

クレアランス低下2例, 食欲不振3例, 悪心嘔吐3例に grade 3 以上の副作用を認めた。STEP 3 で測定可能病変を有する症例 17 例中 8 例に効果を認め, 奏効率 47.1% (95% CI; 23~71%) であった。

考察: この併用療法の recommended dose は CDDP 60 mg/m と考えられた。骨髄毒性が軽微で抗腫瘍効果も認められるため, 後期第 II 相試験を行う意義があると考えられた。

#### 148 薬剤耐性遺伝子 *mrp* の発現 (肺癌, 消化器癌)

岡三喜男・原 耕平

長崎大学第 2 内科

背景・目的: 癌化学療法において癌細胞の抗癌剤耐性は解決すべき重要な課題である。この耐性機構には, 自然耐性と獲得耐性が存在し, 前者は発生臓器の生物学的特性に依存する。これまで幾つかの耐性機構が報告されているが, 実際臨床に於ける役割は十分解明されていない。近年, 多剤耐性機構として *mrp*/MRP が注目されている。今回, 肺癌, 胃癌, 大腸癌の *mrp*/MRP の発現とその意義について検討した。

材料・方法: 肺癌, 胃癌, 大腸癌の培養株と外科的に切除された癌と正常組織を用いた。各種材料において *mrp*/MRP と *mdr1* の mRNA および MRP の発現を, RT-PCR, *in situ* hybridization と Western blotting (WB) で各々検出した。対照として我々が樹立した *mrp* 高発現の多剤耐性株を用いた。

さらに, 培養株については, *mrp*/MRP 発現と薬剤感受性の相関を MTT 法で検討した。

結果: 肺癌 15 株では, 全株に *mrp* が発現し, 4 株に *mrp*, *mdr1* の共発現がみられた。正常肺では, *mrp* が *mdr1* に比して有意に高発現し, 癌組織でも同様の傾向を示した。胃癌 7 株では, 全株に *mrp* が発現し, *mdr1* の発現は認めなかった。癌組織でも *mrp* が有意に発現していた。大腸癌 10 株では, *mrp* と *mdr1* は低発現の傾向を示したが, 2 株では *mdr1* の中等度発現がみられた。しかし, 癌組織では, 同程度の共発現であった。

WB での MRP 検出には感度の面で限界があり, 小數例の組織でのみ検出され, 免疫染色の必要性がある。

いずれの培養株, 癌組織に於いても *mrp* の癌細胞における発現は不均一であり, 一部の株で薬剤感受性と *mrp* 発現に相関が認められた。

考察: *mrp* の発現には組織特異性があるが, 肺癌, 胃癌の薬剤耐性には *mdr1* より *mrp* の関与が示唆される。しかし, その癌細胞内発現は不均一で, トポイソメラーゼを含めたその他の耐性機構も考慮すべきである。

#### 149 原発性肺癌患者の気道内 potential pathogen の保有率についての検討

平瀧洋一・北村 諭

自治医科大学呼吸器内科

林 和

同 附属病院臨床病理部

目的: 悪性疾患患者はしばしば自己の保有する potential

pathogen による内因性感染を発症し, 直接死因となることも多い。このような観点から血液疾患では患者の監視培養が有用とされているが, 肺癌患者ではそのような検討はまれである。そこで, 今回原発性肺癌患者と良性呼吸器疾患患者の気道の細菌叢を比較した。

方法: 1994 年 1~12 月に入院した感染を伴わない原発性肺癌患者 110 名および良性呼吸器疾患患者 75 名を対象とした。入院後原則として 3 日間連続で喀出痰, 咽頭および鼻腔ぬぐい液を採取した。喀出痰は血液寒天培地, チョコレート寒天培地, DHL 寒天培地で, その他は血液寒天培地で培養した。potential pathogen として *S. aureus*, *S. pneumoniae*, enterococcus, *M. catarrhalis*, 全てのグラム陰性桿菌, yeast の分離頻度について検討した。

結果: 肺癌患者 110 名のうち potential pathogen を保有しない患者は 23 名 (20.9%) のみであった。残り 87 名のうち 20 名は yeast のみを potential pathogen として保有していた。良性疾患患者 75 名のうち potential pathogen を保有しない患者は 35 名 (46.7%) であり, 肺癌患者において有意に potential pathogen の保有率は高かった。肺癌患者から分離された主要な potential pathogen の内訳は *S. aureus* 31 名, うち MRSA 17 名, *S. pneumoniae* 7 名, *H. influenzae* 14 名, 腸内細菌 31 名, *P. aeruginosa* 3 名, その他のブドウ糖非醗酵菌 9 名であった。良性疾患患者では *S. aureus* 15 名, うち MRSA 5 名, *S. pneumoniae* 3 名, *H. influenzae* 4 名, 腸内細菌 7 名, *P. aeruginosa* 4 名, その他のブドウ糖非醗酵菌 4 名であった。いずれの群においても potential pathogen の検出率は喀出痰, 咽頭, 鼻腔の順に高かったが, MRSA のみに限った場合は鼻腔の培養で最も検出率は高かった。

考察: 肺癌患者は良性呼吸器疾患患者より有意に高率に potential pathogen を保有していた。化学療法中あるいは手術後の感染においてはこれらの potential pathogen を考慮した抗菌薬投与が必要と考えられた。

#### ポスターセッション

##### P-1 高度耐性 MRSA における自己溶解酵素の検討

館田映子・平松啓一

順天堂大, 医, 細菌

菅井基行・杉中秀壽

広大, 歯, 細菌

目的及び方法: 一般に増殖期の細菌に  $\beta$ -ラクタム剤を作用させると著明な溶菌が見られる。この溶菌は  $\beta$ -ラクタム剤の標的酵素である transpeptidase の阻害による細胞壁架橋形成阻害だけでなく, 自己溶解酵素が関与していると考えられている。我々は先にプロトタイプ MRSA N 315 株から, *mec* regulator 領域に全く変異の見られない, 特異的高度耐性株 N 315-h 4 株を分離し報告した。この株はメチシリンに対しては低濃度より高濃度で増殖する Eagle Type 耐性を示すが, IPM や他のセフェム剤に高度耐性を示す。この N 315-h 4 株の耐性メカニズムを検討する目的で, 培養菌体が

ら自己溶解酵素を分離し、*M. luteus* 細胞含有の SDS-PAGE により検討した。

結果及び考察: N 315-h 4 株において、N 315 株ではほとんどみられない溶菌活性を持った蛋白が検出された。この溶菌活性を持った蛋白は分子量約 34 KDa で、N 315-h 4 株の対数増殖期後期から静止期の前期で著明に検出された。*S. aureus* の産生する自己溶解酵素のうち、最近菅井らにより精製され押田らによりクローン化された ATL は二つの異なる溶菌活性ドメインを持つ自己溶解酵素で、プロセッシングを受けて 2 種の分泌型溶菌酵素になることが明らかになっている。これらの 50 KDa の endo- $\beta$ -acetyl-glucosaminidase と 62 KDa の N-acetylmuramyl-L-alanineamidase に対する抗血清を用い Western Blot 法により検討したところ、N 315-h 4 株で検出された、34 KDa の溶菌活性を持った蛋白はどちらとも反応しなかった。このことより 34 KDa の溶菌活性を持った蛋白は、既知の自己溶解酵素とは異なるものである可能性が示唆された。しかし高度耐性化との関連性については、まだ明らかになっていない。

## P-2 MRSA のメチシリン高度耐性化を規定する遺伝子のクローニング

近藤典子・有高奈々絵・平松啓一

順天堂大学医学部細菌学教室

目的: プロトタイプ MRSA である N 315 株から得られたメチシリン耐性株では、調べた限り全ての株で *mecI* 遺伝子の突然変異、欠失、あるいは *mecA* 遺伝子のオペレーター部位に変異があり、*mecA* 遺伝子の発現が見られる。しかし、N 315 株を高濃度のメチシリンで選択したところ、*mecI* 遺伝子、*mecA* 遺伝子のオペレーター部位に変異が見られず、そして低濃度のメチシリン存在下では増殖できないが、高濃度のメチシリン存在下で増殖できる Eagle-type MRSA が得られた。さらにこの株を低濃度のメチシリンで選択すると、メチシリン高度耐性株が得られ、この株の *mecI* 遺伝子に変異があり、*mecA* 遺伝子の発現が見られた。つまり、MRSA が高度耐性化するには、*mecI* 遺伝子の変異の他に、もうひとつの（あるいは複数の）変化が起こったと考えられる。我々は、メチシリン高度耐性 MRSA の耐性メカニズムを解明するために、メチシリン高度耐性化を規定する遺伝子のクローニングを行ったので報告する。

方法: 1) Eagle-type MRSA である N 315 h 4 株のライブラリーを作製し、N 315 株へエレクトロポレーションにより導入した。

2) 得られた形質転換株を、メチシリン 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有平板とメチシリン 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有平板にレプリカし、メチシリン 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有平板と比較して、メチシリン 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有平板で、より増殖のよい株を選択した。

結果と考察: 上記の方法により、約 2.1 kb の insert を持った、2 つのプラスミドが得られた。これらのプラスミドが導入された N 315 株は、N 315 h 4 株と同様に Eagle-type の耐性パターンを示した。現在、得られた DNA 断片の塩基配列の決定と、DNA 断片がコードする機能を検討している。

## P-3 MRSA におけるメチシリン耐性発現と IPM 感受性について

田中 妙・有高奈々絵

近藤典子・平松啓一

順天堂大、医、細菌学

目的: *mecA* 遺伝子の発現によって MRSA は中等度耐性を発現するが、一般に imipenem (以下 IPM) には、感受性である。しかし、最近の高度耐性 MRSA は IPM にも耐性を示す。そこで、高度耐性化に伴う IPM の抗菌活性の変化を解析する目的で、以下の実験を行った。

方法: 黄色ブドウ球菌株 1,039 に *mecA* 遺伝子を導入しメチシリン中等度耐性株を得た。さらに、この株から、IPM に接触させることにより高度耐性株を得、それぞれの株及び、これらの株から *mecA* 遺伝子を脱落させた亜株につき、IPM の MIC、トレランスの有無を比較検討した。

結果及び考察: 1,039 株に *mecA* プラスミドを導入しても IPM に対しては感受性であった (MIC 0.015  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。ところが、IPM 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  でセレクションを行った結果、その株の中から  $10^4 \sim 10^6$  に 1 個の頻度で IPM 耐性 (MIC 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の株が得られた。この株から、*mecA* 遺伝子を脱落させると、IPM 感受性になった (MIC 0.03  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。しかし、この株は親株に比して IPM トレランスの亜集団が増加していた。従って、MRSA の高度耐性獲得には、*mecA* によらないメカニズムが加わる必要があると考えられ、このメカニズムは、IPM トレランスの獲得を伴うことが示唆された。

## P-4 *mec* 領域 DNA の染色体への挿入機構の解析

伊藤輝代・浅田和美

山本宗孝・平松啓一

順天堂大学、医学部、細菌学教室

目的: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 及びメチシリン耐性コアグラールゼ陰性ブドウ球菌 (MRC-NS) におけるメチシリン耐性遺伝子周辺の外来遺伝子領域 (*mec* 領域 DNA) のクローニングとその構造解析を行い、その挿入機構を検討した。

材料と方法: MRSA, N 315 株, NCTC 10442 株, 85-3907 株およびメチシリン耐性 *S. haemolyticus* JB 16 株染色体 DNA より各種プローブを用いて *mec* 領域 DNA をクローニングした。MSSA, NCTC 8325 株より *mec* 領域 DNA の挿入部位を含む領域をクローニングした。サザン解析, PCR 法, 塩基配列の決定等を行い、メチシリン感受性株と比較することにより *mec* 領域 DNA の挿入部位を検討した。

結果及び考察: 1. MSSA, NCTC 8325 株染色体 DNA より得られたプローブ 11 に反応するクローン (LD 8325) の 7.4 kb *Hind* III 断片の部分的塩基配列を決定し、MRSA 株と比較することにより、*mec* 領域 DNA の挿入部位を推定した。2. これまでに検討したコアグラールゼ II 型および III 型の大部分の MRSA の *mec* 領域 DNA は N 315 株あるいは 10442 株と同じ特定の部位に挿入されていることを PCR 法及び塩基配列の決定により確認した。3. N 315 株の *mec* 領

域 DNA より作成したプローブを用いて MRC-NS の反応性を検討したところ、*S. haemolyticus* の場合検討した 4 株のうち 3 株がプローブ 2-10 まで反応し、N 315 株と同様の長い *mec* 領域 DNA を持っていると考えられた。このような株の一つ JB 16 株を用いてクローニングを行い、*mec* 領域 DNA の挿入領域を現在検討中である。

今後、他のコアグラーゼ型の MRSA 株における *mec* 領域 DNA の挿入部位を検討するとともに、MRSA および MRC-NS に於ける挿入部位の比較検討を行っていきたい。

## P-5 メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* の *llm* 遺伝子変異を補うメカニズムについて

巻 秀樹・村上和久

塩野義製薬(株) 創薬第一研究所

目的: 我々は、昨年の総会で報告した高度メチシリン耐性と自己溶菌速度に影響する遺伝子を *llm* と命名した (J Bacteriol 176: 4993-5000, 1994)。SRM 563 株は高度 MRSA SRM 551 株の *llm* への Tn 918 挿入変異で得られた中等度 MRSA である。臨床分離される他の中等度 MRSA と同様に、SRM 563 は高濃度メチシリン存在下でも生育可能な subpopulation をもつ、いわゆる heterogeneity を示す。SRM 563 のこの様な subpopulation では、耐性度の低下をもたらした *llm* 変異がどのように補われるかについて調べた。

方法: Ca 法で *S. aureus* の形質転換を行った。*llm* 近傍のプライマーを用いた PCR 及びダイレクトシーケンシングにより、*llm* 近傍の塩基配列の変化を調べた。

結果: SRM 563 (*llm*: Tn 918 (TC<sup>r</sup>), メチシリン MIC 12.5 µg/ml) をメチシリン 400 µg/ml 含有培地で培養し、生育した高度耐性化株の 1 株を SRM 572 とした。SRM 572 の *llm* に Tn 918 が挿入されていることを確認し、SRM 572 の DNA で TC<sup>r</sup> をマーカーにして親株 SRM 551 を形質転換した。その結果、*llm* 近傍領域を SRM 572 のものと組換えた形質転換株 SRM 574 を得たが、SRM 563 のような耐性度の低下はみられなかった。SRM 572, SRM 574 では、ともに *llm* の上流に IS 256 の挿入があることがわかった。他の SRM 563 の高度耐性化株でも *llm* 上流に IS 256 が検出されたが、全て同一方向に挿入されていた。挿入部位は少なくとも 3 ヶ所あることがわかった。一方、挿入断片のない株も存在していた。

考察: *S. aureus* の遺伝子変異を spontaneous に回復させるメカニズムの一つとして、*S. aureus* の染色体にもともと存在する IS 256 が関わる事が明らかにされた。しかし、IS 256 だけが SRM 563 の heterogeneity に関わるわけではないようである。

## P-6 *Staphylococcus aureus* におけるクマリン系抗生物質の耐性機構について

加藤和彦・西野武志

京都薬大・微生物

目的: クマリン系抗生物質は DNA ジャイレースの B サブユニットに作用することが知られており、*Escherichia coli*,

halophilic archaeobacteria において *gyrB* の変異による耐性が報告されている。今回、我々は *S. aureus* におけるクマリン系抗生物質の耐性機構を *gyrB* の変異を調べることにより検討を行った。また、トポイソメラーゼ IV の B サブユニットをコードする *grlB* についても変異の検討を行った。

方法: *S. aureus* FDA 209-P 株より、coumermycin A<sub>1</sub> (CMRM), novobiocin (NB) を用いて耐性変異株を選択した。そして、得られた変異株の *gyrB* 及び *grlB* について PCR を用いた直接塩基配列決定法で変異を調べた。また、一本鎖 DNA 高次構造多型 (SSCP) 法によって *gyrB* の変異の検出及び分類を試みた。

結果及び考察: 得られた耐性変異株 (22 株) の MIC を測定したところ、CMRM に感受性を示し NB に低度の耐性を示すグループ (グループ 1) 3 株と CMRM, NB 双方に耐性を示すグループ (グループ 2) 18 株、さらに CMRM に耐性を示し NB に感受性を示すグループ (グループ 3) 1 株に分類することができた。*gyrB* の変異は 22 株中 21 株で認められ、変異部位はすべて Arg-144 (AGA) でみられた。そして、グループ 1 ではすべて Lys (AAA) への変異であり、グループ 2 では Thr (ACA; 1 株), Ser (AGC; 1 株), Ser (AGT; 3 株), Ile (ATA; 13 株) への変異がそれぞれ認められた。なお、グループ 3 の 1 株は変異が認められなかった。また SSCP 法を行ったところ、これらの変異を泳動パターンによって検出及び分類することができた。さらに *grlB* においては、すべての株で変異が認められなかった。以上の結果より、*S. aureus* において *gyrB* の Arg-144 の変異はクマリン系抗生物質の耐性に深く関与していることが示唆された。

(会員外共同研究者: 奇原美佳)

## P-7 黄色ブドウ球菌 DNA topoisomerase IV のキノロン耐性変異

山岸純一<sup>1,2)</sup>・小山田義博<sup>1)</sup>・藤本孝一<sup>1)</sup>

小島 毅<sup>1)</sup>・服部宏昭<sup>1)</sup>・中村信一<sup>1)</sup>

井上松久<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 大日本製薬生物科学研究所

<sup>2)</sup> 北里大学医学部微生物学教室

私共は、黄色ブドウ球菌のキノロン高度耐性機構を研究中、新規キノロン耐性遺伝子として、DNA gyrase とアミノ酸レベルの相同性が高い遺伝子即ち、DNA topoisomerase IV (Topo IV) の subunit A をコードする遺伝子 *grlA* を見い出した (第 41 回東日本化療学会)。また時を同じくして、L. Ferrero 等並びに W. M. Huang 等も、*grlA* 遺伝子をそれぞれ黄色ブドウ球菌及びブドウ菌からクローニングしており、Topo IV 蛋白質は、キノロンの新しい target として注目されている。しかし、黄色ブドウ球菌 *grlA* の変異がキノロン耐性の真の原因であるか否かは明らかでない。この点を明らかにするために、野生型 *grlA* 遺伝子をクローン化し、形質転換による解析を行った。

方法: 野生型遺伝子は、*S. aureus* RN 4220 より、既にクローン化したキノロン耐性 *grlA* 遺伝子を基にして、PCR-based screening 法を用い、pND 50 にクローン化した。

結果及び考察: キノロン耐性変異型 *grlA* をクローン化したプラスミド, pRK 503 を *S. aureus* RN 4220 に導入すると, NFLX 6.25  $\mu\text{g/ml}$  及び CPFY 1.56  $\mu\text{g/ml}$  (それぞれ親株の 8 及び 4 倍) の耐性を示した。一方, 野生型 *grlA* をクローン化したプラスミド, pRK 509 を *S. aureus* KMP 9 (キノロン高度耐性臨床分離株) に導入しても, 耐性は親株と同一であった。このことは, キノロン耐性 *grlA* 変異が野生型対立遺伝子に対して, 優性であることを示唆している。塩基配列解析の結果, 変異型 *grlA* 遺伝子は, 野生型に比べ, 3カ所のアミノ酸の置換が認められたが, 両方の遺伝子より, ハイブリッド遺伝子を作製し, キノロン耐性変異アミノ酸残基の絞り込みを行った所, Ser-80 $\rightarrow$ Phe, Glu-84 $\rightarrow$ Lys の変異がキノロン耐性に関与することが判明した。これらの変異は, DNA gyrase の *gyrA* キノロン耐性変異部位に対応しており, キノロンの topo IV への作用様式は本質的に DNA gyrase と類似していることが示唆された。

## P-8 Topo IV 変異黄色ブドウ球菌のキノロン自然耐性菌の出現頻度

藤本孝一<sup>1)</sup>・山岸純一<sup>1,2)</sup>・小山田義博<sup>1)</sup>  
小島 毅<sup>1)</sup>・服部宏昭<sup>1)</sup>・中村信一<sup>1)</sup>  
井上松久<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 大日本製薬生物科学研究所

<sup>2)</sup> 北里大学医学部微生物学教室

黄色ブドウ球菌の SPFX 自然耐性菌を, 実験室レベルの SPFX 一段階選択により得ることは困難である。しかし, 臨床において, SPFX 高度耐性株が分離されている。この原因を明らかにするために, キノロン高度耐性臨床分離 MRSA 株より, キノロン耐性に関与する遺伝子をクローン化した。その結果, 既知の *norA* 及び *gyrA* 遺伝子のほかに, 新規キノロン耐性遺伝子として, DNA topoisomerase IV (Topo IV) subunit A をコードする遺伝子 *grlA* を見出した。更に, 他の臨床分離株を調べると, キノロン高度耐性株からは, *gyrA* と *grlA* の変異が同時に認められ, 低度耐性株からは, *grlA* 変異が検出された。そこで, 黄色ブドウ球菌のキノロン高度耐性獲得のプロセスを解析するために, *norA* 及び *grlA* 変異が, キノロン自然耐性菌の出現頻度に及ぼす影響について, 検討したので報告する。

方法: *norA* 遺伝子をクローン化したプラスミド, pRK 1 並びにキノロン耐性変異型 *grlA* 遺伝子をクローン化したプラスミド, pRK 3 をそれぞれ *S. aureus* RN 4220 (野生株) に導入し, 形質転換体 (*S. aureus* RN 4220/pRK 1 & *S. aureus* RN 4220/pRK 3) を作製した。これらの株を用い, 各種キノロンによる自然耐性菌の出現頻度を調べた。

結果及び考察: *S. aureus* RN 4220/pRK 1 の NFLX 及び CPFY 等の親水性キノロンの自然耐性菌の出現頻度は,  $1.3 \times 10^{-9}$  及び  $2.1 \times 10^{-10}$  であったが, SPFX 及び OA の場合は,  $1.7 \times 10^{-10}$  以下であった。この傾向は, 野生株の結果と類似していた。一方, *S. aureus* RN 4220/pRK 3 を用いると, いずれのキノロン系化合物でも,  $1 \sim 90 \times 10^{-8}$  の高頻度に自然耐性菌が出現し, 得られた耐性株はクロモゾーム上に *gyrA* 変異が起こっており, キノロンに高度耐性化してい

た。以上のことより, 黄色ブドウ球菌の *grlA* に変異が起こると, SPFX 等の疎水性キノロンの選択によっても他のキノロンと同様にキノロン高度耐性株が生じることが, 判明した。

## P-9 一本鎖高次構造多型法による黄色ブドウ球菌 *gyrA* 遺伝子点変異の検出およびキノロン系抗菌剤感受性と変異との関係

竹之内俊<sup>1)</sup>・石井千絵<sup>1)</sup>・菅原美恵<sup>2)</sup>  
徳江 豊<sup>3)</sup>・大屋 哲<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 三共株式会社第二生物研究所

<sup>2)</sup> 同 バイオメディカル研究所

<sup>3)</sup> 国立がんセンター中央病院

日本各地の 15 病院より分離された黄色ブドウ球菌臨床分離株 451 株の *gyrA* 遺伝子の点変異を, 一本鎖高次構造多型法と制限断片長多型法の組み合わせおよび直接塩基配列決定法により解析した。451 株中 149 株 (33.0%) に 6 種類の *gyrA* 変異が認められ, そのうち 147 株 (98.7%) は OFLX の MIC が 6.25  $\mu\text{g/ml}$  以上の耐性株であった。これらの変異はコドン 84~88 に限局しており, ニューキノロン剤耐性と連関していた。このほか 2 種類のサイレント変異も認めた。これら 8 種類の変異のうち 3 種類, すなわち Ser-84 $\rightarrow$ Val (TCA $\rightarrow$ GTA), Ser-84 $\rightarrow$ Leu (TCA $\rightarrow$ TTA) + Ile-86 (ATC $\rightarrow$ ATT, サイレント), Phe-110 (TTT $\rightarrow$ TTC, サイレント) は新規の変異であった。GyrA 変異株の中では Ser-84 $\rightarrow$ Leu 変異株 (108 株) と Glu-88 $\rightarrow$ Lys 変異株 (37 株) が多く, Ser-84 $\rightarrow$ Ala 変異株や Glu-88 $\rightarrow$ Gly 変異株は少なかった。検討したすべてのニューキノロン剤は各々の GyrA 変異株に対して, 感受性株の 4 倍以上高い MIC<sub>50</sub> 値を示した。Ser-84 $\rightarrow$ Leu や Ser-84 $\rightarrow$ Val 変異株は高度耐性を示したが, Ser-84 $\rightarrow$ Ala 変異株の耐性は比較的低かった。二重変異株は単独の変異株よりも高度耐性化していた。現在使用されているニューキノロン剤の多く (NFLX, ENX, OFLX, CPFY, TFLX, LMLX, SPFX, FLRX) は, どの GyrA 変異株に対しても無効であったが, CS-940 と AM-1155 は比較的高い頻度で検出される Glu-88 $\rightarrow$ Lys 変異株に対しては有効であった。OFLX, AM-1155, CS-940 や ENX は GyrA 変異による抗菌力低下の程度が比較的小さく, NFLX や LFLX は大きかった。

## P-10 黄色ブドウ球菌キノロン耐性株におけるトポイソメラーゼ IV (*grlA*) 変異

田中真由美・前川啓二  
佐藤謙一・早川勇夫

第一製薬探索第一研究所

キノロン系抗菌剤の新たな標的酵素としてトポイソメラーゼ IV が報告されている。本酵素は大腸菌では DNA ジャイレースに次ぐ第二の標的とされているが, 黄色ブドウ球菌ではそのキノロン耐性への関与から第一の標的と報告された (Ferrero, Mol. Microbiol. 13: 641, 1994)。そこで DU-6859 a 2 MIC 含有平板上に黄色ブドウ球菌 FDA 209-P 株を塗抹

