

## Minocycline と Dibekacin あるいは Sulbenicillin との臨床分離 グラム陰性桿菌に対する *in vitro* 併用効果について

渡辺 彰・佐々木昌子・大泉耕太郎・今野 淳

東北大学抗酸菌病研究所内科

(昭和 54 年 12 月 22 日受付)

臨床分離グラム陰性桿 86 菌株に対する Minocycline と Dibekacin および Minocycline と Sulbenicillin の併用効果を寒天平板希釈法および増殖曲線で検討した。

寒天平板希釈法では *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* の 3 菌種で双方の組合せに明らかな相乗効果を認めた。このうち Minocycline と Sulbenicillin の併用では少数の株に拮抗作用を認めたが、全体として Minocycline の併用による Sulbenicillin の抗菌力の増強がみられた。*Serratia* では Minocycline と Dibekacin の併用で拮抗作用がみられ、Minocycline と Sulbenicillin の併用では強い相乗効果がみられた。*Pseudomonas aeruginosa* では Dibekacin あるいは Sulbenicillin を併用することにより Minocycline の抗菌力の増強がみられた。*Acinetobacter calcoaceticus* では Minocycline と Sulbenicillin の併用で相乗効果を認めた。

寒天平板希釈法で相乗効果がみられた菌株は増殖曲線においても相乗効果を示した。寒天平板希釈法で拮抗作用がみられた菌株は増殖曲線においては拮抗作用の発現は少なく、一部では逆に軽度の相乗効果を示した。

### はじめに

$\beta$ -ラクタム系薬剤とアミノ配糖体系薬剤との間に併用効果があることはよく知られており、近年グラム陰性桿菌を主な対象として広域合成ペニシリンあるいはセファロスポリンとアミノ配糖体系薬剤の併用の試みが報告されている<sup>1-4)</sup>。我々も佐々木等<sup>5-9)</sup>が、とくに緑膿菌と肺炎桿菌を主な対象として SBPC, CBPC, ABPC+MCIPC (1:1 合剤), CEZ と DKB, GM, AMK の間の *in vitro* 併用効果について報告し、さらに難治性呼吸器感染症に対する応用についても報告してきた。しかし  $\beta$ -ラクタム系薬剤とアミノ配糖体系薬剤以外についての併用効果に関しては報告も少なく未解決の分野といえる。

我々は、一連の併用効果の研究の一環として上記の薬剤以外についても併用効果を検討することとし、今回、Minocycline を選んで検討した。現時点における Minocycline の第 1 次選択薬としての適応は主にブドウ糖非醗酵グラム陰性桿菌が対象であり、大腸菌、肺炎桿菌、エンテロバクター等の腸内細菌科や緑膿菌に対してはむしろ第 2 次選択の適応と考えられている。今回の研究ではこれらの腸内細菌科の菌種や緑膿菌、さらに一部のブドウ糖非醗酵グラム陰性桿菌をも対象とした。Minocycline との併用薬剤としてアミノ配糖体系から Dibe-

kacin, またテトラサイクリン系薬剤とは従来拮抗作用を示すとされているペニシリン系から Sulbenicillin を選び、Minocycline との間の *in vitro* 併用効果について検討したので報告する。

### 材料と方法

#### 1) MIC (寒天平板希釈法) におよぼす影響

MIC の測定は日本化学療法学会標準法に基づいて、checker board dilution method により 100, 50, 25, …… , 0.78, 0.39, 0  $\mu$ k/ml (SBPC は 1,600  $\mu$ g/ml から) の範囲で Minocycline と Dibekacin および Minocycline と Sulbenicillin の全濃度段階を互いに組合せた系列を作成して寒天平板とし、これに接種した菌の発育を観察した。

MIC 測定の対象は東北大学抗酸菌病研究所附属病院および仙台厚生病院で分離された菌から主に喀痰由来の次の株を選んだ。

<i>Escherichia coli</i>	18 株
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28 株
<i>Enterobacter cloacae</i>	12 株
<i>Serratia marcescens</i>	3 株
<i>Serratia liquefaciens</i>	1 株
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15 株

Table 1 Combined action and antagonistic action of Minocycline with Dibekacin or Sulbenicillin against *Serratia marcescens* No. 3 and *Enterobacter cloacae* No. 3

*Serratia marcescens* No. 3

Minocycline+Dibekacin  
\* combined action index=6

100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	≡	≡	≡	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3.13	≡	≡	≡	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1.56	≡	≡	≡	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
0.78	≡	≡	≡	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
0.39	≡	≡	≡	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
0	≡	≡	≡	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	0	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100										
	DKB (μg/ml)																			

Minocycline+Sulbenicillin  
\* combined action index=17

100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
3.13	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
1.56	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
0.78	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
0.39	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
0	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	0	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1,600						
	SBPC (μg/ml)																			

*Enterobacter cloacae* No. 3

Minocycline+Dibekacin  
\* combined action index=8

100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3.13	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1.56	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
0.78	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
0.39	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
0	≡	≡	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	0	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100										
	DKB (μg/ml)																			

Minocycline+Sulbenicillin  
\* combined action index=4  
† antagonistic action index=6

100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.13	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
1.56	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
0.78	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
0.39	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
0	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	0	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1,600						
	SBPC (μg/ml)																			

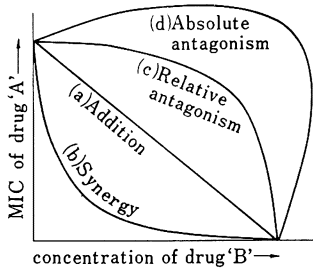
- Pseudomonas fluorescens* 2 株
- Pseudomonas mallei* 1 株
- Acinetobacter calcoaceticus* 6 株

