

Serratia marcescens, *Pseudomonas aeruginosa* に対する Cefoperazone (T-1551) と他剤との併用効果

才川 勇・保田 隆・田井 賢

高畑正裕・前 三千子

富山化学工業株式会社総合研究所

Cefoperazone (CPZ, T-1551) とアミノグリコシッド系抗生剤, マクロライド系抗生剤および tetracycline との併用効果を臨床分離の *Serratia marcescens* および *Pseudomonas aeruginosa* を用いる *in vitro* および *in vivo* 試験で検討した。その結果, CPZ は *in vitro* 抗菌力においてアミノグリコシッド系抗生剤 (gentamicin, amikacin, tobramycin, dibekacin) と強い協力作用を示したが, マクロライド系抗生剤 (kitasamycin, lincomycin, erythromycin) および tetracycline では併用効果は弱かった。また, CPZ とアミノグリコシッド系抗生剤の協力作用は殺菌作用を伴っていた。さらにマウス実験的感染症に対する治療効果においても, CPZ はアミノグリコシッド系抗生剤と相乗効果を示した。

Cefoperazone (CPZ, T-1551) (Fig. 1) は, 才川ら¹⁾により開発された新規な注射用半合成セファロsporin 系抗生剤である。CPZ は, cefazolin より広い抗菌スペクトルを有し, 特に *Proteus* のインドール陽性群, *Serratia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* などのグラム陰性菌に対して強い抗菌力を示す²⁾。

一方, β -ラクタム系抗生剤と, 主としてアミノグリコシッド系抗生剤との併用療法は, 種々の重症感染または混合感染の症例に応用され, それらの併用による有効性を裏づける多くの報告がされている³⁻⁶⁾。

今回著者らは, CPZ とアミノグリコシッド系抗生剤, マクロライド系抗生剤および tetracycline との併用効果を, 臨床から分離された *Serratia marcescens* および *P. aeruginosa* を用い, *in vitro* および *in vivo* において検討したので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1) 使用薬剤

CPZ は, 当社総合研究所で合成された凍結乾燥品 (923 μ g 力価/mg) を用いた。Gentamicin sulfate (GM: 塩野義製薬), amikacin sulfate (AMK: 万有製薬), tobr-

amycin (TOB: 塩野義製薬), dibekacin sulfate (DKB: 明治製薬), tetracycline hydrochloride (TC: 富山化学), kitasamycin tartrate (LM: 東洋醸造), lincomycin hydrochloride (LCM: 日本アップジョン), erythromycin lactobionate (EM: 大日本製薬) の注射用市販品を用いた。

2) 使用培地

Tryptic-soy broth (TSB: 栄研), heart infusion broth (HIB: 栄研), heart infusion agar (HIA: 栄研) を用いた。

3) 使用菌株

臨床分離の *S. marcescens* および *P. aeruginosa* を用いた。

4) 抗菌力測定法

HIA を用いた寒天平板希釈法によって測定した。TSB 中で 37°C, 1 夜培養し, 生理食塩液で 100 倍希釈した菌液の 1 白金耳を薬剤の倍数希釈濃度を含む HIA 平板に接種し, 37°C, 18 時間培養後, 菌の増殖の有無により抗菌力を判定した。ただし, *P. aeruginosa* の場合は, 前培養時に 0.2% KNO₃ を添加した。

CPZ と各薬剤の併用は, 200~0.5 μ g/ml の CPZ の希釈系列に各薬剤の希釈系列を混合して両薬剤の種々の組合せを HIA 平板中で調製する chequer board 法によった。併用効果の有無および程度は combined action index⁷⁾ で示した。Combined action index は, 各薬剤単独では無効であるが併用によって菌の増殖が阻止された組合せをカウントして表示し, 0 の場合は併用効果なしと

