

## 新しいテトラサイクリン誘導体 Doxycycline に関する細菌学的研究

中 沢 昭 三

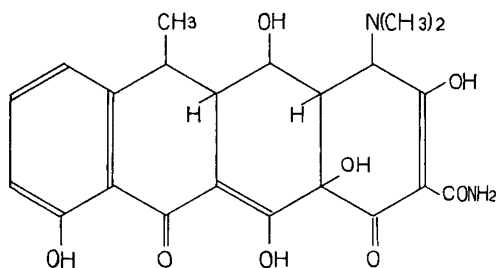
東京大学医科学研究所細菌学教室

小野尚子 小林楨子 小松初子

京都薬科大学微生物学教室

## はじめに

新しいテトラサイクリン誘導体である Doxycycline は1963年ファイザー研究所において Oxytetracycline の hydrogenation により合成されたもので  $\alpha$ -6-Deoxy-oxytetracycline で次の化学構造を示す。



塩酸塩は黄色結晶性物質である。特徴としては黄色ブドウ球菌を含めたグラム陽性菌に対して他の TC より *in vitro* で強力に作用を示すことおよびほとんど完全な吸収と半減期の延長で、1日1回少量投与で効果を挙げることが出来るといわれている。今回、私どもは細菌学的面より本物質の評価を行なった結果、次のごとき成績が得られたので報告する。

## 抗菌スペクトラム

研究室保存の標準菌種に対する Doxycycline(DOTC)の抗菌力を Tetracycline (TC) を対照として日本化学療法学会感受性測定法に準じて実施した。なおレンサ球菌、肺炎球菌、ジフテリア菌については10%血液を加え、リン菌、ズイ膜炎菌についてはGC培地を、また嫌気性菌群の破傷風菌、ボツリヌス菌、ウェルチー菌についてはチオグリコール酸塩培地を用いた液体希釈法により測定した。その成績は第1表に示される如くである。すなわち TC と全く同様にグラム陽性および陰性菌群と広い抗菌スペクトラムを示している。そして特徴として、各種細菌群に対する抗菌力を TC のそれと比較すると DOTC が2~4倍強力になっていることがわかる。

第1表 抗菌スペクトラム (mcg/ml)

菌 種	TC	DOTC
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	3.12	1.56
<i>Staphy. aureus</i> E46	6.25	1.56
東大若田教授分与株 <i>Staphy. albus</i>	6.25	1.56
<i>Streptococcus hemolyticus</i> S <sub>23</sub>	1.25	1.25
<i>Strept. viridans</i>	0.09	0.045
<i>Strept. faecalis</i>	0.19	0.09
<i>Sarcina lutea</i>	6.25	3.12
<i>Diplococcus pneumoniae</i> III	12.5	3.12
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	3.12	3.12
<i>Bacillus anthracis</i>	1.56	0.78
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-219	1.56	0.78
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.09	0.09
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.19	0.19
<i>Proteus vulgaris</i>	25	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.12	3.12
<i>Aerobacter aerogenes</i>	6.25	12.5
<i>Escherichia coli</i> 医科研	6.25	1.56
<i>E. coli</i> NIH	6.25	3.12
<i>Salmonella typhi</i> T-287	6.25	1.56
<i>Salmonella enteritidis</i>	12.5	12.5
<i>Shigella dysenteriae</i>	6.25	6.25
<i>Shigella sonnei</i>	12.5	6.25
<i>Shigella flexneri</i> 2a	12.5	6.25
<i>Shigella boydii</i>	12.5	6.25
<i>Clostridium tetani</i>	0.19	0.09
<i>Clostridium welchii</i>	0.09	0.045
<i>Clostridium botulinum</i>	1.56	0.39

