

HAPA-B の *Mycobacterium* 属各菌種に対する抗菌力と、各種細菌における HAPA-B と血清補体および白血球との協力的殺菌作用

横田 健・加藤 尚代・野沢 龍嗣

順天堂大学医学部細菌学教室

HAPA-B の *M. tuberculosis* 44株に対する MIC₉₀ は 1.6 μg/ml であり、*M. avium-intracellulare* complex 等の非定型抗酸菌に対しても 0.2~50 μg/ml で増殖を阻止することが確かめられた。これは KM, SM および AMK の抗 mycobacteria 作用にほぼ等しい。HAPA-B は培養マクロファージ中に取り込まれた *M. tuberculosis* に対しても *in vitro* MIC の 2 倍程度あれば増殖阻止作用を示す。

HAPA-B の血清補体との *E. coli* に対する協力的殺菌作用は中程度で、培養マクロファージによる *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* 等の食菌殺菌には促進的に働くので、生体内効果も良いことが期待される。HAPA-B は mycobacteria の混合感染もありうる compromised host の感染症に対し単独または他剤との組み合わせで有効な抗生物質となることが考えられる。

HAPA-B は Gentamicin (GM) B の 1 位にアミノ酸を結合させた Amikacin (AMK) 型抗生物質である。グラム陽性菌からグラム陰性菌にわたり広い抗菌域を持ち、不活化酵素の影響を受けにくいので耐性株が少ない。本研究の目的は現在化学療法の主役となっている β-lactam 抗生物質の人体細胞内への透過が不十分のため実際の治療効果が及び難い *Mycobacterium* 属の各菌種に対し、HAPA-B がどの程度の抗菌力を示すか検討するとともに、*Mycobacterium* その他の菌を使用し、血清補体、およびマウス培養マクロファージ (Mφ) と HAPA-B との協力的殺菌作用を調べ、本剤の生体内効果を予測する一助としようとしたものである。

I. 方法および実験材料

1. HAPA-B の *Mycobacterium* 属各菌種に対する試験管内抗菌力の検討

順天堂大学付属病院中検、大宮赤十字病院中検、および虎の門病院中検から分与された臨床分離の *M. tuberculosis* 44 株、*M. avium-intracellulare* complex 7 株、*M. kansasii* 1 株、*M. gordonae* 1 株、*M. szulgai* 1 株、および *M. fortuitum* 1 株計 55 株に対する HAPA-B, AMK, Streptomycin (SM), および Kanamycin (KM) の最小発育阻止濃度 (MIC) は、野沢ら¹⁾の開発した迅速感受性測定法で調べた。すなわち *Mycobacterium* の被験株を 1 ml の 5% fetal calf serum (GIBCO) 加 F 12 培地で 4~7 日間 37°C で静置培養し、Klett-Summerson 比色計で No. 66 フィルターを使用し、1~10 Klett Unit の濁度に希釈した。これは菌数にすると 0.5~5 × 10⁶ CFU/ml となる。96 穴の平底

multitray (Inter Med.) に倍数希釈した薬剤系列を含む 5% fetal calf serum 加 F 12 培地を分注し、各 well に菌浮遊液 10 μl を接種した。菌を接種した multitray を 5% CO₂ 存在下で 37°C 5 日間培養し、各 well における菌増殖の有無を肉眼で判定した。

2. 細胞内 *Mycobacterium* 属各菌種に対する HAPA-B の抗菌力検討

ヘパリン加ヒト末梢血 5 ml を 3 ml の Mono-Poly 分離液 (Flow Laboratories) に重層して 300 × g 30 分間遠心し、その上清をさらに 1000 × g 20 分間 4°C で遠心して最上層の Mφ を分離した²⁾。集めた Mφ は MCDB 103 培地で 2 回洗浄した。これを 96 穴の multitray の各 well に 2 × 10⁵ cells/0.15 ml 20% 自家血漿加 MCDB 103 培地になるように分注した。5% fetal calf serum および 0.05% Tween 80 加 F 12 培地に 5 日間培養した *M. tuberculosis* を希釈し、10 μl 中に 10³~10⁴ CFU 含むようにして各 well に接種した。一部の well には倍数希釈系列の HAPA-B を加えた。これを 5% CO₂ 存在下で 37°C 培養を続け、培養開始後 4 日目および 8 日目に一部の multitray の well に 10 μl の 1 N-NaOH と 5% の Tween 80 を加え、対数希釈して先の multitray を使用した *Mycobacterium* 迅速培養法で、生ずる集落数を顕微鏡下で計測した。

