

Sulfobenzylpenicillin の嫌気性菌に対する抗菌作用について

上野一恵・二宮敬宇・神谷春子・渡辺邦友

鈴木祥一郎

岐阜大学医学部微生物学教室

(主任 鈴木祥一郎教授)

新合成ペニシリンである sulfobenzylpenicillin (SB-PC) は好気性菌では広い抗菌スペクトラムを示し、グラム陽性菌に対する抗菌力は ampicillin に較べやや劣るが、緑膿菌、変形菌を含むグラム陰性菌には carbenicillin と同等の抗菌力を有するといわれる。

私共は SB-PC の嫌気性菌に対する抗菌作用について検討したので報告する。

A. 試験管内抗菌作用

嫌気性菌に対する平板希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法は、嫌気性培養法を行なうことと、使用培地が異なる以外は原則として好気性菌における日本化学療法学会感受性測定法に準じた。GAM 寒天培地 (日水) を用い所要濃度の薬剤含有平板培地を作製した。被検菌株は GAM 液体培地の 24 時間嫌気培養菌を好気性菌の場合と同様の手技によつて薬剤含有平板培地に白金耳で画線塗抹した。steel-wool 法¹⁾ (CO₂ 20%, N₂ 80%) で 24 時間嫌気培養後、発育の有無を観察し、最小発育阻止濃度を求めた。

被検菌は培地に塗抹を開始してから嫌気環境 (jar) に納めるのに、2 時間以内で完了するよう心掛け、被検菌への空気 (酸素) の影響を極力さけた。この方法で行なえば無芽胞嫌気性菌でも 24 時間嫌気培養で好気性菌と同様に充分発育し MIC が測定できる。

1) 抗菌スペクトラム

供試した嫌気性菌はいずれも教室保育菌株である。これらの嫌気性菌に対する SB-PC の抗菌作用を carbenicillin (CB-PC) と比較した成績を表 1、表 2 に示した。SB-PC の MIC は *Peptococcus* は 0.78~6.25 mcg/ml, *Peptostreptococcus* は 0.39~12.5 mcg/ml, *Bacteroides* は 1.56~25 mcg/ml, *Sphaerophorus* は <0.19~3.13 mcg/ml, *Fusobacterium* は 0.78~3.13 mcg/ml, *Citlobacterium* は <0.19 mcg/ml, *Clostridium* は <0.19~3.13 mcg/ml を示した。とくに *B. convexus* は他の嫌気性菌に比較してやや感受性が劣っている。SB-PC はいずれの嫌気性菌に対しても CB-PC よりもやや抗菌力が優れていた。SB-PC は好気性菌に対しては逆に CB-PC よりも若干抗菌力が劣っているといわれる。このことは嫌気性菌と好気性菌の菌種の違いによる

表 1 嫌気性桿菌 (教室保育株) に対する SB-PC と CB-PC の MIC の比較

菌 種	MIC(mcg/ml)	
	SB-PC	CB-PC
<i>Bacteroides convexus</i> (2360)	12.5	6.25
<i>Bacteroides convexus</i> (6B-2)	12.5	12.5
<i>Bacteroides convexus</i> (6F-A)	25	50
<i>Bacteroides convexus</i> (878)	25	50
<i>Bacteroides perfoetens</i>	1.56	3.13
<i>Sphaerophorus necrophorus</i> (S-17)	<0.19	0.78
<i>Sphaerophorus necrophorus</i> (S-56)	<0.19	0.78
<i>Sphaerophorus necrophorus</i> (233)	3.13	3.13
<i>Sphaerophorus necrophorus</i> (S-13)	<0.19	0.39
<i>Fusobacterium fusiforme</i> (2390)	0.78	1.56
<i>Fusobacterium glutinosum</i>	3.13	<0.19
<i>Citlobacterium moniliforme</i>	<0.19	0.78
<i>Clostridium perfringens</i>	<0.19	1.56
<i>Clostridium histolyticum</i>	0.78	1.56
<i>Clostridium septicum</i>	3.13	3.13

