

Gentamicin の抗菌力に関する研究

森 賢 治・岩 永 正 明

長崎大学熱帯医学研究所病原細菌学部門

(昭和 55 年 6 月 23 日受付)

ゲンタマイシン (GM) の各種グラム陰性桿菌に対する抗菌態度, pH による抗菌力の変動, セフトリアム (CTM) との併用効果について検討した。

GM の抗菌態度: 各々 4 MIC 量の GM を含む液体培地中での Killing curve でみると, *Enterobacter cloacae* は速やかに殺菌されたが, *Escherichia coli* は増殖し, 菌種による抗菌態度の差がみられた。

pH による抗菌力の変動: pH 6.4~8.4 の寒天平板では, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus morgani* は培地の pH がアルカリに傾くほど抗菌力が強まる傾向にあったが, *Pseudomonas aeruginosa* では逆に pH 8.4 で抗菌力の低下するものを認めた。また液体培地中でも *Escherichia coli* 5 株, *Enterobacter cloacae* 5 株について培地の pH が高いほど殺菌作用が強まった。

CTM との併用効果: *Escherichia coli* 5 株について検討した。FIC index は各々 0.500, 0.503, 0.625, 0.625, 0.750 といちおう相乗作用を認めたが, 液体培地中では必ずしもそれと一致しなかった。

はじめに

ゲンタマイシン (GM) は多くのグラム陰性桿菌に優れた抗菌力を有するために広く臨床で使用されており, とくに最近問題とされているいわゆる難治性感染症の治療に用いられる頻度は極めて高い。しかしその使用頻度が増すにつれて, 耐性菌の問題がクローズアップされるようになってきた¹⁾。さらにそれ以外にも検討されるべき多くの問題が残されており, 詳細な検討が要求されている。ここでは上記諸問題のうち, 抗菌態度, pH による抗菌力の変動, 他剤との併用の功罪, 菌による GM の不活化などについて検討した結果を述べる。

材料と方法

使用薬剤: ゲンタマイシン (GM, 塩野義製薬) およびセフトリアム (CTM, 武田薬品) のいずれも力価の明らかなものを使用した。

供試菌株: 臨床材料から分離した教室保存株のうちで, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus morgani*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* の各 5 株と *Citrobacter freundii* 1 株を使用した。

抗菌態度: 最小発育阻止濃度 (MIC) は日本化学療法学会標準法に従って行なった。殺菌能はハートインフュージョンブイヨン (栄研) (以後 HIB) に 1 夜培養した各菌液を 100 倍量の新鮮な HIB に加え, 同時に GM

を MIC の 4 倍濃度になるように加え, その後経時的に 10 倍希釈法による CFU から生菌数で判定した。

pH による抗菌力の変動: HIB を NaOH と HCl により種々の pH に調整, GM を加えた各培地中の生菌数を経時的に測定, 互いに殺菌効果を比較した。またハートインフュージョン寒天 (栄研) (以後 HIA) の pH を同様に調整してそれぞれの pH における各菌の MIC を測定した。

他剤との併用効果: GM と CTM を併用し *Escherichia coli* に対する Fractional Inhibitory Concentration index (FIC index) を PAULA F. DOUGHERTY ら²⁾ の checker board 法により求めた。殺菌能を比較する場合は HIB 1 夜培養を薬剤加 HIB に $10^6 \sim 10^7$ ml となるように接種, 37°C に保ち経時的に生菌数を測定した。添加薬剤の組み合わせは, 1) GM の 1 MIC 濃度, 2) CTM の 4 MIC 濃度, 3) GM の 1 MIC 濃度+CTM の 4 MIC 濃度, 4) GM の 1 MIC 濃度のものに菌接種 2 時間後さらに CTM を 4 MIC 濃度となるように添加したもの, とした。

菌による薬剤の不活化: 4 MIC 濃度の GM を含む HIB に *Escherichia coli* を接種して 37°C に保ち, 経時的に生菌数と上清中の GM 残存力価を測定した。GM 含有 HIB の pH は 6.0, 7.0, 7.5 とした。GM の力価測定は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を指示菌とした

Table 1 Susceptibility of isolates to GM and CTM

Species	No. of strains	GM	CTM
<i>Escherichia coli</i>	773	0.78	0.2
	806	1.56	0.2
	827	0.39	0.39
	834	0.39	0.2
	849	0.39	0.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0.2	
	391	0.39	
	440	0.39	
	667	0.39	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	0.78	
	10	0.39	
	44	0.39	
	169	0.39	
<i>Proteus morganii</i>	338	100	
	344	1.56	
	372	1.56	
	518	6.25	
	567	0.78	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	219	1.56	
	255	1.56	
	258	1.56	
	266	1.56	
	270	1.56	
<i>Citrobacter freundii</i>	358	25	

Each value indicates MIC in $\mu\text{g/ml}$.