3. 各種細菌に対する HAPA-B と血清補体との協力的殺菌作用の検討

一夜 L-broth 中で振盪培養した *E. coli* NIHJ JC-2 を希釈し、中試験管中に 5 ml ずつ分注した。3 本 1 組とし、1 本目には *E. coli* の増殖に影響を与えない補体の最高量、0.75 units/ml と 20% ヒト非働化血清を、2 本目には 50% 増殖阻

Table 1 Sensitivity of various mycobacteria to aminoglycoside antibiotics

Strain	Species	SM	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
			KM	AMK	HAPA-B
T 4	<i>M. tuberculosis</i>	12.5	1.56	0.78	0.78
T 45	<i>M. tuberculosis</i>	25	0.78	1.56	1.56
OR 100	<i>M. tuberculosis</i>	1.56	>200	>200	>200
OR 102	<i>M. tuberculosis</i>	25	3.13	3.13	3.13
J 12	<i>M. tuberculosis</i>	12.5	1.56	1.56	1.56
J 18	<i>M. kansasii</i>	6.25	3.13	3.13	3.13
T 8	<i>M. goodnae</i>	6.25	6.25	6.25	6.25
T 10	<i>M. szulgai</i>	—	<0.20	<0.20	<0.20
T 12	<i>M. fortuitum</i>	100	6.25	0.78	12.5

止濃度 (ID_{50}) の HAPA-B, GM, または AMK を, 3 本目には補体, 血清と薬剤の両者を添加した。37°C で振盪培養を続け, 培養開始後 1, 3, 5, および 24 時間後にそれぞれの試験管から培養液の一部を採取し, L 寒天平板を用いて生菌数を測定した³⁾。

被験菌が *S. aureus* 209 P の時には補体濃度が 8 units/ml, *P. aeruginosa* 18 s の時には補体濃度が 10 units/ml となる。これは, これらの菌種は *E. coli* より補体に対する抵抗性が高いためである。

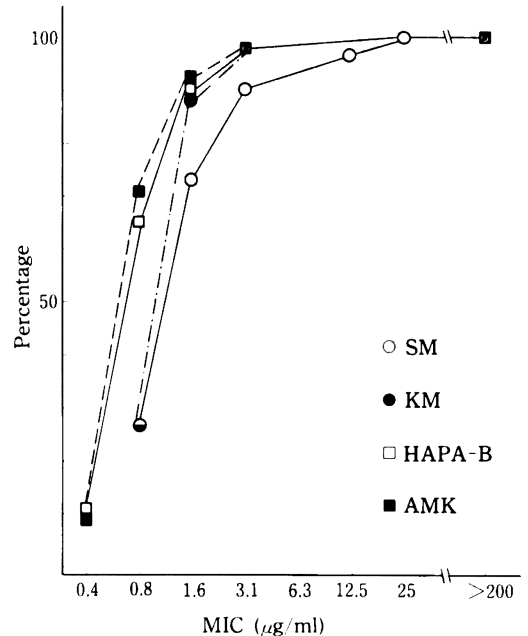
4. HAPA-B とマウス培養 $M\phi$ との協力的食菌殺菌作用の検討

$M\phi$ は ICR ♂ マウスの腹腔内を 8 ml の 10% fetal calf serum 加 F 12 培地 (日水製薬) で洗って採取し, 遠心後同培地 5 ml に浮遊した。その 0.1 ml (10^4 cells) をカバースリップを沈めた 24 穴 FALCON multidish の各 well に分注し, 5% CO_2 存在下で 30 分静置後, 同培地 1 ml ずつ追加して一夜培養した。翌日浮遊細胞を含んだ培地を除き, 20% L-CM (conditioned medium L-929)⁴⁾ 加同培地 1 ml と交換した。これを 37°C 2 時間 CO_2 存在下で培養した後, 一夜培養した *E. coli* NIHJ JC-2, *S. aureus* 209 P または *P. aeruginosa* 18 s を $M\phi$ の 50 倍量 (5×10^5 CFU) 接種した。一部の well には 1~1/8 MIC の HAPA-B を添加した⁵⁾。薬剤添加後 5 時間目にカバースリップを取り出し, saline G で洗った後, ギムザ染色して光顕像を調べた。

