

## Arbekacin の抗菌力におよぼす NaCl の影響

田村 淳・斉藤早紀子・井田 孝志

原 哲郎・河原條勝己

明治製菓株式会社薬品総合研究所\*

藤田 欣一・鈴木 隆男・井上 松久

群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

(平成3年6月20日受付・平成3年8月21日受理)

Bioassay 法により, arbekacin および他の各種抗菌剤の抗菌力におよぼす NaCl の影響を検討した。Arbekacin および他のアミノ配糖体薬は methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) および methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) にかかわらず, 培地に 4% NaCl を添加した時, 著しく抗菌力が低下した。一方,  $\beta$ -ラクタム系薬は培地に 4% NaCl を添加した時, MSSA ATCC 25923 株では抗菌力の低下はわずかであったが, MRSA M-12 株では抗菌力の低下が認められた。さらに M-12 株では, fosfomycin の抗菌力の低下も認められた。しかし, vancomycin, minocycline, ofloxacin, ST 合剤などの抗菌薬では, MSSA, MRSA にかかわらず 4% NaCl 添加による抗菌力の変化はほとんど認められなかった。また培地に NaCl を 1%, 3%, 5%, 7% 添加し, それぞれの MIC 値におよぼす影響を arbekacin, netilmicin について検討した。Arbekacin および netilmicin は, *S. aureus* だけでなく *Escherichia coli* はじめグラム陰性菌でも NaCl 添加で抗菌力が低下した。以上の結果より, NaCl の抗菌力におよぼす影響は薬剤の種類により大きく異なり, arbekacin はじめアミノ配糖体薬は NaCl により著しく抗菌力が低下することが明らかとなった。

**Key words:** アミノ配糖体, arbekacin, NaCl の影響, MSSA, MRSA

アミノ配糖体薬の抗菌力に塩が拮抗的に作用するという事実は以前より知られているが<sup>1)</sup>, 拮抗のメカニズムについては部分的な研究報告に頼るしかなくその全体像はとらえにくい<sup>2)</sup>。

また MRSA の出現とともに, その検出方法が検討され, より感度良く MRSA を検出するために培地に NaCl を 2~4% 添加する方法が推奨されている<sup>3,4)</sup>。そのメカニズムとして NaCl によりヘテロ耐性の MRSA の methicillin 耐性の表現型が増加すること<sup>5)</sup>, および NaCl により MRSA の PBP 2' 産生が促進されることが示唆されている<sup>6)</sup>。

以上の背景がある中で, アミノ配糖体薬 arbekacin が MRSA 感染症薬として使用され始めたことから, 本報では arbekacin はじめアミノ配糖体薬,  $\beta$ -ラクタム系薬および他の抗菌薬の抗菌力におよぼす NaCl の影響を検討したので報告する。

## I. 材料と方法

## 1. 使用菌株

明治製菓薬品総合研究所保存の標準株および臨床分離株を用いた。

Bioassay には, methicillin 感受性 *S. aureus* ATCC 25923 株 (methicillin の MIC 値; 1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), methicillin 中等度耐性 M-12 株 (同 MIC 値; 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), methicillin 高度耐性 A-005 株 (同 MIC 値; >400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の 3 株を使用した。

## 2. 使用薬剤

Arbekacin (明治製菓), netilmicin (三共), methicillin (万有製薬)。各種薬剤ディスクは, 市販の昭和一濃度ディスクを用いた。ただし, vancomycin (Lilly), erythromycin (Upjohn) は, それぞれ 30  $\mu\text{g}$  力価/ディスク, 50  $\mu\text{g}$  力価/ディスクを作製した。図中の薬剤の略号は, 日本化学療法学会化学療法用語集に従った<sup>7)</sup>。

\* 横浜市港北区師岡町 760

## 3. 使用培地

Bioassay および MIC 測定には感受性測定用培地 (STA; ニッスイ) および同培地に NaCl を指定量添加したものをを用いた。

## 4. 阻止円径の測定

昭和ディスクユーザーズマニュアルに従った<sup>9)</sup>。すなわち STA 寒天平板上に増殖させた被験菌をローゼでかき取り、滅菌生理食塩水 1 ml に懸濁 (McFarland 2.0) させた。角シャーレ 1 号に作製した寒天平板上に菌液をのせガラス玉 30 ~ 40 個を上下左右によく揺り動かし、菌を塗抹した ( $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>)。その上に薬剤ディスクをのせ 35°C、16 時間培養後、阻止円径を計測した。

