

抗生物質の協力作用機構に関する研究

—1. Cephaloridine 耐性菌に対する Cephaloridine と Chloramphenicol の協力作用機構—

林 弘 美

東京都立府中病院（東京大学医科学研究所研究生）

（昭和 56 年 5 月 8 日受付）

臨床分離のグラム陰性桿菌で paper disk 法で Cephaloridine (CER) 耐性を示した 50 株中、10 株が CER に高度耐性 ($MIC \geq 1,600 \mu\text{g/ml}$) で Chloramphenicol (CP) に比較的感受性 ($MIC \leq 12.5 \mu\text{g/ml}$) の菌であった。この 10 株中 9 株に CER と微量 CP の併用時に協力効果が認められた。この協力効果の機序を知るために、協力効果のあった株の 1 つ *Enterobacter liquefaciens* について微量の CP を併用した時と非併用時の β -lactamase 活性の比較をした。その結果、CER と CP の併用による協力効果は、 β -lactamase の細胞外への透過逸脱よりも β -lactamase 産生が（蛋白合成自体よりもさらに強く）抑制されることによるのであろうと考えられる。

β -lactam 系の薬剤耐性には、細菌の産生する β -lactamase が関与していることは周知のことである。 β -lactamase を産生するグラム陰性桿菌で Cephaloridine (CER) に高度の耐性を示す菌に、最小発育阻止濃度 (Minimal inhibitory concentration: MIC) 以下の微量の Chloramphenicol (CP) を併用することで協力効果があることが MICHELIS¹⁾ らにより報告されている。しかしそのメカニズムについてはまだ不明である。そこで臨床分離のグラム陰性桿菌について、MIC 以下での CER と CP の協力効果とその時の β -lactamase 活性について検討を行ない、その協力作用のメカニズムについて考察を加えた。

I. 実験材料および方法

(1) 対象菌株および使用培地

対象菌株は 1975 年 2 月から 9 月までに東大医学研究所附属病院の細菌検査室で患者の痰、尿、胆汁、膿汁などより分離した菌株で、その中の paper disk method (栄研トリディスク) で Penicillin (PC), CER に耐性 (+〜-)、CP に感受性 (卅〜卍) のグラム陰性桿菌、50 株である。

これらの菌は *Pseudomonas aeruginosa* (13 株), *Serratia* (8 株), *Enterobacter aerogenes* (8 株), *Enterobacter* (6 株), *Morganella* (3 株), *Klebsiella* (3 株), *Escherichia coli* (3 株), *Citrobacter* (2 株), *Proteus mirabilis* (2 株), *Enterobacter cloacae* (1 株), *Enterobacter liquefaciens* (1 株) である。

使用培地は Heart Infusion Broth (HIB: ムッサン), Heart Infusion Agar (栄研) である。

(2) 感受性および協力作用

抗生物質に対する感受性測定には日本化学療法学会標準法に準じて寒天平板希釈法を用いた。濃度は CER 3,200~100 $\mu\text{g/ml}$ の 2 倍希釈系列とした。また CP は 25~0.8 $\mu\text{g/ml}$ の 2 倍希釈系列とした。CER と CP のおのおのの組み合わせでの協力効果の測定には、CER 3,200~100 $\mu\text{g/ml}$ と CP 25~0.8 $\mu\text{g/ml}$ の各組み合わせで希釈系列をつくり、multiinoculator を使用して菌液を接種、18 時間培養後測定した。薬剤の希釈は滅菌再蒸留水を用いた。なお CP の最初の段階の溶解には少量のプロピレングリコールを用いた。