## 臨床分離ブドウ球菌に対する感受性

1967年度臨床各科領域に於いて分離された病原ブドウ球菌約100株に対する感受性(MIC mcg/ml)を TC のそれと比較した。測定法は前記同様の日本化学療法学会標準法に依った。その成績は第2表(その1, 2)に示される如くである。すなわち TC 感受性株に対しては標準菌として置いたところの *Staphylococcus aureus* 209-P 株と

第2表 臨床分離病原ブドウ球菌の DOTC, TC に  
対する感受性 (その1) (mcg/ml)

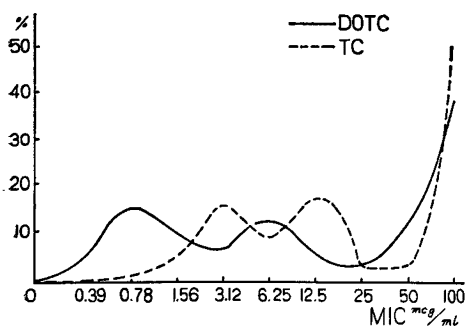
番号	DOTC	TC	番号	DOTC	TC
1	1.56	6.25	27	0.78	3.12
2	100	100	28	100	100
3	3.12	12.5	29	0.78	3.12
④	50	100	30	100	100
5			31	0.39	3.12
6	0.78	3.12	32	100	100
7	0.78	3.12	33	1.56	6.25
8	0.39	1.56	34	100	100
9	0.78	3.12	⑤	25	100
10	0.78	3.12	36		
11	100	100	37	6.25	12.5
12	100	100	38	0.78	3.12
13			39	12.5	50
14	6.25	12.5	40	0.78	3.12
15	100	100	41	100	100
16	100	100	42	1.56	6.25
17	100	100	43	100	100
18	100	100	44		
19	100	100	45	100	100
20	100	100	46	100	100
②①	50	100	47	6.25	12.5
②②	50	100	48	6.25	12.5
23	0.78	1.56	④⑨	50	100
24	1.56	6.25	50		
25	0.78	1.56	51	12.5	25
26	0.78	6.25	52	100	100

(その2) (mcg/ml)

番号	DOTC	TC	番号	DOTC	TC
53	100	100	80	100	100
54	3.12	12.5	81	12.5	25
55	100	100	82	3.12	12.5
56	100	100	83	1.56	3.12
57	100	100	84	12.5	25
58	100	100	⑧⑤	50	100
59	100	100	86	0.78	3.12
60	3.12	12.5	87	100	100
61	6.25	12.5	88	6.25	12.5
62	6.25	12.5	89	12.5	50
63	1.56	3.12	90	100	100
64	6.25	12.5	91	3.12	6.25
65	100	100	⑧⑥	50	100
⑥⑨	50	100	93	100	100
67	100	100		100	100
68	100	100	94	3.12	12.5
69	100	100	95	0.78	3.12
70	100	100	96	0.39	3.12
⑦①	50	100	97	6.25	12.5
72			98	1.56	6.25
⑦③	25	100	99	0.78	3.12
74	100	100	100	0.78	3.12
⑦⑤	50	100	101	6.25	12.5
76	100	100	102	6.25	12.5
77	100	100	103	6.25	12.5
78	1.56	6.25	209		
79	100	100	-P	1.56	6.25

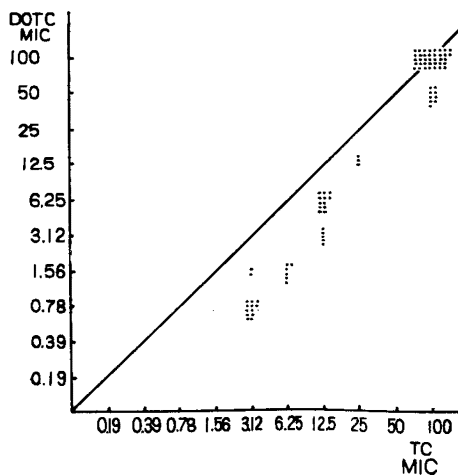
同様に 2~4 倍程度の抗菌力 (MIC mcg/ml) の増強が認められる。次に TC 100 mcg/ml の耐性株のあるものに対しても同様に 25~50 mcg/ml (○印) とかなり感受性化の傾向が認められる。しかし全く TC と同様に 100 mcg/ml の交叉耐性の認められる菌株も多い。今後これらの現象は深く究明する必要が有ろうと思われる。次に