II. 成績

1. HAPA-B の *Mycobacterium* 属各菌種に対する試験管内抗菌力

HAPA-B は Fig. 1 のとおり 44 株の *M. tuberculosis* に対し, ほぼ AMK と等しい抗菌力を示し, SM および KM より強い。特に SM 耐性株にも作用し 44 株の *M. tuberculosis* 大部分が 3.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の HAPA-B で増殖が抑えられる。個々の菌株に対する各薬剤の抗菌力を Table 1 に一部あげた。HAPA-B, AMK および KM に高度耐性で

Fig. 1 Sensitivity distribution of 44 clinical isolates of *M. tuberculosis* to HAPA-B, Streptomycin (SM), Kanamycin (KM), and Amikacin (AMK)Table 2 Susceptibility of *M. avium-intracellulare* complex to aminoglycoside antibiotics

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	SM	KM	AMK	HAPA-B
T 11	12.5	12.5	12.5	12.5
T 15	12.5	12.5	12.5	12.5
T 24	25	25	25	25
T 38	25	12.5	25	25
J 11	12.5	12.5	200	50
J 14	6.25	6.25	12.5	12.5
J 16	12.5	12.5	12.5	12.5

はあるが、SMには感受性を示す1株の *M. tuberculosis* と、SMには高度耐性であるが HAPA-B等には中程度感受性の *M. fortuitum* 1株が認められることが注目される。

各種抗生物質に耐性を示し難治感染の原因となりやすい *M. avium-intracellulare* complex 7菌株の各薬剤に対する感受性を Table 2 に示した。HAPA-Bはこれらの菌に対し SM および KM に近い抗菌力を示すが、AMK では1株高度耐性株が認められた。

2. 細胞内 mycobacteria に対する HAPA-B の抗菌力

Mycobacterium 属の菌は細胞内寄生性なので、*in vitro* 抗菌力の優れた薬剤でも、M ϕ 等の細胞内に透過が悪いものは臨床効果が望み難い。M ϕ 内に取り込まれた *M. tuberculosis* は Fig. 2 のとおり培養期間に応じて増加するが、HAPA-Bは5および10 $\mu\text{g/ml}$ で M ϕ 内のこの菌を抑え、培養8日目には接種時の菌数またはそれ以下になる。実験に使用した菌株に対する HAPA-B の MIC は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ なので、M ϕ 中の菌でも MIC の2倍あれば増殖が阻止されることがわかる。 β -lactam 抗生物質のあるものは *M. avium-intracellulare* complex に対し、*in vitro* では HAPA-B と同程度の抗菌力を示すものもあるが、M ϕ 中の菌に対しては力が弱く、*in vitro* MIC の8~16倍でも増殖阻止できないものもある。

3. HAPA-B と血清補体との協力的殺菌作用

E. coli ではその増殖に影響を与えない最高濃度の補体、0.75 units/ml と、ID₅₀ の HAPA-B を共存させると、Fig. 3 のとおり弱いながらも協力的殺菌効果が認められる。その程度は AMK に近く、中等度である。

S. aureus では 8 units/ml の補体と ID₅₀ の HAPA-B 等

を加えても両者の協力作用は認められない (Fig. 4)。 *P. aeruginosa* に対しても 10 units/ml の補体は、HAPA-B の殺菌力を増強しなかった (Fig. 5)。

4. HAPA-B とマウス培養 M ϕ の協力的食菌殺菌作用

組織培養したマウス培養 M ϕ に *E. coli* を感染させるとよく食菌するが、5時間後には細胞内で菌が増殖し、Fig. 6 のとおり細胞を殺して外に遊出する。Fig. 7のごとく 1/2

Fig. 2 Antibacterial activity of HAPA-B against *M. tuberculosis* growing in human macrophages

