

新抗生物質 Fosfomycin に関する細菌学的評価

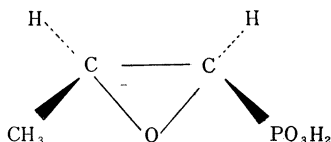
大槻 雅子・西野 武志・清水 陽子

安村 貞美・渡辺 純・中沢 昭三

京都薬科大学微生物学教室

はじめに

Fosfomycin は米国 Merck 社およびスペイン CEPA 社で共同開発された新抗生物質¹⁾⁴⁾で、極めてめずらしい化学構造を有している。本物質は化学名を 1-cis-1,2-epoxypropyl phosphonic acid といい、化学構造は次のとおりである。



分子式 $C_3H_7PO_4$ 、分子量 138.1 の白色結晶性物質で、その Na 塩は注射剤、Ca 塩は経口剤として用いられる。Mouse を用いた急性毒性は Ca 塩については p.o. 720,000mg(力価)/kg, Na 塩については p.o. 4,460mg(力価)/kg, i.v. 1,105mg(力価)/kg といわれている。また本物質の作用機作については、 α -glycerophosphate または glucose-6-phosphate の能動輸送系によってとり込まれ、細菌細胞壁の mucopeptide 生合成系の最初の段階を触媒する酵素, phosphoenolpyruvate: UDP-Glu-Nac-3-O-enolpyruvyl transferase と化学結合することにより、細胞壁合成を阻害するといわれる。

今回、私どもはこの Fosfomycin(FOM) について細菌

学的評価を行なったので報告する。以下の実験においては、Fosfomycin Na 塩を使用した。

実験方法および実験成績

抗菌力測定法に関する諸実験

本物質は試験管内抗菌力において培地組成その他の影響を受けやすく通常の方法では抗菌力, MIC(μ g/ml) 値が大きく変動し²⁾³⁾、再現性が乏しいことが報告されていたので、まず種々な条件下での抗菌力について検討を行なった。

a) 固形培地と添加物の影響

Nutrient Agar (NA, ニッサン) Heart Infusion Agar (HIA, ニッサン), Modified MULLER-HINTON Medium (MH, ニッサン) の3種の培地について 5% Desfibrinated Sheep Blood(DSB), 50 μ g/ml Glucose-6-phosphate(G6P) 添加による抗菌力 MIC(μ g/ml) の変動について前培養に Tryptosoya Broth(ニッサン), 測定菌には教室保存のグラム陽性菌, グラム陰性桿菌 20 株を用いて寒天平板希釈法により検討した。Staph. aureus 209-PJC 株, E. coli NIH JC-2 株の場合には前培養菌を生理食塩水で 100 倍希釈したものについても検討した。なお、レンサ球菌群, 肺炎球菌群, ジフテリア菌については NA, HIA とともに 10% 馬血液を加えて測定した。その成績は Table 1, 2 に示されるとおりであ

Table 1 Antibacterial spectrum of fosfomycin

(Agar streak method)

a) Gram-positive bacteria

Test strain	NA	NA+DSB	NA+G6P	HIA	HIA+DSB	MH	MH+DSB
Staph. aureus 209-PJC	50	12.5	6.25	50	25	100	50
" (×100)	6.25	3.12	1.56	3.12	3.12	12.5	12.5
Staph. epidermidis	50	25	25	100	25	50	25
Strept. pyogenes S ₂₃	50	6.25	—	50	12.5	12.5	12.5
Strept. faecalis	50	50	—	50	100	50	50
Strept. viridans	100	100	—	>100	100	50	100
Diplo. pneumoniae type I	50	12.5	—	50	100	25	100
" type III	50	50	—	100	50	25	100
B. subtilis PCI-219	50	100	25	50	100	>100	>100
B. anthracis	12.5	50	12.5	25	50	100	100
Cory. diphtheriae	>100	>100	50	>100	>100	>100	>100

MIC (μ g/ml)

Table 2

b) Gram-negative bacteria

Test strain	NA	NA+DSB	NA+G6P	HIA	HIA+DSB	MH	MH+DSB
<i>E. coli</i> NIH-JC	>100	12.5	12.5	>100	50	50	12.5
" (×100)	25	3.12	3.12	25	12.5	25	12.5
" NIH	>100	25	12.5	>100	100	>100	>100
<i>Entero. aerogenes</i>	>100	100	25	>100	>100	>100	>100
<i>Sal. typhi</i> O-901	1.56	1.56	1.56	3.12	3.12	0.78	3.12
<i>Sal. enteritidis</i>	25	12.5	12.5	50	25	12.5	6.25
<i>K. pneumoniae</i>	>100	>100	50	>100	>100	>100	>100
<i>Sh. flexneri</i> 2a	>100	25	3.12	>100	50	100	50
<i>Sh. sonnei</i>	12.5	6.25	6.25	12.5	25	12.5	25
<i>Proteus</i> sp. (MB 838)	>100	100	100	>100	>100	100	100
<i>Pseudo. aeruginosa</i> No. 12	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

