

## Netilmicin の抗菌作用について

三橋 進・川辺 晴英

群馬大学医学部微生物学教室

Netilmicin の *in vitro* での抗菌力について、他のアミノ配糖体系抗生剤と比較検討した成績は、次の通りである。

Netilmicin は Gentamicin とほぼ同程度の広い抗菌スペクトルと強い殺菌作用を有し、臨床分離株の感受性試験からも、*E. coli*, *K. pneumoniae*, インドール陰性 *Proteus*, *S. aureus*, *C. freundii* では 6.3  $\mu\text{g/ml}$  以下の濃度で全株が、また *P. aeruginosa*, インドール陽性 *Proteus*, *E. cloacae* では約95%, *S. marcescens* では約80%の株が同一濃度で発育阻止されており、本剤の強い抗菌力を示す成績が得られた。

Gentamicin 耐性株に対する抗菌力については、*S. marcescens*, *E. coli*, *Proteus* では Netilmicin に感受性を示すものが多くみられたが、*P. aeruginosa* では本剤と Gentamicin は交叉耐性を示す傾向がみられた。

また、本剤の抗菌力は酸性域で弱く、接種菌量や血清添加の影響を余り受けない点についても Gentamicin と同様であった。

## はじめに

Netilmicin は米国シリング社の開発による新アミノ配糖体系抗生剤で、Sisomicin の1位のアミノ基をエチル化して得られる半合成物質である。本剤の基礎試験における特長は、腎毒性および聴器毒性が少ないことと、細菌学的には Gentamicin と同様の広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力を有し、さらにアミノ配糖体系抗生剤に耐性を示す株の内、3位のアミノ基の acetylation や 2' 位の水酸基の adenylation などの不活化酵素をもつ耐性株に対して抗菌力を有す<sup>1-7)</sup>。

今回、Netilmicin の *in vitro* での抗菌力について検討した成績を報告する。

## 実験材料および方法

## 1) 使用菌株

抗菌スペクトラムには教室保存の標準菌株を使用し、臨床分離株に対する抗菌力の比較には、ヒト病巣由来の *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, インドール陰性 *Proteus*, インドール陽性 *Proteus*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* で、群馬大学医学部耐性菌研究施設の stock culture より無作為的に選んで使用した。

## 2) 使用薬剤

Netilmicin はエッセクス日本 K.K. より提供された

粉末 (Batch No. 7733-42, 力価 611  $\mu\text{g/ml}$ ) を用いた。また対照薬剤として Gentamicin (GM), Amikacin (AMK), Dibekacin (DKB) を使用した。

## 3) 抗菌力測定

日本化学療法学会標準法に従い、寒天平板希釈法による。すなわち、被検菌のペプトン水18時間培養100倍希釈液(菌数約  $10^6$  cells/ml) 1白金耳を薬剤含有 Heart infusion (HI) 培地平板上に接種し、37°C 18時間培養後、最小発育阻止濃度 (MIC,  $\mu\text{g/ml}$ ) を判定した。なお、*P. aeruginosa* の前培養には1%  $\text{KNO}_3$  を添加し、*S. pyogenes* の培地は前培養、平板ともに Brain heart infusion (BHI) を使用した。

## 4) 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

培地 pH, 接種菌量, 血清添加による影響を、*E. coli* NIHJ-JC-2, *P. aeruginosa* NCTC 10490 および1部について *S. aureus* FDA 209 P-JC-1 を試験菌とし、MIC の変動により検討した。

## 5) 殺菌作用

*E. coli*, *P. aeruginosa* のそれぞれ20株について、Broth dilution method による Minimal bactericidal concentration (MBC) を MIC と比較した。被検菌のペプトン水18時間培養100倍希釈液1白金耳を2倍希釈系列薬剤含有0.5 ml BHI broth に接種(約  $10^4$  cells/ml) し、37°C 18時間培養後、肉眼観察で生育の認められない最小濃度を MIC とした。さらに MIC 以上の

Table 1 Antibacterial spectrum

(10<sup>6</sup> cells/ml)

Organism	MIC (μg/ml)			
	Netilmicin	GM	AMK	DKB
<i>S. aureus</i> FDA209P JC-1	0.2	0.4	0.2	0.8
<i>S. aureus</i> E46	0.2	0.2	1.6	0.8
<i>S. aureus</i> Terajima	0.1	0.1	0.4	0.2
<i>S. aureus</i> 1200A	0.1	0.1	0.2	0.4
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.2	0.2	0.8	0.4
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	0.4	0.4	1.6	3.1
<i>S. typhimurium</i> IID 971	0.4	0.2	0.4	0.4
<i>S. thphi</i> 901	0.2	0.2	1.6	0.8
<i>S. paratyphi</i> 1051	0.1	0.2	0.4	0.4
<i>S. schottmuellei</i> 8006	0.2	0.2	0.4	0.8
<i>S. enteritidis</i> G14	1.6	0.8	3.1	1.6
<i>S. marcescens</i> IAM 1184	6.3	0.8	3.1	6.3
<i>S. marcescens</i> IID 620	0.2	0.1	0.8	0.4
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	3.1	0.8	3.1	6.3
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 1049	3.1	3.1	6.3	3.1
<i>P. mirabilis</i> IFO 3849	6.3	3.1	6.3	1.6
<i>P. morgani</i> IFO 3848	0.8	0.2	0.4	0.4
<i>P. vulgaris</i> OX-19	0.8	0.8	3.1	3.1
<i>P. vulgaris</i> HX-19	0.2	0.4	0.8	0.8
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	0.8	0.2	0.8	0.4
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0.8	0.8	3.1	1.6
<i>E. cloacae</i> 963	1.6	0.8	3.1	1.6

