

ペニシリンーゼ産生淋菌の各種の抗菌剤に対する感受性

金子康子・池田文昭・西田 実・五島瑳智子

東邦大学医学部微生物学教室

山井志朗・小原 寧

神奈川県衛生研究所細菌病理科

(昭和59年9月21日受付)

わが国の各臨床施設において、主として1981年から1983年までに分離され、神奈川県衛生研究所で保存された penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) 116株の38種の抗菌剤に対する感受性を検討した。

被検薬剤のうち、第3世代の cephem 剤, cefoperazone, cefotaxime, ceftazidime および FK 027 (新経口剤), 新しい合成抗菌剤, norfloxacin, ofloxacin, enoxacin などは PPNG に極めて優れた抗菌活性を示し、これらの薬剤に耐性の菌株は全く認められなかった。また PPNG は例外なく amoxicillin に耐性であったが、この薬剤の活性は clavulanic acid の存在によって著しく増強された。その他に PPNG に有効な薬剤として piperacillin および erythromycin, 次いで minocycline, doxycycline, clindamycin などがあげられる。

他方, methicillin, oxacillin および dicloxacillin は PPNG の産生する β -lactamase に非常に安定であったが、酵素に対する安定性は抗菌活性に反映しなかった。

従来、ペニシリン系薬剤は淋菌に極めて強い抗菌力を持ち、第一選択剤として効果的な治療が行われてきた。しかし、1976年 PHILLIPS¹⁾, ASHFOLDら²⁾は、PCG に高度耐性の β -lactamase を産生する淋菌 (penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*, PPNG) を臨床材料より分離し、その後、同様な淋菌が諸外国で分離されるようになった。

わが国においても、近年 PPNG の臨床材料よりの検出率が著しく増加し、薬剤耐性の機構の解明および疫学的研究が展開されてきた。われわれは神奈川県衛生研究所を通じて入手した PPNG の38薬剤に対する感受性を検討したので報告する。

I. 実験材料と方法

1. 試験菌株

わが国の各臨床施設において分離され、神奈川県衛生研究所に1983年までに集められ、保存された淋菌のうち、 β -lactamase を産生する株を chromogenic cephalosporin method³⁾ により PPNG と選択した。これらの菌株はセラテンディスク⁴⁾ で -80°C 実験当日まで保存した。

2. 感受性測定法

1) 菌液の調製: GC 培地 (Difco) に菌を塗抹し、 55°C , 24 時間ローソク培養後、発育した集落をかきと

り、Mueller Hinton broth 中で最終的に 10^6cfu/ml となるように菌液を調製し、これを接種菌液とした。

2) 試験培地の調製: MIC の測定は CDC の方法に準じて行なった。まず試験培地として、9% の proteose No.3 agar (Difco) と 2% の hemoglobin (Difco) 液をそれぞれ高圧滅菌し、 50°C に保温する。次に 0.001% cocarboxylase, 20% glucose および 0.5% glutamine よりなる supplement 混合液を 2% hemoglobin 液に 2% の割合に添加した。この液と proteose No.3 agar の等量を混合し、試験培地とした。agar dilution method により、 35°C で約 20 時間、ローソク培養して MIC を判定した。

