

ロイクロン (ロイコマイシン・クロラムフェニコール合剤) に
関する基礎的検討

三宅 章・斉藤 哲・早野 和夫

東洋醸造株式会社研究部

三 橋 進

群馬大学医学部微生物学教室

(昭和 48 年 2 月 1 日受付)

マクロライド系薬剤は臨床上、とくにグラム陽性菌感染症に広く使用され、その種類も多いが、近年とくにブドウ球菌においてマクロライド耐性菌の分離頻度が高くなり¹⁾、なんらかの対策が必要と思われる。

臨床分離のブドウ球菌のマクロライド耐性菌は、各種報告にあるように、耐性が誘導される型の株と、構成的にすべてのマクロライドおよびリンコマイシンに耐性な株に大別される^{2,3)}。これらの株の耐性機構は、その発現が誘導的か構成的かの違いで、本質的にはリボソームの変化と考えられる^{4,5,6)}。誘導可能な株の大部分は、エリスロマイシン (EM) が耐性誘導物質となるが、ロイコマイシン (LM) は誘導物質とならないため、マクロライド耐性が誘導されるブドウ球菌は、LM には感受性を示す^{2,3)}。また誘導可能な株からは、LM 等を含む平板上で耐性株が得られ、この変異株は、臨床分離の構成的に耐性な株に、種々の性質で対応している³⁾。

臨床的に分離されるマクロライド耐性菌は誘導可能な株より、構成的な株のほうがしだいに多くなつてきている。これらの株は、EM 以外のマクロライド系薬剤およびリンコマイシンの使用により、誘導可能な株からの変異株が選択されてきたものと解釈される。

いつぼう、ブドウ球菌におけるクロラムフェニコール (CP) 耐性菌は、CP をアセチル化して不活性化することが知られている。このアセチル化酵素は、CP が誘導物

質となり誘導的に各成される^{8,9)}。

以上のような背景から、我々は LM と CP の合剤について *Staphylococcus aureus* を用いて *in vitro* および *in vivo* で検討を加えた。

材 料 と 方 法

使用菌株

臨床分離のブドウ球菌、およびその株からの耐性導入株、変異株を使用した。その内訳は下記のとおりである。

Staphylococcus aureus MS 353 (CP^s, Mac^s), S 1396 (CP^r, Mac^s), MS 537-59 (CP^s, LM^{ind}), MS 353 A (Mac^r, CP^s), FS 2056 (CP^r, Mac^r), KS 185-4 (CP^s, Mac^s), S 1434 A (CP^s, Mac^r), S 2174 (EM^{ind}, CP^s RFP^r)。

(s: 感受性, r: 耐性, ind: 誘導耐性)

これらの株に対する、LM, CP およびロイクロン (LM: CP=1:1) の最小発育阻止濃度 (MIC) は、表 1 のとおりであつた。

実験動物

4 週齢の ddY 系マウス (♂ 平均体重 20 g) を、血中濃度の測定、感染治療実験および腎内菌の測定用に使用した。

実験方法

1. 生育曲線への影響

10 ml の B 培地 (5) の入つた、L 型試験管に、1 夜同培地で培養した菌を 0.2 ml 接種し、各薬剤を加えて、

生育曲線を O. D. 530 m μ の吸収から求めた。また残存する CP の濃度は、*Escherichia coli* NIHJ を試験菌として、ディスク法で測定した。

2. 耐性誘導への影響

Staphylococcus aureus MS 537-59 を LM-A₇ 0.2 mcg/ml を含む培地で耐性を誘導した。耐性誘導の阻害をみるために、CP を 3.2 mcg/ml 同時添加した。誘導後は 1. と同様にして生育曲線を求めた。

3. 血中濃度の測定

a) LM の血中濃度

マウスに経口投与後、各時間に血液をとり、血

Table 1. MIC of leucomycin, chloramphenicol and leuchlon against staphylococci,

<i>Staphylococcus aureus</i>	Leucomycin	Chloramphenicol	Leuchlon
MS353	0.8	3.2	1.6
S1396	1.6	100	3.2
MS537-59	100	12.5	12.5
MS353A	100<	6.3	6.3
KS185-4	1.6	3.2	3.2
S1434A	100<	6.3	12.5
S2174	3.2	3.2	1.6

(mcg/ml)