し、37℃一夜培養後に形成した5コロニー（出現頻度  $4.4 \times 10^{-9}$ ）、増量継代法で DU-6859 a, レボフロキサシン, シプロフロキサシンおよびスパルフロキサシンで選択した4株、および臨床分離株6株を用いて、トポイソメラーゼIVサブユニットA (*grlA*) 変異の有無を検討した。実験株では増量継代法の DU-6859 a およびスパルフロキサシン選択株以外は *gyrA* 変異を有さなかったが、臨床分離株は全株に *gyrA* 変異が存在していた。これらの株の *grlA* の一部を、PCR法による増幅、TA クローニングキット (IN VITROGEN 社) を用いたクローニング後、プラスミドを精製し、蛍光シーケンサー (ファルマシア) により部分塩基配列を決定し、60 から 130 番目のアミノ酸の変異を確認した。その結果、DU-6859 a 2 MIC で選択した1コロニーおよび臨床分離株全てに *grlA* のセリン-80 のフェニルアラニンへの変異 (TCC→TTC) が認められた。また、増量継代法のスパルフロキサシン選択株でグルタミン酸-84 がグルタミンに変異 (GAA→CAA) しており、臨床分離株ではグルタミン酸がリジンに変異 (GAA→AAA) した二重変異株も存在した。黄色ブドウ球菌では、大腸菌の場合とは異なり、*grlA* 変異が *gyrA* の変異が存在しない株においても認められ、キノロン剤の感受性がトポイソメラーゼIV阻害活性に依存している可能性が示唆された。しかし、*gyrA* のみに変異の認められた株も存在し、この株と *grlA* および *gyrA* 変異の確認されなかった株については今後さらに *grlB* 変異等を検討する予定である。

#### P-11 キノロン剤の作用耐性機構における Topo IV 阻害の意義について (1)

星野一樹・赤坂高明  
佐藤謙一・早川勇夫

第一製薬 (株) 探索第一研究所

目的: 我々は昨年度の本総会において、大腸菌由来トポイソメラーゼIV (Topo IV) に対するキノロン剤の阻害活性を検証し、キノロン剤がトポイソメラーゼIVのデカテネーション活性を阻害し、かつその阻害活性がDNA ジャイレースに対する阻害活性と正の相関性があることを報告した。今回我々は、キノロン剤の抗菌活性発現における Topo IV 阻害の意義をより明確にするため、実験室内において Topo IV の一方のサブユニットをコードする *parC* 遺伝子の変異体を作成し、この変異体に対するキノロン剤の抗菌活性の比較から、キノロン耐性大腸菌における Topo IV 変異の影響を検証したので報告する。

材料および方法: 使用菌株; 大腸菌 HB101 株を levofloxacin (LVFX) 含有培地中で7代継代培養し、LVFX の MIC 値が 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を示すキノロン耐性株 DNS 5101 株を使用した。変異 *parC* 遺伝子の作成; 野生型 *parC* を鋳型にし、 $\text{Mn}^{2+}$  濃度の変化による読み違いを利用した PCR 法により変異 *parC* ライブラリーを構築した。*parC* disruptant の作成; P1 ファージおよび miniF プラスミドを利用することにより、DNS 5101 株の染色体上 *parC* を破壊し、miniF 上の *parC* により生育可能となった C1 株を作成した。

結果および考察: DNS 5101 株の DNA ジャイレースの性

状を検証した結果、本 DNA ジャイレースは高度キノロン耐性変異を生じていることが明らかとなった。C1 株に野生型 *parC* あるいは変異型 *parC* ライブラリーを導入した結果、LVFX の MIC 値が感受性 (0.39  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、低度 (1.56)、中等度 (6.25)、高度耐性 (25) の4段階を示す導入株が得られた。一方、耐性度の上昇はキノロン間で異なり、DU-6859 a では MIC 値の上昇が小さかった (感受性 (0.2)、低度 (0.39)、中等度 (0.78)、高度耐性 (0.78))。以上の結果より、今回供試した変異型 *parC* 導入株に対するキノロン剤の MIC 値が、キノロン剤の DNA ジャイレースに対する阻害活性ではなく Topo IV に対する阻害活性により規定されていることが明らかとなった。すなわち、キノロン剤の MIC 値は、DNA ジャイレースあるいは Topo IV のうち、キノロン剤に対しより阻害を受けやすい酵素の阻害に規定されることが示唆された。また、変異 Topo IV に対するキノロン剤の阻害活性は、キノロン剤間で相違があることが確認された。

共同研究者: 熊谷由美, 加藤潤一, 池田日出男 (東大医科研生物物理化学研究部) 前川啓二, 早田憲司, 藤原弘之, 堀内正 (第一製薬 (株))

#### P-12 キノロン剤の作用耐性機構における Topo IV 阻害の意義について (2)

赤坂高明・星野一樹  
佐藤謙一・早川勇夫

第一製薬 (株) 探索第一研究所

目的: キノロン耐性臨床分離大腸菌において、そのキノロン耐性機構における Topo IV 阻害の意義を検証したので報告する。

材料および方法: 臨床分離のキノロン耐性大腸菌において、pBR 322 に野生型 *parC* をサブクローニングしたプラスミドを用いた Dominance test を実施し、Topo IV 変異株を選別した。次に、*parC* 変異株と推定されたキノロン耐性株および野生型株 (KL-16) より PCR 法を用いて *parC* を含む DNA 断片を調製し、本断片を miniF プラスミドにクローニングし、耐性株由来の *parC* を持つプラスミドを構築した。また、PCR 法により *parC* の *gyrA* キノロン耐性決定領域と相同性の高い領域を増幅し、この部位の塩基配列を決定した。

結果および考察: キノロン耐性大腸菌 8 株中 5 株において、野生型 *parC* 導入にともなう MIC 値の低下が観察された。よって、これら 5 株の臨床分離キノロン耐性大腸菌は、*parC* の変異によりキノロンに対し耐性を示すことが推察された。

さらに、染色体上にキノロン耐性変異 *gyrA* を有する実験室株に、*parC* 変異株と推定された耐性株由来の *parC* を持つプラスミドを導入した株は、対照となる野生型 *parC* を持つプラスミドを導入した株よりも高い MIC 値を示した。したがって、これら 5 株のキノロン耐性株の MIC 値は Topo IV 変異 (*parC* 変異) により規定されていることが明らかとなった。

一方、DNA ジャイレース A サブユニットをコードする *gyrA* には、キノロン耐性において変異部位が多く集まるキノロン耐性決定領域が存在する。*parC* にも *gyrA* のキノロ

ン耐性決定領域と相同性の高い領域が存在している。そこでこの部位の塩基配列を決定したところ、アミノ酸の置換が確認された。また、変異したアミノ酸 Gly 78, Ser 80 および Glu 84 は、キノロン耐性型 *gyrA* でも多くの変異が確認されているアミノ酸 Gly 81, Ser 83 および Asp 87 に一致した。以上の結果より、Topo IV および DNA ジャイレースは、キノロン剤に対し同様な変異様式により耐性を獲得することが明らかとなった。

共同研究者: 熊谷由美, 加藤潤一, 池田日出男 (東大医科研生物物理化学研究部) 前川啓二, 早田憲司, 藤原弘之, 堀内 正 (第一製薬 株)

### P-13 男子尿道炎由来のキノロン耐性淋菌臨床分離株における DNA gyrase *gyrA* 遺伝子の変異について

出口 隆<sup>1)</sup>・安田 満<sup>1)</sup>・浅野 学<sup>1)</sup>  
尾関茂彦<sup>1)</sup>・江崎孝行<sup>2)</sup>・斎藤 功<sup>3)</sup>  
河田幸道<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 岐阜大学泌尿器科

<sup>2)</sup> 岐阜大学微生物

<sup>3)</sup> 東京共済病院泌尿器科

目的: ニューキノロン剤は、男子尿道炎の治療に汎用され、その有用性が示されてきたが、ニューキノロン剤無効例やキノロン耐性の淋菌臨床分離株の増加が報告され、新たな問題となってきている。一方、キノロン耐性には、キノロン剤の target enzyme である DNA gyrase GyrA 蛋白をコードする *gyrA* 遺伝子の変異が大きな役割を果たしていることが示されてきた。そこで、キノロン耐性淋菌の臨床分離株における *gyrA* 遺伝子の変異について検討した。

材料および方法: 男子尿道炎由来の淋菌臨床分離株 55 株を対象とした。55 株に対するキノロン剤の MIC の測定を行い、キノロン耐性の淋菌 31 株の *gyrA* 遺伝子の解析を行なった。*gyrA* 遺伝子のいわゆるキノロン耐性決定領域を含む DNA 断片を polymerase chain reaction (PCR) 法にて増幅し、PCR 産物の塩基配列を決定した。

結果: 55 株の淋菌臨床分離株はキノロン剤に感受性を有する群と耐性の群とに二分された。耐性群の 31 株の *gyrA* 遺伝子の解析の結果では、31 株全てが *gyrA* 遺伝子の変異を有し、Ser-91 → Phe (22 株), Asp-95 → Asn (4 株), Ser-91 → Tyr (2 株), Ser-91 → Phe, Asp-95 → Asn (2 株) と Ser-91 → Phe, Asp-95 → Gly (1 株) の 5 種類のアミノ酸の置換を伴う変異であった。

考察: キノロン耐性淋菌の臨床分離株においても他のキノロン耐性の細菌におけるのと同様に、GyrA 蛋白のアミノ酸の置換を伴う *gyrA* 遺伝子の変異が、キノロン剤に対する耐性化に重要な役割を果たしていることが示された。

### P-14 *In vitro* で選択した淋菌キノロン耐性変異株における DNA gyrase *gyrA* 遺伝子の変異について

安田 満<sup>1)</sup>・出口 隆<sup>1)</sup>・尾関茂彦<sup>1)</sup>

浅野 学<sup>1)</sup>・福田秀行<sup>2)</sup>・江崎孝行<sup>3)</sup>

斎藤 功<sup>4)</sup>・河田幸道<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 岐阜大学泌尿器科

<sup>2)</sup> 杏林製薬中央研究所細胞化学研究部

<sup>3)</sup> 岐阜大学微生物学

<sup>4)</sup> 東京共済病院泌尿器科

目的: 淋菌は各種抗菌剤に対して良好な感受性を示していたが、近年ニューキノロン剤に対して耐性を示す例が報告されており問題となりつつある。また、他の菌種においてキノロン耐性獲得に、キノロン剤の target enzyme である DNA gyrase GyrA 蛋白をコードする *gyrA* 遺伝子の変異が重要な役割を果たしていることが示されている。そこで、*in vitro* においてキノロン感性株を耐性化させ、*gyrA* 遺伝子の変異を検討した。

方法: NA, NFLX に対する MIC がそれぞれ 0.25, 0.008  $\mu\text{g/ml}$  である WHO A 株を用いた。WHO A 株を NFLX がそれぞれ MIC 値の 2, 4, 8, 16 倍含まれたチョコレート寒天培地に接種し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件で 24 時間培養し、耐性出現頻度を計算した。*gyrA* 遺伝子の塩基配列は、PCR 法により *gyrA* 遺伝子のいわゆるキノロン耐性決定領域を増幅し、PCR 産物を用いて決定した。

結果: 耐性出現頻度はそれぞれ  $7.9 \times 10^{-4}$ ,  $1.2 \times 10^{-4}$ ,  $2.8 \times 10^{-3}$ ,  $3.3 \times 10^{-3}$  であった。耐性株 R-4-5, R-8-4, R-8-5 の MIC は、NA はすべて 128  $\mu\text{g/ml}$ , NFLX に対しては 0.5, 0.5, 0.25  $\mu\text{g/ml}$  であった。*gyrA* 遺伝子の解析では、それぞれ Ser-91 → Phe, Ser-91 → Tyr, Asp-95 → Asn にアミノ酸の置換を伴う変異がみられた。

考察: *in vitro* において実験的にキノロン耐性株を作製したところ、アミノ酸の置換を伴う *gyrA* 遺伝子の変異がみられたことより、キノロン耐性淋菌臨床分離株においても同様に、*gyrA* 遺伝子の変異によりキノロン耐性を獲得していると示唆された。

### P-15 PCR を用いた imipenem 加水分解酵素遺伝子 *cfiA* gene の検出について (第 2 報)

山添喜久雄・加藤直樹・加藤はる

田中香お里・渡辺邦友

岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設

片桐義博

岐阜大学医学部附属病院薬剤部

我々は昨年の本学会において *Bacteroides fragilis* の imipenem (IPM) 分解酵素である metallo- $\beta$ -lactamase (ML) をコードする *cfiA* gene の *B. fragilis* 臨床分離株における分布を polymerase chain reaction (PCR) を用いて検討した成績を報告したが、Podglajen らは *cfiA* gene 陽性、IPM 感受性 *B. fragilis* 株は one-step mutation により IPM に耐性化すると同時に、*cfiA* gene に接する上流領域に挿入配列 (IS 1186) が検出されるようになることを報告した。そこで、今回は当施設に保有する株を用いて同様の実験を試みた。また、PCR 法を用いて *B. fragilis* 以外の *B. fragilis* group の菌種からの *cfiA* gene の検出を試みた。

One-step mutation 実験は IPM 感受性 (MIC,  $\leq 0.78$

$\mu\text{g/ml}$ ) で *cfiA* gene 陽性と陰性の *B. fragilis* 4 株ずつを IPM 16  $\mu\text{g/ml}$  含有寒天培地に接種することにより行った。MIC の測定は寒天平板希釈法により行った。IS 1186 遺伝子の検出は Podglajen らの方法に従った。*cfiA* gene の検出は先回の報告に従った。

One-step mutation による IPM 耐性化は今回使用した株では見られず、Podglajen らの見いだした所見は必ずしも普遍的なものではないと思われた。IS 1186 遺伝子用 PCR は *cfiA* gene 陽性、ML 陽性株では陽性であったが、*cfiA* gene 陽性、ML 陰性株では陰性であった。このことから、*cfiA* gene の上流領域に IS 1186 遺伝子が挿入されると *cfiA* gene が発現され IPM に耐性化することと思われた。*B. fragilis* 以外の 98 株では IPM に感性、耐性に関係なく *cfiA* gene は検出されず、*cfiA* gene は *B. fragilis* に固有の遺伝子であることが示唆された。

#### P-16 Extended-spectrum $\beta$ -lactamase (Toho-1) の構造的特徴

石井良和・大野 章・辻 雅克  
館田一博・松本哲哉・宮崎修一  
山口恵三

東邦大学医学部微生物学教室

目的: Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESB) を産生する腸内細菌科が、15 年ほど前から欧米を中心に分離されるようになり、臨床問題となっている。私達が報告した Toho-1 および多くの ESB は、そのアミノ酸配列から、クラス A の  $\beta$ -lactamase に分類される。Frere らは、 $\beta$ -lactamase の基質特異性の拡張に関与するアミノ酸について報告している。今回は、基質特異性に関与すると考えられる新たなアミノ酸を見いだすことを目的に、Toho-1 を含む class A に分類される  $\beta$ -lactamase のアミノ酸配列をさらに詳細に比較検討した。その結果、基質特異性の拡張に関与していると考えられる新たなアミノ酸を見いだしたので報告する。

方法: アミノ酸配列は、国立遺伝学研究所の ODN を用いて解析した。アミノ酸の対応付けは、*S. aureus* PC-1 由来の  $\beta$ -lactamase を基準にした。なお、構造最適化は、AMBER Ver. 3.0 を用い、活性に重要なアミノ酸および水分子を固定し、他のアミノ酸の側鎖について行った。

結果および考察: Toho-1 は、 $\beta$ -lactamase 活性に特に重要であるアミノ酸、S<sup>70</sup>、K<sup>76</sup>、S<sup>100</sup>、N<sup>102</sup>、E<sup>166</sup>、K<sup>234</sup>、S<sup>285</sup>、R<sup>244</sup> の中で、R<sup>244</sup> が別のアミノ酸に置換されていた。このことは、Toho-1 と類似性の高い *E. coli* MEN-1、*K. oxytoca* や *S. albus* G 由来の  $\beta$ -lactamase にも認められた。モデリングした Toho-1 の立体構造と *S. aureus* PC-1 のそれを重ね合わせると、R<sup>244</sup> の Guanidino 基の近傍に R<sup>276</sup> の Guanidino 基が存在し、対応可能であることが推察された。*S. aureus* PC-1 由来  $\beta$ -lactamase の R<sup>244</sup> は、 $\beta$ -lactam のカルボニルの認識に重要であるが、Toho-1 では R<sup>276</sup> が  $\beta$ -lactam のカルボニルの認識に関与しているものと考えられる。

#### P-17 ProteinA・IgG 結合ドメイン数分類による黄色ブドウ球菌の薬剤耐性の傾向

前澤浩美<sup>1)</sup>・吉沢幸夫<sup>2)</sup>・坂本光男<sup>1)</sup>  
吉田正樹<sup>1)</sup>・柴 孝也<sup>1)</sup>・酒井 紀<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京慈恵会医科大学内科 (II)

<sup>2)</sup> 同 アイソトープセンター

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の存在は臨床上重要な問題である。1993 年 7 月から 1994 年 6 月の 1 年間の当科における外来通院患者 19 例と入院患者 82 例の計 101 例から検出された黄色ブドウ球菌を対象に、Polymerase Chain Reaction 法にて、メチシリン耐性の有無、ProteinA・IgG 結合ドメイン数の分類を行った。また、併せて、コアグララーゼ型、ファージ型別分類、感受性検査も行い遺伝子的背景を含めた臨床的検討を行った。メチシリン耐性を有する 40 株のうち、ProteinA・IgG 結合ドメイン数 5 個、4 個、3 個を有した株はそれぞれ 5 株、34 株、1 株、一方メチシリン耐性を有さない 61 株は同様に 38 株、21 株、2 株認められた。ProteinA・IgG 結合ドメイン数 2 個、0 個の株は認められなかった。メチシリン耐性を有した株のうち ProteinA・IgG 結合ドメイン数 4 個の株は、メチシリン耐性を有さない株に比して有意に高率に認められた ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2 = 22.92$ )。コアグララーゼ型分類では II 型が 46 株 (45.5%) と高率に認められた。さらにメチシリン耐性を有し、かつ ProteinA・IgG 結合ドメイン数 4 個の株ではコアグララーゼ II 型が 30 例に認められ、ファージ型別で NT (判定不能) が 16 株 (53.3%) 認められたが、残りは、I、IM、I II III、III、III M、III V、V に各々 1~5 株と、多様にわたり、同一由来株でないことが確認された。また感受性検査でメチシリン耐性を有した株では、ProteinA・IgG 結合ドメイン数 4 個の株に耐性度が強かった。従って当科のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌臨床株においては、ProteinA・IgG 結合ドメイン数 4 個の株の出現頻度が比較的高いことが示唆された。

#### P-18 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を $\beta$ -ラクタム剤に感受性化させる因子の発見

田島 裕・永沢善三・田辺一郎  
草場耕二・只野壽太郎

佐賀医科大学附属病院検査部

タングステン酸とリン酸の混合溶液を長期間放置したところ、保存中に未知の化合物「因子 T」が生成し、この因子 T は、MRSA を  $\beta$ -ラクタム剤に感受性化させる効果があることが偶然発見された。この感受性化効果は、構成型・誘導型の両タイプの MRSA に見られ、因子 T 単独では、過剰に加えられない限り菌の増殖抑制効果は低い。また、 $\beta$ -ラクタム剤のみでも MRSA の増殖抑制はさほど見られないが、両者が共存すると著しい増殖抑制効果が表れる。

因子 T は、酸性下でリン酸とタングステン酸の混合溶液を加熱すると効率よく生成する。興味深いことに、他の化合物の組み合わせではこのような効果は見られない。また、このような著しい感受性化効果は MRSA・ $\beta$ -ラクタム剤・因子 T の組み合わせに限って認められ他の薬剤や感受性菌・緑膿

菌などの他の耐性化した菌種では起こらない特異性の高い現象である。

因子Tを先に MRSA に作用させておき、後から  $\beta$ -ラクタム剤を加えると、菌は直ちに増殖が抑制されるが、加える順序を逆にすると増殖抑制効果の発現までには数時間を要するようになる。即ち、因子Tの感受性増感効果を完全に発現させるためには、因子Tと MRSA を最低でも2~3時間は接触させておかななくてはならず、また、こうして  $\beta$ -ラクタム剤へ感受性させても、因子Tを培地から除いてしまうと菌は1時間ほどで再び  $\beta$ -ラクタム剤への耐性を獲得する。高温で菌を培養して MRSA を完全に感受性化させてしまうと、因子Tによる増強効果は現われなくなるので、因子Tの作用機序については、(MRSA の耐性の本質を担うと目されている  $\beta$ -ラクタム剤に低親和性の細胞壁合成酵素) PBP 2' を直接失活させるのではなく、その誘導を止めて MRSA 株を感受性化させている可能性が高い。

Ref. Microbiol. Immunol. 37, 695~703, 1993

### P-19 MRSA に対するリゾチームの $\beta$ -lactam 抗菌力増強作用メカニズム

大野 章・石井良和

東 康之・山口恵三

東邦大学医学部微生物学教室

目的: 我々は本学会において、黄色ブドウ球菌の PBP 4 に高い親和性を有する  $\beta$ -lactam に対し、リゾチームが強い抗菌力増強作用を示すこと、またこの増強作用が MSSA よりも MRSA に著しいことを明かにし報告してきた。今回その作用メカニズムについて精製ペプチドグリカンの構造の面から検討を加えた。

方法: MRSA 91 および  $\Delta$  *mec* MS mutant 91-2 そして *mec* MS mutant 91-5 のフロモキシセフ 1/8 MIC 処理および無処理菌体から、Park らの方法に準じてペプチドグリカンを精製した。逆相 HPLC により各ペプチドグリカンに対する架橋度を、またヒドロキシルアミン法により MurNAc 6 位水酸基のアセチル化率を測定した。また各ペプチドグリカンに対するリゾチームの加水分解速度を溶菌初速度にて比較した。

結果: フロモキシセフの MIC を指標とした場合、リゾチームは MRSA 91 に対して8管、91-2 に対して1管、91-5 に対して3管減少させた。フロモキシセフ 1/8 MIC 処理菌体のペプチドグリカンに対するリゾチームの溶菌初速度は、これら isogenic strains 間で差を認めなかった。またリゾチームのフロモキシセフに対する抗菌力増強作用の要因と考えられるペプチドグリカンの架橋率減少度は、isogenic strains 間ではほぼ同様であった。またもう一つの要因であるアセチル化率にも差は認められなかった。フロモキシセフに対するリゾチームの抗菌力増強作用が、*mec* 遺伝子を有する株で著しく高い原因は、少なくとも精製段階でのペプチドグリカン構造の差に起因しなかった。一方 MRSA は MSSA に比し菌体オートリシン活性が高いことが報告されていることから、リゾチームとオートリシンの相乗効果が、リゾチームの抗菌力増強作用に関係していることも示唆される。

### P-20 MRSA における $\beta$ -ラクタム系抗菌薬による自己溶菌酵素活性の変化

東 康之・若林亜紀子・渡辺裕二

藤沢薬品工業(株)開発第一研究所・化療

先に我々は高度耐性 MRSA に細胞壁架橋度を維持し、強度を保持するための何らかの機構が存在する可能性について報告した(1993年本学会西日本支部総会)。今回、 $\beta$ -ラクタム剤の作用による自己溶菌酵素活性の変化について検討を行った。

菌株は臨床分離の MRSA から得られた高度耐性株と感受性株(PBP 2'非産生)を用いた。自己溶菌酵素は薬剤非存在下、あるいは存在下で一晩培養した菌体より抽出した。被検薬は PBP 2' に高い親和性を示す FK 037, PBP 2' に対する親和性は低い PBP 4 に対する親和性の高い FMOX, 及び DMPPC を用いた。溶菌活性は Sugai らの方法に基づき加熱死菌を含む SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて抽出した自己溶菌酵素を電気泳動後、再活性化させることにより生じた透明帯の大きさを指標として、半定量的に測定した。

感受性株を subMIC 濃度の薬剤存在下で培養した場合、いずれの薬剤の場合も薬剤濃度の上昇に伴い、単位タンパクあたりの自己溶菌活性は減少傾向を示した。高度耐性株の場合は、FK 037 では濃度依存的な自己溶菌酵素の減少が観察されたが、FMOX では 1/4 MIC をピークとしてやや増加する傾向が見られた。DMPPC の場合でも濃度依存的な減少は見られなかった。

感受性株における、subMIC の薬剤存在下での自己溶菌酵素活性の低下現象は、薬剤による細胞壁脆弱条件下で溶菌を回避して生存するための補償的反応であると考えられた。高度耐性 MRSA では FK 037 処理では MSSA と同様の挙動が観察されたが、DMPPC や FMOX 処理菌では顕著な溶菌活性の低下が認められず、溶菌酵素活性を維持しなければならない程度に細胞壁の強度が保持されていることが示唆され、高度耐性化の一因と考えられる細胞壁強度維持の機構の存在が示唆された。

### P-20 臨床分離 MRSA における arbekacin (ABK) 耐性機序の化学的・酵素学的検討

藤村 茂・渡辺 彰・高橋 洋

庄司 聡・菊地宏明・貫和敏博

東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野

目的: 第42回の本総会において、我々は ABK 耐性 MRSA のメカニズムについて、耐性株接触後の ABK の反応生成物の構造解析から、acetyl 化の機序によるとする報告をした。今回は、その耐性株について酵素学的な検討を加えた。

方法: 1992, 93年に東北地方から臨床分離された MRSA の中から ABK に耐性を示した株 (> 8  $\mu$ g/ml) 4株と *in vitro* で高度耐性を獲得させた株 (> 128  $\mu$ g/ml) 1株を用い AGs 修飾酵素 (AAC, APH, AAD) の確認を行った。Haas らの方法により粗酵素液を調整後、bioassay により

AGs 修飾酵素の定性と ABK の残存力価の測定を行った。AGs 修飾酵素の定量は、BCA protein assay により吸光度 562 nm で測定し、不活化率を検討した。

成績: CUP 法での検討で不活化が認められた株は、全て acetyl 化の系のみであり、adenyl·phosphate 系の検討では不活化は見られなかった。acetyl 化の系での不活化率は、酵素量 220  $\mu\text{g/ml}$  において 11.2~30% とややバラつきのある結果を示したが、ABK 長期投与例分離株では不活化率が高かった。

考察: ABK 耐性 MRSA 5 株は全て AAC 保有株である事が確認され、前回報告した構造解析の結果と併せて、耐性機序が従来から言われている bifunctional enzyme によるものと異なって acetyl 化単独によるものが存在する事を確認した。今後は、acetylation の作用部位を検討する予定である。