Table 2 Susceptibility of isolates to GM in various pH

Species	No. of strains	pH of media				
		6.4	7.1	7.6	8.0	8.4
<i>Escherichia coli</i>	773	3.13	0.78	0.39	0.2	0.2
	806	3.13	1.56	0.39	0.39	0.39
	827	6.25	1.56	0.39	0.39	0.39
	834	0.78	0.78	0.39	0.39	0.39
	849	1.56	0.78	0.78	0.39	0.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0.78	0.2	0.2	0.2	0.2
	391	1.56	0.39	0.2	0.2	0.2
	440	1.56	0.39	0.39	0.2	0.2
	667	1.56	0.39	0.39	0.39	0.2
	729	1.56	0.39	0.39	0.2	0.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	6.25	0.78	0.39	0.2	0.2
	10	1.56	0.39	0.39	0.39	0.39
	44	3.13	0.39	0.39	0.39	0.39
	169	1.56	0.39	0.39	0.39	0.2
	416	1.56	0.39	0.39	0.2	0.2
<i>Proteus morganii</i>	338	100	100	100	100	100
	344	6.25	1.56	0.39	0.39	0.39
	372	3.13	1.56	0.39	0.39	0.39
	518	25	6.25	1.56	1.56	1.56
	567	1.56	0.78	0.39	0.39	0.39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	219	1.56	1.56	1.56	1.56	3.13
	255	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56
	258	1.56	1.56	1.56	1.56	3.13
	266	1.56	1.56	1.56	1.56	3.13
	270	1.56	1.56	0.78	0.78	1.56

Each value indicates MIC in $\mu\text{g/ml}$.

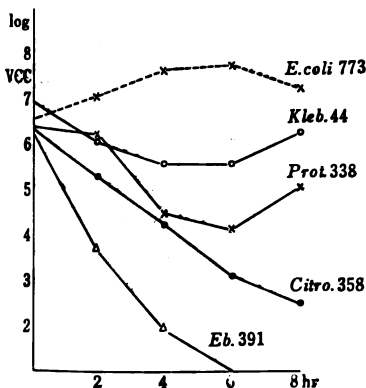
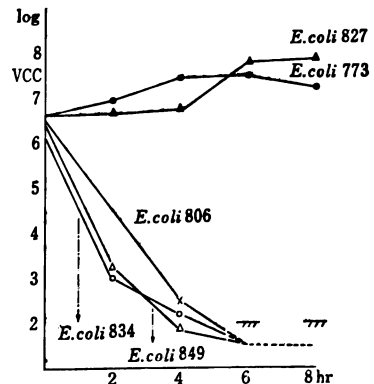
Fig. 1 Bactericidal effect of GM against various strains in HIB with $4\times\text{MIC}$ of GMFig. 2 Bactericidal effect of GM against 5 strains of *E. coli* in HIB with $4\times\text{MIC}$ of GM

Fig. 3 Bactericidal effect and residual activities of GM using 5 strains of *E. coli* in HIB with various pH and 4×MIC of GM

