

PC-904 の嫌気性菌に対する抗菌力

今村博務・江崎孝行・甲畑俊郎・渡辺邦友
望月 泉・二宮敬宇・上野一恵・鈴木祥一郎

岐阜大学医学部微生物学教室

PC-904 は住友化学工業株式会社で新しく開発された半合成ペニシリンで、緑膿菌をはじめ多くの好気性グラム陰性菌に強い抗菌力を示す。著者らは本剤の嫌気性菌に対する *in vitro* における抗菌力、および *Fusobacterium necrophorum* (S-45) 感染マウスに対する治療実験を行なった。

I. 実験材料および方法

1. 供試菌株

Bacteroides fragilis ss. *fragilis* 27 株, *B. fragilis* ss. *thetaitaomicron* 10 株, *B. fragilis* ss. *distasonis* 1 株, *B. fragilis* ss. *vulgatus* 6 株, *B. melaninogenicus* 1 株, *B. praeacutus* 1 株, *Fusobacterium freundii* 2 株, *F. mortiferum* 2 株, *F. necrophorum* 1 株, *F. nucleatum* 1 株, *F. russii* 1 株, *F. varium* 20 株, *Fusobacterium* sp. 9 株, *Veillonella parvula* 3 株, *Veillonella* sp. 1 株, *Clostridium perfringens* 8 株, *C. sporogenes* 3 株, *C. histolyticum* 1 株, *C. sticklandii* 1 株, *C. tetani* 1 株, *Eubacterium limosum* 4 株, *Bifidobacterium adolescentis* 3 株, *Bi. bifidum* 1 株, *Bi. infantis* 1 株, *Bi. longum* 4 株, *Peptococcus asaccharolyticus* 1 株, *P. constellatus* 2 株, *P. magnus* 10 株, *P. prevotii* 1 株, *P. productus* 1 株, *P. variabilis* 2 株, *Peptococcus* sp. 1 株, *Peptostreptococcus anaerobius* 1 株, *Ps. productus* 1 株, *Peptostreptococcus* sp. 1 株の計 134 株を用いた。これらは教室保存株および最近臨床材料から分離、同定された菌株である。

2. 供試薬剤

PC-904 (住友化学工業), ABPC (三共), CBPC (台糖ファイザー), CEZ (フジサワ薬品工業) および CLDM (Upjohn) を使用した。

3. 薬剤感受性試験法

渡辺により標準化された方法^{1), 2)}で行なった。

4. 接種菌量の MIC に及ぼす影響

被検菌株の GAM プイオンでの 24 時間培養菌を, GAM プイオンで 1 ml あたりの生菌数が 10^8 個, 10^6 個および 10^4 個になるように菌液を調整して, 接種菌量の MIC に及ぼす影響を検討した。

5. 培地 pH の MIC に及ぼす影響

pH 5.7, pH 7.2 および pH 8.0 に調整した GAM 寒天培地を用いて MIC を測定し, 培地 pH の MIC におよぼす影響を検討した。

6. 基礎培地の種類と MIC

GAM 寒天培地 (ニッセイ), TEP 寒天培地 (栄研), 5% ヒト血液加 Brain heart infusion agar (BBL) および 5% ヒト血液加 *Brucella* agar (BBL) の 4 種類の培地を用いて MIC を測定し, 培地の種類による MIC の変動を比較した。

7. 耐性の上昇

望月らにより報告されている方法³⁾に準じて行なった。

8. 自然耐性 mutant の分布

菌量 10^{10} 個, 10^8 個, 10^6 個および 10^4 個あたりの自然耐性 mutant の分布を調べた。上記の各菌量を PC-904 の各濃度含有 (1,000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/ml}$) GAM 寒天培地に接種し, 96 時間嫌気培養後, 各濃度の薬剤含有培地に発育した集落数を測定した。

9. *F. necrophorum* 感染マウスに対する治療効果

感染菌株として教室保存の *F. necrophorum* (S-45) を用いた^{4), 5)}。本菌株の PC-904 に対する MIC は 0.19 $\mu\text{g/ml}$ であった。マウスは体重約 30g の dd-N 系の ♂ を (40 mg/kg/day 筋注, 皮下投与群および 200 mg/kg/day 筋注投与群各 5 匹, 200 mg/kg/day 皮下投与群 3 匹, 未治療群 10 匹) 使用した。*F. necrophorum* (S-45) の GAM 半流動高層培地での 24 時間培養菌液を 0.2 ml マウスの右側腹皮下に接種した。3 日後, 触診により膿瘍形成を確実に認めたマウスに, PC-904 を体重 1 kg あたり 40 mg および 200 mg を 1 日 1 回 7 日間, 皮下注および筋注した。治療終了後, 屠殺剖検し, 菌接種局所, 肺, 心, 肝, 脾および腎を培養した。