これら 86 株を Trypticase Soy Broth (BBL) で 37 °C 20 時間培養し、その原液をマイクロプランターを用いて各濃度段階の各薬剤を組合せた Heart Infusion Agar (栄研) 上に接種した。マイクロプランターによる接種菌量は原液の約 0.005 ml、すなわち 10<sup>8</sup> CFU 前後となる。これを 37°C で 20 時間培養後にコロニーの発育の有熱

により感受性を判定した。

併用効果の判定には、1 株毎に併用効果指数<sup>10)</sup>(CAI; Combined action index, 薬剤単独での最小発育阻止濃度以下で両薬剤を組合せて発育を阻止する組合せの数, Table 1 参照)を求め、KLAESTERSKY<sup>11)</sup>の定義を応用して CAI 4 以上を相乗効果とし、CAI 3 以下は単なる相加作用とした。また拮抗的な作用については併用効果指数と同様に拮抗作用指数 (AAI; Antagonistic action index, 少なくとも一方の薬剤の最小発育阻止濃度およ

Fig. 1 Lines of equal effect (isobols) of two drugs in combination



びそれ以上の濃度で両薬剤を組合せて発育を許した組合せの数, Table 1 参照) を想定してこれを求め, 同様に判定の材料とした。

さらに菌種毎に全株における平均 ICM の変化を Isobologram に表わして, 菌種別の併用効果を判定した。

Isobologram の作成およびその意義については次のとおりである。LOEWE<sup>12)</sup> および LACEY<sup>13)</sup> らの方法に準じて, Fig. 1 に示すように A, B 2 種の薬剤があるとき A の平均 MIC (MIC を全株について幾何平均した値) を B の各濃度段階において求めてグラフする。グラフ上の各点は互いに同等の抗菌活性を示す, とみなされる。すなわち B 薬剤が種々の濃度で与えられた時, 菌の発育を阻止するのに要する A 薬剤の最小の濃度が各点であり, 互いに同等の抗菌力を有しているからである。このようにして得られたグラフが isobole (line of equal biological effect) であり, isobole が直線状になる時 (Fig. 1-(a)) A と B の併用は単に相加的な効果を示すに過ぎないが, isobole がグラフのゼロ点側に向って内側に曲線を描く時 (Fig. 1-(b)) は相乗的な効果を示しており, 曲線の勾配が強いほど相乗効果が強いことを示す。逆に isobole が外側に膨らむ時 (Fig. 1-(c)) は拮抗的な作用を示すことになり, 膨らみが大きい (Fig. 1-(d)) ほど拮抗作用が強いことを示す。

A 薬剤と B 薬剤の関係は相対的なものであり, A の各濃度における B の平均 MIC も得られるのでもう 1 つのグラフとして表現され, 同一の成績が 2 元的に表現されることになり, しかも併用に対する A, B 両薬剤の各々の寄与の程度の優劣を論ずることが可能になる。

## 2) 増殖曲線および殺菌効果におよぼす影響

この実験では 1) の寒天平板希釈法の実験に使用した菌株から, Minocycline と Dibekacin の併用については

<i>Escherichia coli</i>	No. 14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	No. 16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No. 13

*Acinetobacter calcoaceticus* No. 4

の計 4 株を選んで対象とし, Minocycline と Sulbenicillin の併用については

<i>Escherichia coli</i>	No. 18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	No. 7
<i>Enterobacter cloacae</i>	No. 8
<i>Serratia marcescens</i>	No. 2
<i>Serratia marcescens</i>	No. 3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No. 10

の計 6 株を選んで対象とした。

これらの菌株を Trypticase Soy Broth (BBL) で 37°C 20 時間培養し, この 1 白金耳量を Heart Infusion Broth (Difco) に接種して約 3 時間培養後の対数増殖期に各薬剤を添加した。薬剤濃度は原則として各薬剤の MIC 以下の任意の低濃度の単独投与とその同時併用およびコントロールを選び, さらに各薬剤の MIC 値についても検討した。また, 1) の寒天平板希釈法による MIC の測定実験で拮抗作用を示した範囲を任意に選んで検討した。

各薬剤を添加した後, 37°C にて培養を続け, 0, 1, 2, 4, 6, 24 時間の各点で生菌数を測定して増殖曲線におよぼす薬剤の併用効果を観察した。

## 成 績

### 1) MIC (寒天平板希釈法) におよぼす影響

MIC におよぼす併用効果の成績については, 併用効果指数と拮抗作用指数を Table 2 に示し, Isobologram を Fig. 2, Fig. 3 に示した。

#### ① *Escherichia coli*

Minocycline と Dibekacin の併用では 18 株中 16 株に CAI 4 以上という相乗効果を認め, 併用効果指数の平均は 7.44 であった。1 株で拮抗作用を認めているがその拮抗作用指数は 1 と小さい。Minocycline と Sulbenicillin の併用では 18 株中 8 株に相乗効果を認め, 5 株では相加作用にとどまった。同時に 7 株で拮抗作用を認めた。平均併用効果指数は 9.11 であり平均拮抗作用指数は 0.78 であった。

Isobologram を検討すると, Minocycline と Dibekacin の併用では isobole が内側に双曲線様の曲線を描いて強い相乗効果を示している。とくに Dibekacin の 0.39 μg/ml から 1.56 μg/ml の範囲の低濃度併用時の Minocycline の平均 MIC の低下が大きい (Fig. 2-a)。Minocycline と Sulbenicillin の併用でも良好な相乗効果を示すが, Sulbenicillin の 0.39 μg/ml から 1.56 μg/ml の低濃度併用時に Minocycline の平均 MIC が上昇する拮抗的な現象がみられた (Fig. 3-a)。

#### ② *Klebsiella pneumoniae*

Table 2 Combined action index (CAI) and Antagonistic action index (AAI) of combinations of Minocycline with Dibekacin or Sulbenicillin against gram-negative bacilli