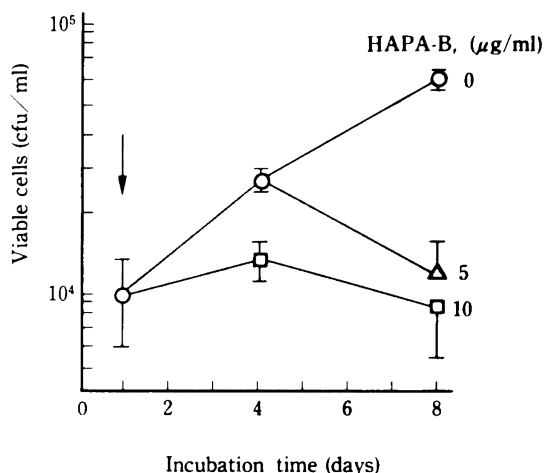


Fig. 3 Synergy of bactericidal effects between the complement and sub MIC doses of aminoglycosides against *E. coli* NIHJ JC-2

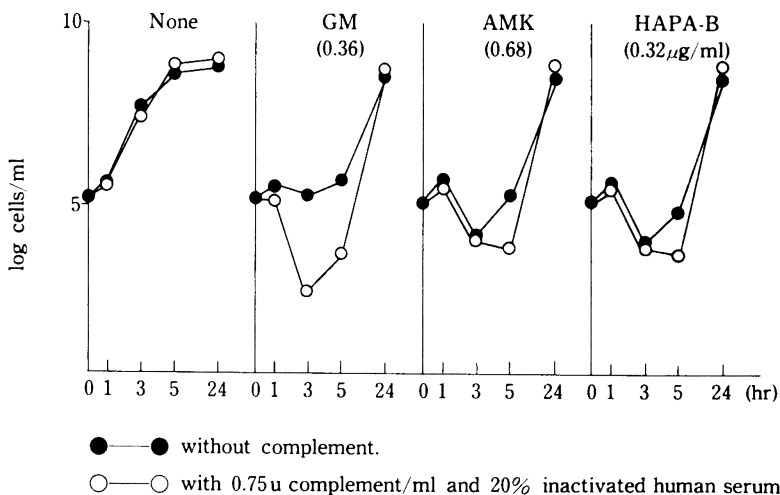


Fig. 4 Synergy of bactericidal effects between the complement and sub MIC aminoglycosides against *S. aureus* 209 P

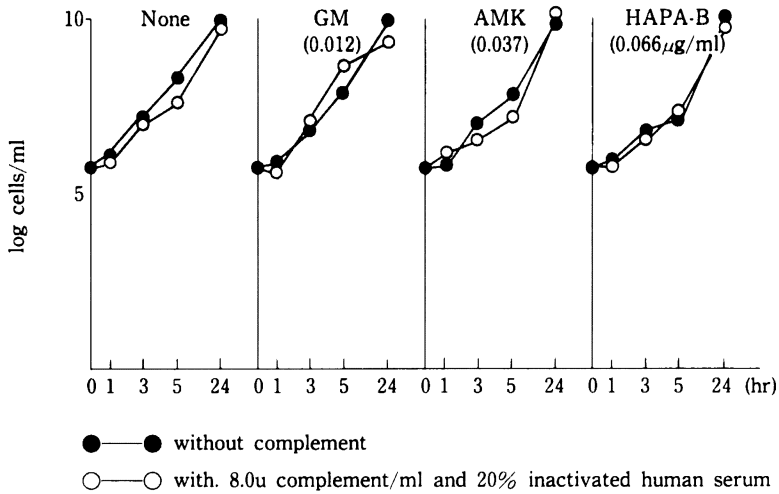
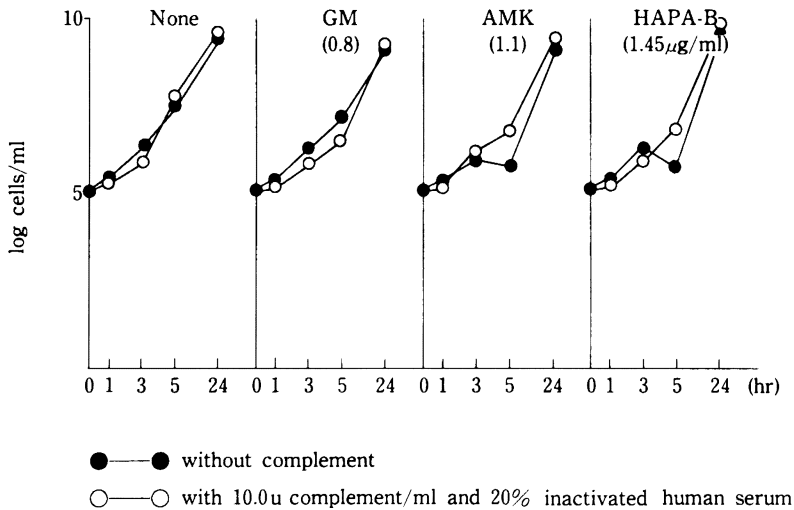