表 2 嫌気性球菌 (教室保育株) に対する SB-PC と CB-PC の MIC の比較

菌 種	MIC (mcg/ml)	
	SB-PC	CB-PC
<i>Peptococcus anaerobius</i> (Z-795)	0.78	1.56
<i>Peptococcus variabilis</i> (PL-7)	0.78	1.56
<i>Peptococcus prevotii</i> (PL-10)	3.13	1.56
<i>Peptococcus aerogenes</i> (PL-4)	1.56	3.13
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i>	6.25	3.13
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (B-38)	12.5	6.25
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (PL-9)	6.25	3.13
<i>Peptostreptococcus intermedius</i> (857)	1.56	3.13
<i>Peptostreptococcus foetidus</i>	6.25	12.5
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	0.39	3.13

ものか、あるいは実験に使用した CB-PC の質的な差異によるものかは明らかでない。即ち市販の CB-PC は製造過程で脱炭酸が起こつて PC-G が 2~5% に含まれていることは周知のことである。その量は場合によつては充分抗菌力に干渉すべきレベルであつて、そのために

抗菌力が強く現われることも充分考えられる。しかし私共が実験に供した CB-PC は武田薬品研究所で合成されたもので PC-G は全く含まれていない。

2) 臨床分離株の感受性分布

過去2年間に主として臨床材料から分離した嫌気性

菌, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, 嫌気性 *Gaffkya*, *Clostridium* (教室保育株を含む) の SB-PC に対する感受性分布を検討し表3, 表4に示した。いずれの菌株に対しても優れた抗菌作用を認めたが *Bacteroides* は他の嫌気性菌よりもやや抗菌力が劣つて

表3 SB-PC の臨床分離嫌気性球菌に対する抗菌作用

菌種	株数	MIC (mcg/ml)									
		≤0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
<i>P. asaccharolyticus</i>	11	3	2	1		3	1		1		
<i>P. anaerobius</i>	4	1			3						
<i>P. activus</i>	2			1		1					
<i>P. aerogenes</i>	1			1							
<i>P. gelatinolyticus</i>	1			1							
<i>P. saccharolyticus</i>	1						1				
<i>P. variabilis</i>	3			1	2						
<i>P. grigoroffii</i>	1			1							
<i>P. prevotii</i>	3	1	1		1						
<i>P. lactilyticus</i>	2			1	1						
<i>Ps. anaerobius</i>	2				1		1				
<i>Ps. putridus</i>	9				1	8					
<i>Ps. foetidus</i>	6				3	1	2				
<i>Ps. productus</i>	1						1				
<i>Ps. magnus</i>	1					1					
<i>Ps. glycinophilus</i>	1				1						
<i>V. alcalescens</i>	5	1			1	1	2				
<i>G. anaerobia</i>	2		2								

P. : *Peptococcus* *Ps.* : *Peptostreptococcus* *V.* : *Veillonella* *G.* : *Gaffkya*

表4 SB-PC の臨床分離嫌気性桿菌に対する抗菌作用

菌種	株数	MIC (mcg/ml)									
		≤0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≤
<i>B. convexus</i>	4	1				1			1		1
<i>Bacteroides</i> 属	18	4	2	1	1		3	2	4		1
<i>S. nerophorus</i>	11	4	1	1	3			1		1	
<i>Sphaerophorus</i> 属	10	2			3	5					
<i>Fusobacterium</i> 属	4				2	2					
<i>Cl. perfringens</i>	5	4				1					
<i>Cl. septicum</i>	4	3			1						
<i>Cl. tetani</i>	3	2	1								
<i>Cl. histolyticum</i>	2	1		1							
<i>Cl. cochlearium</i>	1	1									
<i>Cl. tetanomorphum</i>	1	1									
<i>Cl. bifermentans</i>	1		1								
<i>Cl. butyricum</i>	2										2
<i>Cl. saccharobutyricum</i>	1			1							
<i>Cl. sporogenes</i>	2			1	1						

B. : *Bacteroides* *S.* : *Sphaerophorus* *Cl.* : *Clostridium*
Cl. Perfringens 5株, *Cl. septicum* 1株, *Cl. tetani* 1株以外の *Clostridium* は教室保存菌株である。

いる。

3) 培地 pHの差異による MIC の変動

滅菌後培地 pH が 6.0, 7.0, 8.0 になるように調整した GAM 寒天培地を用いて検討した。表5に示すとおり pH 6.0の酸性側で抗菌力が強くあらわれた。