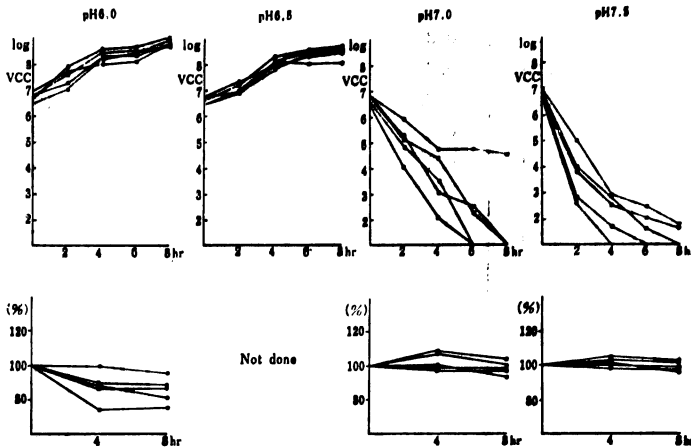
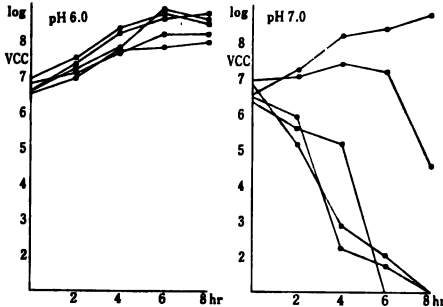


Fig. 4 Bactericidal effect of GM against 5 strains of *Enterobacter cloacae* (GM concentration in HIB: 4×MIC)



pH 7.2 の HIA を用いた薄層ペーパーディスク法で行なった。

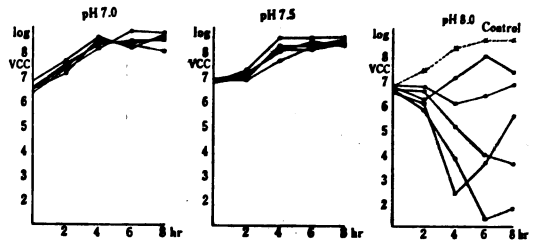
実験成績

抗菌態度：実験に使用した菌に対する GM と CTM の MIC は Table 1 に示した。

HIB に各菌種から無作為に選んだ株を接種し同時にそれぞれ 4 MIC 濃度の GM を加えた場合、Fig. 1 に示したように *Escherichia coli* は増殖を示し、*Enterobacter cloacae* は速やかに殺菌され菌種による抗菌態度の差がみられた。ここで用いた *Escherichia coli* にやはり無作為に選んだ同菌 4 株を加えて同様の実験を行なうと (Fig. 2), No. 773, 827 の 2 株は増殖したが他の 3 株は殺菌され菌株による効果の差を認めた。なお以上で使用した HIB の pH は 6.8 であった。

pH による抗菌力の変動：pH 6.4, 7.1, 7.6, 8.0, 8.4 の HIA で試験した各菌に対する GM の MIC を Table 2 に示した (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 に調

Fig. 5 Bactericidal effects of GM in low concentration (1×MIC) against 5 strains of *E. coli*



整した HIA は高圧滅菌分注後前記の pH となった)。*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* の全株, *Proteus morgani* のうち耐性の 1 株を除く 4 株で培地の pH がアルカリに傾くほど抗菌力が強まっていたが、*Pseudomonas aeruginosa* の 4 株では培地の pH が 6.4 から 8.0 まで MIC の変動はなく、pH 8.4 ではむしろ抗菌力の低下するものが上記 4 株中 3 株に認められた。

4 MIC の GM を含む HIB の pH を無菌的に 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 に調整して *Escherichia coli* を接種すると、Fig. 3 上段に示したように pH 6.0, 6.5 では 5 株とも増殖したが、pH 7.0 では 5 株とも殺菌され、pH 7.5 では殺菌効果がさらに著明であった。*Enterobacter cloacae* 5 株を対象に pH 6.0, 7.0 の HIB で行なった同様の実験成績は Fig. 4 に示した。この場合 *Escherichia coli* 5 株と同じ傾向といえるがうち 1 株は pH 7.0 でも増殖を示した。

1 MIC 濃度の GM で pH を変化させた場合 *Escherichia coli* 5 株についてみると (Fig. 5), pH 7.0, 7.5 ではすべて増殖したが、pH 8.0 の場合 2 株に殺菌効果、

Fig. 6 Bactericidal effects of GM in low concentration (1×MIC) against 5 strains of *Enterobacter cloacae*

