

Klebsiella 感染症の化学療法に関する基礎的研究：
Cephalosporin 系抗生剤単独と Gentamicin との併用について

増田 剛太・富岡 一

慶応義塾大学医学部内科学教室

(昭和 50 年 4 月 14 日受付)

緒 論

Klebsiella は Penicillin 系抗生剤に自然耐性を有することで知られるグラム陰性桿菌(Gram Negative Rod: GNR)である。*Klebsiella* 感染症は、とくに悪性腫瘍、血液疾患、慢性消耗性疾患などに合併した場合、難治性かつ重篤であり、これら基礎疾患の予後を左右する重要因子となる。その治療には、現在 aminoglycoside 系抗生剤とともに cephalosporin 系抗生剤が撰択されることが多い。とくに後者は、毒性が少ないことから大量に投与される。

著者らは本論文で、cephalosporin 系抗生剤の単独および gentamicin との併用効果を *in vitro* の実験系で検討した。また、*Klebsiella* 感染病巣にしばしば検出される共存菌をも含めた実験系を開発し、これら共存菌の臨床的意義を考察した。

実験材料および方法

被検菌株 1972~1974 年に慶応病院中央検査科微生物部に提出された臨床検体から分離した *Escherichia coli* 12 株、*Klebsiella pneumoniae* 20 株、*Enterobacter* spp. 18 株および *Serratia* 18 株を用いた。分類は EDWARDS & EWING¹⁾ に準じて行なった。

抗生剤 cephalothin (CET: 塩野義), cephaloridine (CER: 塩野義), cefazolin (CEZ: 藤沢) および gentamicin (GM: Shering) の各標準品を各製薬会社から提供をうけ使用した。

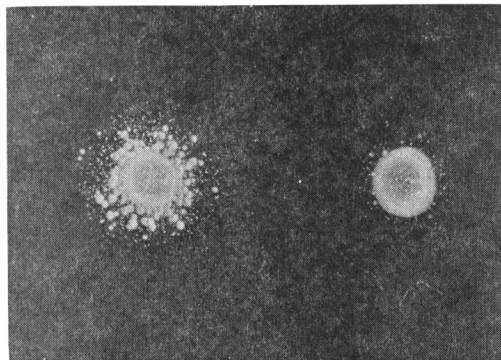
なお、抗生剤等の希釈には pH 7.2 の磷酸緩衝液を用いた。

培地は Heart Infusion Agar-Bacto (HIA: Difco) および Heart Infusion Broth-Bacto (HIB: Difco) を使用した。

Klebsiella 感染病巣における GNR の共存効果の *in vitro* での検討 *Klebsiella pneumoniae* の 1 菌株の 1 夜培養菌液を洗滌し、菌浮遊液を作製した。ついでこの菌液を HIA に混釈し(HIA 中の生菌数は約 10^7 /ml)、2 段階濃度に希釈した CET とともにペトリ皿に分注し、固化した。さらに、これら寒天平板上に、共存菌として各種 GNR の 1 夜培養菌液の原液を接種(菌数 $10^5 \sim 10^8$)して、 37°C 、48 時間の培養を行なった。

Fig. 1 Photograph of the effect of coexistent organisms.

The basal agar plate contained $200 \mu\text{g/ml}$ of cephalothin as well as cells of *Klebsiella pneumoniae* (cell count 10^7 /ml). After the incubation at 37°C for 48 hours, two large round colonies of *Enterobacter cloacae* (representing coexistent organisms) are visible on the plate accompanied by small satellite colonies of *K. pneumoniae* around them.



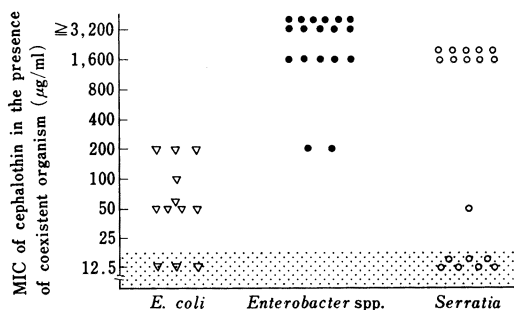
CET 濃度 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 以下では寒天平板全体に *K. pneumoniae* の集落が出現した。CET $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以上では寒天平板上の共存菌として接種された菌が形成した集落の周囲に、寒天平板内に混釈された *K. pneumoniae* が satellite colony を形成した (Fig. 1)。本論文では、これら satellite colony の出現が認められなくなる最小 CET 濃度を“MIC (minimal inhibitory concentration) of cephalothin in the presence of coexistent organism”と定義した。すなわち、この値は共存菌存在下において、指標菌である *K. pneumoniae* の発育を完全に阻止しうる最小 CET 濃度を表わす。

