ球菌では 200 mcg/ml, 赤痢菌その他では 50 mcg/ml まで辛うじて生育するがそれ以上の耐性値のものは得られなかつた。DOTC も他の TC 誘導体と同じく *in vitro* における耐性値上昇は段階的であるが、自然界で分離される耐性菌はいずれも耐性値が高く、異なる機構で耐性の発現が行なわれているものと考えられた。

考 察

テトラサイクリン系薬剤は、臨床的に広汎に使用されている薬剤の内、作用機序も耐性機構も不明な薬剤である。しかしわが国においては既に昭和 28 年に赤痢菌における 2 例の TC 耐性菌の報告があり、昭和 31 年からは着々と耐性赤痢菌が増加し、33 年よりは Chloramphenicol (CM), Streptomycin (SM) と共にいわゆる多剤耐性菌として流行がみられるようになった⁷⁾。一方、グラム

陽性菌であるブドウ球菌による感染症においても、TC 耐性は多剤耐性として発現されるものが多い²⁾。現在 TC 耐性菌は更にグラム陰性桿菌症の起因菌としても、動物や人より分離される大腸菌からも高率に分離されるようになってい。これら耐性菌の TC 耐性度は殆んどすべて高度耐性で、耐性度分布曲線を画くと、感受性菌と耐性菌とは第 1, 2 図の如く、明らかな 2 峯性を画く。試験管内で感受性菌の耐性化を試みると、かかる耐性度の高いものは得られず、このような人工耐性菌は病原由来の耐性菌と異なる耐性機構をもつと考えられている。

合成ペニシリンの目ざましい開発進歩にならつて種々の薬剤の改良が試みられてきたが、作用機序の不明な TC の場合、抗菌力の変化が何に由来するかその解釈は困難である。Penicillin の場合は耐性ブドウ球菌の耐性度分布曲線では中等度耐性と高度耐性があり、Pheneticillin はこの中等度耐性に効果があることが知られている。Pheneticillin が耐性菌に効く割合は、PC 中等度耐性菌が耐性菌の内に占める割合を反映する⁸⁾。

しかし TC の場合、グラム陰性、陽性菌を問わず耐性菌の分布は単一峯である。従がつて、ある耐性型にだけ効果があるという形式で薬剤の改良を企てることは出来ない。図 3 にみられる如く、DOTC は他の TC 誘導体に比し、耐性菌または感受性菌の全集団に対して、抗菌力が同じかそれよりすぐれていることがみられた。これは TC 耐性が透過性の変化であるならば、母核の 6 の位置の OH が H になつたことで透過性に変化が起つたのか、あるいは透過性に変化を与える内部要因に変化を与えたかが考えられる。いずれにしても DOTC は他の TC 誘導体に比し、殊に耐性ブドウ球菌に対し数倍高い抗菌力があることが明らかになつた。

これらの結果は ENGLISH⁵⁾ や ROSENBLATT⁶⁾ の報告と一致している。すなわち彼らは感性大腸菌ならびにブドウ球菌において DOTC は TC に比し抗菌力に大差ないが、耐性ブドウ球菌には一様に著しい効果があると報告している。しかし耐性大腸菌に関しては ENGLISH は奇妙な現象を報告している。すなわち MIC で 100 mcg/ml 以上を示す 11 例の TC 耐性大腸菌が DOTC に対しては 2 例が 3.12 mcg/ml, 7 例が 31.2 mcg/ml で 2 例のみが 100 mcg/ml 以上であつた。この例では TC, DOTC 間の交叉耐性が必ずしも存在しないことになるがそれ以上の解析の報告はない。われわれの結果でも第 3 図にみられる如く、ブドウ球菌では DOTC と TC とは耐性度に平行関係がみられるが、赤痢菌の場合、TC 耐性度では耐性菌と感受性菌との明瞭な 2 群が区別されるに拘わらず、DOTC 耐性度では漸増的である。すなわち DOTC 3.12 mcg/ml 耐性菌の中に TC 50 mcg/ml 耐性のものと 0.8:

mcg/ml 耐性のもと2種類あるのがみられる。かかる耐性でありながら DOTC 感受性ともいえる菌株の存在は、TC 誘導体に完全な交叉耐性の存在しないこと、あるいは TC 耐性に2種以上の耐性機構があることを示唆しているがその遺伝学的解析は今後にまつ処である。われわれの結果ではかかる例外は、43 株中数株しかなく、大多数の例においては TC 誘導体のすべてに交叉耐性があるといつても間違ではない。