第1図 臨床分離ブドウ球菌に対する DOTC, TC の感受性分布



感受性分布を調べると第1図の如くなり、DOTCがTCに比し全体の山が左側の感受性の方向に片寄っており、

第2図 DOTC, TC間の交叉耐性



TC より明らかに DOTC の感受性の増強が認められる。また 100 mcg/ml の所を見ても、その分布%は TC のそれに比し少なく、左側の 25~50 mcg/ml の感受性に傾いている。

次に DOTC と TC 間の交叉耐性を調べると第 2 図の如き相関グラフが得られ、この成績からでも完全に交叉耐性の認められる菌株と感受性化されている菌株が認められる。

抗菌作用に及ぼす諸因子の影響

I) 接種菌量の影響

肉汁ブイヨンによる液体希釈法に於いて種々の接種菌量を移植して、37°C 24 時間後の感受性の変動を調べた。

A) 感受性ブドウ球菌の場合

その成績は第 3 表 (その 1, 2) に示される如くで、すなわち *Staphylococcus aureus* 209-P 標準株を用いると、TC に比し DOTC は 10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup> 接種の感受性が皆同一の 1.56 mcg/ml となり、接種に対する影響が TC よりやや安定化している。

第 3 表 DOTC, TC の感受性—MIC に及ぼす接種菌量の影響

A. 感受性ブドウ球菌の場合 (その 1)  
DOTC *Staph. aureus* 209-P

Cell/ml \ MIC	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
2 × 10 <sup>9</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
× 10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
× 10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
× 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
× 10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	+

A. 感受性ブドウ球菌の場合 (その 2)  
TC *Staph. aureus* 209-P

Cell/ml \ MIC	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
2 × 10 <sup>9</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+
× 10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+
× 10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
× 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
× 10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+

B) TC 高度耐性ブドウ球菌の場合

この場合には前記の如く 100 mcg/ml 耐性菌に対して DOTC が全く同様に、100 mcg/ml の MIC を示す株と、

第 4 表

B. TC 高度耐性ブドウ球菌の場合

(a) 影響を受けない場合

(その 1)

DOTC *Staph. aureus* No. 2

Cell/ml \ MIC	≥ 100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
1 × 10 <sup>9</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>8</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>6</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>5</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>4</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+

(その 2)

TC *Staph. aureus* No. 2

Cell/ml \ MIC	≥ 100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
1 × 10 <sup>9</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>8</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>6</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>5</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>4</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

第 5 表

B. TC 高度耐性ブドウ球菌の場合

(b) 影響を受ける場合

(その 1)

DOTC *Staph. aureus* No. 35

Cell/ml \ MIC	≥ 100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
1 × 10 <sup>8</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>6</sup>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+
× 10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
× 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(その 2)

TC *Staph. aureus* No. 35

Cell/ml \ MIC	≥ 100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
1 × 10 <sup>8</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>6</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>5</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>4</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
× 10 <sup>3</sup>	-	-	-	+	+	+	+	+	+

かなり感受性化され 25 mcg/ml の MIC を示す株が存在するわけで、この両菌株について接種菌量の影響を調べた。

## a) 影響を受けない場合

その成績は第4表(その1, 2)に示される如くでDOTCはTCとほとんど同様に100 mcg/ml ~100 mcg/ml 以上のMICを各接種菌量で示した(わずかに $10^4$ の場合感受性の増強が見られる)。