Fig. 5 Synergy of bactericidal effects between the complement and sub MIC aminoglycosides against *P. aeruginosa* 18s



MICのHAPA-B存在下では、5時間後には細胞内でスフェロプラスト化し殺菌消化が進み、5時間後でもMφは正常な形にとどまる。菌を消化した後の空胞が細胞内に明らかに認められる。1/4 MICのHAPA-B存在下では、Fig. 8のとおり菌の細胞内増殖とそれに続くMφの変性が認められる。*P. aeruginosa*は薬剤のない時は、Fig. 9のとおりMφにほとんど食菌されず、菌の細胞外増殖によってMφ

は殺される。1 MICのHAPA-Bが共存すると、Fig. 10のとおりMφは*P. aeruginosa*でもよく食菌し、菌消化後のphagosome空胞が認められる。1/2 MIC存在下でも、Fig. 11のとおりMφは*P. aeruginosa*を食菌するが、1/4 MIC存在下では、*P. aeruginosa*の細胞内外の増殖によりMφは傷害される(Fig. 12)。

*S. aureus*はFig. 13のように薬剤非存在下でもMφに

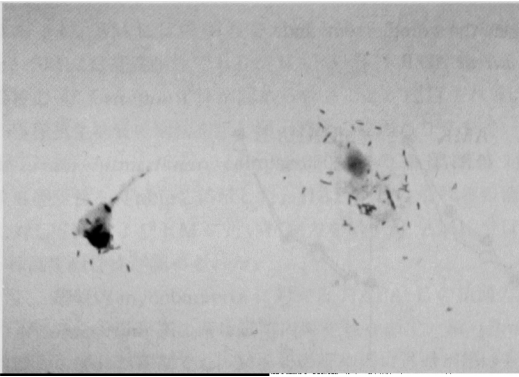


Fig.6 Death of activated mouse-macrophages phagocytizing normal cells of *E. coli* NIHJ-JC 2 in the absence of drugs at 5 hrs after the infection

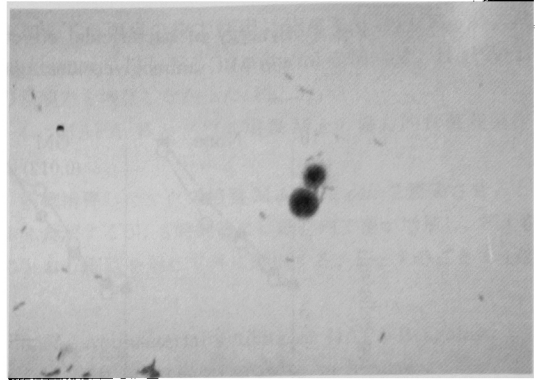


Fig.9 Death of mouse activated macrophages by extracellular growth of *P. aeruginosa* 18 s in the absence of drugs at 5 hrs after the infection

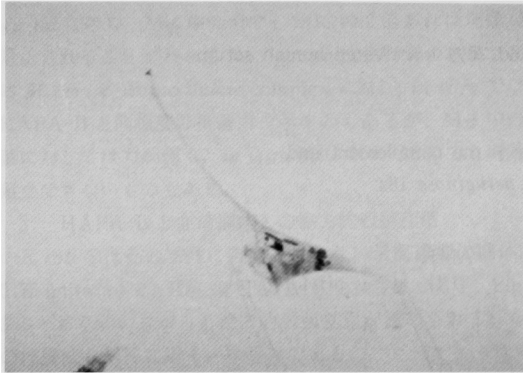


Fig.7 Digestion of cells of *E. coli* NIHJ-JC 2 by mouse activated macrophages in the presence of 1/2 MIC of HAPA-B

