

Doxycycline の抗菌作用に関する研究, 特に Tetracycline との比較検討

徐 慶 一 郎

関東通信病院臨床検査科

三 辺 武 右 衛 門

関東通信病院耳鼻咽喉科

生 亀 芳 男

関東通信病院泌尿器科

Pfizer 研究所で, メタサイクリンから新たに合成された広範囲抗生物質 Doxycycline (DOTC: Vibramycin) は, Tetracycline (TC) に比し, より少量で有効なことが述べられている。そこで, 我々も両薬剤の抗菌作用を以下の諸点から比較検討した。

- 1) 臨床各科の病巣材料から最近分離された菌株に対する両薬剤の抗菌作用
- 2) 両薬剤の投与後の血中濃度
- 3) 同じく, 同薬剤投与後血清の *Staph. aureus* 209 P 株増殖曲線に及ぼす影響

実験材料と実験方法

1) 病巣分離株の感受性測定法

本剤感受性を測定した菌株は, 診療各科 (特に耳鼻科, 泌尿器科) 患者病巣由来のもので, その大部分は, 最近分離されたものである。

MIC の測定方法は, 化学療法学会標準法案による抗生物質感受性測定法に従った。即ち感受性ディスク用培地 (ニッサン) 使用の寒天平板希釈法で, 抗生物質は 100 mcg/ml より 2 倍希釈の 10 段階を, また, トリプトソイブイオン (栄研) に 18~24 時間増菌培養した被検菌を白金耳で抗生物質含有寒天平板培地に画線塗抹, 18~24 時間培養後, 結果を判定した。

2) 血中濃度測定法

被検薬剤の一定量 (DOTC 200 mg, TC 1,000 mg) を経口投与し, 1, 2, 4 時間後に採血, 血清を分離, 使用時までディープフリーザー (-20°C) に保存した。

血中濃度の測定は, ファイザー社の標準法に若干変更を加えた以下述べる術式に従った。即ち, 試験菌としては本剤に感受性の高い *Bacillus cereus var. mycoides* ATCC 9634 を使用し, 培地として, 試験菌増菌用としては, 1L 当りペプトン 6.0 g, 肉エキス 1.5 g, トリプテケース 4.0 g, ブドウ糖 1.0 g, イーストエキス 3.0 g, 寒天 15.0 g, pH 6.6 補正を使用, また, 血中濃度測定用としては, 1L 当り, ペプトン 6.0 g, 肉エキス 1.5 g,

イーストエキス 23.0 g, 寒天 15.0 g, pH 5.7 補正を使用した。

保存菌を 300 ml の増殖用培地を入れた Roux びんに接種, 27°C 7 日間培養後, 50 ml の滅菌水で菌体を集め, 65°C 30 分加熱処理後遠心洗滌 3 回くり返し, 最後に 30 ml の滅菌水に浮遊し試験用菌懸濁原液とした。

検定用平板は, 血中濃度測定用培地 (上記) 1,000 ml に, 試験菌懸濁液 0.2 ml を混和し, この菌添加培地 10 ml ずつを, 正しく水平位置においた径 9.0 cm のプラスチックシャーレに分注作製した。

次に, 各シャーレに径 6 mm の小穴を等間隔に 4 個, 同口径の金属穴開け器に水流ポンプを連結吸引することにより作製した。

抗生剤の標準希釈系列を, 3.5% の割合に Bovine albumin fraction V を混じた磷酸緩衝液 (pH 4.5) で作り, また被検血清を磷酸緩衝液 (pH 4.5) で 3 倍に希釈した。

上記, 寒天平板の小穴に, それぞれ抗生剤の標準液および 3 倍希釈の被検血清の各 2 滴 (0.04 ml) を標準滴下用ピペットで滴下投与し, 37°C に培養した。

結果の判定は, 翌日 (18~20 時間後) 各阻止円の径を測定し, 標準曲線を作製し, 被検血清の濃度を標準曲線のそれと比較, 力価を判定, 希釈率を換算し, 血中濃度を得た。

3) *Staph. aureus* 209 P 株の増殖曲線に及ぼす各種薬剤の作用測定

培地として, 透明度ならびに増殖効果の優れたトリプトソイブイオン (BBL) を使用, 増殖曲線を, Biophotometer により自動記録した。

本実験に際しては, 各キューベットに被検血清 1.0 ml, 菌液 ($10^5 \sim 10^6$ 生菌単位/ml) 1.0 ml に, ブイオン 8 ml を加え, 37°C で培養した。

実験成績

1) 病巣分離菌の感受性測定成績 (Fig. 1)

病巣分離菌株のグラム陽性菌 32 株 (*Staph. aureus* 25, ..