結 論

1) Doxycycline(α -6-Deoxyoxytetracycline)の抗菌作用を、Chlortetracycline, Oxytetracycline, Tetracycline と比較しつつ、人病巣由来グラム陰性桿菌、赤痢菌、ブドウ球菌を対象として検査した。

2) 種々のグラム陰性桿菌への耐性度は、4種の TC 誘導体で大差はない。耐性菌にはやはり効果はなく、交叉耐性がみられた。

3) 100 株の赤痢菌の耐性度分布曲線で DOTC は他のものより耐性度が低い。100 株のブドウ球菌で検すると、DOTC だけが明らかに低い耐性度の分布の山を示し、その平均は 12.5 mcg/ml で他の TC 誘導体より8倍以上にも低い。これらの関係は各菌株について耐性度の差を図にして考察しても明らかであった。DOTC は殊に耐性ブドウ球菌に効果が大きい。しかしどの菌株に対しても耐性菌は4種の TC 誘導体すべてに交叉耐性を示す。

4) 感受性菌の *in vitro* における耐性獲得は DOTC

においても段階的で病巣由来の耐性菌にみられる如き高度耐性菌は得られなかった。

文 献

- 1) MITSUHASHI, S.: Transmissible drug-resistance factor R. Gunma J. Med. Sci. 14: 169~209, 1965
- 2) MITSUHASHI, S.: Epidemiological and genetical study of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. Japan. J. Microbiol. 11: 49~68, 1967
- 3) グラム陰性桿菌研究会(班長, 石山俊次): 病巣由来グラム陰性桿菌の薬剤耐性について, 第15回化学療法学会総会, 名古屋, 5月, 1967
- 4) WITTENAU, M. S., J. J. BEEREBOOM, R. K. BLACKWOOD, & C. R. STEPHENS: J. Am. Chem. Soc. 84: 2645, 1962
- 5) ENGLISH, A. R.: α -6-Deoxyoxytetracycline, I. Some biological properties. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 122: 1107~1112, 1966
- 6) ROSENBLATT, J. E., J. E. BARRETT, J. L. BRODIE & W. M. M. KIRBY: Comparison of *in vitro* activity and clinical pharmacology of doxycycline with other tetracyclines. Antimicrob. Agents & Chemoth. 134~141, 1966
- 7) 三橋 進, 他: 腸内細菌の薬剤耐性に関する研究第4報, 薬剤耐性赤痢菌の推移と腸内細菌における多剤耐性の一般性について. 日本細菌学雑誌 15 (12): 1239~1242, Dec. 1960
- 8) 藤沢宏晏, 他: ブドウ球菌のペニシリン耐性について. 日本細菌学雑誌 19: 117, 1965

SUSCEPTIBILITY RESPONSE OF CLINICALLY ISOLATED BACTERIAL STRAINS TO DOXYCYCLINE

HAJIME HASHIMOTO & SUSUMU MITSUHASHI

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University, Maebashi, Japan

Antibacterial activity of doxycycline (DOTC, α -6-deoxyoxytetracycline) was compared with that of 3 tetracycline derivatives; chlortetracycline (CTC), oxytetracycline (OTC) and tetracycline (TC). The bacterial strains used were 27 gram-negative rod bacteria, 100 *Shigella* and 100 *staphylococci*, and were of clinical origin.

Level of DOTC resistance in most of the gram-negative bacteria including *Shigella* strains was similar to other TC derivatives. In TC resistant strains, however, DOTC was found to be slightly effective than OTC or CTC. Among the TC resistant *Shigella* strains, some strains showed high sensitivity to DOTC. In TC resistant *staphylococci*, the mean of DOTC was 8 times or more effective than 3 other TC derivatives. In TC sensitive *staphylococci*, DOTC and CTC were slightly effective than OTC and TC.

In vitro acquisition of DOTC resistance was studied by cultivation on the plate containing serial concentrations of the drug. Stepwise increase in drug-resistance took place but high degree of drug-resistance was not obtained so far as tested.