MIC (μg/ml)

り、NA については G-6-P 添加の場合に抗菌力が上昇した。

DSB 添加の場合にも抗菌力は上昇したが G6P 添加ほどではなく、緑膿菌については DSB、G6P 添加によっても抗菌力の上昇は認められなかった。HIA、MH につ

Table 3 Sensitivity of fosfomycin on *Staph. aureus* 209-PJc

Medium	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	Cont.
NA											
NA+DSB											
NA+D6P											
HIA											
HIA+DSB											
MH											
MH+DSB											

Table 4 Sensitivity of fosfomycin on *E. coli* NIH JC-1

Medium	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	Cont.
NA											
NA+DSB											
NA+G6P											
HIA											
HIA+DSB											
MH											
MH+DSB											

いても DSB 添加の有無について検討したが添加により抗菌力が上昇する場合としない場合があり、これらの中では NA+G6P が最も強い抗菌力を示したが、菌量を 100 倍に希釈した場合にはどの培地においても良好な成績を示した。これらの判定をした場合シャーレに現われた菌の増殖の様子を Table 3, 4 に示した。黒くぬりつぶされているのはコントロールと同じくらいに増殖していることを示しており、薬剤濃度が高くなるにつれ、菌の増殖も抑制されている。ブドウ球菌、大腸菌の場合の培地についても MIC と MAC の間に大きな差が認められている。

b) 薬剤耐性菌の出現について

FOM 抗菌力試験の場合 MIC と MAC の間に大きな差が認められたのでこれは耐性菌が出現したためではないかと思われたので Cup 法により検討した。ブドウ球菌、大腸菌を 2% の割合に含む普通寒天平板上の Cup にブドウ球菌の場合は FOM 500 μg/ml, 125 μg/ml, 31.25 μg/ml, 15.6 μg/ml, 大腸菌の場合は 1,000 μg/ml, 500 μg/ml, 250 μg/ml, 6.25 μg/ml の薬剤を添加し、37°C, 16 時間培養後の阻止円を見たのが Fig. 1 である。

Fig. 1 Cup method

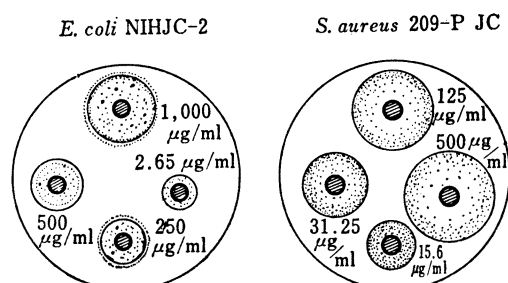


Table 5 Antibacterial activity
(Broth dilution method)

	NB	NB+ DSB	NB+ G6P	HIB
<i>Staph. aureus</i> 209-P·JC	25	12.5	6.25	50
<i>E. coli</i> NIH·JC	200	100	6.25	400

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Table 6 Antibacterial activity

Test strain	NA	MH
<i>Staph. aureus</i> 209-P·JC	100	50
×10	6.25	12.5
×100	6.25	12.5
×1000	6.25	12.5
<i>Staph. epidermidis</i>	50	50
×10	12.5	12.5
×100	6.25	6.25
×1000	6.25	6.25
<i>E. coli</i> NIH·JC	>100	100
×10	25	12.5
×100	25	12.5
×1000	12.5	12.5
<i>Salmonella enteritidis</i>	12.5	12.5
×10	12.5	12.5
×100	3.12	3.12
×1000	1.56	3.12
<i>Proteus</i> sp. (MB 838)	100	100
×10	50	50
×100	12.5	50
×1000	0.78	12.5

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

いずれの阻止円の中にも多くの colony が認められ耐性菌が存在しているのが判った。

c) 液体培地における添加物の影響

Nutrient broth (NB, ニッサン) 培地に 5% DSB, 50 $\mu\text{g/ml}$ を添加した場合の抗菌力をブドウ球菌, 大腸菌について Heart infusion broth (HIB, ニッサン) 培地を対照に液体希釈法により検討した。37°C 20 時間培養後の MIC($\mu\text{g/ml}$) は Table 5 に示すとおりである。寒天平板希釈法の場合と同様, G6P 添加で最も良好な感受性を示した。

d) 接種菌量の影響

前培養に Modified MULLER-HINTON broth MHB 試験培地に NA, MH の両培地を用い, グラム陽性球菌 2 株, 陰性桿菌 3 株について接種菌量を変化させた場合の MIC,