Fig. 1 The TC and DOTC sensitivity of newly isolated strains

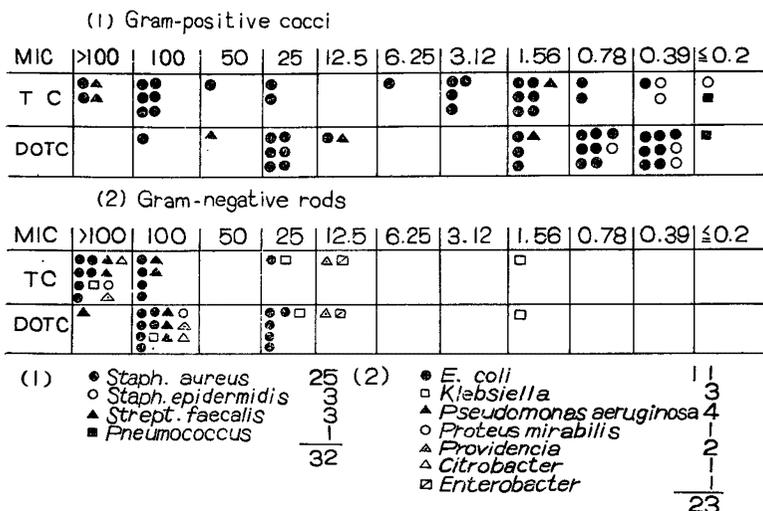
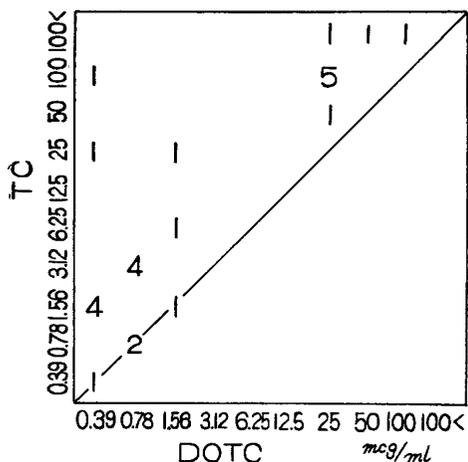


Fig. 2 The TC and DOTC sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains



Staph. epid. 3, *Strept. faecalis* 3, *Pneumococcus* 1) グラム陰性桿菌 23 株 (*E. coli* 11, *Proteus mirabilis* 1, *Klebsiella* 3, *Pseudomonas* 4, *Enterobacter* 1, *Providencia* 2, *Citrobacter* 1) 計 55 株の TC, DOTC の感受性を表示すると Fig. 1 の如くで、その *Staph. aureus* 25 株の両薬剤に対する感性値の相関を表示すると Fig. 2 の如くで、DOTC の方が、TC に較べ、明らかに高いことが示された。また、グラム陰性桿菌についても、同様に、DOTC 値が TC に較べて高いことが示された。この中で、*E. coli* 以外のグラム陰性桿菌 (*Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* など) についても、程度の差はあるにしても、12.5 mcg/ml ないし 100

mcg/ml の MIC 値を示した。

2) 血中濃度測定成績

3名の被検者各々に、時をかえて TC 1,000 mg, DOTC 200 mg をそれぞれ1回経口投与し、投与前、投与後1, 2, 4時間に採血して、その血中濃度を測定した処、Table 1 の(A)項に示される値が得られた。

即ち、TC 投与後1, 2, 4時間値は、症例 T.A, M.I, K.A でそれぞれ 0.1, 3.6, 6.0, -0.1, 0.9, 3.0 および 0.2, 1.9, 3.8 であり、DOTC 投与後、1, 2, 4時間値は、症例 T.A, M.I, K.A でそれぞれ 0.9, 3.6, 3.6 -1.8, 3.6, 3.0 および 1.2,

3.0, 2.1 を示した。TC 1,000 mg と DOTC 200 mg 投与が、ほぼ等しい効果を示し、特に後者において、血中濃度上昇のより速やかなことが認められた。

3) 薬剤投与血清の 209 P 株増殖曲線に及ぼす影響

TC 1,000 mg, DOTC 200 mg 各1回投与後の血清は、

Table 1 Antibiotics concentration and growth inhibitory action of serum after TC and DOTC administration.