## P-22 マクロライド耐性強毒黄色ブドウ球菌の作製とその解析

河内弘行・吉村広光  
小野武夫・長手尊俊  
大正製薬(株)創薬研究所

マクロライド耐性遺伝子を強毒黄色ブドウ球菌に導入することにより、薬剤耐性と強毒性をあわせ持つマクロライド耐性強毒黄色ブドウ球菌を作製し、その菌株の解析を行なった。

マクロライド耐性遺伝子として、23 S リボソーム RNA のアデニンジメチル化酵素遺伝子である、ermA (構成型耐性遺伝子、染色体性)、ermB (構成型耐性遺伝子、プラスミド性) 及び ermC (誘導型耐性遺伝子、プラスミド性) の 3 種類をプロトプラスト-ポリエチレングリコール法により病原性の強い感受性菌 *S. aureus* BB 株に導入し発現させ、マクロライド剤に耐性を示し、かつ強毒性である形質転換株を作製した。

得られた形質転換株の染色体 DNA、プラスミド DNA を解析した結果、各耐性株はいずれも導入遺伝子を保持しており、マクロライド耐性は遺伝子導入の結果獲得されたことが明らかとなった。ermA 導入株は染色体性の構成型耐性株、ermB 導入株は染色体性と、プラスミド性の 2 種類の構成型耐性株、そして ermC 導入株はプラスミド性の誘導型耐性株であった。各種薬剤に対する MIC は、それぞれの耐性遺伝子ドナーと同じ特性を保持していた。

マウス毒性試験の結果、これらの形質転換株は宿主菌同様致死性の強い病現性を保持していた。また各形質転換株のコアグラセ型は、いずれも宿主である *S. aureus* BB 株と同じ I 型であり、これらのことから各形質転換株は宿主由来であることが確認された。

## P-23 T-3761 作用時に出現した *S. aureus* の微小コロニーの性状について

満山純一<sup>1)</sup>・山田 尚<sup>1)</sup>・黒瀬朱美子<sup>1)</sup>  
高畑正裕<sup>1)</sup>・渡辺泰雄<sup>1)</sup>・成田弘和<sup>1)</sup>  
山田恵三<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 富山化学工業(株)総合研究所

<sup>2)</sup> 東邦大学医学部 微生物学教室

目的: *S. aureus* の MIC 近辺の T-3761 を作用させた結果、再増殖菌に親株と異なる微小コロニーの出現を認めた。今回、この微小コロニーの性状について検討したので報告する。

方法: *S. aureus* SA-113, RN 4220, および臨床分離の MSSA, MRSA を T-3761, あるいは CPFY の 1 MIC 含有液体培地中で 24 時間培養後、寒天平板に塗抹し、出現したコロニーの MIC を測定した。MIC の測定は微量液体希釈法により行った。T-3761 作用時に得られた微小コロニーの各性状、すなわち ICR 系マウスを用いた全身感染モデルによるビルレンス、血中クリアランス、血清中での殺菌効果、PMN 中での貪食殺菌を親株、および CPFY で得られたコロニーと比較した。

結果および考察: T-3761, CPFY 中で再増殖したコロニーの MIC を測定したところ、T-3761 では CPFY 比べその変動は少なかった。また T-3761 では特徴的な微小コロニーの出現がいずれの株においても認められ、その生育速度は親株と比べ遅く、ビルレンスも弱かった。また、この微小コロニーは親株と同様に血清中では殺菌されないが、血中クリアランスにおいて親株より速やかな消失を認め、マウス PMN 中では親株、および CPFY の再増殖コロニーより貪食されやすかった。

以上、MIC 近辺の薬剤濃度で再増殖したコロニーの薬剤感受性、およびその性状には薬剤間で差が認められた。また、T-3761 で出現した微小コロニーは親株より病原性が低下したが、その理由として増殖速度の遅延、PMN での貪食のされやすさが考えられた。

## P-24 緑膿菌の多剤耐性に関与する外膜蛋白質 OprM をコードする遺伝子の同定

後藤直正<sup>1)</sup>・山岸純一<sup>2)</sup>  
小山田義博<sup>2)</sup>・西野武志<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 京都薬大・微生物

<sup>2)</sup> 大日本製薬・生物科学研

目的: 緑膿菌のキノロン耐性変異は、特有の外膜蛋白質の過剰産生や新生をもたらす。私共は、nalB 変異により産生が亢進する外膜蛋白質 OprM が、本菌の多剤耐性に重要な役割を果たしていることを Tn 5 挿入 OprM 欠損株から明らかにした。一方、Poole らは、緑膿菌染色体上の *mexA-mexB-oprK* オペロンが多剤耐性に関与し、それぞれの遺伝子産物が他の排出蛋白質と類似することを報告した。今回、私共は機構が未だ明らかでない OprM の多剤耐性機構を、それをコードする遺伝子を同定することにより調べた。

方法: *mexA-mexB-oprK* オペロンの塩基配列から PCR primer を作製し、Tn 5 挿入による OprM 欠損株で各遺伝子の増幅を行った。また、このオペロンを含むプラスミドを OprM 欠損株に導入し、その変異の相補性を調べた。

結果および考察: PCR 実験は、OprM 欠損株で Tn 5 が染色体の *mexB* または *oprK* 遺伝子上へ挿入されていることを示した。また、OprM 欠損変異は、*mexA-mexB-oprK* オペロンによって相補されることが、種々の薬剤に対する感受性

が野生株程度まで上昇したこと、さらに抗 OprM 抗血清により OprM の産生が認められたことから明らかとなった。これらの結果は、OprM が *oprK* によりコードされること、また、*nalB* 変異による多剤耐性が排出機構の亢進により起こっていることを示唆した。

会員外共同研究者: 辻元秀人, Keith Poole

## P-25 RFP 耐性結核菌の迅速検出法および *rpoB* 遺伝子内の point mutation の検討

大野秀明・東山康仁・宮崎義継  
小川和彦・福田美穂・柳原克紀  
山本善裕・宮本潤子・朝野和典  
賀来満夫・古賀宏延・河野茂  
原耕平

長崎大学医学部第二内科

目的: 今回われわれは、わが国における結核菌の RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene (以下 *rpoB*) 内の塩基配列を検討し、*rpoB* 内の point mutation の有無と RFP 感受性を比較検討し、RFP 耐性菌の迅速検出法ならびにその臨床応用の可能性について検討した。

対象および方法: 当科および関連施設にて分離された結核菌臨床分離株 40 株を対象とし、control として結核菌 H 37 Rv を用いた。塩基配列決定のために、結核菌の *rpoB* 内の 411 bp を増幅する primer を用いて PCR-direct sequence 法をおこない塩基配列を決定し、薬剤感受性と比較検討した。また臨床検体中に含まれた結核菌 DNA を用い上記方法を施行し、薬剤感受性について推測可能か検討した。

結果: 結核菌 40 株中、RFP 耐性株は計 13 株であった。PCR-direct sequence 法による塩基配列の検討を行った結果、耐性株では Asp-516 (GAC)  $\rightarrow$  Tyr (TAC) や His-526 (CAC)  $\rightarrow$  Asn (AAC), Ser-531 (TCG)  $\rightarrow$  Leu (TTG) などの point mutation が認められた。また臨床検体を用いた検討でも *rpoB* 内の変異の有無が検討可能であり、RFP 感受性について推測が可能であった。

考案: 諸外国の報告によると、RFP 耐性結核菌における *rpoB* 内の mutation はごく一部分の領域に高率に集中してみられたとされている。われわれの検討でも同様の結果が得られ、わが国における RFP 耐性化が同じメカニズムによることが推測された。さらに臨床検体から直接 *rpoB* 内の変異を検出することで RFP 感受性について推測可能であり、将来的に薬剤感受性についての迅速診断法となり得る可能性が示唆された。

## P-26 Robbins device を用いた大腸菌バイオフィルムの解析

小野憲昭・門田晃一・津川昌也  
公文裕巳・大森弘之・友近健一

岡山大学医学部泌尿器科, \*同 薬学部環境衛生化学

目的: 近年、カテーテル留置複雑性尿路感染症をはじめとする難治性細菌感染症の原因として、感染病巣所に形成される細菌バイオフィルムが注目されている。我々はこれまで

に、Robbins device をバイオフィルムサンプラーとして用いる *in vitro* 実験系において、緑膿菌バイオフィルムに対する各種抗菌剤の効果を検討してきた。今回、尿路性器感染症の主要原因菌の一つである大腸菌 4 株における、Robbins device でのバイオフィルム形成能、ならびに形成された大腸菌バイオフィルムに対する各種抗菌剤の効果について検討した。

材料と方法: 1) 使用菌株: 尿路性器感染症由来大腸菌 4 株 (K 108 AC, E 790, E 808, E 810) 2) 方法: *in vitro* 実験モデルとして Robbins device を用い、人工尿に終濃度が  $10^6$  cfu/ml となるように接種した菌液を  $37^\circ\text{C}$ 、40 ml/h の流速で灌流させ、シリコンディスクにバイオフィルムを形成させた。その後、各種抗菌剤 (OFLX, PIPC, GM, FOM, CAM) を含有する人工尿溶液を灌流し、8~48 時間作用後の効果を検討した。効果の判定には、シリコンディスク 1 枚の表面に形成される細菌バイオフィルムを全体として一つの bioactive material と考えて、その ATP 量をホタルルシフェリンルシフェラーゼ反応を用いた bioluminescence 法で測定し、あわせて走査電顕、共焦点レーザー走査顕微鏡にて観察して評価した。

結果と考察: 検討した 4 株ともにシリコンディスク上に大腸菌バイオフィルムを形成したが、バイオフィルムが完成するまでの時間は緑膿菌と比較して長時間の灌流を必要とした。バイオフィルム形成様式は colony type と diffuse type に大別された。形成された大腸菌バイオフィルムは緑膿菌バイオフィルムと同様に抗菌剤に抵抗性を示したが、高濃度の OFLX の効果はむしろ緑膿菌バイオフィルムよりも悪かった。また、形成された大腸菌バイオフィルムでは、緑膿菌バイオフィルムと同様に OFLX と FOM の併用療法が有効であった。

## P-27 *In vitro* における緑膿菌バイオフィルムに対するホスホマイシンの影響

原 哲郎・荒明美奈子

明治製薬 (株) 薬品総合研究所

小林宏行

杏林大学医学部第一内科

目的: 慢性軌道感染症の難治化の要因の一つとして細菌の形成するバイオフィルムが注目されている。昨年の本学会において緑膿菌バイオフィルムに対して FOM と CPEX との併用効果について報告した。今回は、さらに CPFIX 以外の薬剤と FOM との併用公課について検討した。

方法: 5%ウサギ血漿加生食水にテフロン片を入れ、そこに供試緑膿菌を接種し、 $37^\circ\text{C}$  で 5 日間培養し、バイオフィルムを形成させた。その後、薬剤を添加し、さらに 5 日後のテフロン表面の生菌数を測定した。

結果: PIPC, CAZ, IPM/CS は 10, 1, 0.1  $\mu\text{g/ml}$  ではほとんど殺菌作用を示さなかった。GM, OFLX は殺菌作用を示した菌株もあった。FOM は 50  $\mu\text{g/ml}$  で作用がなかった。しかし、FOM の 50  $\mu\text{g/ml}$  と GM の 10, 1  $\mu\text{g/ml}$  との併用により、GM 単剤より顕著な生菌数の減少が認められ、優れた併用効果を示した。OFLX との併用は OFLX の MIC

が作用濃度より低い菌では単剤よりも生菌数が減少した。さらにこの効果がFOMの抗菌力によるとも考えられるので、抗菌力を持たないFOMの鏡像異性体(FOM(+))を用いてGM, OFLXでの併用を試みた。その結果、FOM(+ )はFOMと同様な併用効果を示し、FOMの併用作用は抗菌力とは違う作用によるものと考えられた。

## P-28 緑膿菌バイオフィームに対するFOMとOFLXとの併用効果

### (1) 形成段階の異なるバイオフィームでの検討

公文裕巳・小野憲昭・大森弘之

岡山大学医学部泌尿器科

飯田真依子・荒明美奈子

明治製菓(株)薬品総合研究所

目的: 緑膿菌バイオフィームに対するFOMとOFLXの併用効果を、形成段階の異なる2種類のバイオフィームを用いて検討した。

材料と方法: 緑膿菌は臨床分離の*P. aeruginosa* 14-210株、培地は人工尿、biofilm samplerとしてはmodified Robbins deviceを従来と同様に使用した。菌液灌流8時間(young but mature biofilm)と3時間(imature biofilm)でシリコン・ディスクに形成される2種類のバイオフィームを対象として、1/32~10 MIC (1.56~500  $\mu\text{g/ml}$ )の濃度のFOMと、3ないし10 MIC (18.75, 62.5  $\mu\text{g/ml}$ )の濃度のOFLXとの併用効果を中心に検討した。なお、抗菌効果の検討はATP-bioluminescence法によるbioactivityの変動を指標とした。

結果と考察: それぞれ単独では緑膿菌バイオフィームのbioactivityに直接影響しない濃度において、顕著な相乗効果がFOMとOFLXとの併用にて認められた。菌液灌流8時間のバイオフィームでは、72時間後にそのbioactivityは1.5~4.5%にまで減少したが、完全な除菌までには至らなかった。一方、菌液灌流3時間のバイオフィームでは、FOMとOFLXとの併用により高い感受性を示し、3 MIC 同士の組み合わせにより48時間以内に除菌効果が得られた。

## P-29 緑膿菌バイオフィームに対するFOMとOFLXとの併用効果

### (2) 薬剤感受性の異なる株での検討

飯田真依子・荒明美奈子

明治製菓(株)薬品総合研究所

小野憲昭・公文裕巳・大森弘之

岡山大学医学部泌尿器科

目的: 緑膿菌はバイオフィーム形成能が高く、複雑かつ慢性的な感染症を引き起こす菌として注目されている。前報では、FOMとOFLXは併用で緑膿菌バイオフィームに対し、殺菌効果を示すことを報告した。今回、その臨床的応用性を検討する目的で、薬剤感受性の異なる4株の臨床分離緑膿菌が形成する細菌バイオフィームを用いて、FOMとOFLXとの併用効果について検討した。

材料と方法: 尿路由来の臨床分離株*P. aeruginosa* 14-210, RPC 163, RPC 233, RPC 154の4株を用い、培地には0.4%のNutrient brothを添加した人工尿を使用した。Biofilm samplerであるRobbins deviceを用い、 $10^6$  cfu/mlの菌を接種した人工尿を15時間灌流させてバイオフィームを形成させたシリコンディスクにFOM, OFLXを含む人工尿を作用させた。抗菌薬の評価にはバイオフィーム菌のATP量をbioluminescence法を用いて測定した。なお、MICの測定は微量液体希釈法で行った。

OFLXの菌体内取り込み量はFOM前処理菌および未処理菌にOFLXを30分間作用させた後、菌体からOFLXを抽出し、蛍光光度計にて測定した。

結果と考察: 浮遊菌に対してFOMとOFLXはMH培地と同様に人工尿中でも併用効果を示し、なおかつ、FIC-indexは人工尿ではより小さい傾向を示した。

バイオフィーム菌に対しFOMとOFLX併用効果が今回使用した4株全てに認められた。OFLX単独ではbioactivityの減少を示さない濃度において、緑膿菌バイオフィームのbioactivityはFOMとの併用により明らかに減少し、その程度はOFLXの濃度に依存していた。また、併用効果のメカニズムのひとつとしてFOMによるOFLXの菌体内取り込み量の増加が示唆された。

## P-30 緑膿菌に対するマクロライド系抗生物質の抗菌作用について

辻 雅克・館田一博・石井良和

大野 章・松本哲哉・宮崎修一

山口恵三

東邦大学医学部微生物学教室

目的: 近年、慢性難治性呼吸器疾患、特に基礎疾患としてDPBを有する緑膿菌感染患者に対しEMの少量長期投与が良好な臨床効果を得ている。その作用機序としてEMが宿主側と菌側の両方に影響すると考えられているが、作用機序が完全に解明されているわけではない。今回、我々は臨床分離緑膿菌30株を用いてマクロライド剤(MLs)を長時間作用した場合の抗菌作用について検討し、若干の知見を得たので報告する。

方法: 感受性測定は微量液体希釈法でおこない、形態観察はSEM(Hitachi S-800)およびTEM(JEOL-1200 EX)を使用した。

結果および考察: 臨床分離緑膿菌30株のMIC, MBC測定の結果、24時間判定では検討したいずれのMLs(EM, CAM, AZM, JM, OL)も抗菌力は弱かった。そこで、培養時間を96時間まで延長して観察したところ、MICは変化しなかったがMBCは低下する傾向が見られ、一部の菌株ではMICとMBCが逆転する現象が見られた。この現象は特にAZMで強くEM, CAMでも観察されたが、JM, OL, キノロン、 $\beta$ -lactam剤では観察されなかった。次に、緑膿菌にEMを長時間作用させたときの形態観察をおこなったところ、菌体の伸長化、膜の陥入による空胞様構造が観察された。この細胞のDNAの複製様式を調べた結果、伸長化した細胞中にDNAが複数観察された。緑膿菌に対してEM,

CAM, AZM が長時間作用によりはじめて抗菌活性を示し、形態変化をおこすという事実は臨床における MLs の有効性の特徴とよく一致した結果であったことから、本作用が緑膿菌持続性感染に対する MLs 有効性の機序のひとつとして重要な役割を果たしていると思われる。

**P-31 マクロライド剤の緑膿菌に及ぼす影響**  
—長時間暴露による殺菌公課と蛋白合成抑制—

館田一博・石井良和・松本哲哉  
辻 雅克・長島正人・松永敏幸  
金子康子・大野 章・宮崎修一  
山口恵三

東邦大学医学部微生物学教室

目的: 我々は、sub-MIC レベルの EM が緑膿菌の LPS や外膜淡白などの菌体表層構造に変化を誘導し、血清殺菌に対する感受性を亢進するという事実を報告した。これらの実験の過程で、EM の作用は本剤が緑膿菌に長時間暴露されてはじめて生じる、すなわち暴露時間依存的な現象であることを見いだした。今回、sub-MIC マクロライド剤の緑膿菌に及ぼす影響について、長時間暴露にともなう殺菌効果と、マクロライド剤本来の作用である蛋白合成抑制作用について検討し、若干の知見が得られたので報告する。

方法: 各種抗菌薬を含有する寒天培地で緑膿菌 PAO-1 株を培養時間を買えて培養したのち、O. D. (550 nm) により濁度を調整後、その viability を比較した。また、抗菌薬含有培地に培養時間を変えて培養した緑膿菌に <sup>35</sup>S-メチオニンを取り込ませ、抗菌薬接触時間の蛋白合成に及ぼす影響について検討した。ストレス蛋白の1つである Gro-EL 産生の比較は、本蛋白に対するウサギ免疫血清を用いた免疫沈降法により検討した。

結果及び考察: 緑膿菌 PAO-1 株を EM, CAM, AZM 含有培地で 48 時間以上培養した場合、AZM では 0.5, EM, CAM では 2 µg/ml の濃度からその viability が低下することが明らかとなった。これに対して JM, OL などのマクロライド剤や CAZ, TOB, MINO, OFLX ではこのような作用は見られなかった。AZM 4 µg/ml 含有培地で培養した PAO-1 株の蛋白新生を比較したところ、暴露時間依存的に蛋白合成の抑制が認められた。また、高温条件下 (45 °C) において AZM 処理菌では無処理菌に比べ急激な viability の低下がみられた。この時の Gro-EL の発現を比較したところ、AZM 処理菌において他の蛋白とともに Gro-EL 蛋白の新生が著明に抑制されていた。これまでの報告では、マクロライド剤は緑膿菌の viability には影響を与えないと考えられていた。しかし、今回の実験から暴露時間を延長することにより、EM, CAM, AZM は sub-MIC レベルで緑膿菌に対して殺菌的に作用することが明らかになった。この作用にはマクロライド剤本来の作用である蛋白合成抑制作用及びストレス条件下における Gro-EL 蛋白合成抑制などが関与していることが示唆された。

**P-32 抗菌薬の好中球粘着能および遊走能に及ぼす影響**

—マクロライド系抗菌薬を中心に—

杉田久美子・西村忠史

大阪医科大学小児科

慢性呼吸器感染症におけるエリスロマイシン (EM) 投与は良好な臨床効果を得ており、それは好中球機能への影響によるものとの報告がなされている。そこで我々は、EM, クラリスロマイシン (CAM), アジスロマイシン (AZM), ロキタマイシン (RKM) の好中球粘着能、粘着因子、遊走能に与える影響について検討した。粘着能は 98 穴プレートを用い、遊走能はアガロース法を用いて測定した。粘着因子は蛍光標識抗体を用い、フローサイトメーターで LFA-1, Mac-1 の発現量を測定した。その結果、遊走能では 4 剤とも影響は認められなかったが、粘着能では、EM で軽度亢進、50 µg/ml の RKM で軽度抑制が認められた。ただし有意差はなかった。粘着因子では、LFA-1 においては有意ではなかったが、50 µg/ml の EM で発現の増加、50 µg/ml の RKM で減少傾向であった。Mac-1 では 50 µg/ml の EM, RKM で有意な減少を認めた。その他、ABPC, DOXY における影響も検討したが、ABPC は今回検討した好中球機能に影響は与えなかったが、DOXY においては 50 µg/ml の濃度で粘着能の低下が認められた。

以上から、50 µg/ml の RKM で粘着能は低下し、それは粘着因子の発現の減少によるものと思われる。しかし EM では 2 種類の粘着因子への影響は異なり、EM による粘着能への影響は粘着因子だけでは説明できない。また、*in vivo* においても EM は遊走能ならびに粘着能を抑制し、粘着因子だけでなくサイトカインを含む体内の種々の因子への関与が指摘されている。今回の *in vitro* の結果からも今後、粘着因子以外の種々の因子、また抗菌薬と好中球の処理方法などを考慮した検討が必要と思われる。

**P-33 エリスロマイシンの好中球活性酸素生成能に及ぼす影響**

松本久美・大窪恭光・有川圭介  
中原 伸・本田順一・市川洋一郎  
大泉耕太郎

目的: エリスロマイシン (以下、EM と略す) は、びまん性汎細気管支炎 (以下、DPB と略す) の治療薬として非常に有効であるが、その作用機序については不明な点が多い。今回、DPB 患者における EM 治療中の好中球活性酸素生成能を検討した。

方法: 活性酸素の測定は、2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いた方法で行った。全血 0.1 ml と DCFH-DA を反応させた後、フローサイトメトリーで、好中球のみを gating し DCF 蛍光強度を測定した。活性酸素生成能は、DPB 患者を無症状群、EM 有効群、EM 無効群、DPB 活動期の 4 群に分け、正常群と比較した。又、EM 内服前後の活性酸素生成能を測定した。さらに、*in vitro* で末梢血と EM を反応させ同様に測定を行った。

結果: 1) DPB 患者のうち, エリスロマイシン内服が有効であった群は, 正常群に比べ末梢血活性酸素生成能は有意に低下していた。又, PMA 刺激を加えた場合も同様に低下していた。さらに, DPB 活動期では, より生成能が増加しており, エリスロマイシン内服により症状改善とともに生成能も低下した。一方, エリスロマイシン内服が無効であった群は, 正常群と比べ末梢血活性酸素生成能は逆に増加していた。2) 健常人においても, エリスロマイシン内服は末梢血活性酸素生成能を低下させた。3) 末梢血にエリスロマイシン (10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ ) を反応させた系では末梢血活性酸素生成能の低下する傾向が認められた。

考察: エリスロマイシンは, 末梢血好中球からの過剰な活性酸素生成を低下させ, 活性酸素による細胞障害を抑制する作用があることが示唆された。

### P-34 抗生物質の菌 - 血小板反応に及ぼす影響

—第2報: 黄色ブドウ球菌による血小板凝集反応に及ぼすマクロライド薬の影響—

碓井之雄・一幡良利  
・大友俊允・嶋田甚五郎  
聖マリアンナ医大・微生物

目的: 我々はエリスロマイシン (EM) の sub-MIC 濃度で培養した黄色ブドウ球菌の血小板凝集活性と細胞表層の変化について報告した (第41回日本化学療法学会)。今回, 他のマクロライド薬を用いて, 同様の実験を行ったので報告する。

方法: 菌は本大学中央検査室で分離された臨床株 *S. aureus* SMU-92-1 を用いた。抗生剤としてクラリスロマイシン (CAM), ロキタマイシン (RKM), リンコマイシン (LCM), オレアンドマイシン (OL), クリンダマイシン (CLDM), ロイコマイシン (LM), ジョサマイシン (JM), ミデカマイシン (MDM), アジスロマイシン (AZM) を用い, それぞれの抗生剤における MIC の 1/4 ~ 1/8 の sub-MIC 濃度を BHI broth に添加し菌の培養を行った。血小板凝集はアグリゴメーターを用いて測定した。

結果: CAM (0.02  $\mu\text{g/ml}$ ), RKM (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), LCM (0.05  $\mu\text{g/ml}$ ) は血小板凝集活性を上昇させた。OL, LM, JM, MDM, AZM (何れも 0.05  $\mu\text{g/ml}$ ) では変化が見られなかった。一方, CLDM (0.017  $\mu\text{g/ml}$ ) は無添加に比べて 81% の凝集阻害が見られ, 凝集開始までの lag time も 2.4 倍に延長した。また, 血小板凝集活性に関与すると思われる菌体表層のフィブリノーゲン結合因子 (clumping factor) の活性には, いずれのマクロライド薬でも顕著な変化は見られなかった。また, それぞれのマクロライド薬の sub-MIC レベルでの培養後に菌体表層をデオキシ化して, SDS-PAGE での蛋白バンドのパターンを比較したところ, マクロライド薬添加により, 蛋白バンドに明らかな違いが認められた。

考察: sub-MIC レベルの EM 存在下で培養した得られた黄色ブドウ球菌菌体は血小板凝集活性が上昇することはすでに報告したが, 同様の活性上昇は CAM, RKM, LCM においても観察された。しかし, OL, LM, JM, MDM, AZM

では変化は見られず, CLDM において顕著な血小板凝集活性の低下が見られた。この結果から, 黄色ブドウ球菌菌体表層の生合成に及ぼすマクロライド薬の影響はそれぞれの種類により異なることが示唆された。