II. 実験成績

1. 抗菌スペクトラム

Table 1 は PC-904 の嫌気性菌に対する抗菌スペクトラムを, ABPC, CBPC, CEZ および CLDM と比較した成績である。*Bacteroides* では一般に PC 系抗生剤に耐性といわれる *B. fragilis* に 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を示した。*B. fragilis* 以外の *Bacteroides* には 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下の MIC であった。*Fusobacterium* では *F. mortiferum* 1 株が 100 $\mu\text{g/ml}$ で, その他の菌株は 0.19

Table 1 Antimicrobial spectrum of PC-904 and other antibiotics

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) of :				
	PC-904	ABPC	CBPC	CEZ	CLDM
<i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> (J-1007)	25	12.5	25	50	100
<i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> (JO-36)	>100	100	>100	>100	0.19
<i>B. fragilis</i> ss. <i>thetaitaomicron</i> (SS-4)	50	50	100	>100	0.39
<i>B. fragilis</i> ss. <i>vulgatus</i> (HI-14)	25	6.25	6.25	25	0.39
<i>B. praeacutus</i> (ATCC25539)	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>B. melaninogenicus</i> (N-19)	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>F. varium</i> (JU-23)	12.5	1.56	1.56	1.56	1.56
<i>F. russii</i> (ATCC25533)	0.19	0.19	0.39	0.19	0.19
<i>F. nucleatum</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>F. freundii</i> (ATCC9817)	3.13	1.56	3.13	6.25	0.19
<i>F. necrophorum</i> (S-45)	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
<i>F. mortiferum</i> (J-1012)	100	50	6.25	25	0.39
<i>Fusobacterium</i> sp. (JU-21)	6.25	0.78	1.56	3.13	3.13
<i>V. parvula</i> (KW-5)	12.5	>100	>100	>100	0.19
<i>C. perfringens</i> (JAM-3-1)	0.19	0.19	1.56	0.19	0.19
<i>E. limosum</i>	0.19	0.19	25	6.25	0.19
<i>Bi. adolescentis</i>	0.39	0.39	3.13	6.25	0.19
<i>Bi. longum</i>	0.78	0.78	3.13	25	0.19
<i>P. magnus</i> (ATCC14956)	0.19	0.19	0.78	1.56	0.39
<i>P. variabilis</i> (PL-7-1)	0.19	0.39	1.56	0.78	0.78
<i>P. productus</i> (ATCC27340)	50	0.78	6.25	3.13	0.78
<i>Peptostreptococcus</i> sp. (B-40)	0.19	0.39	0.39	0.19	0.78

B. : *Bacteroides*, F. : *Fusobacterium*, V. : *Veillonella*, C. : *Clostridium*, E. : *Eubacterium*, Bi. : *Bifidobacterium*, P. : *Peptococcus*

~12.5 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示した。嫌気性グラム陰性球菌である *V. parvula* では 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の MIC であった。多くのグラム陽性桿菌および陽性球菌には強い抗菌作用を有し、その MIC は 0.19~0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった。PC-904 は ABPC, CBPC, CEZ と抗菌力において著明

な差を認めなかった。CLDM に比し、グラム陰性菌に対する抗菌作用が若干劣る。

Table 2, 3 は PC-904 の嫌気性グラム陰性菌 72 株および陽性菌 40 株に対する MIC の分布を示す。グラム陰性菌には中等度の抗菌作用を有した。一方、グラム陽

Table 2 Susceptibility of anaerobes isolated from clinical specimens and feces to PC-904

Organism	No. of organisms with an MIC ($\mu\text{g/ml}$) of :						
	≤ 1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	≥ 100
<i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> (25 strains)	1			10	11	1	2
*ss. <i>thetaitaomicron</i> (9 strains)					3	5	1
ss. <i>distasonis</i> (1 strain)			1				
ss. <i>vulgatus</i> (5 strains)			2	2	1		
<i>F. varium</i> (19 strains)		3	9	5	2		
<i>F. mortiferum</i> (1 strain)							1
<i>F. freundii</i> (1 strain)	1						
<i>Fusobacterium</i> sp. (8 strains)			3	4	1		
<i>V. parvula</i> (2 strains)					2		
<i>Veillonella</i> sp. (1 strain)						1	

* : *B. fragilis* ss.