最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration: MIC) の測定には寒天平板希釈法を用いた。なお、接種菌は被検菌の HIB 1 夜培養菌液の原液とした。

CEZ と GM の単独および併用による抗菌力の比較 CEZ と GM の両抗生剤について 2 段階希釈液をつくり、該当する各抗生剤濃度の組合わせを有する寒天平板系列を作製した。そして固化後直ちに、被検菌の HIB 1 夜培養菌液の原液を寒天平板上に接種し、 37°C 、18 時間

Fig. 2 Effect of coexistent organisms on surviving cells of *Klebsiella pneumoniae* in the presence of cephalothin.

Heart infusion agar plates containing two-fold dilutions of cephalothin and cells of a strain of *K. pneumoniae* (cell count approximately 10^7 /ml) were prepared. The minimal concentration of cephalothin at which no growth of *K. pneumoniae* appeared around and under each of the colony of coexistent organism on the plates was defined as "MIC of cephalothin in the presence of coexistent organism". Dotted zone represents the concentration (cephalothin 12.5 μ g/ml) at which no effect was observed in the presence of coexistent organisms.



培養後, MIC の測定法に準じて, 各抗生剤濃度の組合せで発育が阻止される菌株数を算出した。なお, 複数菌株を対象とした chess board には, 該当する CEZ および GM の濃度の組合せで発育が阻止された *K. pneumoniae* の菌株数を累積数字で表わした。

実験成績

Klebsiella 感染病巣における GNR の共存効果の *in vitro* での検討 (Fig. 2)

寒天平板内に播種された指標菌 *K. pneumoniae* は CET 濃度 6.25 μ g/ml 以下では, 平板全体に集落を形成した。しかし, CET 12.5 μ g/ml 以上の濃度では, 平板上に形成された共存菌集落の周囲にだけ, CET が一定濃度以下の条件において, *K. pneumoniae* が satellite colony (衛星集落) として認められた (Fig. 1)。Fig. 2 に示すように, これら共存効果はとくに *Enterobacter* spp., *Serratia* において著しく高く, *Enterobacter* spp. は 18 株中 16 株が, *Serratia* は 18 株中 10 株が 1,600 μ g/ml またはそれ以上を示した。*E. coli* は 50~200 μ g/ml を示す菌株が多かった。これら数値はすなわち, これら共存菌の存在下で, 指標菌である *K. pneumoniae* の発育を完全に阻止するのに必要な最小 CET 濃度を表わすものと理解された。

MIC と "MIC of cephalothin in the presence of

Fig. 3 Comparison of "MIC of cephalothin in the presence of coexistent organism" and minimal inhibitory concentration.

The two values were compared in three species of gram negative organism. The agar plates contained serial two-fold dilutions of cephalothin and cells of a strain of *Klebsiella pneumoniae* (cell count approximately 10^7 /ml).

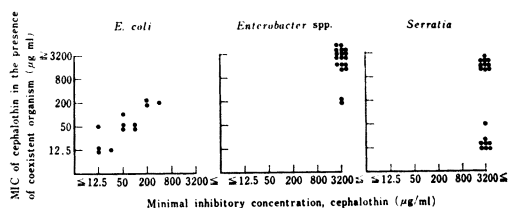
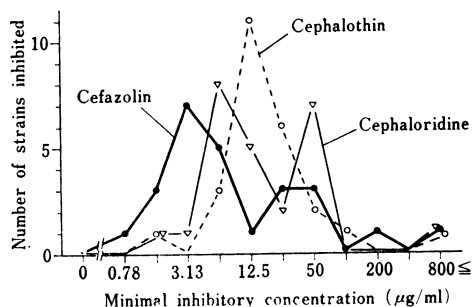


Fig. 4 MICs of cephalosporin antibiotics for 25 strains of *Klebsiella pneumoniae*.