表5 培地 pH の差異による MIC の変動

菌 種	培地 pH と MIC(mcg/ml)		
	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
<i>P. asaccharolyticus</i>	0.39	0.39	0.39
<i>P. asaccharolyticus</i>	1.56	3.13	3.13
<i>P. asaccharolyticus</i>	<0.19	<0.19	<0.19
<i>P. variabilis</i>	1.56	3.13	3.13
<i>Ps. putridus</i>	1.56	3.13	3.13
<i>Ps. putridus</i>	1.56	3.13	3.13
<i>Ps. putridus</i>	1.56	3.13	3.13
<i>Ps. putridus</i>	3.13	6.25	3.13
<i>Ps. putridus</i>	1.56	3.13	6.25
<i>Ps. tropicus</i>	<0.19	<0.19	<0.19
<i>B. convexus</i>	6.25	0.78	0.39
<i>S. funduliformis</i>	0.39	1.56	6.25
<i>S. necrophorus</i>	12.5	3.13	6.25
<i>S. necrophorus</i>	6.25	6.25	6.25
<i>S. necrophorus</i>	<0.19	<0.19	0.78

4) 培地の種類による MIC の変動

GAM 寒天培地 (日水), アネロープ寒天培地 (栄研), 5%羊血液加 liver veal 寒天培地 (Difco), 5%血液加 trypticase soy 寒天培地 (B. B. L.) を用いてそれぞれの培地における MIC を保育株について比較した。表6に示すとおり GAM 寒天培地と5%血液加 liver veal 寒天培地とは MIC が一致した。アネロープ寒天培地では抗菌力が最も強くあらわれた。

表6 培地の種類による MIC (mcg/ml) の変動

菌 種	GAM 寒天	リバーピール血液寒天	アネロープ寒天	トリプテイクエースソール血液寒天
<i>P. anaerobius</i>	6.25	6.25	3.13	6.25
<i>P. putridus</i>	3.13	3.13	3.13	6.25
<i>Ps. anaerobius</i>	≤0.19	0.39	≤0.19	≤0.19
<i>B. convexus</i>	25.0	25.0	6.25	6.25
<i>S. necrophorus</i>	1.56	1.56	1.56	6.25
<i>Cl. perfringens</i>	≤0.19	0.39	≤0.19	≤0.19

さらに23株の臨床材料から分離した嫌気性菌を用いて、GAM 寒天培地と5%羊血液加 liver veal 寒天培地の MIC を比較した。これらの菌株においても、両培地ではほぼ同じ MIC を示した。

GAM 寒天培地と indicator 不含 thioglycollate 液体培地 (Difco) における MIC を比較した。薬剤含有 thioglycollate 液体培地は、まず目的とする薬剤濃度の10倍量の薬剤溶液 1ml を試験管に分注、ついで培地 9ml を加えて混合して作製した。この要領で所要濃度の各種薬剤含有培地を作製した。これらの培地は約1時間静置し、培地の酸化還元電位が低く安定した後、1白金耳量を接種し空気環境で24時間培養後判定した。その結果 GAM 寒天培地は、thioglycollate 液体培地よりも抗菌力が強くあらわれた。

5) 接種菌量による MIC の変動

Peptococcus anaerobius (B-38) と *Sphaerophorus necrophorus* (2377) の24時間培養菌を用い、希釈液²⁾で 1ml 当り 10⁸~10⁴ 生菌数の菌液を作り、その1白金耳を常法で塗抹培養した。図1に示すとおり *Peptococcus anaerobius* (B-38) では菌量による影響はみられなかったが、*Sphaerophorus necrophorus* (2377) では影響がみられた。

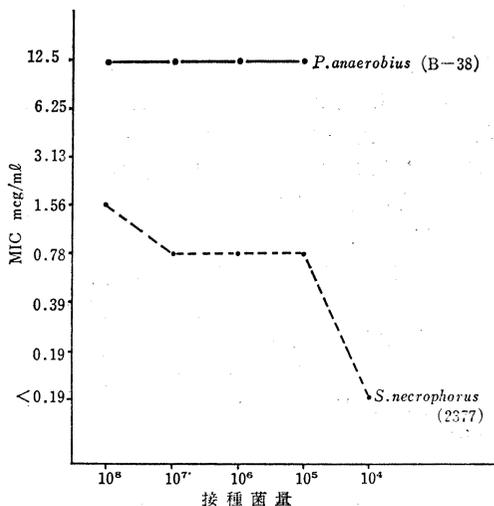


図1 接種菌量による MIC の変動 (GAM 寒天培地, 平板希釈法)