Table 7 Antibacterial activity

Test strain	NA	MH
<i>Staph. aureus</i> 209-P·JC	0.78	0.19
×10	0.78	0.19
×100	0.78	0.19
×1000	0.78	0.19
<i>Staph. epidermidis</i>	3.12	1.56
×10	3.12	1.56
×100	3.12	1.56
×1000	3.12	1.56
<i>E. coli</i> NIH·JC	0.78	3.12
×10	0.78	1.56
×100	0.78	1.56
×1000	0.78	1.56
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.19	0.19
×10	0.19	0.19
×100	0.19	0.19
×1000	0.19	0.19
<i>Proteus</i> sp. (MB 838)	0.19	0.39
×10	0.19	0.39
×100	0.09	0.39
×1000	0.09	0.39

MAC ($\mu\text{g/ml}$)

Table 8 Sensitivity distribution of clinical isolates

a) *Staph. aureus*

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							Total strains
	3.12	6.25	12.5	25	50	100	>100	
×				2	2	6	11	21
×100	1	5	6	6	6	1	1	21

	MAC ($\mu\text{g/ml}$)										Total strains
	0.045	0.09	0.19	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	
×		4	5	2	2	4	2	1		1	21
×100	1	3	4	6	1	2	2	1		1	21

MH medium

MAC を検討した結果, Table 6, 7 に示される成績を得た。NA, MH 両培地とも接種する菌量を 10 倍, 100 倍, 1,000 倍と希釈するにつれ MIC は低い値を示すようになるが, MAC については接種菌量による抗菌力の変化は認められなかった。臨床分離ブドウ球菌 21 株, 臨床分離大腸菌 16 株について MHB 前培養菌の原液と 100 倍希釈液の感受性を MH を用いる寒天平板希釈法により MIC, MAC で求めた。その成績は Table 8, 9 に示さ

Table 9

b) *E. coli*

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					Total strains
	12.5	25	50	100	>100	
		4	2		10	16
$\times 100$	3	8	4	1		16

	MAC ($\mu\text{g/ml}$)					Total strains
	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	
		1	10	5		16
$\times 100$		1	15			16

(MH medium)

Table 10 Antibacterial activity
(Broth dilution method)

	NB
<i>Staph. aureus</i> 209-P·JC	12.5
$\times 10$	6.25
$\times 100$	1.56
$\times 1000$	1.56
<i>E. coli</i> NIH·JC	100
$\times 10$	50
$\times 100$	12.5
$\times 1000$	6.25

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Table 11 Antibacterial activity

Test strain	Nutrient agar	
	Eiken	Nissan
<i>Staph. aureus</i> 209-P·JC	25	25
$\times 100$	3.12	3.12
$\times 1000$	3.12	3.12
<i>Staph. epidermidis</i>	25	12.5
$\times 100$	12.5	6.25
$\times 1000$	12.5	6.25
<i>E. coli</i> NIH·JC	12.5	100
$\times 100$	1.56	50
$\times 1000$	0.39	12.5
<i>Salmonella enteritidis</i>	25	12.5
$\times 100$	3.12	3.12
$\times 1000$	3.12	0.78
<i>Proteus</i> sp (MB 838)	>100	100
$\times 100$	1.56	12.5
$\times 1000$	0.78	1.56

MIC ($\mu\text{g/ml}$)Table 12 Antibacterial spectrum
Gram-positive bacteria

Test strain	FOM
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P·JC	6.25
" Smith	6.25
" Terajima	12.5
" Neumann	6.25
" E-46	0.78
" No. 80	3.12
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6.25
<i>Sarcina lutea</i> PCI-1001	0.045
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-219	0.39
<i>Bacillus anthracis</i>	12.5

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

Table 13 Gram-negative bacteria

Test strain	FOM
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	6.25
" NIH	3.12
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6.25
<i>Salmonella typhi</i> T-287	0.19
" O-901	0.09
<i>Salmonella paratyphi</i> A	1.56
" B	0.78
<i>Salmonella enteritidis</i>	1.56
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.5
<i>Shigella dysenteriae</i> EW-7	0.78
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW-10	6.25
<i>Shigella boydii</i> EW-28	50
<i>Shigella sonnei</i> EW-33	0.19
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	6.25
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	0.19
<i>Proteusmorganii</i> Kono	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	6.25
" IFO-3445	3.12
" No. 24	6.25
" No. 85	0.78

MIC ($\mu\text{g/ml}$)

れるとおりで MIC については原液と 100 倍希釈液で感受性分布が異なるが, MAC についてはほぼ同じ成績が得られ, ブドウ球菌の場合 100 倍希釈で MAC が $25 \mu\text{g/ml}$ のものは 100 倍希釈の MIC も $>100 \mu\text{g/ml}$ の耐性を示していた。Table 10 に示すとおり液体希釈法においても同様に接種菌量により抗菌力が変化するという成績が得られた。FOM の抗菌力測定において同じ NA についても Table 11 に示すとおり Eiken と Nissan で抗菌力に相違が認められ, とくにその差は *E. coli* NIH·JC で著明であった。

以上のように FOM 感受性測定についてはその測定方法により測定値にばらつきがあることが認められた。以下の実験についてはホスホマイシン MIC 測定小委員会の測定法に従い本物質の細菌学的評価を行なった成績について報告する。