## b) 影響を受ける場合

その成績は第5表(その1, 2)に示される如くでDOTCはTCに比し著明な抗菌力の増強が認められ接種菌量によりその影響は顕著である。例えば $10^6$ 接種の場合TCは100 mcg/mlであるがDOTCでは25 mcg/mlとなり、また $10^5$ ではTCは同じく100 mcg/mlであるがDOTCは6.25 mcg/mlとなり、更に接種菌量の少ない $10^4$ ではTC50 mcg/mlであるがDOTCでは3.12 mcg/mlと非常に良い感受性となる。

## II) 血清蛋白の影響

同様に *Staphylococcus* 209-P 株を用いて人血清蛋白添加による抗菌力の変動を調べた。その成績は第6表に示される如くでTCと同様なMICの変動が認められた。

## III) pHの影響

同様に抗菌力に及ぼすpHの影響を調べた。その成績は第7表に表される如くでpHの変化に対してはTCとやや異なり、pH 5~7の間では余りMICの変動が認められず0.39 mcg/mlと同一の感受性を示した。

## マウス実験的感染症に対する治療効果

## I) 溶血レンサ球菌感染症に対する効果

1群10匹のdd系マウス(体重 $18 \pm 1$ g)の腹腔内に *Streptococcus hemolyticus* S<sub>23</sub> 株を100 LD<sub>50</sub> 接種し、2時間後に1回DOTCあるいはTCを各々2.5mg経口投与し8日間その延命効果を観察した。その成績は第3図に示される如くでDOTCが60%の生存を示したのに対しTCでは40%であった。なお *in vitro* の

第6表 血清の影響

DOTC												
MIC mcg/ml	%	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.08
50		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
25		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

TC												
MIC mcg/ml	%	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.08
50		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
25		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
10		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
5		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

第7表 pHの影響

DOTC												
MIC mcg/ml	pH	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.08
5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
8		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
9		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

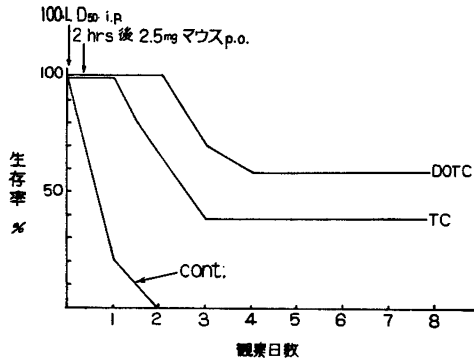
TC												
MIC mcg/ml	pH	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.08
5		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
7		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
9		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

MICは何れも1.25 mcg/mlと同一感受性でありDOTCの生体内効果の増強が認められた。

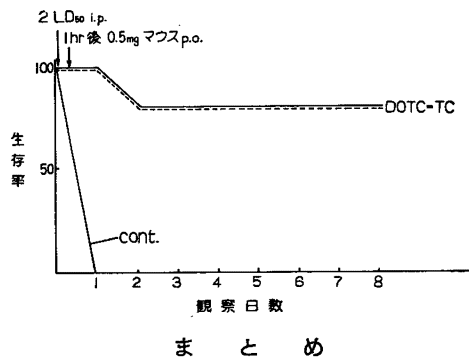
## II) 大腸菌感染症に対する効果

1群10匹のdd系マウス(体重 $16 \pm 1$ g)の腹腔内に *Escherichia coli* NIH 株を2 LD<sub>50</sub> と3% Mucinを併用して接種し、1時間後に1回DOTCあるいはTCを各々0.5mg経口投与し8日間観察を続けたところ、第4図に示される如く両抗生物質の効果は全く同様に80%の生存率を示した。なお本菌株に対する *in vitro* のMICはDOTC 3.12 mcg/ml, TC 6.25 mcg/mlであった。