6) SB-PC の殺菌作用について

SB-PC を 1 mcg/ml, 10 mcg/ml, 100 mcg/ml 含有させた indicator 不含 thioglycollate 液体培地 (Difco) に *Bacteroides perfoetens* (平板希釈法で MIC は 1.56 mcg/ml) の24時間培養菌を移植し、6, 12, 24, 48時間培養後に、それぞれの薬剤含有培地中の生菌数を、GAM 寒天培地を用いて定量培養法で求めた。なお定量培養法における培養菌液の希釈には希釈液²⁾を用いた。これは希釈操作中に嫌気性菌の酸素による死滅を防ぐためである。

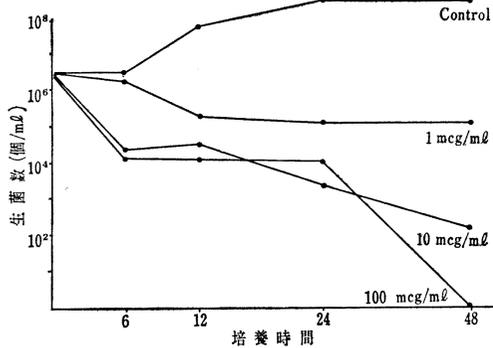


図2 SB-PCの *Bacteroides perfoetens* に対する殺菌作用

成績は図2に示すとおり、被検菌株のMICに近い1 mcg/ml 含有培地中では48時間培養までは静菌作用を思わせる結果が得られた。10 mcg/ml 中では6時間培養で菌数は1/100に減少し、48時間培養では1/10000に減少した。100 mcg/ml 中では48時間で生菌数は0となり殺菌作用を示した。

同時に各薬剤含有培地中での *B. perfoetens* の形態変化を経時的に観察した。培地を遠心し、その沈渣について塗抹標本を作りグラム染色した。いずれの培地においても培養5時間目頃から、菌体の filament 像, spheroplast あるいは bacteriolysis を思わせる像が多数みられた。これらの菌体変化は1 mcg/ml, 10 mcg/ml 含有培地で特に著明にみられた。

7) 試験管内耐性獲得および自然耐性菌の分布

被検菌株の1白金耳量を、各種濃度の薬剤含有 GAM 半流動高層培地に接種、37°C 24時間培養後、最高薬剤含有培地の発育菌の1白金耳量を新しい薬剤含有 GAM 半流動高層培地に移植する、いわゆる増量の継代法により耐性上昇実験を行なった。被検菌株として *Peptostreptococcus anaerobius* および *Fusobacterium fusiforme* を用い、前者は30代、後者は15代薬剤含有培地を継代した。

この2菌種の SB-PC 接触前の自然耐性 mutants の population は表7に示した。*Peptostreptococcus anaerobius* は 6×10^{10} コ中25 mcg/ml 以上の耐性 mutants は検出できなかったが、12.5 mcg/ml の耐性 mutants は20コ検出された。一方 *Fusobacterium fusiforme* では 8×10^{10} コ中1 mcg/ml 以上の耐性 mutants は検出できなかった。

耐性獲得実験の成績は図3に示した。*Peptostreptococcus anaerobius* では30代継代で12.5 mcg/ml から50 mcg/ml に上昇した。この50 mcg/ml 含有培地の発育菌を薬剤を含まない GAM 寒天培地に培養し、発育し

表7 *Peptostreptococcus anaerobius* と *Fusobacterium fusiforme* の SB-PC に対する自然耐性 mutants

菌種	接種生菌数	SB-PC の濃度 (mcg/ml)	耐性 mutants
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	6×10^{10} コ	100	0
		50	0
		25	0
		12.5	20
		0	卅
<i>Fusobacterium fusiforme</i>	8×10^{10} コ	100	0
		10	0
		1	0
		0.1	卅
		0	卅

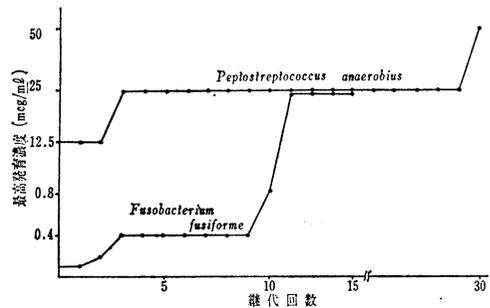


図3 *Fusobacterium fusiforme* と *Peptostreptococcus anaerobius* の継代培養による SB-PC の耐性上昇