Table 3 Susceptibility of anaerobes isolated from clinical specimens and feces to PC-904

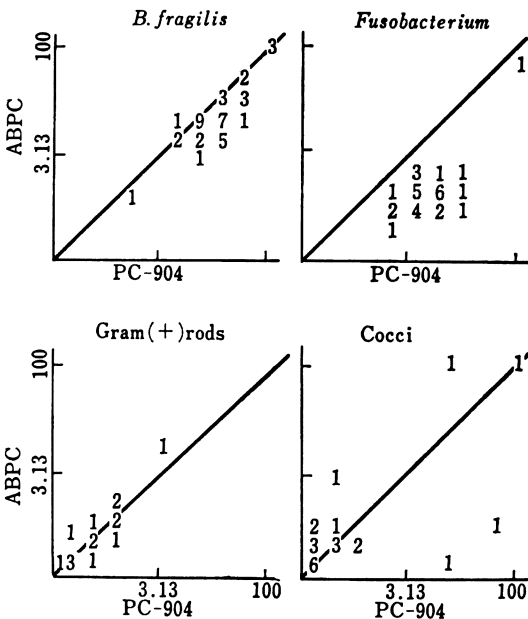
Organism	No. of organisms with an MIC ($\mu\text{g/ml}$) of :					
	0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	≥ 6.25
<i>C. perfringens</i> (7 strains)	7					
<i>C. sporogenes</i> (3 strains)	3					
<i>C. histolyticum</i> (1 strain)	1					
<i>C. sticklandii</i> (1 strain)		1				
<i>C. tetani</i> (1 strain)	1					
<i>F. limosum</i> (3 strains)	2	1				
<i>Bi. longum</i> (3 strains)		2	1			
<i>Bi. adolescentis</i> (2 strains)		2				
<i>Bi. bifidum</i> (1 strain)				1		
<i>Bi. infantis</i> (1 strain)						1
<i>P. magnus</i> (9 strains)	7	1	1			
<i>P. constellatus</i> (2 strains)		1	1			
<i>P. variabilis</i> (1 strain)	1					
<i>P. prevotii</i> (1 strain)	1					
<i>P. asaccharolyticus</i> (1 strain)	1					
<i>Peptococcus</i> sp. (1 strain)	1					
<i>Ps. anaerobius</i> (1 strain)		1				
<i>Ps. productus</i> (1 strain)						1

Ps. : *Peptostreptococcus*

性菌にはきわめて強い抗菌作用を有し、93%が0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下のMICを示した。

Fig. 1, 2, 3, 4は*B. fragilis* 40株, *Fusobacterium* 29株, 嫌気性グラム陽性桿菌 15株および嫌気性球菌

Fig. 1 Correlogram of MICs between PC-904 and ABPC against anaerobes



22株のPC-904に対する感受性をABPC, CBPC, CEZおよびCLDMと比較した成績である。PC-904は嫌気性グラム陽性桿菌および嫌気性球菌に対しては、CBPC, CEZより優れ、嫌気性グラム陰性桿菌である*B. fragilis*