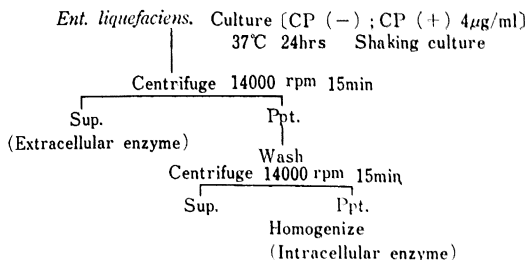
(3) 生菌数の測定

上述の chequer board titration method で協力作用の認められた株の 1 株について次のようにして経時的に生菌数を測定した。HI broth を用い、18 時間静置培養したものを HI broth で菌数を約 $10^5/\text{ml}$ に調節し、この菌液を用いて対照および抗生物質の濃度が CER 600 $\mu\text{g/ml}$ 単独、CP 4 $\mu\text{g/ml}$ 単独、および CER 600 $\mu\text{g/ml}$ と CP 4 $\mu\text{g/ml}$ の両者の組み合わせになるようにして 37°C で培養をした。その一部分について接種直後 (0 時間) 2, 4, 6, 8, 24 時間と経時的に HI 寒天平板に定量培養して生菌数を測定した。

(4) 残存 CER の濃度測定

CER と CP の協力作用のメカニズムを検討するため、同時に、経時的に培養液の一部分をとり 100°C, 2 分間、加熱し反応を止めた後、4°C, 11,000 G で 15 分間冷却遠心をし、その上清を用いて CER 感受性 (MIC が 25 $\mu\text{g/ml}$ 以下)、CP 耐性 (MIC が 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上)

Fig.1 Extraction procedure of β -lactamase of *Enterobacter liquefaciens*



の *Escherichia coli* を検定菌として、HI 寒天平板カップ法を用いて残存 CER 濃度を測定した。

(5) β -lactamase 活性の測定

また上記の β -lactamase 活性を調べるために、松田らの方法²⁾で以下に述べるごとく粗酵素の抽出を行なった (Fig.1)。

HI broth で 18 時間、前培養をした *Enterobacter liquefaciens* を HI broth 100 ml に 10% になるよう接種し、CP 無添加のものと CP 4 μ g/ml 添加したものを 37°C 24 時間振盪培養をした。培養後におのおのを 13,000 G 15 分間、4°C で冷却遠心をし、上清と沈殿に分離した。沈殿を超音波破砕器、発振周波数 20 kc で約 15 分間破壊をした。上清と細胞破壊成分について β -lactamase 活性の測定を microiodometric assay^{3,4)} により行なった。

(a) microiodometric assay

pH 5.8 の 0.05 Mol phosphate buffer で soluble starch を溶解し 2.0%(w/v) の溶液とし、かくはんしながら透明になるまで加熱し室温に放置、これを starch solution とした。ヨード試薬は 10 ml の再蒸留水に 3.2 Mol KI(5.3g) と 0.08 Mol I₂(0.2g) を溶解した。この 0.3 ml を pH 5.8 の 0.05 Mol phosphate buffer 180 ml に 2% starch solution 20 ml と混合し starch-iodide solution を作り、15 分間以上放置をした。基質

には CER 10 μ g を用いた。1.0 cm glass cuvette に starch-iodide solution 1.0 ml, 基質 1.0 ml, pH 5.8 の 0.05 Mol phosphate buffer 0.9 ml, starch solution 0.2 ml を入れて反応開始 5 分後に 0.1 ml の粗酵素を入れた。反応は 37°C 恒温で行なった。Hitachi spectrophotometer 124 で波長 620 nm, light path 1.0 cm で吸光度の減少曲線を chart drive speed 10 mm/min で記録した。control として培養菌液を 100°C で 2 分間加熱処理をしたものの上清、沈殿破壊成分を用いた。吸光度変化の直線部分を初速度として比較した。これらの生菌数 1 個当たりと蛋白量 1 μ g 当たりの活性を算定し、また別に生菌 1 個当たりの蛋白量を求めて生菌 1 個の蛋白当たりの活性を算定した。蛋白量の測定には FOLIN-LOWRY 法を用い、標準液として Bovine serum albumin を使用した。なお CP 無添加培養菌液の上清と沈殿に最終濃度が 100 μ g/ml になるように CP を加え、既成の β -lactamase に対する高濃度 CP の影響をみた。