Fig. 1 Chemical structure of CPZ

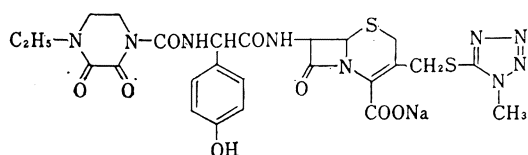


Fig. 2 Combined action of CPZ and GM against clinical isolates of *S. marcescens*

		W-58									W-71									W-31								
		GM ($\mu\text{g/ml}$)									GM ($\mu\text{g/ml}$)									GM ($\mu\text{g/ml}$)								
		200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	0	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	0.05	0
CPZ($\mu\text{g/ml}$)	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 3 Combined action of CPZ and GM against clinical isolates of *P. aeruginosa*

		S - 101									S - 107									S - 19								
		GM (μg/ml)									GM (μg/ml)									GM (μg/ml)								
		200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	0.05	0
CPZ(μg/ml)	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

し、数が大きくなるほど併用効果は大である。

5) 殺菌作用

TSB で37℃, 1夜培養した菌液を HIB に接種し, 37℃ で振盪培養して生菌数が約 10^6 cells/ml になった時点で薬剤を添加した。その後再び37℃ で振盪培養しながら経時的に生菌数を測定した。

6) マウス実験的感染症に対する治療効果

試験菌を HIA 上で37℃, 1夜培養後, 5% gastric mucin (半井化学) に懸濁し, 1群15匹の SLC/ICR 系雄性マウス (19 ± 1 g) に腹腔内接種した。薬剤は, 菌株接種後1時間に1回または1時間および2時間の2回分割で背部皮下投与した。7日間, マウスの生死を観察し, 生存率から ED_{50} および信頼限界を LITCHFIELD-WILCO-

XON 法⁸⁾ により算出した。併用効果を定量的に求めるために KAWAKAMI⁹⁾ の方法に従い, 相乗比 (synergistic ratio) を次式により求めた。

$$\text{相乗比} = \frac{D_a}{D_d} \quad 1)$$

$$\frac{1}{D_a} = \frac{R_1}{D_1} + \frac{R_2}{D_2} \quad 2)$$

$$R_1 = \frac{C_1}{C_1 + C_2} \quad 3)$$

$$R_2 = \frac{C_2}{C_1 + C_2} \quad 4)$$

D_a : 併用効果が相加的であるとして計算して求めた ED_{50}

D_d : 併用時の ED_{50} の実験値

Table 1 Distribution of combined action index of CPZ with various antibiotics against clinical isolates of *S. marcescens* (25 strains)

Combined with	Combined action index*																				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
GM			1	1	2		4	2	1	2	2		4	4	1			1			
AMK			1	1	1	2	1	2	1	3		1	2	1	2	3		2	1		1
TOB				2	1	3	2	4	2	1	1	2				1	2				
DKB			2		2	1	4	2	2	3		2	2	1	2	2			1	1	
TC	5	4	6	2	1	4	1	1					1								
LCM	24	1																			
LM	21	3	1																		
EM	7	10	3	1	1	2			1												

* The combined action index was calculated by the number of plates which showed no visible growth of the test organisms on HIA contained the sub-effective concentration of antibiotics at several ratio.

Table 2 Distribution of combined action index of CPZ with various antibiotics against clinical isolates of *P. aeruginosa* (25 strains)

Combined with	Combined action index																			
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
GM			2	4	1	2	4	3	3	2	4									
AMK		1	3	4	4	3			3	1	2	1	1		1			1		
TOB			3	7	4	4	1	2	1	2				1						
DKB		3	2	2	2	3	6					4		1		1				1
TC	7	3	4	1	7	2						1								
LCM	22		2					1												
LM	23	1	1																	
EM	2	4	6	3	4	3		2			1									