### P-35 Roxithromycin のウイルス感染抑制作用について

庄司 聡・菊地宏明・高橋 洋  
渡辺 彰・本田芳宏・貫和敏博

東北大学加齢医学研究所  
呼吸器腫瘍研究分野

目的: マクロライド薬の長期投与の有効性には, 慢気患者の反復細菌感染抑制と共に, ウイルス感染抑制の可能性もある。演者らは先に Roxithromycin (RXM) 24 時間処理後の Vero 細胞へのパラインフルエンザウイルス 3 型の接種では, Vero 細胞の細胞変性は対照より軽度で cell viability は低下しないことを報告した。今回は, RXM 24 時間処理の影響を, 各パラミクソウイルスについて Vero 細胞, HMV-II 細胞を用いて検討した。

方法: Vero 細胞, HMV-II 細胞を RXM で処理し, 24 時間後に各パラミクソウイルスを接種した。5 日後, パラインフルエンザウイルス 2, 3 型, 麻疹ウイルス, ムンプスウイルスと Vero 細胞の系での cell viability を MTT 法で評価し, パラインフルエンザウイルス 1, 2, 3 型と HMV-II 細胞の系では細胞変性の際放出される LDH 量を測定する LDH 法で評価した。

結果, 考察: [I] パラインフルエンザウイルス 2 型, 3 型, 麻疹ウイルス, ムンプスウイルスと Vero 細胞: RXM 24 時間処理 Vero 細胞にウイルスを接種した際の Vero 細胞の cell viability は, パラインフルエンザウイルス 3 型接種の時は低下せず, 一方, その他のウイルス接種では cell viability が低下した。[II] パラインフルエンザウイルス 1 型, 2 型, 3 型と HMV-II 細胞: RXM 24 時間処理 HMV-II 細胞にパラインフルエンザウイルス 3 型を接種した際の HMV-II 細胞より遊出する LDH 量は, 薬剤無添加の virus control に比べ 75~85% に減少し, パラインフルエンザウイルス 3 型の感染性は抑えられる傾向を示した。一方, パラインフルエンザウイルス 1 型, 2 型接種では LDH 量は減少せず (2 型ではむしろ増加), 感染性は全く抑えられなかった。[I] [II] より, RXM の細胞に対するパラミクソウイルス感染性の低下の作用は, パラインフルエンザウイルス 3 型において特異的であるように思われ, 細胞特異性は認められないと考えられる。

### P-36 原発性肺癌患者に対する clarithromycin (CAM) 投与に関する検討

寺本正治<sup>1)</sup>・三笠桂一<sup>1)</sup>・澤木政好<sup>1)</sup>  
濱田 薫<sup>1)</sup>・古西 満<sup>1)</sup>・前田光一<sup>1)</sup>  
竹内章治<sup>1)</sup>・坂本正洋<sup>1)</sup>・辻本正之<sup>1)</sup>  
森 啓<sup>1)</sup>・国松幹和<sup>1)</sup>・喜多英二<sup>2)</sup>  
成田巨啓<sup>1)</sup>

1) 奈良県立医科大学第二内科, 2) 同 細菌学

目的: 我々は昨年の本学会において切除不能原発性肺癌患者に clarithromycin (CAM) の投与を試み, CAM が BRM として作用し非小細胞肺癌患者において生存期間が有意に延長したことを報告した。今回は各種パラメーターの測定を行い, 投与群, 非投与群について解析を行ったので報告する。

対象と方法: 登録症例は当科に入院した手術不能と判断した初回治療の原発性肺癌患者 (非小細胞癌) の 54 例であり, 解析対象症例はそのうち 6 カ月以上外来で経過を観察できた 26 症例 (CAM 投与例 17 例, 非投与例 9 例) とした。方法はシスプラチン (CDDP) を中心とする化学療法と放射線治療を施行し, 退院後初回外来受診時に CAM 投与群と非投与群に封筒法により無作為に割り付けを行った。登録日を 0 カ月とし, 3 カ月, 6 カ月後に TP, Alb, ChE, Hb, リンパ球数, 体重の測定などを行った。

結果: 解析対象症例のうち CAM 投与群が有意に症例数が多く生存期間の延長が再確認された。Alb, ChE, Hb が CAM 投与群で非投与群に比較し, 有意に増加を示し, 体重は CAM 投与群で増加傾向, 非投与群では減少傾向であった。また, QOL の検討でも CAM 投与群は特に肉体表において非投与群に比べ改善傾向であった。

以上から非小細胞肺癌患者に対する CAM 投与は肺癌患者の予後因子とされる体重, ChE, Hb, などを有意に改善し, 宿主要因を改善している可能性が示唆された。

### P-37 ニューキノロン系薬剤の白血球機能亢進作用のメカニズム

松本哲朗・久保周太・持田 歳

佐久本操・水之江義充・熊澤浄一

九州大学医学部泌尿器科

目的: ニューキノロン系薬剤 (NQs) は多核白血球 (PMNs) 細胞内移行に優れ, 細胞内寄生性細菌に有効なことが知られている。一方, NQs の予期せぬ作用として, PMNs のスーパーオキシド (SO) 産生亢進作用のあることを報告してきた。今回は NQs の中で SO 産生亢進作用の強い Ofloxacin (OFLX), Levofloxacin (LVFX) 及び Fleroxacin (FLRX) の白血球機能亢進作用のメカニズムについて検討した結果を報告する。

方法: PMNs は健常成人末梢血より分離したものを用いた。NQs は 0.1 NNaOH で溶解し, pH7.0 に補正して使用した。PMNs の SO 産生は刺激剤として PMA または FMLP を用い, Biolumat LB 9505 にて測定した。PMNs の NADPH Oxidase に対する NQs の影響を測定するため, PMNs を部分分解し, NADPH を補給する系を用いて, 反応速度を求めた。また, PMNs の食食殺菌能に対する影響を検討するため, *E. coli* および *P. aeruginosa* を試験菌として 30, 60, 90 分間の細菌消失率を求めた。

結果: 1) 検討した 8 種類の NQs のうち, OFLX および FLRX に SO 産生亢進作用が認められ, その他は抑制的に働いた。2) OFLX の光学異性体である LVFX 及び DR 3354 も SO 産生亢進作用が見られた。3) OFLX 及び FLRX の SO 産生亢進作用は Protei kinase C 阻害剤及び Tyrosine

kinase 阻害剤で消失した。4) NADPH oxidase 活性に対しては OFLX は影響しなかった。5) DR 3354 は自身では抗菌活性を有していないが, PMNs の食食殺菌能を亢進させた。

考察: 以上の結果より, OFLX, LVFX, FLRX は白血球の kinase activity を促進し, SO 産生を亢進させた。また, この SO 産生亢進作用は菌の食食殺菌能を亢進させることに繋がっていると考えられた。

### P-38 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の好中球由来酵素に対する効果

東 康之・波多野和男・渡辺裕二

藤沢薬品工業 (株) 開発第一研究所・治療

$\beta$ -ラクタム系抗菌薬は一般に薬理作用が無いことが特徴とされているが, 一部に, 過剰な炎症反応に対し抑制的に働くことを示唆する報告がなされている。そこで, 生体内で炎症反応に関与している因子に対する効果を検討した。

被験薬剤は次の 20 薬剤である: CEZ, CTM, CZX, CTX, CAZ, CPZ, CTRX, FK 037, CPR, CZOP, ABPC, MPIPc, DMPPC, IPM/CS, FMOX, CCL, CFIX, CFDN, CPDX, CFTM。ヒト好中球由来酵素としてはミエロペルオキシダーゼ, エラスターゼ, カテプシン G で検討し, 作用を示したものに関しては, 緑膿菌に対する好中球食食殺菌能に及ぼす影響と, ラット LPS 肺損傷モデルにおける防御効果を検討した。

ほとんどの薬剤は酵素に対する抑制作用を示さなかったが, 高濃度では作用を示すものもあった。ミエロペルオキシダーゼは CEZ, IPM/CS, CCL CFIX, CFDN, CFTM がそれぞれ 40, 250, 290, 240, 500, 67  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で活性を 50% 抑制した。エラスターゼでは CTX, CPZ, MPIPc, CPDX の Ic 50 がそれぞれ 350, 170, 350, 180  $\mu\text{g/ml}$  であり, カテプシン G では CTM, IPM/CS の Ic 50 が 170, 210  $\mu\text{g/ml}$  であった。

このうち最も低い濃度で阻害作用を示した CEZ について更に検討した。CEZ は好中球内のミエロペルオキシダーゼを抑制せず, 食食殺菌にも影響を与えなかった。ラット LPS 肺損傷モデルにおいては肺への炎症細胞の浸潤にはほとんど影響しなかったが, BALF 中のミエロペルオキシダーゼやタンパク質の漏出には抑制傾向を示した。

従来, 薬理作用を示さないと考えられていた  $\beta$ -ラクタム薬においても, 本来の感染防御能に影響を与えず過剰な炎症反応のみを抑制する可能性が, *in vivo* 動物モデルにおいても示唆される結果となった。

### P-39 マウス腹腔マクロファージのサイトカイン産生に及ぼすホスホマイシンの影響

渡部宏臣・小林 香・山本彰彦

明治製菓 (株) 薬品総合研究所

目的: 抗生物質ホスホマイシン (FOM) には抗菌作用以外にステロイド様作用, 抗アレルギー作用, 免疫抑制作用など免疫系への作用や腎庇護作用などが報告されている。我々は

FOMの抗菌以外の作用を明らかにする目的でマクロファージのサイトカイン産生に及ぼすFOMの影響を検討した。

方法: トオグリコレートで誘導したマウス(C3H/He)腹腔マクロファージを薬剤存在下および非存在下で大腸菌リポポリサッカライド(LPS)で刺激した後、培養上血清のサイトカイン量をELISA法で測定した。またTNF $\alpha$ 活性はL929に対する細胞障害活性で、IL-1活性はC3H/HeJマウス胸腺細胞の増殖反応でそれぞれ測定した。

結果: 1. FOMにはサイトカイン誘導作用は認められなかった。2. FOMはLPS刺激マクロファージの分泌型TNF $\alpha$ (sTNF $\alpha$ )の産生を抑制したが膜結合型TNF $\alpha$ (mTNF $\alpha$ )の産生を抑制しなかった。一方FOMとは異なりステロイドDexamethasone(DEX)はsTNF $\alpha$ とmTNF $\alpha$ の両者を抑制した。またFOMはDEXのsTNF $\alpha$ 抑制作用を増強した。3. FOMは分泌型IL-1 $\alpha$ の産生を増強したが膜結合型IL-1 $\alpha$ および細胞内IL-1 $\alpha$ の産生には影響しなかった。4. FOMはIL-6の産生を増強する傾向を示した。

考察: マクロファージの機能に及ぼすFOMの影響を検討し、FOMにサイトカイン産生修飾作用を見出した。FOMにはステロイド様作用が報告されているが今回の結果からFOMとステロイドは作用が明らかに異なることが確認された。FOMのサイトカイン産生修飾作用の臨床上の意義についてはさらに検討が必要である。

#### P-40 Fosfomycinのサイトカイン産生に及ぼす影響

—IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ を中心に—

有川圭介・本田順一・大窪恭光  
中原伸・大泉耕太郎

久留米大学医学部第一内科

目的: Fosfomycin(FOM)は従来の如何なる抗生物質にも属さないユニークかつ簡単な化学構造を持ち、現在まで抗菌活性以外の多彩な薬理活性を持つことが報告されている。今回われわれは、FOMの炎症性サイトカインmRNAの発現に対する影響を観察した。

方法: 健康人よりクエン酸採血し、その全血を培養系とした。また、フィコール分離を施行した単核球分画を培養系とした。培養系にFOM(50 $\mu$ g/ml)を加え、37 $^{\circ}$ C、2時間培養した。その後、LPS(1 $\mu$ g/ml)を加え37 $^{\circ}$ C、3時間培養後、RT-PCR法を用いて、IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ のmRNAの発現量と $\beta$ -actinの発現量を画像解析し、比較検討した。

結果と考察: 単核球分画の培養系においては、IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ いずれもmRNAの発現量にコントロールと比較して一定の傾向を認めなかった。しかし全血法において、FOMはIL-1 $\beta$ , IL-8のmRNA発現を有意に抑制した。TNF $\alpha$ に関しては、減少傾向を認めるものの、PCRにおいて非特異バンドを認めたためprimerに問題があると考えられ、正当な評価は不可能と思われた(現在primerを代えて検索中である)。

今回のわれわれの実験系の結果から、FOMは単球には直接作用せず、多核白血球や血小板の存在下で間接的に単球に

作用し、IL-1 $\beta$ , IL-8の産生を抑制する可能性が示唆された。即ち、FOMが好中球や血小板に作用し、それらの機能を抑制しchemical mediatorsの産生を減少させ、chemical mediatorによる単球からのサイトカインの産生を抑制した可能性が考えられた。現在FOMの多核白血球や血小板に対する作用を検討しており、その結果も併せて報告する。

#### P-41 Fosfomycinのヒト単球に対するimmunomodulatoryな効果

森川景子・渡部宏臣\*\*・荒明美奈子\*\*  
鳥井郁子・森川茂\*

鳥根医科大学第一内科, 同 第一病棟\*, 明治製薬薬品総合研究所\*\*

目的: 我々はfosfomycin(FOM)がヒトT, Bリンパ球免疫能を修飾する作用を有することを報告してきた。今回、ヒト単球の諸機能に及ぼす効果を*in vitro*で検討した。

方法: ヒト末梢血よりFicoll/Hypaque法にて単核球を分離した後、plastic dish付着法で単球を採取した。貪喰能、活性酸素産生能は単球を薬剤の共存下で37 $^{\circ}$ C、2時間前処理した後、PMAやLPSで37 $^{\circ}$ C 25分刺激し、蛍光物質や蛍光粒子を用いて、また細胞表面のIa抗原発現能は24時間incubateした後に、単クローン抗体と二次抗体を用いて間接免疫蛍光染色をしてflow cytometryにて検討した。cytokineの産生能はLPSと薬剤との共存下で24時間培養後その培養上清を採取し、TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$ , IL-6, GM-CSF等の産生をELISA kitにて測定した。FOMの他Clarithromycin(CAM), Dexamethaen(DX)を比較対象薬として用いた。

結果: 検討した濃度範囲内(1.6~40 $\mu$ g/ml)ではFOM, CAM, DXとも単球の貪喰能、活性酸素産生能、Ia抗原発現量等については抑制効果を及ぼさなかった。cytokine産生能については、FOMはTNF $\alpha$ の産生を最も強く抑制し、次いでIL-1 $\beta$ , GM-CSF, IL-1 $\alpha$ の順であった。しかしIL-6産生能には全く抑制効果が認められなかった。

考察: *In vitro*の実験の結果よりFOMがTNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$ の産生抑制効果を有することが判明した。しかしながら各cytokineに対する産生抑制効果は同等でないこと、及びIL-6産生能を抑制しなかったことよりFOMによるproinflammatory cytokineの産生抑制は、選択的であることが示唆された。一方この結果は、FOMが抗菌作用以外に抗炎症作用を有する抗生物質であることを示唆しており、臨床例において報告されているFOMの抗炎症効果を裏づける結果と考えられる。

#### P-42 Fosfomycinのヒト単球によるchemokine産生能に及ぼす効果

森川景子・渡部宏臣\*\*・荒明美奈子\*\*  
鳥井郁子・森川茂\*

鳥根医科大学第一内科, 同 第一病棟\*, 明治製薬薬品総合研究所\*\*

目的: chemokineが炎症の場に白血球を遊走させ、chemical mediatorの分泌を誘導するなどの作用を有することが明らかとなり、chemokine familyの炎症反応における重要

性が注目されている。抗炎症作用を有する FOM がヒト単球による chemokine の産生能に影響を及ぼすかどうかを *in vitro* で検討した。

方法: ヒト末梢血より Ficoll/Hypaque 法にて単核球を分離した後, plastic dish 付着法で単球を採取した。単球は  $1 \times 10^6/\text{ml}$  の濃度にて LPS で 37°C 24 時間刺激し, ここに薬剤を共存させた。培養上清に分泌された cytokine の産生量は ELISA kit により測定した。chemokine  $\alpha$  のうち IL-8, GRO  $\alpha$ , chemokine  $\beta$  のうち RANTES, MIP-1  $\alpha$  を測定した。Clarithromycin, Dexamethason を比較対象薬として用いた。

結果: 検討した濃度範囲 (1.6~40 mg/ml) において FOM はこれら cytokine の産生を濃度依存的に抑制したが, その抑制の効果は cytokine により異なり, 同等ではなかった。すなわち GRO  $\alpha$  産生抑制効果は最も強く, ついで MIP-1  $\alpha$ , RANTES の順であった。IL-8 産生抑制効果は最も弱かった。

結果: 今回の *in vitro* の実験の結果より, FOM は主として好中球の遊走を刺激する chemokine  $\alpha$  の産生に対しては選択的に抑制効果を示すこと, しかし単球, 好酸球, 好塩基球, リンパ球等の遊走を刺激する chemokine  $\beta$  の産生能に対する抑制効果には, 選択性がみられないことが判明した。このことは FOM の抗炎症作用をうける標的細胞は多様であり, その程度も様々であることを示唆している。現在更に FOM が各 cytokine の message level での発現能に影響を及ぼすかどうかを検討している。

#### P-43 サルコイドーシス症例肺胞マクロファージの IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF 産生に及ぼすホスホマイシンの影響

三國谷雄・長井苑子・泉 孝英

京都大学胸部疾患研究所呼吸器内科

目的: サルコイドーシス (サ症) は原因不明の類上皮細胞肉芽腫を主徴とし, 病変部における免疫反応進を病態の特徴とする疾患であり, サイトカインを含む生理活性物質の産生進がみられる。現在のところサ症に対し, 一過性ではあるがある程度の効果が認められる薬剤はステロイドだけである。最近, 抗炎症効果が示唆されているホスホマイシン (FOM) の, サ症例肺胞マクロファージ (BALF M  $\phi$ ) のサイトカイン産生に及ぼす効果を, プレドニン (PSL), エリスロマイシン (EM) と比較検討した。

方法: サ症例 (11 例) の肺胞洗浄液より, BALF M  $\phi$  を調製し, 3 薬剤 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  又は 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) をそれぞれ加え, LPS 刺激下, 非刺激下で 24 時間培養した。培養後, ELISA 法で培養上清中の IL-6, IL-8, TNF  $\alpha$ , GM-CSF の蛋白量を定量した。

結果: FOM は LPS 非刺激下で, IL-6, TNF- $\alpha$  産生を抑制し, PSL, EM と同様の傾向を示した。一方, PSL が IL-8 産生を抑制したのに対し (10/11 例), FOM は高度に増強し, その程度は EM 以上であった。LPS 刺激下では, FOM による IL-6, TNF  $\alpha$  産生抑制能は減弱し, この成績では, 症例間のバラツキが増大した。GM-CSF 産生に対しては,

3 薬剤とも大きな影響はなかった。

考察: LPS 非刺激下で, FOM は IL-1  $\beta$  を含め炎症性サイトカインの産生遊離を抑制する傾向があり, この実験条件下で PSL, EM 同様抗炎症作用を有することが明らかとなった。しかし, LPS 刺激下では IL-6, TNF  $\alpha$  に対する産生抑制能が半数の症例で消失することより, 細胞がある程度活性化した状態では, FOM 単独で抗炎症作用を発揮することが困難であることが示唆された。

#### P-44 サルコイドーシス症例肺胞マクロファージの IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist (IL-1 ra) 遺伝子発現, タンパク質産生に及ぼすホスホマイシンの影響

三國谷雄・長井苑子・泉 孝英

京都大学胸部疾患研究所呼吸器内科

目的: 我々はサルコイドーシス症例肺胞マクロファージ (サ症例 BALF M  $\phi$ ) が健常人に比べ, IL-1  $\beta$  産生は同程度だが, IL-1 ra 産生が有意に減少していることを報告しており, IL-1 サイトカインネットワークのバランスの乱れが慢性炎症の進展に寄与している可能性を示した。本検討では, 抗炎症効果の期待されるホスホマイシン (FOM) のサ症例 BALF M  $\phi$  の IL-1  $\beta$ , IL-1 ra 遺伝子発現, タンパク質産生に及ぼす効果を, エリスロマイシン (EM), プレドニン (PSL) と比較検討した。

方法: サ症例の肺胞洗浄液より, BALF M  $\phi$  を調製し, LPS 刺激下, 非刺激下で 3 薬剤 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  又は 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) をそれぞれ加え, 24 時間培養した。培養後 mRNA の発現は RT-PCR 法で, 培養上清中の蛋白量は ELISA 法 (11 例) で定量した。

結果: LPS 非刺激下で IL-1  $\beta$  遺伝子発見に対し, FOM, PSL は殆ど影響なかったが, PSL が IL-1 ra 遺伝子発現を抑制するのに対し, FOM は変化がないかむしろこれを増強した。IL-1  $\beta$  産生遊離に対し, FOM, PSL はそれぞれ 7/11, 6/11 例で抑制した。IL-1 ra 産生遊離を PSL が全例 (11/11) 抑制したのに対し, FOM は 6/11 例で増強した。LPS 刺激下では, PSL は IL-1  $\beta$ , IL-1 ra 遺伝子発現を抑制したが, FOM は IL-1  $\beta$  遺伝子発現を抑制, IL-1 ra 遺伝子発現を半数の症例で増強した。しかし, IL-1 ra 産生遊離は FOM でも抑制傾向があり, 抑制の程度は, PSL > FOM = EM の順であった。

考察: 炎症性 mediator とその調節物質の間の imbalance を是正することは炎症の進展抑制に有効である可能性がある。特に IL-1 ra の産生が低下しているサ症例 BALF M  $\phi$  に対し, FOM は LPS 非刺激下で遺伝子レベル, 蛋白レベルでこれを増強する症例があり, PSL に比べ, 有効に抗炎症作用を発揮する可能性が示唆された。

#### P-45 ホスホマイシンの一酸化窒素産生抑制作用

山本彰彦・小林 香・渡部宏臣

明治製菓 (株) 薬品総合研究所

目的: 最近の多くの研究により一酸化窒素 (NO) はサイ

トカイン等とともに生体の恒常性の維持に関与する重要な因子として注目されている。そこで我々はホスホマイシン (FOM) の抗菌以外の作用を解明するために生体防御・免疫系の重要な細胞であるマクロファージの NO 産生に及ぼす FOM の影響を検討した。

方法: チオグリコレートで誘導したマウス (C3H/He) 腹腔マクロファージを薬剤存在下および非存在下で大腸菌リポポリサッカライド (LPS) で刺激した後、培養上清中の亜硝酸塩を Griess 反応法で定量することにより NO の生成量を測定した。誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 活性はアルギニンからシトルリンへの変換活性で測定した。

結果: 1. FOM は LPS 単独および LPS + IFN  $\beta$  で刺激したマクロファージの NO 産生を抑制したが、LPS + IFN  $\gamma$  刺激による NO の産生に対する抑制は弱かった。また TNF  $\alpha$  + IFN  $\gamma$  刺激による NO 産生を抑制せず FOM の NO 産生抑制作用に選択性のあることが示唆された。2. LPS 刺激開始 2 時間前及び開始時に FOM を共存させた場合には NO の産生を抑制したが LPS 刺激 2 時間目以降の添加では抑制は認められず、LPS 刺激時に FOM が存在していることが重要と思われた。3. FOM の NO 産生抑制作用は過剰に添加したアルギニンによって拮抗されず、FOM は iNOS を阻害しないことから、FOM の作用点は iNOS 以外にあることが示唆された。

考察: FOM の新たな作用として NO 産生抑制作用を見出した。この結果は FOM がマクロファージの NO 産生制御を介して生体防御・免疫系へ作用する可能性を示唆している。

#### P-46 莢膜保有黄色ブドウ球菌のホスミンによる細胞表面の変動と莢膜産生阻害について

大友俊允・碓井之雄  
一幡良利・嶋田甚五郎  
聖マリアンナ医大・微生物

目的: 細菌の細胞壁よりも、けさらに外側の微細構造が明らかにされてきた。近年、この最外層のグライコカリックス関連物質、特に莢膜が接着、抗食菌作用等で注目されているが、この部位の抗菌剤の合成阻害については余り検討されていない。そこで、分子量、構造的にも透過性の強いホスミン (以下 FOM) について、黄色ブドウ球菌の莢膜合成への影響について検討した。

方法: 莢膜保有黄色ブドウ球菌 (以下 CSA) Smith 株を用いた。莢膜産生能について、sud-MIC レベルでの FOM 及びエリスロマイシン (EM) 濃度が 0.01~0.30  $\mu\text{g/ml}$  存在下で培養、莢膜産生収率 (CY), 細胞容積指数 (CVI), クランピングファクター (CF), 並びに serum-soft agar (SSA) 中での diffuse から compact への変換率を既法 (Infect. Immunol., Vol 31, 798, 1981) に従って行った。また、莢膜合成能の指標としての L-cysteic decarboxylase (LCAD) の活性、及び食菌能についてもマウスの多核白血球 (PMNs) を用いて検討した。

結果: CSA 株を FOM の濃度が 0.25  $\mu\text{g/ml}$  存在下で培養した後の CY, CVI や LCAD は対照や EM に比べて低下し、

CE は上昇した。尚、各濃度での場合も同様の結果を示した。SSA 中での変換率は FOM の濃度が高まるほど上昇したが、EM はその上昇率は FOM に比べて低い結果を得た。マウスの PMNs による食菌活性は E 4 は比べて FOM 処理の場合が濃度が高まる程高かった。尚、両者の抗菌剤による細胞収率から菌の増殖活性には差が認められなかった。

考察: 以上の結果から、従来細菌細胞壁、及び膜に対する透過性が良いといわれている FOM が莢膜やスライムに対する透過性も良いと考えられ、その結果、EM に比べて CSA 株の莢膜産生能の指標である CY, CYI, LCAD, CF や SSA 中での diffuse (莢膜保有) から compact 型 (莢膜非保有) 発育への変換活性等の生物学的性状に反映しているものと考えられた。

#### P-47 レンサ球菌の sialyl-Lewis<sup>x</sup> 発現に及ぼすホスミンの影響

弘田克彦・三宅洋一郎  
徳島大学歯学部口腔細菌学

目的: ガン細胞の転移浸潤、リンパ球のローリング現象のメカニズムとして、レセプターとしての L-, E-, P-セレクトリンとリガンドである sialyl-Lewis<sup>x</sup> の関与が明らかにされている。我々は一部のレンサ球菌の表面に sialyl-Lewis<sup>x</sup> が発現していることを見出した。この現象はこれらの菌による敗血症発症や trans-location に関与している可能性がある。そこでこの発現に及ぼすホスミンの影響を検討した。