高濃度の broth 各 0.01 ml を HI 平板に塗布し、37°C 18時間培養後、平板上で生育のまったく認められない薬剤最小濃度を MBC とした。

殺菌曲線は、*E. coli* NIHJ-JC-2 および *P. aeruginosa* GN 5049 を用いて、BHI broth にて 37°C 振盪培養を行ない、経時的な生菌数測定により調べた。

### 実験成績

#### 1) 抗菌スペクトラム

グラム陽性・陰性の各種標準株 22 株についての MIC を GM, AMK, DKB と比較し、Table 1 に示した。Netilmicin は GM とほぼ同様の広い抗菌スペクトラムを有し、その抗菌力は *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *Proteus* の 1 部について MIC が GM よりもやや高い値を示した以外は、GM とほぼ同等で、全体的には AMK, DKB よりも強い抗菌力を示した。

#### 2) 臨床分離株に示する感受性分布

臨床由来の *S. aureus* 100 株、*S. pyogenes* 50 株、*E. coli* 200 株、*K. pneumoniae* 100 株、インドール陰

性 *Proteus* 100 株、インドール陽性 *Proteus* 200 株、*E. cloacae* 100 株、*C. freundii* 100 株、*P. aeruginosa* 200 株、*S. marcescens* 100 株の計 1,250 株について、Netilmicin, GM, AMK の MIC を比較し、Fig. 1~10 に示した。

Fig. 1 Antibacterial activity of Netilmicin against *S. aureus*

(100 strains, 10<sup>6</sup> cells/ml)

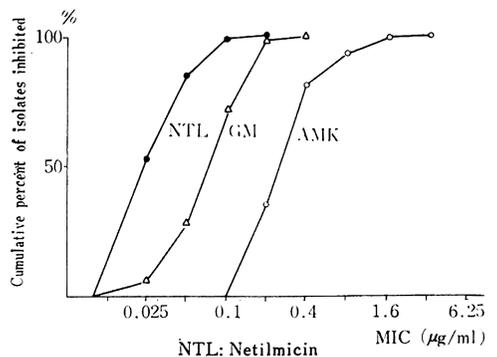


Fig. 2 Antibacterial activity of Netilmicin against *S. pyogenes*

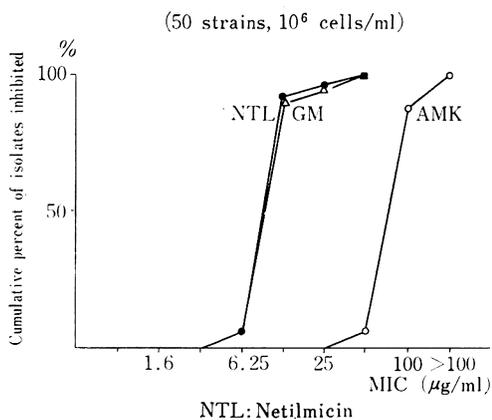


Fig. 3 Antibacterial activity of Netilmicin against *E. coli*

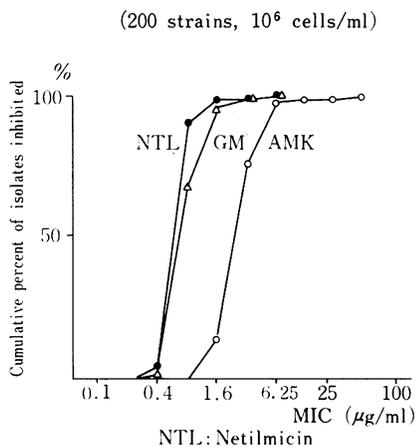


Fig. 4 Antibacterial activity of Netilmicin against *K. pneumoniae*

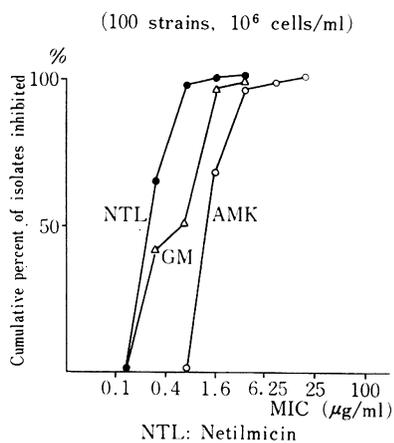


Fig. 5 Antibacterial activity of Netilmicin against indole negative *Proteus* sp.

