

Carbencillin の緑膿菌に対する作用

本間 遜・熊沢洋子・横手規子

東京大学医科学研究所細菌研究部

〔I〕はじめに

緑膿菌に対する抗生物質は、Colistin, Polymyxin, Gentamicin 等があるが、緑膿菌症の場合長期にわたって用いる関係上、副作用の問題もあつて、なお新しい抗生物質の出現が待望されている。

Carbencillin (CB-PC と略記) は最近開発されたペニシリン誘導体で、緑膿菌、変形菌に対して有効に作用するとのことであるので、私達は緑膿菌について検討を行なつてみた。

まず、本菌の特徴として解離の現象があり、これについては塩野谷、本間の最近の報告¹⁾があるから参照されたい。すなわち、解離株はピオシン・ファージに対する感受性を著しく異にしているし、血清反応の質的相違はみられないもの、O抗原に対する反応性の強弱を異にし、あるいは自然凝集性の出現の問題があるので、解離の現象を考慮外にして本菌の研究を進めることはできない。

そこでまず“la型”と“sm型”について感受性の相違の有無をしらべた。ついで緑膿菌中の Carbencillin 感受性の分布状態、つまり感受性の高いもの、低いもの、中等度のものに分けて他の抗生物質に対する感受性を比較し、抗生物質相互の感受性、耐性に関連があるかどうかをしらべた。また本間ら²⁾の血清型別と感受性との関連性の有無もしらべてみた。最後に、CB-PC による Protoplast の形成がおこるかどうかについてしらべた。

〔II〕実験材料および方法

A) 材 料

喀痰(肺結核、筋萎縮症)、大便(赤痢)、膿(直腸切断手術後の旧肛門部感染巣、肋骨カリエス、胸部膿瘍)、耳漏(慢性中耳炎)、尿(慢性腎盂腎炎、膀胱腫瘍)等の患者材料から分離された88株を用いた。これらは本間らの血清別によつて T₁ から T₁₀ まで分類されている。

内訳は T₁ は11株、T₂ は3株、T₃ は3株、T₄ は11株、T₅ は11株、T₆ は5株、T₇ は11株、T₈ は11株、T₉ は11株、T₁₀ は11株である。

B) 感受性測定方法

1) 感受性試験は KNUDSEN 等記載の方法³⁾に準じた。すなわち、ブイオンにうえ 37°C に1晩培養した。その

時の吸光度が 0.07~0.8 くらいまで分布したので、吸光度 0.1~0.3 の間、すなわち菌数としては 10⁸/ml になるようにブイオンにより希釈した菌液を用意した。

2) 斜面にうえ、37°C 1晩培養した菌をブイオンに入れ、10⁸/ml になるようにした。

また、CB-PC を滅菌蒸留水にとかし、それを倍々希釈し、各々の 1 ml を普通寒天の溶液状のもの 19 ml と混釈し、CB-PC の終濃度 0.78 mcg/ml 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 をつくり、シャーレに注ぎ固まらせた。この寒天の表面に前記の菌液 1 ユーゼをおき、1晩 37°C 培養後判定した。判定に関しては、ほぼ菌液をおいたあと、いちように孤立した集落がみとめられたものは (+) とし、数個の集落をもつだけの時は (±)、全く生えないときは (-) とした。(±) の場合、数個の集落は耐性が上つていることを証明した。

CB-PC 以外の抗生物質と用意された濃度。Kanamycin (KM) 6.25 mcg/ml~400 mcg/ml, Chloramphenicol (CP) 12.5 mcg/ml~800 mcg/ml, Streptomycin (SM) 12.5 mcg/ml~800 mcg/ml, Penicillin-G (PC-G) 62.5 units/ml~500 units/ml, Gentamicin (GM) 0.075 mcg/ml~25 mcg/ml, Polymyxin-B (PL-B) 1.6 mcg/ml~50 mcg/ml, 硫酸 Colistin (CL) 31.25 units/ml~2,000 units/ml。