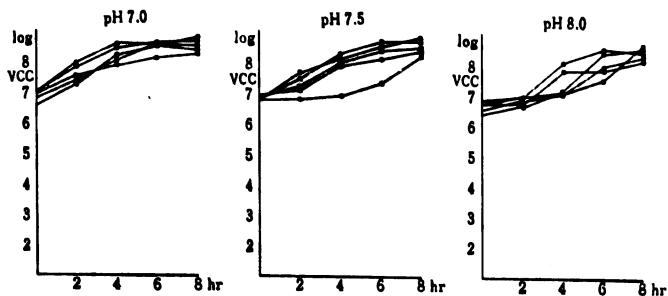


Fig. 7 Bactericidal effect of GM, CTM and their combination, and effect of GM and CTM using checker board titration method on *E. coli*

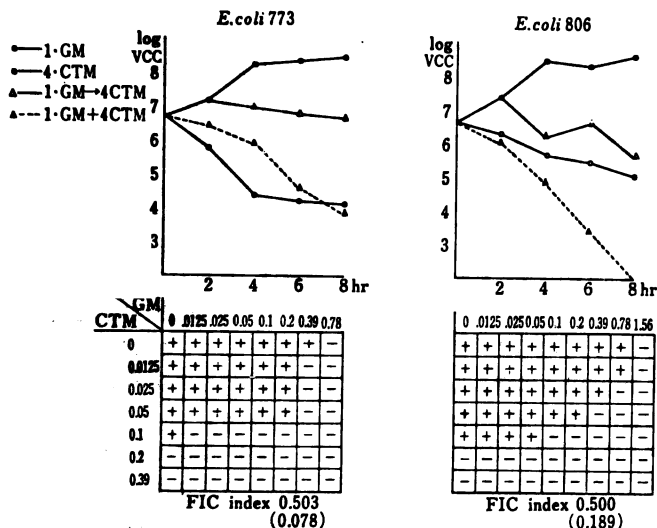
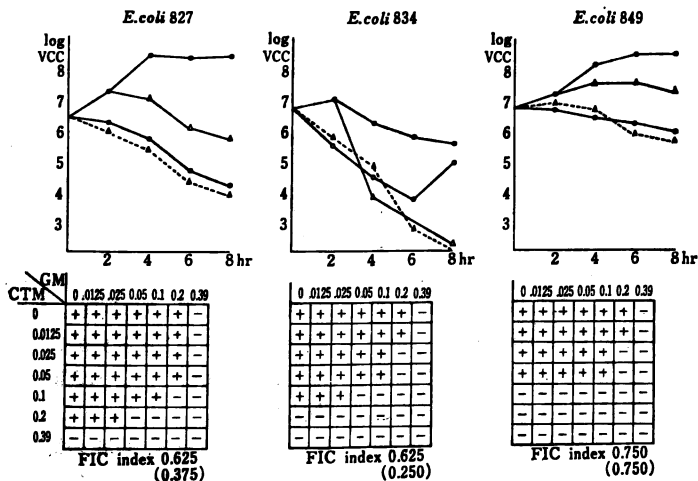


Fig. 8 Bactericidal effect of GM, CTM and their combination, and effect of GM and CTM using checker board titration method on *E. coli*



1株に静菌の効果を認め、1株ではいったん急速に殺菌されても再び増殖を示した。*Enterobacter cloacae* 5株では Fig. 6 に示したように pH に関係なくすべて増殖した。

菌による薬剤の不活化：培養の経過を追って培地中の GM の力価を測定した結果は Fig. 3 下段に示した。pH 6.0, 7.0, 7.5 の培地に *Escherichia coli* を接種した場合の生菌数の変動は Fig. 3 上段に示したとおりであるが、その時培地中に残存する GM の力価は pH 7.0, 7.5 ではほとんど減少しておらず、菌が増殖する pH 6.0 でもわずかに低下するものを認めるだけであった。

併用効果：寒天平板で GM と CTM を *Escherichia coli* 5株に対して併用すると、Fig. 7, 8 下段のようにすべて協力作用を認めた。協力作用の強弱を株別に FIC index で求めると、No. 773 : 0.503 (0.078), No. 806 : 0.500 (0.189), No. 827 : 0.625 (0.375), No. 834 : 0.625 (0.250), No. 849 : 0.750 (0.750) であった。() 内の値は対応する併用薬剤が 1/2 MIC のときに示した MIC 値から求めたもので下記の式で算出した。

$$\text{FIC}_{(1/2)\text{index}} = \frac{\text{CTM } 1/2 \text{ MIC 下の GM の MIC}}{\text{GM 単独の MIC}} + \frac{\text{GM } 1/2 \text{ MIC 下の CTM の MIC}}{\text{CTM 単独の MIC}}$$