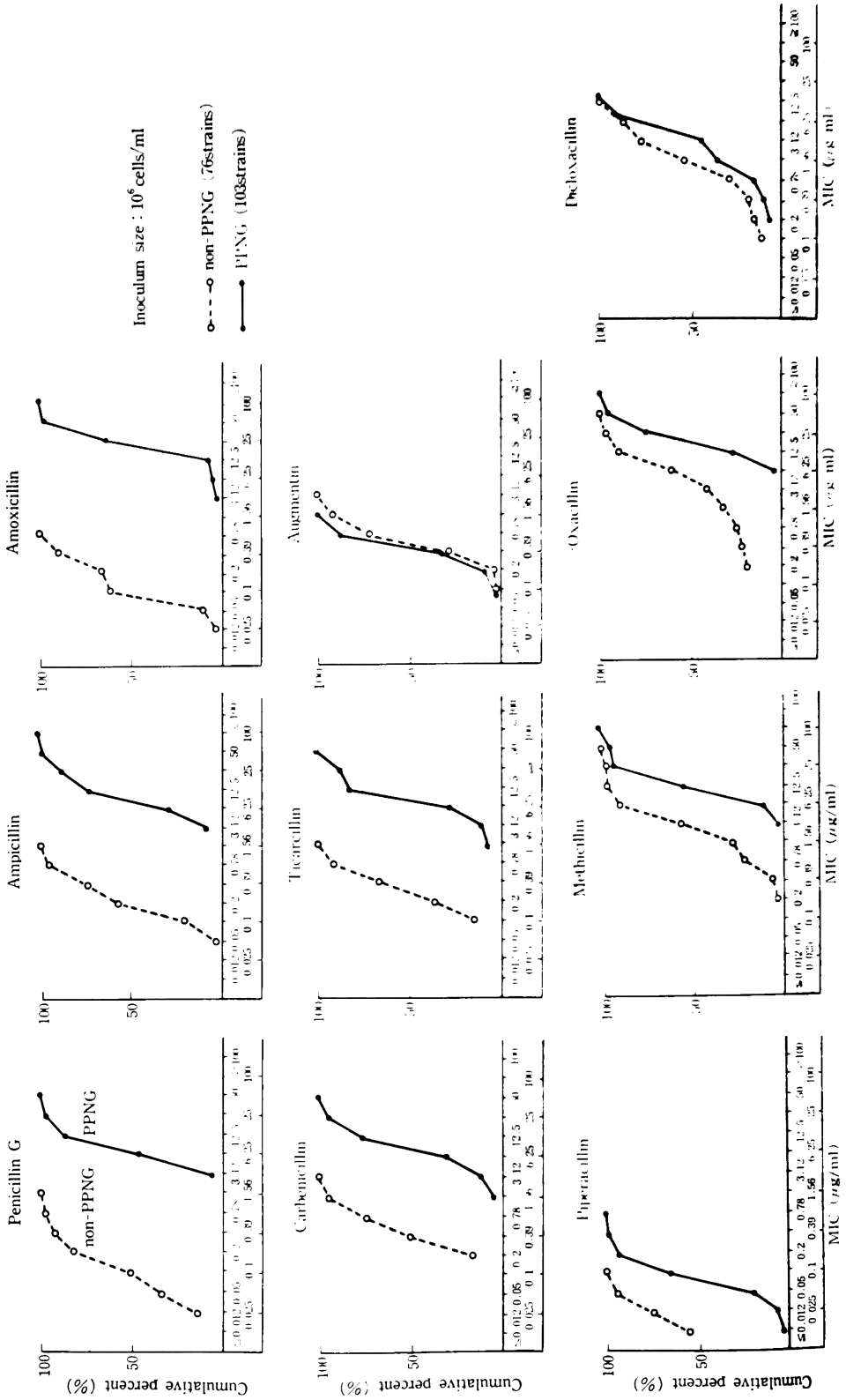
3) β -lactamase 活性の測定: ABPC を $1\mu\text{g/ml}$ 含有した GC 培地で培養した PPNG の菌体を超音波で破砕し、その上清を粗酵素液として用いた。各 β -lactam 剤の安定性は spectrophotometric method で測定した。同一の条件で PCG の加水分解初速度を 100 とした際の各薬剤の相対分解率によって安定性を示した。

3. 使用薬剤

1) Penicillins

Penicillin G (PCG 明治製菓)
ampicillin (ABPC 明治製菓)
amoxicillin (AMPC 藤沢薬品)

