

## 第 25 回日本化学療法学会東日本支部総会

期日 昭和 53 年 10 月 19, 20 日

会場 日本都市センター (東京都)

会長 三 橋 進 (群大教授)

## シンポジウム

## 抗菌活性の測定法

(要望演題)

(司 会)

小 酒 井 望

順天堂大

## 司会のことば

小 酒 井 望

順天堂大臨床病理

抗菌剤の抗菌活性, 抗菌力の測定法の理想は, 正確に臨床効果を予測できる方法でなければならない。しかしこれは容易に確立できないために, 今日まで種々の抗菌力測定法, 感受性測定法が考案されてきた。希釈法, 拡散法, さらに最近では自動測定法と, 種々の測定法が検討されている。

抗菌剤の種類が年々増加の一途をたどる今日, 抗菌剤選択という臨床的な目的からいえば, 再現性に問題はあるとしても, 簡便性の点では今日のところディスク法に勝るものはないであろう。したがって世界的にディスク法が臨床検査として広く用いられている。わが国では, ここ 20 年来, 3 濃度ディスク (栄研) と 1 濃度ディスク (昭和) が広く用いられ, 感受性を 4 段階に区分する方法が定着している。しかし 1 濃度ディスク法では, 阻止円の直径から MIC を算出することができるけれども, 日常検査としては実施条件を規定しがたいので, 4 段階の区分が一般に行われている。だが実施条件を一定にして, 再現性よく MIC を算出できるならば, 臨床的な利点も大きいので, 最近この点の再検討を行っている研究グループの成果を期待したい。

なお, わが国では上記 2 種類のディスクのほか, 最近感受性を十, 一の 2 段階に区分するモノディスク (栄研) が市販され始めた。一方, WHO の専門委員会は米国の KIRBY-BAUER 法を基礎とした 1 濃度ディスク法で, 感受性を十, 土, 一の 3 段階に区分する方法を提案している。したがってわが国でも, ディスク法を根本的に再検討すべき時機にきていると考えられる。

次に, 寒天平板希釈法による MIC 測定法は, 抗菌剤選択という臨床的な目的よりは, ある菌種のある抗菌剤に対する感受性の年次の推移, 地域的分布を調査するいわば疫学的な目的に用いられる方法である。日本化学療法学会ではこの標準法を定めているが, この標準法についてはいくつかの問題点が提出されている。とくに接種菌量の点である。また培地にも問題がある。諸外国のデータとの比較という観点からも再検討の必要があろう。

実験動物についての *in vivo* 抗菌力測定法となると, 多くの因子が複雑にからみ合ってくる。最近開発される抗菌剤には, 実験動物に対しても病原性の乏しい, いわゆる弱毒菌を対象とするものが多い。したがってこれらの菌で実験動物に感染を起させることは容易ではない。だからといって大量の菌を無理やりに接種して, 果して感染実験と言えるであろうか。この点の反省が必要であろう。

さて, 菌の感受性 (MIC) と臨床効果の関係は, 抗菌力測定法が臨床検査に導入されて以来の研究課題である。ある菌がある抗菌剤に臨床的に感性か耐性か, すなわち臨床効果が期待できるか, できないか, が治療上最も必要であり, それを区別できる方法が, 日常検査として役立つ感受性検査法であることは, 最初から強調されていた。しかし現在の感受性検査法は, 残念ながらそこまで到達していない。測定した抗菌力と臨床効果の関係のデータを, 地道に集積していくことが必要ではなからうか。

## (イ) ディスク法による薬剤感性テスト

当院における過去の経験からみた問題点

徐 慶 一 郎

関東通信病院微生物学検査科

臨床検査における薬剤感性検査は, その術式の容易さから, もっぱらディスク法により実施されている。現状では, ディスク法について, 3 濃度法と 1 濃度法が, ほぼ相半ばして実施されている。また, 同じ 1 濃度法にしても, 阻止円径を測り, その測定値と, MIC 値との関連性から, 半定量的に感性度を求める方法 (A) と, 阻止円の出現の有無から, 感性の有無を判定する方法 (B)

がある。一方、MIC 値の標準測定法として、日本化学療法学会で認められた寒天平板稀釈法がある。従来、薬剤感性度の年次推移や、病原微生物の感性スペクトルムの測定には、本稀釈法によるのが原則とされ、測定値の再現性について最も信頼性の高いものと考えられてきた。しかし、この標準法についても、接種菌の継代条件、接種菌量により、かなりな変動のあることが、明かにされ、MIC 値測定に際し、これらの条件の設定を厳しくする必要が認められてきた。接種菌量に関しては、従来の  $10^8$  から  $10^6$ /ml の濃度に減量することが、測定値の再現性、精度の点から優れていることが指摘され、既に実行に移されている。

ディスク法においては、ディスク内含有薬剤量の安定性をはじめ、培地の種類、その組成と安定性、測定術式として接種菌量、培地の厚さなど、種々の条件で、稀釈法以上に変動する傾向はあるが、3 濃度、1 濃度を問わず、測定条件の一致があれば、再現性のあるデータが得られ、とくに、1 濃度法において、阻止円径の測定値と、MIC 測定値との間には、明らかな相関性のあることが、過去 1 か年間に於いて、我々耐性測定研究班グループの成績から、統計学的に証明された。

一方、当院においては、1973 年以降、全病院自働システム化の一環として、全検査データのコンピューター投入が実施され、必要に応じ、診療に必要な情報が、得られる態勢になっている。微生物検査部門では、細菌薬剤感性テストに関し、月別、あるいは年度別に統計表が作製され、実用に供されている。その実施状況と、得られた情報、問題点は、以下のとおりである。

1) 現在、検査データの投入は、従来の検査徴票を若干改正したものを使用、結果の一部を診療科に返す一方、その副写の一を、定時的に集め、月に 1 回バッチ処理により行っている。しかし、本法は、近く、全病院のブラウン管ディスプレイ方式の採用によりオンライン方式に変更される予定である。

2) 1973 年以降、4 年間の成績で、病院における使用頻度の多い  $\beta$ ラクタム系薬剤、とくにセファロスポリン系と ABPC および CBPC に対する薬剤感受性の低下が、年次推移として認められた。この傾向は、グラム陰性桿菌においてとくに著明であった。

3) 1977 年以降、他施設と関連、感性測定値の標準化のため、接種菌量を、シャーレ面積  $1\text{cm}^2$  当り  $10^5$  から  $10^8$  に減量した結果、菌種により差はあるが、全菌種につき、薬剤感性率の向上が認められた。このため、1976 年以前の薬剤感性年次推移との比較は不能になったが、標準法としては以後、新接種菌量を使用することにした。

4) 1977 年以降、腸内細菌の同定に AP 1-20 システムを全面的に採用した。本コードシステムにより、大腸菌生物型と、薬剤感性に関する相関について検討を行った。

その結果、患者由来大腸菌の生物型と薬剤感性の間には、密接な関連性が認められた。とくに AP 1 コード 5144512 型菌は、すべての薬剤に対する感受性が高かった。一方、5144572, 5144532, 5044552 型では、多くの薬剤に感性低下が認められた。

胆汁由来菌と喀痰由来菌の間には、著明な薬剤感性の差が認められたが、一方、検出菌の生物型パターンにも大きな差が認められた。すなわち、胆汁由来菌では、薬剤感染率が顕著に高く、喀痰由来菌では、明かに低かった。その総合感性率は、前者 82.9% に対し後者は 49.3% であった。

また AP 1 コード型でみると、大腸菌全体として、代表 AP 1-コード型 A) 544572 型 (22.7%), B) 5144552 型 (17.7%), C) 5144512 型 (10.7%) の 3 者の占める割合が、合計 51% を占めるのに対し、胆汁由来株では 23.6% に過ぎなかった。

以上、我々の過去の成績から 1 濃度ディスク法による薬剤感性検査により、診療情報として充分役立つデータの得られることが明かにされたが、術式の標準化により、各施設のデータが統合可能になれば、国家的規模で必要な薬剤情報が、随時入手可能になることと期待される。

#### (ロ) コンピューターによる解析

向 島 達

国立がんセンター病院

#### はじめに

細菌感受性検査の有する意味を考えると、1) 原因菌への有効薬剤の決定、2) 使用薬剤の有効性の確認、3) 有効薬剤の推定、4) 施設内での各種薬剤耐性化の傾向、5) 全国内の各種薬剤耐性化の傾向、のように、患者個人の情報の他に施設内、施設間の情報があげられる。とくに、後 2 者は集積データの解析から得られ、施設内においては、抗生物質の投与方法と、耐性化の問題や、原因菌の推定と抗生物質の有効性の推定、院内感染症の解明に役立ち、施設間の集積データは、各施設間の特徴、全国的にみた耐性菌の実態、抗生物質の有効性の推定など、極めて重要なデータを提供するものである。このような膨大なデータを解析するには、充分に精度管理されたデータを集積せねばならず、これには、コンピューターによる集積、解析が重要であることは論を