<i>Escherichia coli</i>					<i>Klebsiella pneumoniae</i>					<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
No.	MINO+DKB		MINO+SBPC		No.	MINO+DKB		MINO+SBPC		No.	MINO+DKB		MINO+SBPC	
	CAI	AAI	CAI	AAI		CAI	AAI	CAI	AAI		CAI	AAI	CAI	AAI
1	4				1	10		21	1	1	5		8	2
2	6		2	5	2	8		9	2	2	3		9	
3	7				3	5		3		3	24		13	
4	12		55		4	4		12		4	6		13	
5	12		1	1	5	10		5	7	5	8		9	1
6	6		28		6	8		8		6	4		10	
7	8		1	1	7	13		2	11	7	14		13	1
8	6			1	8	11				8	4		8	
9	3		22		9			3		9	2	2	9	
10	7		7	2	10	2		1		10	10		43	
11	8		11		11	2		2	2	11	2		6	
12	14		14		12	4		16		12	11		12	
13	10				13			12		13	25		4	
14	12		1	1	14	3		8		14				
15	9		11		15	7		8		15	6		8	
16	4		5		16	12		2		Mean	8.27	0.13	11.0	0.27
17	1	1	3		17	4		3		<i>Pseudomonas sp.</i>				
18	5			3	18	8		5		(except <i>Ps. aeruginosa</i> )				
Mean	7.44	0.06	9.11	0.78	19	9		4	1	No.	MINO+DKB		MINO+SBPC	
					20	8		24		CAI	AAI	CAI	AAI	
					21	3		7		1	4		11	2
					22	4		7		2	8		6	
					23	6		6		3	31		3	
					24	4		12		Mean	14.3	0	6.67	0.33
					25	5		6	1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				
					26	3		6		No.	MINO+DKB		MINO+SBPC	
					27	4		22		CAI	AAI	CAI	AAI	
					28	4		13		1	1		14	2
					Mean	5.82	0	7.82	0.89	2	9		14	
										3	2	1	8	
										4	14		11	
										5	1		1	
										6				
										Mean	4.5	0.33	8.0	0.33
										<i>Serratia sp.</i>				
										No.	MINO+DKB		MINO+SBPC	
										CAI	AAI	CAI	AAI	
										1	9		19	
										2	2	1	16	
										3	6		17	
										4	3		18	
										Mean	5.0	0.25	17.5	0

Fig. 2 Isobolograms of activity of combination of Minocycline with Dibekacin against gram-negative bacilli

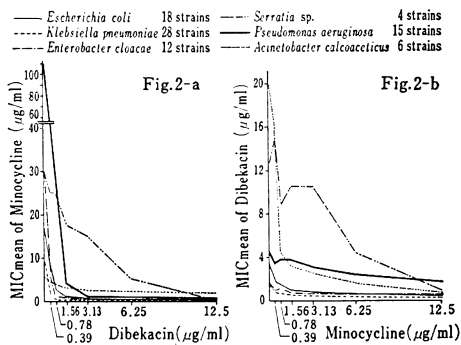
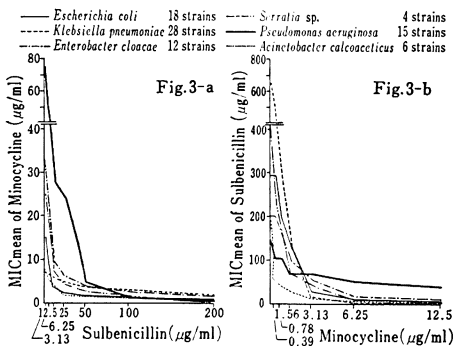


Fig. 3 Isobolograms of activity of combination of Minocycline with Sulbenicillin against gram-negative bacilli



Minocycline と Dibekacin の併用では 28 株中 22 株に相乗効果を認め、4 株は相加作用、2 株では変化はなく、拮抗作用を示す株はなかった。平均併用効果指数は 5.82 であった。Minocycline と Sulbenicillin の併用では 28 株中 19 株に相乗効果を認めたが、7 株は相加作用にとどまった。また 7 株に拮抗作用を認めている。平均併用効果指数は 7.82 であり、平均拮抗作用指数は 0.89 であった。

Isobologram では、Minocycline と Dibekacin の併用で強い相乗効果を認め、isobole は *Escherichia coli* の場合よりもさらに内側に位置し、とくに Dibekacin の 0.39 µg/ml から 0.78 µg/ml の低濃度併用時の Minocycline の平均 MIC の低下が大きい (Fig. 2-a)。Minocycline と Sulbenicillin の併用では、Sulbenicillin の 0.39 µg/ml から 1.56 µg/ml の低濃度併用時に拮抗的な現象がみられた (Fig. 3-a)。逆に Minocycline の 0.39 µg/ml から 3.13 µg/ml の低濃度併用時に Sulbenicillin

の平均 MIC の著明な低下がみられた (Fig. 3-b)。

### ③ *Enterobacter cloacae*

Minocycline と Dibekacin の併用では 12 株中 11 株に相乗効果を認め、残りの 1 株では CAI1 の相加作用と AAI19 の強い拮抗作用を同時に認めた。平均併用効果指数は 6.83、平均拮抗作用指数は 1.58 であった。Minocycline と Sulbenicillin の併用では 12 株中 10 株に相乗効果を認め、同時に 4 株に拮抗作用を認めた。平均併用効果指数は 10.17、平均拮抗作用指数は 1.0 であった。

Isobologram では、Minocycline と Dibekacin の併用で強い相乗効果を認め、とくに Dibekacin の 0.39 µg/ml から 0.78 µg/ml の低濃度併用時に Minocycline の平均 MIC が著明に低下し (Fig. 2-a)、*Escherichia coli* の場合よりも大きい低下を示した。逆に Minocycline を低濃度から併用していった時の Dibekacin の平均 MIC は余り低下せず、Minocycline の 0.39 µg/ml から 0.78 µg/ml の範囲で拮抗的な現象がみられた (Fig. 2-b)。Minocycline と Sulbenicillin の併用では良好な相乗効果を認めた (Fig. 3-a, b)。