方法: 用いた菌種は *S. milleri* group の *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. anginosus* および *S. pyogenes* の標準株および臨床分離株である。培地は Brain heart infusion broth を用いた。一夜前培養した菌を濃度約  $2.0 \times 10^8$  cfu/ml に調製後、ホスミン溶液と 37  $^{\circ}\text{C}$ , 1 時間 5%  $\text{CO}_2$  存在下で接触させ、供試菌液とした。

上記菌液 50  $\mu\text{l}$  を ELISA プレートに乾固吸着させ、牛血清アルブミンにより処理、洗浄後、一次抗体 Anti-sialyl-Lewis<sup>x</sup> monoclonal antibody, 二次抗体 horse-radish peroxidase conjugated anti-mouse IgM goat serum を反応させ、発色定量を行った。

結果および考察: *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. anginosus* および *S. pyogenes* いずれの菌体も Anti-sialyl-Lewis<sup>x</sup> monoclonal antibody と反応し、この反応は sialyl-Lewis<sup>x</sup> により阻害された。この結果はこれらのレンサ球菌が炎症時にサレクチンファミリーを介して付着する可能性を示している。

*S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. anginosus* の sialyl-Lewis<sup>x</sup> 発現はホスミンにより抑制されたが、*S. pyogenes* の sialyl-Lewis<sup>x</sup> 発現は抑制されなかった。Sialyl-Lewis<sup>x</sup> 発現を抑制することにより *S. milleri* group の宿主への付着に影響を与える可能性のあるホスミンの作用は興味深いものがある。

## P-48 ホスホマイシンによる抗癌剤の感受性増強作用及びその修飾機構の検討

菅原俊一・植松史行・麻生 昇

宮城県立瀬峰病院呼吸器科

西條康夫・鈴木修治

渡辺 彰・貫和敏博

東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野

目的: ホスホマイシン (FOM) は、抗菌作用以外にシスプラチン (CDDP) による腎毒性軽減など興味ある知見が報告されている。我々は、ヒト白血病細胞株 K 562 細胞を用い、FOM と種々の抗癌剤との共存による感受性増強効果の有無並びに、修飾機構解明の一環として細胞周期及び細胞内情報伝達系について検討した。

方法・結果: FOM 単独では 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上で K 562 細胞の増殖を僅かに抑制した。単独では殆ど増殖抑制効果認めない低濃度の CDDP, 5-FU との共存において、FOM は相乗的に抑制効果を増強した。一方、ADR, VP-16 との共存においては相加効果にとどまった。<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みのピークは、FOM 存在下では対照に比べ 24 時間遅れて観察されたが、取り込みの程度には殆ど差がなかった。Flow cytometry による細胞周期の解析では、FOM により G<sub>1</sub> 期から S 期への移行の遅延化及び S 期以降の通過促進が認められた。C キナーゼ (PKC) 活性は、可溶画分及び膜画分に FOM 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  接触後徐々に上昇し、6 時間で各々対照の約 1.5 倍、2.5 倍に達した。以後、可溶画分の活性は高いレベルを維持したが、膜画分では減少し 72 時間でほぼ前値に戻った。また、72 時間での可溶画分の活性は FOM の濃度依存的に上昇していた。

考察: FOM は K 562 細胞の抗癌剤感受性を増強し、その一因として細胞周期への修飾が考えられた。また、PKC 活性に対する修飾作用が見出され、BRM 的側面を持つ可能性も示唆された。さらに、これらの効果は FOM が抗菌薬として使用された場合の血中濃度と同等ないし 5 倍程度で認められることから、十分臨床的应用が可能であると考えられた。

## P-49 マウス緑膿菌内因性感染モデルにおける fosfomycin の効果

松本哲哉・館田一博・古谷信彦

宮崎修一・山口恵三

東邦大学医学部微生物学教室

目的: fosfomycin は本来の抗菌作用以外に、抗アレルギー作用、難治性疾患の症状緩解効果など特殊な作用を有している。これらの作用は総括すると抗炎症作用が主体であると考えられるが、メカニズムを始めその詳細はいまだ十分な解明には至っていない。

敗血症では多くのサイトカイン (特に TNF, IL-1 および IL-6) が重要な役割を果たしており、炎症がその病態に大きく関与している。今回我々はマウス緑膿菌内因性感染モデルを用いた敗血症において、fosfomycin の持つ抗炎症作用がどのような効果を引き出すか検討を行った。

方法および結果: SPF の ddY マウス (4~6 週令, 雄) に ABPC 200 mg/kg をあらかじめ投与し腸管内常在菌を攪乱させた後、緑膿菌 D 4 株を 0.45% 食塩水に懸濁し飲水として与え、同菌を腸管内に定着させる。その後サイクロフォスファミド 150~200 mg/kg を 2 回投与し顆粒球減少状態とし、腸管内に定着した緑膿菌による内因性敗血症を惹起させた。2 回目のサイクロフォスファミド投与後 12 時間毎に fosfomycin を腹腔内投与したところ、対照群に比べ生存率の有意な上昇が認められた。しかしこの結果が fosfomycin の持つ本来の抗菌作用による可能性も否定できないため、抗菌作用を有しない fosfomycin の鏡像体を用いて上記と同様のスケジュールで検討を行った。その結果、鏡像体によっても生存率の有意な上昇が認められた。

考察: fosfomycin の投与によって生存率の有意な上昇を認めたことは、この系が緑膿菌による敗血症であり、fosfomycin の直接の抗菌作用が殆ど期待できないことを考慮すると注目すべき点であると考えられる。特に抗菌作用を有していない鏡像体でも同様の効果が確認されたことから、fosfomycin の有する抗炎症作用が生体に有利に働いたものと考えられ、そのメカニズムとしてサイトカインへの影響などが示唆された。

## P-50 難治性口内炎に対するホスホマイシンの使用経験

田中廣一・梅津康生\*

信州大学医学部歯科口腔外科

\*東北大学歯学部第一口腔外科

Fosfomycin (FOM) は抗菌作用以外にも数々の薬理活性が指摘されている。その中に抗癌剤 (Cisplatin) 誘発の腎障害軽減作用などが知られているが、これは腎の近位尿管上皮細胞中におけるライソゾーム膜保護作用によるものとされている。また抗アレルギー作用としては FOM による肥満細胞からの脱顆粒抑制作用やヒト末梢血好塩基球からの IgE 介在性ヒスタミン遊離抑制作用や動物実験における FOM 投与による組織内 cyclic AMP 増加作用などが報告されているがこれら作用の背景には抗炎症作用に関連した steroid like に類似した薬理作用があるものと考えられる。そこで臨床例としてステロイド治療に反応しない難治性口内炎の治療に FOM を試み、優れた効果を経験した事実から抗生物質 FOM には抗菌作用以外にも生体系に及ぼす何らかの生理活性作用があるのではないか、? もしあるとすれば、新たな視点を提供することになると考え、実験的に C 3 H/He mouse を用いて検討した。マウス脾臓細胞を用いて Cortison が Immunocompetent cells に対して顕著な抑制作用を有することから、FOM によるリンパ球、M $\phi$ 、NK cells 等に対する作用等を分析し、Cortison の作用とは違った特徴的な傾向を示したので報告した。

結果: FOM は実験的に C 3 H/He mouse においてはリンパ系細胞を刺激し特に抗体産生にあずかる B 細胞系を増殖させる事実を示したさらに、Cortison とは異なり特異な作用をリンパ系細胞に示し、特に NK 活性、キラー T 細胞分化等の細胞性免疫方向を抑制しつつ、M $\phi$ 、ヘルパー T 細胞、Sig 陽性 B 細胞の増加を誘導しかつ、液性免疫系の賦活傾向

を有しているものと考えられた。今後、この抗体産生系への影響を具体的に検討することが重要と考えられる。

## P-51 肺線維症症例に対するホスミシンの投与の臨床的検討

長井苑子・三国谷雄・泉 孝英

京都大学胸部疾患研究所呼吸器内科

目的: 抗生物質であるホスミシンの持つステロイド節約作用の検討対象として、炎症性肺傷害の修復過程の過剰あるいは異常によって起こる線維化形成性肺疾患の代表である特発性肺線維症 (IPF) と関連疾患に焦点をあてて、薬剤投与の効果について検討を加え、ステロイド薬との比較あるいは併用の意義について考察した。

方法: 開胸肺生検によって UIP と診断された特発性肺線維症 10 例と膠原病 (RA, PSS) に伴う肺線維症 3 例を対象とした。安定期に静脈投与 (ホスミシン 2 g/日を 7 日間投与) あるいは経口 2 g/日 14 日~28 日投与した。投与前後の変化を以下の結果に示す指標で比較検討した。数値は 10% 以上の変化は改善あるいは悪化とし、10% 以内の変化は不変と判定した。

結果: 自覚症状 (呼吸困難, 咳, 痰, 発熱) の改善は 31% の症例でみられたが、胸部 X 線所見は不変 (91%) または悪化 (9%) であった。肺機能 (VC, % VC, FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>%) で 10%, 動脈血酸素分圧は 33% で改善がみられた。赤沈 42%, CRP 45%, LDH 8%, 白血球数 0%, 好中球数 31%, 好中球エラスターゼ 31%, α<sub>1</sub>-アンチトリプシン 29%, プロコラーゲンペプチド 50%, IV 型 7 S コラーゲン 50%, ヒアルロン酸 80% の改善率であった。

考察: ホスミシンの短期投与により、軽度ではあるが、肺傷害改善効果が示唆された。しかし、進行例での効果は単独では困難なことも示唆された。

## P-52 HAM におけるホスホマイシン療法

山野嘉久・川畑政治・納光 弘

鹿児島大学医学部第三内科

目的: 現在までに、Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy (HAM) に対して様々な immunomodulatory drug の有用性が確認されている。最近、ホスホマイシンに免疫調節作用のある事が幾つか報告された為、今回、我々は HAM に対するその効果と、安全性について評価した。

方法: 10 例の HAM 患者 (男 2 例, 女 8 例, 41~78 歳) に対し、ホスホマイシン 4 g/day (朝夕分 2) を 2 週間点滴静注し、続いて、内服でホスホマイシン 2 g (朝夕分 2) を 2 週間経口投与し、投与の開始前後で神経症状の改善度について評価した。評価方法は、納の運動障害重症度スケールにて行い、重症度が 2 段階以上改善を著効、1 段階改善を有効、同一障害度内での改善をやや有効とした。更に、10 m 歩行時間を計測し、その変化を調べた。その他、上肢握力、しゃがみ立ち、下肢振動覚、および膀胱機能障害の程度について評価を行った。

結果: HAM の運動障害重症度では、10 例中有効 3 例、や

や有効 7 例で、無効、増悪例はなかった。10 m 歩行時間は 9 例で短縮し、しゃがみ立ちの改善が 5 例に見られ、膀胱機能障害の改善が 6 例に見られた。上肢握力、下肢振動覚については、明らかな改善はみられなかった。副作用は、10 例中 2 例で下痢、1 例で下肢浮腫がみられたが、特に重篤な副作用はみられなかった。

結論: ホスホマイシン療法が HAM の治療として有用であると考えられた。

## P-53 2 種の異なるマウス遅延型アレルギー反応における Fosfomycin の影響の相違

鳥井郁子・森川 茂

島根医大病理学講座第一ユニット

目的: マウスの遅延型アレルギー (DH) 反応は MΦ 依存性に成立し肥満細胞の関与を必要としないタイプと、MΦ 非依存性に成立し肥満細胞の関与を必要とするタイプの 2 型に分類される事を見だし、前者をツベルクリン (Tbc) 型、後者を肥満細胞依存 (MD) 型として報告してきた。今回は両 DH 反応における肥満細胞の関与をさらに詳しく検討するため、ヒスタミン放出抑制効果を有する抗生物質 Fosfomycin (FOM) の両 DH 皮膚反応に及ぼす影響の相違を解析した。

方法: 両 DH 皮膚反応は、C 57 BL/6 の左足趾皮下に、CFA 併用 (Tbc 型) 又は IFA 併用 (MD 型) メチル化ヒト血清アルブミン (MHSA) で感作後、8 日目 (Tbc 型) 又は 28 日目 (MD 型) に右足趾皮内に惹起注射を行い、24 時間目の足腫脹 (FPR) 及び病理組織学的所見で解析した。MD 型 DH 誘導時の肥満細胞に対する FOM の影響を解析するため、惹起注射 4 時間目及び 24 時間目の惹起局所の肥満細胞の集積及び脱顆粒について定量的に解析した。FOM 処理は投与時期 (惹起注射前/後) 並びに投与量 (1~1,000 mg/kg/ B. W.) を変え i. p. した。

結果: ① FOM 処理により処理時期に無関係に、Tbc 型では足腫脹の増強、MD 型では抑制が見られた。② 惹起注射直後に FOM 処理を行った場合、Tbc 型では FOM 濃度に依存して足腫脹の増強が見られたのに対し、MD 型では体重当たり 1 mg から 100 mg までは足腫脹の抑制が、1 g では足腫脹の増強が観察された。③ MD 型 DH では FOM 処理により 4 時間目の惹起局所での肥満細胞の集積並びに脱顆粒の抑制が確認された。④ 病理組織学的にも、FOM 処理で、Tbc 型は炎症細胞浸潤及び皮下浮腫の増強、MD 型は炎症細胞浸潤の程度の減弱を認めた。

考察: 肥満細胞からのヒスタミンの放出抑制効果が知られている FOM を用いた今回の結果からも、Tbc 型 DH 反応と異なり MD 型 DH 反応の誘導には肥満細胞が重要な役割を演じることが確認された。FOM は肥満細胞のヒスタミン放出を抑制することにより、MD 型 DH 皮膚反応を抑制するものと考えられる。

## P-54 アトピー性皮膚炎に対する FOM の効果

—ケトチフェンとの比較—

田中 信

静岡赤十字病院皮膚科

はじめに: アトピー性皮膚炎 (AD) は増悪, 寛解を繰り返す慢性反復性経過をとる痒みのある湿疹を主病変とする疾患である。真皮に侵入したハウスダストなどの抗原による肥満細胞を介した I 型アレルギー反応により痒み, 紅斑が出現し, T 細胞の活性化による IV 型アレルギー反応により湿疹反応が発生する。I 型反応に対する抗アレルギー剤内服と IV 型反応に対するステロイド剤外用の併用が一般的治療である。FOM は抗 IgE, Ca<sup>2+</sup>イオノフォア介在の肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制, 細胞内 c-AMP の増加作用を持ち, ヒスタミンなどの化学伝達物質遊離抑制と拮抗作用を持つ抗アレルギー剤に類似した薬剤でもある。今回, AD に FOM 内服を行ない FOM の抗アレルギー剤としての作用を確かめた。

方法: 17 例の AD に FOM 100 mg/kg/日最高 2 g/日を 14 日間内服し, 同時にステロイド外用を併用した。

結果: 有効率は 59 % で, その効果は痒みより紅斑に優れていた。紅斑より FOM に感受性陽性の黄色ブドウ菌が検出された AD の有効率は 44 % で, 細菌陰性の AD の有効率は 100 % であった。血中ヒスタミン値, 好酸球, IgE には影響を与えなかった。抗アレルギー剤であるケトチフェン (KET) の有効率は 68 % で FOM より僅かに優れているが紅斑には FOM が, 痒みには KET が優れていた。FOM と KET の併用の有効率は 86 % で紅斑, 痒みに対する効果も FOM, KET より優れていた。

まとめ: FOM は AD に対して抗菌剤としてでなく抗アレルギー剤として働いているようであり, その効果は KET より僅かに劣る。FOM と KET の併用により KET がない cAMP 増加作用を FOM が補い, FOM がないヒスタミン拮抗作用を KET が補うことから FOM と KET の併用は優れた効果を示すと思われる。

#### P-55 MRAS に対する FOM + ABPC/SBT の *in vitro* 及び *in vivo* 併用効果の検討

中尾 歩・山下直哉

慶應義塾大学医学部小児科学教室

MRSA に特有の細胞壁合成酵素である PBP 2' の誘導を抑制する FOM と, PBP 2' に対する親和性が高い ABPC と,  $\beta$ -lactamase 阻害剤の SBT を加えた 3 剤併用療法 MRSA 感染症に対する効果を, VCM 単独療法との間で比較検討した。

MIC 測定は, 最近 5 年間に当科で感染症の起炎菌として分離された MRSA 23 株を検体として微量液体希釈法で行った。*in vitro* 併用効果は同様に checkerboard 法で行い, FIC index < 0.5 を相乗効果とした。*in vivo* 併用効果の検討は, 左室内カテーテル留置によるウサギ実験的心内膜炎モデルを用いて, *in vitro* で FOM + ABPC/SBT の相乗効果を認めた臨床分離株 SA 67 を起炎菌として行った。1~3 × 10<sup>8</sup> CFU の SA 67 を耳静脈から接種する事により心内膜炎を成立させ, 菌接種 16 時間後にウサギを ① 対照群 5 羽 (治療無し) ② ABPC/SBT 群 6 羽 (200/20 mg/kg/dose 6 時間毎筋注) ③ FOM + ABPC/SBT 群 10 羽 (FOM 40 mg/kg/dose を ABPC/SBT 投与の 1 時間前毎に筋注) ④ VCM 群 11 羽 (25 mg/kg/dose 12 時間毎静注) の 4 群に振り分け

治療を開始した。対照群は菌接種 16 時間後, その他 3 治療群は 4 日間治療終了後に, 大動脈弁周囲の疣贅を採取し定量培養した。治療効果については, 疣贅内細菌密度の平均値 (mean log<sub>10</sub> CFU/gram vegetation) を各群間で比較検討した。

その結果, SBT 6  $\mu$ g/ml 存在下での ABPC の 23 株に対する MIC は 16 株 (70 %) で 16  $\mu$ g/ml 以上であった。FOM の MIC は 15 株 (65 %) で 256  $\mu$ g/ml 以下であり, これらの株では ABPC/SBT との間で相乗効果を認めた。*in vivo* モデルでは FOM + ABPC/SBT 群は対照群及び ABPC/SBT 群と比較して有意な平均疣贅内細菌密度の減少が認められ (2.92 v. s. 9.84 v. s. 9.53), VCM 群と同等の治療効果 (2.92 v. s. 2.97) が認められた。

以上から, FOM + ABPC/SBT 併用療法は MRSA 感染症に有用であることが示唆された。

#### P-56 MRSA に対する CZOP/VCM, CZOP/TEIC, CZOP/ABK の *in vitro* 併用効果

豊川真弘・浅利誠志・堀川晶行

塚本寿子・田原和子・砂田淳子

大阪大学医学部附属病院臨床検査部

目的: 抗 MRSA 薬である VCM, TEIC および ABK とセフェム系新薬である CZOP との MRSA に対する *in vitro* 併用効果を比較測定した。

材料および方法: 当院微生物検査室において 1994 年度に分離された MRSA 73 株を対象とし, FICindex, time-killing curve および PAE を比較測定した。なお, 詳細な併用効果を捉えるために VCM, TEIC および ABK は 1.25 倍希釈系列を用いた。

結果: 各薬剤の単剤 MIC 値を比較すると, VCM は 0.3 ~ 1.6  $\mu$ g/ml の幅の狭い一層性の分布を示し TEIC および ABK は幅広い分布を示した。VCM および TEIC に対する耐性株は認められなかったが ABK に対しては 8 % の株が耐性であった。MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> は VCM (1.0, 1.2  $\mu$ g/ml), TEIC (0.8, 3.2  $\mu$ g/ml), および ABK (0.6, 4.0  $\mu$ g/ml) であった。

*In vitro* 併用効果を FICindex で比較すると, CZOP/TEIC の組み合わせでは 92 % の株に対して相乗効果が認められ, CZOP/ABK, CZOP/VCM ではそれぞれ 38 %, 7 % であった。また CZOP を併用することにより TEIC, ABK および VCM の MIC 値がそれぞれ単剤の 13 ~ 50 % (平均 28 %), 19 ~ 90 % (47 %) および 31 ~ 83 % (54 %) に低下した。殺菌効果の比較ではすべての組み合わせにおいて CZOP の併用による殺菌効果の増強が認められた。

考察: MRSA 感染症に対する VCM, TEIC あるいは ABK と CZOP との併用は, 腎機能低下患者における副作用の軽減やグラム陰性菌との混合感染症例において有用な治療法であることが示唆された。

## P-57 メチシリン耐性 *S. aureus* に対する VCM と FK 037 の併用効果

— 1. *In vitro* pharmacokinetic model による検討 —

波多野和男・若井芳美・渡辺裕二

藤沢薬品工業開発第一研究所・化療

目的: VCM は MRSA 感染症の第一選択薬として高い実績があるが、短時間殺菌力が弱く臨床的な効果の発現が緩徐である。また、副作用の点から投与量が制約される問題も生じる。そこで、MRSA にも抗菌力を有する FK 037 を、VCM と併用することによって殺菌力の増強と VCM の投与量の低減の可能性について *in vitro* PK model を用いて検討した。

方法: *In vitro* PK model は Nishida らの方法<sup>1)</sup>を用いて各薬剤をヒトに 1 時間点滴静注した時の血漿中濃度を試験管内で再現し、MRSA に対する併用時の殺菌作用を 8 時間作用時の殺菌率を指標として検討した。

結果:

(1) 同時併用: VCM の 500 mg 相当量と FK 037 の 1 g 相当量の同時併用 8 時間作用後の殺菌率は、VCM または FK 037 の各単独時の殺菌率と大差なく、両剤の併用効果は認められなかった。

(2) 時間差投与の影響: 併用効果は FK 037 を先行した場合に認められ、併用効果を最大とする VCM と FK 037 の併用のタイミングは、FK 037 の 4 時間先行作用後 VCM 作用であった。

(3) 併用による VCM の減量: VCM の 250 mg 相当量と FK 037 の 1 g 相当量の同時併用時の殺菌率は VCM の 500 mg 相当量の単独時のそれと同等以上であり、VCM の投与量を低減させても FK 037 と併用することで十分な作用が発揮された。

(4) FMOX 併用との比較: FK 037 と VCM の併用効果を FMOX と VCM のそれと比較した場合、8 時間後の殺菌率および併用効果の程度は FMOX と VCM の併用が優れていた。

結論: MRSA に対する VCM と FK 037 の併用効果は、*in vitro* PK model において認められ、その併用タイミングは、FK 037 を先行させる時差投与との方が強かった。さらに併用により、殺菌力を減弱することなく VCM の投与量を低減できる可能性が示唆された。

1) Nishida M et al.: Antimicrob. Agents. Chemother. 14: 6~12, 1978

## P-58 メチシリン耐性 *S. aureus* に対する VCM と FK 037 の併用効果

— 2. *In vivo* pharmacokinetic model による検討 —

波多野和男・若井芳美・渡辺裕二

藤沢薬品工業開発第一研究所・化療

目的: *In vitro* PK model において、VCM と FK 037 を併用することによる、殺菌力の増強と VCM の投与量の低減の可能性について報告した。そこで、この結果が、ヒトに反映するかどうかを予測するために、*in vivo* PK model を用いて MRSA による呼吸器感染治療を検討した。

方法: *In vivo* PK model は Hatano らの方法<sup>1)</sup>を用いて各薬剤をヒトに 1 時間点滴静注したときの血漿中濃度をマウスの血漿中濃度に再現し、MRSA 呼吸器感染マウスに対する併用時の治療効果を検討した。

結果:

(1) 同時併用による効果: VCM と FK 037 を同時併用した場合の 8 時間後の治療効果は、同一相当投与量の各単独治療群に比べ明らかに優れていた。また、FK 037 の 1 g 相当量と VCM の 125 mg 相当量の併用による治療効果は、VCM の 500 mg 相当量の単独時の治療効果と同等で、さらには VCM を 250 mg 相当量併用した場合にはそれ以上の治療効果が得られた。

(2) 時間差投与の影響: VCM と FK 037 を同時に治療開始した場合に比較し、FK 037 の治療開始 4 時間後に VCM の治療を付加した場合の方が 8 時間後の治療効果は優れていた。

(3) FMOX 併用との比較: VCM の 500 mg 相当量と FMOX の 1 g 相当量を併用したときの 8 時間後の治療効果は、VCM の 500 mg 相当量の単独治療時のそれと差がなく、VCM と FK 037 との併用の方に遥かに優れていた。

結論: 臨床効果を予測する目的で検討を行った *in vivo* PK model において、MRSA に対する VCM と FK 037 の併用効果は治療結果に顕著に現れ、FK 037 を先にした時差投与の方が強かった。さらに併用により、副作用の危惧される VCM の投与量を低減でき、臨床における MRSA 感染症に対して、VCM と FK 037 の併用の有用性が示唆された。

1) Hatano K. et al.: Chemother. (Basel) 40: 1~7, 1994

## P-59 ABK と $\beta$ -lactam の MRSA に対する *in vitro* 併用効果

— Postantibiotic phase における抗菌効果 —

長谷川裕美<sup>1)</sup>・乙黒一彦<sup>2)</sup>

戸塚恭一<sup>3)</sup>・清水喜八郎<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京女子医科大学第二学院小児科

<sup>2)</sup> 北里研究所

<sup>3)</sup> 東京女子医科大学臨床中央検査部

目的: 第 41 回東日本支部総会にて、VCM または  $\beta$ -lactam の一方の薬剤作用により Postantibiotic phase (PA-phase) に誘導された MRSA に対する他方の薬剤の抗菌効果について報告したが、今回、ABK と  $\beta$ -lactam について *in vitro* にて同様の検討を行った。

材料: 使用薬剤: arbekacin (ABK), flomoxef (FMOX)。

使用菌株: MRSA 臨床分離株 (MIC: ABK 8  $\mu$ g/ml, FMOX 64  $\mu$ g/ml)。

方法: (1) FMOX 作用後 filter 法にて薬剤を除去し、直後に ABK を作用させ経時的に生菌数を測定することにより求めた PA-phase の菌に対する ABK の抗菌効果を、FMOX 前作用 (-) の菌と比較した。(2) 同様の方法で、ABK 前作用の有無による FMOX の抗菌効果を比較検討した。また、前作用濃度および時間は、血中濃度を考慮し、(1) FMOX: 32~128  $\mu$ g/ml, 0.5~2 h, (2) ABK: 1~8  $\mu$ g/ml, 0.5~2 h と設定した。

結果: (1) FMOX 前作用により ABK の sub-MIC での増殖抑制作用, 殺菌作用, および above-MIC での殺菌作用は, ともに増強する傾向を示した。また, この傾向は FMOX の前作用濃度, 作用時間の増加とともに増強した。