Fig. 2 Correlogram of MICs between PC-904 and CBPC against anaerobes

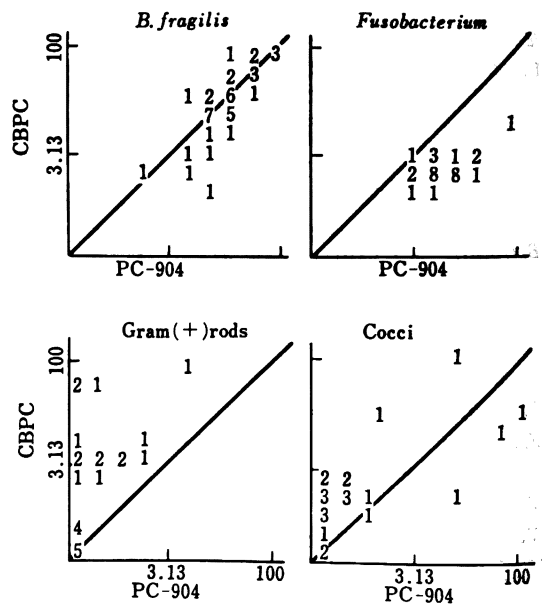


Fig. 3 Correlogram of MICs between PC-904 and CEZ against anaerobes

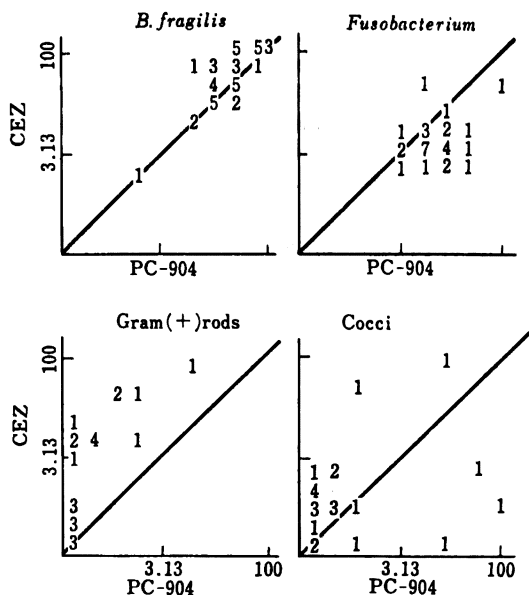
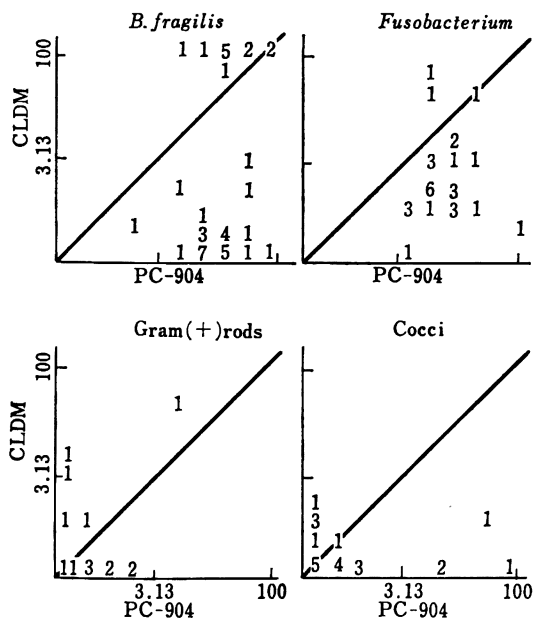


Fig. 4 Correlogram of MICs between PC-904 and CLDM against anaerobes



および *Fusobacterium* に対しては ABPC, CBPC, CLDM に若干劣る。

2. MIC に及ぼす諸因子の影響

Fig. 5 は接種菌量による MIC の変動を検討した成績である。*B. fragilis* の MIC は接種菌量による変動は少ないが、*C. perfringens* の MIC は 10^8 個/ml 接種時に

Fig. 5 Influence of inoculum size on MIC of PC-904

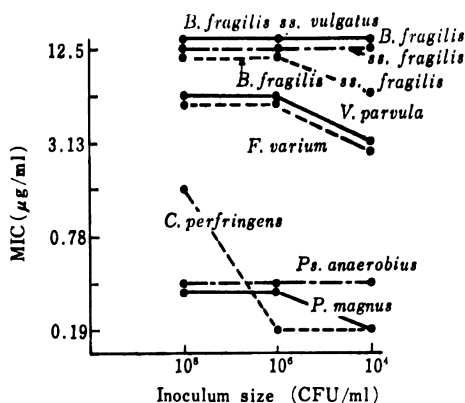
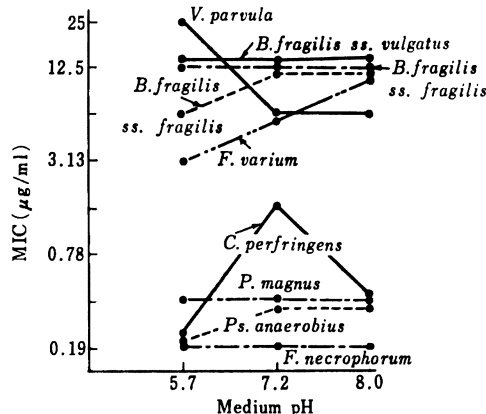