抗菌スペクトラム

教室保存のグラム陽性球菌、桿菌，グラム陰性桿菌に対する試験管内抗菌力，MIC($\mu\text{g/ml}$) をホスホマイシン抗菌力測定法により求めた。すなわち，前培養に Nutrient Broth (ニッサン)，測定用培地には Nutrient Agar (Difco) を用い，前培養菌を生食水で 1,000 倍希釈したものを接種した。その成績は Table 12, 13 に示されるようにグラム陽性球菌，桿菌，グラム陰性桿菌に対して有効であり，その抗菌力はブドウ球菌では 0.78~12.5 $\mu\text{g/ml}$ であり Penicillin 耐性ブドウ球菌 No. 80 株に対しても 3.12 $\mu\text{g/ml}$ という感受性を示した。大腸菌では 3.12~6.25 $\mu\text{g/ml}$ ，肺炎桿菌 12.5 $\mu\text{g/ml}$ ，変形菌に対しても *mirabilis* 株には 0.19 $\mu\text{g/ml}$ 他は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ を示し，緑膿菌には 0.78~6.25 $\mu\text{g/ml}$ とグラム陽性菌，グラム陰性桿菌ともに同程度の感受性を示した。

臨床分離株に対する感受性分布

臨床的に分離されたブドウ球菌 50 株，大腸菌 32 株の感受性分布をホスホマイシン抗菌力測定法に従い求めた。その成績は Table 14 に示されるとおりである。

Table 14 Sensitivity distribution of clinical isolates

FOM strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									Total strains
	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
<i>Staph. aureus</i>			4	11	19	14	1		1	50
<i>E. coli</i>	1		1	3	9	13	3	2		32

ブドウ球菌では 6.25 $\mu\text{g/ml}$ にピークを有し，ほとんどの株が 3.12~12.5 $\mu\text{g/ml}$ 付近に存在しており，100 $\mu\text{g/ml}$ を示す株が 1 株認められた。大腸菌についてピークは標準株の MIC 付近の 12.5 $\mu\text{g/ml}$ にあり，0.39~50 $\mu\text{g/ml}$ の間に分布していた。

抗菌力におよぼす諸因子の影響

抗菌力におよぼす培地 pH，人血清添加，接種菌量の影響を *Staph. aureus* 209-PJC 株，*E. coli* NIH JC-2 株を試験菌として Nutrient broth を用いた液体希釈法により 37°C 20 時間培養後の MIC を求めた。その成績は Table 15 に示されるとおりである。pH の影響については，pH 5，9 では菌の増殖が認められなかった。pH 6~8 についてみると酸性側で抗菌力の増強がみられ，人血清添加による影響では，血清の量が増すにつれて抗菌力は低下し，接種菌量によっても抗菌力は変動をきた

Table 15 Influence of various factors on activity of fosfomycin

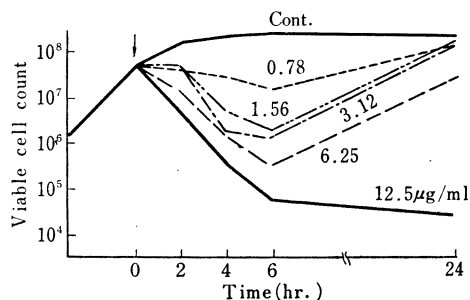
		<i>S. aureus</i> 209-P·JC	<i>E. coli</i> NIH JC-2
pH	9	—	—
	8	25	100
	7	3.12	12.5
	6	1.56	3.12
	5	—	—
Human serum (%)	50	12.5	100
	25	12.5	50
	10	6.25	12.5
	0	3.12	6.25
[inoculum size (cells/ml)	$\times 10^7$	50	400
	$\times 10^6$	25	200
	$\times 10^5$	25	100
	$\times 10^4$	12.5	25
	$\times 10^3$	6.25	6.25

し， 10^7 cells/ml でブドウ球菌は 50 $\mu\text{g/ml}$ ，大腸菌は 400 $\mu\text{g/ml}$ を示したものが 10^3 cells/ml の菌量でともに 6.25 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し，接種菌量によりかなり影響を受けることは明らかである。

細菌の増殖曲線におよぼす影響

細菌の増殖曲線におよぼす FOM の影響を *Staph. aureus* 209-PJC 株を用いて生菌数測定により検討した。Nutrient broth 37°C 20 時間培養菌を同じ培地で 10^6 cells/ml に希釈し，37°C で約 3 時間培養後の 7×10^7 cells/ml で薬剤を MIC 濃度を中心としてその 2 倍，4 倍，1/2 および 1/4 量添加した。以後 2，4，6，24 時間後の生菌数を求めた。その成績は Fig. 2 に示すとおりである。

Fig. 2 Bactericidal effect of fosfomycin against *Staph. aureus* 209-P·JC



りである。1/4 MIC に相当する 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 作用では静菌的，1/2 MIC~2MIC に相当する 1.56~6.25 $\mu\text{g/ml}$ 作用では 6 時間まで殺菌作用がみられたが 24 時間後には菌の増殖が認められ，4MIC 量の 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 作用で

