

ブドウ球菌に対する Spiramycin と Chloramphenicol の併用効果

清水 幹 夫・三 橋 進

群馬大・医・微生物

小 田 倉 義 博

協和醸酵KK

(昭和 45 年 2 月 5 日受付)

緒 言

近年、抗生物質の普及により、種々の感染症は激減したが、これと同時に多剤耐性菌の出現、増加が臨床問題になつてきている。¹⁾ 有効な新薬の開発は最も正当な進め方であるが、この方面の研究の進歩の速度が低下してきている現在においては、これの対策が立てられねばならぬ。その1つには古くから知られている抗生剤の併用がある。合剤の意義として、①抗菌スペクトルの拡大、②耐性化の防止、③協力作用による薬剤の最少有効量の減少および副作用の軽減、などが考えられている。これに加えて、ブドウ球菌(ブ菌)の場合、④耐性誘導株における耐性誘導抑制が必要である。Macrolide 抗生物質(Mac)に関して、既に Oleandomycin と Chloramphenicol, Leucomycin と Chloramphenicol の合剤の有効性が報告され^{2,3)}、臨床に導入されている。Spiramycin と Chloramphenicol の併用効果に関しても、既に報告がある^{4,5)} が、我々もブ菌に対して、*in vitro* で合剤の効果を検討したので報告する。

実験方法

薬剤: Spiramycin (SP, 協和醸酵KK), Chloramphenicol (CP, 三共KK), Erythromycin (EM, 日本アップジョンKK), Oleandomycin (OM, 万有製薬KK), Leucomycin (LM, 東洋醸造KK) および Lincomycin (LCM, 日本アップジョンKK) を使用した。

菌株: 1968年に耐性ブ菌研究会(班長: 市川篤二博士)によつて集められたブ菌から190株を選んで、薬剤耐性検査をし、この中から100株について、SPとCPの併用における耐性度分布を調べた。

耐性度測定: 各菌の18時間ペプトン水での培養菌を100倍に稀釈し、これを1白金耳ずつ、HIA plate(2倍階段稀釈した薬剤を含む heart infusion agar, 日本製薬)に滴下し、37°C 18時間培養する。そして、薬剤のない plate に示すと同程度の発育を示す薬剤加 plate の最大薬剤濃度(MAC)をもつて、その菌の耐性度とした⁶⁾。耐性度の表現は、その薬剤100 mcg/mlを10とし、その2倍階段稀釈を用い、9(50 mcg/ml), 8(25 mcg/ml)……として表現した。

耐性誘導: Subinhibitory な濃度の薬剤を inducer として加えた BHI(brain heart infusion, Difco) broth に、前培養したブ菌液の20分の1量を加え、37°C 1時間振盪培養し、耐性値の上昇を調べた⁷⁾。Inducer 濃度として、EMは0.1 mcg/ml, SPは0.5 mcg/mlを用いた。

実験結果

(1) Macrolide(Mac) 抗生物質における SP の位置
表1は190株中の Mac および LCM 耐性ブ菌の出現率を示す。1961~1965年にくらべ、耐性菌は増加している⁸⁾。耐性パターンは、表2に示すように、全 Mac 耐性に LCM 耐性が加わつた型が62.9%、EM 単独耐性型が24.3%と、この2つの型で大半を占める。その他に、少数の EM, OM 型、これに LM や SP が加わつた型が分離される。全 Mac 耐性型は400 mcg/ml以上の高度耐性を示すのが特徴的である。耐性誘導(indu-

表1 耐性菌の分離頻度(1968年度分離190株中)

		EM	OM	LM	SP	LCM
耐性菌*	株数	70	53	51	50	44
	%	36	27	26	26	23

* 耐性菌の基準は耐性値(MAC)が、EM 1.6 mcg/ml以上、OM, LM および LCM 3.2 mcg/ml以上、SP 6.3 mcg/ml以上のものとした。

