

Cefotiam 高度耐性菌に対する Rifampicin 併用の効果

渡辺 繁徳・岩永 正明
長崎大学熱帯医学研究所病原細菌学部門

(昭和 55 年 6 月 23 日受付)

臨床材料から分離され Cefotiam (CTM) に高度耐性を示す *Enterobacter cloacae* と *Serratia marcescens* をそれぞれ 1 株および同薬剤に感受性の *Enterobacter cloacae* 1 株を用いて、耐性菌株に対する Gentamicin (GM) と CTM および Rifampicin (RFP) と CTM との併用効果を比較して、次のような結果を得た。

固型培地上での checker board 法によって比較し、RFP との併用のほうが GM との併用と比較して明らかに有効であった。またブイオン中での殺菌効果として比較しても同様に RFP との併用の場合が優れていた。

耐性菌株はブイオン中で多量の β -lactamase を産生するが、低濃度の薬剤存在下における β -lactamase 産生能をみると、CTM の場合は誘導現象がみられ産生量が増加していたが、GM 存在下では全く不変、RFP ではかなりの抑制が認められた。

以上の結果から、RFP の併用効果は β -lactamase の抑制が一因をなすものと考えた。

はじめに

従来 β -lactam 系薬剤に対して高度の耐性を示す菌種のうち *Enterobacter cloacae* および *Serratia marcescens* は臨床材料からの分離頻度も高く、しばしば opportunistic pathogen として問題となることがある。最近次々に開発された新しい Cephalosporin 系薬剤のなかにはこれらの菌に対してかなりの抗菌力を示すものもみられるが、やはり多くの株が高度の耐性を示している¹⁻³⁾。これらの菌による感染症に対処するため薬剤の併用による効果を期待する検討結果が報告されている⁴⁻⁶⁾。著者は新しく開発された Cephalosporin 系薬剤 Cefotiam に高度の耐性を示す *Enterobacter cloacae* と *Serratia marcescens* に対して、同剤に他薬剤の併用を試み Rifampicin の併用が有効であることを見出した。従来 β -lactam 系薬剤には aminoglycoside 系薬剤の併用がよく試みられて、いちおうの効果は認められている⁵⁻⁷⁾。そこでその代表としての Gentamicin の併用効果と比較しながら、Rifampicin の併用効果の本態解明を試みた。

材料と方法

供試菌株：臨床材料から分離した *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) 77 株および *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) 69 株を用いた。そのうち併用効果の検索には *E. cloacae* 1 (No. 1 株)、*E. cloacae* 391 (No. 391 株) および *S. marcescens* 240 (No. 240 株) の 3 株を使用した。

使用薬剤：Cefotiam (CTM)、Gentamicin (GM) および Rifampicin (RFP) の 3 剤を用いた。

薬剤感受性試験：日本化学療法学会の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法に従って行なった⁸⁾。

CTM 力価の測定：*Bacillus subtilis* ATCC 6633 を指示菌とし、その芽胞を 4×10^8 /ml の割合に混釈した Heart Infusion Agar (HIA) (栄研) を用いた薄層カップ法で測定した。

寒天平板上における併用効果：2 薬剤を同時に混釈した checkerboard 法の成績に基づき、Fractional Inhibitory Concentration index (FIC index) を求めて検討した^{4, 10)}。

併用による殺菌効果：それぞれ 1/2 MIC または 1 MIC 濃度の GM あるいは RFP を加えた Heart Infusion Broth (HIB) (栄研) に HIB 1 夜培養の被験菌液 (10^8 /ml) を 100 分の 1 量加えて 37°C に保ち、2 時間後さらに 1/10 MIC 濃度に CTM を加え培養を続けた。

β -lactamase の定量¹¹⁾：1) 培養、HIB 800 ml にほぼ 5×10^7 /ml の濃度に被検株を接種し 37°C、8 時間培養した。薬剤の濃度は CTM は 1/32 MIC、GM および RFP は 1/8、1/4、1/2 MIC とした。2) β -lactamase 粗酵素液の作成、上記培養のそれぞれを 8,000 g、30 分遠心し、沈査を 200 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に浮遊させ、再度の遠心沈殿菌体を同緩衝液 20 ml に浮遊させた。そのうち 5 ml は純水で洗滌した後凍結乾燥し乾燥菌量測定に使用した。残る 15 ml は

