

抗生物質の抗菌力定量化の試み

宮 本 忠 昭

千葉大学医学部第一内科

小 林 章 男・降 矢 震

千葉大学医学部中央検査部

(昭和 47 年 8 月 3 日受付)

要 約

各種抗生物質 (Oxytetracycline OTC, Gentamicin GM, Colistin CL, Aminobenzylpenicillin AB-PC, Cephaloridine CER, Kanamycin KM) を試験管内で大腸菌に作用させ、経時的に殺菌曲線をもとめ、それぞれの抗菌力を比較検討した。これらの殺菌曲線は、1) 1相性の指数関数的減少を示すもの (GM, CL), 2相性の指数関数的減少を示すもの (KM, AB-PC), そしていったん指数関数的減少を示すが直ちに増殖に向うもの (OTC, CER), に分けられた。おのおのの曲線の指数関数的減少を示す部分から、99.9% の大腸菌を殺す濃度と時間との関係を両者の対数をとつてもとめると、 $-1/N$ の勾配の直線と相関することがわかった。また、この直線から各抗生物質の抗菌力は $C^N T = K$ なる方程式であらわすことができた。ただし、 K は各抗生物質が1分間に99.9% の大腸菌を殺す濃度に N をかけたもので、 N をもとめる過程でおのずと計算しうる数である。この方程式の N から各抗生物質は濃度の変化にその殺菌効果が強く影響される GM, CL, KM の群と、濃度の変化にその殺菌効果がほとんど影響されない AB-PC, CER の群に分類できた。

緒 言

抗生物質を使って、*in vitro* で細菌の殺菌曲線をもとめる試みは、1950 年前後、EAGLE¹⁾ が主に Penicillin を使い、ぶどう球菌、連鎖球菌、肺炎球菌に対して行なった。しかしその後、次々に開発された抗生物質についてまとまった報告は少いように思われる。さらに、抗生物質の殺菌曲線を数量的に解析しようとする試みはあまりみられない。いつぼう、殺すことを第1義とする消毒剤²⁾ および放射線³⁾ の領域では、殺菌を数量的に解析する方法が進んでいる。そこで著者等は近年開発され広く使われている殺菌性抗生物質を用い大腸菌に対する殺菌曲線をもとめ、その数量的解析を試みた。実験の材料と条件の選択は、最近問題となつているグラム陰性桿菌感染症を考え、被検菌として大腸菌を、抗生物質として GM, CL, KM, AB-PC, CER, OTC を選び、発症時の菌数に近いと思われる対数増殖期にある 10^7 台の菌数に各抗生物質を

作用させた。数量的解析は、各々の濃度の殺菌曲線をもとめ、指数関数的減少を示したものは、各曲線から99.9% の大腸菌を殺す各濃度 ($\mu\text{g/ml}$) ごとの時間 (分) をもとめ、両者の対数をとって、相関関係をもとめる方法をとつた。

材料および方法

1) 被検菌は *Escherichia coli* NIHJ; TC-1 株を用いた。使用に際しては18時間、2代培養をしたものを用いた。2) 抗生物質は硫酸ゲンタマイシン (シェーリング), メタスルホン酸コリスチン (科研), 硫酸カナマイシン (明治), アミノベンジルペニシリン (武田), セファロリジン (鳥居), オキシテトラサイクリン (第一) の注射アンプル内容を適当に希釈して用いた。3) 培地はハートインフュウジョンブイヨン (日水) を用いた。方法は抗生物質作用時の菌数を検討づけるため上記 *E. coli* を18時間培養したものを希釈し、 10^4 台にし、この大腸菌を 37°C 振とう培養で増菌させ、わずかに白濁した時点をもとめ、 10^7 台と見当づけ抗生物質を作用させた。この時点の正確な菌数は希釈法を用いて各実験ごと測定した。抗生物質添加後、各濃度における菌数の計算は、0.37 (22.5 分), 0.75 (45 分), 1.5, 3, 6, 12, 24 時間ごと経時的に、内径 4mm, 外径 6mm の標準白金耳でブイヨン中の菌を釣取り、3等分した寒天平板に同一ブイヨンからそれぞれ3回ずつ接種し、18時間培養後、それぞれの寒天平板に発育した集落を数えて平均した。このようにもとめた数から真の菌数を逆算した。逆算の方法は文献⁴⁾ によつた。