またない。

I) 臨床検査としての薬剤感受性検査

現在臨床検査としての薬剤感受性検査には1濃度法、3濃度法、希釈法、混積法の4法が考えられるが、このなかで、多種多量検体の処理、多種抗生物質の測定などを科せられている現状においては、ディスク法が主体にならざるを得ず、今日、1濃度、3濃度の各種ディスク法が、臨床検査において、主流を占めるのは当然と言える。

a) 1濃度法と3濃度法の比較

今日行われている2法における結果の比較を、時期が若干異なるが、国立がんセンターの成績で行ってみると、nalidixic acid 以外の成績においては、著明な変化がないことが示された。このことにより、両者は、度数表示で集積できるものであるということが考えられる。

b) 1濃度法と寒天希釈法の比較

他方、1濃度法阻止円直径が、旧来から最小発育阻止濃度(MIC)に相応すると言われるが、耐性菌測定研究会では、各施設のデータを十分に管理した条件下で、各種細菌合計600件にわたる阻止円直径とMICを比較した。その結果、アミノ配糖体はじめほとんどの抗生物質が、 $\text{Log}(\text{MIC}) = \text{AD}^2 + \text{B}$  (A, Bは定数)の換算式で得られることが示された。このなかで、 $\beta$ -lactam系では、2種の直線が得られること、その他の抗生物質、すなわち、chloramphenicol, nalidixic acid は、ある範囲において成立することが示された。全体的に見ると、1濃度法はMICと良く相応するものの、テトラサイクリン系だけ阻止円が全体的に大きく出、20mmの所においても100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、表示の臨床効果との間に大きなずれが生じていた。このことから、1濃度法の度数表示が3濃度法とほぼ同じ結果であるので、両者とも臨床評価とずれていることが考えられ、早急の変換が重要と考えられた。

II) 感受性データの精度管理

以上のことから、1濃度法は、阻止円直径から最小発育阻止濃度を求めることができることを示したと言える。このためには、感受性検査において十分な精度管理が望ましい。そのため、国立がんセンターでは、毎日標準菌株をルーチン検査に入れて精度管理を行っている。そこで、毎日施行した標準菌株における阻止円直径の分布を見ると、多くの薬剤において、CVは10%内外であるが、ある種の薬剤においては、それ以上に分布することが示された。この原因には、1) ディスク自体のパラッキ、2) 保存中の変化、3) 阻止円直径の読み方の変化、などが考えられた。とくに、ある種の菌株のある薬剤だけに限局していることは、色々な原因もさること

図1 Histogram of CER *Kl.pneumoniae* (all material) (Mar. 1978~Sept. 1978)

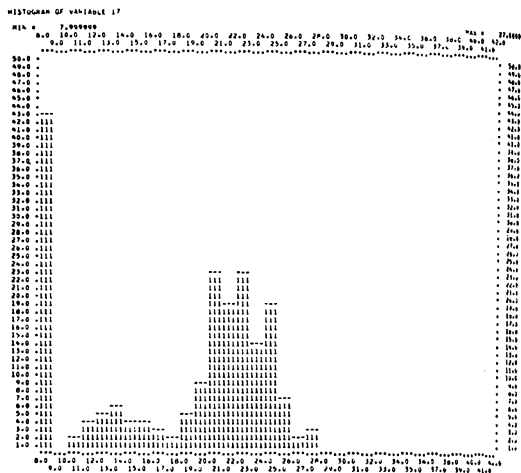
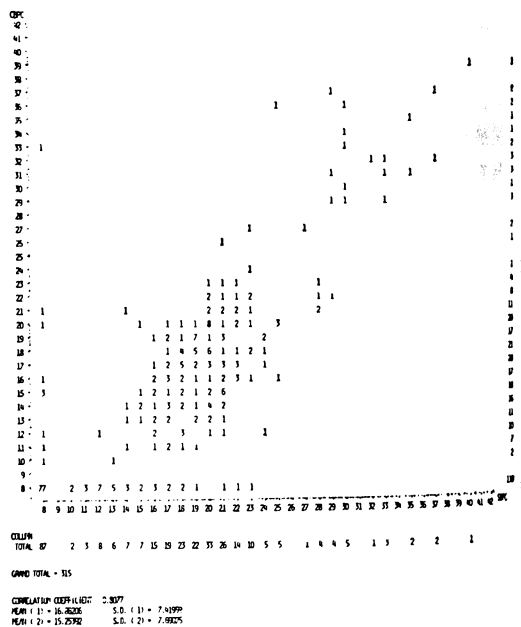


図2 Relation between carbenicillin and subbencillin (Nov. 1977~Apr. 1978)



ながら、阻止円直径の判定のパラッキを示していると言っている。このためには、阻止円直径の判定にも、細菌同定と同じような、厳密な判定が必要と言えよう。

III) 阻止円直径分布から見た感受性の区分

現行の感受性結果の表示は、1濃度法、3濃度法いづれもが、0, 1, 2, 3の4段階区分を行っている。ところで、各種抗生剤の分布を見ると、図1のように感性、耐性、中間の分布の3つに分けられるものと、感性、耐

性の2つに分けられるものと得られた。これは、前項でもふれた阻止円直径の成績における各種エラーの存在を考えると、3段階、あるいは、2段階に分けることしか出来なく、したがって、1濃度法が最小発育阻止濃度を示すことができるというもの、あくまでも参考であり、むしろ、各分布における最小発育阻止濃度を知るほうが本質的であると言える。

#### N) コンピューターによる集積データの解析

以上、集積データを得るには、培地、ディスク、技術、等の各種の精度管理を行なわなければならない。このように管理された成績は前項のヒストグラムのような、各種薬剤の耐性化の問題や類似薬剤間、異なる検査手技間の比較が充分にできる。図2はSBPCとCBPCとの間の2薬剤間の比較で、2者は比較的良く相応していることを示すものである。現行の増大する抗生物質の種類なかで、この種の2薬剤相関を求めることは、検査ディスクの採用等に有用なことと言える。

#### ま と め

コンピューターによるデータの解析は無限の情報を与えるが、このためには精度管理が重要であると言える。

本研究には、群馬大学医学部・三橋進教授、田波洋教授、群馬県公衆保健協会・原田賢治先生、豊栄病院・金沢裕院長、千葉大学医学部・小林章男助教、国立病院医療センター・中村正夫医長、東京女子医科大学・長田富香助教、関東通信病院・徐慶一郎部長、北里大学医学部・大沢伸孝助教、浜松医科大学・吉田孝人教授、国立小児病院・青木義雄先生、以上耐性菌測定研究会の各先生方と、医療情報システム開発センターの協力を得ました。

#### (ハ) 寒天平板希釈法

原 田 賢 治

群馬県公衆保健協会

寒天平板希釈法では薬剤の抗菌活性を量的に標示するMIC法が広く各分野で用いられている。このMIC測定の重要性に鑑みて日本化学療法学会では1968年にいわゆる化療法を制定し、さらに1974年に改定し日本のMIC測定標準法としている。私達は基礎の面からこのMIC測定に及ぼす諸因子を検討してきたので、ここでは次の4つのことについて述べる。

(1) 供試菌の前培養濃度と寒天平板接種菌量：*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*などの腸内細菌科に属する11菌種(ペプトン水前培養)および*St. pyogenes*, *H. influenzae*(BHI-brothまたはこれにNAD, Heminを添加して前培養)などの前培養液は $3.0 \times 10^8$ /ml~ $4.2 \times 10^9$ /mlの生菌数を含む。これを希釈して各菌前培養

液の生菌数をほぼ一定にするためにマイクロプランター(5.0μl)を用い、その希釈液量を変えることによって容易に希望濃度の菌液を調製できるし、またその変動の割合も $\pm 8.5 \sim 12.8\%$ の範囲に抑えられる。こうして得られた接種用菌液を再びマイクロプランターによって寒天平板に接種する。この時の接種可能液量は約1.5μlで、その変動の割合は $\pm 11 \sim 13\%$ にあり、無視できる誤差範囲にあることがわかった。

接種菌量とMIC値： $10^8$ /ml(A),  $10^6$ /ml(B)および $10^4$ /ml(C)濃度の各菌液を用いて各薬剤のMIC値を求めて比較してみた。その結果、BはAよりどの薬剤でも感受性が高まる。とくにコリスチンおよびスルファミン剤は4倍、βラクタム系薬剤は4~8倍その感受性を増した。しかしBとCの感受性値には著明の差は認められない。また耐性菌の場合はA, Bとも同じ感受性値を示した。