Fig. 6 Influence of medium pH on MIC of PC-904



は 1.56 µg/ml, 10^8 個/ml 接種時には 0.19 µg/ml と変動した。

Fig. 6 は培地 pH による PC-904 の MIC の変動を検討した成績である。PC-904 の抗菌作用は酸性側で若干強いようである。しかし *V. parvula* は pH 5.7 で 25 µg/ml, pH 7.2 および pH 8.0 で 6.25 µg/ml の MIC を示した。

Table 4 は基礎培地による MIC の変動を検討した成績である。*Ps. anaerobius*, *P. magnus*, *C. perfringens*, *B. fragilis ss. fragilis* および *F. varium* など一部の菌種の MIC は基礎培地の種類により 2~8 倍の差が認められた。すなわち 5% ヒト血液加 *Brucella* agar で測定した MIC は低く, GAM 寒天培地を用いると高い MIC を示す。

3. 耐性の上昇

Fig. 7 は試験管内耐性上昇の成績である。*F. varium* は 6.25 µg/ml から 4 代継代後 100 µg/ml 以上とす

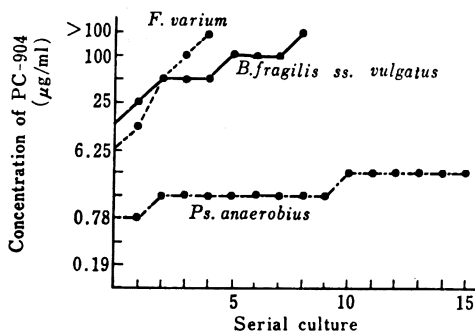
Table 4 MIC of PC-904 on four media

Organism	Medium			
	GAM	TEP	BHIA*	BA**
<i>Ps. anaerobius</i> (B-38)	0.39	0.39	0.19	0.19
<i>P. magnus</i> (4386)	0.39	0.39	0.39	0.19
<i>C. perfringens</i> (JAM-3-1)	1.56	0.78	0.19	0.19
<i>V. parvula</i> (KW-2-2)	6.25	12.5	12.5	12.5
<i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> (4812)	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>B. fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> (2582)	12.5	12.5	6.25	6.25
<i>B. fragilis</i> ss. <i>vulgatus</i> (4743)	12.5	6.25	12.5	12.5
<i>F. varium</i> (1004)	6.25	6.25	6.25	1.56
<i>F. necrophorum</i> (S-45)	0.19	0.19	0.19	0.19

BHIA* : Brain heart infusion agar with 5% human blood

BA** : Brucella agar with 5% human blood

Fig. 7 Development of resistance to PC-904



やかな耐性上昇を示した。*B. fragilis* ss. *vulgatus* は8代継代で step by step に、12.5 µg/ml から 100 µg/ml 以上に上昇した。*Ps. anaerobius* は step by step ではあるが、15代継代で 0.78 µg/ml から 3.13 µg/ml とわずかに上昇したにとどまった。

Table 6 Chemotherapeutic effect of PC-904 on subcutaneous abscess due to *F. necrophorum*

dose/kg/day (mg)		No. of mouse	Recovery of organism from																			
			LA**			Lung			Heart			Liver			S**			K**				
			+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-		
40	IM*	5	1	1	3																	
	SC*	5			5			5		5		5		5		5		5		5		5
200	IM	5			5			5		5		5		5		5		5		5		5
	SC	3			3			3		3		3		3		3		3		3		3
Control		10	10			1	3	6	1	2	7	2	3	5	1	5	4	1	3	6		

IM* : Intramuscular injection, SC* : Subcutaneous injection, LA** : Local abscess, S** : Spleen, K** : Kidney

+ : 1~20 colonies, ++ : more than 20 colonies

Table 5 Population of natural resistant mutants of anaerobes to PC-904

Organism	MIC (µg/ml)	Inoculum size	No. of viable cell				
			62.5*	125	250	500	1,000
<i>F. varium</i> (1004)	6.25	10 ¹⁰ 10 ⁸	7 0	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Ps. anaerobius</i> (B-38)	0.39	10 ¹⁰ 10 ⁸	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0