表2 Macrolide および LCM 耐性パターン

耐性型	株数	%	耐性型	株数	%
EM	17	24.3	EM, OM, LM, SP	6	8.6
EM, OM	2	2.8	EM, OM, LM, SP	44	62.9
EM, OM, LM	1	1.4	LCM		

表3 耐性誘導株

検査株数*	耐性誘導株数	
	E M誘導	S P誘導
50	37	0

* SP 6.3 mcg/ml 以下の菌株50株について、耐性誘導の有無を調べた

cible) 株は、SP 耐性の低い型 (EM 型, EM, OM 型, EM, OM, LM 型) の菌株に見出されるのが普通である。時には、見かけ上、Mac に感受性の菌株にも inducible 株が見出されることがある。そこで、SP 耐性度の低い株 (SP 耐性値が 6.25 mcg/ml 以下) のブ菌 50 株を選んで、耐性誘導 (induction) の有無を調べた。表 3 のように、50 株中 37 株 (74%) が、EM によつて induction されることがわかつた。これに反し、SP によつて induction される株は皆無であつた。Induction が EM や OM で起る変異株⁹⁾や、EM および LM で起る変異株¹⁰⁾が分離されているが、SP で induction の起る変異株は、今のところ、得られていない。すなわち、SP は induction 能力が欠けているのである。これは薬剤として、1つの利点である。

(2) SP, CP 併用による耐性度分布の移行

第 1 図は SP 単独, CP 単独および SP, CP 併用 (等量混合) に対するブ菌 100 株の耐性度分布を示す。SP 或いは CP 単独にくらべ SP, CP 併用では、耐性度 (MAC) が 50 mcg/ml 以上や 25 mcg/ml の菌株が減少し、全体の分布も低いほうへ移行していることがわかる。すなわち、相補効果がみとめられる。

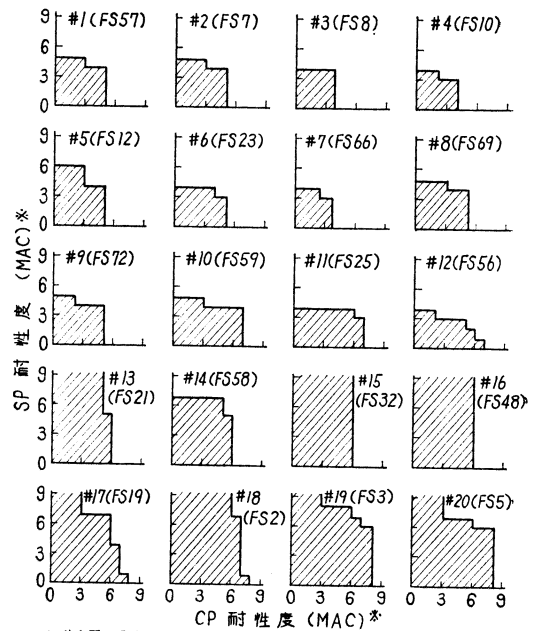
(3) SP, CP 併用による相補効果

前記 100 株の中から、SP^s, CP^s 型 (#1~#9), SP^s, CP^r 型 (#10~#12), SP^r, CP^s 型 (#13~#16) および SP^r, CP^r 型 (#17~#20) を選び、SP, CP 併用による相補効果を調べた。第 2 図のように、各耐性型において、だいたい相補効果がみとめられた。なお、SP^s は SP 感受性を、SP^r は SP 耐性を示す (CP も同様)。