D₁, D₂: 薬剤単独の ED₅₀

C₁, C₂: 併用時の 2 薬剤の比率

併用効果は、相乗比が 1 の時相加作用、1 以上であれば相乗作用、1 以下であれば拮抗作用である。

II. 実験結果および考察

1) 抗菌力における併用効果

S. marcescens, *P. aeruginosa* のそれぞれ 25 株を用い、chequer board 法により CPZ とアミノグリコシッド系抗生剤、マクロライド系抗生剤および TC との併用効果を検討した。

Fig. 2 に感受性の異なる *S. marcescens* 3 株を、Fig. 3 に *P. aeruginosa* 3 株に対する CPZ と GM の併用効果を示した。いずれの菌株に対しても協力作用が認められ、combined action index は、*S. marcescens* の場合 W-58, W-71 で 13, W-31 では 12 であり、*P. aeruginosa* の場合 S-101 で 9, S-107 で 8, S-19 で 7 であった。

Table 1 に CPZ と GM, AMK, TOB, DKB, LCM, LM,

EM および TC の *S. marcescens* 25 株に対する combined action index の分布を示した。すべての菌株において CPZ は 4 種のアミノグリコシッド系抗生剤との間にはほぼ同程度の強い協力作用を示した。

また、CPZ およびアミノグリコシッド系抗生剤に対する感受性の違いによって協力作用の大きさが異なることはなかった。

一方、LCM, LM においては併用効果はほとんどみられなかった。また TC では 20 株、EM では 18 株に協力作用が認められたが、その効果はアミノグリコシッド系抗生剤と比べて弱かった。Table 2 に *P. aeruginosa* 25 株に対する combined action index の結果を示した。すべての株において CPZ は 4 種のアミノグリコシッド系抗生剤との間に協力作用を示したが、その効果は *S. marcescens* の場合よりやや弱かった。また薬剤感受性と協力作用の大きさには相関関係が認められなかった。アミノグリコシッド系抗生剤以外の薬剤については、*S. marcescens* と

Fig. 4 Bactericidal effect of CPZ and GM singly and in combination against *S. marcescens* W-31

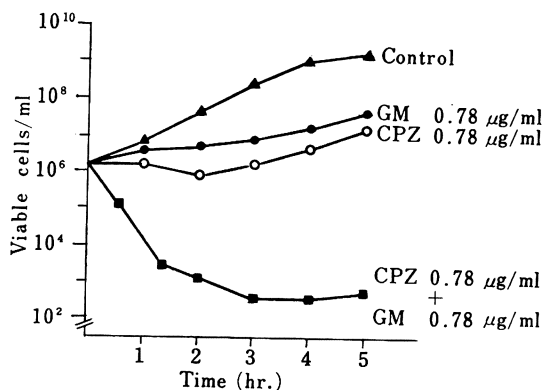


Fig. 5 Bactericidal effect of CPZ and GM singly and in combination against *P. aeruginosa* S-19

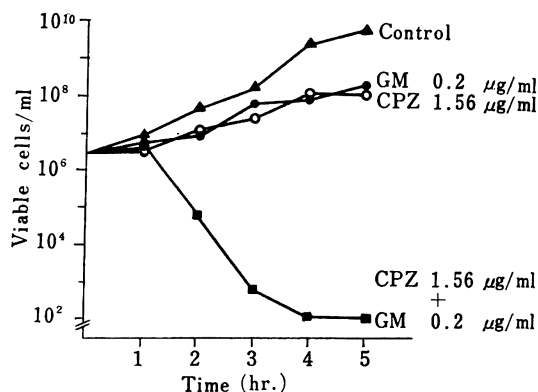


Table 3 Protective effect of CPZ, GM, AMK and combinations on *S. marcescens* W-31 infected mice

Group	Antibiotics	Combination ratio	Determined ED ₅₀ (Dd) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)
1	CPZ (6.25*)	—	1.80	1.20 — 2.68
2	GM (1.56)	—	0.088	0.077—0.10
3	AMK (12.5)	—	0.14	0.12 — 0.16
4	CPZ+GM	10 : 1	0.24	0.20 — 0.28
5	CPZ+AMK	10 : 1	0.44	0.38 — 0.55