## 5. MIC 値の測定

日本化学療法学会標準法に従った<sup>9)</sup>。

接種菌量は  $10^6$  CFU/ml、37°C、20 時間培養後、最小発育阻止濃度 (MIC 値) を測定した。

## II. 結 果

## 1. 阻止円径に及ぼす NaCl 添加の影響

Methicillin 感受性 *S. aureus* ATCC 25923 株、中等度耐性 M-12 株、高度耐性 A-005 株の 3 株を被験菌として各種薬剤の阻止円径におよぼす 4% NaCl 添加の影響を検討した。結果を Table 1 および Fig. 1 に示す。

Arbekacin をはじめアミノ配糖体系 5 薬剤は、MSSA、MRSA にかかわらず上記 3 菌株に対して同程度に 4% NaCl 添加により阻止円径の減少、すなわち抗菌力が低下した。これに対して、 $\beta$ -ラクタム系 8 薬剤は、methicillin 感受性の ATCC 25923 株では、4% NaCl 添加により阻止円径の変化は小さかったが、中等度耐性の M-12 株では、cefotaxime を除き阻止円径が著しく減少した。Methicillin 高度耐性の A-005 株では、NaCl 無添加でも阻止円径がほとんど認められず、わずかに認められた cefmetazole、flomox-

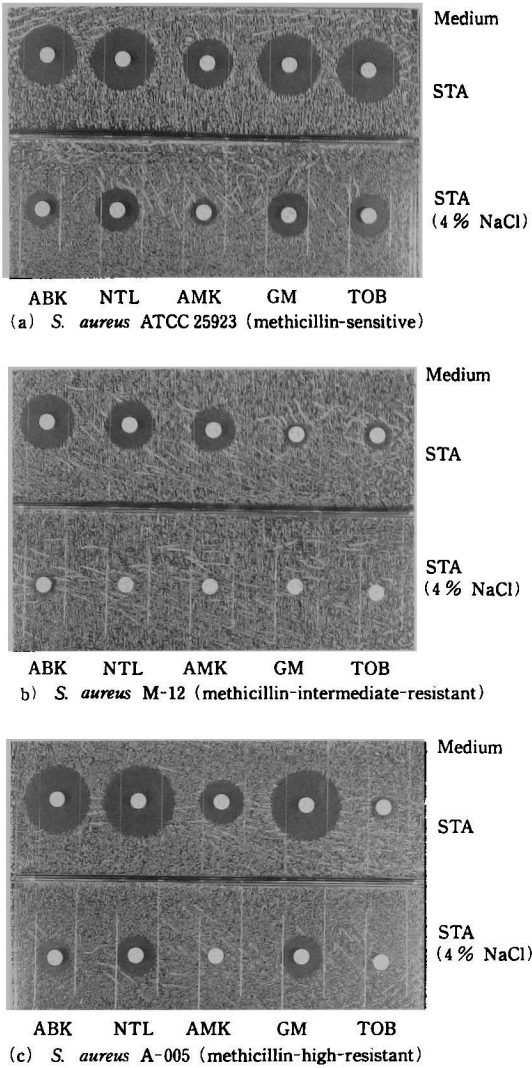
Table 1. Effect of additional 4% NaCl on diameter of inhibition zone of various drug disks

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (methicillin-sensitive)		<i>S. aureus</i> M-12 (methicillin-resistant)		<i>S. aureus</i> A-005 (methicillin-resistant)	
	STA <sup>a)</sup>	STA (4% NaCl) <sup>b)</sup>	STA	STA (4% NaCl)	STA	STA (4% NaCl)
Arbekacin	31.0 <sup>d)</sup>	17.5	27.9	11.0	33.7	17.4
Netilmicin	33.2	27.7	24.7	— <sup>d)</sup>	35.8	19.6
Amikacin	25.5	12.2	22.8	—	22.4	—
Gentamicin	31.5	22.4	12.0	—	35.6	20.8
Tobramycin	33.2	23.0	13.0	—	9.0	—
Methicillin	32.0	28.8	23.5	—	—	—
Oxacillin	38.5	38.0	34.8	13.5	—	—
Ceftizoxime	33.4	27.2	13.6	—	—	—
Cefazolin	35.6	32.0	23.2	—	—	—
Cefmetazole	29.8	27.8	36.3	21.6	11.9	14.2
Cefotaxime	30.5	28.0	24.9	25.0	—	—
Flomoxef	34.2	30.0	30.7	22.9	10.0	12.0
Imipenem	48.0	39.4	45.0	39.8	12.1	13.5
Fosfomicin	26.4	23.5	44.0	21.5	—	—
Vancomycin	20.9	21.3	22.0	22.0	22.6	23.4
Norfloxacin	28.7	27.8	28.5	27.5	18.6	22.4
Ofloxacin	35.1	35.0	34.2	33.5	32.8	32.0
Minocycline	33.0	36.2	27.6	33.4	33.5	36.8
Erythromycin	33.8	36.5	13.1	16.9	—	—
ST	35.2	36.0	37.8	39.0	41.7	42.5

<sup>a)</sup>STA: sensitivity test agar (Nissui)

<sup>b)</sup>STA (4% NaCl): STA supplemented with 4% NaCl

<sup>c)</sup>diameter of inhibition zone (mm)    <sup>d)</sup>no inhibition zone



ABK, arbekacin; NTL, netilmicin;  
AMK, amikacin; GM, gentamicin;  
TOB, tobramycin.

