

緑膿菌に対する合成ペニシリンとポリミキシンの 相互作用に関する細菌学的研究

尾花芳樹・妹尾聰一郎・松井邦彦・中沢昭三

京都薬科大学微生物学教室

(昭和 51 年 6 月 21 日受付)

近年, opportunistic infection の起炎菌としてグラム陰性桿菌, とくに緑膿菌が重要視されており, そのため最近の抗生物質の開発も緑膿菌に有効な物質を目的としている場合が多い。現在臨床各科で使用されている抗緑膿菌性抗生物質としては Carbenicillin, Sulbenicillin などの合成ペニシリン, Gentamicin, Dibekacin などのアミノ配糖体抗生物質, Polymyxin-B, Colistin などのポリペプチド系抗生物質などがある。しかしながらこれらの薬剤単独では効果が不十分な場合や長期間使用すると耐性菌が出現しやすいこと, また副作用発現などの欠点が認められている。そこでこれらの欠点を補う目的でこれらの合成ペニシリンとアミノ配糖体抗生物質あるいは合成ペニシリンとポリペプチド抗生物質間の併用効果が基礎, 臨床面で検討されているが¹⁻⁴⁾, その成績は一定していない。その原因について, 私どもの教室では既に合成ペニシリンとアミノ配糖体抗生物質 2 剤間の併用効果について, 種々の作用条件を検討することにより, *in vitro*, *in vivo* に於いて, 著明な協力的効果を認めたことを報告した⁵⁾。

今回, さらに合成ペニシリンとポリペプチド抗生物質について同様に検討を行なったので報告する。

実験材料および実験方法

1) 使用薬剤

Carbenicillin (CBPC: 藤沢薬品), Sulbenicillin (SB-PC: 武田薬品), Polymyxin-B (PL-B: 台糖ファイザー) のいずれも力価の明らかな標準品を使用した。

2) 使用菌株

教室保存の緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* No. 12 (東大医科学研究所本間遜教授分与) を用いた。

3) 使用培地

Tryptosoya broth (TSB: ニッサン)

Heart Infusion broth (HIB: ニッサン)

Nutrient broth (NB: ニッサン)

Nutrient agar (NA: ニッサン)

4) Chequer board titration 法による相互作用

CBPC と PL-B および SBPC と PL-B 間の相互作用の有無を Chequer board titration 法により検討した。

測定用培地には HIB を用い, 同培地で各薬剤を希釈混合し, その培地に TSB で 37°C, 18 時間前培養した菌を 1 白金耳移植し, 37°C, 18 時間培養後菌の増殖により効果を判定した。

5) 増殖曲線による相互作用

緑膿菌を TSB に 37°C, 18 時間前培養し, この菌液を 5% の割合で HIB に移植し, 対数増殖期に達するまで振とう培養する。この菌液に各濃度の薬剤を添加し, 経時的に菌液を採取し, 混濁法による生菌数測定を行なった。また薬剤の分割添加の場合は, 上記のように調製した菌液に第 1 剤目を添加後, 1 時間あるいは 2 時間の間隔をあけて, 第 2 剤目を添加し, 経時的に菌液を採取し生菌数測定を行なった。

6) Sulbenicillin あるいは Polymyxin-B 前処理菌に対する Polymyxin-B あるいは Sulbenicillin の作用

上記のように緑膿菌を対数増殖期まで培養し, その菌液に SBPC (最終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$) あるいは PL-B (最終濃度 3 $\mu\text{g/ml}$) を添加しその後 1 時間培養を続けた。SBPC 前処理の場合は薬剤添加 1 時間後に SBPC を不活化する充分量の Penicillinase (市販品の 2 倍希釈液) を加え, 37°C, 5 分間反応した後 PL-B (3 $\mu\text{g/ml}$) を添加し, その後培養を続け経時的に菌液を採取し生菌数測定を行なった。PL-B 前処理の場合は, 1 時間後に処理菌を無菌的に遠心洗浄し, 薬剤を除去後, 新しい HIB に再懸濁させ, SBPC (100 $\mu\text{g/ml}$) を添加, 経時的に生菌数測定を行なった。

7) マウス実験的緑膿菌感染症に対する治療効果

緑膿菌を NB に 37°C, 18 時間前培養し, この菌を NB に移植し, 37°C, 14 時間振とう培養を行ない, この培養菌を同培地で 10^4 倍希釈し, 4% Gastric mucin (Nutritional Biochemicals Corporation) と等量混合したものを使用し, 1 群 10 匹の ddYS 系雄マウス (体重 $16 \pm 1\text{g}$) に 40 LD₅₀ 腹腔内接種し, 感染 2 時間後に 1 回, 分割投与の場合は, 2 時間後と 4 時間後に 2 回各薬剤を皮下投与し, 7 日間生死の観察を行なって治療効果を判定した。