### ④ *Serratia* 属

4 株についてだけの成績である。Minocycline と Dibekacin の併用では 4 株中 2 株に相乗効果を認め、1 株に拮抗作用を認めた。平均併用効果指数は 5.0 であった。Minocycline と Sulbenicillin の併用では 4 株とも著明な相乗効果を認め、拮抗作用を示した株はなかった。平均併用効果指数は 17.5 であり、各菌種の中では最もよい成績であった。

Isobologram では Minocycline と Dibekacin の併用で直線的ないしは一部に拮抗的な動きがみられた (Fig. 2-a, b)。Minocycline と Sulbenicillin の併用では著明な相乗効果がみられた (Fig. 3-a, b)。

### ⑤ *Pseudomonas aeruginosa*

Minocycline と Dibekacin の併用では 15 株中 11 株に相乗効果を認め、3 株で相加作用を認めた。1 株に拮抗作用を認めている。平均併用効果指数は 8.27 であった。Minocycline と Sulbenicillin の併用では 15 株中 14 株に相乗効果を認め、うち 3 株に同時に拮抗作用を認めた。平均併用効果指数は 11.0 であった。

Isobologram では、双方の併用でともに著明な相乗効果を認めたが、とくに Dibekacin の 0.39 µg/ml から 1.56 µg/ml の低濃度の併用 (Fig. 2-a) および Sulbenicillin の 0.39 µg/ml から 50 µg/ml の低濃度の併用 (Fig. 3-a) で Minocycline の平均 MIC の低下が大きい。逆に Minocycline を低濃度から併用していった場合は Dibekacin の平均 MIC の低下は少なく (Fig. 2-b)、

Sulbenicillin の場合も軽度の低下にとどまった (Fig. 3-b)。

⑥ 緑膿菌以外の *Pseudomonas* 属

3株だけであるが、双方の併用でも相乗効果を示している。

⑦ *Acinetobacter calcoaceticus*

6株だけであるが、CAI4以上の相乗効果を示したのは Minocycline と Dibekacin の併用では2株、Minocycline と Sulbenicillin の併用では4株であり、平均併用効果指数は各々4.5, 8.0であった。

Isobologram ではいずれの併用においても相乗効果を示しているが、とくに Minocycline の 0.39  $\mu\text{g/ml}$  から 1.56  $\mu\text{g/ml}$  の低濃度併用時の Dibekacin および Sulbenicillin の平均 MIC の低下が大きい (Fig. 2-b および Fig. 3-b)。

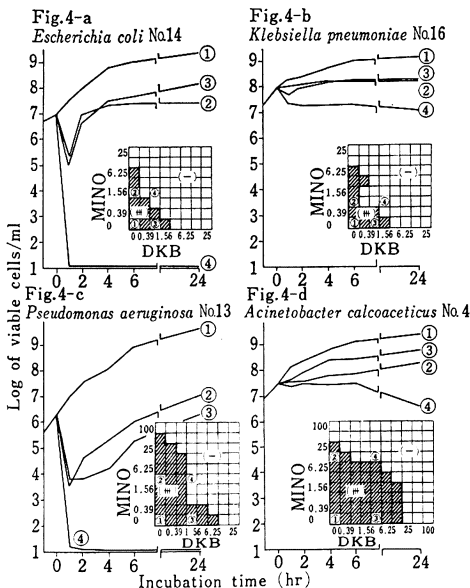
2) 増殖曲線および殺菌効果におよぼす影響

① Minocycline と Dibekacin の併用

Minocycline と Dibekacin の併用が増殖曲線に与える影響については Fig. 4 にその成績を示した。使用した菌株はいずれも寒天平板希釈法による MIC の測定で Minocycline と Dibekacin の著明な相乗効果を確認した株である。

Fig. 4-(a) に示すように *Escherichia coli* No. 14 で

Fig. 4 Killing curve of Minocycline combined with Dibekacin against gram-negative bacilli



は Minocycline 1/8 MIC と Dibekacin 1/4 MIC の各各単独投与 (Fig. 4-(a) の②, ③) では一時増殖が抑制されるものの、2時間後から再増殖がみられ、24時間後には各々  $4.1 \times 10^7/\text{ml}$ ,  $1.5 \times 10^8/\text{ml}$  となる。ところがこれらを同時に併用投与する (Fig. 4-(a) の④) と著明な殺菌効果を示し、1時間以降24時間まで生菌数は全て0であった。

Fig. 4-(b) の *Klebsiella pneumoniae* No. 16 では薬剤投与時に菌量がすでに  $10^8/\text{ml}$  まで達していたが、Minocycline 1/16 MIC と Dibekacin 1/4 MIC の併用 (Fig. 4-(b) の④) ではその各々の単独投与 (Fig. 4(b) の②, ③) よりも強い増殖抑制効果がみられた。

Fig. 4-(c) の *Pseudomonas aeruginosa* No. 13 は MIC が Minocycline 100  $\mu\text{g/ml}$ , Dibekacin 12.5  $\mu\text{g/ml}$  を示す感受性の近い菌であるが、Minocycline 3.13  $\mu\text{g/ml}$  (1/32 MIC) と Dibekacin 1.56  $\mu\text{g/ml}$  (1/8 MIC) の併用 (Fig. 4-(c) の④) で2時間以降の生菌数は0となった。この時各々の単独投与 (Fig. 4-(c) の②, ③) では  $10^8 \sim 10^7/\text{ml}$  台へ再増殖した。

Fig. 4-(d) の *Acinetobacter calcoaceticus* No. 4 も感受性の低い菌である。Minocycline 1/4 MIC と Dibekacin 1/8 MIC の併用 (Fig. 4-(d) の④) では24時間後生菌数が  $6.6 \times 10^6/\text{ml}$  まで抑制され、この時各々の単独投与 (Fig. 4-(d) の②, ③) は  $10^8/\text{ml}$  台へ再増殖している。グラフには示さなかったが各々の1MIC投与では  $10^8/\text{ml}$  台へ再増殖しており、これとほぼ同等の効果を示した。