(2) ABK 前作用により FMOX の sub-MIC での増殖抑制作用, 殺菌作用は増強したが, above-MIC での殺菌作用は減弱し, FMOX 1~4 MIC では 4 時間後も殺菌作用は殆ど認められなかった。また, この傾向は ABK の前作用濃度, 作用時間の増加とともに増強した。

考案: MRSA に対する ABK と FMOX のそれぞれの抗菌効果は, FMOX above-MIC の殺菌作用では, ABK 前作用 (+) の PA-phase の菌が ABK 前作用 (-) の菌に比べ減弱する傾向を認めたが, 実際の併用療法で問題となる sub-MIC での抗菌効果 (増殖抑制効果, 殺菌効果) は, ABK, FMOX ともに, 他方の薬剤を前作用することにより増強され, 優れた併用効果を認めた。

#### P-60 ホスホマイシン高度耐性肺炎桿菌に対する FOM と他抗生剤との併用効果

小原康治

東京薬大・薬・第二微生物

目的: ホスホマイシン (FOM) 耐性菌の耐性化機構としては緑膿菌の FOM: グルタチオン-S-転移酵素 (FOM: GST)<sup>1,2)</sup>, *S. marcescens* のプラスミド性遺伝子 *fosA*, *S. epidermidis* の *fosB*, 肺炎桿菌の FOM: GST や膜不透過型<sup>2)</sup> が知られている。今回は FOM 高度耐性肺炎桿菌の耐性化機構および他抗生剤との併用効果について報告する。

方法: 使用菌株: 肺炎桿菌, FOM 力価検定 *Proteus* sp. MB 838。薬剤 (化療略号): FOM; PCV, PEPC, ABPC, AMPC, CMNX; EM, MDM; KM, AKM, AMK, DKB, ABK。MIC 測定: 化療抗菌薬感受性測定法, 1990。粗酵素液での FOM 不活化: 粗酵素液<sup>2)</sup> 0.8 ml, FOM (125 mg/ml) 0.1 ml, 40 mM GSH 0.1 ml で 37 °C 反応, 残存力価検定。50% 発育阻止濃度 (ID<sub>50</sub>): 各 FOM 濃度での EDTA (不) 含有 BHI 培地で測定。菌体内 FOM 測定: 新鮮培地での洗浄菌体を, 種々 FOM 濃度で 37 °C で取り込ませ Hyper-tonic 液で洗浄後, FOM を加熱抽出。他剤との併用効果: マイクロタイタープレートでの二次元液体希釈法。

結果: FOM 高度耐性株の EDTA 処理後の ID<sub>50</sub> 値は 1.5 ~ 3.7 倍, グリシン・スフェロプラストでは 1~2 段階感受性化した。高度耐性菌では 512 μg/ml の FOM 濃度で菌体内取り込みが見られ, 経時変化でも感受性菌と比べ著しい差を示した。FOM 耐性株での種々抗生剤併用効果検討では ABPC, CMNX; EM, MDM が使用全株に対し相乗効果を示した。また, 感受性菌 JK 9 株では AMPC, PEPC; AKM でも, 感受性のやや低い Tf 341 A 株では PCV; AKM でも, 高度耐性 Tf 170 B 株では AMPC とでも相乗効果を示した。アミノ糖抗生剤は FOM 高度耐性株には全て拮抗した。

考察: 全 FOM 高度耐性株への相乗効果は上記の 4 抗生剤で特異的であり, 一次選択 FOM 併用薬剤として強い有用性が示唆された。

1) Chemotherapy 36: 905~910, 1988

2) FEMS Microb. Lett. 114: 9~16, 1993

#### P-61 ペニシリン耐性肺炎球菌に対する fos-fomycin と β-ラクタム薬の *in vitro* の併用効果についての検討

戸塚恭一・内山竹彦・菅野由美子\*

高田敏彦\*・吉田 隆\*

東京女子医科大学感染対策科

\*明治製薬創薬研究所

目的: 近年ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) の増加が認められている。PRSP は, β-ラクタム薬をはじめとする多くの抗菌薬に耐性を示すことからその治療について種々の検討が行われている。我々は既に fosfomycin (FOM) と penicillin G との併用効果について報告した。今回は FOM と他の β-ラクタム薬との併用効果について FIC index, 殺菌曲線, 投与順序に関して検討を行ったので報告する。

方法: 1992 年から 1994 年に当院で分離された PRSP の 56 株について FOM と CEZ, CTM, CTX, CFPM, IPM, PCG の *in vitro* における併用効果をチェッカーボード法により求めた。FIC index で 0.5 以下を相乗, 0.5 から 1 未満を部分相乗, 1 を相加, 2 を不関, 2 以上を拮抗とした。

PRSP 23-1231 株について FOM の 1/2 MIC (8 μg/ml) と CEZ, CTM, CTX, CFPM, IPM, PCG の 1/2 -2 MIC の併用時の殺菌曲線を求めた。また FOM の 1/2 MIC と CTX, CFPM, IPM, PCG の 1/2 MIC および 1 MIC について 2 時間後に併用して作用順序による殺菌効果を検討した。

結果: PRSP の 56 株における併用効果は使用した薬剤全てにおいて部分相乗が約 60~80% の株に認められ, CTM と PCG ではさらに相乗効果が 36%, 30% の株に認められた。

投与順序の検討では FOM といずれの β-ラクタム薬においても同時併用が最も殺菌作用が強かった。

考察: PRSP は β-ラクタム薬全体への耐性を示しており, 薬剤移行性の少ない髄膜炎の治療では β-ラクタム薬単独では治療が困難である例も示されている。今回の検討では FOM と β-ラクタム薬の *in vitro* における併用効果が示されたが, *in vivo* における作用などについても更に検討が必要である。

#### P-62 *Corynebacterium non-diphtheriae* 感染症に対する検討

坂本光男・斎藤 篤

東京慈恵会医科大学附属柏病院総合内科

猿田克年・中澤 靖・進藤奈邦子

前澤浩美・吉川晃司・吉田正樹

柴 孝也・酒井 紀

東京慈恵会医科大学第二内科

目的: *Corynebacterium non-diphtheriae* は日和見病原体として注目されてきている。そこで今回慈恵医大柏病院 (以下当院) において本菌群が検出された症例について検討を行った。

対象: 1990年1月から1994年12月までの5年間に当院において血液, CAPD 排液より本菌群が検出された5例(内科4例, 小児科1例)を対象とした。

結果: 検出菌の内訳はC. Group ANF 4株, C. Group B 1株であった。症例の基礎疾患は造血器悪性腫瘍, 肺炎, 脳出血後の急性腎不全, 非ケトン性高グリシン血症であった。次に検出菌の薬剤感受性について検討した。最も良好な抗菌力を示したのはVCMとMINOであり, すべての株でMICは1.0 µg/ml以下であった。β-ラクタム薬に対してはC. Group Bの1株は比較的良好な感受性を示したが, C. Group ANFの4株はすべて高度耐性を示していた。ところでMRSAではVCMとβ-ラクタム薬を併用することによって相乗効果の得られることが知られている。そこでβ-ラクタム薬に高度耐性を示したC. Group ANFの4株についてチェッカーボード法を用いて同様の検討を行なった。その結果, VCMとFMOX, CPR, IPMの組合せにおいて, MRSAの場合と同様の併用効果が得られた。

考察: β-ラクタム薬に耐性を示すC. Group ANFに対してVCMとβ-ラクタム薬の併用が有効であることが示唆された。

### P-63 緑膿菌に対する sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) と piperacillin (PIPC) の併用効果の検討

中森祥隆<sup>1)</sup>・宮下吉弘<sup>1)</sup>

小川正俊<sup>2)</sup>・香本見良<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 国家公務員等共済組合連合会三宿病院呼吸器科

<sup>2)</sup> ファイザー製薬(株)新薬開発センター細菌研究室

目的: 緑膿菌に対するSBT/CPZとPIPCの*in vitro*併用効果を検討した。

実験材料および方法: 1. ファイザー製薬(株)新薬開発センター保存緑膿菌27株, 呼吸器感染症分離緑膿菌14株に対するSBT/CPZとPIPCのMICを日本化学療法学会最小発育阻止濃度測定法に準じ測定した。また, Checker board法によりFIC indexを算出した。

2. 呼吸器感染症分離緑膿菌14株に対するSBT/CPZとPIPCの併用効果を検討した。

結果: 1. 接種菌量 $10^6$  CFU/mlでは, 緑膿菌27株に対するSBT/CPZのMIC rangeは3.13~25 µg/ml, PIPCは0.20~6.25 µg/mlであった。両者を併用した場合には0.05~12.5 µg/ml, 0.025~3.13 µg/mlであった。FIC indexは0.516~1.0に分布し, 平均は0.759であった。また, CPZとPIPC, SBTとPIPCのFIC indexの平均は0.698, 0.798であり拮抗は認められなかった。

2. 緑膿菌14株に対するSBT/CPZのMIC rangeは, 0.39~50 µg/mlで, PIPCは0.10~50 µg/mlであった。PIPCのMICはSBTを3.13 µg/ml添加すると若干良好となり, SBT/CPZ 3.13 µg/ml添加時には, MIC<sub>90</sub>で1.56 µg/ml, またSBT/CPZ 12.5 µg/ml存在下でのPIPCのMIC<sub>90</sub>は0.05 µg/ml以下と良好な併用効果を示した。

考察: 緑膿菌に対するSBT/CPZのMICが3.13~25 µg/ml(中等度耐性)の株に対するSBT/CPZとPIPCの併用効果

の検討を行ったが, FIC indexの平均で0.740であり, ほとんどの株で相加, 相乗効果が確認された。

今回併用で得られたSBT/CPZ及びPIPCのMIC値から, 緑膿菌感染症に対してこの併用療法の治療効果が期待される。

### P-64 臨床分離緑膿菌に対する CPR と各種抗生物質の試験管内抗菌併用効果

鈴木由美子・横田のぞみ・古口昌美

深山成美・石原理加・小田清次

出口浩一

東京総合臨床検査センター研究部

臨床分離緑膿菌に対するCefpirome (CPR) と各種抗生物質の試験管内抗菌併用効果を検討した。

検討方法: 供試株は1994年に当所にて検出した*P. aeruginosa* 25株とした。抗菌併用効果は, CPR + PIPC, CPR + AZT, CPR + IPM, CPR + FOM, CPR + GM, CPR + TOB, およびCPR + AMKの7系統とし, 濃度の組み合わせはCPRは一定とし, 7系統の濃度は各々の薬剤の投与量と体内動態を考慮して設定した。そして, 抗菌併用効果の判定は, Mueller-Hinton Broth (Difco, Ca・Mgの規定量を添加)の微量液体希釈法により, MICを測定する方法とした。

結果: 7系統のいずれの組み合わせにおいても併用効果が認められたが, CPRおよび併用試験の組み合わせに用いた薬剤単独のいずれかの高い方のMIC<sub>90</sub>に比較して, 両薬剤の組み合わせによって1/4以下にMIC<sub>90</sub>が低下した各々の濃度は, CPR-PIPC: 4 µg/ml・2 µg/ml, CPR + AZT: 2 µg/ml・2 µg/ml, CPR + IPM: 8 µg/ml・4 µg/ml, CPR + FOM: 8 µg/ml・16 µg/ml, CPR + GM: 8 µg/ml・2 µg/ml, CPR + TOB: 2 µg/ml・2 µg/ml, CPR + AMK: 8 µg/ml・4 µg/mlであり, 7系統いずれにおいても臨床的に可能な濃度において抗菌併用効果が認められた。

考察: *P. aeruginosa*に対するCPRと7薬剤には抗菌併用効果が認められたが, そこにおいては相乗効果を含むことが示唆された。上記の1/4以下にMIC<sub>90</sub>が低下するのに必要な併用薬剤の濃度と, 本学会が発表したBreak point MICを比較すると, 肺炎においてはIPMを除く各薬剤がその濃度をクリアーしていた。しかし, 肺炎においてはFOMが, 敗血症においてはAGs等のBreak pointが発表されていないので, 検討できなかった。

### P-65 *Legionella pneumophila* に対する erythromycin と levofloxacin の併用療法の基礎的検討

普天間光彦・比嘉 太・伊志嶺朝彦

豊田和正・小出道夫・川上和義

草野展周・斎藤 厚

琉球大学第一内科

目的: レジオネラ感染症は診断が困難であることや

compromised host に発症しやすいことから重症例も多々みられる。このような重症例に対する治療法としては優れた抗菌力を持った薬剤の併用療法が選択される。今回我々は erythromycin (EM), levofloxacin (LVFX) と Rifampicin (RFP) の3剤を用いて併用療法の基礎的検討を行った。

方法: *L. pneumophila* serogroup 1 10株に対する MIC を BYE-a broth を用いた微量液体希釈法にて測定し、その併用効果を checker board を用いた FIC index にて検討した。試験管内抗菌活性は *L. pneumophila* (80-045) に各薬剤を同時および時間差 (12 時間) 併用し、37℃ で振盪培養を行い経時的に菌数を測定した。

結果: *L. pneumophila* 10 株に対する FIC index はそれぞれ EM + LVFX が 1.0 以上と拮抗作用を示し、EM + RFP は 0.625 と部分的相乗効果、LVFX + RFP は 0.75 ~ 1.0 以上と株間に差がみられ拮抗を示す株が 2 株認められた。試験管内抗菌活性ではそれぞれ 1 MIC の同時併用ではいずれの群も拮抗作用を示した。時間差併用の検討では RFP を後に加えた群で菌数の減少する傾向を示した。また、EM と LVFX の併用で、1 MIC の併用では拮抗作用を示したが、EM 1/4MIC を加えた群では LVFX の抗菌作用に影響を与えず、1/4 MIC づつの併用では相加作用を認めた。

考察: 今回の検討では FIC index と試験管内抗菌活性の結果が一致しない部分もあり、今後の検討課題であると考えられた。EM と LVFX の拮抗作用は EM の静菌的作用が LVFX の抗菌効果を抑制することが示唆された。

## P-66 MRSA に対する緑茶エキスと $\beta$ -ラクタム系抗生剤の相乗効果に関する検討

山崎堅一郎

大宮赤十字病院検査部

村山琮明・山口英世

帝京大・医・細菌

目的: 近年、MRSA 感染症の治療法として種々の抗生剤の組合せによる併用療法が試みられている。今回我々は、緑茶エキスと単独では無効であった  $\beta$ -ラクタム系抗生剤との併用で MRSA に対する相乗効果を示唆する結果を得たので報告する。

方法: (1) MRSA は、当院で分離された 12 株を用いた。(2) 緑茶エキスは、1 g の緑茶を 100 ml の沸騰精製水に加え、30 分間室温放置したものを用いた。このエキス 5% では MRSA の発育を阻止しない。(3) MRSA を塗布した MH 寒天培地に、緑茶エキスを一滴滴下、その横にセンチディスクを併置し、その間に生じた阻止帯の有無を一夜培養後調べた。使用したディスクは ABPC, CEZ, CTM, CMZ, CZX, FMOX, IPM, CRMN, MIPIC および CLDM, VCM, NTL, LVFX, CP, MINO, EM, FOM である。(4) MIC 値の測定は、日本化学療法学会標準法に準じ、MH 寒天培地および 5% 緑茶エキス添加 MH 寒天培地に抗生剤を加え、菌数を  $10^6$  CFU/ml に調製後マイクロプランターで接種し、一夜培養後判定した。

結果及び考察: (1) 薬剤感受性ディスクを用いた検討から、MIPIC, CRMN を除く  $\beta$ -ラクタム系抗生剤と緑茶エキス

との間に、MRSA に対する相乗効果を示唆する結果を得た。その他の薬剤では、全く認められないか、あるいは  $\beta$ -ラクタム系抗生剤に比べ、その効果は弱いものと推測された。(2)  $\beta$ -ラクタム系抗生剤 (ABPC, CEZ, CTM, CMZ, CZX, FMOX, IPM) の MIC 値は、緑茶エキス添加により顕著に低下し、7 薬剤と緑茶エキスとの間に MRSA に対する相乗効果のあることが確認された。(3) MRSA に対する緑茶エキスと  $\beta$ -ラクタム系抗生剤の相乗効果のメカニズム、および緑茶エキス中の抗菌成分については今後の検討課題である。

## P-67 Aztreonam (AZT), Clindamycin (CLDM), recombinant G-CSF (G-CSF) 併用療法の基礎的検討

内田淑子<sup>1)</sup>・佐藤 勝<sup>2)</sup>・外山圭助<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京医大第一内科

<sup>2)</sup> エーザイ研究所

目的: 血液疾患患者における顆粒球減少症に合併する細菌感染症における empiric therapy として、AZT, CLDM 療法の効果、さらに本治療における G-CSF の併用効果を、*in vitro* ならびにマウス感染モデルによって検討した。

方法・材料: 細菌は血液疾患患者顆粒球減少症における感染症において、臨床上問題となる血液分離菌である *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* さらに *S. epidermidis* を使用した。

1) *in vitro*: 4 種の血液分離菌に抗生物質を単独、および同時に短時間作用させ、その際の PAE を観察した。

2) *in vivo*: 4 週齢の ICR 雄マウスに cyclophosphamide による顆粒球減少マウスを作成。4 種の血液分離菌を接種 1 時間後に抗生物質を単独または併用投与した。G-CSF は臨床に即して感染 1 時間後ならびに 24 時間後に投与し、抗生物質および G-CSF の併用効果を ED<sub>50</sub> で検討した。

結果: *in vitro* では、PAE が *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* において 6~8 時間後まで認められた。しかし、いずれの菌に対しても AZT と CLDM の併用効果は観察されなかった。*in vivo* では、いずれの菌においても併用による相乗効果は認められなかった。また、G-CSF の併用投与において ED<sub>50</sub> の低下は *S. aureus* 感染においてのみ認められ、他菌種では認められなかった。

考察: AZT, CLDM の併用は血液疾患における顆粒球減少症に合併する感染症の empiric therapy としては有用と考えられる。しかし、G-CSF の感染後投与はその効果が限られており強力な empiric therapy が重要である。

## P-68 肝代謝抑制による抗菌薬の薬物相互作用 —ニューキノロンとマクロライドを中心に—

二木芳人

川崎医科大学呼吸器内科

近年の薬物療法の著しい進歩と臨床応用に伴って、臨床場において同一患者の複数の病態に対して複数の治療薬が投与されることは、きわめて一般的な状況として認識される。

しかし、個々の病態のみを考えた薬物投与は、時に思いがけない他剤との相互作用を生じ、効果の増減や副作用の出現など、予期しない事態を招く場合がある。

抗菌薬も慢性疾患の経過中に併発する感染症にしばしば併用投与される可能性の高い薬物であり、その効果のかつ安全な使用のためには、この薬物相互作用に対する十分な配慮が必要である。

我々は、この中で特に肝代謝障害による相互作用として、ニューキノロン (NQ) やマクロライド (MAD) とテオフィリン (TP) との相互作用について研究してきたが、TP の代謝はさまざまな影響を受け、NQ や MAD も個々の誘導体でその強弱が異なることを報告してきた。この作用は基礎的検討や動物実験では完全に予測できない場合があり、臨床応用に際しては、ヒトでの検討が必要不可欠である。また、近年開発が進められている注射用 NQ では、同じ誘導体が経口で投与された場合と明らかに異なる影響を TP 代謝に及ぼすようであり、この点がただ血中濃度の高低で論じられてよいかどうかにもさらに検討を必要とする。

最近いま一つ話題のものに MAD とテルクエナジンの併用による Torsades de pointes の頻発があり、この点についても我々はボランティアを用いて心電図に及ぼす併用の影響を検討中であるが、その発生機序なども未だ明らかでなく、今後のより多くの検討が必要であろう。

これらの薬物相互作用を把握するためには、個々の医療機関の異なる診療科での対応はもとより、地域における情報交換ネットワークの整備などの対応も将来必要であろう。

## P-69 抗菌薬と他剤との薬物相互作用による腎障害

柴 孝也

東京慈恵会医科大学第二内科

はじめに：感染症の治療法としての抗微生物薬による化学療法は人類に大きく貢献してきた。しかし、一方では薬剤の耐性化、毒性、副作用などのほか、最近の薬害問題に端を発した薬物相互作用による副作用は記憶に新しいことである。副作用としての薬物相互作用の記載には「禁忌」と「慎重投与」の2通りがあるが問題なのは後者であろう。しかし、従来この「慎重投与」に関して具体的な議論はなされていなかったように思われる。そこで今回、抗菌薬と利尿剤および腎障害性薬剤との併用による腎障害増強の薬物相互作用について諸検討を試みた。

腎障害の実際：①利尿剤との関係においてはアミノ配糖体薬との相互作用が最も顕著である。また、セフェム薬では CER と利尿剤による急性腎不全もありその頻度は 6～10% と述べられている。②腎障害性薬剤との関係、抗菌薬の中で最も影響を与えるものはポリエン系抗真菌薬の amphotericin である。総量 2～3 g を使用すると大多数の症例において遠位尿細管性アシドーシスの病態をとり、腎血流量および糸球体濾過値 (GFR) は共に低下する。またアミノ配糖体薬は近位尿細管障害から始まり、具体的には刷子緑およびライソゾーム由来の酵素、低分子量蛋白の尿中排泄増加、多尿、尿浸透圧の低下であり、更にリン脂質蓄積症が起こり、

ミエリン様小体が観察される。さらにカルバペネム薬でも DHP-1 に安定でしかも腎毒性も軽減された薬剤も開発されている。抗腫瘍薬のシスプラチン (白金錯体) は 1 回 50 mg/m<sup>2</sup> の静注で 25～30% に高窒素血症がみられる。組織学的には近位および遠位尿細管の広範な壊死像が特徴で長期反復投与で間質の繊維化が進み尿細管は高度に拡張することも明らかにされている。

考察：代表的薬物相互作用の発現の防止には近位尿細管機能異常を把握することが必要である。その代表的な臨床症状は、低分子量蛋白尿、腎性糖尿、汎アミノ酸尿であり、更にリン再吸収能の低下、重炭酸再吸収能の低下および腎性アシドーシスである。尿中酵素には  $\gamma$ -GTP や AAP、NAG などであり、これらの酵素と低分子量蛋白の尿中排泄動態を検討すれば薬物による尿細管細胞の障害程度のみならず、早期発見とその評価に役立つものと思われる。

## P-70 皮膚感染病巣分離黄色ブドウ球菌の薬剤感受性 (1994 年)

—2 施設間における比較検討を加えて—

赤松浩彦<sup>1)</sup>・堀尾 武<sup>1)</sup>・西島暉子<sup>2)</sup>

中川光子<sup>2)</sup>・杉山 徹<sup>2)</sup>・河端繁勝<sup>3)</sup>

藤田真麻<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 関西医科大学皮膚科

<sup>2)</sup> 関西医科大学附属香里病院皮膚科

<sup>3)</sup> 大塚製薬株式会社

目的：規模と機能の異なる 2 病院の皮膚科において、皮膚感染病巣から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性と、2 病院間の相違とその背景を検討する。

方法：A 病院 (特定機能病院, 1,024 床)、B 病院 (中規模病院, 353 床) の皮膚科において、一定期間に皮膚感染病巣から分離された黄色ブドウ球菌、102 株の薬剤感受性 (MIC) を測定する。使用した薬剤は以下の 14 薬剤である。ampicillin (ABPC), methicillin (DMPPC), cefaclor (CCL), cefpodoxime, proxetil (CPDX-PR), gentamicin (GM), erythromycin (EM), clindamycin (CLDM), minocycline (MINO), vancomycin (VCM), fugsidic acid (FA) ofloxacin (OFLX), tosufloxacin (TFLX), nadifloxacin (NDFX), grepafloxacin (GPFX)。DMPPC の MIC が  $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$  を MRSA、各薬剤の MIC が  $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$  のものを耐性とした。

結果：MIC はほとんどの薬剤において、A 病院の方が B 病院より高かったが、MINO だけは B 病院の MIC が高かった。MRSA は全体では 19.6% であったが、A 病院では 36.8%、B 病院では 7.8% であった。特に CCL, CPDX-PR, EM, CLDM, OFLX, TFLX に対する耐性菌が、B 病院と比較して A 病院では多かった。GPFX は発売前にもかかわらず、A 病院では耐性菌 (36.8%) が出現していた。

皮膚感染症の種類は、2 病院では大きく異なっていた。A 病院では、浅在性感染症である伝染性膿痂疹はゼロであり、潰瘍、褥瘡などの二次感染が多数であった。患者の平均年齢は、A 病院が B 病院より約 20 歳以上上であり、入院、外来患者別では、A 病院は約半数 (47.4%) が入院患者であり、B 病院では 92.2% が外来患者であった。薬剤の使用状況に

も違いがみられた。特にB病院はA病院と比べるとキノロン剤の使用が少なかった。

考察: A病院とB病院の薬剤感受性の相違は、疾患の種類、患者の背景、薬剤状況などが、影響していると考えられた。

## P-71 当院における MRSA の検出状況の検討 —一般医療機関との比較—

高橋孝行<sup>1)</sup>・国分勝弥<sup>1)</sup>・辻原佳人<sup>1)</sup>  
桜井 磐<sup>2)</sup>・吉田正樹<sup>2)</sup>・松本文夫<sup>2)</sup>

神奈川県衛生看護専門学校付属病院検査科<sup>1)</sup>, 同 内科<sup>2)</sup>

目的: 近年メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染症が問題となっている。われわれは MRSA の分離状況及び薬剤感受性について検討したので報告した。

材料と方法: 1993年7月から1994年6月までの1年間に当院分離株と当院入院時分離株および一般医療機関より提出された臨床材料から分離した菌株のうち、原因菌と判断された黄色ブドウ球菌それぞれ638株, 98株, 238株を対象とした。

DMPPC, CEZ の MIC 12.5  $\mu\text{g/ml}$  以上を MRSA とした。対象薬剤は VCM, ABK, MINO, IPM, GM, CMZ, OFLX, ABPC の 8 薬剤とした。なお MIC の測定は日本化学療法学会標準法に準じた。