培地組成とMIC値：HI寒天培地はロットによってMIC値に変動があり、国際的にはミュラーヒントン(MH)変法培地が最も広く使用されている。そこで4社(a, b, c, d)のMH変法培地を用いてTetracycline/*S. aureus*(TS)およびTetracycline/*E. coli*(TE)で各系24株ずつ供試し検討した。その結果、TS系では3社(a, c, d)の製品によるMIC値はほぼ似た傾向にあるが細部では異なり、また他の1社(b)のそれは殆ど一致しなかった。TE系でのそのMIC値はaとdが、またbとcがそれぞれ似た傾向を示す。ちなみに両系をカップ法で調べてみると前述の結果と一致した。

MIC値決定のための発育抑制点：化療法でのMIC値はまったく接種菌の発育できない薬剤濃度で表現しているが接種菌量や実験の再現性などからみて適切でない。そこでくりかえし検討してみても $10^6$ /ml菌液をマイクロプランターで接種して99.9%発育抑制点をMIC値とすることが妥当と思量される。

むしろ：マイクロプランターを用いて接種菌量を常に $10^6$ /mlの一定濃度とし、培地組成が明かな寒天平板の使用で99.9%発育抑制点をMICとすること提言した。

#### (ニ) *In vivo* 抗菌活性の測定法

川 上 正 也

北里大学医学部

実験動物感染症の治療による化学療法剤の評価は、臨床治療効果を推定するための基礎資料を提供するために重要であり、*in vitro*評価と臨床評価の橋渡しをする役を担うべきものである。

動物実験の系では、病原体の他に、宿主および宿主に定着している細菌叢が生物として含まれており、薬剤と

これらの生物との間に種々の相互作用が働いており、*in vitro* とは異なっているかに複雑な系である。ヒトを動物に置きかえて感染治療を行う時は、ヒトにおけるものと類似した host-parasite-drug relationship がたもたれることが望ましい。そのための試みとして、動物の病原菌を用いて、ヒトの感染症と類似した型の感染を動物におこさせ、これの治療実験を行う方法が考えられる。例えばマウスに *Corynebacterium kutscheri* を感染させて、ヒトの体液内増殖型、急性渗出炎症感染症のモデルとし、または *Salmonella typhimurium* を感染させて、細胞内増殖型、亜急性特異性炎症感染症として、これらを薬剤で治療することが1つの方法である。実際に、動物に病原性をもつ菌ともたない菌の感染を治療して比較すると、感染の菌量や経路を等しくしても、病原菌のほうが治療しにくいことが見出された(図1)。また病原菌では宿主内の増殖速度が低い時期であっても、治療し難くなることを見出された(図2)。

しかしヒトにおける各種の感染症の特徴を動物実験によって自由に再現させることは難しいので、このような方法にも自ら限界がある。

動物に病原性をもたないヒト病原菌を動物に感染させる場合、例えば大腸菌や *Citrobacter* をマウスに感染させる時には、極めて大量を感染させないと発症しない。そのため治療も感染後短期間のうちに行なって効果を判定せざるを得なくなる。これでは *in vitro* の薬効評価と大差がなくなってしまう。これによってヒト感染症の治療効果を推定することは期待し難い。コーチゾンやムチンを与えられた動物では、非病原菌であっても少量の

図1 動物病原性の高い菌と低い菌に対するセファロリジンとオレアンドマイシンの治療効果

Bacteria	CER			OM		
	MIC	ED <sub>50</sub>	ED/MIC	MIC	ED <sub>50</sub>	ED/MIC
<i>S. aureus</i> FS157	0.24	13	54	0.7	35	50
<i>C. kutscheri</i> CM23	3.6	560	156	1.2	>4500	>3750

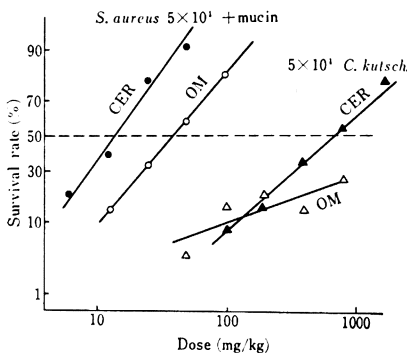
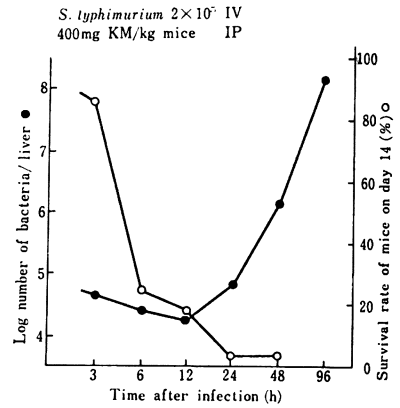


図2 ネズミチフス菌感染後のカナマイシンによる治療効果



感染で動物をたおすことができるが、これらの物質は、宿主の種々の抵抗因子を不活化または排除するので、その結果は *in vitro* 測定の結果に近づくことになり、動物実験の意義をうすれさせるものである。

動物非病原菌を使用せざるをえない場合は、多数の菌株の中からなるべくウイルレンスの強いものを選び、さらに動物通過をくりかえして、少量感染で動物をたおすような株を作り、実験に供することが必要である。テトラサイクリンまたはマクロライドに誘導耐性をもつ球菌の少量を感染させたマウスの治療実験では、薬剤感受性菌に較べて ED<sub>50</sub>/MIC 比が著しく低くなる例が観察されたが、これは *in vivo* と *in vitro* の測定結果が異なる1例である。

感染後の治療開始時間も重要な因子である。上述の目的を考慮すると、菌が宿主に定着し、初期感染が成立した時期に治療することが望ましい。

動物実験の測定値は *in vitro* 測定値よりもふれが大きいので、統計処理を必要とする場合が多い。ことに強毒菌使用、少量感染、晩期治療では変動が大きくなる。2つ以上の実験群の間の有意差を見出すためには、1群あたりの動物数を増やす、体重をそろえる、感染菌の前培養、菌数を正確にそろえるなどの処置が必要になる。50%以上の生存率が得られない場合は ED<sub>50</sub> の代りに平均生存時間を測定し比較することもできる<sup>1)</sup>。適当な卓上計算器を用いれば、ED<sub>50</sub> とその信頼限界の計算に RITCHFIELD-WILCOXON 法<sup>2)</sup> またはそれ以上の正確な計算法の導入が容易である<sup>3,4)</sup>。ことに2剤の相乗効果判定には統計処理は必須である<sup>4)</sup>。

文 献

1) GUPTA, A. K. : Biometrika 39, 260~273(1952)

- 2) LITCHFIELD, J. T. & WILCOXON, F. : J. Pharmacol. Exp. Therap. 96, 99~113 (1949)
- 3) 猪原和泉, 他 : Jap. J. Antibiotics 28, 53~60 (1975)
- 4) KAWAKAMI, M. *et al.* : J. Antibiotics 24, 892~895 (1971) ; TONE, J. *et al.* : Jap. J. Antibiotics 29, 571~579 (1976)

## (ホ) MIC と臨床評価

松本 慶蔵

長崎大学熱帯医学研究所内科

MIC と臨床評価を正しく論ずるためには、前提としてその対象となる起炎菌が正しく決定されていることと、MIC 測定法が臨床的に望ましい方法が選択されて行われていること、の2点が必要である。

起炎菌を呼吸器感染症において正しく決定するため、喀痰細菌叢定量培養法による評価を確立し、 $\geq 10^7/\text{ml}$  の分離細菌中、いわゆる口腔内常在菌 ( $\alpha$  *Streptococcus*, *Neisseria catarrhalis*) を除き起炎菌とすることとした。この詳細は日胸疾会誌 16 巻 2 号 77 頁に既に記載した。ただし、たとえ、 $10^7/\text{ml}$  以下であっても、起炎病原菌が化学療法によって減少してゆく場合、起炎菌として把握していることは当然であり、菌交代してまず、 $10^7/\text{ml}$  以下に現われ、以後  $\geq 10^7/\text{ml}$  に増加して起炎菌となる場合に初期に現れた一定数以下の細菌の意義も同様に起炎菌として扱う。このように喀痰細菌叢定量培養による成績を演者は動的に評価していることを強調しておく。

$\beta$ -lactam 剤に対する起炎菌の感受性は、接種菌量によって大きく異なり、 $10^8/\text{ml}$  と  $10^6/\text{ml}$  の 1 白金耳接種の成績のどちらが臨床評価に相関性が高いかはまだ決定されていない。しかし演者は *H. influenzae* 感染症研究の過程において以前からこの点に疑問を持ち、臨床成績で合せ検討しており、MIC 実施の際にみられる  $10^8/\text{ml}$  の時の成績は臨床と著しい不一致およびコロニーの濃度の異なる部分での本質的差異があり、 $10^6/\text{ml}$  1 白金耳接種で得られた MIC の成績が臨床評価と一致することを確認しており、*H. influenzae* 以外の病原菌についても呼吸器感染症に関する限り、 $10^6/\text{ml}$  1 白金耳接種による MIC の成績が臨床評価と一致していることを経験的に積重ねており、今日まで矛盾する成績は得られていない。