実験成績

GM は図1に示すように、100, 50, 25 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度では薬剤添加後、直ちに指数関数的に大腸菌を殺した。6.25, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度ではいつたんそのまま大腸菌の増殖を許すが、6時間以降は指数関数的に殺した。さて、作用させた GM の濃度、100, 50, 25, 6.25, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ を対数でとり、これら各濃度において大腸菌を99.9% 減少させるに要した時間 (分) も対数でとると、図1に示した5本の線は図7の GM の線で示したように1本の直線にかき表わされた。この直線の方程

図1 *E. coli* $5.8 \times 10^7/ml$ に対するGMの殺菌曲線

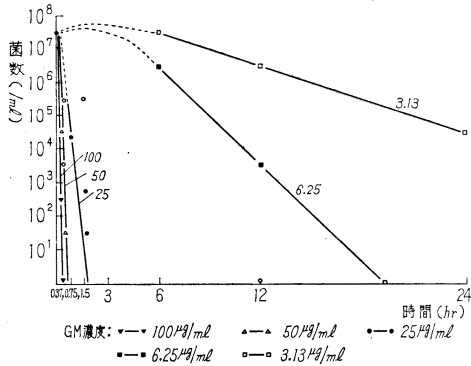


図4 *E. coli* $3.0 \times 10^7/ml$ に対するAB-PCの殺菌曲線

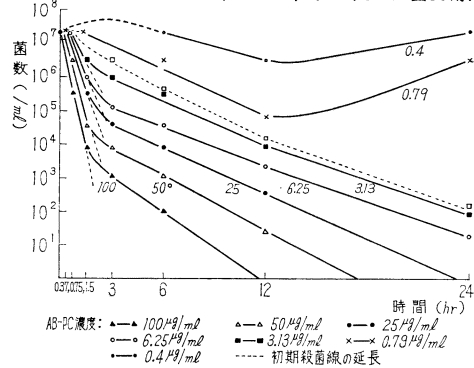


図2 *E. coli* $5.8 \times 10^7/ml$ に対するCLの殺菌曲線

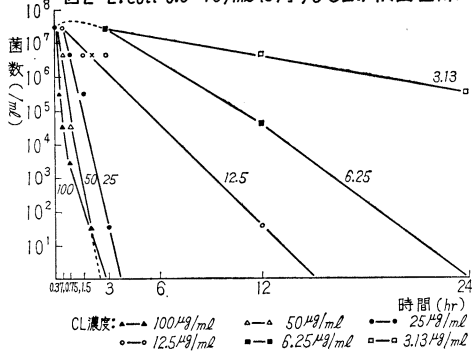


図5 *E. coli* $6.0 \times 10^6/ml$ に対するCERの殺菌曲線

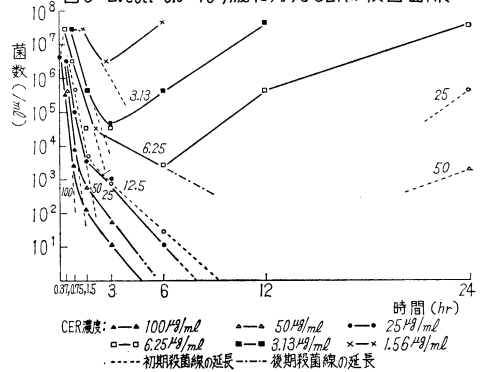


図3 *E. coli* $1.0 \times 10^8/ml$ に対するKMの殺菌曲線

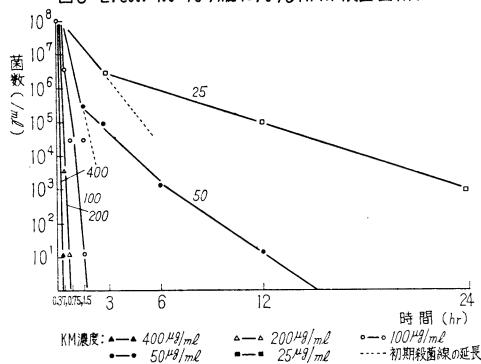
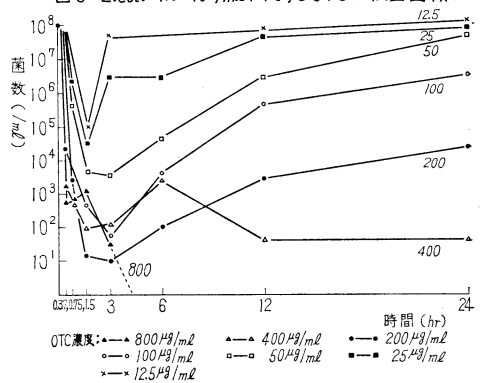


図6 *E. coli* $1.0 \times 10^8/ml$ に対するOTCの殺菌曲線