第3図 実験的溶血レンサ球菌感染症に対する効果



第4図 マウス実験的大腸菌感染症に対する効果



## ま と め

新しいテトラサイクリン誘導体 Doxycycline(DOTC) は Tetracycline (TC) と同一の抗菌スペクトラムを有し、しかもその試験管内抗菌力は2~4倍増強されている。臨床分離ブドウ球菌約100株の感受性試験の結果特に面白い事実は、約60%に認められたTC高度耐性株(MIC 100 mcg/ml)のうち約20%の菌株は25~50 mcg/mlのMICとなりやや感受性化の傾向が見られ、接種菌量の減少によつては更に著しい感受性化の傾向が認めら

れる。残りの約80%は完全な交叉耐性が認められDOTCに対しても100 mcg/mlを示した。一方、TC感受性株に対してはやはり2~4倍の感受性の増強が認められた。

血清蛋白の添加による感受性の変動はTCと同傾向であった。またpHの変化による影響ではDOTCのほうがやや安定であった。マウス実験的感染症に対する治療効果については、溶血レンサ球菌感染症に対してはTCより優れた効果が認められたが、大腸菌感染症の治療効果ではTCと全く同一の効果しか得られなかつた。今後更に多くの菌種、菌株について検討する必要があると思う。

稿を終るに当り本研究に協力された教室の人見淳子、藤野常子氏に厚く感謝する。

## 参 考 文 献

- 1) M. T. PEREZ-URENA & A. PORTOLES: "In vitro" bacterial study with a new antibiotic substance: Doxycycline. Proceedings V. Intern. Conf. Chemoth. Wien, 1967
- 2) HENRY D. ISENBERG & MARIE SIEGEL: In vitro activity of  $\alpha$ -6-deoxy-5-oxytetracycline against bacteria from clinical material. Intersci. Conf. Antimicrob. 6: 80~81, Oct. 26~28, 1966
- 3) A. R. ENGLISH & J. E. LYNCH:  $\alpha$ -6-Deoxyoxytetracycline, II. Activity in chemotherapeutic studies in the mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 124: 586~691, Feb. 1967
- 4) 中沢昭三, 天野 翠, 池上田鶴子, 和佐敏夫: 新テトラサイクリン誘導体 Tetracycline-6-methylene-lysine に関する基礎的研究。Chemotherapy 13 (3): 146~152, 1965
- 5) 山本郁夫, 中沢昭三, 板垣守正, 西野武志, 宮川和子: 新しいテトラサイクリン誘導体 Methacycline に関する細菌学的研究。Chemotherapy 16 (1): 90~92, 1968

## BACTERIOLOGICAL STUDY ON DOXYCYCLINE, A NEW TETRACYCLINE DERIVATIVE

SHOZO NAKAZAWA

The Institute of Medical Science, University of Tokyo

HISAKO ONO, MAKIKO KOBAYASHI &amp; HATSUKO KOMATSU

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The new tetracycline derivative, doxycycline, has the same antibacterial spectrum as tetracycline but the *in vitro* antibacterial activity is 2 to 4 times more potent. Especially the interesting thing about the results of the sensitivity studies on approximately 100 clinical isolates of *staphylococci* is that

approximately 60% of the strains showed high resistance to tetracycline with MIC of 100 mcg/ml and approximately 20% of those showed a somewhat sensitive tendency to doxycycline with MIC of 25~50 mcg/ml, and this tendency of sensitivity increase became marked by decreasing the inoculum size. The remaining 80% of the strains showed complete cross resistance, the MIC against doxycycline being also 100 mcg/ml.

On the other hand, doxycycline showed 2 to 4 times more activity against tetracycline sensitive strains.

The same tendency for the change in sensitivity due to the addition of serum protein was seen as with tetracycline. Doxycycline was somewhat more stable in regard to the influence by the change of pH. In experimental infections in the mouse, therapeutic results with doxycycline in hemolytic streptococcal infections were superior to tetracycline but the results in *E. coli* infections were the same as tetracycline. There would be a need to conduct further studies on additional staphylococcal strains.