coexistent organism" との関係 (Fig. 3)

共存菌として用いた *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* について, MIC 値と "MIC of cephalothin in the presence of coexistent organism" 値との関係を検討した。*E. coli* では, 一般に CET に耐性であるほど後者の値も高かった。*Enterobacter* spp., *Serratia* は全株が CET 1,600 μ g/ml 耐性であり, その多くで該当数値も著しく高く, 両数値間に密接な関係が認められた。しかし, *Serratia* の一部に, CET に高度耐性でありながら, このような現象を全く示さない菌株が存在することも, また注目された。

各種 cephalosporin 系抗生剤の *K. pneumoniae* に対する抗菌力の比較 (Fig. 4)

CET, CER, CEZ の *K. pneumoniae* 25 株に対する抗菌力を比較した。CET では MIC のピークが 12.5 μ g/ml であった。CER は 6.25 および 50 μ g/ml と 2 峯型を示した。これに対し, CEZ ではその MIC の主峯が 3.13 μ g/ml にあり, 前 2 者に比べて, さらにすぐれた抗菌効果を有することが確認された。

CEZ と GM の単独および併用効果の検討 (Fig. 5)

K. pneumoniae 20 株について、CEZ と GM の各種濃度の組合せで発育が阻止された菌株数を chess-board に累積数字で表わした。その結果、これら両抗生剤が *K. pneumoniae* に対し、相乗効果を有することが証明された。すなわち、*K. pneumoniae* 全株の発育を阻止するために、CEZ 単独では 50 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以上、GM では 1.56 $\mu\text{g/ml}$ が必要であった。しかし、これら両抗生剤の併用においては CEZ 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$ と GM 0.2~0.39 $\mu\text{g/ml}$ という比較的低濃度の組合せで、被検菌のほぼ全株の発育を阻止しえた。

考 按

重篤な基礎疾患を有する *Klebsiella* 感染症の治療には、昨今、cephalosporin 系抗生剤および aminoglycoside 系抗生剤が単独または併用で用いられることが多い。なかでも、cephalosporin 系抗生剤は毒性が少ないことから大量に投与される。

いっぽう、*Klebsiella* を初めとして GNR の多くは、主として β -lactamase (penicillinase, cephalosporinase) からなる抗生剤不活化物質を産生し、penicillin 系抗生剤、cephalosporin 系抗生剤などの β -lactam 系抗生剤を不活化することが知られている²⁻⁶⁾。さらに *Klebsiella* 感染病巣には *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia*, *Proteus* spp. など他種の GNR をも同時に検出することが少なくない。これら菌種は

E. coli を除けば、一般に cephalosporin 系抗生剤に高度耐性であり、その共存が抗生剤療法に対して何らかの影響をもたらすであろうことが予想される。

著者らは *in vitro* の実験系を用いて、*Klebsiella* に対する CET 療法における菌共存の意義を明らかにした。すなわち、共存菌として *Enterobacter* spp., *Serratia* 等が認められる場合には、1,600 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以上という高濃度の CET 存在下でさえも、CET 感受性 *Klebsiella* の発育を阻止し得なかった。このような現象は、共存菌としての *Enterobacter* spp., *Serratia* が産生する主として β -lactamase からなる抗生剤不活化物質が、寒天平板内に含有されていた CET を不活化し、その結果、平板内に生存しつづけた *Klebsiella* が集落を形成したためと理解された。また、*E. coli* においても、CET に耐性となるに従いがい、その共存効果“MIC of cephalothin in the presence of coexistent organism”値が上昇したことは、これら *E. coli* の CET 耐性が、抗生剤不活化物質に関係することを示すと同時に、CET 耐性菌を共存菌として検出する *Klebsiella* 感染症に対する CET 単独療法の難かしさを物語る。しかし、*Serratia* の一部菌株において、CET に高度耐性であるにも拘らず、このような共存効果がみられなかったことは、これらの菌株での CET 耐性機構が必ずしも CET 不活化物質の産生にだけよるものでないことを示すものであろう。なお、今回の実験で平板上に共存菌として接種した菌数は $10^5 \sim 10^6$ であったが、接種菌数を $10^1 \sim 10^2$ と減少しても同様の成績が得られた(著者ら、未発表)。