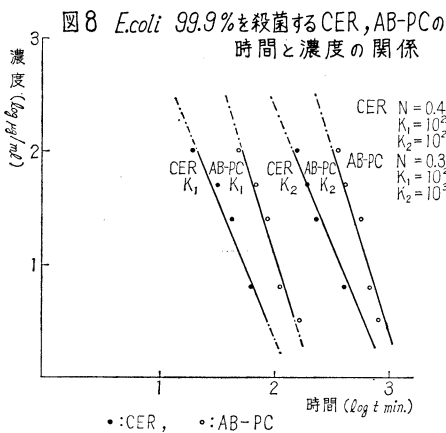
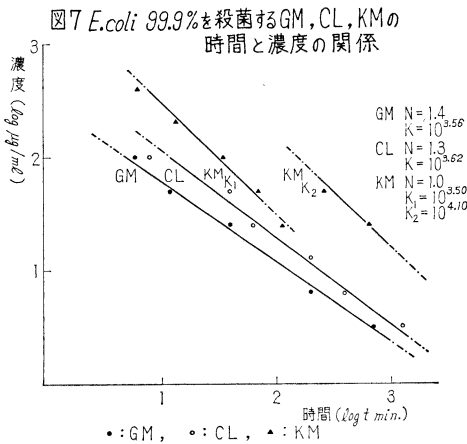


式を、 $\log C = -1/N \log T + 1/N \log K$ と表わすと (C は $\mu g/ml$, T は分, N は図7の直線から求められる勾配の逆数, そして K は GM が1分間に 99.9% の大腸菌を殺す濃度に N をかけたもので, この直線から求められる), GM は $N=1.4$ であり, $K=10^{3.56}$ ともめられた。

CL は図2に示すように, GM と同様の1相性の殺菌曲線を示し, 菌を 99.9% 殺す時間と作用濃度の関係を

もとめると図7のようになり, この直線の方程式から, $N=1.3$, $K=10^{3.62}$ となった。KM, AB-PC, CER は, 各々図3, 4, 5に示すように, その曲線の殺菌部分は指数関数的減少を示すが2相性となった。

AB-PCは図4のように, この2相性の移行部分が1.5時間から3時間の間にあつた。第1相の部分と第2相の部分それぞれ延長し, 双方の部分に対し GM と同様に対数で表わし, 数量的処理をしてその相関をもとめる



と、図8に示すように、2本の直線が得られた。この2本の直線の勾配は同じであつた。しかし、その位置は異なつていた。この2本の直線は $N=0.3$, K は $10^{2.86}$ と $10^{3.15}$ となり、それぞれを K_1 および K_2 とした。

KM は図7に示すように、同勾配の2本の直線となり、 $N=1.0$ であり $K_1=10^{3.50}$, $K_2=10^{4.10}$ となつた。

CER も、図8に示すように、同勾配の2本の直線となり、 $K_1=10^{2.24}$, $K_2=10^{2.89}$ となつた。OTC は、図6に示すように、各濃度において1.5時間以内に急激に指数関数的に大腸菌を殺すが、直ちに増殖を許した。この殺菌部分の数量的処理はできなかった。