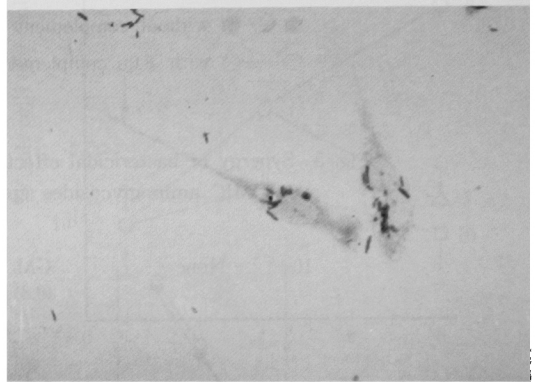


Fig.10 Digestion of cells of *P. aeruginosa* 18 s by mouse activated macrophages in the presence of 1 MIC of HAPA-B at 5 hrs after the infection

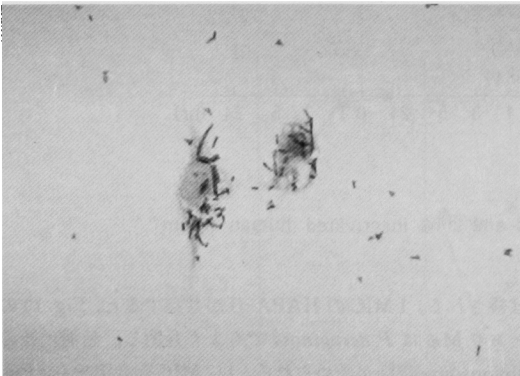


Fig.8 Light microscopy of mouse activated macrophages phagocytizing cells of *E. coli* NIHJ-JC 2 in the presence of 1/4 MIC of HAPA-B at 5 hrs after the infection

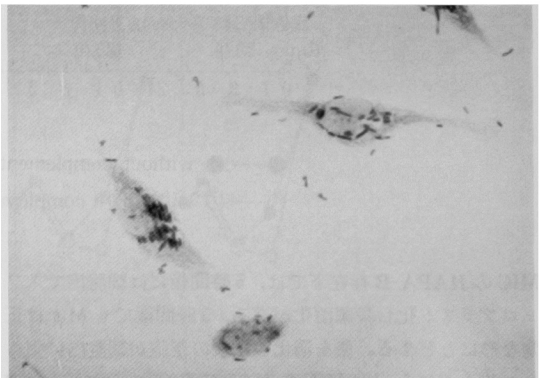


Fig.11 Phagocytosis of cells of *P. aeruginosa* 18 s by mouse activated macrophages in the presence of 1/2 MIC of HAPA-B at 5 hrs after the infection

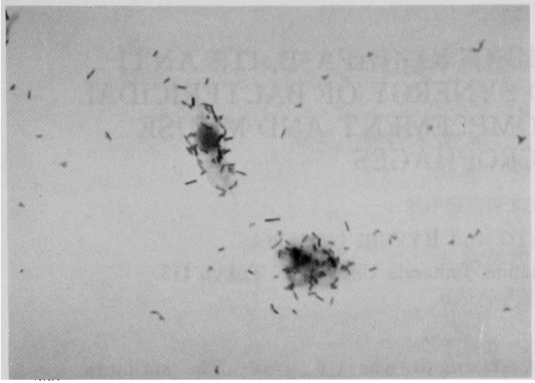


Fig.12 Death of mouse activated macrophages by extracellular growth of *P. aeruginosa* 18 s at 5 hrs after the infection in the presence of 1/4 MIC of HAPA-B

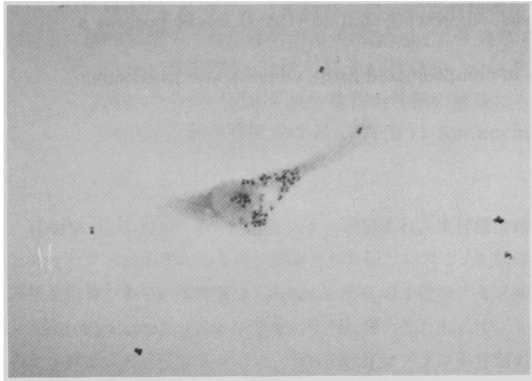


Fig.13 Phagocytosis of *S. aureus* 209 P by mouse activated macrophages at 5 hrs after the infection in the absence of drugs