臨床における病巣内共存菌の意義に言及した MADDOCKS らの報告⁶⁾は、菌種、抗生剤の差異は有っても、著者らの *in vitro* での成績と軌を一にするものと考えられる。

著者らはさきに *Klebsiella* に対する CET と GM の併用効果がそれぞれの抗生剤の単独使用に比べて、静菌、殺菌作用ともすぐれた効果をもたらすことを報告した⁷⁾。今回はさらに本論文において、より有効な併用抗生剤検討の一環として、cephalosporin 系抗生剤のうち、CET, CER, CEZ の抗菌力を比較した。そして、CEZ が *K. pneumoniae* に対し、ひじょうにすぐれた抗菌力を有することを知った。そこで、CEZ と GM との併用効果を *in vitro* で検討し、chess board に表わし、両抗生剤間に *K. pneumoniae* に対して相乗効果が成立するのを認めた。単独では *K. pneumoniae* の発育を阻止するために CEZ 50 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以上が、GM では 1.56 $\mu\text{g/ml}$ が必要であった。しかし、これら両抗生剤を併用することによって、CEZ 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$,

Fig. 5 Effect of cefazolin and gentamicin used alone or in combination on 20 strains of *Klebsiella pneumoniae*.

Antibacterial activities were determined by the agar plate method. Undiluted overnight broth cultures of 20 strains of *Klebsiella pneumoniae* were employed as the inocula. In the chess board, strains inhibited by the combinations in concentrations of cefazolin and gentamicin were displayed in cumulative numbers.

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------|--------------------------|---------------------------------|------|------|------|------|----|----|----------|
| | | <input type="checkbox"/> | all of 20 strains inhibited | | | | | | | |
| | | <input type="checkbox"/> | none | | | | | | | |
| Cefazolin ($\mu\text{g/ml}$) | 1.56 | 20 | | | | | | | | |
| | 0.78 | 16 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | | | |
| | 0.39 | 2 | 11 | 18 | 18 | 19 | 20 | 20 | | |
| | 0.2 | 0 | 4 | 11 | 17 | 17 | 18 | 20 | | |
| | 0.1 | | 0 | 5 | 12 | 13 | 17 | 19 | 20 | |
| | ≤ 0.05 | | 0 | 2 | 8 | 10 | 16 | 18 | 20 | |
| | 0 | | 0 | 2 | 6 | 11 | 15 | 18 | 20 | |
| | | 0 | 0.78 | 1.56 | 3.13 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | ∞ |
| | | | Gentamicin ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | | |

GM 0.2~0.39 $\mu\text{g/ml}$ という、比較的得やすいこれら両抗生剤の血中濃度に相当する組合せで、被検 *K. pneumoniae* のほぼ全株の発育を阻止しえたことが注目された。

一般に *Klebsiella* 感染症は難治性であり、その治療には cephalosporin 系抗生剤または aminoglycoside 系抗生剤の単独または併用療法がすぐれているといわれる。しかしながら、これら抗生剤の単独投与は、ときにその治療効果に限界がみられる。とくに今回の実験成績で知られたとおり、*Enterobacter* spp. や *Serratia* など cephalosporin 系抗生剤耐性菌を同時に証明する *Klebsiella* 感染症の治療に対しては、交代菌症等の問題をも考慮すると、cephalosporin 系抗生剤単独投与よりも GM など他種抗生剤との適切な併用が、よりすぐれた治療効果をもたらすであろうと予測されるのである。

結 論

Klebsiella 感染症に対する抗生剤療法を *in vitro* の実験系で検討し、以下の成績をえた。

(1) *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* を共存菌とする *Klebsiella* 感染病巣を *in vitro* の実験系につくり、cephalosporin 系抗生剤 (CET) 療法に及ぼす共存菌の意義を検討した。その結果、とくに CET 耐性菌の共存により、*Klebsiella* は 1,600 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以上という高濃度の CET 存在下でも生存しつづけ、菌集落を形成してくることが知られた。

(2) CET, CER, CEZ の *K. pneumoniae* に対する抗菌力を比較して、CEZ が他の 2 者に比しすぐれていることを知った。

(3) CEZ と GM の併用が *K. pneumoniae* に対し、

相乗効果を生ずることを証明した。

纏を終わるにあたり、細菌の分離、同定に協力された慶大中検 内田博氏に深謝の意を表する。

なお、本論文の一部は 1974 年 9 月に米国サンフランシスコで開催された Fourteenth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy で発表した。