慢性呼吸器感染症における起炎菌の抗生物質感受性と喀痰中抗生物質濃度の関係：

慢性呼吸器感染症の病態は気道における感染が主体で炎症病巣の主体は気道内膜とその周辺にあり、さらに気道内分泌物が感染菌の増殖の場となっており、intra-

canal infection ともいべき病像を呈している。慢性炎症の化学療法効果は、その病巣中に MIC 以上の薬剤が到達し、ある作用時間を保持した時に得られるものと推定される。それゆえ慢性気管支炎、慢性細気管支炎、気管支拡張症等の慢性呼吸器感染症においては喀痰中抗生物質濃度とその推移を検討することは甚だ有用である。

慢性呼吸器感染症を中心に 65 疾患につき、起炎菌に対する MIC と喀痰中薬剤濃度ピーク値を有効・無効でその分布で検討したところ、喀痰中濃度が MIC 以上の場合有効例が多く、その逆の関係も成立つ傾向がみられた。さらに *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, その他の菌の 3 病原菌群に分け、Penicillin 系, Cephalosporin 系, Aminoglycoside 系, その他について、喀痰中濃度, MIC, 有効, 無効について細分析すると  $\beta$ -lactam 剤では、喀痰中濃度が MIC を越えていると、*H. influenzae* では有効例が 95% と圧倒的であるが、*P. aeruginosa* では 30% と低い。しかし *P. aeruginosa* で喀痰中濃度が MIC より低い場合 (17 例) には有効例は全くなく、すべて無効であった。Aminoglycoside 系では 4 例と少ないが、喀痰中濃度と MIC の関係の如何に拘らず有効例は認められなかった。

慢性呼吸器感染症における起炎菌の抗生物質感受性と気道分泌物中抗生物質濃度の関係：

喀痰中濃度が MIC より低くても有効な場合の解析のため、病巣気管支に直径約 2mm の KIFA green catheter を挿入して気道内分泌物を採取し、その分泌物内抗生物質濃度と起炎菌の感受性と有効性の関係を検討した。 $\beta$ -lactam 剤については、たとえ喀痰中濃度が MIC 以下でも気道内分泌物濃度が MIC を越えている場合には臨床的には全例有効であった。ただし 2 例の Tobramycin 有効例では、気道内分泌濃度が MIC 以上でも無効であった。

以上の成績は病巣中濃度を反影すると考えられる喀痰中薬剤濃度の重要性を示唆するもので、有効、無効はこの濃度と MIC の関係によって定まるものと考えられる。しかし、この結論は  $\beta$ -lactam 剤でいえることであって、Aminoglycoside 剤で異なる理由は、両剤が、滲出する部位が本質的に異なり、 $\beta$ -lactam 剤は病巣炎症から、Aminoglycoside は肺胞から滲出するものと推定される。

起炎菌の抗生物質感受性の変化と臨床効果：

起炎菌が病巣内において薬剤と接触する場合においては、絶えず薬剤感受性の変化に注意しなければならない。耐性化と耐性脱失の 2 面が考えられるが、臨床の場において前者は頻回に経験され、後者は *P. aeruginosa*

と Sulbenicillin で確認された。MIC の頻回の検討が必要となる所以である。

慢性呼吸器感染症における  $\beta$ -lactam 剤の気道移行性の変化：

演者は慢性細気管支炎において Ampicillin を点滴静注し、喀痰中移行経時濃度と臨床像の改善を対比検討し、Blood-Bronchus barrier の存在を指摘した。このことは  $\beta$ -lactam 剤の一定の投与は病巣における一定の移行を意味しないことを示唆している。

慢性気道病巣へ薬物を送り込むための方法：

演者はこの目的のために抗生物質点滴療法がすぐれていることは既に幾度も報告したところである。この他  $\beta$ -lactam 剤において Probenecid と併用すると明白に喀痰中濃度も増加する。ただし肺シンチグラムで肺血流の途絶例では喀痰中濃度を指標でみると上記方法でも病巣への移行は高まらない。血流の重要性を改めて示唆する重要な所見といえよう。

慢性難治性呼吸器感染症における菌交代症のメカニズム：

起炎菌の感受性にしがって有効性抗生物質を投与したとき出現する病原細菌は MIC の上から低感受性のものであることが肺線維症に感染した症例で典型的に示された。

(追加) 抗結核菌剤, 抗菌力測定法の問題点

新井 蔵吉・近食ふじ子

昭和大学医学部臨床病理学教室 八王子中央病院

我が国の結核菌に対する抗菌活性測定法は小酒井によって占部、山田の変法培地を用いる試験管希釈法によって始められた(以下、本法を小酒井法と仮称する)。現在は小川培地による試験管希釈法が耐性検査用として市販されている。この培地素材は生卵液が主体となっている。著者は卵液を培地素材とする小川培地を用い、抗結核菌剤(MIC)の測定を試験管希釈法によって行なった。その測定値は極めてバラツキが大きく、また再現性が不可能であることを知り、この原因の追求により卵液中の卵白は強力な粘性のため添加する薬剤がこの卵白に吸着すると培地を何百回攪拌しても、ミキサーを用いて攪拌しても均等化を妨げる大きな欠点となっている事実を知った。この欠点を除くための研究を重ねた結果、卵液を凍結乾燥することによって、卵白の粘性性状だけ消滅し、その他の特質は備え各種水溶液と均質化し、生卵のように加熱凝固力を有する粉末培地素材の開発に成功した。

先年本学会において kanamycin 耐性測定培地内の薬剤活性濃度について発表したため、今回は streptomycin

(SM) について再検討を行った結果を報告する。現行の小川培地は (SM) が卵液に阻害されて力価が低下するため添加 (SM) 濃度 200  $\mu$ g/ml を 100  $\mu$ g/ml と指標されている。凍結全卵末を蒸留水にて復元した小川培地に (SM) 200  $\mu$ g/ml を添加し、培地内薬剤濃度を微生物学的重層定量法による測定結果は薬剤の均等化により一律に 120  $\mu$ g/ml 力価が測定されたため (SM) を 185  $\mu$ g/ml の添加により 100  $\mu$ g/ml の培地となる。下記は卵液凍結乾燥比率表と、凍結乾燥全卵末培地、小酒井法培地、市販の耐性培地内の (SM) 100  $\mu$ g/ml の活性力測定値の比較である。

卵液凍結乾燥比率表

	最初の重量	乾燥後の重量
全 卵	52 g	12.45 g ( 24%)
卵 白	52 g	6.5 g (12.5%)
卵 黄	52 g	23.9 g ( 46%)

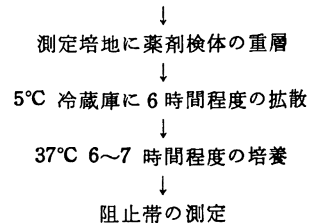
培 地 組 成

A 全 卵 末	30g
蒸 溜 水	100 ml
1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 小川原液 (pH 7.4)	50 ml
グリセリン 2% マラカイト緑	各 3 ml
SM 添加濃度	185 $\mu$ g/ml
B 占部山田の変法 (小酒井法)	100 ml
培地溶液 (卵黄 20 ml 加)	
SM 添加濃度	100 $\mu$ g/ml
pH	7.2

無蛋白培地による測定法実施順序

Yeast extract (大五)	10g
NaCl	5g
寒天 (棒状または Difco)	10g
蒸 溜 水	1,000 ml
pH	7.6
基礎培地	100 ml
検定菌 霊菌	
Heart Infusion Broth	
20 時間培養	10×0.5 ml
1% NaNO <sub>3</sub>	2 ml
0.1% Methylene blue	5 ml