II. 実験成績

(1) CER と CP の協力作用

CER の MIC が 1,600 μ g/ml 以上、CP 12.5 μ g/

Table 1 MIC of cephaloridine and chloramphenicol

	Source	CER MIC (μ g/ml)	CP MIC (μ g/ml)
<i>Morganella</i>	Bile	1,600	12.5
<i>Proteus vulgaris</i>	Urine	3,200	12.5
<i>Proteus vulgaris</i>	Urine	>3,200	12.5
<i>Ent. liquefaciens</i>	Sputum	1,600	12.5
<i>Proteus vulgaris</i>	Pus	>3,200	12.5
<i>Proteus vulgaris</i>	Pus	3,200	12.5
<i>Serratia</i>	Sputum	1,600	12.5
<i>Ent. cloacae</i>	Sputum	>3,200	12.5
<i>Ent. aerogenes</i>	Pus	3,200	6.4
<i>Citrobacter</i>	Urine	3,200	6.4

Table 2 Combination effect of cephaloridine and chloramphenicol

CP	<i>Morganella</i> (μ g/ml)						
	CER	3,200	1,600	800	400	200	100
25	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	+
6.3	-	-	-	+	+	+	+
3.2	-	-	+	+	+	+	+
1.6	-	-	+	+	+	+	+
0.8	-	+	+	+	+	+	+

CP	<i>Enterobacter liquefaciens</i> (μ g/ml)						
	CER	3,200	1,600	800	400	200	100
25	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-
6.3	-	-	-	-	-	-	+
3.2	-	-	-	+	+	+	+
1.6	-	-	+	+	+	+	+
0.8	-	+	+	+	+	+	+

ml 以下の CER に高度耐性で CP に比較的感受性の株は 50 株中 10 株であった (Table 1)。この 10 株中 9 株に程度の差はあるが若干の CER と CP の協力作用が認められた。Table 2 にその 2 例を示す。

(2) 生菌数の推移

比較的明らかな協力作用のあった *Enterobacter*

Fig. 2 Combination effect of cephaloridine and chloramphenicol

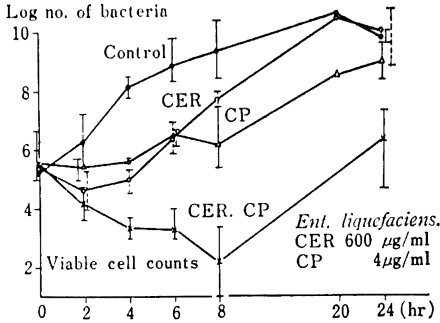


Table 3 Concentration of cephaloridine (µg/ml) in the supernatant

hrs	0	2	4	6	8	24
CER	495	361	180	0	0	0
CER, CP	567	470	—	375	333	225

Cylinder plate method

Table 4 β-lactamase activity microiodometric assay

(Hitachi Spectrophotometer. OD 620 nm Light path. 1.0 cm
 Concent. of iodine. 40 µM
 Concent. of substrate. CER 10 µg
 pH 5.8, 30°C)

	Ppt.		Sup.	
	CP -	CP +	CP -	CP +
Per cell	6.40 × 10 ^{-10*}	1.05 × 10 ^{-10*}	0	0
Per protein	2.71 × 10 ^{-1*}	0.88 × 10 ^{-1*}	0	0

* µg/min/ml.

Viable cell counts : CP - : 1.79 × 10¹¹/ml.
 CP + : 1.57 × 10¹¹/ml.