② Minocycline と Sulbenicillin の併用

Minocycline と Sulbenicillin の併用が増殖曲線に与える影響については Fig. 5, Fig. 6 にその成績を示した。この併用実験では寒天平板希釈法による MIC の測定で Table 2 に示したように拮抗作用を示す株が多くみられたので拮抗作用を示した株 (*Escherichia coli* No. 18, *Klebsiella pneumoniae* No. 7, *Enterobacter cloacae* No. 8) と相乗効果を示した株 (*Serratia marcescens* No. 2, 同 No. 3, *Pseudomonas aeruginosa* No. 10) を選び、その各々の成績を Fig. 5 と Fig. 6 に示した。

Fig. 5-(a) の *Escherichia coli* No. 18 は Sulbenicillin の MIC が 6.25  $\mu\text{g/ml}$  という良い感受性を示すが、Sulbenicillin の濃度を 6.25  $\mu\text{g/ml}$  に固定しておいてこれに Minocycline 0.39  $\mu\text{g/ml}$  を加えるとわずかに菌の増殖が強くなるようになる (Fig. 5-(a) の③)。つまり拮抗的な動きを示している。Minocycline の濃度を 3.13  $\mu\text{g/ml}$  以上とすると拮抗的な作用はみられず順調な増殖抑制がみられるようになる (Fig. 5-(a) の④, ⑤, ⑥)。

Fig. 5 Killing curve of Minocycline combined with Sulbencillin against gram-negative bacilli

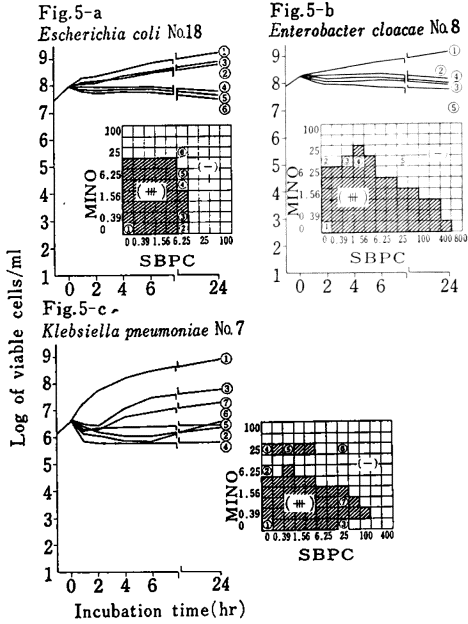


Fig. 6 Killing curve of Minocycline combined with Sulbencillin against gram-negative bacilli

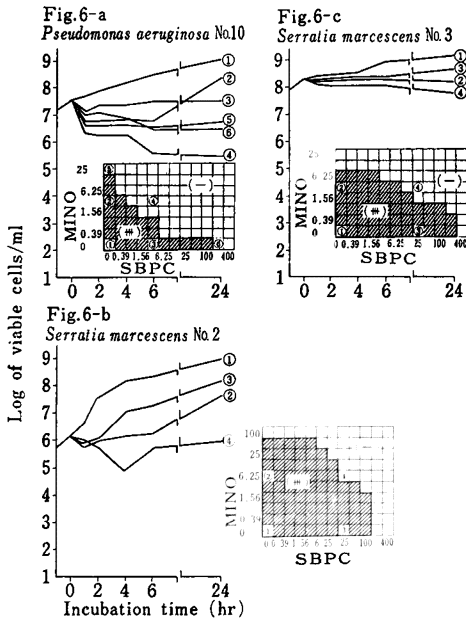


Fig. 5-(b) の *Enterobacter cloacae* No. 8 は寒天平板希釈法では Sulbencillin の低濃度で拮抗作用, 高濃度で相乗効果を示した。Minocycline を 1 MIC に固定して Sulbencillin を低濃度から加えていくと 0.78  $\mu$ g/

ml 投与 (Fig. 5-(b) の ③) と 1.56  $\mu$ g/ml 投与 (Fig. 5-(b) の ④) の間にだけ生菌数の逆転がみられるが, その差は小さい。

Fig. 5-(c) の *Klebsiella pneumoniae* No. 7 は寒天平板希釈法では「島」状の拮抗作用の分布がみられるなど Minocycline と Sulbencillin の各々の低濃度で互いに相手の抗菌力を低下させるような拮抗作用がみられたが, 増殖曲線では Minocycline を 25  $\mu$ g/ml に固定しておいて Sulbencillin を低濃度から加えていった時に 0  $\mu$ g/ml と 0.78  $\mu$ g/ml の間に生菌数の逆転がみられる (Fig. 5-(c) の ④, ⑤)。逆に Sulbencillin を 25  $\mu$ g/ml に固定しておいて Minocycline を低濃度から加えていった時には逆転現象はみられず, dose-response 的な増殖抑制効果を示した (Fig. 5-(c) の ③, ⑦, ⑧)。

Fig. 6-(a) の *Pseudomonas aeruginosa* No. 10 は寒天平板希釈法では著明な相乗効果がみられたが, 増殖曲線においても Minocycline 1/8 MIC と Sulbencillin 1/64 MIC の併用 (Fig. 6-(a) の ④) では各々の単独投与 (Fig. 6-(a) の ②, ③) はもちろん, 各々の 1 MIC 単独投与 (Fig. 6-(a) の ⑤, ⑥) よりも強い増殖抑制効果がみられた。

