

Fosfomycin の抗菌作用と感染防禦能

三 橋 進・田 中 徳 満・倉 茂 達 徳
群馬大学医学部微生物学教室

ホスホマイシンは、他の薬剤との交叉耐性がなく、広い抗菌スペクトルを示し、毒性も低いユニークな抗生物質とされている。いっぽう、試験管内で容易に耐性菌が出現することが問題とされている¹⁻⁷⁾。

本報においては、当教室保存の各種臨床分離菌に対する試験管内抗菌作用と、マウスのサルモネラ感染症の治療効果を検討し、また治療中の耐性菌出現について検討した結果を報告する。

実験材料および方法

使用菌株：当教室に保存されている各種病巣由来細菌を材料としたが、各種種ごとに薬剤耐性型、血清型等を考慮に入れ 250 株あてを被検菌として使用した。

感染治療実験には *Salmonella enteritidis* の強毒株 (116-54) および弱毒株 (SER) を用いた。菌は、当教室で、凍結乾燥保存しておいたものを、HIA 平板に 37°C 20 時間培養後、生理食塩水に浮遊して用いた。菌数は、530 m μ における吸光度によって求めた。静脈内感染の際のマウスに対する最小致死量 (MLD) は 116-54 株が 10³ 個、SER 株が 10⁵ 個である。

使用薬剤：明治製菓から分与をうけた FOM-Na を用いた。

試験管内抗菌力測定法：ホスホマイシン MIC 測定小委員会指定の測定法に準じ抗菌力を測定した。すなわち、被検菌を普通ブイヨン (栄研) で 18 時間前培養後、滅菌生理食塩水にて 1,000 倍に希釈し、その 1 白金耳を各種濃度の FOM を含む nutrient agar (Difco) 上に滴下、37°C 18 時間培養後判定、結果は MIC を以て表現した。なお対照菌株としては当教室保存の *E. coli* NIHJ 株を使用した。

動物：感染治療実験には、4~5 週令、体重 20 \pm 1g の ICR-JCL 系マウスの雌雄を用いた。マウスは、全て日本クレア社から購入した。

感染：生食水に適当な濃度に浮遊させた菌液 0.1 ml を 4 分の 1 の皮下針によってマウスの尾静脈内に注射した。

治療：ホスホマイシンカルシウム (FOM-Ca) を生食水に溶解し、菌感染直後に第 1 回の投薬を、次いで適当な間隔をおいて、2~4 回投薬した。薬剤は、全て 0.2 ml ずつマウスの皮下に投与した。治療効果は、感染 15 日後のマウスの生死によって判定し、ED₅₀ 値は帰帰

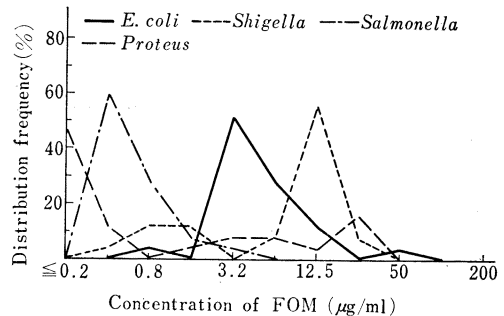
直線法によって算出した。マウスは、全て 1 群 30 匹ずつ用いた。

結 果

FOM の *in vitro* 抗菌効果：

大腸菌の FOM に対する感受性分布は、Fig. 1 にみるとおり、0.8~50 μ g/ml に分布し、3 峰性のピークを示した。被検株の 52% は 3.2 μ g/ml の MIC を示し、6.25~12.5 μ g/ml が 40%、0.8 および 50 μ g/ml のものがそれぞれ 4% であった。なお対照として用いた *E. coli* NIHJ 株の MIC は 0.8 μ g/ml であった。

Fig. 1 Antibacterial activity of FOM against clinical isolates



Each 250 strains of bacteria were used for assay. Number indicates the minimum concentration of drug (MIC).