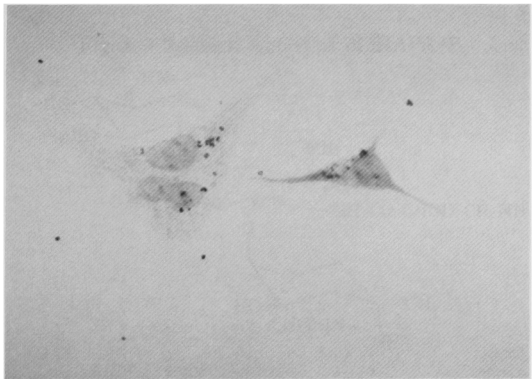


Fig.14 Spheroplast formation and digestion of cells of *S. aureus* 209 P by mouse activated macrophages in the presence of 1/8 MIC of HAPA-B at 5 hrs after the infection

よく食菌消化されるので HAPA-B の効果は明らかでなくなる。しかし、Fig. 14 に示すとおり HAPA-B 存在下の方が食菌する菌数も多く消化も速いようである。

III. 考 察

HAPA-B はグラム陽性、陰性菌に広い抗菌域を持つのみならず、*Mycobacterium* 属の *M. tuberculosis* や *M. avium-intracellulare* complex 等にも SM や KM と同程度の抗菌力を示すことがわかった。しかも、aminoglycoside は細胞内透過が良いため、*in vitro* MIC の 2 倍程度の薬剤量があれば、Mφ 中の mycobacteria を抑えることができる。oxime 型 cephem は *in vitro* では *M. avium-intracellulare* complex に HAPA-B と同程度の抗菌力を示すが、Mφ 中の菌に対しては MIC の 8~16 倍でも効果がないことがあるので、広い抗菌域に加え、抗 mycobacteria 作用と良好な細胞透過性を持った HAPA-B は、非定型抗酸菌の混合感染の疑われる compromised host 感染症には価値ある薬剤となるであろう。HAPA-B と血清補体との協力的殺菌作用は顕著ではないが、Mφ では *E. coli* でも *P. aeruginosa* でも HAPA-B が協力的に食菌殺菌を促進するので、生体内効果も良いことが期待される。

文 献

- 1) NOZAWA, R. T. & T. YOKOTA : Rapid drug susceptibility testing of mycobacteria in tissue culture medium. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 24 : 268 ~ 272, 1983
- 2) NOZAWA, R. T. ; H. KATO & T. YOKOTA : Intra- and extracellular susceptibility of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex to aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 26 : 841 ~ 844, 1984
- 3) KIYOTA, H ; R. SEKIGUCHI, T. MACHIDA & T. YOKOTA : Synergy of bactericidal effects of the complement and macrophages with subinhibitory concentrations of cephem antibiotics. 13th International Congress of Chemotherapy, 1983
- 4) NOZAWA, R. T. & T. YOKOTA : Inhibition by glucocorticoids and choeragen of the conditional growth of poorly adherent mononuclear phagocytes of new-born hamster liver and lung (hormonal control of macrophage growth). *Cell. physiology.* 100 : 351 ~ 364, 1979
- 5) 横田 健, 関口玲子, 東 映子 : Cefmenoxime (SCE-1365) の各種 β -lactamase およびペニシリン結合タンパク質に対する親和性とその抗菌力との関係。 *Chemotherapy* 29 : 32~41, 1981

A NEW AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTIC, HAPA-B, ITS ANTI-MYCOBACTERIAL ACTIVITY AND SYNERGY OF BACTERICIDAL EFFECT WITH THE SERUM COMPLEMENT AND MOUSE CULTURED MACROPHAGES

TAKESHI YOKOTA, NAOYA KATO and RYUSHI NOZAWA

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo 113

MIC₉₀ of HAPA-B to 44 clinical isolates of *M. tuberculosis* was 1.6 µg/ml. The antibiotic manifested also the MIC from 0.2 to 50 µg/ml against various typical mycobacteria including *M. avium-intracellulare* complex. HAPA-B inhibited the intracellular growth of *M. tuberculosis* in human macrophages with 2-fold concentration of *in vitro* MIC.

Synergy of bactericidal effect between HAPA-B and the serum complement against *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* was moderate, and inferior than that of gentamicin (GM). The antibiotic, however, showed good synergy of phagocytosis and bactericidal activity with mouse cultured macrophages against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, suggesting that HAPA-B might possess a good *in vivo* effect on various bacterial infections.

HAPA-B may be a useful antibiotic for infections in compromised hosts where sometimes super-infections by mycobacteria will occur.