Fig. 1. Effect of 4% NaCl on the diameter of inhibition zone of drug disk.

ef, imipenem の 3 薬剤では、阻止円径のわずかな増加が認められた。Fosfomycin では、methicillin 中等度耐性の M-12 株で阻止円径の著しい減少が認められた。

Vancomycin, norfloxacin, ofloxacin では MSSA, MRSA のいずれの菌株でも 4% NaCl の影響はまったく認められなかった。

Minocycline, erythromycin, ST 合剤では、いず

れの 3 株も NaCl の添加によってわずかに阻止円径の増加が認められた。

## 2. Arbekacin の MIC 値におよぼす NaCl 添加の影響

MSSA, MRSA を含む *S. aureus* 10 株とグラム陰性菌 8 株に対する arbekacin, netilmicin の MIC 値におよぼす NaCl 添加の影響について結果を Table 2 に示す。両薬剤の MIC 値は MSSA, MRSA にかかわらず、1% NaCl 添加で  $2^2 \sim 2^3$  倍、3% NaCl 添加で  $2^4 \sim 2^7$  倍、5% NaCl 添加で  $2^6 \sim 2^8$  倍、7% NaCl 添加で 2 倍以上上昇した。グラム陰性菌では、*E. coli* で 1% NaCl 添加で 2 倍以上上昇したが、3% NaCl 添加では、MIC 値の上昇は緩慢であった。ただし、*Pseudomonas aeruginosa* の MIC 値の上昇は 2 倍程度であった。また、5% NaCl 添加では、薬剤なしの対照で菌の発育が悪くなり判定不能となった。

## III. 考 察

今回の我々の実験で、MSSA, MRSA にかかわらずアミノ配糖体の抗菌力が NaCl の添加で大きく低下することが認められた。これはアミノ配糖体の種類に関係なく、*E. coli* などグラム陰性菌でも認められた。*E. coli* を用いた実験で、gentamicin の抗菌力におよぼす塩の作用は塩のイオン強度によるものであるという報告がある<sup>10)</sup>。アミノ配糖体薬が菌体内に取り込まれるには、まず菌表層に結合しなければならず、NaCl によりこのイオン結合が阻害されると考えられる。

また、金政らにより、ブドウ球菌の耐塩機構として細胞質膜成分の cardiolipin の増加があると報告されており、アミノ配糖体取り込みへの影響も考えられる<sup>11)</sup>。

$\beta$ -ラクタム剤では、methicillin 中等度耐性株の M-12 株では、NaCl 添加により抗菌力が低下することが認められた。この理由は、NaCl により PBP 2' の産生が増加したことによるものと考えられる<sup>6)</sup>。

Fosfomycin では、NaCl 添加により M-12 株で抗菌力が低下したがこの理由は不明である。他の種類の薬剤では、NaCl の影響は認められないか、わずかであった。

このように NaCl の抗菌力におよぼす影響は、薬剤の種類により大きく異なる。特に MRSA の場合、使用培地に NaCl を添加し、その検出を行うよう推奨されている。このため MRSA を中心に黄色ブドウ球菌の場合、アミノ配糖体薬をはじめ他剤の MIC を調べる時も NaCl 存在下で検討することも考えられる。こ