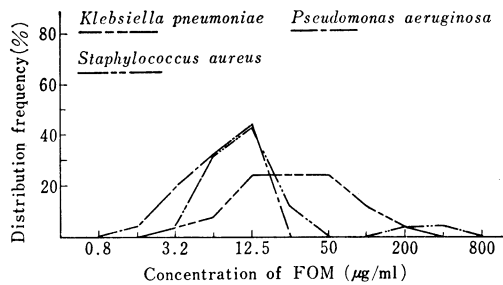
赤痢菌においては 12.5 μ g/ml を主峰とする 2 峰性で、その分布は 0.4~25 μ g/ml であり、6.25~25 μ g/ml の MIC を示すものは 72% であった。

サルモネラでは 0.4 μ g/ml が 60% を占め、0.8 μ g/ml が 28%、1.6 および 3.2 μ g/ml が 8%、4% で使用したサルモネラ 250 株全てが 3.2 μ g/ml で完全に発育が阻止されていた。

クレブシエラの FOM に対する感受性値は 3.2~200 μ g/ml で、25 μ g/ml が 24%、それ以上の MIC を示すもの 40%、25 μ g/ml 未満のもの 36% で、Fig. 2 にみるとおり、25 μ g/ml を中心にやや相似的な分布を示していた。

プロテウスでの MIC は \leq 0.2~25 μ g/ml に広く分布し、 \leq 0.2 μ g/ml が 48%、25 μ g/ml が 16% であった。緑膿菌は 12.5 μ g/ml の FOM で 100% 阻止され、

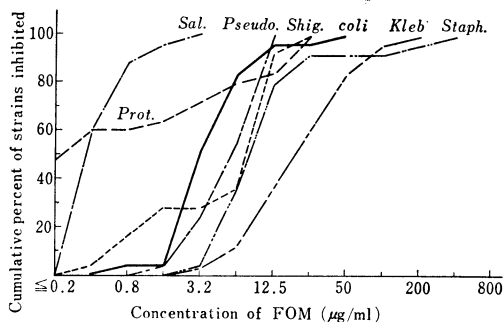
Fig. 2 Antibacterial activity of FOM against clinical isolates (See the footnote of Fig. 1.)



その MIC 分布は 0.8~12.5 µg/ml の間にあった。MIC 12.5 µg/ml は 44% で、それ以下の濃度に肩をもつ 1 峰性の分布であった。

以上はグラム陰性桿菌の 6 菌種についての結果であるが、グラム陽性球菌として選択したブドウ球菌についての測定結果は 12.5 µg/ml に 44% が分布する peak と、200 および 400 µg/ml にそれぞれ 4% が分布する FOM 高度耐性の群に分けられ、被検株の MIC は 3.2~400 µg/ml と広範囲に分布していた。

Fig. 3 Antibacterial activity of FOM against clinical isolates (See the footnote of Fig. 1.)



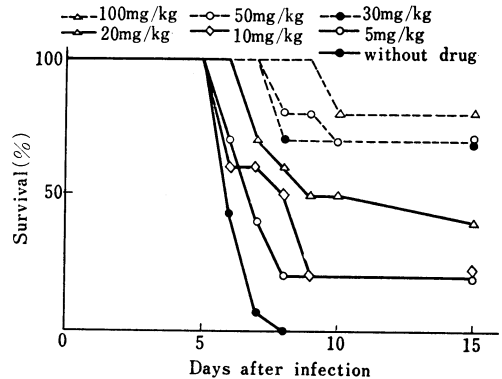
今回使用した 7 菌種の MIC の累積分布を Fig. 3 に示した。グラム陰性桿菌においてはサルモネラに強い抗菌作用を示し、クレブシエラの増殖を完全に阻止するには 200 µg/ml を要する。大腸菌、赤痢菌、プロテウス、緑膿菌の増殖阻止は前 2 者の間である 12.5~50 µg/ml にあり、とくに緑膿菌が 12.5 µg/ml と意外に低く、FOM に対して感受性を示したことである。

ブドウ球菌の 100% 増殖阻止は 400 µg/ml とひじょうに高い値であり、MIC の分布も広範囲にわたりクレブシエラとならび FOM の抗菌力の低い菌種であることが理解された。

