

肺炎球菌に対する β -ラクタム薬の殺菌効果の検討

海江田 哲 矢野 寿一

長崎大学耳鼻咽喉科・北里大学医学部微生物

井上 松久

北里大学医学部微生物

小林 俊光

長崎大学耳鼻咽喉科

Study on Bactericidal Effect of β -lactams against *Streptococcus pneumoniae*

Satoru KAIEDA, Hisakazu YANO

Department of Otolaryngology, Nagasaki University School of Medicine and
Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine

Matsuhisa INOUE

Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine

Toshimitsu KOBAYASHI

Department of Otolaryngology, Nagasaki University School of Medicine

Minimum inhibitory concentration (MIC) is the most common index on evaluation of the antibacterial effect of antibiotic agents.

On the other hand, minimum bactericidal concentration (MBC) that show the bactericidal effect of the antibiotic agents is not common compare with MIC because of its complicated method.

In this study, we determined the bactericidal effect of β -lactams against *Streptococcus pneumoniae* by determination of 40 strains of MIC and MBC. And we can get the result that 27 of 40 strains lost viability treatment with MIC or $2\times$ MIC concentration of β -lactams. But remains 13 strains can survive treatment with $8\times$ MIC or higher concentration of β -lactams and can grow again on normal plate with removing the effect of antibiotics.

This result suggest that β -lactams have relatively good bactericidal effect against *S. pneumoniae*, but against some strains that can survive under high concentration of β -lactames, they only have the stereostatic effect at the MIC concentration.

はじめに

MIC (minimum inhibitory concentration; 最少発育阻止濃度) は, 抗菌薬の細菌に対する抗菌力の指標であり, 感染症治療における抗菌薬選択の際の重要な1つの参考値である。しかし, MIC は肉眼的観察結果であり, 抗菌薬の殺菌能や体内動態を反映したものではない。基礎細菌学的な観点からすると, 抗菌薬の細菌に対する殺菌力の指標である MBC (minimum bactericidal concentration; 最少殺菌濃度) の検討は, 抗菌薬の初期殺菌能を知る上でも重要であるが, 標準的な測定法も確立されていない事もあり, 詳細には検討されていない。従って, 臨床の場では MBC を念頭に入れた抗菌薬の選択はほとんど普及していない。

今回, 種々の β -ラクタム薬を用いて, 肺炎球菌に対する MIC と MBC をそれぞれ測定したので, その殺菌効果に関して検討を行い, 若干の考察を加え報告する。

実験方法

1) 使用菌株

1999 年以降に分離された北里大学微生物学保存の肺炎球菌 40 株を対象とした。NCCLS の基準に従い, PCG に対する MIC より, ペニシリン感受性肺炎球菌 (penicillin susceptible *Streptococcus pneumoniae*; PSSP) : $\leq 0.06 \mu\text{g}/\text{ml}$, 中間型 (penicillin intermediate *Streptococcus pneumoniae*; PISP) : $0.125 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$, ペニシリン耐性肺炎球菌 (penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*; PRSP) : $\geq 2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ に分類した。

2) 使用抗菌薬

経口ペニシリンとして amoxicillin (AMP C), 経口セフェムとして cefditren (CDTR), 経口ペネムとして faropenem (FRPM) の計 3 薬剤を使用した。

3) MIC 測定

Table 1 Antibacterial and bactericidal activity of three β -lactams against *Streptococcus pneumoniae*. (n=40 strains).

		MIC range ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MBC range ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MBC/MIC	
				≤ 2 (n)	≥ 8 (n)
PSSP (n=20)	AMPC	0.016-0.03	0.03-0.5	14	6
	CDTR	0.016-0.25	0.03-0.5	14	6
	FRPM	0.004-0.008	0.008-0.13	14	6
PISP (n=13)	AMPC	0.25-1	0.5-8	9	4
	CDTR	0.25-1	0.5-16	9	4
	FRPM	0.13-0.25	0.25-2	9	4
PRSP (n=7)	AMPC	1-4	2-64	4	3
	CDTR	0.25-1	0.5-16	4	3
	FRPM	0.25-1	0.5-16	4	3