測 定 方 法

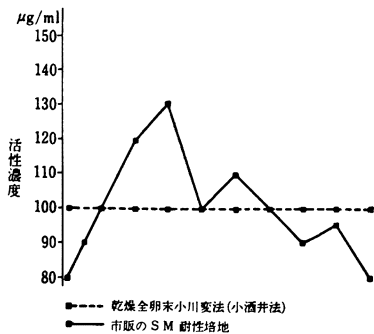


間接法による SM 耐性測定結果の比較

菌株番号	培地名 薬剤濃度 mcg/ml	凍結乾燥卵末培地			小酒井変法			生卵使用培地			対照
		1	10	100	1	10	100	1	10	100	
1		+	+ <sup>13</sup>	—	+	+ <sup>12</sup>	—	+++	+++	+ <sup>21</sup>	+++
2		—	—	—	—	—	—	+++	+ <sup>5</sup>	—	+++
3		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4		—	—	—	—	—	—	+++	+	—	+++
5		+	+ <sup>15</sup>	—	+	+ <sup>14</sup>	—	+++	+++	+	+++
6		+ <sup>46</sup>	—	—	+ <sup>45</sup>	—	—	+	+ <sup>95</sup>	—	+++
7		—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
8		+ <sup>5</sup>	—	—	+ <sup>7</sup>	—	—	+++	+	—	+++
9		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
11		+++	+	—	+++	+	—	+++	+++	+	+++
12		+ <sup>8</sup>	—	—	+ <sup>6</sup>	—	—	+++	+	—	+++
13		+	+ <sup>5</sup>	—	+	+ <sup>4</sup>	—	+ <sup>12</sup>	—	—	+++
14		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15		+	—	—	+	—	—	+++	+	—	+++
16		+ <sup>20</sup>	—	—	+ <sup>16</sup>	—	—	—	+++	—	+++
17		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ <sup>11</sup>	+++
18		+++	+	—	+++	+	—	+	+ <sup>9</sup>	—	+++
10		+	+ <sup>28</sup>	—	+	+ <sup>25</sup>	—	+ <sup>21</sup>	—	—	+++
20		+	—	—	+	—	—	+ <sup>11</sup>	—	—	+++

(注) +の下の数字はコロニーの実数を示す。

図1 SM 活性濃度 100 μg/ml を中心とした培地内測定値の比較



この3種の培地内測定結果により生卵を用いた市販の培地は 78 μg/ml~130 μg/ml とバラツキが大きい。凍結乾燥卵末培地、小酒井法培地の測定値は一律に 100 μg/ml であり、小酒井法では添加 100 μg/ml が培地素材の影響なく (SM) は 100 μg/ml 測定された。測定に供した培地は次に示す培地組成と、市販の (SM) 耐性測定培地である。

測定方法は蛋白質吸着と培地内のマラカイドグリンの影響を考慮し、著者の開発した検定菌 *Serratia mar-*

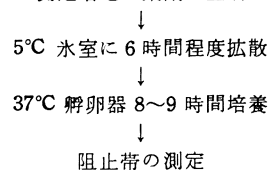
合成培地による測定実施順序

L アスパラギン	10 g
グルコース	5 g
食塩	2 g
寒天 (棒状または Difco)	10 g
蒸留水	1,000 ml
pH	7.6

測定方法

合成培地	100 ml
3% フマル酸 Na	2 ml
0.1% Methylenc blue	3 ml
霊菌 Heart Infusion Broth	
20 時間培養	5 × 0.5 ml

測定培地に薬剤の重層



*censcens* No. 33 を用い、無蛋白培地、合成培地により測定した。

測定結果、ならびに合成培地の測定法は上記のとおりである。測定結果に見られるように、生卵を使用した培地の測定値は極めて不安定であり臨床効果もこの成績と



同様な報告を受けた。この測定結果により (SM) は卵黄には吸着はなく卵白に吸着する薬剤であることを立証した。

このような研究結果からみて、薬剤耐性基準が  $1\mu\text{g/ml}$  の INA,  $1\sim 3\mu\text{g/ml}$  の PAS 等の薬剤についても、耐性測定結果が憂慮されるため、さらに検討を加える予定である。

### (へ) 抗菌活性と臨床評価との関係 (とくに尿路感染症を中心として)

西浦 常雄  
岐阜大学泌尿器科学教室

一般に急性単純性膀胱炎では、各種抗菌剤の投与によって極めて高い有効率がえられるので、恰も臨床効果は抗菌活性に関係なく得られるように思われる傾向がある。そこで、急性単純性膀胱炎に ampicillin を投与量を変えて投与し、抗菌活性と臨床効果との関係を検討してみた。臨床効果の比較検討に際しては、各症例における検討方法を統一することが基本的な問題であるが、われわれの症例は患者条件、投薬方法、検討方法、効果判定方法などを統一して行われたもので、起炎菌が1種類だけの単独感染症例に限定した。

ampicillin 2g/日 (分4) 3日間投与群 63 例では 97% の細菌消失率がえられた。投与量を半減して 1g/日を投与した群 85 例では 80% の消失率で、有意の dose response が観察された。しかし 0.5g/日投与群 52 例では 83% の消失率で、1g/日投与群と同様な成績であった。さらに減量した 0.2g/日投与群 56 例では消失率は 68% と低下したが 0.5g/日群との間に有意差はみられなかった。これらの症例の起炎菌 256 株の薬剤感受性分布は 2 峰性となり、感性株と耐性株との境界は  $100\mu\text{g/ml}$  付近にあったので、各量投与群を  $100\mu\text{g/ml}$  以下の感性株群と  $200\mu\text{g/ml}$  以上の耐性株群に分けてその消失率を比較してみた。感性株群ではそれぞれ 98%, 89%, 98%, 95% とほとんどが消失しているのに対し、耐性株群ではそれぞれ 80%, 47%, 20%, 6% と消失率に dose response がみられた。第 24 回東日本支部総会で発表した clinical effective level を検討してみると、それぞれ 1,160, 210, 240,  $50\mu\text{g/ml}$  という値がえられた。以上の成績から、起炎菌の薬剤感受性分布を考慮して観察すると、急性単純性膀胱炎においてもほぼ *in vitro* の抗菌活性に比例した臨床効果がえられていることを述べた。

### [シンポジウム]

### $\beta$ -lactam 抗生物質について

司会 桑原 章吾  
東邦大学

ペニシリン群とセファロスポリン群は  $\beta$ -lactam 抗生物質の代表的な群として世界各国に広く流通し、とくに人工化学転換による作用の変化が著しいところから、事実上抗菌薬の王座の地位を確保しつつある。

本日のシンポジウムでは、両者の人工化学変換の流れとその特徴、耐性化の中心となる  $\beta$ -lactamase についての最近の知見、耐性菌の分布と遺伝に関する現在の知見、ペニシリンの細胞障害の target に関する最新の知見、および近年急速に進歩しつつある細胞質膜中の penicillin-binding protein, の 5 主題的をしばって、この領域の研究の現況に触れてみたい。

これらの知見は、さらに来るべき新世代の  $\beta$ -lactam 物質 (例えば thienamycin, clavulanic acid, CP-45899 など) に対する会員各位の自由な評価と期待に新しい方向を賦与するものとなるであろう。

### (イ) $\beta$ -lactam 剤開発の歴史

三橋 進  
群大・医

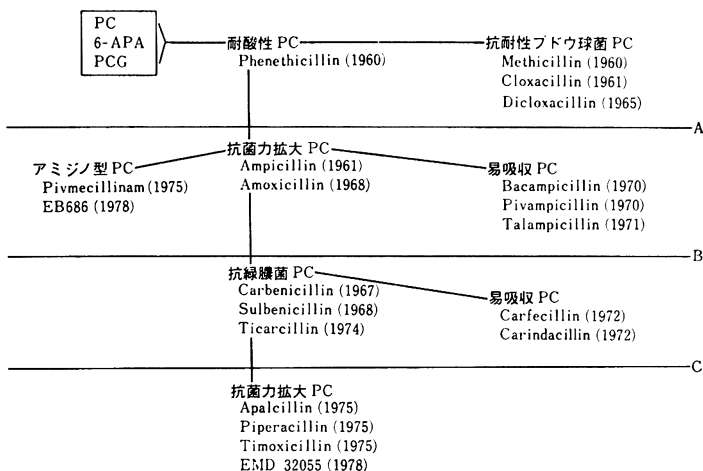
ペニシリン (PC) の発見は 1929 年、プロントシールの発見に先がけて行われたものであるが、化学構造の決定の困難さからオックスホードグループによって 10 年遅れて第 2 報が出されるまで人の目についていなかった。プロントシールの作用はスルホンアミド (SA) によることがフランスの TRÉFOUEL によって発見され、PC に先立って、細菌感染の先駆的化学療法剤として登場した。

PC がグラム陽性菌だけに作用する薬であること、酸に弱い性質から先づ耐酸性の PEPC が開発され、ついでグラム陽性菌の  $\beta$ -lactamase (PCase) に強い DMPPC, MPIPC, DCIPC が開発された。PCase に関しては、筆者が研究に従事した最初の年、外国の文献も読めない戦後の時代に偶然発見した思い出の酵素である (ペニシリン, 1 巻 1 号 1 頁)。

$\beta$ -lactam 系薬剤の発展推移を段階的に見てみると上述の第 1 期に続いて PC 剤の大きい進歩は第 1 表の A 線を越えてグラム陰性桿菌に有効なアンピシリン, アモキシシリンの発見によってもたらされたものである。これを PC の歴史の第 2 期とよびたい。