Challenge dose: 8.0×10^6 cells/mouse (40LD₅₀)

Therapy : sc injection at 1hr after infection

* MIC (µg/ml)

Table 4 Protective effect of CPZ, GM and combination on *S. marcescens* W-71 infected mice

Group	Antibiotics	Combination ratio	Determined ED ₅₀ (Dd) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)
1	CPZ (200*)	—	>25	—
2	GM (12.5)	—	0.11	0.10—0.12
3	CPZ+GM	10 : 1	0.54	0.42—0.69

Challenge dose: 2.8×10^7 cells/mouse (50LD₅₀)

Therapy : sc injection at 1hr after infection

* MIC (µg/ml)

同様に TC および EM で弱い協力作用が認められた。

β-lactam 系抗生剤とアミノグリコシッド系抗生剤の協力作用機作として、β-lactam 系抗生剤によるアミノグリコシッド系抗生剤の細胞膜透過性の増大が考えられているが¹⁰⁾、CPZ においても同様であると考えられる。

2) 殺菌力における併用効果

CPZ とアミノグリコシッド系抗生剤との併用効果が殺菌力を伴ったものであるか否かを確かめるため、抗菌力において併用効果の認められた *S. marcescens* W-31 およ

び *P. aeruginosa* S-19 を用い、CPZ と GM の単独および併用時の殺菌力を検討し、その結果を Fig. 4, 5 に示した。すなわち両菌株において、CPZ, GM それぞれ単独で静菌的に作用する濃度を両剤併用することにより、殺菌的に作用した。*S. marcescens* W-31 では併用時には速やかに殺菌的に作用したのに対し、*P. aeruginosa* S-19 では 1 時間後から殺菌作用を示しており、この違いは両菌株における薬剤の細胞膜透過性の差に起因していると思われる。

Table 5 Protective effect of CPZ, GM and combination on *P. aeruginosa* S-19 infected mice

Group	Antibiotics	Combination ratio	Determined ED ₅₀ (Dd) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)
1	CPZ (6.25*)	—	0.72	0.61—0.85
2	GM (0.39)	—	0.046	0.040—0.052
3	CPZ+GM	10 : 1	0.12	0.09—0.13

Challenge dose: 1.9×10^6 cells/mouse (20LD₅₀)

Therapy : sc injection at 1 and 2 hr after infection

* MIC (μ g/ml)

Table 6 Synergistic ratio of therapeutic effect of combined antibiotics

Strain	Combination	Hypothetical ED ₅₀ (Da)* (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)	Synergistic ratio (Da/Dd)	Confidence limit (P=0.05)
<i>S. marcescens</i> W-31	CPZ+GM (10 : 1)	0.65	0.51—0.83	2.7	2.0—3.6
	CPZ+AMK (10 : 1)	0.87	0.64—1.10	2.0	1.5—2.6
<i>S. marcescens</i> W-71	CPZ+GM (10 : 1)	>1.16	—	>2.1	—
<i>P. aeruginosa</i> S-19	CPZ+GM (10 : 1)	0.3	0.26—0.35	2.5	2.0—3.1

* Hypothetical ED₅₀ in which additive effect of combined antibiotics assumed

3) マウス実験的感染症に対する併用効果

In vitro 抗菌力において認められた CPZ とアミノグリコシッド系抗生剤との併用効果を *in vivo* において確かめるため、*S. marcescens*, *P. aeruginosa* を用い、実験的マウス感染症に対する CPZ と GM または AMK の併用効果について検討した。Table 3, 4, 5 に *S. marcescens* W-31, *S. marcescens* W-71 および *P. aeruginosa* S-19 に対する CPZ, GM, AMK 単独および CPZ と GM または AMK を 10 : 1 で併用した時の治療効果を、また Table 6 に KAWAKAMI ら⁹⁾ の方法によって算出した相乗比を示した。