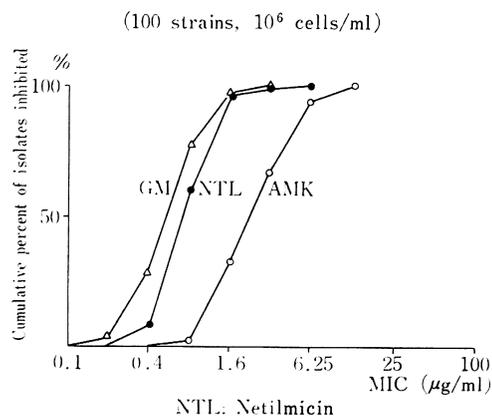


Fig. 6 Antibacterial activity of Netilmicin against indole positive *Proteus* sp.

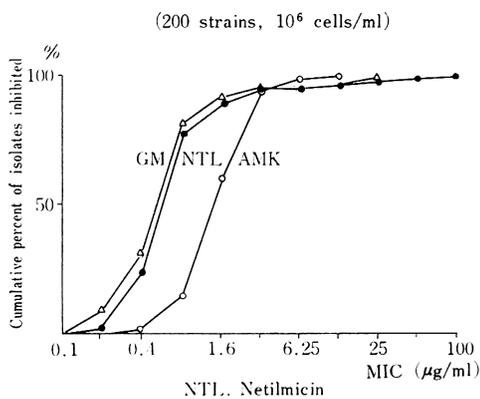


Fig. 7 Antibacterial activity of Netilmicin against *E. cloacae*

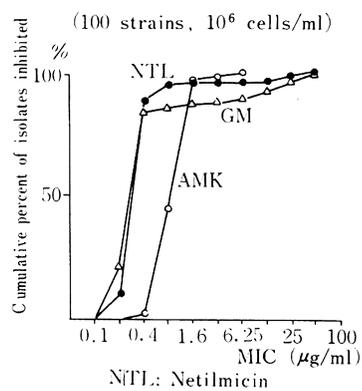


Fig. 8 Antibacterial activity of Netilmicin against *C. freundii* (100 strains, 10<sup>6</sup> cells/ml)

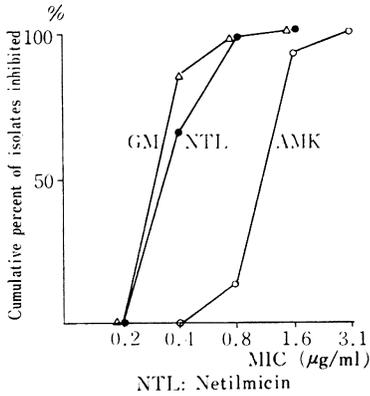


Fig. 9 Antibacterial activity of Netilmicin against *P. aeruginosa* (200 strains, 10<sup>8</sup> cells/ml)

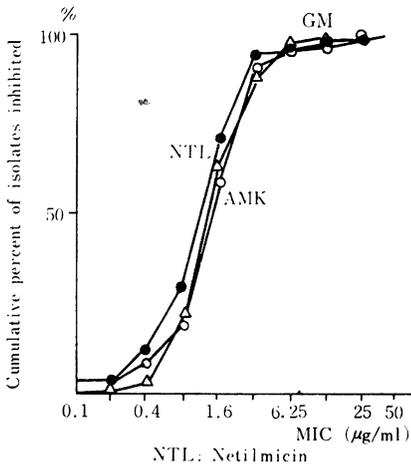


Fig. 10 Antibacterial activity of Netilmicin against *S. marcescens* (100 strains, 10<sup>6</sup> cells/ml)

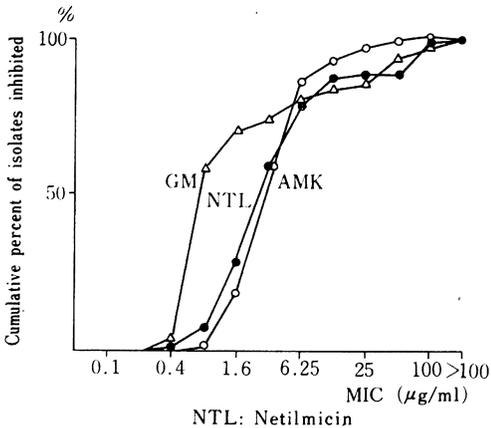


Fig. 11 Antibacterial activity of Netilmicin against GM-resistant *S. marcescens* (52 strains, 10<sup>6</sup> cells/ml)