成績: 当院分離株と当院入院時分離株および一般医療機関での MRSA の検出株数は、それぞれ 126 株, 19 株, 33 株であった。3 群それぞれの MIC<sub>90</sub> 値は、VCM は 1.56, 1.56, 0.78  $\mu\text{g/ml}$ , ABK は 1.56, 1.56, 0.78  $\mu\text{g/ml}$ , MINO は 12.5, 12.5, 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , IPM は 100, 100, 50  $\mu\text{g/ml}$ , GM は  $\geq 100$ ,  $\geq 100$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , CMZ は 100, 100, 100  $\mu\text{g/ml}$ , OFLX は  $\geq 100$ ,  $\geq 100$ ,  $\geq 100$   $\mu\text{g/ml}$ , ABPC は 100, 100, 50  $\mu\text{g/ml}$  であった。

結果及び考察: 今回の検討では、MRSA 検出頻度は当院分離株が 19.7%, 当院入院時分離株 19.4%, 一般医療機関分離株 13.9% であった。とくに当院の方が高率に検出された要因として、紹介患者が多く、基礎疾患を有し、抗菌剤無効症例の臨床材料からの分離菌株が多かったことが考えられる。

コアグララーゼ型別は II 型が大多数を占め、エンテロトキシン型別では C 型が多かった。3 群での型別比較の検討では差はみられなかった。

MRSA の各薬剤の感受性パターンは VCM, ABK には耐性がみられなかった。

## P-72 臨床分離 MRSA の疫学的検討 (第 13 報)

豊永義清

山梨赤十字病院小児科

堀 誠

東京慈恵会医科大学小児科

保科定頼

東京慈恵会医科大学臨床検査医学

黒坂公生・龍野国弘・大眉寿々子

東京慈恵会医科大学青戸病院・臨床検査医学

出口浩一

東京総合臨床検査センター・研究部

中原正城

(株) 科学技術研究所

目的: 医療側の種々な対策にもかかわらず MRSA は依然として高い検出率を示している。小児科領域でも特に新生児・未熟児での検出率は注意を要する。我々は 1981 年より継続して検討しているが、1994.1~12 (第 13 次) の株について各抗生剤の MIC, ファージで型別について検討したので報告した。

方法: 慈恵医大小児科の関連 8 施設にて検出された黄色ブドウ球菌を用い、全株について Disk 法により CEZ 低感受性・耐性株を選び、それらの株について化療標準法に従い、MIC を測定した。薬剤: DMPPC, ABPC, CMZ, PAMP, GM, NTL, MINO, CLDM, OFLX, FOM, VCM, ABK。ファージは国際標準セットによる従来の方法に CNS の型別に使用するファージ (Ph10, Ph12, U14, H96) を加え、1 RTD の力価に調整後、検索を行った。

結果: 今回の検出率 (耐性株/対象株) は 6,367 株中 3,807 株 (44.1%) であり、前年度の 29.5% と比べ、有意な上昇を認めていた。各薬剤の MIC<sub>90</sub> は、 $\beta$ -ラクタム剤は全て  $\geq 100$   $\mu\text{g/ml}$ , MINO, NTL, VCM, ABK および FOM は順に、25, 6.25, 1.56, 1.56,  $>100$   $\mu\text{g/ml}$  であった。また、MINO, GM については施設間で差が認められた。ファージ型別は新しい方法により、型別可能なものが増加し、I 群, III 群, I-III 群, CNS 群がそれぞれ 2.4, 29.3, 8.3, 48.2% であった。

考察: 13 年間の検討において、20 薬剤の MIC を測定し、臨床例の検討を加え、臨床使用可能な薬剤は、併用療法を含め、CMZ, IPM, PAMP, CZON, NTL, MINO, VCM, ABK を推奨してきたが、経時的検討より、菌の感受性判定前では NTL, VCM, ABK の選択が望ましい。ファージ型別に GM 感受性を組み合わせることより、今回は 10 のパターンに分類され、各施設の流行株の把握が可能となり、各施設で使用可能な薬剤も決定できると考えられた。

## P-73 最近 5 年間における MRSA の疫学的検討

古城裕美・原田千寿・有川圭介  
大窪恭光・中原 伸・矢野秀樹  
白石恒明・本田順一・力丸 徹  
市川洋一郎・大泉耕太郎

久留米大学医学部第一内科

橋本好司・梶村克成

同 中央検査室

目的: 久留米大学第一内科病棟における最近 5 年間の MRSA の分離状況, MIC 測定, コアグララーゼ型別, エンテロトキシン型別, TSST-1 産生能を検索し年次別に検討したので報告する。

対象: 久留米大学第一内科病棟において 1990 年から 1994 年までの 5 年間に分離された MRSA 臨床株 197 株 (1990 年 6 株, 1991 年 47 株, 1992 年 64 株, 1993 年 42 株,

1994年38株)を対象とした。

方法: MIC測定は寒天平板希釈法で、化学療法学会基準に準じて行った。薬剤はDMPPC, CEZ, IPM, MINO, ABK, VCMの6薬剤を使用した。コアグラマーゼ型別, エンテロトキシン型別, TSST-1産生能はデンカ生研の検出用キットを使用した。

結果: *S. aureus* 中のMRSAの割合は、1994年で37%と過去4年と比較して減少した。MIC測定では、DMPPC, CEZ, IPM, MINOは耐性株が大部分を占め、ABK, VCMでは依然として高い感受性を示した。コアグラマーゼ型別は1993年までII型が大部分を占めたが、1994年ではIII型VII型が増加しII型は減少傾向にあった。エンテロトキシン型別では1994年でA型は減少し、AC型およびC型の増加がみられた。TSST-1産生株は、依然として大部分を占めていた。

考察: 1994年では*S. aureus* 中のMRSAの分離率の低下を認め、流行は沈静化しつつあると考えられた。MIC測定では大きな変化は認められなかった。コアグラマーゼ型別およびエンテロトキシン型別では感染経路の指標として有用と考えられた。

#### P-74 名古屋市立大学病院における注射用抗菌薬使用量とMRSA分離状況の推移について

真下啓二・野間秀一・岸田捷美  
村瀬幸雄・真辺忠夫・武内俊彦  
松業和久\*

名古屋市立大学病院院内感染対策委員会、\*同 薬剤部  
品川長夫

名古屋市立大学第1外科

目的・検討方法: MRSA感染に対するサーベイランスの一環として、1991年から1994年までの注射用抗菌薬使用量とMRSA分離頻度の関連性について検討した。注射用抗菌薬使用量は力価(g)にて算定した。薬剤感受性は3濃度ディスク法にて測定し、*Staphylococcus aureus* のうち、oxacillinに対する感受性が(-)または(+)の株をMRSAとした。分離頻度は患者数でカウントした。

結果: 施設全体の注射用抗菌薬使用量は1991年以後漸減傾向にある。とくに第3世代セフェム薬(CEPs 3)の減少は顕著で、1991年には全体の40.1%を占めていたが、1994年には23.3%にまで減少した。代わって第1世代セフェム薬、第2世代セフェム薬の使用量が増加した。これに対しMRSAの分離患者数は103例、120例、149例、166例と年々増加の傾向を示している。外科系2病棟ではともにMRSA分離頻度の連続的な増減傾向は認められなかった。B病棟ではCEPs 3使用量とMRSA分離頻度の推移がほぼ平行したが、A病棟では明らかな関連は認められなかった。2病棟間での比較では、A病棟の抗菌薬年間使用量はB病棟の約60%と少なく、とくにCEPs 3についてはA病棟はB病棟の39.6%~48.4%の使用量にすぎないが、MRSA分離例はいずれの年度においてもA病棟の方が多かった。内科系4病棟ではC, D, E病棟のMRSA分離頻度に明らかな減少傾向はなく、とくにD病棟では増加が顕著であった。全床個室のF病棟ではMRSA分離頻度の減少傾向がみられ

た。C病棟のCEPs 3使用量とMRSA分離頻度が平行する以外には、抗菌薬使用量およびCEPs 3の占める比率とMRSA分離頻度の間に相関は認められなかった。外科系、内科系の6病棟いずれにおいても病棟内での交差感染が強く疑われるケースが散見された。

考察: 注射用抗菌薬の使用状況とMRSA分離頻度の推移について検討した結果、CEPs 3の使用制限のみではMRSAの分離頻度の明らかな減少は期待し難いものと考えられ、総合的な院内感染対策実施の重要性が示唆された。個室病棟は予防対策の効果が得やすい環境と考えられた。

#### P-75 当院における臨床分離MRSAの性質の年次変化(第5報)

塩谷譲司<sup>1)</sup>・林 泉<sup>2)</sup>

稲村延子<sup>1)</sup>・桜井雅紀<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 癌研究会附属病院細菌室, <sup>2)</sup> 同 内科

目的: 当院では毎年、院内感染対策の参考にするため、臨床分離MRSAの諸性質について調査しているが、今回、1990年から1994年の5年間の株の諸性質の年次変化を見たので報告する。

方法: 一定期間に分離されたMRSA 1990年75株, 1991年100株, 1992年100株, 1993年98株, 1994年99株についての各種薬剤感受性, コアグラマーゼ型, エンテロトキシン型,  $\beta$ -ラクタマーゼ産生能を調べ、その年次変化を見た。また、1993年と1994年の株におけるTSST-1産生能も検討した。

結果, 考察: 薬剤感受性: ABKのMICは90%以上の株が1.56  $\mu$ g/ml以下, VCMはすべて1.56  $\mu$ g/ml以下で5年間で耐性は全く進んでいなかった。MINO, OFLXは1992年に感受性株が多く見られたが、耐性化が進みつつある。NTLは感受性株がやや増加傾向にあり80%の株が3.13  $\mu$ g/ml以下であった。その他FOM, FMOX, IPM/CSのMICに大きな変化はなく高度耐性であった。

コアグラマーゼ型: II型が大勢を占め、1990年から1994年まで85%→92%→83%→97%→96%と変化した。

エンテロトキシン型: C型とA型に二分され、C型が63%→65%→41%→85%→80%, A型が25%→25%→46%→9%→17%と変化した。

$\beta$ -ラクタマーゼ産生能: 非産生株が増加傾向にあると思われたが、1992年以降減少が見られている。

TSST-1産生能: エンテロトキシンC型とA型の株すべてがTSST-1を産生しており、高度産生株は1993年28%, 1994年35%であった。

当院で分離されるMRSAに単剤でも有効なものはABK, VCMであり、コアグラマーゼII型, エンテロトキシンC型, TSST-1(+)の株が最も多い。強毒なMRSAが多いと思われるが、重篤な感染症を引き起こすものは少なく、単なるコロニゼーションが大部分である。

## P-76 臨床分離 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の各種性状に関する検討

金山明子<sup>1)</sup>・内野卯津樹<sup>1)</sup>

小林寅詰<sup>1)</sup>・西田 実<sup>1), 2)</sup>

<sup>1)</sup>三菱化学ピーシーエル・化学療法研究室

<sup>2)</sup>東邦大学医療短期大学

1994年に各種臨床材料より分離された Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 100株を試験菌として、ABPC, GM (G), EM (E), TC (T), OFLX (O) に対する薬剤感受性を寒天平板希釈法にて測定した。生物学的性状は Coagulase 型, Enterotoxin 型, Phage 型および TSST-1 産生性やウサギ, ヒツジおよびヒト血球を用いた溶血素について調査した。また, その他の性状として  $\beta$ -lactamase 産生性および Plasmid パターンを解析し, 関連性を比較した。

その結果薬剤耐性パターンでは GM, EM, TC, OFLX (GETO) 4剤全て耐性の株が 33株と最も多く, 次いで EM, OFLX (EO) の2剤耐性が 16株, EM, TC, OFLX (ETO) 3剤耐性が 15株であった。生物学的性状は従来の報告と同様, Coagulase II型, Enterotoxin, C型, TSST-1産生, ファージ型別不能株が高率に存在した。またウサギ, ヒツジ血球を溶血する  $\alpha$  溶血素を産生した株が 68株であった。試験菌株 100株中  $\beta$ -lactamase 産生株は 70株, 20,000bp 以上の Plasmid 保有株は 74株と両者とも多く認められた。

薬剤耐性パターンと生物学的性状とは特に関連が認められなかったが, 4剤全てに耐性を示す GETO 型の株には  $\beta$ -lactamase 非産生株や Plasmid (> 20,000bp) を保有しない株がそれぞれ 56.7%, 46.2%と高率に存在した。

## P-77 ファージ型およびパルスフィールド電気泳動法による MRSA の型別

稲村延子<sup>1)</sup>・塩谷譲司<sup>1)</sup>・林 泉<sup>2)</sup>

島内千恵子<sup>3)</sup>・井上松久<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>癌研究会附属病院細菌室, <sup>2)</sup>同 内科

<sup>3)</sup>同 北里大・医・微生物

目的: 当院の患者より分離された MRSA 19株についてコアグララーゼ型, 薬剤耐性型, プラスミドパターンの方法に加えパルスフィールド電気泳動法 (PFGE) およびファージ型での型別分類を行ったので報告する。

方法: 1994年9月27日~10月11日に分離された MRSA (外科病棟5株, 頭頸科病棟5株, 泌尿器科病棟2株, 泌尿器科外来1株, 整形外科病棟1株, 放射線科病棟1株の15株) および1994年12月2日~12月4日に分離された MRSA (外科病棟2株, 頭頸科病棟1株, 頭頸科外来1株の4株) これら19株についてファージ型別を行いさらに25種類の薬剤の耐性限界値を含む寒天平板を用いて薬剤耐性型を調べた。また, 制限酵素 *Sma* I で切断した染色体 DNA の PFGE 型別を行いファージ型別との相関性をみた。さらにその一部についてコアグララーゼ型, プラスミドパターンを調べた。

結果: コアグララーゼ型は19株のうち15株について調べ

た。II型が14株でI型は1株だった。プラスミドパターンは19株のうち10株について調べたが5種類に分類された。薬剤耐性型では MLs, SM, MINO の3薬剤群に対する感受性が RSR (MLs', SM', MINO') が12株, RSS が6株, SSS が1株だった。標準ファージによるファージ型は7種類のタイプに分けられた。一方 PFGE 型で分類した結果やはり7種類に分類され両者間に密接な関連性がある事が判明した。

結論: MRSA による院内感染が高くなると, コアグララーゼ型, 薬剤耐性型, プラスミドパターンでは分類されるタイプのバリエーションは少ないのでこれらの結果だけでは菌株を識別する事はむずかしい。今回我々の分類した MRSA 19株の検討ではファージ型別法に PFGE 型別を加えた方法は MRSA の型別に有用性があることを示唆した。

## P-78 最近海外で分離された MRSA の細菌学的動向

島内千恵子<sup>1)</sup>・野々山勝人<sup>1), 2)</sup>・井田孝志<sup>1)</sup>

岡本了一<sup>1)</sup>・井上松久<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>北里大・医・微生物, <sup>2)</sup>同 小児科

目的: 主として1993年, 1994年に分離された海外15ヶ国の MRSA 計169株について, 薬剤耐性, コアグララーゼ型, エンテロトキシン型を調べ, 日本の MRSA と比較検討した。

方法: 薬剤耐性は, 16種類の薬剤の耐性限界値の寒天平板で発育の有無を判定し, また6種類の薬剤について寒天平板希釈法で MIC を求めた。ペニシリナーゼ産生の有無をヨード・アンブ法により判定した。コアグララーゼ型は, ブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清 (デンカ生研) によるウサギ正常血漿の凝固阻止法, または PCR 法で増幅したコアグララーゼ遺伝子の制限酵素切断パターンにより判定した。エンテロトキシン型は, ブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット (デンカ生研) により判定した。

結果及び考察: 海外の MRSA は, 全般に SM (耐性率 85.2%), CP (47.3%) に対する耐性率が, 日本のそれを大きく上回っていた。また, GM (90.5%) 及び TC (83.4%) の耐性率, ペニシリナーゼの産生率 (92.9%) が, 日本に比べやや高かった。マクロライド及び OFLX の耐性率は日本の MRSA の方がやや高かった。VCM, TEIC の耐性菌は無く, ABK 耐性菌は 23株 (13.6%) で, その MIC は 22株が 6.25  $\mu$ g/ml, 1株が 12.5  $\mu$ g/ml であった。RP59500 の MIC は 1.56  $\mu$ g/ml 以下であった。国によって薬剤耐性の割合は多少変動があった。USA, フランス, イタリア以外の国では, DMPPC 高度耐性株が多かった。

コアグララーゼ型は, 日本では II 型が 82.7% を占めているが, 海外では全体で IV 型が 68.0%, ついで II 型が 17.2%, III 型が 13.6% で, その他の型は検出されなかった。II 型は, ドイツ, フランス, ベルギー, イタリア, USA, 韓国の由来菌から検出され, 他の 9ヶ国からは検出されなかった。

海外の MRSA のエンテロトキシン型は, A 型 34.4%, C 型 5.3%, B 型 3.6%, A+B 型 3.0%, A+C 型 2.4%, D 型 1.8% であり, C 型 32.2%, A+C 型 8.5% の日本の

MRSAとは異なった。

最近海外で分離されたMRSAの大多数は、薬剤耐性、コアグララーゼ型、エンテロトキシン型などの点で、日本のそれと異なっていた。しかし、韓国由来のコアグララーゼII型のMRSA 8株のうち、エンテロトキシンC型が7株あり今後の動向が注目された。

## P-79 MRSA 感染症に対する注射用バンコマイシンの臨床研究

—第3報 臨床成績—

島田 馨<sup>1)</sup>・小林寛伊<sup>2)</sup>・砂川慶介<sup>3)</sup>  
稲松孝思<sup>4)</sup>・山口恵三<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> 社会保険中央総合病院 (現: 東京専売病院)  
<sup>2)</sup> 東京大学医学部感染制御学  
<sup>3)</sup> 国立東京第二病院小児科  
<sup>4)</sup> 東京都老人医療センター感染症科  
<sup>5)</sup> 東邦大学微生物学

目的: 注射用バンコマイシン (VCM) のMRSA 感染症に対する有効性、安全性について、既報にて市販後調査1年次 (第41回総会, 東京), 2年次 (第42回総会, 福岡) の集計成績を発表したが、今回3年次までの累積集計成績を報告する。

方法: 1991年12月~1994年10月の集積症例1,354例のうち、安全性は全例を、有効性は非MRSA感染症、基礎疾患重篤等の判定不能例99例を除外した1,255例を評価対象とした。

成績: 疾患別改善率は敗血症87.5%, 骨髄炎85.7%, 肺炎78.7%等で全体で81.7%であった。先行薬無しの場合若干改善率が高かったが、1日投与量、併用薬の有無による差はみられなかった。MRSAに対する菌消失率は、肺炎で64.2%と若干低く全体で69.8%であった。副作用発現率は3.2%、臨床検査値異常変動の発現率は11.5%であったが、経年的にはやや減少傾向がみられた。red, neck症候群は8例であり、初回投与での発現が多くこの内6例は点滴時間の延長等により投与継続可能であった。腎機能検査値異常の発現頻度は2g投与群が1g投与群の2倍以上高かった。

考察: 脳梗塞等を合併した高齢者肺炎を中心とする集積症例に対し、改善率81.7%、菌消失率69.8%は満足すべき効果といえよう。成人の1日投与量の減少傾向 (2g → 1g)、投与期間の短縮傾向、TDM実施率の向上等適正使用に関する意識の深まりが示唆され、それとともに副作用発現率も減少傾向を示していた。今後とも、MRSA感染症に対する第一選択薬としてさらに適正使用を徹底する必要がある。

## P-80 MRSA 感染症に対する注射用バンコマイシンの臨床研究

—第3報 その2. 体内動態—

尾熊隆嘉<sup>1)</sup>・矢野義孝<sup>1)</sup>・島田 馨<sup>2)</sup>  
小林寛伊<sup>3)</sup>・砂川慶介<sup>4)</sup>・稲松孝思<sup>5)</sup>  
山口恵三<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup> 塩野義製薬株式会社新薬研究所

<sup>2)</sup> 社会保険中央総合病院  
<sup>3)</sup> 東京大学医学部感染制御学  
<sup>4)</sup> 国立東京第二病院小児科  
<sup>5)</sup> 東京都老人医療センター感染症科  
<sup>6)</sup> 東邦大学微生物学

目的: 注射用バンコマイシン (VCM) はMRSAに優れた抗菌力を示すが、腎障害などの副作用も知られておりその使用に関しては慎重な扱いが要求される。前回、VCMの使用成績調査において得られた血中濃度モニタリングデータを用いて、患者群におけるVCMの体内動態の検討結果を報告したが、今回更にデータを追加し検討を行った。

対象・方法: 本調査において得られた451名からの血中濃度データ (911ポイント) を用い、体内動態の解析を行った。速度論モデルはTwo-Compartment, Modelを用い、Population, Pharmacokinetic解析プログラムNONMEMにより母集団パラメータを推定した。個体内、個体間の変動は相対誤差モデルを仮定し、VCMの消失クリアランス (CL) に及ぼす要因として、Cockcroft-Gault式から算出されるクレアチニンクリアランス (CL<sub>Cr</sub>)、あるいは血清クレアチニン (Scr)、年齢、体重を考慮した。

結果: 前回同様VCMのCLはCL<sub>Cr</sub>に依存することが示され、CL<sub>Cr</sub>が正常値であっても健常成人の約1/2の値であった。また、Scrを直接回帰式に組み込んだ場合、CLはScrに逆比例し女性では同じScr値であっても約15%低い値となること、さらに年齢があがるにつれCLは減少することが示唆された。

考察: 今回の解析の結果得られたCL及び分布容積 (V<sub>e</sub>) の個体間変動はC. V. 値としてそれぞれ約40%、60%と大きく、腎機能や年齢、体重だけでは十分に説明できない要因 (合併症、重症度など) があることが示唆される。このような場合、患者ごとの血中濃度モニタリングを可能な限り頻繁に行うことによりVCM治療の個別化、最適化を目指すことが望まれる。

## P-81 MRSA に対する局所除菌薬としての polymyxin B (PL-B) の評価

—in vitroでの基礎的検討—

青木泰子

筑波大学臨床医学系内科

目的: 高濃度PL-BはMRSAに優れた殺菌力を示すとされる。これが局所除菌薬としての有用性に結びつく可能性を評価するため、菌量増加時や有機物混入時、および半流動培地での殺菌力を検討し、他の抗菌薬や消毒薬と比較した。

方法: 1990~93年に分離された80株のMICを微量液体希釈法で測定し、40~1,000 μg/mlの殺菌曲線を褥瘡からの分離株を用いて、接種菌量10<sup>6</sup>および10<sup>8</sup> CFU/mlで検討した。培地はMHB、および、10%カジトンプロス (1リットル中にカジトン1g、食塩0.5g、イースト0.3g) とし、羊脱織血10~50%添加の影響を他薬剤と比較した。さらに、半流動培地 (0.3% agar) 中での殺菌力を液体培地中と比較した。対照薬は抗菌薬 (VCM, ABK)、および消毒薬 (PVP-I, CHG) とした。

結果: MRSAに対するPL-BのMICは25~400 μg/ml,

MIC<sub>90</sub>は200 µg/mlであった。1,000 µg/mlのPL-Bは4時間で99.9%以上の殺菌効果を示し、ABKよりやや劣るが、VCMより優れていた。菌数増加時にもABKに次いで優れた殺菌効果を示した。PVP-I、CHGは常用濃度で5~10分以内に完全な殺菌効果を示し、菌数増加の影響を全く受けなかったが、有機物混入の影響は強く、とくに、5 mg/ml以下のPVP-IはMHB中、あるいは10%血球添加で殺菌力をほぼ失った。VCM、ABKの殺菌力は有機物の影響を全く受けなかったが、PL-Bの殺菌力は50%血球添加時にやや激弱した。軟寒天中での殺菌力は、PVP-Iは液体培地と全く差がなかったが、VCM、ABK、PL-Bでは液体培地中より劣り、両者の差は接種菌量10<sup>8</sup> CFU/mlの場合により明かであった。

考察: PL-Bは局所除菌に有用と考えられるが、血液、滲出液、フィブリン析出などの創面の状態によって殺菌力が低下する可能性も示唆された。

#### P-82 CFC-222, a new fluoroquinolone, is free of convulsant activity in co-administration with NSAIDs

D. M. Lim, Y. H. Kim,  
D. H. Kim, K. H. Lee,  
Y. S. Youn, J. M. Lee,  
I. H. Cho and K. H. Park

R & D Center, Cheil Foods & Chemicals Inc., 522-1  
Dokpyong, Majang, Ichon, Kyonggi 467-810, Korea

One of the notorious side-effects of quinolones is the induction of convulsion when coadministered with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Recently we identified a new potent fluoroquinolone CFC-222, active against both Gram (+) and Gram (-) bacteria. In this study, CFC-222's convulsion-inducing activity was investigated in mice when pretreated with the NSAID, fenbufen (300 mg/kg, p. o., 30 min prior) in comparison with available new quinolones. CFC-222 did not cause any convulsion with up to 100 mg/kg, i. v. when pretreated with fenbufen. In contrast, enoxacin (5 mg/kg, i. v.), norfloxacin (10 mg/kg, i. v.) and ciprofloxacin (40 mg/kg, i. v.) induced tonic convulsion usually followed by death in 90, 100 and 40% of the animals, respectively. After oral administration of quinolones preceded by fenbufen, enoxacin (5 mg/kg, p. o.), lomefloxacin (25 mg/kg, p. o.) and ciprofloxacin (50 mg/kg, p. o.) induced tonic convulsion/death at 20, 60 and 80%, respectively. With a dose of 1,000 mg/kg, p. o., after fenbufen, ofloxacin caused death in 60% following clonic and tonic convulsion in all animals, whereas CFC-222 did not cause death even though 80% showed clonic convulsion. CFC-222 at 300 mg/kg, p. o., did not cause convulsion when administered after NSAIDs such as ibuprofen, naproxen, diclofenac sodium, fenoprofen calcium, indomethacin, piroxicam,

acetylsalicylic acid or biphenyl acetic acid, all at 10 times clinical dose. It was demonstrated that the new fluoroquinolone, CFC-222, is free of the liability of CNS excitation in co-administration with NSAIDs.