Protein amounts :

Ppt. CP - : 42.0 mg/ml
 Sup. 3.2
 HI broth 9.3
 CP + : 17.6 mg/ml
 8.8

liquefaciens 1 株について CER 600 µg/ml と CP 4 µg/ml を併用して培養したときの生菌数 (Fig. 2) は、8 時間まで減少し以後増加をし、24 時間目の生菌数は 10⁴~10⁷/ml であった。薬剤無添加の control では接種後 4 時間で急速に増加し 24 時間では 10⁹/ml で、CP 単独、CER 単独とも control に比べれば増殖は遅いが、8 時間では 10⁸/ml 以上になっていた。

(3) 残存 CER 濃度

上清中に残存している CER 濃度は、CER と CP 併用では 6 時間では 375 µg/ml、8 時間では 333 µg/ml、24 時間では 225 µg/ml であった。CER 単独使用時は 6 時間ですでに 0 µg/ml と減少している (Table 3)。

(4) β-lactamase 活性

β-lactamase 活性は上清中にはほとんど認められなかった (Table 4)。沈殿破壊成分についての β-lactamase 活性は細菌 1 個当たりについては、CP を 4 µg/ml 添加培養をしたものでは 1.05 × 10⁻¹⁰ µg/min/ml で、CP 無添加のものでは 6.40 × 10⁻¹⁰ µg/min/ml であり、CP 添加培養をしたものが無添加に比べ約 1/6 の低い値を示していた。蛋白量 1 µg 当たりでは CP 添加のものが 0.88 × 10⁻¹ µg/min/ml、CP 無添加では 2.71 × 10⁻¹ µg/min/ml で、前者は後者の約 1/3 の低い値であった。生菌 1 個当たりの蛋白は CP 無添加のもので 2.35 × 10⁻⁷ µg、CP 添加のものが 1.12 × 10⁻⁷ µg で、添加した方が蛋白量は約 1/2 減少している。生菌 1 個の蛋白当たりの活性は、CP 無添加のもので 2.72 × 10⁻⁸ µg/min/ml、添加したものでは 0.94 × 10⁻⁸ µg/min/ml で、添加した方が無添加のものに比べ約 1/3 に低くなっている。なお CP 無添加の培養液の一部をとり CP 100 µg/ml を加え直ちに β-lactamase 活性の測定を行なったが、対照との差は認められなかった。生菌数は CP 添加のもので 1.57 × 10¹¹/ml、CP 無添加のもので 1.79 × 10¹¹/ml であった。蛋白量は沈殿破壊成分では CP 添加のもので 17,575 µg/ml、無添加のものが 42,000 µg/ml と、添加したものが無添加の約 2/5 であった。上清中の蛋白量は CP 添加が 8,750 µg/ml、CP 無添加で 3,220 µg/ml と、CP 無添加の方が添加の 1/3 程度に低くなっていた。なおこの時の HI broth の蛋白は 9,300 µg/ml であった。

臨床分離の CER 高度耐性菌である *Enterobacter liquefaciens* に対しそれぞれ MIC 以下の CER, CP の併用で協力作用を認めた。CER と微量の CP 併用時に β-lactamase 活性は沈殿破壊成分において抑制が認められた。一方、この菌から抽出した β-lactamase に直接 CP を添加作用させた場合は、高濃度 CP (100 µg/ml) は抑制作用を示さなかった。

III. 考 察

グラム陰性桿菌のある株について CP と β -lactam 系抗生物質間に相乗効果があるという報告がある¹⁾。両方の薬剤に感受性がある場合には普通拮抗的に作用するのであるが、 β -lactam 系抗生物質耐性、CP 感受性の株に関しては相乗的に作用するという。この相乗効果のメカニズムに関しては、細胞膜の透過性の変化、 β -lactamase の合成を阻害するなどの説がある。本実験において微量 CP 併用時の沈殿破壊成分中の β -lactamase 活性が低い成績が得られたことより、 β -lactamase の合成が阻害されている可能性があることが明らかとなった。また CP 100 μ g/ml の大量を CP 無添加の粗酵素、 β -lactamase に加えても β -lactamase 活性の変化がないことから、すでに形成された β -lactamase に対しては CP は影響しないと推測される。蛋白質の量も CP 併用時に減少しており、生菌 1 個当たりの蛋白量も同様に減少している。しかし蛋白の合成抑制の割合よりも β -lactamase 活性の減少の割合の方が大きい。CP 添加の有無にかかわらず上清中の β -lactamase 活性がほとんどないことから、細胞外の β -lactamase 活性はほとんどないか、この方法で測定できないくらい少ないものと思われる。したがって CP の微量添加は β -lactamase の細胞外への透過性の変化による逸脱に影響を及ぼしたとは考えにくく、菌体内（細胞内）における蛋白合成を阻害し、とくに β -lactamase の産生をより強く阻害し、その活性を抑制したために協力作用が現われたものと考えられる。