〔III〕実験結果

1) 解離による感受性の相違

緑膿菌は解離の現象が著しく、解離株間には種々の性状の相違がみられる。塩野谷、本間は最近これを研究し、その著しいものについて la 型と sm 型と名付けた¹⁾。今日の実験では 20 株を用いたが、20 株のうち、15 株が la 型と sm 型に解離をおこした。感受性試験の方法は前記〔II〕の方法によつた。この la 型と sm 型との間の CB-PC 感受性の違いは図 1 に示した。すなわち la 型の最小阻止濃度 (MIC) を基準にし、sm 型の MIC との感受性の差は MIC (sm 型)/MIC (la 型)=2ⁿ とし、横軸に x をとり、縦軸にその差をもつ菌株数を示している。14 株については +1 より -2 までに分布している。14 株の x の平均値がマイナスに傾いているのは、sm 型では菌膜をつくり、ブイオン中でいちよりの菌液ができず、混合

した時も菌塊の状態をかなり保つので、1mlあたりの菌数が la 型より低くなるための効果と推定される。しかし、1株由来の la 型と sm 型には 2^6 の差ができた。このようなことが、どの程度の頻度におこるか、またその理由は不明である。また、この15株のうちに標準株は含まれていない。

2) 菌株の CB-PC 感受性テスト

88株の CB-PC 感受性について、方法は前記(1)の感受性試験を行ない、各々の菌株について MIC を示す菌株数を図2に示した。

MIC が 50 mcg/ml のものが一番多く 50% を占める。

MIC が 25 mcg/ml, 50 mcg/ml, 100 mcg/ml のものの合計は80%である。もつとも感受性の低いものでも、MIC を 800 mcg/ml にもち、もつとも感受性のたかいものは 0.78 mcg/ml にもつ。CB-PC 濃度は両者のあいだに 2^{10} 倍の差がある。

3) CB-PC 感受性と他の抗生物質との感受性との間
の相関々係の有無

表1の No.1にはCB-PC感受性株 (MIC 0.78 mcg/ml~6.25 mcg/ml), No.2には中等度感受性株 (MIC 25 mcg/ml~100 mcg/ml), No.3は非感受性株 (MIC 200 mcg/ml~800 mcg/ml) を集め、それぞれの株の抗

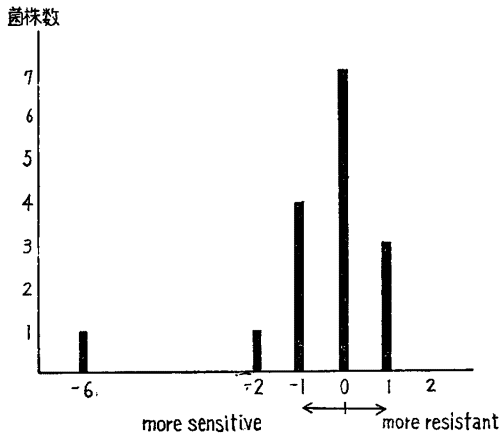


図1 La型を基準としたとき Sm 型の感受性の違い

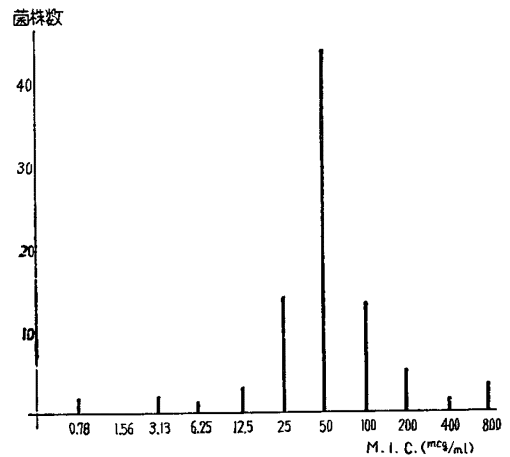


図2 緑膿菌の Carbenicillin の感受性

表1 Carbenicillin と他の抗生物質との感受性 (MIC)