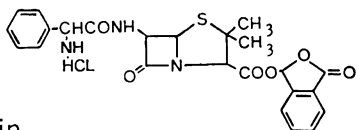
しかしこれらの PC 剤はグラム陽性、陰性菌へとスベ

第1表 βラクタム系薬剤開発の推移 (ペニシリン)

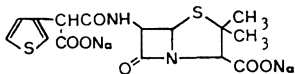


第1図 ペニシリン系新薬の構造

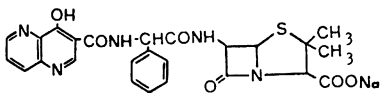
Talampicillin



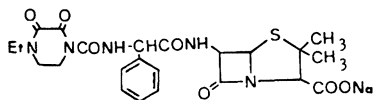
Ticarcillin



Apalacillin



Piperacillin



クトラムを拡大したが、緑膿菌などの全く無効な壁が存在した。

ついで CBPC が英国で、SBPC が日本で開発され、*P. aeruginosa* にまで抗菌力が拡大した功績は大きい (1表のB)。さらにわが国で、ABPC を基本骨核として APPC, PIPC, EMD 32055 が合成され、第1表のB線を越え *P. aeruginosa* を含め広域の PC 剤がつけられた。同様にアモキシシリンを母核として、チモキシシリンがつけられ、β-lactam 剤の新しい時代を産み出すきっかけをつくった。

これらの薬剤が、その抗菌力を拡大した大きい理由は、APPC, PIPC を中心とした研究から細菌細胞壁の

透過性が増したものと考えられる。新しいペニシリン剤の構造は第1図に示した。

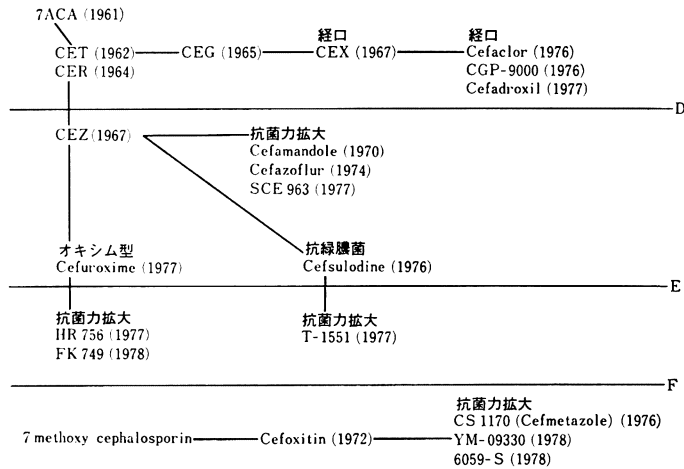
化学的に安定なセファロスポリン環を骨核としたセファロスポリン剤の発展の歴史は表2に示した。CER, CET が1962年に発見され、ついで CEG, CEX と開発が進み、とくに後者は経口剤として用いられるためセファロスポリン剤の用途は急速に拡大した(表2のD)。わが国で開発された CEZ は幅広い抗菌力と、half-life の長い特長などから臨床効果がすぐれ、セファロスポリン剤の1時代をつくったものとして過言でない。SCE-963 もスペクトルの広いものとして新たに登場した。

Cefsulodine はセファロスポリン剤の効果の全く及ばない *P. aeruginosa* に強い抗菌力を示す点興味深いが、そのスペクトラムが異常に狭い理由は将来の研究の興味ある課題である (2表のE)。

セファロスポリン剤の弱点であった *P. aeruginosa*, *S. marcescens* までを含めた広域のセファロスポリン剤は第2表のE線を越え、ヨーロッパにおいては HR-756, わが国において T-1551, FK 749 として誕生し、セファロスポリン剤の第2の時代をむかえることになった。Cefsulodine, HR-756, T-1551, FK 749 は PC 製剤に比較して、PCase はもちろん CSase にも強い点が特長である。

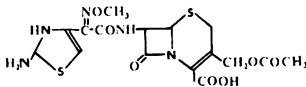
β-lactam 剤の広汎な、しかも大量の投与は必然的に耐性菌の増加を惹きおこし、興味あることに、この種の耐性には高度耐性菌の出現という面倒な事態が出現してきた。CFX の登場は、β-lactamase に非常に強いという特徴から多くの注目をあびた。わが国で開発された CS-1170 はこの種のものとして、さらにスペクトラムを拡大し、つづいてわが国において YM-09330 が開発され、いっそうスペクトラムが拡大した (2表のFより

第2表 βラクタム系薬剤開発の推移 (セファロスポリン)

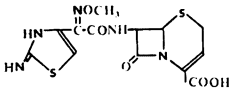


第2図 セファロスポリン系新薬の構造

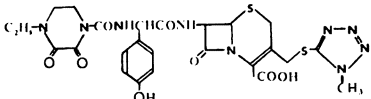
HR 756



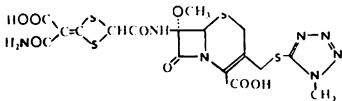
FK 749



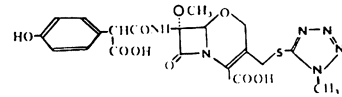
T 1551



YM-09330

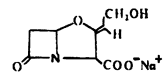


6059-S

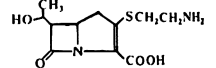


第3図 β-ラクタメースインヒビター

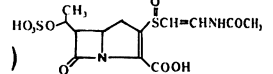
Clavulanic acid (1976)



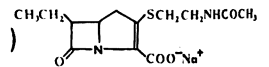
Thienamycin (1976)



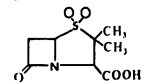
MM 4550 (1977)



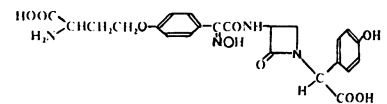
PS-5 (1978)



CP-45899 (1978)



Nocardicin A (1975)



下)。

6059-S はセファロスポリン環のイオウを酸素に置換し、7位に -OCH<sub>3</sub> をもつ化合物として登場し、今後いっそうセファマイシン群の発展が期待される。セファロスポリン系の新薬の構造は第2図に示した。

その後 β-lactam 剤の研究は、β-lactamase 阻害剤の研究という、従来のペニシリン環、セファロスポリン環と異なる新しいタイプのβラクタム環の研究とが併行して進められてきた。とくに前者の研究は、わが国では微化研とわれわれとの共同研究、次いで英国、米国においてそれぞれ独立に行われ、MM 4550、クラブラン酸、CP-45899 が発見された。抗菌活性は殆んど認められないが β-lactamase の強い阻害剤であるため今後合

剤としての研究が活発になろう (第3図)。

同様にノカルディン A (1975) はわが国で発見された極めて興味ある化合物である。チエナマイシンは注目すべき抗菌力と、β-lactamase に強い物質であるが、不安定さの弱点を克服することが今後最大の課題である。PS-5 は同様に幅広い抗菌力を持つ物質としてわが国で発見された。これを母核としての新しい物質の合成こそ今後期待される。筆者はこれらの化合物の時代をペニシリン・セファロスポリンの時代を越えた第3の時代と名づけている。

(ロ)  $\beta$ -ラクタマーゼの分類とその特徴

山 岸 三 郎

千葉大学薬学部

グラム陰性菌による感染症を治療する上で最近の重要課題として  $\beta$ -ラクタム抗生物質耐性菌の著明な増加があげられる。そしてその主たる耐性機序は各々の耐性菌の産生する  $\beta$ -ラクタマーゼ活性に帰せられる。

グラム陰性菌の産生する  $\beta$ -ラクタマーゼは諸種のパラメーターを考慮して第1表に示すように分類して考えることが実際的であろう。

すなわち、

1)  $\beta$ -ラクタマーゼをファロスポリナーゼ(CSase)とペニシリンナーゼ(PCase)の2群に大別する。

2) CSaseは誘導的もしくは構成的に産生され、その構造遺伝子は chromosome 上にあり、したがってそれぞれ菌種特異的である。とはいえ、それらの酵素学的特徴から3~4群に分類することも可能である。すなわち  
① 典型的 CSase: *C. freundii* 型, *P. rettgeri* 型等である。  
② CS 類の加水分解活性がやや異なる *E. coli* 型 CSase, ③ PC 類をも幾分加水分解する *P. vulgaris* 型 CSase 等に群別できる。

3) PCaseは chromosome 性と plasmid 性の両方が知られているが、それらは第1表に示すように4つのグループに分類することが都合がよい。私共は酵素学的研究から R plasmid 性 PCase を I~IV 型 (RICHMOND の Class III~V) に大別することを提唱しているが、それらの系統発生的、疫学的考察を試みるに当って、従来の酵素学的知見に加えて R plasmid 上に含まれる ampicillin transposon (TnA) の分子遺伝学的な疫学研究を検討することが必須となってきた。現在までの研究結果によると、I 型および II 型 PCase を支配する各 TnA の間に転移活性の特徴的な差違が見出されており、その差が自然界の ABPC 耐性 R plasmid の分布によく対応していることを見出している。