実験成績

1) Chequer board titration 法による相互作用

Chequer board titration 法による CBPC あるいは SBPC と PL-B の相互作用の有無を検討した結果を Fig. 1, 2 に示してある。いずれの組み合わせの場合も、図中央部の太線で囲んだ部分に菌の増殖抑制が見られ、明らかに両薬剤間に協力作用が認められた。

2) 増殖曲線による相互作用の検討

増殖曲線に及ぼす CBPC と PL-B および SBPC と PL-B の相互作用について検討した。薬剤を同時添加した場合の結果を Fig. 3, 4 に示してある。CBPC, SBPC および PL-B の 3 剤ともに単独ではほとんど殺菌作用を示さない条件下でも、CBPC と PL-B, SBPC と PL-B のいずれの組み合わせにおいても、各薬剤単独の作用よりも、これらの薬剤を併用したほうが強い殺菌作用を示した。

また薬剤の分割添加について検討した結果を Fig. 5~8 に示してある。CBPC と PL-B, SBPC と PL-B のいずれの組み合わせにおいても同時添加が最も強い殺菌作用

Fig. 1 Combination effect of CBPC and PL-B on *Ps. aeruginosa* No. 12

		CBPC									PL-B alone
		200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	
PL-B	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	0.39	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.09	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	.045	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	.022	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CBPC alone		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

μg/ml

Fig. 2 Combination effect of SBPC and PL-B on *Ps. aeruginosa* No. 12

		SBPC									PL-B alone
		200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	
PL-B	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	0.39	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.09	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	.045	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	.022	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
SBPC alone		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

μg/ml

を示し、次いで CBPC あるいは SBPC 添加一定時間後（1 時間あるいは 2 時間後）に PL-B を添加したものが良好であり、PL-B 添加後 CBPC あるいは SBPC を添加した場合は殺菌作用は認められなかった。以上の結果

Fig. 3 Combination effect of CBPC and PL-B on *Ps. aeruginosa* No. 12

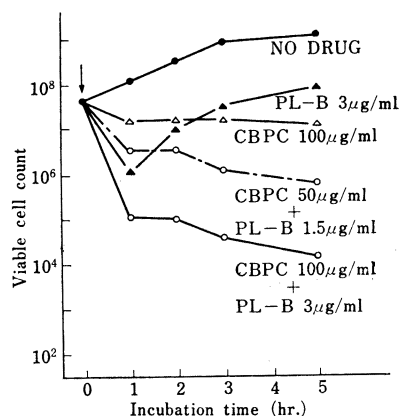


Fig. 4 Combination effect of SBPC and PL-B on *Ps. aeruginosa* No. 12

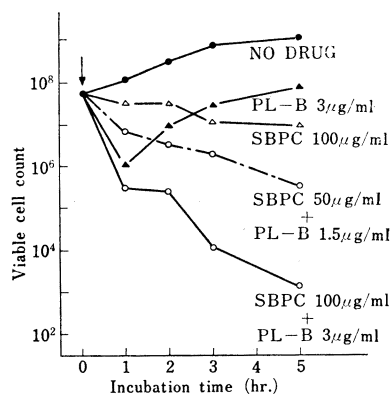


Fig. 5 Combination effect of CBPC and PL-B on *Ps. aeruginosa* No. 12

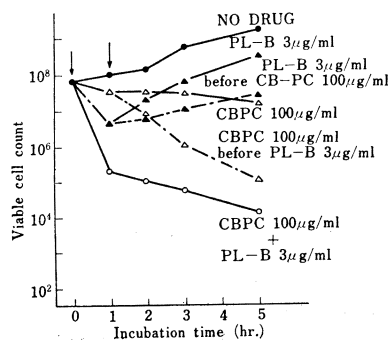


Fig.6 Combination effect of CBPC and PL-B on *Ps. aeruginosa* No.12

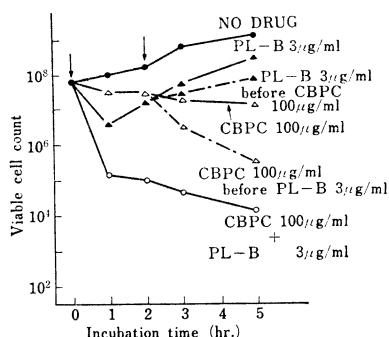


Fig.7 Combination effect of SBPC and PL-B on *Ps. aeruginosa* No.12

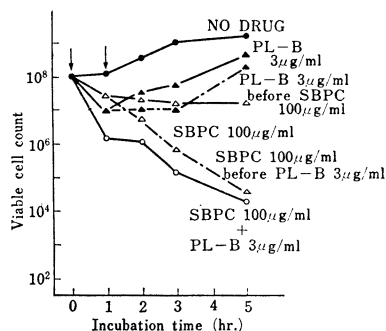
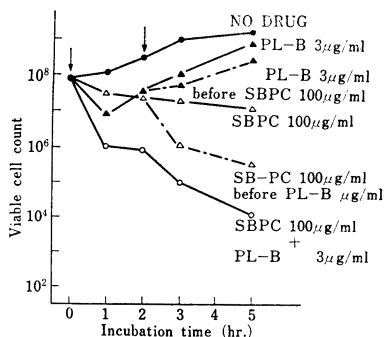