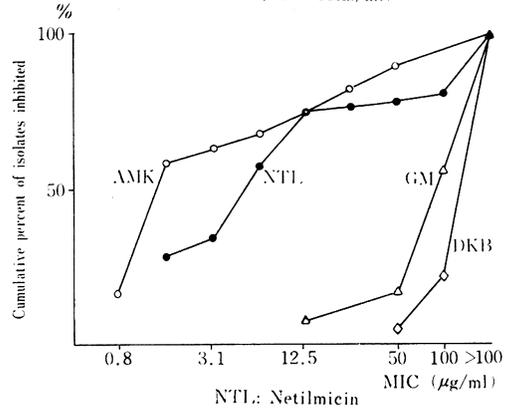


Fig. 12 Comparison of the antibacterial activities of Netilmicin and GM against GM-resistant *S. marcescens* (resistant: MIC ≥ 12.5 µg/ml) (52 strains, 10<sup>6</sup> cells/ml)

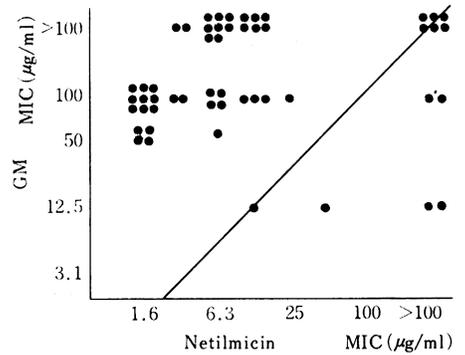


Fig. 13 Comparison of the antibacterial activities of Netilmicin and AMK against GM-resistant *S. marcescens* (resistant: MIC ≥ 12.5 µg/ml) (52 strains, 10<sup>6</sup> cells/ml)

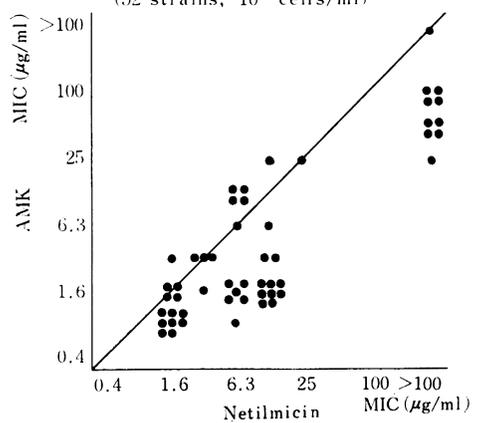


Fig. 14 Comparison of the antibacterial activities of Netilmicin and DKB against GM-resistant *S. marcescens*

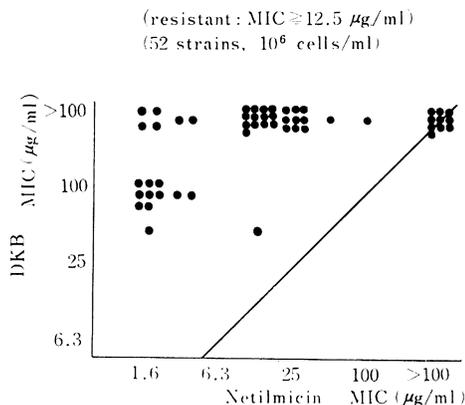
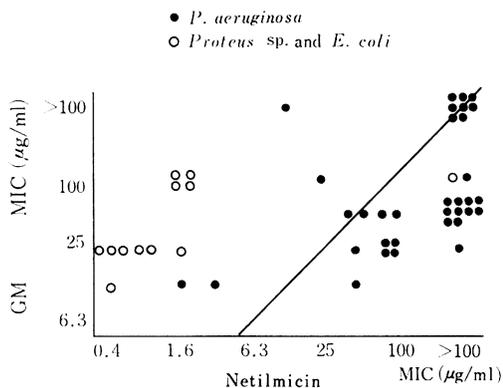


Fig. 15 Comparison of the antibacterial activities of Netilmicin and GM against GM-resistant *P. aeruginosa*, *Proteus* sp. and *E. coli*

(resistant: MIC  $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$ )  
(*P. aeruginosa* 34 strains,  $10^6$  cells/ml)  
(*Proteus* sp. and *E. coli* 12 strains,  $10^6$  cells/ml)



*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, インドール陰性 *Proteus*, *C. freundii* については Netilmicin は強い抗菌力を示し、感受性分布のピークはそれぞれ 0.025, 0.8, 0.4, 0.8~1.6, 0.4  $\mu\text{g/ml}$  で、すべての株がそれぞれ 0.2, 6.3, 3.1, 6.3, 1.6  $\mu\text{g/ml}$  以下の濃度で発育阻止された。インドール陽性 *Proteus*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* でも、6.3  $\mu\text{g/ml}$  以下の濃度でそれぞれ95, 95, 97, 79%の株が発育阻止されており、またそれぞれの感受性分布のピークは 0.8, 0.4, 1.6, 1.6~6.3  $\mu\text{g/ml}$  であった。*S. pyogenes* ではピークが 12.5  $\mu\text{g/ml}$  で、これ以下の濃度で92%の株の発育が阻止された。