MIC の測定条件は, Mc Farland 0.5 に調整した菌液を 10 倍希釈し, 最終接種菌量を $5 \times 10^4 \text{cfu}/\text{well}$ とした。測定培地は, ストレプトヘモサプリメント栄研 (栄研化学, 東京) を添加した Muller Hinton Broth を使用した。

4) MBC 測定

MIC 判定後の, それぞれの well より $5 \mu\text{l}$ の菌液 (約 10^3cfu の菌量を含む) を採取し, 薬剤の影響が無くなるように Muller Hinton 寒天培地+ストレプトヘモサプリメント栄研上に播種した。これを 35°C にて 20 時間前後培養後, 発育したコロニー数をカウントし, 99.9% の殺菌効果を示す最少濃度, すなわち発育したコロニー数が 1 コロニー以下となる最少濃度を MBC とした。

結 果

今回の結果を Table 1 に示す。肺炎球菌 40 株を, NCCLS の基準により分類した結果, PSSP 20 株, PISP 13 株, PRSP 7 株であった。PSSP 20 株に対する AMPC の MIC は, $0.016 \sim 0.03 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間にあり, MBC は $0.03 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間に存在した。それぞれの菌株における MBC/MIC が 2 以下の株が 14 株 (70%), 8 以上の株が 6 株 (30%) であり, この 6 株の中には, MIC は $0.016 \mu\text{g}/\text{ml}$ であるにも関わらず, MBC は $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ と, 両濃度間に非常に大き

なに乖離を認める菌株も存在した。更に、この6株はCDTR, FRPMの両薬剤においても同様に、MICとMBCの間に大きな乖離を認めた。一方、PISP13株, PRSP7株の、MBC/MICを見てみると、それぞれ4株(30.8%)、3株(42.5%)で、MBC/MICが8以上の株が検出された。これらのMBC/MICが8以上の菌株は、今回使用したAMPC, CDTR, FRPM3薬剤全てに対して同様の傾向を示した。全体では、MBC/MICが2以下の株が40株中27株(67.5%)、MBC/MICが8以上の株が40株中13株(32.5%)であり、この13株はペニシリン薬、セファロスポリン薬、さらにペネム薬の3薬剤に対し同様の傾向を示した。

考 察

β -ラクタム薬は、細胞壁合成に関わる酵素であるPBPに結合し、架橋形成を阻害し、その抗菌活性を発揮する。従って、その作用は殺菌的である。今回の検討でも40株中27株に於いて、MBCはMICと同濃度もしくは2倍の濃度の範囲内で、両者は非常に近い値となった。すなわち、これらの菌株に対しては、 β -ラクタム薬はMIC濃度付近で殺菌的に作用している事になる。

一方、残る13株に於いては、MICとMBCの間に8倍或はそれ以上の薬剤濃度の乖離が認められた。すなわちこれら13株に対しては、 β -ラクタム薬はMIC濃度では、殺菌的というよりむしろ静菌的にしか作用しておらず、菌は薬剤存在下でも生存し続けており、薬剤の影響を取り除くと再び増殖してくるものと思われた。

このように、高濃度の薬剤存在下に於いても、殺菌されずに生存し得る性質は、細菌性心内膜炎の主要な起因菌である *Viridans group streptococci* をはじめとして、種々の菌種及び種々の細胞壁合成阻害剤において報告されている¹⁾。中でも、MBC/MICが32以上のものは、

toleranceと定義されている。この機構発現には多くの因子が関与しているとされている。薬剤による細菌の自己融解酵素の誘導と、それに伴う溶菌である²⁾。肺炎球菌に於いて、実験的に自己融解酵素(lytic enzyme)をコードする遺伝子 *lytA* に変異を起こし、その酵素活性を消失させるとトレラント株となる事が証明されている³⁾。

臨床分離株では、肺炎球菌に関しては、このような性質を有する菌株の頻度は少ないとされている¹⁾が、一方で、Tomazらは1977年に南アフリカで、世界で初めて分離された多剤耐性肺炎球菌6株のうち、5株はペニシリンに対してトレラントであったと報告している⁴⁾。