FOM-Ca の治療効果：

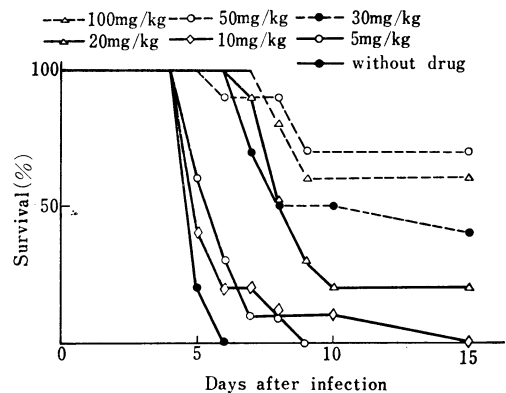
S. enteritidis 116-54 株 10^8 個 (10 MLD) を静脈内に感染させ、FOM を 1 回だけ皮下投与したマウスは、100 mg/kg の投与によっても 1 匹も生残せず、延命効果

Fig. 4 Therapeutic effect of FOM on the infection with *S. enteritidis* 116-54



ICR-JCL strain mice of both sexes were infected intravenously with 10^8 cells of virulent strain (116-54) of *S. enteritidis*. Mice were administered subcutaneously with various doses of FOM on day 0, 1, 3 and 5 after infection.

Fig. 5 Therapeutic effect of FOM on the infection with *S. enteritidis* SER

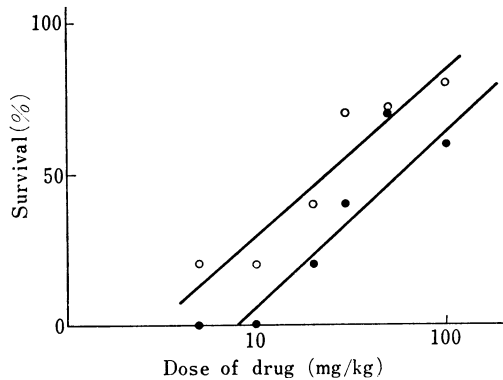


ICR-JCL strain mice of both sexes were infected intravenously with 10^6 cells of an attenuated strain (SER) of *S. enteritidis*. Mice were administered subcutaneously with various doses of FOM on day 0, 1, 3 and 5 after infection.

も認められなかった。薬剤投与を、感染直後と翌日の 2 回行った群においても生残マウスはみられず、僅かな延命効果が認められたにすぎなかった。しかし、116-54 株の感染直後、1日、3日および 5 日後の 4 回に亘って FOM-Ca を投与した際には、明らかに治療効果がみとめられ、その ED₅₀ 値は、23.5 mg/kg/回 (90% 信頼限界における ED₅₀ の下限と上限は、それぞれ 19.4 mg, 27.5 mg) であった。

S. enteritidis SER 株 10^6 個 (10 MLD) を静脈内に感染させたマウスに対しても FOM-Ca の 4 回投与によ

Fig. 6 Therapeutic effect of FOM on *Salmonella* infection (See the legends of Figs. 4 and 5.) Effect of FOM was determined 15 days after infection, with 116-54 (○) or SER (●).



って治療効果をあげることができたが、ED₅₀ 値は 57.8 mg/kg/回 (下限 13.4mg, 上限 102.2mg) で、116-54 感染に対するより治療効果が小さい傾向がみられた。

Fig. 6 の直線は、計算によって得られた ED₅₀, ED₈₀ および ED₂₀ 値から求めた。

In vivo からの耐性菌の検索：

ICR 系マウスに *S. enteritidis* 116-54 株 10⁸ 個を静注感染させ、感染直後、1日、3日および5日後の4回、20mg/kg/回の FOM-Ca を皮下に投与し、感染7日後に、症状の現われている10匹のマウスを屠殺し、その脾ぞうを摘出した。脾ぞうの重量を測定し (1.3g)、重量の20倍量の生食水 (26ml) 中で、テフロンガラスホモジナイザーで破碎し、稀釈して 0.1ml ずつを5枚の nutrient agar (Difco) 平板に播いて脾内の菌数を測定すると同時に、同じ稀釈液を FOM-Ca を含む nutrient agar 平板上で耐性菌を採取した。選択平板の FOM-Ca は、1.56 μg/ml を用いた。