Fig. 16 Comparison of the antibacterial activities of Netilmicin and AMK against GM-resistant *P. aeruginosa*, *Proteus* sp. and *E. coli*

(resistant: MIC  $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$ )  
(*P. aeruginosa* 34 strains,  $10^6$  cells/ml)  
(*Proteus* sp. and *E. coli* 12 strains,  $10^6$  cells/ml)

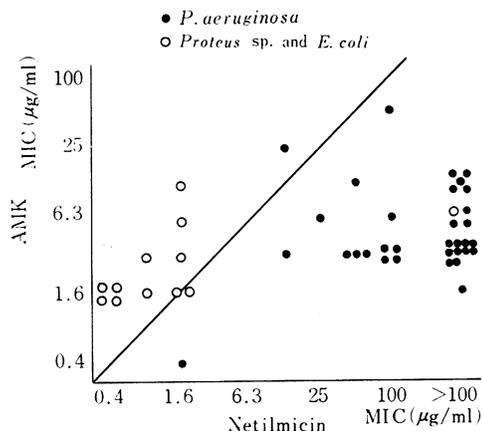
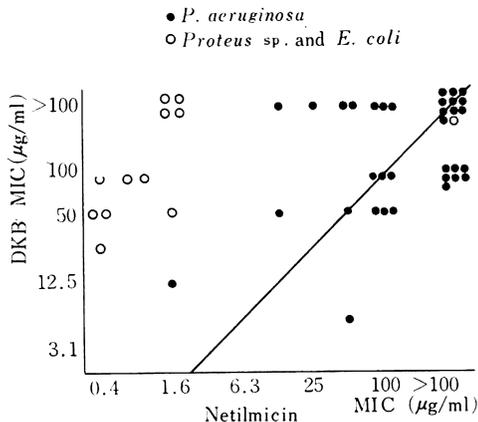


Fig. 17 Comparison of the antibacterial activities of Netilmicin and DKB against GM-resistant *P. aeruginosa*, *Proteus* sp. and *E. coli*

(resistant: MIC  $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$ )  
(*P. aeruginosa* 34 strains,  $10^6$  cells/ml)  
(*Proteus* sp. and *E. coli* 12 strains,  $10^6$  cells/ml)



これらの成績を GM, AMK と比較すると、*S. aureus*, *K. pneumoniae* では GM, AMK よりも優れた抗菌力を示しており、*P. aeruginosa* では3剤がほぼ同等、*S. marcescens* では GM が優れていた。その他の菌種では Netilmicin の抗菌力は GM とほぼ同等で、AMK よりも1~2管程度優れていたが、*E. cloacae*, *S. marcescens* での耐性株の頻度については AMK がより少なかった。

次に群馬大学医学部耐性研究施設保存の *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *Proteus sp.*, *E. coli* の GM 耐性株 ( $MIC \geq 12.5 \mu\text{g/ml}$ ) に対する Netilmicin の感受性について、AMK, DKB と比較した成績を Fig. 11~17 に示した。

GM 耐性の *S. marcescens* 52 株については、Netilmicin と AMK では約60%の株が感受性を示したが、DKB ではすべての株が耐性で、96%の株の MIC が  $100 \mu\text{g/ml}$  以上であった。GM 耐性の *P. aeruginosa* 34株については、Netilmicin 感受性は2株 (5.8%) で

あり、DKB でも1株 (2.9%) のみであったが、AMK では25株 (73.5%) が感受性を示した。GM 耐性の *Proteus*, *E. coli* 群12株については、Netilmicin, AMK に対して耐性を示したのはそれぞれ1株 (8.3%) のみであったが、DKB では全株が耐性であった。