-20°C で凍結後 X-press で4回破砕し、その8000 g, 30分遠心上清をさらに95,000 g, 1時間超遠心した。その上清を0.45 μ のミリポアフィルターで濾過したものを粗酵素液として活性の測定に用いた。3) 酵素活性の測定、各検体につき Cefazolin (CEZ) および CTM を基質として、その濃度を0.1 μM/ml とし CEZ は吸収波長270 nm, CTM は257 nm の紫外線吸収法により測定した。

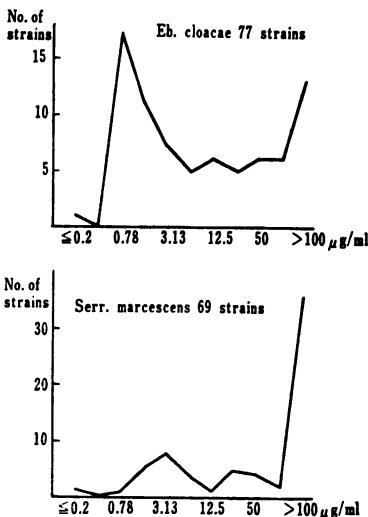
結 果

分離株の MIC : 臨床材料から分離した *E. cloacae* 77 株および *S. marcescens* 69 株に対する CTM の MIC は Fig. 1 に示した。*E. cloacae* の場合かなりの株に対して良好な抗菌力を示しているものの、約20%の株は MIC 100 μg/ml またはそれ以上の耐性を示していた。一方、*S. marcescens* では良好な感受性を示すものは約10%で多くの株は耐性であった。

固型培地上での併用効果: 上記の耐性株のうちから MIC が1,600~3,200 μg/ml の高度耐性株を選び、薬剤の併用効果を試験した。GM を併用した場合は Table 1 に示すように *E. cloacae* 391 (No. 391 株) に対してわずかに協力作用を認めたが、*S. marcescens* 240 (No. 240 株) に対しては明確な協力作用は認められず、むしろ CTM を高濃度に混合すると GM の抗菌力が低下する現象がみられた。一方、RFP を併用した場合は Table 2 にみられるように、いずれの株に対しても両薬剤の併用効果が著明であった。

これらの効果を FIC index が最小値を示す混合比で

Fig. 1 Sensitivity distribution of *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* to CTM



みると、No. 391 株に対する CTM と GM の併用では 0.625, CTM と RFP の併用では 0.5 であり、No. 240 株に対しては CTM と GM の併用で 0.531, CTM と RFP の併用では 0.313 であった。

ついで見方を変えて一方の薬剤を 1/2 MIC 濃度に加えた時に対応する薬剤の MIC がどれほど小さくなるかという点で検討してみた。No. 391 株の場合、CTM の 1/2 MIC 存在下で GM の MIC は 1/2 (0.39→0.2 μg/ml), GM の 1/2 MIC 存在下で CTM の MIC は 1/8 (1,600→200 μg/ml) となり、その和は $5/8=0.625$ となった。以下これを FIC index (1/2) と仮称する。CTM と RFP の併用では CTM の 1/2 MIC 存在下で RFP の MIC は 1/32 (25→0.78 μg/ml), RFP の 1/2 MIC 存在下で CTM の MIC は 1/16 (1,600→100 μg/ml) となり FIC index (1/2) = $3/32=0.094$ となった。No. 240 株の場合、FIC index (1/2) は GM との併用で 2 以上、RFP との併用の場合 0.07 となった。

液体培地中での薬剤併用による殺菌効果: GM または RFP の 1 MIC 濃度に被検株を接種し 2 時間作用させた後 1/10 MIC 濃度の CTM を添加した場合、Fig. 2 に示したように No. 391 株では RFP 作用後に CTM を加えると速やかに殺菌効果が現れたが、GM 含有培地では CTM 添加後も菌は増殖を続けた。No. 240 株で

Fig. 2 Bactericidal effects of CTM, GM, RFP and their combination against *Enterobacter cloacae*-391