No.	菌株名	カルベニシリン (mcg/ml)	PC-G (u/ml)	KM (mcg/ml)	SM (mcg/ml)	CP (mcg/ml)	GM (mcg/ml)	PL-B (mcg/ml)	CL (u/ml)
1	NCTC 10490	0.78	500<	400	50	800	12.5	6.25	125
	N 6	3.1	500<	100	200	100	0.3	3.1	62.5
	W14	3.1	500<	400<	200	100	12.5	50	125
	H 11	6.25	500<	100	800<	100	25	50<	2,000<
2	P 3	25	500<	200	800<	200	12.5	6.25	2,000<
	NCA	50	500<	400	800<	200	12.5	3.1	2,000<
	T 12	50	500<	400<	800<	400	12.5	50<	2,000<
	NIOA	100	500<	400<	800<	400	25<	6.25	2,000<
	K 27	100	500<	200	200	400	2.5	6.25	125
	T 13	100	500<	400	200	200	5	25	125
	D 243	100	500<	200	200	200	2.5	6.25	125
3	T 9	200	500<	200	200	800	12.5	6.25	125
	D 218	200	500<	200	200	400	12.5	6.25	125
	U 71	800	500<	400<	800<	800<	12.5	12.5	125
	U 69	800	500<	400<	800<	800<	12.5	50	125

生物質 PC-G, KM, SM, CP, GM, PL-B, CL に対する感受性をしらべた。その結果, PC-G, KM, SM, CP 耐性の緑膿菌の CB-PC 感受性との相関々係は見出されなかつた。少なくとも PC-G, KM, SM, CP の 4 剤の耐性株の中に CB-PC 感受性を示す株が見出された。また CL 感受性との間にも関連はみとめられず, CL 耐性でも CB-PC 感受性の株があつた。いつぼう CL 感受性と PL-B および GM 感受性との間にも関連は見出されなかつた^{5,6)}。

4) 血清型と CB-PC 感受性について

血清型は本間らにより T₁ より T₁₀ まで分類されている。T₁ より T₁₀ までの MIC と菌株数は表 2 に示されている。これより, 各々の血清型と CB-PC 感受性の間に差があるとはいえない。

5) Protoplast 形成

MIC 0.78 mcg/ml の NCTC 10490 株に MIC の 8 倍濃度の 6.25 mcg/ml, いつぼう MIC 400 mcg/ml の W 1 株には 400 mcg/ml になるよう CB-PC を加え, シュクロース 0.4M 加ブイオン中で 10⁸/ml の菌液をつくり, 37°C, 1 時間振盪培養した後, 位相差顕微鏡下で検鏡すると NCTC 10490 株, W 1 株のどちらの標本でも活発に運動する桿菌をみとめた。さらに 3 時間, すなわち振盪培養 4 時間したものを検鏡すると, NCTC 10490 株ではほぼ 90%, W 1 株では全体の 30% 程度が球状となつた。球状になつた菌は活発な活動はみられなくなり, ブラウン運動をしていた。また桿菌としての形態をとどめるものも運動性の低下をみた。NCTC 10490 株をブイオンのみの場合と, 0.4 M シュクロース加のブイオンの菌液をつくり, 1 時間振盪培養して, 各々に CB-PC を加え終濃度 1,000 mcg/ml にした。対照として CB-PC を加えぬものをつくつた。時間をおつてしらべた結果は図 3

----- 対照 CB-PC - Sucrose -
 —●— CB-PC 1,000mcg/ml Sucrose -
 -x-x- CB-PC 1,000mcg/ml Sucrose 0.4M