Fig. 1 Comparative susceptibility of PPNG and non-PPNG strains to penicillins



carbenicillin (CBPC 藤沢薬品)
 ticarcillin (TIPC 藤沢薬品)
 methicillin (DMPPC 萬有製薬)
 oxacillin (MIPIC 萬有製薬)
 dicloxacillin (MDIPC 萬有製薬)
 piperacillin (PIPC 富山化学工業)
 amoxicillin (BRL 25000 ビーチャム)
 clavulanic acid (augmentin)

2) Cephems

cephaloridine (CER 塩野義製薬)
 cefazolin (CEZ 藤沢薬品)
 cephalixin (CEX 萬有製薬)
 cefoxitin (CFX 第一製薬)
 cefmetazole (CMZ 三共)
 cefoperazone (CPZ 富山化学工業)
 cefotaxime (CTX ヘキスト)
 ceftazidime (CAZ 新日本実業)
 FK 027 (未定 藤沢薬品)

3) Aminoglycosides

streptomycin (SM 明治製菓)
 kanamycin (KM 明治製菓)
 gentamicin (GM 塩野義製薬)
 amikacin (AMK 萬有製薬)
 astromicin (ASTM 協和醸酵)
 spectinomycin (SPCM アップジョン)

4) Pyridone carboxylic acid

nalidixic acid (NA 第一製薬)
 pipemidic acid (PPA 大日本製薬)
 norfloxacin (NFLX 杏林製薬)
 ofloxacin (OFLX 第一製薬)
 enoxacin (ENX 大日本製薬)

5) Others

erythromycin (EM 塩野義製薬)
 josamycin (JM 山之内製薬)
 chloramphenicol (CP 三共)
 tetracycline (TC 台糖ファイザー)
 doxycycline (DOXY 台糖ファイザー)
 minocycline (MINO 日本レダリー)
 clindamycin (CLDM アップジョン)
 rifampicin (RFP 第一製薬)

II. 実験結果

1. PC系10薬剤に対するPPNGとnon-PPNGの感受性の比較

実験の項に記載した方法によって、PCGのMICが $\geq 3.12 \mu\text{g/ml}$ のPPNG 103株とMIC $\leq 1.56 \mu\text{g/ml}$ の

non-PPNG 76株のPC系10薬剤に対する感受性を比較した。

Fig. 1のようにPCG, ABPCおよびAMPCはnon-PPNGに対してはほぼ同等の抗菌力を示し、それらの薬剤の0.78~1.56 $\mu\text{g/ml}$ によって被検株のすべての増殖が阻止された。

一方、PPNGの76株はこれらの3薬剤に同程度に耐性であった。ただPCaseの阻害剤clavulanic acidの存在下でAMPC, augmentinのPPNGに対する抗菌力は著しく増強された。またaugmentinに対するPPNGとnon-PPNGの感受性には殆ど相違がみられなかったがnon-PPNGのaugmentinの感受性はAMPC単独よりも明らかに低く、100%の株のMICはAMPCでは0.78 $\mu\text{g/ml}$, augmentinでは3.12 $\mu\text{g/ml}$ であった。次にCBPC, TIPCおよびPIPCについて同様に検討したが、PC系10薬剤のうちPIPCが最も優れた抗菌活性を示し、PPNGの被検菌株のすべては0.78 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以下のPIPCによって完全に増殖が阻止された。

CBPCおよびTIPCはPPNGおよびnon-PPNGに対して、ABPCと類似した感受性パターンを示し、PIPCよりも明らかに抗菌活性は低かった。またPCaseに安定な3薬剤、DMPPC, MIPICおよびMDIPCに対するnon-PPNGおよびPPNGの感受性はいずれもPIPCおよびaugmentinよりも低く、上記の3薬剤のPCaseに対する安定性は、PPNGに対するそれらの薬剤の抗菌力に反映しなかった。