Table 16

Conc.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	0 hr.	24 hr.
Control	12.5	12.5
0.78 $\mu\text{g/ml}$	"	50
1.56 $\mu\text{g/ml}$	"	100
3.12 $\mu\text{g/ml}$	"	100
6.25 $\mu\text{g/ml}$	"	>100
12.5 $\mu\text{g/ml}$	"	>100

は24時間目まで殺菌作用がみられた。24時間後に増殖してきた菌の感受性, MIC($\mu\text{g/ml}$)をみると, Table 16に示されるとおり菌液を希釈せずに測定した場合, 0時間目では12.5 $\mu\text{g/ml}$ を示していたものが24時間目には50~7,100 $\mu\text{g/ml}$ を示すようになった。これはFOM作用で殺菌されなかった自然耐性菌が増殖してきたものと思われる。

他剤との併用効果

FOMと他の抗生物質間の併用効果の有無を *E. coli* NIH JC-2株を用い, Nutrient brothを用いるBOX法により検討した。使用した薬剤はAmpicillin(AB-PC),

Table 17 Combination effect of FOM and AB-PC against *E. coli* NIH JC-2

		FOM ($\mu\text{g/ml}$)									AB-PC alone
		50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	
AB-PC ($\mu\text{g/ml}$)	25	—									—
	12.5										
	6.25										
	3.12										
	1.56										
	0.78	+					+				
	0.39										
	0.19										
0.09											
FOM alone											
FOM alone	—	+								+	

Table 18 Combination effect of FOM and CEX against *E. coli* NIH JC-2

		FOM ($\mu\text{g/ml}$)									SM alone
		50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	
SM ($\mu\text{g/ml}$)	50	-									-
	25										
	12.5										
	6.25										
	3.12										
	1.56	-					+				
	0.78										+
	0.39										+
0.19	+										
FOM alone	+										
FOM alone	-	+									+

Table 19 Combination effect of FOM and TC against *E. coli* NIH JC-2

		FOM ($\mu\text{g/ml}$)									TC alone
		50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	
TC ($\mu\text{g/ml}$)	6.25	-									-
	3.12										
	1.56										
	0.78										
	0.39										
	0.19	-					+				+
	0.09										+
	0.045										+
0.022	+										
FOM alone	+										
FOM alone	-	+									+

Table 20 Combination effect of FOM and CP against *E. coli* NIH JC-2

		FOM($\mu\text{g/ml}$)									CP alone
		50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	
CP($\mu\text{g/ml}$)	12.5	-									-
	6.25										-
	3.12										-
	1.56										-
	0.78										-
	0.39	-					+				+
	0.19										+
	0.09										+
0.045	+										
FOM	+										
FOM	-	+									+

Table 21 Combination effect of FOM and SM against *E. coli* NIH JC-2

		FOM ($\mu\text{g/ml}$)									CEX alone
		50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.73	0.39	0.19	
CEX ($\mu\text{g/ml}$)	50										-
	25										
	12.5										
	6.25										
	3.12										
	1.56						+				+
	0.78										
	0.39										
	0.19										
FOM alone	-	+								+	

Cephalexin(CEX), Tetracycline(TC), Chloramphenicol(CP), Streptomycin(SM), Polymyxin B(PL-B)の6種である。その成績はTable 17, 18, 19, 20, 21, 22に示すとおり, いずれの薬剤との間においても併用効果は認められなかった。

マウス実験的感染症に対する治療効果

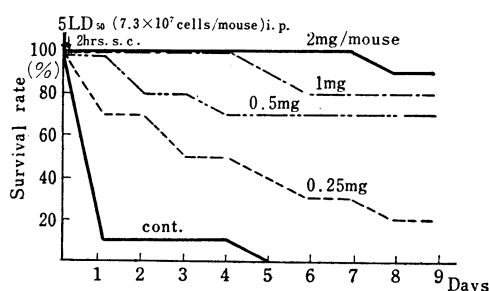
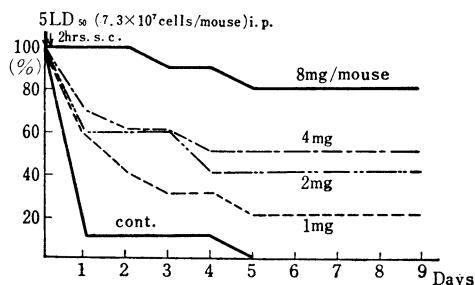
Penicillin 耐性 *Staph. aureus* No. 13株, *Diplo. pneumoniae* type III株, *E. coli* NIH株のマウス実験的