Fig.8 Combination effect of SBPC and PL-B on *Ps. aeruginosa* No.12



から、CBPC と PL-B あるいは SBPC と PL-B の併用において、先に Chequer board titration 法で認められた協力作用が生菌数測定においても認められた。またこれらの協力作用の現われ方は、同時添加が最も強い殺菌作用を示し、次いでペニシリン添加後 PL-B を添加したものが良好で、PL-B 添加後ペニシリンを添加した場合

Fig.9 Effect of PL-B on *Ps. aeruginosa* No.12 treated with SBPC

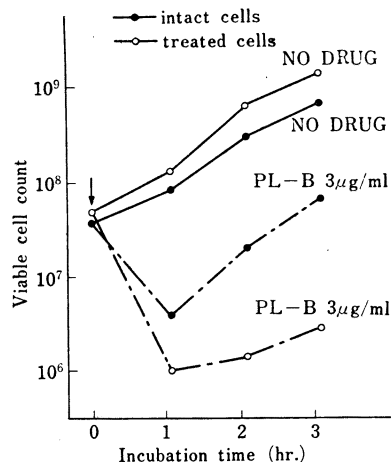
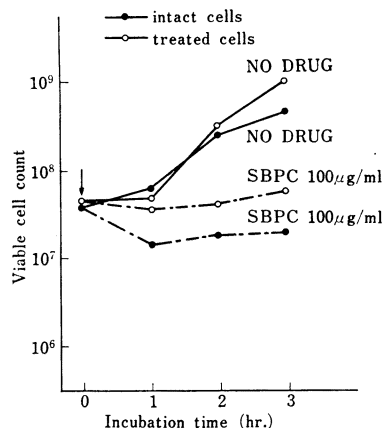


Fig.10 Effect of SBPC on *Ps. aeruginosa* No.12 treated with PL-B

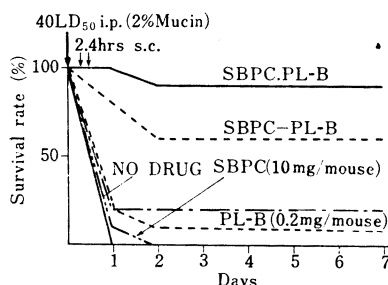


は、ほとんど協力作用は現われなかった。

3) Sulbenicillin あるいは Polymyxin-B 前処理菌に対する Polymyxin-B あるいは Sulbenicillin の作用
SBPC 前処理菌に対する PL-B および PL-B 前処理菌に対する SBPC 作用を生菌数測定で検討した結果を Fig.9, 10 に示してある。SBPC 前処理菌の場合、正常な菌に比べて、PL-B の作用を受けやすく容易に殺菌され、再増殖に要する時間も長くなっていた。なお今回使用した Penicillinase の菌の増殖への影響は認められなかった。また PL-B 前処理菌の場合は正常な菌に比べて SBPC の作用をわずかであるが受けにくい傾向が認められた。

4) マウス実験の緑膿菌感染症に対する治療効果
マウスを用いて行なった緑膿菌感染症に対する治療実験の結果を Fig.11 に示してある。無処置群は1日以内

Fig. 11 Protective effect with SBPC and PL-B for experimental *Ps. aeruginosa* No. 12 infection in mice



に全て死亡している。感染2時間後1回の皮下投与については、SBPC 10 mg/mouse では2日以内に全て死亡しており、PL-B 200 μ g/mouse では10%の治療効果が得られたにすぎない。これらの薬剤を併用した場合、マウス当り SBPC 10 mg と PL-B 200 μ g 投与群では90%の治療効果が得られた。また *in vitro* の殺菌作用で認められたように作用時期を変える、すなわち両薬剤をずらせて別々に投与した場合、その治療効果にどのような影響が現われるかについて検討したところ、マウス当り SBPC 10 mg 投与2時間後に PL-B 200 μ g を投与した群では60%の治療効果が得られたが PL-B 200 μ g 投与2時間後に SBPC 10 mg を投与した群では20%の治療効果しか得られなかった。以上の結果、緑膿菌を用いた感染治療実験においても、*in vitro* と同様 SBPC と PL-B 間に協力作用が認められた。また薬剤の投与方法についても、*in vitro* 同様 SBPC と PL-B 間の同時投与が最も優れた治療効果を示し、次いで SBPC を投与後 PL-B を投与する方法が良い結果を示したが、PL-B を投与後 SBPC を投与する方法はほとんど協力作用を示さなかった。