2. 各種抗菌剤に対するPPNGの感受性

1) PC系薬剤

PC系10薬剤に対するPPNG約103株の感受性は前述のとおりで、PPNG被検株に対するPIPCのMICは $\leq 0.01 \sim 0.78 \mu\text{g/ml}$ に分布し、MIC₉₀は0.2 $\mu\text{g/ml}$ と最も優れた活性を示した。これに次いでaugmentinのMIC₉₀が0.78 $\mu\text{g/ml}$ と有効であった(Table 1, 2)。

その他の8薬剤のMIC₅₀およびMIC₉₀はいずれも6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ で、これらの薬剤の*in vitro*活性からPPNGに高い有効性は期待できない。

2) Cephem系薬剤

検討に用いたcephem 9薬剤のうち、第3世代に属する4薬剤(CPZ, CTX, CAZおよびFK 027)の抗菌活性は極めて強く、各薬剤のMICは $\leq 0.01 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ に分布し、耐性株は全く認められなかった。

第1および第2世代に属するcephem 5薬剤のMICは0.05~50 $\mu\text{g/ml}$ に分布した。これらの5薬剤のうちCERのMIC₉₀は25 $\mu\text{g/ml}$ と最も活性が低かったが、他の4薬剤間に対する被検菌株の感受性(MIC₉₀; 1.56

Table 1 Comparative susceptibility of PPNG to 38 antimicrobial agents

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Range	50%	90%	Mean
Penicillins				
Penicillin G (103)	3.12 ~ 100	12.5	25	9.88
Ampicillin (103)	3.12 ~ 100	12.5	25	13.9
Amoxicillin (103)	1.56 ~ 100	50	50	29.4
Carbenicillin (103)	1.56 ~ 50	25	25	11.0
Ticarcillin (103)	1.56 ~ 50	12.5	50	11.8
Methicillin (69)	3.12 ~ 100	12.5	50	15.7
Oxacillin (69)	6.25 ~ 100	25	50	23.6
Dicloxacillin (103)	0.2 ~ 50	6.25	6.25	3.35
Piperacillin (103)	≤ 0.01 ~ 0.78	0.1	0.2	ND
Augmentin (103)	0.1 ~ 1.56	0.78	0.78	0.654
Cephems				
Cephaloridine (105)	0.2 ~ 50	12.5	25	11.9
Cefazolin (105)	0.2 ~ 3.12	1.56	3.12	1.39
Cephalexin (105)	0.2 ~ 12.5	1.56	3.12	1.69
Cefoxitin (105)	0.2 ~ 6.25	0.78	1.56	0.710
Cefmetazole (105)	0.05 ~ 12.5	1.56	3.12	1.23
Cefoperazone (105)	≤ 0.01 ~ 0.1	0.025	0.025	ND
Cefotaxime (105)	≤ 0.01 ~ 0.025	≤ 0.01	0.01	ND
Ceftazidime (105)	≤ 0.01 ~ 0.05	≤ 0.01	0.025	ND
FK 027 (62)	≤ 0.01 ~ 0.01	≤ 0.01	0.01	ND
Aminoglycosides				
Streptomycin (116)	6.25 > 100	12.5	> 100	ND
Kanamycin (116)	3.12 ~ 100	12.5	25	16.3
Gentamicin (116)	1.56 ~ 25	6.25	6.25	5.07
Amikacin (116)	6.25 ~ 100	50	50	33.9
Astromycin (116)	6.25 ~ 50	12.5	25	17.1
Spectinomycin (72)	12.5 ~ 25	12.5	25	16.7
Pyridone carboxylic acids				
Nalidixic acid (116)	0.025 ~ 3.12	1.56	3.12	1.11
Pipemidic acid (116)	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56	0.853
Norfloxacin (116)	≤ 0.01 ~ 0.1	0.025	0.05	ND
Ofloxacin (116)	≤ 0.01 ~ 0.05	0.01	0.025	ND
Enoxacin (116)	≤ 0.01 ~ 0.05	0.025	0.05	ND
Others				
Erythromycin (113)	≤ 0.01 ~ 0.78	0.025	0.78	ND
Josamycin (113)	0.05 ~ 12.5	3.12	12.5	3.65
Chloramphenicol (113)	0.39 ~ 6.25	3.12	3.12	2.78
Tetracycline (113)	0.2 ~ 6.25	1.56	6.25	1.13
Doxycycline (72)	0.1 ~ 1.56	0.78	1.56	0.74
Minocycline (72)	0.05 ~ 0.78	0.39	0.39	0.40
Clindamycin (113)	0.1 ~ 1.56	0.78	0.78	0.63
Rifampicin (113)	≤ 0.01 ~ 1.56	0.2	0.2	ND