Table 22 Combination effect of FOM and PL-B against *E. coli* NIH JC-2

		FOM($\mu\text{g/ml}$)									PLB
		50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	alone
PL-B ($\mu\text{g/ml}$)	12.5										-
	6.25										
	3.12										
	1.56										
	0.78										+
	0.39										
	0.19										
	0.09										
	0.045										
FOM alone	-	+								+	

感染症に対する治療効果を ddys 系 mouse ϕ 17 ± 1 g 1 群 10 匹を用いて検討した。比較薬剤としては注射用 Cephalosporin 系抗生物質である Cephalothin (CET), Cephaloridine (CER) を用いた。

Penicillin 耐性 *Staph. aureus* No. 13 株あるいは *E. coli* NIH 株を Nutrient agar 培地で 37°C 18 時間培養し、この菌を Nutrient broth 培地に浮遊、10% ガストリックムチンと等量混合しマウス腹腔内に 0.25 ml 接種した。攻撃菌量はブドウ球菌 No. 13 株の場合 5LD_{50} (7.3×10^7 cells/mouse), 大腸菌 NIH 株の場合は 8LD_{50} (1.8×10^8 cells/mouse) である。Diplo. pneumoniae type

Fig. 3 Protecting effect of fosfomycin against experimental mice infection with *Staph. aureus* No. 13Fig. 4 Protecting effect of CET against experimental mice infection with *Staph. aureus* No. 13

Ⅲ株の場合は 10% 人血清加 Heart infusion broth で 37°C 18 時間培養した菌を生理食塩水で 20 倍希釈したものを用いた。この場合の攻撃菌量は 100LD_{50} であった。治療群は菌接種後 2 時間目に 1 回皮下治療を行なった。その成績は Fig. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 に示されるとおりである。縦軸には生存率、横軸には観察日数を示した。Penicillin 耐性ブドウ球菌 No. 13 株では FOM 投与群で 2mg/mouse で 90%, 1mg/mouse で 80%, 0.5mg/mouse で 70%, 0.25mg/mouse で 20% の延命効果が得られた。無処置群は 5 日以内にすべて死亡している。対照とした CET 投与群では、8mg/mouse

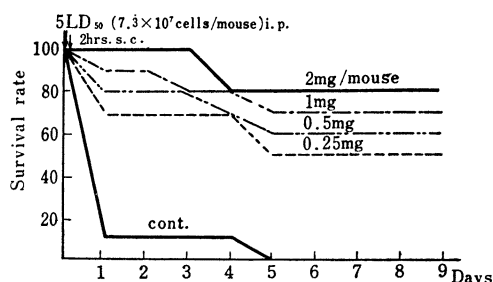
Fig. 5 Protecting effect of CER against experimental mice infection with *Staph. aureus* No. 13

Fig. 6 Protecting effect of fosfomycin against experimental mice infection with Diplo. pneumoniae type Ⅲ

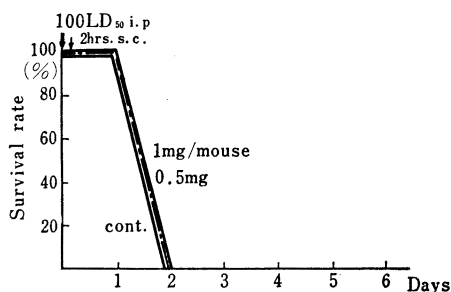


Fig. 7 Protecting effect of CET against experimental mice infection with Diplo. pneumoniae type Ⅲ

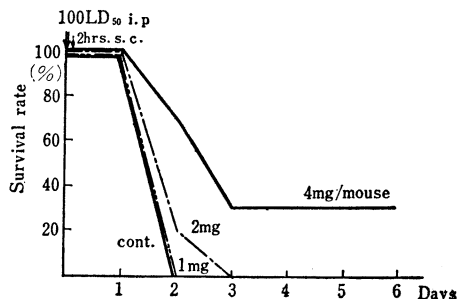


Fig. 8 Protecting effect of CER against experimental mice infection with *Diplo. pneumoniae* type III

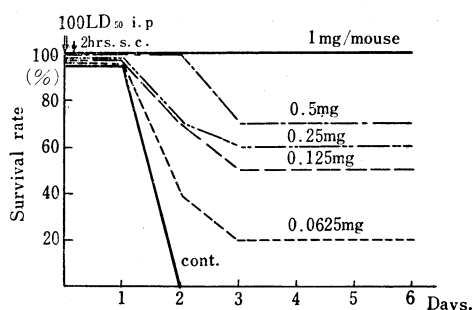


Fig. 9 Protecting effect of fosfomycin against experimental mice infection with *E. coli* NIH