116-54 株の MIC は、0.19 μg/ml である。検討に用いた10個の脾ホモジネートの原液 0.5ml から得られた総菌数は 2.3×10⁶ 個で、その中、FOM-Ca 1.56 μg/ml 平板に生育し得たのは、6個であった。得られた6株の MIC は、全て 6.25 μg/ml であった。6株が *S. enteritidis* であることは、通常の細菌学的同定法および抗血清によって確かめた。

脾ホモジネートの FOM の抗菌作用への影響を除くために、1度薬剤を含ませぬ HIA 平板に生育させた菌 10⁴ 個について、耐性菌の採取を試みたが、FOM-Ca 1.56 μg/ml の平板に生育できる菌は1個も得られなかった。

耐性菌の菌力：

得られた6株の耐性菌についてその菌力を検討した。ICR 系マウスに対して、原株の 116-54 が 10² 個の静

脈内感染で全マウスを死亡させるのに対し、6株の耐性菌の MLD はいずれも 10⁵ 個で、耐性菌は、原株に比してその菌力が 1,000 分の1に低下し、弱毒株 SER と同じ菌力であった。

総括および考察

臨床から分離され当教室で保存している *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* および *Staphylococcus* の7菌種について、それぞれ250株ずつを選びホスホマイシンの試験管内抗菌作用を検討したところ、*Salmonella* に対して強い抗菌作用を示し、次いで *E. coli*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus* の5菌種にはほぼ同程度の抗菌作用を示し、*Klebsiella* に対する抗菌作用は低かった。

Salmonella に対する抗菌作用が大きいこと、緑膿菌に対して、大腸菌や赤痢菌に対するのと同じ程度の抗菌作用があることおよび、プロテウス属の48%に対して、0.2 μg/ml 以下で、完全に発育を阻止することは注目値する。

いっぽう、ホスホマイシンは試験管内で、容易に耐性菌が出やすいことが報告されており、*in vivo* での治療効果が、*in vitro* での抗菌作用と並行しない可能性が、示唆されている。そこで、サルモネラを用いて、ホスホマイシンの治療効果と、治療中の耐性菌の出現について検討した。

マウスに対する病原性のたかい *Salmonella enteritidis* 感染症に対して、FOM-Ca の皮下への4回投与によって、治療効果をあげることができた。サルモネラ属の菌は、細胞親和性細菌群に属し、生体内では、RES系の細胞内に捉えられて増殖する。一般に抗生物質は、細胞内菌に対しては、試験管内よりはるかに効き難いが⁸⁾、ホスホマイシンは、試験管内抗菌作用と同様、著明な効果を示した。これは、興味ある成績である。次いで、治療が不完全で死亡直前のマウスを用いて脾ぞうからの耐性菌の検索を試みた。10匹分のマウスの脾ぞう (1.3g) のホモジネート 26ml 中の 0.5ml から、2.3×10⁶ 個の菌が得られ、MIC 6.25 μg/ml の耐性菌が6株得られた。1匹の脾あたり換算すると、1匹の脾全体から平均 1.2×10⁷ 個のサルモネラ菌が検出され、その中の約30個が耐性菌ということになる。脾から得られた耐性菌の菌力は、原株に比して、1,000 分の1に低下しており、その MLD は、10⁵ 個/マウスだから、治療中にこの程度の耐性菌が出現しても、治療の妨げにはならないものと考えられる。

耐性菌の出現頻度は、試験管内でのそれに比して低く、なぜ、生体内では、耐性菌が出現し難いのか、また、耐性を獲得した菌は、なぜ、その菌力が低下するのか、今

後検討されるべき興味ある問題である。

結 論

種々のグラム陰性桿菌およびグラム陽性球菌について1菌種について250株ずつを用いて、ホスホマイシンの試験管内抗菌作用を検討した。その結果、FOMは、サルモネラ属の菌に対して最も強い抗菌作用を示し、次いで *Proteus*, *E. coli* に対する抗菌作用が、大きかった。興味あることは、一般に抗生物質が効き難い *Pseudomonas* に対して、著明な効果がみられたことである。