(4) SP, CP 併用による Mac 耐性変異の抑制

ブ菌の Mac 耐性変異率は inducible 株では高いの

第 2 図 各薬剤耐性型株に対する SP と CP の相補効果



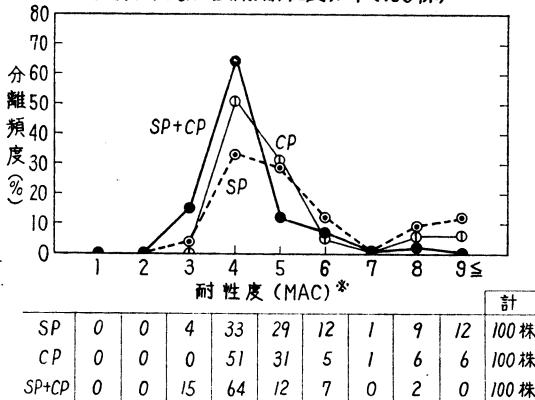
* 第 1 図の脚註を参照のこと。

表 4 SP, CP 併用による Macrolide 耐性変異の抑制

薬 剤	SP ₀	SP ₀ + CP ₅	SP ₀ + CP ₆	SP ₀ + CP ₇
耐性変異頻度 (2.5×10 ⁹ コロニー中)	428 □□□□□□□□□□	402 □□□□□□□□□□	0	0

(注) 薬剤濃度の表現は、第 1 図の MAC と同じで、SP₀ は SP 50 mcg/ml, CP₅ は CP 3.125 mcg/ml を表す

第 1 図 SP, CP および合剤の耐性度分布 (100 株)



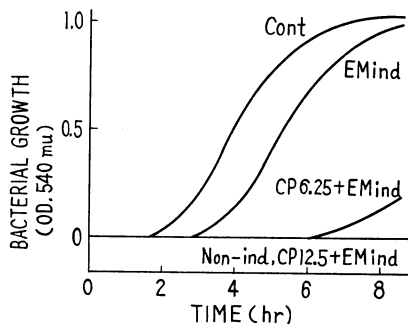
* 耐性度 (MAC) はその薬剤 100 mcg/ml を 10 とし、その 2 倍段階稀釈を用い、9 (50 mcg/ml), 8 (25 mcg/ml), 7 (12.5 mcg/ml) ... と表現した。

で、代表的な株 MS 537 (7) を用いて、CP による Mac 耐性化抑制を調べた。MS 537 の耐性値は SP 0.8 mcg/ml, CP 6.25 mcg/ml である。表 4 のように MS 537 は 2.5×10⁹ colony 中、428 colony が、SP 50 mcg/ml 含有 HIA plate 上に耐性変異株として出現し、これらは全 Mac および LCM に高度耐性 (400 mcg/ml 以上) であつた。SP 50 mcg/ml plate 中に、CP 6.25 mcg/ml 以上を同時に加えると、耐性変異は完全に抑えられた。

(5) Mac 耐性誘導の CP による抑制

Mac 耐性誘導 (inducible) 株は、表 3 で示したように、意外に多く自然界 (病院) に存在している。従がつて、induction の抑制は重要な課題である。前記の inducible 株 MS 537 を用いて、induction の CP による阻害を検討した。EM (0.1 mcg/ml) による induction 時に、CP を加えておくと、induction の抑制がみられた。第 3 図に示すように、CP 6.25 mcg/ml でかなり抑制され、CP 12.5 mcg/ml 以上では induction が完全に抑制

表3図 Macrolide耐性のCPによる抑制



(註) Contは薬剤なしのgrowth,その他はSP20 mcg/ml含有培地中でのgrowthを示す。EMindはEM 0.1 mcg/mlでMacrolide耐性を誘発した。

された。この現象は既に、WEAVER & PATTEE¹¹⁾によつて報告されているが、高温で耐性誘導される変異株においても同様なことが示された¹²⁾。

考 察

ブ菌に対する Macrolide 抗生物質の場合、抗生剤併用の効果は、①耐性変異の防止、②耐性誘導の抑制、③相補効果による抗菌力の増加、が主なものと考えられる。そこで、これらの点に関し、まず *in vitro* で SP, CP 併用の実験を行なつた。成績の示すように、併用効果は充分、認められた。また、SP, CP 併用による抗菌スペクトルの拡大、その他に関しても、中沢⁴⁾がその有効性を報告している。ただし、これら *in vitro* での成績が、*in vivo* の感染症に対して、どの程度反映されるかは問題がある。中沢⁴⁾や小田倉⁵⁾は *Pneumococci* や *E. coli* の実験的感染症に対する SP, CP 併用の実験を行なつていいるが、*in vitro* の成績ほどには、その効果が出されていない。感染症自体が複雑な現象であるため、実験系自体によつて成績がかなり、ふれるものと思われる。ただ、Macrolide 系抗生物質は實際上、ブ菌に対して有効に使用されているので、ブ菌感染症の実験を加えて判定することを必要とするものと思われる。抗生剤併用作用によつて、細胞膜透過や組織親和性、吸収や排泄などが影響される場合も考えられるが、それは今後の問題である。