Fig. 6-(b) の *Serratia marcescens* No. 2 は MIC が Minocycline 100  $\mu$ g/ml, Sulbencillin 200  $\mu$ g/ml を示す感受性の低い菌であるが, Minocycline 6.25  $\mu$ g/ml (1/16 MIC) と Sulbencillin 25  $\mu$ g/ml (1/8 MIC) の併用 (Fig. 6-(b) の ④) では各々の単独投与 (Fig. 6-(b) の ②, ③) よりも強い増殖抑制がみられた。

Fig. 6-(c) の *Serratia marcescens* No. 3 では薬剤投与時に菌量がすでに  $10^8$ /ml を越えていたが, Minocycline 1/4 MIC と Sulbencillin 1/16 MIC の併用 (Fig. 6-(c) の ④) では各々の単独投与 (Fig. 6-(c) の ③, ②) よりも強い増殖抑制がみられた。

### 考 察

抗生物質の進展と起炎菌の変化は常に表裏一体の関係にあり, 1960年代前半まではグラム陽性菌が優位であったものが 1960年代後半からは *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* などのグラム陰性桿菌感染症が増加し, 1970年代に入るとグラム陰性桿菌の中でも強い  $\beta$ -lactamate を産生する *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Serratia* sp. による感染症が増加し, さらに最近では緑膿菌以外の *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. などのブドウ糖非酵性グラム陰性桿菌による感染症の増加がみられるようになった。これらの菌種は通常, 重篤な基礎疾患を有する患者に併発した感染症の起炎菌として分離されることが多く, 基礎疾患の性格と相まって感染による全身状態の

悪化を惹起し、ひいては死亡に至ることが多い。私共の成績<sup>14)</sup>でも、肺癌症例での死亡は肺癌自体の増悪もさることながら感染の増悪によるものがかかなり多いことが示されている。すなわち Stage III, IV を中心とする肺癌患者で感染を併発した場合、感染に対する化学療法が奏効しない時は感染症発症から3週間で約半数が死亡するが、化学療法が奏効した場合には次に癌化学療法、放射線照射等の導入が可能となるので50%生存期間は3ヵ月にまで延長する。もちろん感染非合併例ではさらに長期の生存を期待できる。

このような種々のグラム陰性桿菌による難治性感染症に対して、従来我々も併用の試みを基礎的、臨床的に検討してきた<sup>5-9)</sup>。すなわちその基本はアミノ配糖体系と広域合成ペニシリン系あるいはセファロスポリン系の組合せであり、肺炎桿菌や大腸菌、緑膿菌に対して著明な併用効果が得られることが知られた。しかしこれらの抗生物質以外における併用効果の検討は少なく、例えば Polymyxin B と Carbenicillin<sup>1)</sup>、Trimethoprim と Amikacin<sup>15)</sup> の報告などを散見するだけで、とくにテトラサイクリン系やマクロライド系に関する併用の報告は少ない。

従来の併用の試みは先に挙げたとおりアミノ配糖体系と広域合成ペニシリン系あるいはセファロスポリン系の組合せが主であり、現時点ではこれが併用療法の第1次選択である。しかし臨床的にはこれらの薬剤の一方あるいは双方が副作用その他の条件で投与できない場合も多い。これらの薬剤以外についての組合せ、あるいは従来の薬剤との組合せを検討して、併用療法における第2次選択の可能性を探る新たな試みが為されなければならない、と考える。

今回我々の実験した Minocycline は1967年、MARTELL および BOOTHE ら<sup>16)</sup>により Demethylchlortetracycline (DMCTC) から合成された最も新しいテトラサイクリン系抗生物質であり、当初は TC 耐性ブドウ球菌に対して *in vitro*, *in vivo*、さらに臨床例において優れた効果を示すことが知られていた。最近では多くのブドウ糖非醗酵グラム陰性桿菌に対する抗菌力が現用の抗生物質中では最も優れていることが知られ、現時点では本剤の第1次選択薬としての適応はこれらの菌による感染症であり、通常のグラム陰性桿菌感染症に対しては第2次選択薬としての適応にとどまっている。

今回我々は、併用療法における新たな展開として、Minocycline のグラム陰性桿菌感染症に対する併用療法に占める意義および役割を基礎的方面から検討した。成績は checker board dilution method を用いて併用効果指数と拮抗作用指数を求め、さらに Isobologram に表

わして検討した。なお併用効果の成績については ELION ら<sup>17)</sup>のように FIC index (fractional inhibitory concentrations index) および FBC index (fractional bactericidal concentrations index) を求める方法があるが、こういう方法では得られた成績を臨床における併用療法へ直接反映させることができず、学問的興味にとどまっている。臨床的な応用を意図した場合には Isobologram が優れていると思われる。

我々の臨床分離 *Escherichia coli* に対する Minocycline の平均 MIC は 16.4  $\mu\text{g/ml}$  であるが、Dibekacin 0.39  $\mu\text{g/ml}$  の併用で Minocycline の平均 MIC は 6.75  $\mu\text{g/ml}$  に、また 0.78  $\mu\text{g/ml}$  の併用で 2.58  $\mu\text{g/ml}$  にまで低下しており、臨床効果の増強が期待できると思われる。Sulbenicillin の 0.39  $\mu\text{g/ml}$  にか 1.56  $\mu\text{g/ml}$  の範囲の低濃度併用では Minocycline の平均 MIC が逆に上昇する拮抗的な動きがみられるが、12.5  $\mu\text{g/ml}$  以上の併用では Minocycline の平均 MIC が 4  $\mu\text{g/ml}$  以下となる。

*Escherichia coli* は現在 Sulbenicillin に対してかなり耐性を獲得しており、今回の実験でも平均 MIC は 294  $\mu\text{g/ml}$  であり臨床的に単独投与で効果を期待することは難しい。ところが Minocycline 1.56  $\mu\text{g/ml}$  の併用で Sulbenicillin の平均 MIC は 126  $\mu\text{g/ml}$  に、また 3.13  $\mu\text{g/ml}$  の併用では 29.3  $\mu\text{g/ml}$  とほぼ 1/10 にまで低下しており、併用による効果を期待できる。