IV. ま と め

CER 高度耐性の臨床分離株 50 株中 10 株に微量の CP 併用時に協力効果が認められた。そのうちの 1 株、*Enterobacter liquefaciens* について β -lactamase 活

性の変化からその協力効果のメカニズムを検討した。微量 CP 併用時は非併用時と比べ、その沈殿破壊成分中の蛋白量も β -lactamase 活性も減少している。細胞 1 個当たりの蛋白量の減少率よりも β -lactamase 活性の減少率の方が大きかった。両者でまた上清中の β -lactamase 活性には差がみられなかった。以上のことは CER と CP の併用による協力効果は、 β -lactamase の細胞外への透過逸脱よりも β -lactamase 産生が（蛋白合成自体よりもさらに強く）抑制されることによることを示唆しているものと考えられる。

謝 辞

終りに臨み、東京大学医科学研究所 三輪史朗教授、国井乙彦助教授のご指導およびご校閲を深謝致します。

なお終始ご指導、ご鞭撻をいただいた厚生年金病院長真下啓明博士、教室先輩各位に感謝致します。

文 献

- 1) MICHEL, J.; H. BORNSTEIN, R. LUBOSHITZKY & T. SACKS: Mechanism of chloramphenicol-cephaloridine synergism on enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and Chemother.* 7(6): 845, 1975
- 2) 松田真人, 浜洲泰久, 花村敏嗣, 浜尾 晃, 中澤昭三: 臨床分離セファロsporin系抗生物質耐性ブドウ球菌の産生する β -lactamase の精製, ならびにその性質に関する研究. *Chemotherapy* 23(8): 2558, 1975
- 3) NOVIC, R. P.: Microiodometric assay for penicillinase. *Biochemical. J.* 83: 236, 1962
- 4) CITRI, N.: Determination of penicillinase activity. *Methods Med. Res.* 10: 221, 1964
- 5) RICHMOND, M. H. & R. B. SYKES: β -lactamase of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* 9: 31, 1973

A STUDY OF MECHANISM ABOUT SYNERGISTIC EFFECT OF ANTIBIOTICS

—1. A mechanism of synergism, cephaloridine with chloramphenicol on cephaloridine resistant gram negative bacilli—

HIROMI HAYASHI

Fuchu Metropolitan Hospital

(Institute of Medical Science, University of Tokyo)

The 10 strains out of 50 gram negative rods, which were isolated at the clinical laboratory in the hospital of the Institute of Medical Science, University of Tokyo and determined as resistant against cephaloridine and sensitive to chloramphenicol by routine paper disk method, were highly resistant to cephaloridine ($MIC \geq 1,600 \mu\text{g/ml}$) and relatively sensitive to chloramphenicol ($MIC \leq 12.5 \mu\text{g/ml}$).

The synergistic effect of CER and small doses of CP was revealed in nine strains of these ten strains.

In order to investigate the mechanism of this synergistic effects, β -lactamase activities were measured by microiodometric assay.

It was suggested that the mechanism of this synergistic effect might not be due to leak out of β -lactamase, might be due to the stronger suppression of β -lactamase production than that of protein synthesis.