考 察

GM, CL は1相性の指数関数的殺菌を、KM は低濃度で、AB-PC, CER はすべての濃度で、2相性の指数関数的殺菌を示した。いつぼう、AB-PC は低濃度で、CER はほとんどの濃度で、OTC はすべての濃度で、いつたん殺菌されたあと、ゆつくりとあるいは急激に増菌に転じた。従がつて、これらの殺菌曲線は3つの型、

GM, CL と KM, AB-PC と CER, OTC の群に分けられるが、順次観察してゆくと一連の連続的变化と思われる。このような変化が見られるのは、CER で検討されているように、抗生剤が大腸菌と接触中、いつぼうでは大腸菌を殺すとともに自らの活性も失うためにおこるものと思われる⁵⁾⁶⁾。このような考えから、KM, AB-PC, CER に見られる2相性の殺菌曲線は、実際には下に凸の曲線であり、これらの曲線の接線が N としてもめられたものと思われる。すなわち、殺菌の速度(N)は変化しないが、その強さ(K)は活性の低下とともに変化し、図7,8でいえば K_1 と K_2 の間に N が一定の直線が連続的に存在すると思われる。図7,8のそれぞれの直線は $\log C = -1/N \log T + 1/N \log K$ という方程式で表わされるが、この式は $C^N T = K$ という式に変換できる⁷⁾。

N の意味を検討すると、 N を $-1/N$ とすると各直線の勾配を示す。この勾配が急なほど、すなわち N が小さいほど、大腸菌を殺すに要する時間は作用濃度が減少してもさほど影響をうけない。例えば N の最も小さい CER の場合、濃度が $100 \mu\text{g/ml}$ から $6.13 \mu\text{g/ml}$ に大きく減少しても99.9%の大腸菌を殺すに要する時間は30分から1時間にのびるだけであるが、 N の最も大きい GM の場合は、濃度が $100 \mu\text{g/ml}$ から $6.13 \mu\text{g/ml}$ に減少すると、99.9%の大腸菌を殺すに要する時間は5分から4時間へと大きく延長する。すなわち、勾配がゆるいほど、 N が大きいほど大腸菌を殺すに要する時間は作用濃度が減ると著明に延長する。前者、すなわち N が小さい群 (AB-PC, CER) は、血中濃度 (正確には有効濃度) の動揺が殺菌効果にさしたる影響をおよぼさないのに対し、後者すなわち N が大きい群 (KM, GM, CL) は血中濃度の動揺が殺菌効果に大きな変化をおよぼす。いいかえると、前者の抗生剤は血中濃度を一定に維持することを余り考慮する必要はないが、後者の抗生剤は血中濃度を一定に維持することに細心の注意を必要とする。

以上の検討から、上記抗生剤は N によつて GM, CL, KM の群と AB-PC, CER の2群に分類できた。 N は抗生剤の経時的な活性低下によつて変化しなかつた。

近年抗生剤の作用機序が分子レベルで解明されてきており⁸⁾、GM, KM 等のアミノグリコサイド系の抗生剤はリボゾームに作用し誤つた蛋白合成を行ない、AB-PC, CER は細胞壁の合成阻害を起こし菌を殺す。 N によつて上記抗生剤が作用機序の違いと同様な2群に分けられ、 N が活性低下によつて変化しない抗生剤の固有の性質であり、2群の抗生剤のそれぞれの特有な殺菌様式を表わしているとすれば、 N という数は抗生剤の細菌に対する作用様式を定量的に示す定数と考へてさしつかえな

いと思われる。

※ 抗生剤の抗菌力は $C^N T = K$ という方程式で表わされる。図7,8でNが同じならばKが小さいほど強い殺菌力の抗生剤といえる。従がつて、Nが近似の2群における抗菌力は、 $GM > CL > KM$ の順に強力で、 $CER > AB-PC_2$ の順に強力である。しかし、この2群はNが異なるので抗菌力の比較はできない。しかし一般に、Nが小さくKが小さいほど有効な抗生剤といえるであろう。すなわち、NとKが決まればその抗生剤の抗菌力もおのずと決まる。このように抗菌力は $C^N T = K$ で表わされる。