清を分離後、2倍に希釈して、70°C、20分熱処理をして、*Sarcina lutea* ATCC 9341を試験菌として、ディスク法で濃度を測定した。各測定値とも7匹のマウスの平均値を示す。

b) CPの血中濃度

血清を分離後、2倍に希釈して、*E. coli* NIHJを試験菌としてディスク法で濃度を測定した。

c) ロイクロンの血中濃度 (LMとCPの分別定量)

血清を分離後、2倍に希釈して、70°C、20分熱処理。両薬剤に耐性の*S. aureus* FS 2056をあらかじめ5 mcg/mlのCPを含む培地で2時間培養して、CP-アセチルトランスフェラーゼの産生を誘導しておき、集菌して約 10^{10} cells/mlを生食塩水に懸濁して、上記血清に1/10量加える。1時間37°Cにおき、100°C 3分熱処理後、LMの濃度をa)と同様にして測定した。なお、耐性菌の添加によって、LMは影響を受けなかつた。CPの濃度は上記処理をせずに、そのままb)と同様に測定した。

4. 感染治療実験

体重約20gのddY系マウス(♂)に尾静脈から、*S. aureus* KS 185-4の場合には 5×10^6 cells/mouse、*S. aureus* S 1434 Aの場合には 10^8 cells/mouse接種した。接種2時間および4時間後に薬剤を経口投与し、延命効果を判定した。

5. 腎内菌の測定

4.と同様に、*S. aureus* S 2174を 10^8 cells/mouse接種後、翌日から毎日1回100 mg/kg薬剤を経口投与し、4日後に両腎を摘出して、生理食塩水を加え、ガラスホモゲナイザーにかけ、heart infusion agar平板で生菌数を測定した。

6. 耐性菌の出現の検査

5.と同様に菌を接種し、1日後から毎日薬剤を100 mg/kg投与した。6日後に腎内生菌数を計測すると同時に、LM 6.3 mcg/ml、またはCP 12.5 mcg/mlを含む平板で耐性菌の数を求めた。なお、この実験においては、耐性菌が接種した菌の変異株であることを確かめるために、使用した菌株をあらかじめリファンピシン耐性にしておき、出現した耐性菌のリファンピシン耐性を検査した。

結 果

1. 各種ブドウ球菌の生育曲線に与える影響

S. aureus MS 353 A株は、LMおよびスピラマイシン等に100 mcg/ml以上の耐性を示す株であるが、LM 6.3 mcg/ml添加により、3時間lag timeの延長が認められた。CP 3.2 mcg/mlの存在下では生育が抑制され、LM 3.2 mcg/mlおよびCP 3.2 mcg/mlの同時添加では、さらに生育が抑制された (Fig. 1)。

Fig. 1 Comparison of MS 353 A growth with or without drug

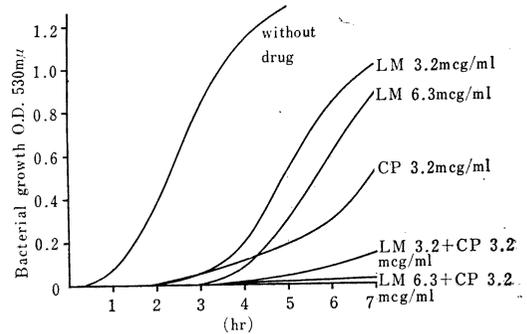


Fig. 2 Effect of leucomycin on inactivation of chloramphenicol

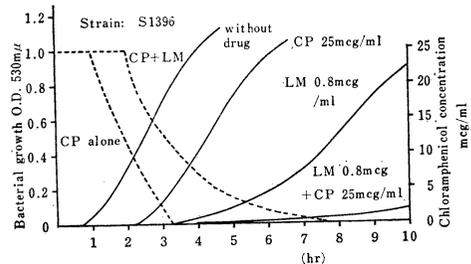
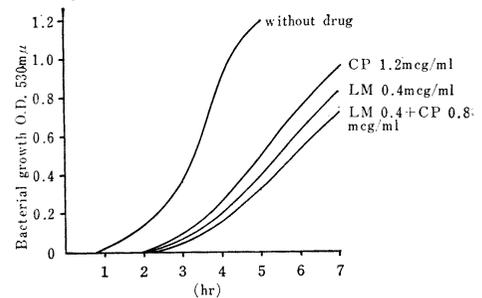


Fig. 3 Comparison of MS 353 growth with or without drug



S. aureus S 1396株はCP耐性で、CPを25 mcg/ml添加しても、2時間程度の遅れで生育し培地中のCPは、ほぼ完全に不活性化されている。LMを0.8 mcg/ml添加するとlag timeが長くなり生育速度が落ちるが、両薬剤の同時添加の際には、lag timeは9時間以上に延長される。この際、培地中のCPはLMの添加によつて、不活性化がおさえられ、7時間培養後も1 mcg/ml残存していた (Fig. 2)。