## (ハ) 薬剤耐性菌の疫学と遺伝

橋 本 一

群馬大

$\beta$ -lactam 系薬剤、ことに ampicillin を中心としたグラム陰性桿菌の耐性という立場から、如何に疫学の問題を遺伝学的に考察し、また分子遺伝学の最近のめざましい発展から疫学をどうみるか、ということについて、私、および教室の同僚のやってきた仕事を代表として紹介する。

私共は常に人病巣由来の臨床分離菌を広く集め、その耐性値を測定することから仕事を始める。肺炎桿菌を例にとると、群馬県下で分離された96株は殆んどが Cephaloridine (CER) に感受性であり、3.1  $\mu$ g/ml に MIC の山をもつ。感受性菌の MIC 分布が0になるところ、25  $\mu$ g/ml を耐性菌の MIC の下限とすれば、16株は耐性菌であった。一方、Ampicillin (ABPC) に対しては9株を除いた殆んどが MIC 12  $\mu$ g/ml 以上の耐性菌である。このことから肺炎桿菌は ABPC に自然耐性であると考えられる。これらの株について、耐性型と R 因子保有率を調べたところ、肺炎桿菌の中でも、Indole 陽性の *Oxytoca* と、Indole 陰性の株とでは著しい違いのあることがわかった。すなわち陽性株では殆んどが  $\beta$ -lactam 系薬剤だけに耐性で、耐性株の半数は、CER 耐性であると同時に ABPC 高度耐性である。そしてこれらの株から R 因子は分離されていない。しかし Indole 陰性株では殆んどが  $\beta$ -lactam 耐性であるのは同じだが、これらの殆んどは Tetracycline (TC), Chloramphenicol (CP), Streptomycin (SM) の3剤以上に耐性であり、また R 因子を保有している。このように同じ菌種でも、生化学的、血清学的、ファージ型などが異なると、耐性型や R 因子型が大きく異なってくるのが  $\beta$ -lactam 耐性の特徴の1つである。

変形菌では属の違いにより大差がある。Indole 陰性の *P. mirabilis* だけが CER および ABPC に対して感受性である。

わが国で始めて ABPC 耐性グラム陰性桿菌が分離さ

第1表 グラム陰性菌の産生する  $\beta$ -ラクタマーゼの分類  
Penicillin/Cephalosporin Amido- $\beta$ -lactam Hydrolase (E. C. 3.5.2.6)

$\beta$ -Lactamases of Gram-negative Bacteria	CSase	typical	Class I a
		others	Class I b, c, d
	PCase	<i>P. mirabilis</i> -type	Class II
		TEM-type	Type I Class III a
		Oxacillinase-type	Type II (III) Class V a/b
Carbenicillinase-type	Type IV Class V c		

CSase : Cephalosporinase

PCase : Penicillinase

れたのは 1965 年赤痢菌からであるが、その際 16 株の ABPC 耐性菌の中 5 株に伝達性があり、それらはすべて多剤耐性であった。それ以来の分離された 13,000 株の赤痢菌の調査をまとめると、3.5% だけが ABPC 耐性を示したが、それらの 3/4 は R 因子によるものであり、その R 因子の 85% は 4 剤以上の多剤耐性であった。

緑膿菌では治療に CBPC な用いられるが、*in vitro* ではこの菌はすべて 12.5  $\mu\text{g/ml}$  以上の耐性菌である。殆んどは透過性の低下による耐性であるが、中に 400  $\mu\text{g/ml}$  以上の高度耐性の群があり、これらは R 因子によるもので耐性機構は不活化である。種々の  $\beta$ -lactam 抗生剤を用いて基質特異性を調べると I, II, IV 型と種々の不活化酵素がえられ、関係する遺伝子が異なることを示しているが、耐性型を調べると CPC 耐性 R 因子の 85% 以上は TC, CM, SM, SA の 3 剤以上にも耐性を与える。すなわち、ここにおいても  $\beta$ -lactam 耐性は多剤耐性に伴って生じ易いことがわかる。

*Klebsiella* の ABPC 耐性は自然耐性、すなわち菌自身もつ耐性であり、その遺伝子は染色体上にあることが知られている。菌染色体の最もよく解析されている大腸菌では、耐性は低い  $\beta$ -lactamase を生産しており、その遺伝子、*ampC* と *ampA* は既にマップされている (93 分)。前者は構造遺伝子、後者は調節遺伝子である。両者で約 1  $\mu\text{g/ml}$  の耐性値を示し、*ampA* の変異で 10  $\mu\text{g/ml}$ 、さらに *ampC*, A 両者とも重複して数がふえると 100 から 400  $\mu\text{g/ml}$  もの ABPC 耐性菌になる。

病巣分離の ABPC 耐性菌の場合、殆んど単に R 因子によるものである。日本で始めて私達が分離した ABPC 耐性 R 因子は 5 株とも TC, CP, SM, SA 4 剤耐性を伴っていた。そのひとつ、Rms 201 は世界で最も広く分布している多剤耐性 R 因子の F<sub>II</sub> グループに属し、分子量約 60 Megadalton (Md) である。Rms 201 の DNA を、代表的 4 剤耐性 R 因子、R100 と制限酵素による切断型で比較した。R100 は EcoR1 によって 13 の主な切断片に切れるが Rms 201 も同じく 13 にきれる。ただ 1 つの違いは、2 番目に大きいフラグメント B の大きさが、Rms 201 の場合、R100 の B フラグメントより 3.2 Md 大きいことであり、あとの 12 個の分子量は全く同じであった。このことから Rms 201 は R100 のような R 因子に ABPC 遺伝子をもった 3.2 Md の遺伝体が入りこんだものと考えられる。その遺伝体の由来は未だ明らかではない。近年ある遺伝体から別の遺伝体へのりうつり易い遺伝子群が発見され、Transposon (Tn) と命名されており、ABPC 耐性の Tn も Tn1, Tn2, Tn3 と種々報告されて、その分子量はいずれも 3 Md

ほどである。したがって Rms 201 の *amp* も Tn1~3 と同じ Transposon によって運ばれたものと考えられ、実際にやってみるとこの *amp* 遺伝子は容易に  $\lambda$ ファージなどにうつすことができた。このように *amp* が Tn として行動し易いので ABPC 耐性菌は自然界から従来の多剤耐性に伴った型で出現し易いものと考えられる。

自然界では ABPC 高度耐性菌がよく分離されるが、酵素としての性質、とくに基質特異性などが、低度耐性菌と同じ場合が多い。このような場合は *amp* 遺伝子の質的な変化というより、酵素生産の量的変化と考えられる。Rms 201 を用いて、*in vitro* で ABPC 高度耐性の変異株をとると、その殆んどは 3 種類に分類された。1 つはコピー数増加株で細胞内の R 因子数の多くなったもの。この場合は ABPC だけでなく CP や SM 耐性度も増加するが TC 耐性だけは低下するという変わった現象もみられる。第 2 は 1 つの R 因子上で *amp* 遺伝子だけが数の増加を来たしたもの。つまり遺伝子の部分的重複である。第 3 は *amp* 遺伝子の数は変わらないが、形質発現の効率が増加したもの。これらの 3 種は DNA を分離して、制限酵素で解析すると区別することができる。

近年インフルエンザ桿菌などにも ABPC 耐性菌が開始したが、これらも非伝達性 R 因子によることが明らかになってきておる。

## (二) 細菌細胞の分裂とペニシリンの致死標的

広田 幸敬  
国立遺伝学研究所

(未着)

## (ホ) ペニシリン結合蛋白質 (PBP)

松橋 通生  
東大応微研

$\beta$ -ラクタム抗生物質は細菌の細胞壁生成を阻害し、その結果細胞壁が破れたり、正常な隔壁や細胞壁ができず異常形態を呈したりするような変化をひき起して、殺菌的あるいは静菌的に働くと考えられている。 $\beta$ -ラクタム抗生物質の作用標的としては細菌の細胞質膜にあるペニシリン結合蛋白質 (PBP) が知られており (図 1)、それらの 1 つ 1 つに対する  $\beta$ -ラクタム抗生物質の結合性の特異性を測定することによって、その薬剤の細菌に対する生理作用のパターンがかなり正確に説明ないし予言できる (拮抗法、図 2)。しかしそれだけでは説明できない部分もあり、細胞壁溶解酵素に対する作用なども  $\beta$ -ラクタム抗生物質の働きを解明するに当たって考慮が必要