た集落のうち無作為に16コを約菌し、薬剤を含まない GAM 半流動培地で増菌した。これらのそれぞれの菌株について、SB-PC 12.5 mcg/ml, 25 mcg/ml, 50 mcg/ml 含有 GAM 寒天培地で耐性を調べた。成績は表8に示すとおり、16コの集落中5コ (31.3%) は12.5 mcg

表8 *Fusobacterium fusiforme* の15代継代菌 (25 mcg/ml 発育) と *Peptostreptococcus anaerobius* の30代継代菌 (50 mcg/ml 発育) の SB-PC 耐性 population

菌種	被検集落数	SB-PC 耐性集落数 (mcg/ml)			
		6.3	12.5	25	50
<i>Fusobacterium fusiforme</i>	16コ	16コ (100%)	10コ (62.5%)	0	—
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	16コ	—	5コ (31.3%)	0	0

/ml に耐性であったが、16コ中11コ (68.7%) は感受性であった。25 mcg/ml, 50 mcg/ml に対しては16コ中すべてが感受性であった。すなわち *Peptostreptococcus anaerobius* は薬剤含有培地を30代継代して50 mcg/ml に耐性が上昇したかにみられたが、実際はみかけ上の耐性であった。12.5 mcg/ml 耐性の5株は薬剤を含まない培地20代を継代しても耐性は安定であった。

Peptostreptococcus anaerobius の SB-PC 1.4 mcg/ml 含有平板培地に発育した集落と、その親株について、SB-PC 耐性 mutants の population を比較した。成績は図4に示すとおり、1.4 mcg/ml 含有培地発育菌には耐性 mutants の population が増加した。即ち唯1回の薬剤接触で耐性菌の増加することがみられた。

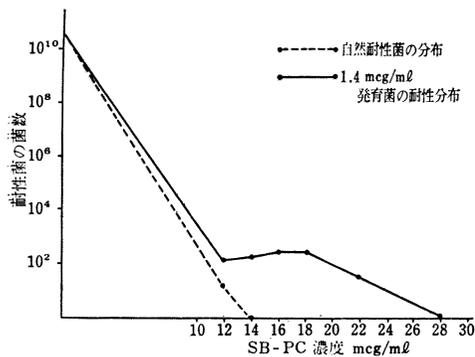


図4 *Peptostreptococcus anaerobius* の SB-PC 自然耐性菌の分布と SB-PC 1.4 mcg/ml 含有培地に発育した集落の耐性分布

一方 *Fusobacterium fusiforme* の成績は図3に示すとおり、11代継代で0.1 mcg/ml から25 mcg/ml に上昇した。この15代継代後の25 mcg/ml 発育菌の耐性の確認を上記の *Peptostreptococcus anaerobius* と同様に行なった。成績は表7に示すとおり、16コの集落中16コ(100%) が6.3 mcg/ml に耐性、12.5 mcg/ml には16コ中10コ (62.5%) が耐性で、6コ (37.5%) は感受性であった。25 mcg/ml 以上の薬剤濃度では、すべて感受性であった。12.5 mcg/ml 耐性菌は継代によっても耐性の脱落はなく、遺伝的に安定した耐性菌であった。

B. 実験的嫌気性菌感染症に対する治療効果

以上のような SB-PC の *in vitro* での抗菌作用が、*in vivo* ではどのように反映されるかについて、マウスにおける実験的嫌気性菌感染症に対する治療効果を検討した。

感染菌株に *Sphaerophorus necrophorus* を用いた。この菌株は dd-N 系マウス (4週♂) に生菌数 10^8 コ以上を皮下接種すれば、2~3日で局所に厚い被膜をもつ