$C^N T = K$ の式からある抗生剤の作用濃度とその持続時間を知れば、その時間に殺される菌数がわかる。すなわち、ある抗生剤により殺される菌数(SF)は確率論から、 $SF = e^{K^c t} \dots (1)$ と表わされる。この式が実験的にもおおよそ正しいことは図1—5において証明された。いづつ、時間と濃度の関係は $C^N T = K \dots (2)$ であるから、99.9%を殺菌する時間Tは(1)に代入して $10^3 = e^{-K^c T}$ となり、 $K^c = 3 \log e / 10T$ となる。(2)の式から $T = K / C^N \log e / 10 = 4.6$ から、これを(1)に代入して、 $SF = e^{13.8} / K C^N t \dots (3)$ となり、cとtが決まれば殺菌される菌数が計算される。

殺菌は殺癌細胞にも通ずる。癌化学療法領域では、SKIPPER等⁹⁾がL1210の白血病細胞をBHFIマウスの腹腔に接種し、*in vivo*で抗癌剤を作用させ、その殺菌曲線と増殖曲線をもとめ、Total cell killの治療概念を生み出した。しかしTotal cell killをどのような方法で行なうか。この領域でもこの方法が完成されていないようである。世代時間20分の大腸菌と24時以上におよぶ癌細胞では薬剤—細菌あるいは一癌細胞の関係の上でその致死効果に大きな差があると思われる。しかし、高部等のプレオマイシンによる細胞致死効果の検討とその投与法の工夫¹⁰⁾¹¹⁾はこの問題に近づく試みであり、このような工夫により癌化学療法の分野でも $SF = e^{13.8} / K C^N t$ の式は応用ができるものと思われる。また化学療法における薬動学的研究¹²⁾は、この式によつて血中濃度を自在に制御する投与法を検討する意義が明白となり、いつそその発展が意味深いものになるとと思われる。

現在、抗生剤の選択は起炎菌がわかった場合、ディスク法により感受性を調べて行なう。近年グラム陰性桿菌感染症がふえ、これらの細菌は薬剤耐性が多いことから感受性試験の必要性はますます強い。しかし、いづつでは有効な抗生剤も次々と開発され、1つの起炎菌に感受性の著明な抗生剤が多数存在した場合、その選択に迷うことも多い。この場合、抗生剤の薬理学的特質から選択されることはもちろんであるが、この選択の問題がも

う少し詳しく検討される必要があると思われる。抗生剤を選ぶ第1の目安が感受性試験であることは異論のないところであり¹³⁾、その方法についても充分検討されてきた¹⁴⁾。しかし、感受性試験が菌と抗生剤のどのような関係にもとづいて成り立っているのかについての検討は不十分に思われる。MCDERMOTTは静菌性抗生物質は高濃度では殺菌的に、殺菌性抗生物質も低濃度では静菌的に働き、静菌、殺菌の差は質的違いでなく量的なものである¹⁵⁾とのべている。すなわち、抗生剤の抗菌作用は細菌の増殖曲線に対して、増殖阻止から殺菌に至る全過程を含んでいる。現在行なわれている感受性試験はその基礎を最小発育阻止濃度(MIC)においている。MICは上記全過程のうち主として静菌だけをとらえたものであり、殺菌の部分は含まれていない。しばしば、MICをもつて抗菌力の代表のように用いられるのは、殺菌の部分がぬけているので不相当と思われる。今回、著者等はこの点も検討し、抗生剤の殺菌部分に注目し、細菌の増殖阻止から殺菌までの抗菌作用は、薬剤作用下における細菌の増殖と死滅の動的平衡の和として生ずる連続的变化と想定し殺菌曲線をもとめ数量的解析を行ない、抗生剤の抗菌力の定量化をすることができた。臨床的要求からしても、抗癌剤、ステロイド剤が頻用され抵抗力の著しく低下した患者に起こる感染症には殺菌を主とした治療が必要である。従がつて今後は、抗生剤のかくされた殺菌性を彫り出して定量化し、各抗生剤の殺菌様式の特徴を充分考えた選択と投与法の工夫が必要と思われる。現在まで開発された抗生剤と新たに開発される抗生剤はその殺菌能力を解析し、できればNとKをもとめて、その薬剤の薬効を全面的に評価すべきことを提案した。