(): Number of strains tested

ND : not determined

~3.12 $\mu\text{g/ml}$) には大差は認められなかった (Table 1, 3)。

3) AG 系薬剤

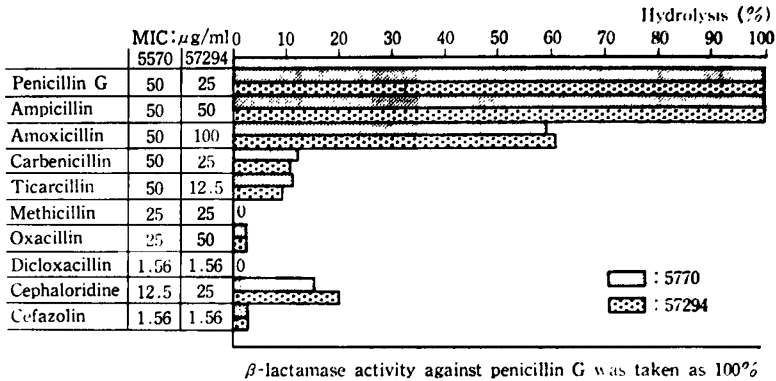
AG 系 6 薬剤の PPNG に対する活性は全般に弱く、 MIC_{90} が 6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ で、多くの高度耐性株が認められた。特に淋菌感染症に臨床的に用いられている

Table 6 Susceptibility distribution of PPNG to other types of antibiotics

Test strains : 113

MIC: $\mu\text{g/ml}$	≤ 0.012	0.025	0.047	0.095	0.19	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	>100
Drug															
Erythromycin	20	37	24	3	4	4	21								
Josamycin			2	2	4	2	1	7	47	31	17				
Chloramphenicol						3	2	16	82	10					
Tetracycline					6	32	6	46	10	13					
Doxycycline #				12	6	8	13	33							
Minocycline #			3	13	16	39	1								
Clindamycin				2	5	26	72	8							
Rifampicin	8	2	22	10	51	15	2	3							

: 72 strains

Fig. 2 Relationship between MIC of β -lactams and rate of hydrolysis by β -lactamase of two strains of PPNG β -lactamase activity against penicillin G was taken as 100%

SPCM の MIC_{50} は $12.5 \mu\text{g/ml}$, MIC_{90} は $25 \mu\text{g/ml}$ と活性は他の AG 系薬剤同様弱く, *in vitro* の成績から, その有効性を説明することはできない (Table 1, 4)。

4) Pyridone carboxylic acid 系薬剤

5 薬剤について同様に比較した。NFLX, OFLX および ENX などの新しい薬剤は, いずれも PPNG に対して極めて強い抗菌力を示し, これらの 3 薬剤の MIC はいずれも $\leq 0.01 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ に分布した。しかし, NA および PA に対する被検株の感受性は上記の 3 薬剤より低く, NA の MIC_{90} は $3.12 \mu\text{g/ml}$, PA では $1.56 \mu\text{g/ml}$ であった (Table 1, 5)。

5) その他の薬剤

Macrolide, TC 系薬剤を含む合計 8 種の抗菌剤について同様に比較した。これらの薬剤のうち EM の活性 (MIC : $0.01 \sim 0.78 \mu\text{g/ml}$) は最も優れ, 次いで MINO, DOXY, CLDM および RFP などの薬剤は $1.56 \mu\text{g/ml}$ 以下で被検株のすべての増殖を阻止し, 耐性株は認められなかった (Table 1, 6)。