*Klebsiella pneumoniae* においても同様の相乗効果が示されたが、とくに平均 MIC が 656  $\mu\text{g/ml}$  の Sulbenicillin が Minocycline の低濃度併用によりその平均 MIC の著明な低下を示した。すなわち Minocycline 1.56  $\mu\text{g/ml}$  の併用で Sulbenicillin の平均 MIC が 128.4  $\mu\text{g/ml}$ 、3.13  $\mu\text{g/ml}$  の併用で 15.3  $\mu\text{g/ml}$ 、6.25  $\mu\text{g/ml}$  の併用で 1.51  $\mu\text{g/ml}$  という著明な改善を示し、臨床的な効果を強く期待できる。

*Enterobacter cloacae* においても前2者と同様の相乗効果が得られた。

以上の3菌種については今回の組合せが臨床においても十分に有用性を期待できる、と考える。

*Serratia* の場合は4株だけの成績であるが、前記の3菌種とは異なり Minocycline と Dibekacin の併用では拮抗作用が、また Minocycline と Sulbenicillin の併用では逆に強い相乗効果がみられた。

我々<sup>18)</sup>は本菌が肺癌等の重篤な疾患において気管支肺胞系における opportunistic infection をひきおこし、しかも terminal infection として高い死亡率を有することを報告し、さらに Dibekacin, Gentamicin, Amikacin と Sulbenicillin, Carbenicillin との間に強い相乗効果



があることを基礎的<sup>7)</sup>、臨床的<sup>7,18)</sup>に報告してきた。今回の Minocycline と Sulbenicillin の併用についても十分な臨床効果が期待できると思われる。

*Pseudomonas aeruginosa* に対する Minocycline 単独の抗菌力は臨床的には余り期待できないレベルだが、Dibekacin あるいは Sulbenicillin を併用することによりその平均 MIC の著明な低下が得られた。だが逆に Minocycline を低濃度から併用していてもこれら 2 剤の MIC の低下はそれぞれ小さく、緑膿菌に対する併用における Minocycline の寄与する部分が小さいことを示している。本菌に対しては従来から報告されているようにアミノ配糖体系と Sulbenicillin, Carbenicillin の併用が優れているが、今回の組合せにもこれに次ぐ併用の効果を期待できると思われる。

*Pseudomonas fluorescens* や *Pseudomonas mallei* は被験株数が少数であるが、やはり相乗効果を示しており今後株数を増やして検討してみる価値がある。

*Acinetobacter calcoaceticus* の場合は Minocycline 単独でも十分な抗菌力が期待できるが、とくに Sulbenicillin の 25 µg/ml 以上を併用した場合に Minocycline の平均 MIC が 1/4 以下に低下しており、さらに強い抗菌力が得られると思われる。

増殖曲線におよぼす影響を検討した結果では、Minocycline と Dibekacin の併用では寒天平板希釈法による MIC の実験でみられた相乗効果が増殖曲線でも再現された。しかも併用によって強い殺菌効果が得られており、併用の有用性が示唆された。

Minocycline と Sulbenicillin の併用では、寒天平板希釈法において互いに相手の抗菌力を低下させる現象が *Serratia* を除く腸内細菌科の菌種の一部においてみられた。しかし増殖曲線には寒天平板希釈法の成績はそのままには再現されず、拮抗的な動きは少なくなっている。

寒天平板希釈法と増殖曲線の成績の解離は EICKHOFF<sup>1)</sup> が Carbenicillin と Gentamicin あるいは Polymyxin B との間にもみられたことを報告しており、また諸家の併用に関する報告も主に寒天平板希釈法に基くもの、主に増殖曲線に基くもの、と種々であるが、若干の解離は常に見られるようである。これに対し WEINSTEIN<sup>ら</sup><sup>19)</sup>がこれら間で良く相関した成績を報告している。

したがって菌量と薬剤濃度の関係などに考慮を加えて一定の相関した成績が得られるような、より標準的な実験方法が必要であろう。

今回の実験では、併用における抗菌作用の機序については全く触れなかったが、今後の検討課題としたい。併

用における抗菌作用の機序に関してはほとんどが未解明といってよく、わずかに ST 合剤の場合などで解明されているだけである。

従来、殺菌性抗生物質と静菌性抗生物質との併用に対しては否定的な意見が多いが、元来殺菌的作用と静菌的作用の間には明確な区分があるわけではなく、事実今回検討した Minocycline は静菌的作用と共にかなり殺菌的作用を有する、という報告<sup>20)</sup>がある。今回の実験でも Minocycline と Dibekacin の間には殺菌効果の増強がみられ、Minocycline と Sulbenicillin の間にも一部に拮抗作用がみられたものの、全体としては良好な抗菌力の増強がみられた。再考すべき問題であると考えられる。

以上、併用療法における新たな展開として Minocycline と Dibekacin あるいは Sulbenicillin との併用効果を検討した。併用療法におけるいわば第 2 次選択として、本剤とアミノ配糖体系あるいは広域合成ペニシリン系の併用が有用性を期待できることが示唆された。また菌種によって今回の組合せが併用療法の第 1 次選択として十分に期待できる、と考えられる。すなわち腸内細菌科のうち *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* では Minocycline と Dibekacin の併用が優れ、Minocycline と Sulbenicillin の併用もこれに劣らなかつた。*Serratia* では Minocycline と Sulbenicillin の併用が優れていた。

今後、臨床例における経験を集積かつ分析してその有用性を検討すべきであろう。

(本論文の要旨は第 27 回日本化学療法学会総会で発表した。)