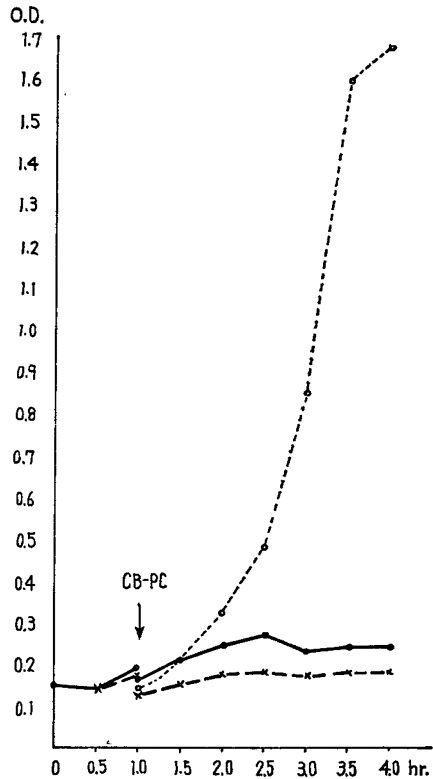


図 3 CB-PC 投与と吸光度 (670mμ) の時間的変化

表 2 血清型と Carbenicillin 感受性との関係

血清型	CB-PC (mcg/ml)												計
	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	300	400	600	
T ₁	1					1	5	2	1			1	11
T ₂						1	2						3
T ₃				1			2						3
T ₄					1	1	8	1					11
T ₅	1				1	1	7	1					11
T ₆						4	1						5
T ₇					1	4	2	1	3				11
T ₈						2	5	4					11
T ₉			2				4	2	1			2	11
T ₁₀							8	2		1			11
計	2	0	2	1	3	14	44	13	5	1	0	3	88

のとおり、吸光度に変化が認められたが、シュクロースの入ったものと入らぬものに差は認められなかつた。また、これを顕微鏡でみたものが図4であるが、全視野に球状の Protoplast と思われる菌体を認めることができた。



図4

さらにシュクロースを含み、CB-PC と作用させてできた Protoplast を遠心 (5,000回30分) して上清を捨て、ブイヨンに浮遊させた Protoplast を普通寒天にまき、37°C 1晩培養すると沢山の集落を形成する。しかし、その集落の大きさはいちようではなく大小様々であるが、さらに、この大小の集落を継代したときは、集落は同一の性状を示した。

この Protoplast の性状についてはさらに研究中である。

(IV) 考 察

Carbenicillin 感受性は 88 株についてしらべた。その両極端には 2^{10} 倍の差が見出されたが、大多数は 50 mcg/ml を中心に分布していた。

ブドウ球菌の Penicillinase により Carbenicillin は不活化される⁷⁾。しかし、CB-PC に特に感受性を有する緑膿菌標準株 (0.78 mcg/ml) に対する PC-G の MIC は 4,000 units/ml であつた。PC-G 耐性でも Carbenicillin 感受性株があることは注目すべきである。また Carbenicillin も Penicillin と同様の作用機作を示すと考えられることから、この事実は興味あることである。また、CL と PL-B とは同じ類型の抗生物質と考えられているが、少なくとも今回の実験からは、両者の感受性が平行していることは見出されなかつた。すなわち、CL と PL-B はいつぼうが耐性でも他に感受性であることを臨牀的に注意する必要がある。血清型と Carbenicillin 感受性に相互に平行な関係がみとめられなかつたことは、血清型を決定する因子と直接的関係を推定できない。Carbenicillin の作用機作は PC-G と同様にムコペプチドの合成阻害と考えられるだろうが、PC-G との感受性の差は何に由来するものであろうか。高濃度の Carbenicillin の作用によつてほとんど

100%桿菌としてはみとめられなくなつたが、これが真の Protoplast かどうか、この Protoplast がリゾチーム/EDTA によるものと同様のものであるかどうかは、今後の検討にまたねばならない。

(V) 結 論

Carbenicillin の緑膿菌に対する作用をしらべ、以下のような結果をえた。

1) 15株からそれぞれ解離株“la型”と“sm型”(文献参照)を分離し、両型の間 Carbenicillin 感受性に相異があるかどうかしらべた。

その結果、1例に相異を見出したが、その他には見出されなかつた。

2) 88株について Carbenicillin 感受性を調べた結果、感受性の度合は広範に分布し、その両極端では 2^{10} の差が見出された。しかし被験株の約50%は最小阻止濃度 (MIC) は 50 mcg/ml であり、約 80% の MIC は 25 mcg/ml と 100 mcg/ml の間に入る。