CPZ, GM, AMK とともに比較的感受性の高い *S. marcescens* W-31 の場合、CPZ+GM および CPZ+AMK の相乗比はそれぞれ 2.7, 2.0 であり相乗的であると考えられる。CPZ に対して感受性の低い *S. marcescens* W-71 では、CPZ 単独で無効であったが併用することにより GM の投与量を減少させる事ができ、相乗比も 2 以上であった。*P. aeruginosa* S-19 においても、CPZ と GM を併用することにより相乗比は 2.5 となり、相乗的に作用した。

以上のように、CPZ は *in vivo* においてもアミノグリコシッド系抗生剤と協力作用を示した。

文 献

- 1) 才川 勇, 高野俊太郎, 桃井海秀, 高倉 勇, 工谷千株, 落合裕一, 吉田長作, 保田 隆, 滝 秀雄: β -ラクタム系抗生物質の薬学的研究(第8報) 7-[D(-)- α -(4-alkyl-2, 3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)phenylacetamido] cephalosporanic acid 類の合成ならびに構造-抗菌活性。薬学雑誌 99(9): 929~935, 1979
- 2) MITSUHASHI, S.; N. MATSUBARA, S. MINAMI, T. MURAOKA, T. YASUDA & I. SAIKAWA: Antibacterial activity of a new semisynthetic cephalosporin, T-1551. 18th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents & Chemoth. Abstract, No. 153, Atlanta, 1978
- 3) SONNE, M. & E. JAWETZ: Combined action of carbenicillin and gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. Appl. Microbiol. 17: 893~896, 1969
- 4) 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
- 5) BOURQUE, M.; R. QUINTILANI & R. C. TILTON: Synergism of Cefazolin-Gentamicin against *Enterococci*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 10: 157~163, 1976

- 6) POGWIZD, S. M. & S. A. LERNER : *In vitro* activity of gentamicin, amikacin and netilmicin alone and in combination with carbenicillin against *Serratia marcescens*. Antimicrob. Agents & Chemoth. 10 : 878~884, 1976
- 7) NAGATOMO, H.; M. KAKIZAKI & K. TSUCHIYA : Combined action of sulbenicillin and gentamicin. J. Antibiotics 27 : 199~205, 1974
- 8) LITCHFIELD, J. T., JR. & F. WILCOXON : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. & Exp. Ther. 96:99~113, 1949
- 9) KAWAKAMI, M.; Y. NAGAI, S. SHIMIZU & S. MITSUHASHI : Antimicrobial effect of combinations of colistin methanesulfonate and chloramphenicol. I. *In vitro* effect. J. Antibiotics 24 : 884~891, 1971
- 10) ZIMMERMANN, R. A. ; R. C. MOELLERING, JR. & A. N. WEINBERG : Mechanism of resistance to antibiotic synergism in *Enterococci*. J. Bacteriol. 105 : 837~879, 1971

COMBINED ACTION OF CEFOPERAZONE (T-1551) AND VARIOUS
ANTIBIOTICS AGAINST *SERRATIA MARCESCENS*
AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

ISAMU SAIKAWA, TAKASHI YASUDA, MASARU TAI,
MASAHIRO TAKAHATA and MICHIKO MAE

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

The *in vitro* and *in vivo* synergistic activities of cefoperazone (CPZ, T-1551) and aminoglycosides, macrolides, or tetracycline against, clinical isolates of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* were studied.

The combinations of CPZ and aminoglycosides (gentamicin, amikacin, tobramycin, dibekacin) showed markedly synergistic activity in both *in vitro* antibacterial activity against *S. marcescens* and *P. aeruginosa* and protective effects on experimental infection in mice. And the combined actions were bactericidal.

On the other hand, *in vitro* combinations of CPZ and macrolides (kitasamycin, lincomycin, erythromycin) or tetracycline showed rather weak synergism.