Numbers attached to drugs in the figure mean concentration of drug in MIC/ml and arrow means the following drugs were added to 2 hours cultures with former drug. This is also effective to the other figure excepting Fig. 6

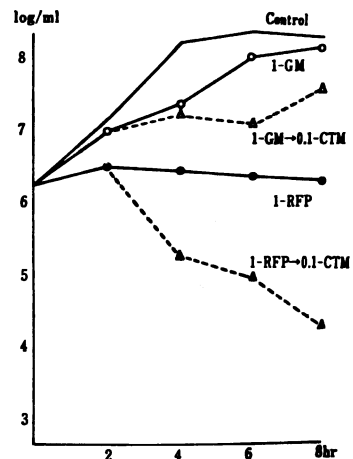


Table 1 Sensitivities of 2 strains in checkerboard method with combination of GM and CTM
Enterobacter cloacae-391

CTM	GM									
	0	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13
0	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6.25	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
12.5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
25	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
50	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
100	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
200	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
400	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
800	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1,600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Serratia marcescens-240

CTM	GM									
	0	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
100	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
200	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fig.3. Bactericidal effects of CTM, GM, RFP and their combination against *Serratia marcescens*-240

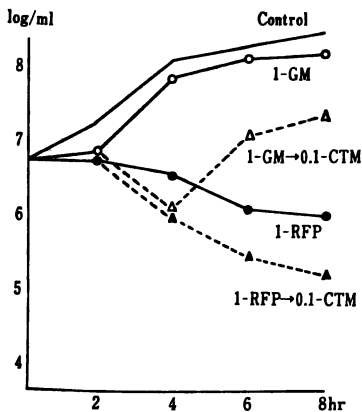


Fig.4 Bactericidal effects of CTM, GM, RFP and their combination against *Enterobacter cloacae*-391

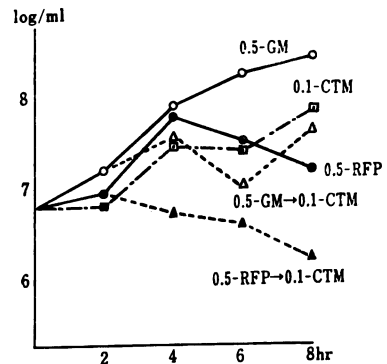


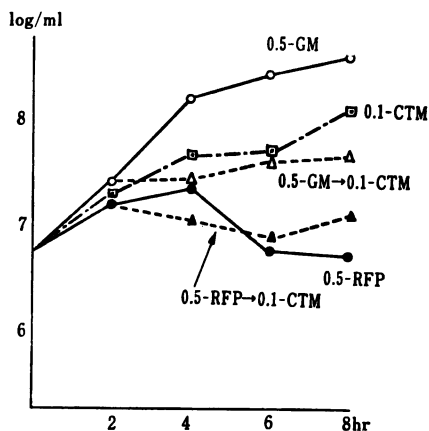
Table 2 Sensitivities of 2 strains in checkerboard method with combination of RFP and CTM
Enterobacter cloacae-391

CTM	RFP									
	0	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50
0	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
6.25	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12.5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
25	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
50	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
100	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
200	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
400	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
800	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1,600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Serratia marcescens-240

GMT	RFP									
	0	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50
0	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
0.25	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12.5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
25	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
50	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
100	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
200	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
400	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
800	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1,600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 5 Bactericidal effects of CTM, GM, RFP and their combination against *Serratia marcescens*-240



も Fig. 3 のようにはほぼ同様の結果であった。RFPおよび GM の濃度を 1/2 MIC に下げると、No. 391 株の場合 Fig. 4 のように CTM 添加後の殺菌効果の増強は RFP との併用で明らかに認められたが、GM との併用では Fig. 2 と同様にその効果は認められなかった。また No. 240 株では Fig. 5 に示したように GM の効果はなく、RFP でもその効果が不明瞭であった。

以上の薬剤併用試験に用いた 2 株 とは別の 1 株 *E. cloacae* 1 (No. 1 株) は寒天平板上での CTM に対する MIC は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であったが、Fig. 6 上段に示したように CTM 100 $\mu\text{g/ml}$ 含有 HIB 中では比較的用いた No. 391 株とはやや異なるものの明らかな増殖が認められた。経時的にこの培養液遠心清液中に残存する CTM 濃度を測定した結果、Fig. 6 下段のように 2 時間までの間に No. 391 株より強い CTM 不活化が認められた。Fig. 7 で明らかのように、この株を GM および RFP の 1/2 MIC 濃度含有 HIB で 2 時間培養後に 4 MIC 濃度

Fig. 6 Growth curve of 2 strains of *Enterobacter cloacae* in HIB with 100 µg/ml of CTM and residual activities of CTM in the same culture a: and b: Strains-391 and -1 respectively, c: no bacteria.