肺炎球菌に対する β -ラクタム薬の殺菌効果を検討する際、細胞壁で伸長化するペプチドグリカン合成に関与しているPBP1Aに親和性の高い薬剤(ペニシリン系薬)ほど殺菌力にすぐれ、菌の隔壁形成に関わるPBP2Aに親和性の高い薬剤(セフェム系薬)の殺菌作用は劣る点を十分考慮しなければならない。

今回の我々の検討では、PSSP6株, PISP4株, PRSP3株とPCGに対するMICに関わらず殺菌されにくい菌株が13株存在し、この13株は、今回使用した3薬剤全てに対して、同様の傾向を示した。従って、このような性質を持つ菌株を把握する為には、MICに加えてMBCの測定が有用と考えられた。

ま と め

従来、 β -ラクタム薬に対し、非常に良好な感受性を示し、その治療に苦慮する事の少なかった肺炎球菌感染症において、近年のペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)の急激な増加は、深刻な問題であり、耳鼻咽喉科領域に於いても、小児急性中耳炎など、肺炎球菌を主要な起因菌とする感染症に対する抗菌薬治療が難治化してきたその一つの大きな要因となっている。今回の検討で、 β -ラクタム薬の肺炎球菌に対する殺

菌力は、PBPの変異に関わらず、比較的良好で、薬剤の組織移行性が血中濃度の10分の1程度で、必ずしも良好とは言えない中耳或は鼻咽腔に於いても、薬剤の増量により、ある程度の効果が得られる事が予想される。しかし、一方で、40株中13株に殺菌されにくい菌株が存在した。体内濃度が注射薬に比べて低い経口薬が繁用されている現状を考えると、これらの性質を持つ菌株は、今後選択されていく可能性があり、今後の動向に注目すべきと考える。

参 考 文 献

- 1) Holbrook WP, Olafsdottir D, Magnusson HB, et al. : Penicillin tolerance among oral streptococci. J Med Microbiol 27 : 1

7-22, 1988.

- 2) Tomasz A : The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Annu Rev Microbiol 33 : 113-137, 1979.
- 3) Williamson R, Tomasz A : Antibiotic-tolerant mutants of Streptococcus pneumoniae that are not deficient in autolytic activity. J Bacteriol 144 : 105-113, 1980.
- 4) Liu HH, Tomasz A : Penicillin tolerance in multiply drug-resistant natural isolates of Streptococcus pneumoniae. J Infect Dis 152 : 365-372, 1985.

質 疑 応 答

質問 市川銀次郎（順天堂大）

MBCの結果を得るにはどの程度の時間がかかるか、また臨床的に応用することはどうか。

応答 海江田 哲（長崎大）

M2Cに加えてMBCを測定するには、更に1日時間を要する。

肺炎球菌による髄膜炎では臨床的に応用されている。しかし、現時点では測定法の複雑さから、ルーチンでの測定は困難と思われる。

質問 富山道夫（豊栄市）

PRSPのトレラント性の臨床的意義について

応答 海江田 哲（長崎大）

小児細菌性髄膜炎においては、トレラントによる治療失敗例も報告されているが、耳鼻咽喉科領域では、十分な検討はなされておらず今後の検討課題である。

質問 山中 昇（和歌山県立医大）

トレランス株の増殖性。

応答 海江田 哲（長崎大）

ノントレランス株と比較すると明らかに増殖は遅い。この事がトレラントのメカニズムとも

関連していると思われる。

質問 山中 昇（和歌山県立医大）

治療法について。

応答 海江田 哲（長崎大）

トレランス株でもMIC以上の薬剤濃度では、菌量の著しい減少が起こる。

従って、その治療には組織移行性の高い薬剤が有効と思われる。

連絡先：海江田 哲

〒228-0829 神奈川県相模原市北里1-15-1

北里大学医学部微生物

TEL 042-778-9349 FAX 042-778-9349