3) Carbenicillin に対する感受性と他の抗生物質 PC-G, KM, SM, CP, GM, PL-B, CL に対する感受性との間に相関々係は見出されなかつた。Carbenicillin 以外の緑膿菌に有効な他の抗生剤に耐性であつても、あるものは Carbenicillin 感受性であつた。同時に CL 耐性株中に PL-B, GM 感受性株が見出された。したがつて、臨床には必ずそれぞれの感受性を調べた上で応用すべきである。

4) 10種の型別血清によつて分類された菌株間に Carbenicillin 感受性についての差は見出されなかつた。

5) Carbenicillin 感受性株 (0.78 mcg/ml) でも耐性株 (400 mcg/ml) でも形態、学的に Protoplast と思われるものの形成をみた。その化学的、生物学的性状は今後の研究によつて明らかにされる予定である。

文 献

- (1) H. SHIONOYA & J. Y. HOMMA: Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. Japan. J. Exp. Med. 1967 (in Press), 日本細菌学会雑誌印刷中
- (2) 本間遜, 塩野谷博, 金桂守, 目黒道大, 山田紘子: 未発表
参考論文 本間遜, 塩野谷博, 金桂守, 目黒道大, 高松良子: 緑膿菌の血清型別と感染, 第17回日本医学会総会学術講演集 II: p. 198, 1967
- (3) E. T. KNUDSEN, G. N. ROLINSON & R. SUTHERLAND: Carbenicillin; a new semisynthetic penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*. Brit. Med. J. 8 July 1967.

- (4) W. BRUMFITT & A. PENCIVAL, D. A. LEIGH: Clinical and laboratory studies with carbenicillin. *Lancet* 1, 289—1, 293 June 17, 1967
- (5) 山地幸雄・高橋昌巳・宮永嘉隆・留目優子・本山三生
- 1965年以降病巣由来グラム陰性桿菌の抗生物質感受性: 第15回化学療法学会, 1967.
- (6) W. W. WRIGHT & H. WELCH: Chemical, biological and clinical observation on Colistin. *Antibiotics Annual* 61~74, 1959—1960

ACTIVITY OF CARBENICILLIN ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

J. YUZURU HOMMA, YOKO KUMAZAWA & NORIKO YOKOTE

Department of Bacteriology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Activity of carbenicillin on *Pseudomonas aeruginosa* was investigated with the following results.

1) Two kinds of dissociants "type la" and "type sm" isolated from each of the 15 strains, were tested and compared with each other. No difference could be found between the two types except in one case.

2) Eighty-eight strains of *Ps. aeruginosa* were tested on their sensitivity to carbenicillin and found quite different from each other. The minimum inhibitory concentration (M.I.C.) of each of the strains was found scattered over a wide range, the concentration difference between the extremities being 2^{10} . About 50 per cent of the 88 strains, however, as found to have M.I.C. of 50 mcg/ml, and about 80 per cent of them within a range from 25 mcg/ml to 100 mcg/ml.

3) No correlation was found between the sensitivity of *Ps. aeruginosa* against carbenicillin and the one against other antibiotics PC-G, KM, SM, CP, GM, PL-B and CL. Among strains that were found resistant to the latter antibiotics, which were effective to *Ps. aeruginosa*, there were some that were sensitive to carbenicillin. There were also found some strains that were resistant to CL-M, while at the same time sensitive to both PL-B and GM. Therefore, it will be advisable in clinical application of *Ps. aeruginosa* to test them on their sensitivity against each of antibiotics which are supposed to be effective to *Ps. aeruginosa*.

4) Among the 10 kinds of strains classified by serological typing (cf. reference 2) could be found no difference in sensitivity to carbenicillin.

5) Protoplast formation could be observed by phase microscopy in either case whether a strain sensitive to carbenicillin (0.78 mcg/ml) or a strain resistant to it (400 mcg/ml) was used. Further studies are needed to clarify the chemico-physical and biological properties of the protoplast.