### 3) 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地 pH, 接種菌量, 血清添加の影響について、GM と比較した成績を Fig. 18~20 に示した。

培地 pH の影響については、*E. coli* NIHJ-JC-2,

Fig. 18 Effect of medium pH on antibacterial activity of Netilmicin and GM

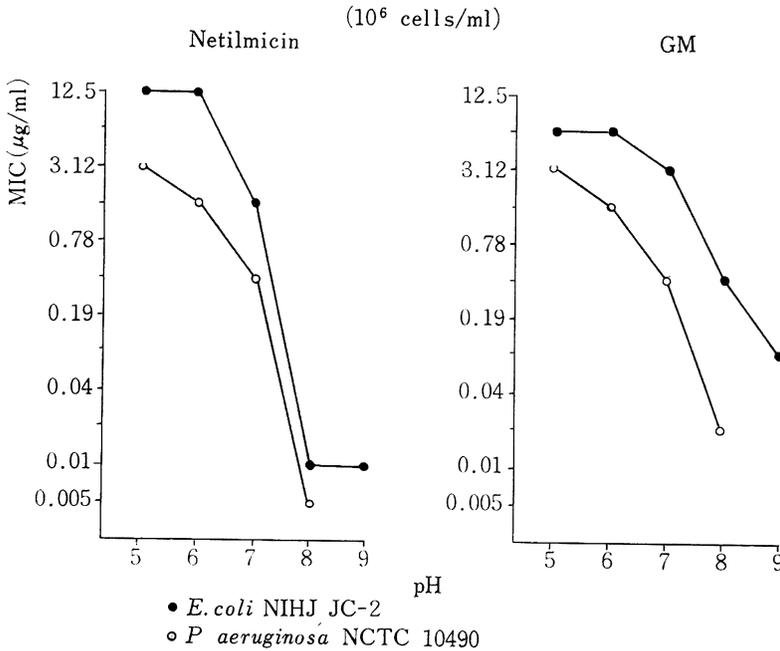


Fig. 19 Effect of inoculum size on antibacterial activity of Netilmicin and GM

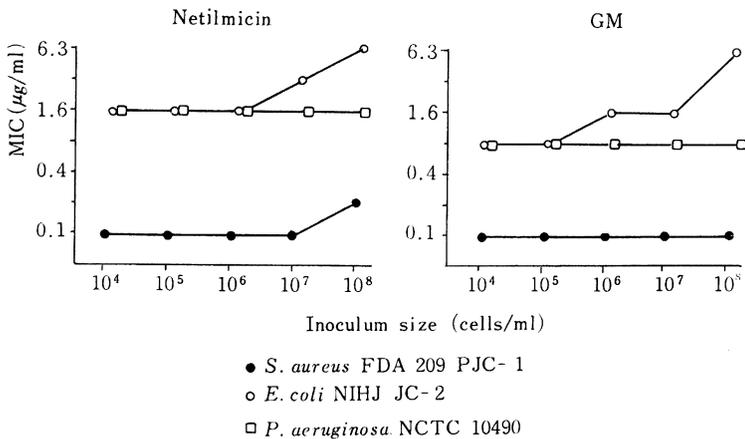
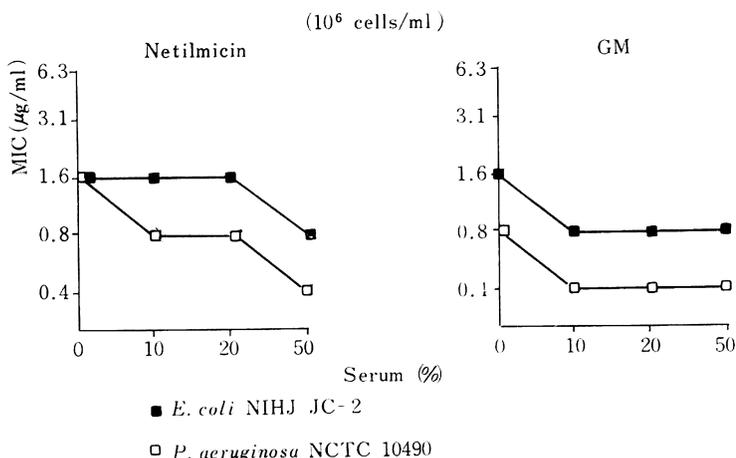


Fig. 20 Effect of serum on antibacterial activity of Netilmicin and GM



*P. aeruginosa* NCTC 10490 とともに、Netilmicin の抗菌力は酸性側で弱く、アルカリ側になるほど強くなる傾向がみられ、GM でも同様の成績が得られた。接種菌量の影響については、*P. aeruginosa* NCTC 10490, *S. aureus* FDA 209 P-JC-1 の場合にはほとんど影響がみられなかったが、*E. coli* NIHJ-JC-2 では  $10^8$  cells/ml における MIC は  $10^6$  cells/ml の場合の 4 倍であった。この傾向は GM においても同様にみとめられた。血清添加の影響については、*E. coli* NIHJ-JC-2, *P. aeruginosa* 10490 のいずれにおいてもあまり影響は

みられず、GM でも同様であった。

#### 4) 殺菌作用

*E. coli* NIHJ-JC-2 および *P. aeruginosa* GN 5046 を試験菌とする生菌数の経時変化により、Netilmicin の殺菌作用を GM と比較検討した成績を Fig. 21, 22 に示した。

両株ともに MIC の 2 倍以上の濃度を添加することにより、添加直後から急速な生菌数の減少がみられ、著明な殺菌作用がみとめられた。GM でも同様の成績を示したが、Netilmicin では両株ともに 8 時間以内での再