両薬剤に感受性な株においては、相加的な効果が認められた (Fig. 3)。

2. 耐性誘導への影響

Fig. 4 Effect of chloramphenicol on induction of leucomycin resistance

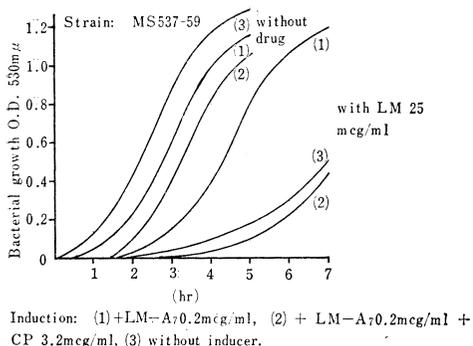


Fig. 5 Blood level of chloramphenicol in mice

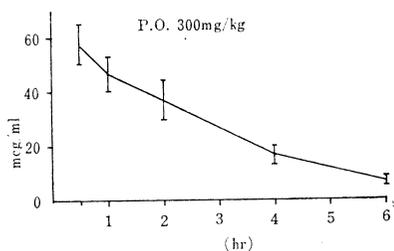
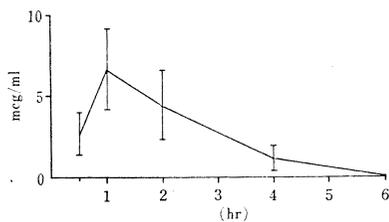


Fig. 6 Blood level of leucomycin in mice P.O. 300 mg/kg



LM で誘導可能な株 *S. aureus* MS 537-59 株の LM-A₇ による耐性誘導は、CP 3.2 mcg/ml の添加によつて、誘導剤無添加と同様の生育となり、完全に阻止された (Fig. 4)。

3. 血中濃度

体重約 20 g の ddY 系マウスに単剤 300 mg/kg, ロイクロン 600 mg/kg を経口投与した際の血中濃度を Fig. 5, 6, 7 に示す。CP のピーク値は投与後 30 分 (58 mcg/ml) で、LM のピーク値は 1 時間 (6.4 mcg/ml) であつた。合剤においては各薬剤のピーク時およびピーク値 (CP 43.3 mcg/ml, LM 5.1 mcg/ml) と単剤の場合とほぼ同様で、パターンも同様であつた。以上のように合剤にすることによる影響は認められなかつた。

4. 感染治療実験

Fig. 7 Blood level of leuclon in mice P.O. 600 mg/kg (LM 300+CP 300 mg/kg)

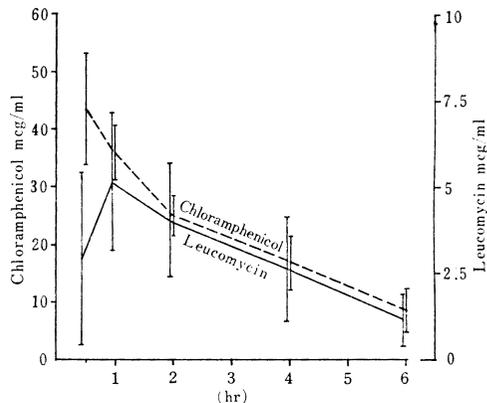


Fig. 8 Chemotherapeutic effect of leucomycin, chloramphenicol and leuclon on staphylococcal infection in mice (Strain: *S. aureus* KS 185-4)

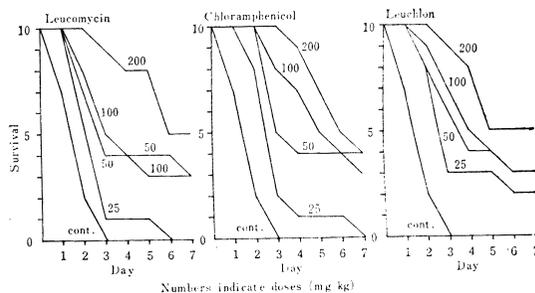
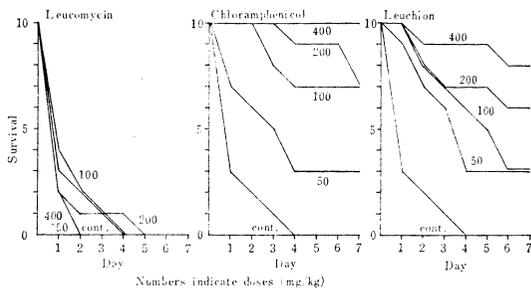