文 献

- 1) EDWARDS, P. R. & W. HEWING : Identification of *Enterobacteriaceae*, 3rd Ed., Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, 1972
- 2) ABRAHAM, E. P. : Biosynthesis and Enzymic Hydrolysis of Penicillins and Cephalosporins, University of Tokyo Press, Tokyo, Japan, 1974
- 3) AYLIFFE, G. A. J. : Cephalosporinase and penicillinase activity of Gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 40 : 119~126, 1965
- 4) NEU, H. C. & E. B. WINSHELL : Relation of β -lactamase activity and cellular location to resistance of *Enterobacter* to penicillins and cephalosporins. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 1 : 107~111, 1972
- 5) HOLT, R. J. & G. T. STEWART : Production of amidase and β -lactamase by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 36 : 203~213, 1964
- 6) MADDOCKS, J. L. & J. R. MAY : "Indirect pathogenicity" of penicillinase-producing *Enterobacteria* in chronic bronchial infections. *Lancet* 1 : 793~795, 1969
- 7) 増田剛太, 富岡 一 : 抗生剤併用療法に関する *in vitro* での検討。感染症学雑誌 48 : 350~356, 1974

IN VITRO STUDIES ON THE ACTIVITIES OF CEPHALOSPORINS USED ALONE AND IN COMBINATION WITH GENTAMICIN AGAINST *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

GOHTA MASUDA and SUSUMU TOMIOKA

Department of Medicine, School of Medicine, Keio University

To institute appropriate antibiotic therapy for the infections due to *Klebsiella pneumoniae*, *in vitro* studies were carried out.

(1) Heart infusion agar plates containing serial two-fold dilutions of cephalothin (CET) and cells of a strain of *K. pneumoniae* in the concentration of $10^7/\text{ml}$ were prepared. Undiluted overnight broth cultures of 12 strains of *Escherichia coli*, 18 strains of *Enterobacter* spp. and 18 strains of *Serratia* were inoculated separately on the above-stated agar plates (cell count $10^6\sim 10^8$) as coexistent organism (s). These plates were then incubated at 37°C for 48 hours. When the CET concentration was 6.25 $\mu\text{g/ml}$ or less, the cells of *K. pneumoniae* formed numerous colonies in the plates. However, with concentrations of 12.5 $\mu\text{g/ml}$ or more of CET, *K. pneumoniae* appeared as satellite colonies only around and

under the colonies of coexistent organisms. In this paper, the minimal concentration of CET at which no such satellite colonies appeared around and under each of the coexistent organism was defined as "MIC (minimal inhibitory concentration) of cephalothin in the presence of coexistent organism". The value varied according to the coexistent organism. The highest values were observed among strains of *Enterobacter* spp. and *Serratia*; 16 out of 18 strains of *Enterobacter* spp. and 10 of 18 *Serratia*, these values were 1,600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or more of CET. These results suggest the difficulty of the treatment of *Klebsiella* infections using CET alone, especially in cases demonstrating CET-resistant coexistent organisms. Such phenomena were supposed to be attributable to the CET-inactivating substances, mainly to β -lactamases produced by the coexistent organisms.

(2) Three cephalosporin antibiotics, cephaloridine (CER), cefazolin (CEZ) and CET were compared in their antibacterial activities against *K. pneumoniae*. It was concluded that CEZ had the most potent activity among them.

(3) Alone and combined effects of CEZ and gentamicin (GM) using 20 strains of clinical isolates of *K. pneumoniae* were examined by the agar plate method. Cumulative numbers of strains inhibited by the combinations in various concentrations of the two antibiotics were shown in the chess board. Synergistic effects of these two antibiotics were demonstrated by the procedure. It was especially noted that almost all strains of *K. pneumoniae* were inhibited by the concentration of 0.2 to 0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GM when used in combination with 6.25 to 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CEZ, the concentrations usually obtainable in the serum in clinical practice.

From these results, it was concluded that among cephalosporins CEZ had excellent antibacterial activity, and the combined use with other antimicrobials, for example, aminoglycosides such as GM showed more potent activity bacteriostatically as well as bactericidally.