Fig. 21 Bactericidal activity of Netilmicin and GM against *E. coli* NIHJ JC-2

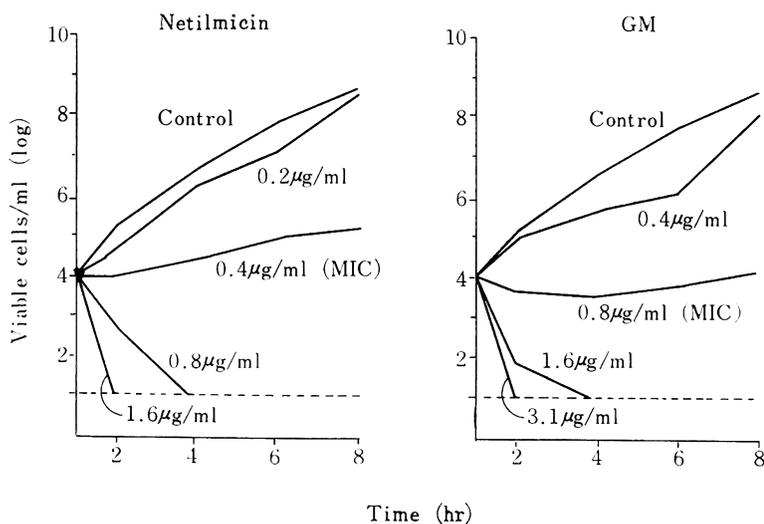


Fig. 22 Bactericidal activity of Netilmicin and GM against *P. aeruginosa* GN5046

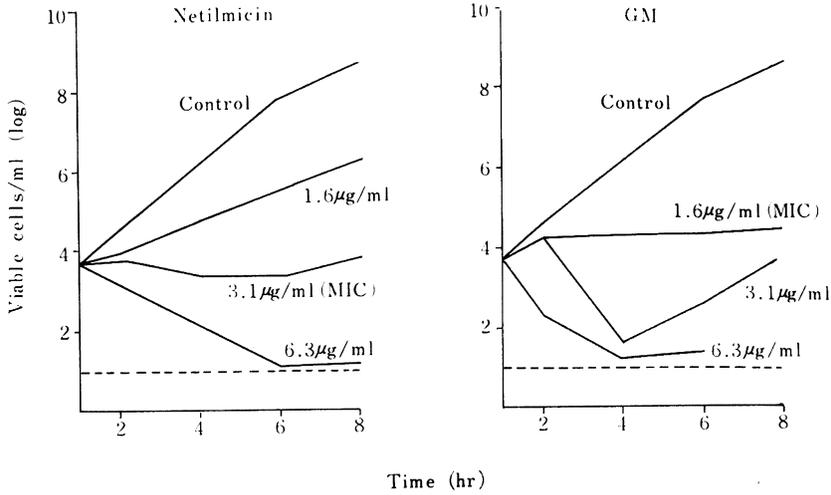


Fig. 23 Comparison of MIC and MBC of Netilmicin against *E. coli* (20 strains,  $10^6$  cells/ml)

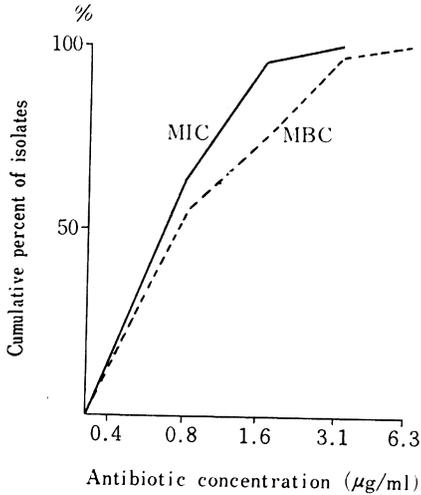
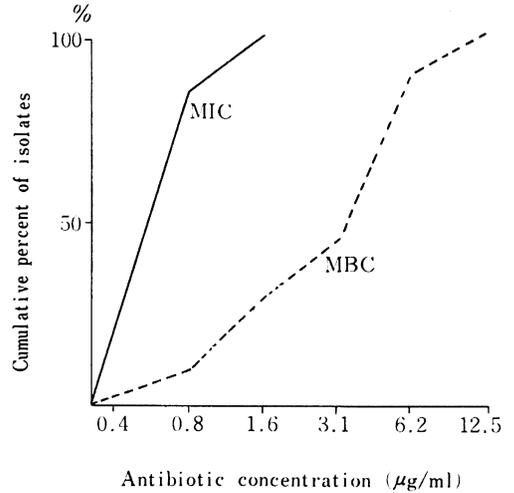


Fig. 24 Comparison of MIC and MBC of Netilmicin against *P. aeruginosa* (20 strains,  $10^6$  cells/ml)



増殖はみられなかったのに対し、GM では *P. aeruginosa* GN 5046 に 4 時間目以降にわずかながら再増殖がみられた。

次に、臨床分離の *E. coli*、*P. aeruginosa* 各 20 株についての、Netilmicin の MIC と MBC を比較した成績を Fig. 23, 24 に示した。*E. coli* では MIC と MBC は近似していたが、*P. aeruginosa* では著明な差がみとめられた。

#### 考 察

Netilmicin は Sisomicin の 1 位の アミノ基をエチル化したものであり、Sisomicin の化学構造は GM Cla に近似している。このことより本剤は、基本的には GM と同様の細菌学的な特長を有するものと考えられ、さらに 1 位の アミノ基がエチル化されていることにより、化学構造上近接している 3 位の アミノ基および 2' 位の水酸基に対する不活化を受けにくく、他のアミノ配糖体系抗生剤耐性株の内、本剤に感受性を示すものがあるとい