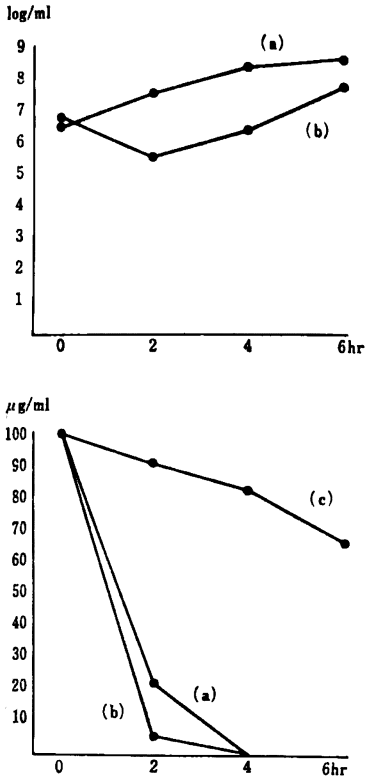
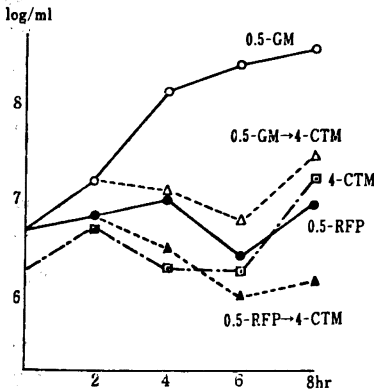


Fig. 7 Bactericidal effects of CTM, GM, RFP and their combination against *Enterobacter cloacae*-1



の CTM を作用させるとその併用効果はやはり GM に比べ RFP のほうが優れていた。

β-lactamase 活性の比較: Table 3 にその成績を示したが, No.1 株を HIB で 8 時間培養した後の β-lactamase 活性は基質を CEZ または CTM としたときそれ

Table 3 Beta-lactamase activities of the three strains after 8 hours culture in HIB with or without antibiotics

<i>Enterobacter cloacae</i> 1		
Antibiotics in HIB	Substrates	
	CEZ	CTM
—	0.018	0.001
CTM 100	2.822	3.806
<i>Enterobacter cloacae</i> 391		
—	0.596	0.068
CTM(1/32)	1.786	0.426
—	1.511	0.346
GM(1/2)	1.081	0.400
—	0.727	0.080
RFP(1/2)	0.151	0.002
<i>Serratia marcescens</i> 240		
—	0.220	0.069
CTM(1/32)	1.283	0.427
GM(1/2)	0.611	0.167
RFP(1/2)	0.167	0.067

The values indicate the degradation of substrate in micro moles/minute/mg dry weight organism.

ぞれ 0.018, 0.001 micromoles/min/mg dry weight であった。しかしこの株を CTM 100 µg/ml 含有 HIB に 8 時間培養後の活性値はそれぞれ 2.822, 3.806 micromoles/min/mg dry weight と多量の β-lactamase が誘導されていた。No. 391 株および No. 240 株の場合は薬剤非添加でもかなりの β-lactamase 産生がみられ, CTM の共存で更に増加した。一方 1/2 MIC 濃度の GM を加えて培養すると非添加の場合と比較して, No. 391 株ではほとんど同じ, No. 240 株では増加がみられたが, RFP の 1/2 MIC 濃度を含む培地中で増殖させた場合では両株とも β-lactamase の活性は低下していた。