Fig. 9 Chemotherapeutic effect of leucomycin, chloramphenicol and leuclon on staphylococcal infection in mice (Strain: *S. aureus* S 1434 A)



両薬剤に感受性な株, *S. aureus* KS 185-4 を攻撃菌とした場合は、Fig. 8 のような延命曲線が得られた。各薬剤の ED₅₀ 値は Table 2 に示した。ロイクロン (CP: LM=1:1) の ED₅₀ 値は 43.5 mg/kg で LM 単剤 (ED₅₀=70.5 mg/kg) より、すぐれた治療効果を示し、CP 単剤 (ED₅₀=50.0 mg/kg) と同程度であつた。

Table 2. ED₅₀ values of leucomycin, chloramphenicol and leuchlon against mice infection with staphylococci

Treatment	ED ₅₀ dose (mg/kg)	
	K S185-4	S1434 A
Leucomycin	70.5(52.7-101.2)	—
Chloramphenicol	50.0(33.5-74.3)	78.3(51.5-119.0)
Leuchlon	43.5(25.9-73.2)	90.0(54.3-149.0)

() 95% confidence limits

Table 3. Viable cells in kidney after treatment with leucomycin, chloramphenicol and leuchlon in the renal infection of mice

Treatment	Leucomycin	Chloramphenicol	Leuchlon	Control	
mouse	No. 1	9.3×10 ⁷	1.6×10 ⁶	1.8×10 ⁸	1.5×10 ⁸
	No. 2	1.8×10 ⁵	4.6×10 ⁵	1.8×10 ⁵	3.0×10 ⁶
	No. 3	2.5×10 ⁷	1.3×10 ⁸	5.3×10 ⁵	3.2×10 ⁷
	No. 4	5.0×10 ⁷	2.0×10 ⁶	2.2×10 ⁵	4.5×10 ⁶
	No. 5	2.3×10 ⁷	7.0×10 ⁶	4.0×10 ⁵	4.0×10 ⁶

Numbers indicate viable cells per both kidneys.

LM 耐性の *S. aureus* S 1434 A 株の場合は, Fig. 9 に示す結果が得られた。この株の場合は, LM 効果は期待できないが, ロイクロンの ED₅₀ 値(90.0 mg/kg)は, CP 単剤(78.3 mg/kg) よりわずかに大きい程度で, 生育曲線からも予想されるように, LM が部分的に作用するものと思われる。

EM で誘導可能な株 S 2174 を攻撃菌として各薬剤を投与後, 腎内生菌数を測定すると, LM は 10⁶~10⁷ cells/kidney, CP は 10⁶~10⁸ cells/kidney およびロイクロンは 10⁸~10⁶ cells/kidney の範囲にあり, ロイクロン治療群がいちばん少ない結果が得られた(Table 3)。

5. 耐性菌の分離

EM で誘導可能な株より, LM に耐性な変異株の出現は, CP の同時添加によりおさえられると, 三橋⁹⁾および春日¹⁰⁾によって報告されている。

In vitro の結果が *in vivo* においてもみられるかどうかを, 菌を攻撃後, 腎から菌を分離して調べた。使用菌株は EM で耐性誘導可能な株 *S. aureus* S 2174 で, 方法は実験方法の記載のように行なった。Table 4 のように, LM 単剤を用いた場合には, 1 群 5 匹中 4 匹から 3.1×10⁸~3.4×10⁴ cells/kidney の範囲で LM 耐性菌が出現するが, ロイクロンおよび CP 治療群では, 測定限界の 50 cells/kidney 以下

で, 耐性菌は認められなかった。なお, CP 耐性菌はいずれの場合も得られなかった。

考 察

LM 耐性株において, CP と LM の同時添加によって, CP 単独より生育が抑制され, また, CP 耐性菌の場合には, 培地中の CP のアセチル化が LM の添加により抑えられた。後者の場合は, LM による菌の生育阻害の効果と同時に, LM が蛋白質合成阻害剤であるので, CP-アセチルトランスフェラーゼの誘導形成も阻害されるためと思われる。

感染治療実験の結果から, ブドウ球菌に対するロイクロンの効果は, ほぼ CP と同程度と考えられるが, CP の毒性を考慮すると, LM が低毒性なので, この点では, ロイクロンのほうが有利と思われる。