Table 2. Effect of additional NaCl on the MIC values of arbekacin and netilmicin

	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )										
	Methicillin		Arbekacin				Netilmicin				
	0%*	1%	3%	5%	7%	0%	1%	3%	5%	7%	
<i>S. aureus</i> 209 P JC 1	3.13	0.05	0.39	6.25	12.5	50	$\leq 0.025$	0.20	3.13	12.5	50
<i>S. aureus</i> MS 353	1.56	0.10	0.78	6.25	25	50	0.10	0.78	6.25	25	50
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.56	0.20	1.56	12.5	25	100	0.20	0.78	6.25	25	50
<i>S. aureus</i> M-108	1.56	3.13	25	200	400	>400	25	50	>400	>400	>400
<i>S. aureus</i> M-12	50	1.56	6.25	200	200	>400	6.25	25	400	>400	>400
<i>S. aureus</i> M-133	50	0.78	6.25	50	100	400	3.13	12.5	100	400	>400
<i>S. aureus</i> No 58	100	0.78	6.25	50	200	>400	6.25	25	200	>400	>400
<i>S. aureus</i> A-005	>400	0.20	1.56	12.5	50	200	0.10	0.78	12.5	25	50
<i>S. aureus</i> NU 10	>400	0.39	3.13	25	100	400	1.56	12.5	200	400	>400
<i>S. aureus</i> NU 45	>400	0.20	1.56	25	25	200	0.20	0.78	6.25	25	50
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.78	6.25	12.5	12.5			0.39	1.56	3.13	6.25	
<i>E. coli</i> 255	0.78	6.25	25	25			0.78	1.56	6.25	12.5	
<i>P. vulgaris</i> GN 76	0.39	0.78	3.13	3.13			0.20	0.39	1.56	0.78	
<i>M. morgarii</i> 1510	6.25	12.5	12.5	-			0.78	3.13	6.25	-	
<i>C. freundii</i> GN 346	1.56	3.13	6.25	-			0.39	0.78	1.56	-	
<i>E. cloacae</i> G-0008	0.78	3.13	6.25	12.5			0.78	0.78	3.13	6.25	
<i>P. aeruginosa</i> GN 10362	6.25	12.5	12.5	-			12.5	25	25	-	
<i>P. aeruginosa</i> IAM 1007	1.56	3.13	1.56	-			6.25	6.25	0.78	-	

\*Concentration of additional NaCl (%)

Medium: STA (Sensitivity test agar, Nissui)

Inoculum size:  $10^6$ CFU/ml, incubation: 37°C, 20 h

のため今回の結果は、薬剤の抗菌力の測定にあたっては充分注意する必要がある。

#### 文 献

- Medeiros A A, O' Brien T F, Wacker W E C, Yulug N F: Effect of salt concentration on the apparent in vitro susceptibility of *Pseudomonas* and other gram negative bacilli to gentamicin. *J. Infect Dis* 124 (Suppl.): S 59 ~ S 64, 1971
- Hancock R E W: Aminoglycoside uptake and mode of action-with special reference to streptomycin and gentamicin. *J. Antimicrob Chemother* 8: 249 ~ 276, 1981
- Thornsverry C, McDougal L K: Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) *Staphylococci*. *J. Clin Microbiol* 18: 1084 ~ 1091, 1983
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 2nd ed. Tentative standard M7-A2. NCCLS, Villanova, Pa, 1990
- Sabath L D: Chemical and physical factors influencing methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob Chemother* 3 (Suppl. C) 47 ~ 51, 1977
- Madiraju M V V S, Brunner D P, Wilkinson B J: Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1727 ~ 1733, 1987
- 日本化学療法学会編集委員会: 化学療法用語集 (案) *Chemotherapy* 39, 1991
- 薬剤感受性試験昭和ディスクユーザーズマニュアル. 昭和薬品化工株式会社, 1990
- 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法改訂について. *Chemotherapy* 29: 76 ~ 79, 1981
- Beggs W H, Andrews F A: Role of ionic strength in salt antagonism of aminoglycoside action on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect Dis* 134: 500 ~ 504, 1976
- 林 英生, 国府島泉, 木口健一郎, 金政泰弘: プド

ウ球菌の耐塩機構の解析。日本細菌学雑誌 33 539

～ 546, 1978

EFFECT OF NAACL ON ANTIBACTERIAL  
ACTIVITY OF ARBEKACINAtsushi Tamura, Sakiko Saito, Takashi Ida,  
Tetsuo Hara and Katsumi Kawaharajo

Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd., Yokohama, Japan

Kinichi Fujita, Takao Suzuki and Matsuhisa Inoue

Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, Gunma University School of Medicine

We determined the effect of NaCl on the antibacterial activities of arbekacin and other antibacterial compounds by bioassay. Addition of 4% (w/v) NaCl to the medium significantly decreased the antibacterial activities of arbekacin and other aminoglycoside antibiotics against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The activities of  $\beta$ -lactam antibiotics were slightly decreased against *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) and decreased against *S. aureus* M-12 (MRSA) by the addition of 4% NaCl. Against *S. aureus* M-12 (MRSA) the activity of fosfomycin was also decreased by the addition of 4% NaCl. But the activities of vancomycin, minocycline, ofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) and others showed almost no change against MSSA or MRSA in the 4% NaCl supplemented medium. We also determined the effect of the addition of 1%, 3%, 5%, 7% NaCl to the medium on the MICs of arbekacin and netilmicin. Against *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria in addition to *S. aureus*, the MICs of arbekacin and netilmicin rose as the concentration of additional NaCl increased. Our results showed that the effect of NaCl on antibacterial activity varied with the kind of antibacterial compound used. The antibacterial activities of arbekacin and other aminoglycoside antibiotics were decreased by adding NaCl to the medium.