3. β -lactam 剤の PPNG に対する抗菌活性と β -lactamase に対する安定性との相関

本研究に用いた PPNG のうち, PCG, ABPC および AMPC などに高度耐性を示した No. 5570 株および No. 57294 株の 2 菌株を選び, 両菌株に対する各 β -lactam 剤の抗菌活性と両菌株の産生する β -lactamase に対する安定性との相関性を検討した。なお β -lactamase に対する各薬剤の安定性は, 同一条件における PCG の加水分解を 100 とした場合の相対値で示した (Fig. 2)。

被検薬剤の抗菌活性と β -lactamase に対する安定性が良く対応する薬剤と, 全く相関性を示さない薬剤が認められた。前者には PCG, ABPC, AMPC および CER など β -lactamase に不安定で, かつこれらの菌株に耐性の薬剤と, MDIPC および CEZ のように β -lactamase に安定で比較的抗菌活性の良好なものがある。また後者には, β -lactamase に非常に安定であるが, 抗菌活性の弱い DMPPC および MPIPIC があげられる。

III. 考 察

淋菌は従来ペニシリン (PC) に高度感受性であったが, 1940 年代以降 PC が化学療法剤として繁用されるに従い, 低レベルではあるが本剤に耐性を示す株³⁾が分離されはじめた。

一方、1976年に β -lactamase^{1,2)}を産生するPC高度耐性菌(PPNG)が検出され、1981年までに世界42か国において、PPNGが確認されており、わが国でも1977年に、初めてPPNGが分離されて以来多くの施設^{3,7)}から検出例が報告されている。

本報告では1983年までにわが国の各臨床施設で分離され、神奈川県衛生研究所に収集されたPPNGを試験菌として用いた。

一方、近年、主として β -lactam系および合成抗菌剤などの新しい薬剤の開発が相次いでいる。

今回の実験では現時点において入手し得た38種類の抗菌剤を対象として、PPNGに最も有効な薬剤の検索を目的として検討を行なった。特に淋菌感染症では外来患者に対するone-shot注射による治療方法が一般に採用され、PPNG感染に対してもこの治療法ないしは経口投与が適用し得る有効な薬剤が望まれる。

われわれの検討成績から、penicillin剤ではpiperacillin, amoxicillin-clavulanic acid合剤, cephem剤では注射用のcefoperazone, cefotaxime, ceftazidime, 経口cephem剤のFK 027, 合成抗菌剤では最近開発されたnorfloxacin, ofloxacin, enoxacinなどがPPNGに対して優れた抗菌活性を有することが確認された。

また検討した薬剤のうち、すべてのPPNG試験株に対するMIC値が $1\mu\text{g/ml}$ 以下の抗菌剤としては、上記の薬剤以外にerythromycin, minocyclineその他があげられる。

PPNGのPC系薬剤に対する耐性機作として菌の産生するI型penicillinase(PCase, TEM型)の産生⁴⁾によることが解明され、この種のPCaseの産生がplasmidに由来することが知られている。本報の結果でも、各種の β -lactam剤のPPNGに対する抗菌活性と安定性とは比較的良く一致した。しかし、われわれが用いたPC高度耐性の2株の酵素に対し、methicillinおよびisoxazole系のPC剤は、いずれも極めて安定であるのに各薬剤のMIC値は $25\sim 50\mu\text{g/ml}$ と耐性であった。