いっぽう、*S. enteritidis* 感染症に対するFOMの治療効果を皮下投与によって検討した。感染直後、1日、3日および5日後の4回投与によって、治療効果をあげることができた。そのED₅₀値は23.5mg/kg/回であった。治療中にマウスの脾臓内に耐性菌が検出された。耐性菌の出現頻度は、10⁻⁶で *in vitro* での実験報告に比してはるかに低く、MICも原株の0.19μg/mlに対して6.25μg/mlでそれよりたかいものは得られなかった。*In vivo* で得られた耐性菌は、調べた範囲でその菌力は、原株のそれに比して1,000分の1低く、MLDは10⁶個であった。

文 献

- 1) STAPLEY, E. O., D. HENDLIN, J. M. MATA, M. JACKSON, H. WALLICK, S. HERNANDEZ, S. MOCHALES, S. A. CURRIE & R. M. MILLER : Phosphonomycin. I. Discovery and *in vitro* biological characterization. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1969 : 284~290, 1970
- 2) HENDLIN, D. ; B. M. FROST, E. THIELE, H. KROPP, M. E. VALIANT, B. PELAK, B. WEISSBERGER, C. CORNIN & A. K. MILLER : Phosphonomycin. III. Evaluation *in vitro*. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1969 : 297~302, 1970
- 3) MILLER, A. K. ; B. M. FROST, M. E. VALIANT, H. KROPP & D. HENDLIN : Phosphonomycin. V. Evaluation in mice. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1969 : 310~315, 1970
- 4) CHRISTENSEN, B. C. ; W. J. LEANZA, T. R. BEATTIE, A. A. PATCHETT, B. H. ARISON, R. E. ORMOND, F. A. KUEHL, G. ALBERS-SCHONBERG & O. JARDETZKY : Phosphonomycin : Structure and synthesis. *Science* 166 : 123~125, 1969
- 5) FOLTZ, E. L. & H. WALLICK : Pharmacodynamics of phosphonomycin after intravenous administration in man. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1969 : 316~321, 1970.
- 6) FOLTZ, E. L. ; H. WALLICK & C. ROSENBLUM : Pharmacodynamics of phosphonomycin after oral administration in man. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1969 : 322~326, 1970
- 7) ホスホマイシン資料, 明治製菓株式会社, 1973
- 8) SAITO, K. ; K. HITOMI & S. MITSUHASHI : Antibacterial activities of drugs against *Salmonella enteritidis* ingested into mononuclear phagocytes. *Gunma Reports on Med. Sci.* 9, 1974, in press.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND THERAPEUTIC EFFECT OF FOSFOMYCIN

SUSUMU MITSUHASHI, TOKUMICHI TANAKA and SATONORI KURASHIGE
Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University

Each 250 strains of various bacterial species were at random selected from our clinical stock cultures, and antibacterial activity of fosfomycin (FOM) toward these bacteria was determined. High antibacterial activity of FOM was observed against *Salmonella* strains, and followed by those toward *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. It should be noted however that FOM showed high antibacterial activity toward *P. aeruginosa*. The bacterial strains used were resistant to various chemotherapeutic agents including TC, CP, SM, SA, KM, GM, β-lactam antibiotics, etc., while FOM showed no cross resistance to these drugs.

Therapeutic effect of FOM was examined using ICR-JCL strain mice infected with a virulent strain (116-54) of *Salmonella enteritidis*. Therapeutic effect was observed in mice with 4 subcutaneous administrations of FOM on day 0, 1, 3 and 5 after infection, while single or two administrations showed no therapeutic effect. From the spleens of mice showing characteristic typhoid symptoms during therapy, FOM-resistant strains of *S. enteritidis* were isolated. Demonstration frequency of FOM-resistant bacteria was 10⁻⁶ and MIC toward all resistant bacteria was 6.25μg/ml, while that of original *Salmonella* strain was 0.19μg/ml. Virulence of FOM-resistant *Salmonella* strain against mice was 1,000 times lower than that of original one so far as examined.