要 約

SP は EM と異なり、ブ菌における Macrolide 耐性誘導能の無いことがわかり、この点は SP の利点と思われる。SP, CP 併用により、耐性度分布曲線が低いほう

へ移行し、相補効果を示した。SP, CP の各耐性型の菌株に対しても相補効果を示した。Macrolide 耐性変異および耐性誘導が CP 併用により抑制された。以上の成績から SP, CP 併用の有効性が、少なくとも *in vitro* で示された。

文 献

- 1) 三橋 進, 齋藤 誠: 抗生物質の年次的変動。医学のあゆみ 56(5): 337, 1966
- 2) 草間 悟: ブドウ球菌感染症の抗生物質療法に関する基礎的研究——ブ菌に対する Penicillin, Streptomycin, Oleandomycin, Chloramphenicol そして Terramycin の抗菌効果の比較ならびに併用効果について。J. Antibiotics 12: 642~651, 1952
- 3) 石山俊次, ら: Leucomycin compound capsule について。診療と保険 9(9): 153~157, 1967
- 4) 中沢昭三, ら: Spiramycin と Chloramphenicol の併用に関する基礎的研究。Jap. J. Antibiotics 21: 183~187, 1968
- 5) 小田倉義博: Chloramphenicol, Acetylspiramycin 合剤に関する研究。Chemotherapy 17(6): 948~955, 1969
- 6) 三橋 進: 薬剤耐性菌。最新医学 24(9): 1814~1820, 1969
- 7) KONO, M., HASHIMOTO, H. & MITSUHASHI, S.: Drug resistance of *Staphylococci*. III. Resistance to some macrolide antibiotics and inducible system. Jap. J. Microbiol. 10: 59~66, 1966
- 8) MITSUHASHI, S.: Review. Epidemiological and genetical study of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. Jap. J. Microbiol. 11(1): 49~68, 1967
- 9) HASHIMOTO, H., OSHIMA, H. & MITSUHASHI, S.: Drug resistance of *Staphylococci*. IX. Inducible resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. Jap. J. Microbiol. 12: 321~327, 1968
- 10) SAITO, T., OSHIMA, H., SHIMIZU, M., HASHIMOTO, H. & MITSUHASHI, S.: Macrolide resistance in *Staphylococcus aureus*. Abstracts of papers of 6th International Congress of Chemotherapy. p. 422, 1969
- 11) WEAVER, J. R. & PATTEE, P. A.: Inducible resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus*. J. Bact. 88: 574~580, 1964
- 12) SHIMIZU, M., SAITO, T. & MITSUHASHI, S.: Macrolide resistance in *Staphylococcus aureus*. Relation between spiramycin-binding to ribosome and inhibition of polypeptide synthesis in a heat inducible-resistant mutant. Jap. J. Microbiol. in press, 1969

THE SYNERGISTIC ACTION OF SPIRAMYCIN AND
CHLORAMPHENICOL IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

MIKIO SHIMIZU, SUSUMU MITSUHASHI and

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University

YOSHIHIRO ODAKURA

Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

It was found that erythromycin is an active inducer for macrolide (Mac) resistance in inducible-resistant strains of *S. aureus*, but not spiramycin (SP). In this respect, SP is found to be useful in chemotherapy for Mac inducible-resistant strains.

The synergistic action of SP and CP(chloramphenicol) was demonstrated *in vitro* test for Staphylococcal strains.

Induction for Mac resistance did not take place when CP was added to the induction mixture. Addition of CP also lowered the mutation rate to Mac high resistance in Mac inducible-resistant strains.