* : Concentration of PC-904 (µg/ml) in GAM plate

4. 自然耐性 mutant の分布

Table 5 に自然耐性 mutant の分布を示した。*F. varium* では PC-904 の 62.5 µg/ml 含有平板に、10¹⁰ 個あたり7個の耐性 mutant が認められた。*Ps. anaerobius* では 10⁸~10¹⁰ 個あたりに耐性 mutant は認められなかった。

5. *F. necrophorum* 感染マウスに対する治療効果

PC-904 の常用量 (40 mg/kg/マウス/day) および常用量の5倍投与群は、未治療群に比し顕著な治療効果を認めた。すなわち毛並、局所硬結、局所膿瘍、膿瘍の腹腔内浸潤、皮下充血および脾腫は PC-904 の投与により著明に改善された。体重も未治療群では徐々に減少するが、治療群では膿瘍形成時、一時減少していた体重も治療するに伴い増加した。

また治療終了後の各臓器の培養においても、常用量の筋注投与群で5匹中2匹に局所から *F. necrophorum* が分離されただけで、その他の投与群ではいかなる臓器からも菌は回収されなかった。未治療群では各臓器から *F. necrophorum* が分離された (Table 6)。

III. ま と め

PC-904 は嫌気性グラム陽性桿菌および陽性球菌に対してきわめて強い抗菌力を有し、CBPC および CEZ より優れている。嫌気性グラム陰性桿菌に対しては中等度の抗菌作用で、ABPC, CBPC および CEZ と著明な

差を認めなかった。PC 系およびセファロスポリン系抗生剤に耐性とされる *B. fragilis* は本剤に対しても耐性を示した。また PC-904 は接種菌量などの諸因子の影響を若干受けるが、一部の好気性菌に指摘されるような著明な MIC の変動は認められなかった。

試験管内の耐性上昇は step by step で、*F. varium* はきわめてすみやかに、*Ps. anaerobius* はゆるやかに上昇する。

本剤の *F. necrophorum* (S-45) 感染マウスに対する治療効果は顕著で、常用量の7日間の投与で、全身状態は改善され、皮下膿瘍も治癒した。

文 献

- 1) 渡辺邦友：嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について、第1報、MIC に影響する因子。Chemotherapy 22 : 1459~1465, 1974
- 2) 渡辺邦友：嫌気性菌の薬剤感受性試験の標準化について、第2報、再現性について。Chemotherapy 22 : 1495~1501, 1974
- 3) 望月 泉：Lincomycin と Clindamycin の嫌気性菌に対する抗菌作用；統報。Chemotherapy 22 : 1052~1057, 1974
- 4) 上野一恵：In vivo における metronidazole (flagyl) の嫌気性菌に対する抗菌作用について。Clinical Report 5 : 737~739, 1971
- 5) 上野一恵：Sulfobenzylpenicillin の嫌気性菌に対する抗菌作用について。Chemotherapy 16 : 875~880, 1971

SUSCEPTIBILITY OF ANAEROBES TO PC-904

HIROMU IMAMURA, TAKAYUKI EZAKI, SHUNRO KOBATA, KUNITOMO WATANABE,
IZUMI MOCHIZUKI, KEIU NINOMIYA, KAZUE UENO and SHOICHIRO SUZUKI
Department of Bacteriology, Gifu University School of Medicine

Strains (134) of anaerobic bacteria were tested for susceptibility to PC-904 using agar dilution technique. Many strains of gram-positive anaerobic bacteria were susceptible to this drug.

Antibacterial activity of this drug was little affected by various factors (medium pH, inoculum size and medium).

Population of natural resistant mutant and development of resistance to this drug were studied. *Fusobacterium varium* (10^{10} /ml viable cell) was streaked on GAM agar plate containing 62.5 μ g/ml PC-904 and natural resistant mutants were obtained. After 4 serial cultures in GAM semi-solid media containing this drug, the minimal inhibitory concentration against *Fusobacterium varium* increased from 6.25 μ g/ml to 100 μ g/ml or more. Development of resistance against *Peptostreptococcus anaerobius* advanced slowly.

Chemotherapeutic effect of PC-904 on subcutaneous abscess of mouse (dd-N) due to *Fusobacterium necrophorum* (S-45) was investigated. Injection of 40 mg/kg/day of this drug to mouse was effective. Subcutaneous abscess was treated completely.