稿を終えるに当たり、今回の実験の理論化に多大の示唆を与えて下さった放射線医学研究所 渡部郁雄博士、および実験に協力して下さいた中央検査部細菌検査科 久保勢津子、荒木正子、高沢寿江、山田和子、山下いくさんに深く感謝します。

文 献

- 1) EAGLE, H. : The rate of bacteriocidal action of penicillin *in vitro* as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentration against certain organisms. J. Exp. Med. 88, 99~131, 1948.
- 2) PROKOP, A. *et al.* : Kinetics of disinfection. Disinfection ed. by MELVIN A. BERNARDE Marcell Dekker Inc, New York, 1970.
- 3) D. E. リー著、西脇安訳：放射線生物物理学, p. 254~262, 1957.

- 4) 宮本：1 白金耳による簡易菌数計算法，未発表。
- 5) 宮本，小林：感受性大腸菌による Cephaloridine の活性低下について，未発表データ。
- 6) SAWAI, T., MITSUHASHI, S. & YAMAGISHI, S.: Stability of various deviation of 7-amino cephalosporic acid and 6-amino-penicillic acid to cephalosporinase from gram negative bacteria. Progress in antimicrobial and anticancer chemotherapy, Univ. Tokyo Press, p. 410~415, 1970.
- 7) JAWETZ, E. *et al.* : Review of Medical Microbiology. 9th ed. Lange. Med. Pub., p. 81~82, 1970.
- 8) LORIAM, V. : The mode of action of antibiotics on gram negative bacilli. Arch. Inter. Med. 128, 623~632, 1971.
- 9) SKIPPER, H. E. *et al.* : On the criteria and kinetics associated with "curability" of experimental leukemia. Cancer Chemotherapy Report 35 : 1, 1964.
- 10) TERASHIMA, T., TAKABE, Y., KATSUMATA, T. & WATANABE, M. : Lethal effect of bleomycin on cultured mammalian cells. J. Nat. Cancer Inst., in press.
- 11) TAKABE, Y., KATSUMATA, T. WATANABE, M. & TERASHIMA, T. : Lethal effect of bleomycin cultured mouse L cells. Comparison between fractionated and continuous treatment. Gann, in preparation.
- 12) 御旅屋寛一：化学療法における薬動学的研究の展望，第19回化学療法学会，教育講演，1971
- 13) 第12回化学療法学会東日本支部総会シンポジウム：薬剤の感受性と臨床効果について。医人14：31~104, 1965
- 14) 第13回化学療法学会東日本支部総会シンポジウム：感受性とその周辺。最新医学 22, 1861~1885, 1967.
- 15) DAVIS, E. D. & MCDERMOTT, W. : Principle of chemotherapy : Bacterial and mycolic infection of man. by ed. DUBOS, R. J. 2th ed. p. 733, 1952.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF BACTERICIDAL EFFECTS OF THE VARIOUS ANTIBIOTICS

TADAAKI MIYAMOTO

First Department of Medicine, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan

AKIO KOBAYASI & SHIN FURIYA

Department of Laboratory Medicine, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan

The time inactivation curves of various antibiotics (Oxytetracycline OTC, Gentamicin GM, Colistin CL, Kanamycin KM, Aminobenzylpenicillin AB-PC, Cephaloridine CER) were obtained in *E. coli*. The curves were distinguished into three types ; (1) exponential decline (GM, CL), (2) biphasic decline (AB-PC, KM), and (3) temporal depression of survivor (OTC, CER). To compare these bactericidal effects on *E. coli*, a new equation ($C^n T = K$) was developed. Using the equation, the curves were analysed in terms of the time-concentration effects. The results revealed that these are two different patterns of bactericidal effects, namely treatment time dependent type (GM, CL and KM), and concentration dependent type (AB-PC and CER). OTC, however, was inapplicable to the present equation, because of its complicated response.