TC (Achromycin) 1,000 mg per os 1x

Cases		1 hr	2 hrs	4 hrs
1) T.A	A)	0.1	3.6	6.0
	B)	(±)	(+)	(+)
2) M.I	A)	0.1	0.9	3.0
	B)	(-)	(+)	(+)
3) K.A	A)	0.2	1.9	3.8
	B)	(-)	(+)	(+)

DOTC (Doxycycline) 200 mg per os 1x

Cases		1 hr	2 hrs	4 hrs
1) T.A	A)	0.9	3.6	3.6
	B)	(+)	(+)	(+)
2) M.I	A)	1.8	3.6	3.0
	B)	(+)	(+)	(+)
3) K.A	A)	1.2	3.0	2.1
	B)	(+)	(+)	(+)

(A) Concentration in serum
(B) Status of growth inhibition estimated from growth curve of 209-P strain
(+) Complete inhibition
(+) Incomplete inhibition

Fig. 3 The anti-staphylococcal growth inhibitory action of doxycycline and tetracycline

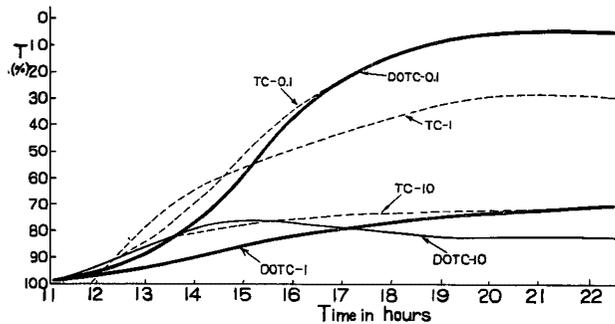


Fig. 4 The anti-staphylococcal growth inhibitory action of serum after DOTC administration

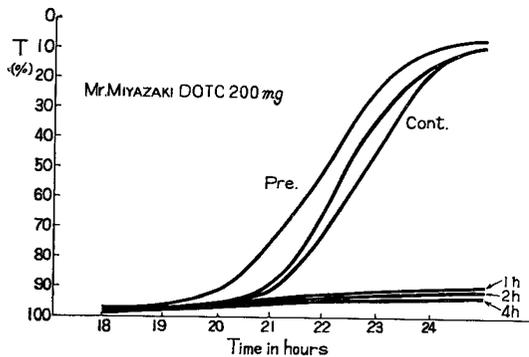
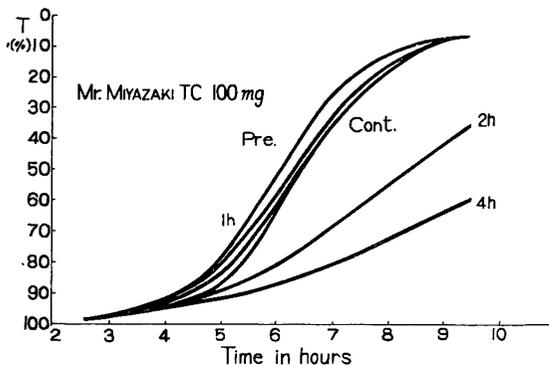


Fig. 5 The anti-staphylococcal growth inhibitory action of serum after TC administration



209 P 株増殖阻止作用を示し、増殖曲線に変化を与えるが、TC 1,000 mg と DOTC 200 mg 投与時を比較すると増殖効果の出現時期が後者においてもより速やかであり、投与 1 時間後、後者では、その効果が明瞭であるが、前者では明瞭でなかつた。

血清の増殖曲線に及ぼす影響から、血清の保持する抗

菌力価を、 \uparrow , $+$, \pm で示すと、Table 1 の如くなり、血中濃度とその強さは、ほぼ、平行することが明らかにされた。

なお、209 P 増殖におよぼす TC および DOTC の直接抗菌力を検討してみると、最終濃度が 10 mcg/ml では、両剤とも完全な増殖阻止、1 mcg/ml では部分的阻止、0.1 mcg/ml では阻止されないことが確かめられた (Fig. 3, 4, 5)。

考 按

1) DOTC の抗菌作用が TC に較べより高いことが、本剤の特長とされているが、我々は最近患者病巣より分離された 55 株の諸菌の MIC を測定することにより追試した。

MIC 測定値の両薬剤間の差は、*Staph. aureus* において著明であるが、グラム陰性桿菌についてもその傾向は認められた。

2) 血中濃度に関して感受性の高い *B. cereus* の芽胞を用いることは、極めて合理的であり、微量濃度の検出に適している。

我々は、ファイザー社のカップ法を若干変更し、寒天穴 (Agar well) 法を初めて試みたが、穴あけ操作が予想より容易であり、標準曲線の上からも良い結果が得られた。