考 案

最近次々と開発されている cephalosporin 系薬剤には従来の同系薬剤に高度の耐性を示す菌に対してかなり優れた抗菌力を示すものもある。しかし *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus rettgeri* などのなかにはなお高度耐性株が高頻度にみられている¹⁻³⁾。これらの耐性菌に対処するため薬剤の併用による治療が種種試みられてきたが, その多くは cephalosporin 系薬剤と aminoglycoside 系薬剤の併用に関するものであり⁵⁻⁸⁾, その他の薬剤を併用した報告は比較的少ない。

Table 4 Example for discussion of FIC index (1)

Conc. of drug B	Conc. of drug A(MIC)					
	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1
1/32	+	+	+	+	+	-
1/16	+	+	+	+	-	-
1/8	+	+	+	+	-	-
1/4	+	+	+	+	-	-
1/2	+	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-

Conc. of drug B	Conc. of drug A(MIC)					
	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1
1/32	+	+	+	+	+	-
1/16	+	+	+	+	-	-
1/8	+	+	+	+	-	-
1/4	+	+	+	+	-	-
1/2	+	+	+	+	-	-
1	-	-	-	-	-	-

Table 5 Example for discussion of FIC index (2)

Conc. of drug D	Conc. of drug C(MIC)					
	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1
1/32	+	+	+	+	+	-
1/16	+	+	+	+	-	-
1/8	+	+	-	-	-	-
1/4	+	+	-	-	-	-
1/2	+	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-

Conc. of drug D	Conc. of drug C(MIC)					
	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1
1/32	+	+	+	+	+	-
1/16	+	+	+	+	-	-
1/8	+	+	+	+	-	-
1/4	+	+	+	+	-	-
1/2	+	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-

本研究で RFP の併用を試みた理由のうち主なものとしては以下があげられる。1) RFP は結核菌に対する効果のほかにも諸種グラム陽性菌に対して極めて優れた抗菌力を有し、さらにグラム陰性桿菌に対してもブドウ糖発酵、非発酵の別を問わず一定した抗菌力を示す。2) RFP は体内停滞時間が長く、1~2回の内服でその併用効果を期待することができると考えられる。3) RFP の作用は DNA dependent RNA polymerase のブロックといわれており、その結果として蛋白合成阻害がおこるわけであり、殺菌あるいは静菌効果を示す以下の濃度でも各種蛋白(とくに菌体の発育、増殖に直接の関わりはないと思われる β -lactamase など)の産生を抑制するものと思われ、推定される。4) RFP は副作用が少ない。

ここでは GM との併用効果を比較検討したが、寒天平板における checkerboard 法による MIC の変動、ブイオン中における生菌数の変動ともに RFP の併用の場合が優れていた。checkerboard 法で CTM の濃度が高くなると却って GM の効果が減退した場合があったが、HIA の pH が 7.15 であったのに対して CTM 400, 800, 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 含有 HIA の pH はそれぞれ 6.89, 6.75, 6.35 であったことから培地の pH 低下がその主因と考えている。

checkerboard 法による 2 種薬剤の併用効果を数値的に評価する方法として FIC index が用いられているが、これにも PAULA らの方法¹⁰⁾の他に、高橋らの方法⁹⁾がある。しかしいずれの方法によっても一方だけでは併用効果を完全には評価できない。例えば Table 4 のような場合を仮定すると、PAULA 法では FIC index は I の場合 $1/16+1/16=0.125$ 、II では $1/2+1/16=0.563$ となるのに対して、高橋法では I、II ともに 0.563 となる。すなわち表からは明らかに II が優れているといえこれは PAULA 法ではその点を表現できたのに対し、高橋法では評価できないこととなる。しかし Table 5 のような場合では PAULA 法では III、IV ともに FIC index = 0.125 となるのに対し、高橋法では III の場合 $1/8+1/8=0.25$ 、IV では 0.563 となり明らかな差が高橋法では表現されているのに対し PAULA 法では表現できていないこととなる。このようにこれら両法ではいずれか一方だけではその表現に不完全さを伴う。そこでこの不完全さを補うためとさらに実用面も考え合わせ著者は FIC index について独自の見解を得た。すなわち薬剤の併用効果を checkerboard 法を用いて検討する場合、FIC index の表現方法として上記 2 法の他に各薬剤の 1/2 MIC 存在下での併用薬剤の MIC の低下率(単独使用時の MIC