* FIC index の優れた2株について HIB 中における殺菌効果をみると、Fig. 7 上段のように No. 806 に対しては両薬剤の併用によって殺菌効果の著明な増強がみられた。しかし No. 773 に対しては CTM 単独による殺菌効果がむしろ抑制されたような結果であった。FIC index で劣っていた3株では (Fig. 8 上段) 同様に併用しても CTM 単独時とほとんど同じ殺菌パターンを示した。

考 案

ゲンタマイシン (GM) が臨床に使用されるようになって以来、その抗菌力に関する研究は数多く報告されており、pH が GM の抗菌力に及ぼす影響については当学会誌 15 巻 4 号において論じられている。五島、桑原⁹⁾は *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* について pH 6.0 から 7.5 の間で著しい抗菌力の差を指摘したが、一方、中沢ら⁴⁾は *Pseudomonas aeruginosa* について pH 6.0, 7.0, 8.0 の場合、抗菌力にほとんど影響しないとしている。本研究では pH 6.4, 7.1, 7.6, 8.0, 8.4 で種種の菌株について MIC を測定し、*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus morganii* に対しては培地の pH がアルカリに傾くほど抗菌力が強まる傾向にあり、*Pseudomonas aeruginosa* の場合は pH 8.4 で抗菌力が低下する例が多かった。今

回の結果は *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* については五島、桑原⁹⁾の成績と同様の傾向にあり、*Pseudomonas aeruginosa* に関しては中沢ら⁴⁾の結果と一致しているので菌種間で差があるものと思われた。我々は寒天平板と同様、液体培地中での殺菌効果に対しても pH は著しい影響を与えることも確認した。その中には pH 7.0 では 4 MIC 濃度で殺菌される菌も pH 6.0 の条件下ではすべて増殖するという現象がみられた。薬剤耐性のメカニズムを考えると①不活化酵素の産生¹⁰⁾、②1次作用点の変化¹¹⁾、③細胞膜の透過能の変化などがあげられる。今回の結果のように低 pH 条件下で抗菌力が低下する現象は、そのような条件下で不活化酵素が産生されるために起きるという可能性は少ないと思われる。それは低 pH 条件下で HIB 中に著明な GM 残存力価の減少を認めなかったうえ、無作為に選んだ *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* に同様の傾向がみられたからである。このような現象は臨床における GM の使用に関して重要な問題を与えるものと考えられる。例えば尿の pH は 6.0 前後のものが多く、尿路感染症に対する GM の使用が尿の pH によって無効に終るとい可能性も示唆される。臨床分離菌の薬剤感受性試験は一般に pH 7.2 前後の寒天平板上で行なわれるが、GM の感受性菌が検出され、また尿や喀痰中の GM 濃度が充分上昇しているにもかかわらず、臨床効果が認められない場合は先ず病巣の pH という点を念頭におくべきであろう。

薬剤の併用により抗菌力の増強を期待したい場合、GM は主として β -lactam 系抗生剤と併用されることが多い。*Pseudomonas aeruginosa* に対する GM と SBPC 併用の場合、NAKAZAWA ら⁸⁾は、同時投与または SBPC を先行して与えることに利点をみだし、GM の投与を先行させることは無意味もしくは逆効果と述べている。さらに PAUL and PATTISON⁹⁾ および川島¹⁰⁾は GM と CBPC の混合によって GM が不活化される結果を報告している。Aminoglycoside 系抗生剤と Cephalosporin 剤といった実験報告も多くみられるが、高橋、小林¹¹⁾または RAHAL¹²⁾の報告のように、いちおうの協力効果を認めるものが多い。しかし本研究での組み合わせ、GM+CTM では GM の併用により CTM の殺菌効果が抑制されるような結果もしばしば認められた。また併用効果の判定に際し寒天平板上での checker board 法と液体培地中での殺菌効果がかならずしも一致しない結果を得たが、横田ら¹³⁾も FIC index と殺菌効果の解離と指摘している。