#### P-83 *In Vitro* Bactericidal Activity and Postantibiotic Effect of CFC-222, a New Fluoroquinolone

K. H. Hong, J. A. Kang,  
J. H. Kim, S. B. Song,  
J. W. Kim, K. H. Lee  
and K. H. Park

R & D Center, Cheil Foods & Chemicals Inc.,  
522-1 Dokpyong, Majang, Ichon, Kyonggi 467-810,  
Korea

CFC-222 is a potent fluoroquinolone being developed by our research group. CFC-222 has a broad spectrum antibacterial activity and is especially very potent against Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus* and *Streptococcus* spp. In this study, the *in vitro* susceptibility of CFC-222 against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) was evaluated in comparison with those of fluoroquinolones and other antibacterial agents. Further, the mode of antibacterial activity of CFC-222 was studied in various *in vitro* test systems. CFC-222 showed higher activity against PRSP than any other quinolone tested. In wide range of microorganisms, MBCs of CFC-222 were either equal to or 2-fold higher than the MICs, as were observed for the other fluoroquinolones. The time-killing curves of CFC-222 and other fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* were also obtained. The number of viable cells decreased rapidly during incubation with CFC-222 at 1- to 4-fold the MIC. The postantibiotic effect (PAE) following 1 or 2 hours exposure to the concentration of 2 × MIC or 4 × MIC of CFC-222 and ofloxacin was determined in *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*. The PAE of CFC-222 was similar to that of ofloxacin. In summary, our results indicate that CFC-222 has an excellent antibacterial activity against PRSP and exerts the activity by bactericidal mechanism.

#### P-84 ニューキノロン系抗菌剤 AM-1155 の菌体膜透過性に関する研究

福田秀行・保坂雅喜・篠田泰誉  
杏林製薬(株)・中央研究所

目的: 細菌における耐性機構の一つとしてキノロン剤の膜透過性に関する研究が遺伝学的、生化学的側面より進められ、取り込み同様、排出機構の関与が指摘されている。そこで、現在開発中のAM-1155に関して種々の変異株を用い透過性

を検討した。

方法: 使用薬剤: AM-1155, シプロフロキサシン (CPFX) を始めとする各種キノロン剤, アンカプラーとしてカルボニルシアナイド *m*-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP) を用いた。使用菌株: 大腸菌 K-12 株及び緑膿菌 PAO の膜透過性変異株, 及び *norA* 遺伝子を有するプラスミドを組み入れたブドウ球菌 NY 12 (*norA*, pTUS 20) 株 (帝京大学生方先生より分与) を用いた。MIC の測定: 化学療法学会標準法に準じた。菌体内へのキノロン剤の取り込み: 既報りに若干の改良を加えて行った。

結果及び考察: 各種グラム陰性の膜透過性変異によるキノロン耐性株に対する AM-1155 の抗菌力は他のニューキノロン剤と同程度低下した。これは, グラム陰性菌において AM-1155 が他のニューキノロン剤と同様な機構によって透過, あるいは排出されていることを示唆していた。AM-1155 のブドウ球菌のキノロン剤排出機能亢進株 NY12 (*norA*, pTUS 20) に対する抗菌活性は野性株の 1/8 に低下しており, CPFX の 1/64 と比較してその低下割合は小さく, ブドウ球菌における排出機構の影響を受けにくいことが示唆された。そこで CCCP の存在下で *norA* 株への AM-1155 の菌体内取り込みの上昇を CPFX と比較した。CPFX の *norA* 株への取り込みは CCCP の存在下で非存在下と比較して約 7 倍上昇し, AM-1155 では約 3.5 倍の上昇であった。このことも AM-1155 がブドウ球菌のキノロン排出亢進株に対して CPFX と比較して排出されにくいことを示唆しており, それがキノロン耐性ブドウ球菌に対して優れた抗菌活性を有する一つの要因であると考えられた。

1) Hirai K, et al.: A. A. C. 31: 582~586, 1987

## P-85 *In vitro* pharmacokinetic model における AM-1155 の殺菌作用

保坂雅喜・若林栄二・篠田泰誉

杏林製薬 (株) 中央研究所

目的: AM-1155 はグラム陽性菌および陰性菌に対し強い抗菌力を示す新しいニューキノロン系抗菌剤である。われわれは, 本化合物の生体内での殺菌作用を推察する目的で, 通常用量内服後のヒト血清中薬剤濃度の推移を再現した *in vitro* pharmacokinetic model における AM-1155 の各種菌株に対する殺菌作用を検討し sparfloxacin, levofloxacin 等の類剤と比較した。

方法: *In vitro* pharmacokinetic model は Grasso らの方法に従って作製し, 各試験薬剤の薬動学的パラメーターは第 1 相臨床試験で報告されている値 (化療新薬シンポジウム集から引用) を用いた。

結果及び考察: AM-1155 を 200 mg 内服した時の血清中濃度を再現した *in vitro* モデルにおいて, AM-1155 はブドウ球菌, 肺炎球菌, 大腸菌および緑膿菌に対し殺菌作用を示した。緑膿菌を除く 3 株は薬剤作用 24 時間後まで再増殖が観察されなかった。一方, 緑膿菌は薬剤作用 6 時間後より再増殖が見られ, 18~24 時間後には薬剤無添加対照群と同レベルまで増殖していた。このモデルを用いて AM-1155 の殺菌作用を他のキノロン剤の各 *in vitro* モデルにおける作用と

比較したところ, ブドウ球菌および肺炎球菌に対する AM-1155 の殺菌効果は比較薬よりも強かった。また, AM-1155 が緑膿菌に殺菌作用を示したのに対し, sparfloxacin (300 mg 内服モデル) および tosufloxacin (150 mg 内服モデル) の作用は静菌的であった。AM-1155 は sparfloxacin とほぼ同等の *in vitro* 抗菌力を有しているが, 今回の実験から, 生体内での殺菌作用には *in vitro* 抗菌力と同様, その体内動態も重要な要素として反映されることが示唆された。さらに, 他の薬剤と比較した結果についても合わせて報告する。

1) Grasso S, et al: Antimicrob. Agents Chemother. 13: 570~576, 1978

## P-86 AM-1155 の吸収特性

草嶋久生・石田了三

杏林製薬 (株) 研究センター

目的: 新キノロン系抗菌薬 AM-1155 は, 良好な経口吸収性をその特徴の一つとする。今回, 我々は, 本剤の吸収性, 吸収部位及び速度, 吸収性と物性との関係, 並びに ENX, SPFX, LVFX など報告されている能動輸送系の, AM-1155 の吸収に対する関与の有無について検討した。

方法: 1) ラット (10 mg/kg), イヌ (2 mg/kg) 及びヒト (100 mg) における経口及び静脈内投与後の AUC より, AM-1155 のバイオアベイラビリティ (B. A.) を評価した。2) ラット *in situ* ループ法により AM-1155 の吸収部位及び速度を検討し, 吸収部位については更に類薬 (CPFX, FLRX) と比較した。3) AM-1155 を含む数種の新キノロン誘導体について, ラット及びイヌにおける吸収性と脂溶性, 水溶性の相関を, *in situ* 及び *in vivo* で検討した。4) CEX を対照薬として, ラット空腸 *in situ* ループ法により, 吸収における能動輸送系の関与の有無を検討した。

結果及び考察: 1) AM-1155 のラット, イヌ及びヒトにおける B. A. は, それぞれ 96, 89 及び 103 % であり, 本剤は動物種によらず良好な吸収性を示した。2) AM-1155 は十二指腸及び空腸から良好に吸収され, 回腸及び結腸からも吸収されたが, 胃からの吸収は少なかった。空腸及び回腸からの吸収は速やかであった。3) ラット空腸ループからの吸収率は, 脂溶性の高い新キノロン薬ほど高かった。AM-1155 は FLRX, OFLX, SPFX と同様の良好な吸収性を示した。本剤の良好な吸収性は, 高い脂溶性と水溶性によることが, イヌにおける検討から明らかとなった。4) CEX の空腸ループからの吸収は高濃度のジペプチドにより阻害されたが, AM-1155 の吸収はアミノ酸及びペプチドによりいずれも阻害されなかった。このことから, 本剤の小腸における吸収には, アミノ酸またはペプチド輸送担体を介する能動輸送系は関与せず, 単純拡散によるものと考えられた。

## P-87 各種実験感染モデルにおける AM-1155 の効果

富沢 寛・山本隆雄・福田秀行

保坂雅喜・篠田泰誉

杏林製薬(株)中央研究所

目的: AM-1155 はグラム陽性菌および陰性菌にバランスのよい抗菌力を示すキノロン系抗菌剤である。そこで、われわれは各種細菌を用いて種々の実験感染モデルを作製し AM-1155 の効果を類薬と比較検討した。

材料及び方法: マウスを用いた全身感染、呼吸器感染、皮膚感染およびラットポーチ内感染の各モデルにおける AM-1155 の効果を生存率、感染部位の菌数変動等から判定し、ciprofloxacin (CPFX), levofloxacin (LVFX), sparfloxacin (SPFX) 及び tosufloxacin (TFLX) の効果と比較した。

結果および考察:

マウス全身感染: MRSA, QRSA 感染に対する AM-1155 の効果は SPFX と同等であり、LVFX, CPFX に比べ3倍以上優れていた。肺炎球菌に対して AM-1155 は SPFX よりも3倍優れた効果を示した。大腸菌および緑膿菌感染に対する効果は LVFX, CPFX と同等であった。

マウス呼吸器感染: 肺炎球菌による肺感染モデルでは AM-1155 は SPFX に比べ3倍優れた効果を示した。また肺炎桿菌に対する効果は SPFX, LVFX とほぼ同等であった。

マウス皮膚感染: ブドウ球菌による皮下腫瘍モデルにおいて AM-1155 は腫瘍サイズを顕著に縮小し、その効果は SPFX, LVFX, CPFX および TFLX に比べ明らかに優れていた ( $P < 0.05$ )。

ラットポーチ内感染: ラットポーチ内に接種されたブドウ球菌に対し AM-1155 は殺菌的に作用し、その効果は CPFX よりも強く、SPFX と同等であった。また、*B. fragilis* に対する効果は CPFX よりも優れていた。

AM-1155 は各種実験感染モデルにおいて、*in vitro* 抗菌活性を反映してグラム陽性菌および陰性菌感染に良好な効果を示し、特にグラム陽性菌感染に対する効果は類薬に比べ優れた点がみとめられた。

## P-88 ニューキノロン系抗菌剤 AM-1155 の細胞内移行性及び細胞内殺菌力に関する検討

山本隆雄・草嶋久生・保坂雅喜

杏林製薬株式会社中央研究所

目的: 抗菌剤の食細胞内移行性および殺菌作用は細胞内増殖菌に対する有効性を推測する指標の一つと考えられる。今回、我々はヒト抹梢血好中球 (PMNs) およびマウスマクロファージ様細胞株 (J 774. 1) を用いて AM-1155 の細胞内への移行性を、また J 774. 1 を用いてヒト血中レベルに相当する薬剤濃度範囲での細胞内殺菌効果を検討したので報告する。

方法: 薬剤の細胞内取り込み; PMNs は HBSS を用いて、J 774.1 は 10% FCS 加 RPMI 1640 を用いて薬剤存在下で培養後、細胞外の薬剤を洗浄除去して細胞を回収した。凍結融解を繰り返して細胞を破碎した後、フィルターでろ過して細胞破片を除き、細胞内液を調整した。サンプル中の薬剤濃度は HPLC 法により定量した。細胞内移行率は細胞外薬剤濃度 (E) に対する細胞内薬剤濃度 (C) の比、C/E ratio として表した。細胞内殺菌; オブソニン化した *S. aureus* 菌体を貪食させた細胞を、薬剤存在下で一定時間培養した。細

胞外の薬剤を洗浄除去した後、低張処理をして細胞を破碎し、細胞内の生菌数を測定した。

結果: AM-1155 は、他のキノロン剤と同様速やかに細胞内に移行した。細胞内移行率は PMNs, J 774.1 でそれぞれ  $6.1 \pm 1.8$ ,  $5.8 \pm 1.3$  であった。また、細胞内移行は各種代謝阻害剤 (NaF, CCCP, ouabain, adenosine) の影響を受けなかった。*S. aureus* に対する細胞内殺菌作用では、AM-1155 の 0.25, 1 及び 4  $\mu\text{g/ml}$ , 6 時間処理により、それぞれ薬剤非処理細胞内生菌数の 77, 91, 及び 99% が殺菌され用量依存性がみられた。この殺菌作用は薬剤処理時間にも比例していた。また、AM-1155 は他のニューキノロン系抗菌剤、 $\beta$ -ラクタム剤やアミノ配糖体と同等以上の細胞内殺菌力を示した。

結語: AM-1155 の臨床における細胞内増殖菌に対する有用性が示唆された。

## P-89 Q-35 の *Staphylococcus* 属に対する殺菌活性

伊藤達也・松本雅彦

中外製薬(株)富士御殿場研究所

西野武志

京都薬科大学微生物学教室

目的: Q-35 (balofloxacin), TFLX, および SPFX は、MRSA を含む *Staphylococcus* 属に対して強い抗菌活性を示す。今回、我々は、これら薬剤の *Staphylococcus* 属に対する抗菌活性を殺菌力の点より検討したので報告する。

方法: MRSA 18 株および *S. epidermidis* 3 株の臨床分離株を用いた。MIC は寒天平板希釈法、*gyrA* (Ser-84) の変異は PCR-RFLP 法で調べた。殺菌活性は、およそ  $10^7$  CFU/ml の菌を含む Mueller Hinton broth に抗菌薬を加え、好気的条件下で培養し、一定時間後に生菌数を測定する方法で調べた。

結果および考察: 本実験で用いた *Staphylococcus* 属は、SPFX の感受性において明瞭に二分された。SPFX 感受性菌 (MIC: 0.05~0.2  $\mu\text{g/ml}$ , 7 株) および耐性菌 (6.25~25  $\mu\text{g/ml}$ , 14 株) に対して、Q-35 および TFLX の MIC は、0.05~0.78  $\mu\text{g/ml}$  および 1.56~12.5  $\mu\text{g/ml}$  に分布した。ここで試験した SPFX 耐性 MRSA の全ては、*gyrA* の変異株であった。Q-35 は、SPFX 感受性、耐性株ともに MIC 以上の濃度で 3 時間作用により生菌数を 1/100~10/10,000 に減少させる殺菌活性を示した。一方、TFLX, SPFX, および OFLX は、SPFX 感受性菌に対しては Q-35 と同様の殺菌活性を示したが、SPFX 耐性菌に対しては、MIC 以上の濃度においても 3 時間で生菌数をほとんど減少させず、静菌的な作用であった。この Q-35 の SPFX 耐性 MRSA に対するすみやかな殺菌作用は、Q-35 の 8 位メトキシ素をフッ素または水素に置換することにより減弱した。以上の結果より、キノロン骨格 8 位へのメトキシ基の導入は、キノロン耐性 *Staphylococcus* 属に対する殺菌作用に寄与することが示唆された。

## P-90 用量検討試験ならびに二重盲検群間比較試験の臨床効果判定からみた判定基準

小橋吉博・米山浩英・矢野達俊  
木村 丹・田辺 潤・田野吉彦  
松島敏春

川崎医科大学附属川崎病院内科 (II)

目的: 全国施設における用量検討試験や二重盲検群間比較試験の効果判定は、偏りの少ないものであると考えられる。そこで、当施設でそれらの試験に参加した症例を基に、判定の基準となったであろうと考えられる点を検討し、今後の評価に役立てたいと考えた。

対象と方法: 過去4年間に試験抗菌薬の用量検討試験および二重盲検群間比較試験が行われたのは肺炎81例、慢性気道感染症27例であった。著効、有効、やや有効、無効の4群に分別し、個々の症例において判定に至った理由を、発熱、咳嗽、膿性痰、白血球数、CRP、胸部X線所見、喀痰培養検査の改善度から総合的に検討した。

結果: 肺炎81例における臨床効果判定では著効11例、有効61例、やや有効4例、無効5例。著効11例においては、発熱が平均2.7日、白血球増多は平均3.7日、CRP亢進は10.8日、浸潤影も平均11.5日でほぼ消失していた。一方、有効61例においては発熱は平均5.9日、白血球増多は3日で60%、7日で77%、14日で98%、CRP亢進は3日で0%、7日で21%、14日で44%で正常化しており、浸潤影も21%の症例が投薬終了時に消失していたのみであった。従って、著効を解熱3日以内、白血球増多の正常化を7日以内、CRP亢進の正常化を14日以内、浸潤影の消失14日以内を満たした症例とすると、著効11例中8例がこの基準を満足し、逆に有効61例中7例が著効例に入った。細菌学的効果はほとんど臨床効果判定には関与していないように思えた。慢性気道感染症27例中著効2例、有効22例、やや有効2例、無効1例で症例が少なく、検討は不可能であった。

結論: 以上の判定基準を設けた場合、両者の間に位置する症例が少数例あり、判定に苦慮する場合もみられた。

## P-91 細菌性肺炎に対する cefoselis と ceftazidime の薬効比較試験

全国35施設およびその関連施設の共同研究

副島林造

川崎医科大学呼吸器内科

島田 馨

東京専売病院

三木文雄

多根病院内科

原 耕平

長崎大学第二内科

斎藤 厚

琉球大学第一内科

砂川慶介

国立東京第二病院小児科

目的: 注射用セファロスポリン系抗生物質 cefoselis (FK 037; FK と略) の細菌性肺炎に対する有効性、安全性および有用性を検討する目的で ceftazidime (CAZ) を対照薬とした比較試験を実施した。

対象と方法: 感染症状の明確な細菌性肺炎を対象とした。FK, CAZ とともに1回1gを1日2回点滴静注し、14日間投与を原則とした。

成績: 総投与症例は186例 (FK群93例, CAZ群93例) で、解析採用症例は臨床効果146例 (FK群78例, CAZ群68例)、副作用178例 (FK群90例, CAZ群88例)、臨床検査値172例 (FK群90例, CAZ群82例)、有用性145例 (FK群78例, CAZ群67例) であった。

臨床効果における有効率はFK群92.3% (72/78), CAZ群91.2% (62/68) であり、両群間に有意差を認めなかった。菌消失率 (株数) はFK群100% (24/24), CAZ群96.9% (31/32) であった。

副作用発現率はFK群3.3% (3/90), CAZ群3.4% (3/88), 臨床検査値異常変動発現率はFK群20.0% (18/90), CAZ群18.3% (15/82) であり、両群間に有意差を認めなかった。

有用率はFK群89.7% (70/78), CAZ群88.1% (59/67) であり、両群間に有意差を認めなかった。

結論: 以上の成績から cefoselis は ceftazidime と同様、細菌性肺炎に対し臨床的に有用な薬剤であると考えられた。

## P-92 慢性気道感染症に対する cefoselis と ceftazidime の薬効比較試験

全国35施設およびその関連施設の共同研究

副島林造

川崎医科大学呼吸器内科

齋藤 玲

北海道大学医療技術短期大学部

小林宏行

杏林大学第一内科

松本文夫

神奈川県衛生看護専門学校付属病院

大泉耕太郎

久留米大学第一内科

松本慶蔵

長崎大学熱帯医学研究所内科

砂川慶介

国立東京第二病院小児科

目的: 注射用セファロスポリン系抗生物質 cefoselis (FK 037; FK と略) の慢性気道感染症に対する有効性、安全性および有用性を検討する目的で ceftazidime (CAZ) を対照薬とした比較試験を実施した。

対象と方法: 感染症状の明確な慢性気管支炎、気管支拡張症 (感染時)、慢性呼吸器疾患の二次感染等を対象とした。FK, CAZ とともに1回1gを1日2回点滴静注し、14日間投与を原則とした。

成績: 総投与症例は173例 (FK群86例, CAZ群87例) で, 解析採用症例は臨床効果144例 (FK群74例, CAZ群70例), 副作用163例 (FK群84例, CAZ群79例), 臨床検査値162例 (FK群84例, CAZ群78例), 有用性145例 (FK群75例, CAZ群70例) であった。

臨床効果における有効率はFK群90.5% (67/74), CAZ群90.0% (63/70) であり, 両群間に有意差を認めなかった。菌消失率 (株数) はFK群88.1% (37/42), CAZ群94.6% (35/37) であった。

副作用発現率はFK群7.1% (6/84), CAZ群2.5% (2/79), 臨床検査値異常変動率はFK群13.1% (11/84), CAZ群12.8% (10/78) であり, 両群間に有意差を認めなかった。

有用率はFK群84.0% (63/75), CAZ群87.1% (61/70) であり, 両群間に有意差を認めなかった。

結論: 以上の成績から cefoselis は ceftazidime と同様, 慢性気道感染症に対し臨床的に有用な薬剤であると考えられた。

### P-93 肺炎に対する azithromycin と clarithromycin の臨床的有用性に関する比較試験

アジスロマイシン内科領域研究会

(研究代表者) 小林宏行

杏林大学第一内科

佐野靖之

同愛記念病院アレルギー呼吸器科

青木信樹

信楽園病院内科

三木文雄

多根病院内科

斎藤 厚

琉球大学第一内科

島田 馨

社会保険中央総合病院

他 37 施設

目的: 新規経口用マクロライド系抗生物質 azithromycin (AZM) の肺炎に対する有効性, 安全性および有用性を検討するために, clarithromycin (CAM) を対照薬として無作為化二重盲検比較試験を実施した。

対象と方法: 感染症状の明確な, 軽症または中等症の肺炎を対象とした。AZMは1回500mg (力価) を1日1回3日間, CAMは1回200mg (力価) を1日2回14日間投与とした。

結果: 1. 総症例163例中, 臨床効果の解析対象症例122例における有効率 (「著効」+「有効」の割合) はAZM群98.3% (58例/59例), CAM群90.5% (57例/63例) であった。両群間に有意差は認められなかったが, AZMのCAMに対する臨床的同等性は検証された ( $\Delta=10\%$ ,  $p<0.001$ )。

2. 分離菌の消失率はAZM群86.7% (13例/15例), CAM群88.2% (15例/17例) であった (有意差なし)。

3. 随伴症状 (副作用) の発現率はAZM群4.1% (3例/

74例), CAM群6.7% (5例/75例) であった (有意差なし)。

4. 臨床検査値の異常変動の発現率はAZM群20.8% (15例/72例), CAM群21.4% (15例/70例) であった (有意差なし)。

5. 概括安全度の解析対象症例144例における安全率 (「問題なし」の割合) はAZM群77.8% (56例/72例), CAM群73.6% (53例/72例) であった (有意差なし)。

6. 有用性の解析対象症例121例における有用率 (「極めて有用」+「有用」の割合) は, AZM群94.9% (56例/59例), CAM群87.1% (54例/62例) であった (有意差なし)。

以上の成績より, 肺炎に対してAZMはCAMと同様に有用性の高い薬剤であると考えられた。

### P-94 慢性気道感染症に対する azithromycin と clarithromycin の臨床的有用性に関する比較試験

アジスロマイシン内科領域研究会

(研究代表者) 小林宏行

杏林大学第一内科

中田 紘一郎

虎の門病院呼吸器科

小田切繁樹

神奈川県立循環器呼吸器病センター呼吸器科

副島林造

川崎医科大学呼吸器内科

原 耕平

長崎大学第二内科

島田 馨

社会保険中央総合病院

他 36 施設

目的: 新規経口用マクロライド系抗生物質 azithromycin (AZM) の慢性気道感染症に対する有効性, 安全性および有用性を検討するために, clarithromycin (CAM) を対照薬として無作為化二重盲検比較試験を実施した。

対象と方法: 感染症状の明確な, 軽症または中等症の慢性気道感染症 (慢性気管支炎, 気管支拡張症感染時, 慢性呼吸器疾患の二次感染) を対象とした。AZMは1回500mg (力価) を1日1回3日間, CAMは1回200mg (力価) を1日2回14日間投与とした。

結果: 1. 総症例171例中, 臨床効果の解析対象症例144例における有効率 (「著効」+「有効」の割合) はAZM群94.5% (69例/73例), CAM群83.1% (59例/71例) であった。両群間に有意差は認められなかったが, AZMのCAMに対する臨床的同等性は検証された ( $\Delta=10\%$ ,  $p<0.001$ )。

2. 分離菌の消失率はAZM群75.8% (25例/33例), CAM群68.2% (15例/22例) であった (有意差なし)。

3. 随伴症状 (副作用) の発現率はAZM群7.6% (6例/79例), CAM群5.1% (4例/78例) であった (有意差なし)。

し)。

4. 臨床検査値の異常変動の発現率はAZM群 13.5% (10例/74例), CAM群 9.3% (7例/75例)であった(有意差なし)。

5. 概括安全度の解析対象症例 149例における安全率(「問題なし」の割合)はAZM群 79.7% (59例/74例), CAM群 86.7% (65例/75例)であった(有意差なし)。

6. 有用性の解析対象症例 138例における有用率(「極めて有用」+「有用」の割合)は, AZM群 92.9% (65例/70例), CAM群 79.4% (54例/68例)であった(有意差なし)。

以上の成績より, 慢性気道感染症に対してAZMはCAMと同様に有用性の高い薬剤であると考えられた。

#### P-95 びまん性汎細気管支炎に対する azithromycin の臨床的検討

小林宏行・武田博明

杏林大学第一内科

島田 馨

社会保険中央総合病院

中田紘一郎

虎の門病院呼吸器科

澤木政好

奈良県立医科大学第二内科

二木芳人

川崎医科大学呼吸器内科

河野 茂

長崎大学第二内科

他 15施設

目的: びまん性汎細気管支炎を対象に, 新規の15員環マクロライド系抗生物質 azithromycin (AZM) の有効性, 安全性を検討した。

対象と方法: 合計 60例の症例に AZM 250 mg を1週2回, 原則として3ヵ月間間欠投与し, 臨床効果 52例, 安全性 55例を検討の対象とした。

結果: AZM 投与による有効率は 84.6% (44/52) であった。投与 12週後の臨床所見では, 喀痰量が 46例中 30例に, 労作時息切れは 46例中 23例に改善がみられ, いずれも悪化例はみられなかった。その他, 肺活量, 1秒量, 寒冷凝集反応, CRP についても改善傾向がみられた。常在菌を除いた喀痰分離菌の消失率は 39.5% (15/38) であった。そのうち *Pseudomonas aeruginosa* は 22株が検出され, 4株が消失した。副作用は 55例中 4例 (7.3%) にみられ, その内訳は皮疹, 下痢, 胃症状(胃もたれ), 掻痒感各 1例であった。臨床検査値の異常変動は 54例中 4例 (7.4%) にみられ, その内訳は好酸球の増多 2例, GOT の上昇 1例, Al-P の上昇 1例であった。これらの副作用, 臨床検査値異常変動の程度は軽度または中等度であった。

考察: AZM の 1週2回間欠投与による長期投与には, 現在, 有用性の認められている erythromycin, clarithromycin 等の 14員環マクロライド剤の少量長期投与と同様の有用性が期待された。