図 1 Detection of penicillin binding proteins

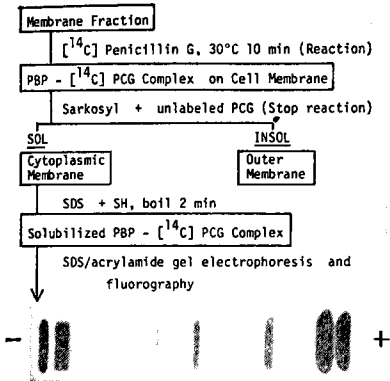


図 2 Competition experiment

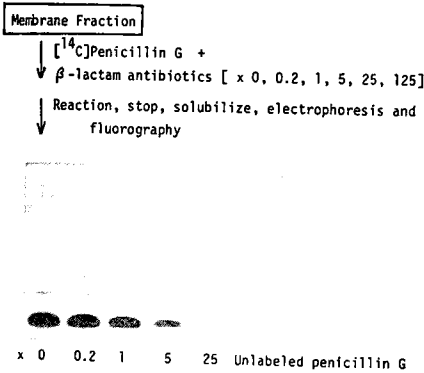


図 3 Penicillin binding proteins in *E. coli*

Protein	Function	Inhibition or deletion
1A	Detour enzyme of 1Bs	Not detected
1Bs	Crosslinking enzyme (in vivo for cell elongation?)	Pen <sup>SS</sup> , cell-lysis
2	Initiation of cell elongation?	Round cells, cell-lysis
3	Septa formation	Filamentous cells, cell-lysis
4	D-Ala-CPase IB	Not detected
5	D-Ala-CPase IA	Pen <sup>SS</sup>
6	?	?

になるだろう。

PBP は細胞壁ペプチドグリカン形成における架橋反応の酵素またはその類縁の酵素であり、β-ラクタム抗生物質がそれらに結合することによってそれらのもつ酵素活性が阻害されると考えられる。大腸菌では少なくとも7種の異なる PBP が知られている。大腸菌以外のグラム陰性桿菌でも事情はほぼ同様である。グラム陽性桿菌、さらにグラム陽性球菌になると PBP のパターンは全く変わってくる。さて大腸菌で明らかになった各 PBP の機能について述べれば、図3のようなことになる。PBP-1A は熱不安定性、セファロsporin 親和性の蛋白質で (文献 1, 2), PBP-1Bs の detour enzyme (迂回酵素または代替酵素) と考えられる (文献 1)。PBP-1Bs は最低3個の熱安定性 (結合性に関して)、ペニシリン親和性の蛋白質から成り、*in vitro* でみられるペプチドグリカン架橋酵素そのものであると思われる (文献 1, 2)。PBP-2 は熱不安定性、メシリナム親和性の蛋白質で (文献 2, 3)、細胞壁伸長の開始反応の酵素であろう。PBP-3 は隔壁形成に関する (文献 3, 4)。PBP-4 は D-アラニン・カルボキシペプチダーゼ 1B に、PBP-5 は同じく IA に等しい (文献 5, 6, 7)。この2つの酵素の機能は明らかでないが (文献 5, 6)、一定の条件下である役割を果すと思われる (文献 1, 8)。

PBP はすべて適当な中性またはアニオン性の界面活性剤で抽出され、通常の方法で分離精製することができる (文献 2)。

細胞壁ペプチドグリカン溶解酵素は現在まだすべてのものが明らかになっているわけではなく、反対に細胞にとって必須なものはまだ知られていないかもしれない。これらの酵素は PBP の作用に先立ってペプチドグリカンに破れ目をいれる機能が想定されており、細胞にとっては生長、分裂の制御機構に組込まれている可能性があるが、β-ラクタム抗生物質にとってはその殺菌の作用標的の1つである可能性がある。グラム陽性細菌では N-アセチルムラミル-L-アラニル・アミダーゼがリポタイコイン酸によって阻害をうけるが、グラム陰性大腸菌では DD-エンドペプチダーゼが DNA フラグメントまたはリポタイコイン酸 (グラム陰性菌には見出されていない) によって阻害され、その制御機構における役割が注目されている (文献 9)。

文 献

- 1) T. S. TAMAKI, S. NAKAJIMA & M. MATSUHASHI, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5472 ~5476 (1977)
- 2) J. NAKAGAWA, H. MATSUZAWA & M. MATSUHASHI, J. Bacteriol. submitted.
- 3) B. G. SPRATT, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

- 72, 2999~3003 (1975)
- 4) H. SUZUKI, Y. NISHIMURA & Y. HIROTA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 664~668 (1978)
- 5) M. MATSUHASHI, Y. TAKAGAKI, I. N. MARUYAMA, S. TAMAKI, Y. NISHIMURA, H. SUZUKI, U. OGINO & Y. HIROTA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2976~2979 (1977)
- 6) M. MATSUHASHI, I. N. MARUYAMA, Y. TAKAGAKI, S. TAMAKI, Y. NISHIMURA & Y. HIROTA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2631~2635 (1978)
- 7) M. MATSUHASHI, S. TAMAKI, S. J. CURTIS & J. L. STROMINGER, J. Bacteriol. 136, No. 1 (1979)
- 8) S. TAMAKI, J. NAKAGAWA, I. N. MARUYAMA & M. MATSUHASHI, Agr. Biol. Chem. 42, 2147~2150 (1978)
- 9) S. TOMIOKA & M. MATSUHASHI, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1978) in press.

### 新薬シンポジウム

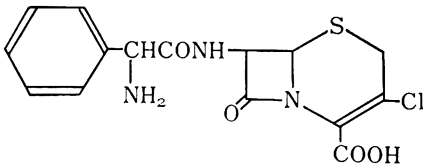
## CEFACTOR

司会 藤井良知  
帝京大学小児科

司会にあたって

藤井良知  
帝京大学小児科

Cefaclor は米国 Eli Lilly 社で開発された経口用 Cephalosporin 剤で 1976 年の第 16 回 ICAAC で発表された。本剤は下図に示すとおり化学構造上、3 位の炭素原子に直接クロール原子が結合している。従来の Cephalosporin 剤では、3 位の側鎖には必ず炭素原子が結合しており、3 位の側鎖に炭素以外の原子を結合させることが合成化学上の課題であったことを考えると、本剤はこの課題を解決してつくられた最初の薬剤であるといえることができる。



Cefaclor は従来の経口用 Cephalosporin 剤に比し、抗菌力の改善・拡大が認められ、とくに短時間で強い殺菌作用を示すことが明らかである。

本邦では、各種の試験管内実験・動物実験が塩野義製薬研究所および基礎領域研究施設で行なわれ、これらの

preclinical data からその安全性を確認したのち、慎重に Phase I 試験が進められた。この結果、所期のとおりヒトでの安全性と有効体液内濃度の持続を認め、臨床における有用性が期待されたので、1977 年 11 月 5 日 Cefaclor 研究会が組織され、その後全国 71 施設の協力によって広範な基礎的・臨床的検討が進められた。以来 1978 年 7 月 15 日まで 5 回の会合を通じて十分な討議を重ねながら、これまでに 2,022 例の臨床症例が集積されており、本剤について一応の評価をなしうる段階に到達したものと考えられるので、本シンポジウムを開催する運びになったものである。

本シンポジウムでは、開発側から本剤の開発経緯と日本での研究会発足までに集積されていた内外データならびにそのメリットと考えられた点を最初に説明してもらい、本シンポジウムに参加される会員諸氏が本剤開発の前提を共通に理解することから開始したい。その上で各シンポジストから Cefaclor 研究会発足以後に新たに見出された知見の報告と開発側から示された特長が追認されたか否かも加えて報告してもらい、両者を対比しながら会員諸氏とともに意見を交換しあって本剤の本質を鮮明にしていきたい。

司会者としては、Cefaclor 考床開発の過程を会員諸氏につまびらかとし、これを 1 つの題材として新薬開発の現状およびあり方、学会との関連等について、会員諸氏が改めて思いを到す 1 つの機会になれば望外の喜びと考える次第である。

## I. 開発側の資料

村尾裕史

日本リリー株式会社

### (1) 発明の経緯

セファクロールはセファレキシンの 3 位の側鎖を Cl で置換した構造式をもつ。本化合物は米国リリー社研究所でセファレキシンの合成法を研究している過程で生まれた。7ACA (7-aminocephalosporanic acid) からセファレキシンを合成する際、従来知られている合成法はいずれも能率が悪く非経済的な方法なので、より能率的な合成法を求めて研究が進められ、その過程で 3 位に Cl のついた 3-chlorocephem 化合物が得られ、これがすぐれた抗菌力を示した。この化合物の 7 位の側鎖をいろいろ修飾した結果、経口投与で吸収もよく、抗菌力もよいものとして見出されたのがセファクロールである。

従来報告されているセファロsporin 化合物は、7ACA またはペニシリンから合成されるため、すべて 3 位の炭素原子にさらに炭素原子が結合している。セファクロールは 3 位に炭素原子以外のものが直接結合してい