今回の研究から、GM の抗菌力は pH 7.0 前後のところで微妙な変動をみせ、殺菌態度においても菌種によ

てそのパターンが異なり、さらにそのパターンは pH の影響を同時に受けるので、抗菌力の表現は極めて複雑であると考えた。従って GM の臨床使用に際しては、これらも充分理解した上で当を得た使用を症例毎に考えなければならないであろう。

文 献

- 1) 岩永正明, 鈴木 滋, 田中 寛, 小張一峰: ゲンタマイシンに関する研究. *Chemotherapy* 26(1): 30~33, 1978
- 2) PAULA F. DOUGHERTY; DAVID W. YOTTER & THOMAS R. MATTHEWS: Microdilution transfer plate technique for determining *in vitro* synergy of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 11(2): 225~228, 1977
- 3) 五島善智子, 桑原章吾: Gentamicin の抗菌作用. *Chemotherapy* 15(4): 462~466, 1967
- 4) 中沢昭三, 横田芳武, 金森政人, 吉田進彦, 石田邦子: 新抗生物質 Gentamicin に関する細菌学的研究. *Chemotherapy* 15(4): 477~482, 1967
- 5) UMEZAWA, HAMAO; MORIMASA YAGISAWA, YUJI MATSUHASHI, HIROSHI NAGASAWA, HARUO YAMAMOTO, SHINICHI KONDO & TOMIO TAKEUCHI: Gentamicin acetyltransferase in *Escherichia coli* carrying R factor. *J. Antibiotics* 26 (10): 612~614, 1973
- 6) MITSUHASHI, SUSUMU; FUJIO KOBAYASHI & MASAHITO YAMAGUCHI: Enzymatic inactiva-

- tion of gentamicin C components by cell-free extract from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiotics* 24(6): 400~401, 1971
- 7) TANAKA, NOBUO; Biochemical studies on gentamicin resistance. *J. Antibiotics* 23(9): 469~471, 1970
 - 8) NAKAZAWA, SHOZO; TAKESHI NISHINO, MASAKO OTSUKI, MASAFUMI NAKAO & TOMO NOMURA: Bacteriological studies on the combined action of aminoglycoside antibiotics and synthetic penicillins against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiotics* 27(12): 989~991, 1974
 - 9) NOONE, PAUL & J. R. PATTISON: Therapeutic implications of interaction of gentamicin and penicillins. *Lancet* Sept. 11: 575~578, 1971
 - 10) 川島士郎: Penicillin 系抗生剤と Aminoglycoside 系抗生剤の相互作用に関する研究. I. *Chemotherapy* 23(12): 3767~3774, 1975
 - 11) 高橋公毅, 小林章男: 緑膿菌, クレブシエラ, セラチアに対する抗生剤の併用効果. *Chemotherapy* 27(6): 848~855, 1979
 - 12) JAMES, J. RAHAL Jr.: Antibiotic combinations the clinical relevance of synergy and antagonism. *Medicine* 57 (2): 179~195, 1976
 - 13) 横田好子, 村川武雄, 西田 実: Cefazolin と Gentamicin の併用に関する基礎評価. *Chemotherapy* 27(4): 696~703, 1979

STUDIES ON ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF GENTAMICIN

KENJI MORI and MASAOKI IWANAGA

Department of Bacteriology, Institute for Tropical Medicine,
Nagasaki University, Nagasaki, Japan

Gentamicin (GM) was examined in the following points of view. 1) Antibacterial pattern against gram-negative rods (GNR). 2) Influence of pH to the antibacterial activity. 3) Effect of combination with Cefotiam (CTM).

Antibacterial pattern was examined in the broth culture which contained $4 \times \text{MIC}$ of GM. The initial number of the organisms was $10^6 \sim 10^7/\text{ml}$. *Enterobacter cloacae* was rapidly killed, while *Escherichia coli* was not killed through the viable cell count increased. The growth curves or the killing curves of the other GNRs were variable between those of the upper two organisms.

The pH of the media significantly influenced the antibacterial activity of GM. The higher pH was, the stronger activity was against *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus morgani*. However, the activity of GM against *Pseudomonas aeruginosa* was rather weakened when the pH was high.

Fractional inhibitory concentration (FIC) and bactericidal effects of GM plus CTM combination were examined against 5 strains of *Escherichia coli*. FIC index revealed 0.500, 0.503, 0.625, 0.625 and 0.750 in each strain. These results were not always coincident with the bactericidal synergisms.