## 文 献

- 1) EICKHOFF, T. C.: *In vitro* effects of carbenicillin combined with gentamicin or polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology* 18: 469~473, 1969
- 2) 中沢昭三, 大槻雅子, 西野武志, 中尾雅文: 緑膿菌に対する合成ペニシリンとアミノ配糖体抗生物質との併用に関する細菌学的研究。 *Chemotherapy* 23: 3201~3209, 1975
- 3) 富岡 一, 小林芳夫: グラム陰性菌に対する Sulbenicillin と Dibekacin の併用効果に関する研究。 *Jap. J. Antibiotics* 29: 597~600, 1976
- 4) 増田剛太, 富岡 一: *Klebsiella* 感染症の化学療法に関する基礎的研究。Cephalosporin 系抗生物質と Gentamicin との併用について。 *Chemotherapy* 24: 451~455, 1976
- 5) 佐々木昌子, 今野 淳: 新鮮患者分離菌に対する Sulbenicillin, Cefazolin と Aminoglycoside の併用効果について。 *日本臨牀* 34: 20~26, 1976
- 6) 佐々木昌子, 今野 淳: 臨床分離グラム陰性桿菌 (緑膿菌, 肺炎桿菌) に対する ABPC+MCIPC と

- DKB の併用効果について。Chemotherapy 26 : 15~20, 1978
- 7) 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 渡辺 彰, 青沼清一, 今野 淳: Carbenicillin と Aminoglycoside 併用における基礎的, 臨床的研究。Chemotherapy 投稿中
  - 8) 佐々木昌子, 渡辺彰, 今野 淳: Betalactam 系抗生物質と Aminoglycoside の併用効果——難治性呼吸器感染症における Sulfobenzyl-PC(SBPC) と 3',4'-Dideoxykanamycin B (DKB) の使用経験。第 25 回日本化学療法学会総会抄録集: 91, 1977
  - 9) 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 今野 淳:  $\beta$ -lactam 系抗生物質と Aminoglycoside の併用——SBPC と DKB のマウスに対する影響。第 26 回日本化学療法学会総会抄録集: 174, 1978
  - 10) NAGATOMO, H.; M. KAKIZAKI & K. TUCHIYA: Combined action of sulbenicillin and gentamicin. Jap. J. Antibiotics 27: 199~205, 1974
  - 11) KLASTERSKY, J.: Prediction and significance of synergy between antibiotics used for treatment of gram negative sepsis. 第 27 回日本化学療法学会総会特別講演抄録集, 1979
  - 12) LOEWE, S.: The problem of synergism and antagonism of combined drugs. Arzneimittel-Forschung 3: 285~290, 1953
  - 13) LACEY, B.W.: Mechanismus of chemotherapeutic synergy. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 8: 247~288, 1958
  - 14) 今野 淳, 本宮雅吉, 大泉耕太郎, 中井祐之, 小犬丸貞裕, 鈴木修治: 肺癌に合併する呼吸器感染症の意義。「肺癌」投稿中
  - 15) PARSLEY, T. L.; R. B. PROVONCHEE, C. GLICKSMAN & S. H. ZINNER: Synergistic activity of trimethoprim and amikacin against gram-negative bacilli. Antimicrob. Agents & Chemother. 12: 349~352, 1977
  - 16) MARTELL, M. J. & J. H. BOOTHE: The 6-deoxytetracyclines. VII. Alkylated aminotetracyclines possessing unique antibacterial activity. J. Med. Chem. 10: 44~46, 1967
  - 17) ELINO, G. B.; S. SINGER & G. H. HITCHINGS: Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. J. Biol. Chem. 208: 477~488, 1954
  - 18) 青沼清一, 渡辺 彰, 佐々木昌子, 富樫秀生, 大泉耕太郎, 今野 淳: 菌交代症としてのセラチアによる呼吸器感染症の誘因と予後について。第19回日本胸部疾患学会抄録集: R-35, 1979
  - 19) WEINSTEIN, R. J.; L. S. YOUNG & W. L. HEWITT: Comparison of methods for assessing *in vitro* antibiotic synergism against *Pseudomonas* and *Serratia*. J. Lab. Clin. Med. 86: 853~862, 1975
  - 20) 中沢昭三, 小野尚子, 西野武志, 川辺晴英, 西田克次, 藤田吉彦, 山田勝人, 和島 剛: 新しいテトラサイクリン誘導体 Minocycline に関する細菌学的研究。Jap. J. Antibiotics 22: 411~416, 1969

*In Vitro* Combined Action of Minocycline with Dibekacin  
or with Sulbenicillin against Clinical  
Isolates of Gram-negative Bacilli

AKIRA WATANABE, MASAKO SASAKI, KOTARO OIZUMI  
and KIYOSHI KONNO

The Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University

*In vitro* combined action of Minocycline with Dibekacin or with Sulbenicillin against 86 clinical isolates of Gram-negative bacilli was examined by checkerboard technique and by analysis of the effects on the growth curves.

The combinations of Minocycline with Dibekacin and Minocycline with Sulbenicillin, showed an apparent synergistic antimicrobial action against patient strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae*.

Generally, an increase in antimicrobial activity of Sulbenicillin was observed when it was combined with Minocycline, although on rare occasion a slightly antagonistic effect was seen in small number of strains tested.

The combination of Minocycline with Dibekacin was shown to be antagonistic against patient strains of *Serratia* species, while the combination of Minocycline with Sulbenicillin showed a marked synergistic activity against these strains.

Anti-*pseudomonas* activity of Minocycline became intensified when it was combined with either of the two agents, Dibekacin or Sulbenicillin.

The combination of Minocycline and Sulbenicillin revealed to be synergistic against patients strains of *Acinetobacter calcoaceticus* among glucose-nonfermentative gram-negative bacilli.

As a rule, in the strains, against which the combination was shown to be synergistic by checkerboard technique, the synergistic effect was similarly observed on the growth in liquid medium.

In contrast, in the strains in which an antagonistic action was demonstrated by the checkerboard technique, an antagonistic effect on the growth curves was rarely shown, and even a slightly synergistic action was observed in a portion of the strains.