腎からの耐性菌の分離実験から, EM 誘導可能株 (EM 単剤耐性株) を他の非誘導型マクロライド (LM 等) の単剤で治療することは耐性菌を適挿するという点で危険であり, 合剤によってその出現をおさえることが必要と考えられる。

文 献

- 1) 市川篤二ほか: ブドウ球菌の薬剤耐性。Chemo-therapy 14 : 633~640, 1966
- 2) KONO, M., H. HASHIMOTO & S. MITSUHASHI: Drug resistance of staphylococci. III. Resistance to some macrolide antibiotics and inducible system. Jap. J. Microbiol. 10 : 59~66, 1966
- 3) HASHIMOTO, H., H. OSHIMA & S. MITSUHASHI: Drug resistance of staphylococci. IX. Inducible resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. Jap. J. Microbiol. 12: 321~327, 1968

Table 4. Appearance of leucomycin resistant mutants in kidney after treatment with leucomycin, chloramphenicol or leuchlon

Treatment	Leucomycin	Chloramphenicol	Leuchlon	Control	
mouse	No. 1	2.5×10 ⁴ (1.1×10 ⁸)	50> (6.5×10 ⁶)	50> (4.0×10 ⁶)	50> (1.0×10 ⁸)
	No. 2	3.4×10 ⁴ (4.4×10 ⁷)	50> (8.5×10 ⁶)	50> (2.5×10 ⁷)	50> (1.9×10 ⁷)
	No. 3	3.1×10 ³ (1.1×10 ⁸)	50> (1.5×10 ⁷)	50> (1.5×10 ⁶)	50> (1.0×10 ⁷)
	No. 4	2.0×10 ⁴ (1.8×10 ⁷)	50> (2.0×10 ⁷)	50> (1.5×10 ⁶)	50> (1.3×10 ⁷)
	No. 5	50> (3.3×10 ⁷)	50> (2.2×10 ⁸)	50> (4.5×10 ⁷)	50> (6.3×10 ⁶)

Numbers indicate drug-resistant mutants per both kidneys.

Numbers in parentheses indicate total viable cells per both kidneys.

- 4) SAITO, T., H. HASHIMOTO & S. MITSUHASHI : Drug resistance of staphylococci. Decrease in the formation of erythromycin-ribosome complex in erythromycin resistant strain. Jap. J. Microbiol. 13 : 119~121, 1969
- 5) SAITO, T., M. SHIMIZU & S. MITSUHASHI : Macrolide resistance in staphylococci. Annals of the New York Academy of Sciences 182 : 267~278, 1971
- 6) LAI, C. J. & B. WEISBLUM : Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Proc. Nat. Acad. Sci. 68 : 856~860, 1971
- 7) KONO, M., K. OGAWA & S. MITSUHASHI : Drug resistance of staphylococci. VI. Genetic determinant for chloramphenicol resistance. J. Bacteriol. 95 : 28~36, 1968
- 8) SHAW, W. V. & R. F. BRODSKY : Characterization of chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 95 : 28~36, 1968
- 9) 三橋 進, 森 弘道, 渡辺 健 : 合剤使用の理論的考察。Chemotherapy 18 : 247~250, 1970
- 10) 春日徳彦 : ブドウ球菌に対するロイコマイシンとクロラムフェニコールの合剤の作用。東洋薬事報 8 : 7~9, 1967

STUDIES ON LEUCLON (LEUCOMYCIN-CHLORAMPHENICOL COMBINATION DRUG)

AKIRA MIYAKE, TETSU SAITO and KAZUO HAYANO

Research Laboratories, Toyo Jozo Co., Ltd., Ohito-cho, Shizuoka-ken

SUSUMU MITSUHASHI

Department of Microbiology, School of Medicine, Gumma University, Maebashi, Gunma-ken

Abstract

A mixture of leucomycin and chloramphenicol was active as same as chloramphenicol against leucomycin resistant staphylococci. Inactivation of chloramphenicol by chloramphenicol resistant staphylococci was reduced by the addition of small amounts of leucomycin.

Chemotherapeutic effect of leuchlon on staphylococcal infection in mice was almost the same to that of chloramphenicol.

Leucomycin resistant mutants were isolated from the kidneys of mice infected with erythromycin inducible-resistant staphylococci after leucomycin therapy. In contrast, these mutants were not detected when leuchlon was used instead of leucomycin.