この不一致の原因は、これらの薬剤が本質的に淋菌に対する抗菌活性が低く、その上にPPNGの β -lactamase不活化以外の何らかの機作で関与することが考えられる。また、CBPC, TIPCはPCG, ABPCおよびAMPCに比較すると酵素に対して比較的安定であったが、抗菌活性は低く、耐性(MIC; $12.5\sim 50\mu\text{g/ml}$)であった。この原因は明らかではないが、CBPCは β -

lactamaseと結合親和性を持ち、薬剤の作用点への移行が阻害されるという説⁵⁾があり、淋菌にもこのような機構が作用している可能性が考えられる。

またspectinomycinが淋菌感染に有効な薬剤として、臨床的に応用され、優れた効果を示しているという報告^{10,11)}があるが、今回のPPNGに対する抗菌力の測定成績からは、この薬剤がPPNG感染に対する第一次選択に価するという根拠を得ることができなかった。

文 献

- 1) PHILLIPS, I.: β -Lactamase-producing penicillin-resistant gonococcus. *Lancet* 25: 656-657, 1976
- 2) ASHFORD, W. A.; R. G. GOLASH & V. C. HEMMING: penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet* 25: 657-658, 1976
- 3) O'CALLAGHAN, C. H.; A. MORRIS, S. M. KIRBY & A. H. SHINGLER: Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1: 283-288, 1972
- 4) YAMAI, S.; Y. OBARA, T. NIKAWA, Y. SHIMODA & Y. MIYAMOTO: Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* by the gelatin-disc method. *Brit. J. Vener. Dis.* 55: 90-93, 1979
- 5) SHAHIDULLAH, M. & P. W. GREAVES: Minimum inhibitory concentrations of penicillin and minocycline for 300 isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Brit. J. Vener. Dis.* 51: 265, 1975
- 6) 津上久弥, 大里和久: 性病の疫学と臨床。臨床と細菌 10: 54-64, 1983
- 7) 岡崎武二郎, 小野寺昭一: 1982年に分離された淋菌の細菌学的研究と男子淋菌性尿道炎の臨床的研究。感染症学雑誌 57: 808-815, 1983
- 8) BERGSTRÖM, S.; L. NORLANDER, A. NORQVIST & S. NORMARK: Contribution of a TEM-1-like β -lactamase to penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 618-623, 1978
- 9) YAMAMOTO, T.; T. YOKOTA: β -Lactamase-directed barrier for penicillins of *Escherichia coli* carrying R plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 936-940, 1977
- 10) Consultants/GC Recommendations: Gonorrhoea-CDC recommended treatment schedules, 1979. *Sexually Transmitted Diseases* 6 (2): 89-92, 1979
- 11) 岡崎武二郎, 町田豊平, 小野寺昭一: 男子淋疾の最近の動向。臨泌 36: 433-438, 1982

IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF JAPANESE ISOLATES OF
PENICILLINASE-PRODUCING *NEISSERIA GONORRHOEAE*
TO 38 ANTIMICROBIAL AGENTS

YASUKO KANEKO, FUMIAKI IKEDA, MINORU NISHIDA, SACHIKO GOTO
SHIRO YAMAI* and YASUSHI OBARA*

Department of Microbiology, School of Medicine Toho University

* Department of Bacteriology and Pathology, Kanagawa Prefectural Public
Health Laboratory

A total of 116 isolates of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*(PPNG) from patients with sexually transmitted diseases in many hospitals, in Japan, were collected in the Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory, and tested for their susceptibility to 38 antimicrobial agents. All strains were highly susceptible to 3rd-generation cepheims including cefoperazone, cefotaxime, ceftazidime and FK-027 (a new oral cephem) and new pyridone carboxylic acids such as norfloxacin, ofloxacin, enoxacin. One of the isolates tested was resistant to these drugs. Although all strains of PPNG tested were highly resistant to amoxicillin, the susceptibility of these strains to this antibiotic was greatly enhanced in the presence of clavulanic acid (augmentin). Furthermore, piperacillin, and erythromycin were also highly active against the strains of PPNG tested. Methicillin, oxacillin and dicloxacillin, unlike PCase-susceptible penicillins, were very stable to β -lactamase from the strains of PPNG used. However, no correlation was found between their stability and antibacterial activity against the strains used.