この際抗生剤の標準稀釈列には、被検体が血清である関係から、溶媒として、Bovine albumin fraction V を混じた緩衝液を用いたが、緩衝液のみを用いた場合と較べて明らかに差がみられ、前者を標準とした場合より高値が得られる結果になった。

また、被検血清を緩衝液 (pH 4.5) で 3 倍に稀釈することにより、より感度が上昇する傾向が認められた。

3) 薬剤投与後血清の 209 P 株増殖曲線に及ぼす影響 Biophotometer を使用することにより、菌の増殖曲線を自動記録することが可能になり、我々は、薬剤投与後血清の抗菌力測定にこれを応用している。この利点は、菌に及ぼす抗菌力の作用様式を或る程度知り得ることにある。また、患者より起因菌が分離されるときは、その分離菌株を用いて、薬剤の効果判定を行なうことが可能になる。

従来、分離菌株の薬剤感受性スペクトルを知り、使用薬剤の選択を行なつて来た。しかし薬剤を用いた時、生体内で真に有効であつたかどうかの判定は容易でない。そこで薬剤投与後の血清が、真に抗菌力を持つかどうかは、別の観点から重要であり、この目的で Biophotometer を用いた抗菌力測定が有利である。

従来の血中濃度測定値と、今回行なつた増殖曲線に基づく抗菌力測定成績とは、よく相関することが判明した。増殖曲線において、薬剤の有効性は、誘導期の延長、曲線の傾斜の変化、特に曲線の低下（溶菌現象）などにより明らかにされる。

また、実施上問題になるのは、接種菌の量とその状態であり、経験的にブイヨン 16 時間培養の菌液を 1,000 倍希釈し、使用するのが妥当と考えられる。

結 論

1) 最近患者病巣から分離された 55 株の本剤に対する感受性測定成績から、本剤に対する MIC が、TC のそれより一般に 2~3 管低く、より少量の投与で有効なことが明らかにされた。

2) 本剤投与後の血中濃度測定成績から、本剤 200 mg 投与で、TC 1,000 mg 投与に優るとも劣らない成績が得られ、特に、血中出现が、より速やかなことが明らかにされた。

3) 本剤投与後血清の抗菌力を 209 P 株増殖曲線に及ぼす影響から検討してみると、従来の血中濃度測定値と相関する成績が得られ、その抗菌力は、増殖曲線における誘導期の延長、曲線傾斜の変化などにより示された。

3 症例の Cross over test によつて TC と DOTC

の抗菌力を測定した処、DOTC 200 mg 投与で TC 1,000 mg 投与に匹敵する強さを示すことが明らかにされ、また、TC に較べ本剤の吸収のより速やかなことも明らかにされた。

参 考 文 献

- 1) FABRE, J., *et al.*: Distribution and excretion of doxycycline in man. *Chemotherapia* 11: 73~85, 1966
- 2) ROSENBLATT, J. E., *et al.*: Comparison of *in vitro* activity and clinical pharmacology of doxycycline with other tetracyclines. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* p. 134~141, 1966
- 3) BONET-MAURY, P. & WALLEN, R. J.: Photomètre différentiel pour l'enregistrement automatique des courbes de multiplication bactérienne. *Ann. Inst. Pasteur* 71: 284~291, 1945
- 4) COULTAS, M. K. & HUTCHISON, D. J.: Response of *Streptococcus faecalis* to a photochemically modified medium. *Bacteriol. Proc.* p. 55
- 5) 徐 慶一郎: Biophotometer (Jouan) の構造と使用方法。メデアサークル 12: 95~103, 1967

STUDIES ON THE ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF DOXYCYCLINE

KEIICHIRO JO, BUEMON SANBE & YOSHIO IKI

Departments of Central Laboratories,
Oto-Rhino-Laryngology and Urology,
Kanto Teishin Hospital

1) The newly isolated 55 strains including 32 gram (+) cocci and 23 gram (-) rods were tested for the sensitivity to TC and DOTC. From the results obtained concerning MIC value, DOTC showed more active than TC especially in the former group including *Staphylococcus aureus* strains.

2) The TC and DOTC serum levels after each single oral administration of 1,000 mg and 200 mg respectively were measured by modified standard method of Pfizer Laboratory, and also antistaphylococcal activity of these sera were analyzed by their effects on the growth curve of 209 P strain automatically recorded by biophotometer (Jouan).

From the results, it was demonstrated by both methods that DOTC appears in serum earlier than TC, and smaller dose is sufficient enough to obtain an effective concentration there than TC.