総括ならびに考察

抗緑膿菌性合成ペニシリン Carbenicillin, Sulbenicillin と緑膿菌に有効なポリペプチド抗生物質の相互作用を検討した結果、*in vitro* における Chequer board titration 法や増殖曲線に及ぼす影響および *in vivo* における感染治療実験から併用する条件によって協力作用の現われ方に差異があるという事実が解った。そして優れた協力作用を示す条件としては、これらの薬剤を同時に併用した時が最も良好であり、次いでペニシリンを先に Polymyxin-B を後に併用する組み合わせが良好であり、Polymyxin-B を先にペニシリンを後に併用する組み合わせではほとんど協力作用は認められなかった。

Carbenicillin と Polymyxin-B 間に協力作用があることはすでに報告されているが、今回の実験で明らかとなったように併用の条件により協力作用の現われ方に

差異が認められた。このような協力作用発現のメカニズムについて、検討の余地は充分にあるが、現在までのところでは、ペニシリンと Polymyxin-B を同時併用する方法およびペニシリンを先に Polymyxin-B を後に併用する方法では、ペニシリンにより菌体表層部分に存在する barrier に変化を生じ⁶⁾、Polymyxin-B の膜部分への到達が容易になって協力的な作用が生じているものと考えられ、逆に Polymyxin-B を先にペニシリンを後から併用する方法ではほとんど協力作用が現われないのは、Polymyxin-B には膜阻害の他に蛋白合成を抑制する作用も有しており⁷⁾、菌の増殖が抑制されるため、増殖期に最も良く作用するペニシリンの抗菌作用がなくなるためと考えている。そしてこれらの現象は先に私どもが検討を加えた抗緑膿菌性合成ペニシリンとアミノ配糖体抗生物質の相互作用における現象と良く一致していた⁶⁾。すなわち Sulbenicillin, Carbenicillin と Gentamicin, Dibekacin 間の併用において協力作用が認められ、それらの併用条件においても同時併用が最も良好であり、ペニシリンを先にアミノ配糖体抗生物質を後に併用する方法が次いで良好であるが、アミノ配糖体を先にペニシリンを後に併用した場合はほとんど協力作用は認められなかった。また感染治療実験においては、マウス体内での両薬剤濃度の影響が充分に考えられ、今後この面の検討や毒性についてさらに検討が必要であると考えている。

文 献

- 1) SMITH, C. B.; P. E. DANDS & J. M. WILFENT : Use of gentamicin in combinations with other antibiotics. *J. Infect. Dis.* 119 : 370~377, 1969
- 2) SONNE, M. & E. JAWETZ : Combined action of carbenicillin and gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. *Appl. Microbiol.* 17 : 893~896, 1969
- 3) ANDRIOLE, V. T. : Synergy of carbenicillin and gentamicin in experimental infection with *Pseudomonas*. *J. Infect. Dis.* 124 : 46~55, 1971
- 4) EICKHOFF, T. C. : *In vitro* effects of carbenicillin combined with gentamicin or polymyxin-B against *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.* 18 : 469~473, 1969
- 5) NAKAZAWA, S.; T. NISHINO, M. OTSUKI, M. NAKAO & T. NOMURA : Bacteriological studies on the combined action of aminoglycoside antibiotics and synthetic penicillins against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiotics* 27 : 989~991, 1974
- 6) HAMILTON-MILLER, J. M. T. : Damaging effects of ethylenediaminetetra-acetate and penicillins on permeability barriers in Gram-negative bacteria. *Biochem. J.* 100 : 675~682, 1966
- 7) KUSANO, T.; K. IZAKI & H. TAKAHASHI : De-

gradation of phospholipid in *Pseudomonas aeruginosa* induced by polymyxin-B. J. Antibio-

tics 28 : 689~695, 1975

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON THE COMBINED ACTION OF SYNTHETIC PENICILLINS AND POLYMYXIN-B AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

YOSHIKI OBANA, SOICHIRO SENO, KUNIHICO MATSUI
and SHOZO NAKAZAWA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The synergic actions of CBPC, SBPC and PL-B were observed on *Pseudomonas aeruginosa* No.12 by Chequer board titration method.

In either case of the combination of CBPC with PL-B, SBPC with PL-B, the simultaneous administration showed the highest bactericidal effect, followed by the case of addition of PL-B after adding CBPC or SBPC, while the reverse case showed the similar effect to that of each drug alone.

The therapeutic experiment of infection demonstrated that the combination of SBPC with PL-B showed superior effects to those of each drug alone. In comparison to this, the combination of SBPC with PL-B revealed more favorable effect by the simultaneous administration in 2 hours after infection.