た膿瘍を形成する。この菌株の SB-PC に対する MIC は <0.19 mcg/ml である。

dd-N 系マウス (4週♂) に生菌数 10^8 コを皮下接種、3日後に確実に膿瘍形成をみとめたものを実験に供した。1群4匹とし、SB-PC の投与量を1日、マウス1kg 当り 5 mg, 10 mg, 20 mg とし、菌接種局所の反対側の側腹部に1日1回、5日間皮下注射し、膿瘍の消失および縮少の程度を触診で観察した。5日間の投薬後、翌日マウスを屠殺剖検し、菌接種局所、心血、肺、肝、脾、腎を培養した。成績は表9に示すとおり、治療効果がみられた。すなわち対照群は全例に局所膿瘍が外部からの触診によつてもみとめられ、うち2匹は潰瘍形成がみられた。また局所膿瘍の膿からは全例に多数の *Sphaerophorus necrophorus* を検出した。臓器培養では腎4匹中4匹、脾3匹、肝1匹に *Sphaerophorus necrophorus* を検出した。

表9 *Sphaerophorus necrophorus* による膿瘍形成マウスに対する SB-PC の治療効果 (1群4匹、5日間投与)

SB-PC の投与量 (1日)	マウス No.	膿瘍と潰瘍の有無	培養成績					
			局所	心血	肺	肝	脾	腎
5 mg/kg	1	A(微小)	+	-	-	-	-	-
	2	0	+	-	-	-	-	-
	3	0	+	-	-	-	-	-
	4	0	-	-	-	-	-	-
10 mg/kg	5	A(微小)	-	-	-	-	-	-
	6	0	+	-	-	-	-	-
	7	0	-	-	-	-	-	-
	8	0	-	-	-	-	-	-
20 mg/kg	9	A(微小)	-	-	-	-	-	-
	10	0	+	-	-	-	-	-
	11	0	-	-	-	-	-	-
	12	0	-	-	-	-	-	-
0 (対照)	13	A	卅	-	-	+	+	+
	14	A	卅	-	-	-	+	+
	15	A, U	卅	-	-	-	-	+
	16	A, U	卅	-	-	-	+	+

A: 膿瘍

U: 潰瘍

SB-PC 投与群では5 mg, 10 mg, 20 mg 各投与群ともに5匹中1匹に菌接種局所に膿瘍をみとめた。しかし、その膿瘍も剖検によつてはじめて認められるほどに縮少していた。10 mg, 20 mg 投与群では、その膿瘍からは菌を検出できなかつた。さらに臓器培養でも菌は検出できなかつた。

おわりに

私共は SB-PC の嫌気性菌に対する抗菌力を教室保育菌株および最近各種臨床材料から分離した嫌気性菌を用いて検討した。さらに本剤の嫌気性菌に対する感受性と使用培地、培地 pH、接種菌量との関係についても検討した。さらに本剤の自然耐性 mutants の population、試験管内耐性上昇についても検討を加えた。また実験的嫌気性菌感染症の治療実験を行ない、本剤は嫌気性菌感染症に対しても臨床効果が期待される薬剤の 1 つであるといえるであろう。

文 献

- 1) 上野一恵：国産 steel-wool 法による嫌気性培養の実際。メデイヤサークル No.57：1~7, 1964
- 2) 大谷文茂：無芽胞嫌気性桿菌選択分離培地，第 1 報，基礎実験。日本細菌雑誌 25：222~232, 1970
- 3) 上野一恵ほか：In vivo における metronidazole (flagyl) 抗菌作用について。Clinical Report 5：737~739, 1971

ACTIVITY OF SULFOBENZYL PENICILLIN
ON STRICTLY ANAEROBIC BACTERIA

KAZUE UENO, KEIU NINOMIYA, HARUKO KAMIYA,
KUNITOMO WATANABE and SHOICHIRO SUZUKI

Department of Bacteriology, Gifu University, School of Medicine

Sulfobenzylpenicillin has a wide-spectrum activity against gram-negative and gram-positive species of strictly anaerobic bacteria.

In vitro activity of sulfobenzylpenicillin was influenced by the kind and pH of the test medium.

Repeated subculture of *Peptostreptococcus anaerobius* and *Fusobacterium fusiforme* in GAM semi-fluid medium containing increasing levels of sulfobenzylpenicillin resulted in a stepwise development of resistance, the rate of which was more rapid in *Fusobacterium fusiforme* than in *Peptostreptococcus anaerobius*.

Subcutaneous treatment of experimental mice infections by *Sphaerophorus necrophorus* with sulfobenzylpenicillin was proved to be effective when the causative organisms were sensitive *in vitro* against this drug.