との比), この両者の和をもって表現することも必要であると考えらる。

β -lactam 系薬剤との併用による効果発現の機序としては, まず β -lactam 系薬剤が細胞壁に多少なりとも障害を与え他併用薬剤の細胞内への浸透を高めるであろうこと, および他併用薬剤によって β -lactamase の産生が抑制されて β -lactam 系薬剤の効果を増強させるであろうとの考えがあげられる。このうち細胞内への浸透度によってその抗菌力が影響される macrolide 系薬剤は検討されるべきであろう。本研究では β -lactamase の産生抑制によって耐性を弱め得るとの観点から RFP および GM が β -lactamase 産生に及ぼす影響を検討したわけであるが, $1/2$ MIC 濃度の薬剤存在下と比較すると *in vitro* の併用効果と一致して RFP では β -lactamase の産生抑制がみられたが, GM の場合産生抑制はみられなかった。RFP のような類 macrolide 系薬剤では β -lactamase の産生を抑制することにより併用の β -lactam 系薬剤の効果を高め, その結果, 細胞内への浸透が促進されさらに RFP としての作用が増強されるといった相乗効果を期待できると思われ, 今後の研究が期待される。

文 献

- 1) 小栗豊子, 村瀬光春, 小酒井 望: 臨床材料からの *Enterobacter-Serratia* 群の多剤耐性。Jap. J. Antibiotics 28: 137~142, 1975
- 2) 那須 勝, 猿渡勝彦, 中富昌夫, 森 信興, 斎藤厚, 原 耕平: 最近の臨床材料から分離された *Serratia marcescens* の化学療法剤感受性。

- Chemotherapy 25: 397~404, 1977
- 3) 五島雅智子, 辻 明良, 高橋邦子, 金子康子: *Serratia marcescens* の薬剤感受性—1975 年尿分離株と 1973 年分離保存株の比較。Chemotherapy 27(6): 848~855, 1979
- 4) 高橋公毅, 小林章男: 蘇膜菌, クレブシエラ, セラチアに対する抗生剤の併用効果。Chemotherapy 27(6): 848~855, 1979
- 5) 横田好子, 村川武雄, 西田 実: Cefazolin と Gentamicin の併用に関する基礎的評価。Chemotherapy 27(4): 696~703, 1979
- 6) 長谷川弥人, 富岡 一, 外山圭助, 他: グラム陰性桿菌敗血症の抗生剤療法に関する研究。Chemotherapy 23: 970~975, 1975
- 7) 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 系抗生剤単独と Gentamicin の併用について。Chemotherapy 24: 451~454, 1976
- 8) KLASTERSKY, J.; F. MENNIER CARPENTIER, J. M. PREVOST & M. STAQUET: Synergism between amikacin and cefazolin against *Klebsiella*. *In vitro* studies and effect on the bactericidal activity of serum. J. Infect. Dis. 134(3): 271~276, 1976
- 9) MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 22: 1126~1128, 1974
- 10) PAULA, F. DOUGHERY; DAVID W. YOTTER & THOMAS R. MATTHEWS: Microdilution transfer plate technique for determining *in vitro* synergy of antimicrobial agents. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11(2): 225~228, 1977
- 11) 横田 健: β -ラクタマーゼ測定法とその酵素活性と耐性。モダンメディカ 24: 360~377, 1978

COMPARATIVE STUDIES ON THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF CEFOTIAM COMBINED WITH RIFAMPICIN OR GENTAMICIN

SHIGENORI WATANABE and MASAOKI IWANAGA

Department of Bacteriology, Institute for Tropical Medicine,
Nagasaki University, Nagasaki, Japan

Rifampicin (RFP) or gentamicin (GM) was added to cefotiam (CTM), and antibacterial effects of combined use were examined on *Enterobacter cloacae* strain No. 391 and *Serratia marcescens* strain No. 240 which were highly resistant to CTM. The combination of CTM and RFP was more effective than that of CTM and GM in the viewpoints of fractional inhibitory concentration and bactericidal effects in broth. Both strains produced beta-lactamase in significant amount, and it additionally increased under the presence of CTM. The production of beta-lactamase was markedly inhibited by low concentration of RFP in the broth, while not inhibited at all by GM.