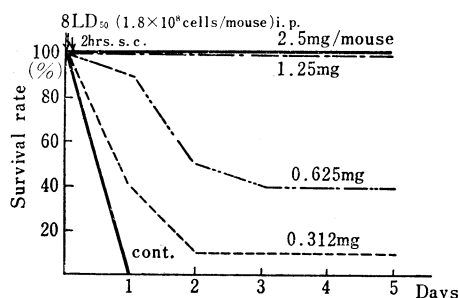
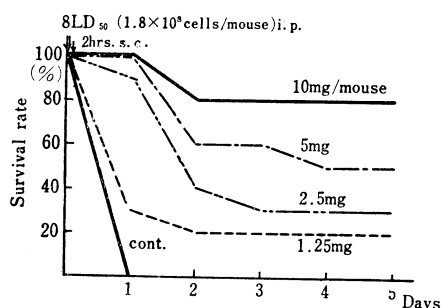
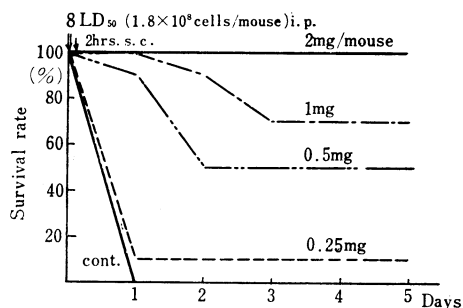


Fig. 10 Protecting effect of CET against experimental mice infection with *E. coli* NIH



で 80%, 1mg/mouse で 20% の延命効果が, CER 投与群では 2mg/mouse で 80%, 1mg/mouse で 70%, 0.25mg/mouse で 50% の延命効果が認められた。肺炎球菌の場合 FOM は 4mg/mouse の投与量で無処置群と同様 2 日以内に全て死亡した。CET 投与群では 1mg/mouse で 30%, CER 投与群では 1mg/mouse で 100%, 0.5 mg/mouse で 70%, 0.125mg/mouse で 50%, 0.0625 mg/mouse で 20% の延命効果が得られた。大腸菌の場合においては, FOM は 1.25 mg/mouse で 100%, 0.625mg/mouse で 40%, 0.312 mg/mouse で

Fig. 11 Protecting effect of CER against experimental mice infection with *E. coli* NIH



10%, CET 10mg/mouse で 80%, 2.5mg/mouse で 30%, 1.25mg/mouse で 20%, CER は 2mg/mouse で 100%, 1mg/mouse で 70%, 0.5 mg/mouse で 50%, 0.25mg/mouse で 10% という延命効果が得られた。この場合の ED₅₀ 値を求めると Table 23, 24, 25 のとおりになる。Penicillin 耐性ブドウ球菌 No.13 株では FOM は CET の 8 倍くらいの効果を示したが CER とはほぼ同じ値であった。肺炎球菌については FOM は

Table 23 Protecting effect of FOM, CET and CER against experimental mice infection with *Staph. aureus* No.13

	MIC (μg/ml)*	ED ₅₀ (mg/mouse)
F O M	100	0.4
C E T	0.78	3.2
C E R	0.19	0.3

*Heart infusion agar

Table 24 Protecting effect of FOM, CET and CER against experimental mice infection with *Diplo. pneumoniae* type III

	MIC(μg/ml)*	ED ₅₀ (mg/mouse)
F O M	100	>1.0
C E T	0.19	>4.0
C E R	0.045	0.2

*Heart infusion agar with 10% horse blood

Table 25 Protecting effect of fosfomycin, CET and CER against experimental mice infection with *E. coli* NIH

	MIC(μg/ml)*	ED ₅₀ (mg/mouse)
F O M	>100	0.62
C E T	6.25	4.6
C E R	6.25	0.6

*Heart infusion agar

71.0mg となり ED_{50} 値は求められなかった。肺炎球菌に対する効果は CER が最も優れていた。大腸菌感染では、ブドウ球菌の場合と同様 FOM は CER とほぼ同じ成績を示し、CET の効果に比べるとはるかに良好であった。

総括ならびに考案

米国 Merck 社およびスペイン CEPA 社で共同開発された新しい抗生物質 Fosfomycin に関する細菌学的評価を行なった。本物質は従来の日本化学療法学会感受性測定法による抗菌力測定では抗菌力が弱く現われるため、まず測定法の検討から始めた。標準株の感受性を他の化学療法剤の感受性に近づけるために測定用培地の種類を変えたり、5% Desfibrinated Sheep Blood (DSB) や 50 μ g/ml Glucose-6-phosphate (G6P) の添加について検討した。これらの中では G6P 添加で抗菌力が増強したが接種菌量を少なくすることによりこれ以上の効果が得られた。ホスホマイシン MIC 測定小委員会でいろいろ検討された結果ホスホマイシン抗菌力測定法が定められ以下の実験においてはこの測定法に従い検討した成績である。