う特長を有するものとされている<sup>1-7)</sup>。

今回の *in vitro* での抗菌力試験からも, Netilmicin は各種グラム陰性菌および *S. aureus* に対して, 広い抗菌スペクトラムと強い殺菌作用を有し, 細菌学的にはほぼ GM と同等の成績が得られた。臨床分離株の感受性試験においては, *E. coli*, *K. pneumoniae*, インドール陰性 *Proteus*, *S. aureus*, *C. freundii* では全株の MIC が 6.3  $\mu\text{g/ml}$  以下で, さらに同一濃度で *P. aeruginosa*, インドール陽性 *Proteus*, *E. cloacae* では約95%, *S. marcescens* でも約80%の株の発育が阻止されており, グラム陰性菌における感受性分布のピークは 0.4~6.3  $\mu\text{g/ml}$  であった。この成績は AMK よりも1~2管程度優れ, GM にほぼ匹敵するものであり, 本剤の抗菌力の強さは *E. coli*, *P. aeruginosa* を用いた殺菌作用の検討からも裏付けられている。

GM 耐性株に対する抗菌力の検討からは, *S. marcescens*, *Proteus*, *E. coli* では Netilmicin に感受性を示す株が多くみられたが, 今回用いた *P. aeruginosa* 52株の範囲では本剤は GM と交叉耐性を示した。一方, AMK ではいずれの菌種においても感受性を示すものが多く, また DKB ではほぼ全部の株が GM と交叉耐性を示した。

各種アミノ配糖体系抗生剤の耐性株についての不活化酵素型による分類からは, 3位のアミノ基の acetylation, 2'位の水酸基の adenylation により不活化する酵素を有する耐性株が欧米で多く見出されており, この点において Netilmicin の評価が高い<sup>1-7)</sup>。

一方我国においては, 2'位や 6'位のアミノ基の acetylation による不活化酵素を有する耐性株も多く見出されており, これらについては本剤は不活化を受ける。このようにアミノ配糖体系抗生剤はその化学構造と関連した耐性株の発現をみるが, この不活化酵素型別の耐性株の頻度については, 全国規模での調査研究によらねばならず, この分野での今後の研究報告が待たれるところである<sup>8)</sup>。

## 文 献

- 1) MILLER, G.H.; G. ARCIERI, M.J. WEINSTEIN & J. A. WAITZ: Biological activity of Netilmicin, a broad-spectrum semisynthetic aminoglycoside antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10: 827~836, 1976
- 2) KABINS, S. A.; C. NATHAN & S. COHEN: *In vitro* comparison of Netilmicin, a semisynthetic derivative of Sisomicin, and four other aminoglycoside antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10: 139~145, 1976
- 3) FU, K.P. & H.C. NEU: *In vitro* study of Netilmicin compared with other aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10: 526~534, 1976
- 4) PHILLIPS, I.; A. SMITH & K. SHANNON: Antibacterial activity of Netilmicin, a new aminoglycoside antibiotic, compared with that of Gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11: 402~406, 1977
- 5) SOUSSY, C.J. & J. DUVAL: Activité antibactérienne comparée de sept aminosides. *Med. Mal. Infect.* 6: 211~218, 1976
- 6) DEVAUD, M.; F. H. KAYSER & U. HUBER: Resistance of bacteria to the newer aminoglycoside antibiotics: an epidemiological and enzymatic study. *The Journal of Antibiotics* 30: 655~664, 1977
- 7) SCOTT, D.F.; D.O. WOOD, G.H. BROWNELL, M.J. CARTER & G.K. BEST: Aminoglycoside modification by Gentamicin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 13: 641~644, 1978
- 8) 三橋 進, 伊予部志津子: アミノ配糖体の耐性機構。臨床と細菌 6: 325~331, 1979

## IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NETILMICIN

SUSUMU MITSUHASHI and HARUHIDE KAWABE

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University

The following are results obtained with *in vitro* antibacterial activity of Netilmicin, compared with other aminoglycoside antibiotics.

Netilmicin showed a broad spectrum of activity with a potent bactericidal action nearly identical to that of Gentamicin. In susceptibility testing of clinical isolates, Netilmicin inhibited all strains of *E. coli*, *K. pneumoniae*, indole-negative *Proteus*, *S. aureus*, and *C. freundii*, about 95% of *P. aeruginosa*, indole-positive *Proteus*, and *E. cloacae*, and about 80% of *S. marcescens* at a concentration of 6.3  $\mu\text{g/ml}$  or less.

Many Gentamicin-resistant strains of *S. marcescens*, *E. coli*, and *Proteus* were sensitive to Netilmicin, while there was a tendency of cross-resistance between the drug and Gentamicin in *P. aeruginosa*.

As with Gentamicin, the activity of Netilmicin was weaker at acidic pH, and was not much influenced by inoculum size or addition of serum to the medium.