Fosfomycin はグラム陽性菌、グラム陰性桿菌に抗菌スペクトラムを示し、その抗菌力はグラム陽性菌、陰性桿菌に対しほぼ同じであった。次に臨床分離ブドウ球菌、大腸菌の感受性分布を調べたが、ともに標準株の MIC 付近にピークを有する分布を示し、ほとんどの株が Fosfomycin に感受性であった。しかし、ブドウ球菌の場合に 50 株中 1 株だけが 100 μ g/ml の耐性を示し、この株の耐性機構には興味を持たれ、今後検討を加えていきたい。試験管内抗菌力におよぼす諸因子の影響あるいは、細菌の増殖曲線におよぼす影響を検討した。培地 pH の影響では酸性側で抗菌力が増強し、人血清蛋白の添加でも抗菌力の変動を受けた。接種菌量による影響では感受性測定法の場合に問題となったとおり、接種菌が少なくなるほど抗菌力は上昇した。本物質の抗菌作用型式は 1/4 MIC 濃度では静菌的、1/2~2MIC 濃度では薬剤添加後 6 時間までは殺菌作用がみられたが 24 時間後には菌の増殖が認められた。4MIC 濃度では殺菌的であった。24 時間後に増殖してきた菌の MIC を測定すると 50~7,100 μ g/ml を示した。これは Fosfomycin 自然耐性菌が Fosfomycin の作用を受けずに増殖してきたものと思われる。次に Fosfomycin と他の抗生物質との間の協力作用を検討したがいずれの薬剤とも併用効果は得られなかった。しかし現在私どもはブドウ球菌を用いてこれらの併用効果を検討中であるが、この場合においては Lysozyme あるいは CEX などとの併用で明らかな協力効果が得られており、次回にまとめて報告したい。マウス実験

的感染症に対する治療効果については注射用 Cephalosporin 系抗生物質である Cephalothin, Cephaloridine を比較薬剤として検討した。Penicillin 耐性ブドウ球菌、大腸菌感染症においては Fosfomycin は Cephalothin より良好で Cephaloridine とほぼ同じ治療効果を示したが、肺炎球菌感染症では Cephaloridine が最も良く、Fosfomycin の ED_{50} 値は >1 mg という成績であった。

結 論

- 1) 本物質はグラム陽性菌、陰性桿菌に抗菌スペクトラムを有し、その抗菌力はグラム陽性菌、陰性桿菌はほぼ同じである。
- 2) 臨床分離株の感受性分布はほとんどの菌が標準株に近い感受性を示した。
- 3) 抗菌力におよぼす諸因子の影響では培地 pH, 人血清蛋白添加, 接種菌量により影響を受けた。
- 4) その抗菌作用型式は 1/4 MIC 濃度で静菌的、それ以上の濃度では殺菌的であったが、24 時間後には菌の増殖がみられ、これらの増殖してきた菌については MIC 値が上昇していた。
- 5) 大腸菌を用いた Fosfomycin と他の抗生物質間の協力作用はみられなかった。
- 6) マウス実験的感染症に対する治療効果は penicillin 耐性ブドウ球菌、大腸菌感染症では Cephaloridine とほぼ同程度であったが肺炎球菌感染症では Cephaloridine ほどの効果が得られなかった。

引 用 文 献

- 1) HENDLIN, D.; E. STAPLEY, J. M. MATA, S. HERCINDEZ, S. PLATES, M. JACKSON, H. WALLK, A. K. MILLER, F. J. WOLF, T. W. MILLER, L. CHAIET, F. M. KAHAN & H. B. WOODRUFF: Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. Science (Washington) 166: 122~123, 1969
- 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 & Chemother. 1969: 297~302, 1970
- 3) ZIMMERMAN, S. B.; E. O. STAPLEY, H. WALLICK & R. BALDWIN: Phosphonomycin, IV. Susceptibility testing method and survey. Antimicrob. Agents & Chemother. 1969: 303~309, 1970
- 4) MILLER, A. K.; B. M. FROST, M. E. VALIANT, H. KROPP & D. HENDLIN: Phosphonomycin, V. Evaluation in mice. Antimicrob. Agents & Chemother. 1969: 310~315, 1970

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF A NEW ANTIBIOTIC FOSFOMYCIN

MASAKO OTSUKI, TAKESHI NISHINO, YOKO SHIMIZU,
SADAMI YASUMURA, JUN WATANABE and SHOZO NAKAZAWA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Fosfomycin, a new antibiotic, has been evaluated bacteriologically, using fosfomycin Na.

- 1) This antibiotic has an antibacterial spectrum against Gram-positive and Gram-negative bacteria, antibacterial activity being nearly the same between both.
- 2) The strains isolated clinically presented mostly the sensitivity distribution similar to standard strain.
- 3) Various factors such as medium pH, addition of human serum, protein and inoculum size, affected the antibacterial activity of fosfomycin.
- 4) The type of antibacterial action was bacteriostatic at the concentration of 1/4 MIC, while bactericidal at the higher concentrations. Bacteria grew after 24 hours, and the MIC values rose in these grown bacteria.
- 5) No synergistic action was observed between fosfomycin and other antibiotics in *E.coli*.
- 6) As for the treatment effect for experimental infections of mice, it was almost the same as cephaloridine in the infections due to penicillin resistant *Staphylococcus* or *E.coli*, while it was inferior to cephaloridine in the infections due to *Pneumococcus*.