

抗生物質の併用に関する研究 (V)

肺炎桿菌に対するセフェム剤とアミノグリコシド剤との *in vitro* 併用効果に関する
実験的考察——電顕観察も加えて——

青沼清一・有路文雄・大沼菊夫・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 56 年 11 月 24 日受付)

Klebsiella pneumoniae PCI 602 に対するセフェム剤 (CEPs) とアミノグリコシド剤 (AGs) の併用における殺菌効果を検討した。Cephalothin (CET) と Amikacin (AMK), Cefazolin (CEZ) と Dibekacin (DKB), Cefmetazole (CMZ) と DKB のいずれの場合も、それぞれ単独の作用よりも併用で作用させた方が著明な殺菌作用の増強がみられた。

CEZ と DKB については、それぞれ単独および併用時の *K. pneumoniae* PCI 602 の形態変化を電子顕微鏡により観察した。その結果は併用時の強い殺菌作用を裏付けるものであった。

感染抵抗力が減弱した肺癌患者に併発する呼吸器感染症は肺炎桿菌による場合が多い。これに対して CEPs と AGs の併用療法が優れた治療成績を示しており、このことは *in vitro* における短時間での殺菌作用の増強によるものと考えられた。

グラム陰性桿菌による重症感染症に対しては、 β -ラクタム剤とアミノグリコシド剤 (AGs) の併用療法が優れた治療成績を示している^{1,2)}。また *in vitro* において、緑膿菌に対して β -ラクタム剤と AGs の併用は相乗作用を示すことを報告した^{3,4)}。

今回、われわれは肺炎桿菌の標準株に対する CET と AMK, CEZ と DKB, CMZ と DKB の殺菌効果を検討し、また CEZ と DKB については同時に電子顕微鏡により菌の形態変化を観察した。

I. 実験方法

1. 使用菌株：*K. pneumoniae* PCI 602

使用薬剤：Cephalothin (CET)

Cephazolin (CEZ)

Cefmetazole (CMZ)

Amikacin (AMK)

Dibekacin (DKB)

使用培地：増菌用および殺菌作用測定用として Heart infusion broth (HIB, Difco) を用いた。

2. *K. pneumoniae* PCI 602 に対する殺菌効果

あらかじめ測定した *K. pneumoniae* PCI 602 に対する CET, CEZ, CMZ, AMK, DKB の MIC は、それぞれ 0.78, 3.13, 0.78, 0.78, 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であった。本菌株の一夜培養菌液を HIB で百倍に希釈して 37°C, 1時

間培養後、cephems (CEPs) 単独および aminoglycosides (AGs) 単独のいずれも 1 MIC と 1/2 MIC, CET (1/2 MIC) + AMK (1/2 MIC), CEZ (1/2 MIC) + DKB (1/2 MIC), CMZ (1/2 MIC) + DKB (1/2 MIC) で薬剤を作用させて 37°C で培養し、2 時間後および 4 時間後に生菌数を測定した。薬剤を含まないものを対照とした。

3. *K. pneumoniae* PCI 602 に対する CEZ, DKB の単独または併用による形態変化

本菌株の一夜培養菌液を百倍に希釈して 37°C, 1 時間培養後、CEZ は 4 MIC, 1 MIC, 1/2 MIC, DKB は 8 MIC, 1 MIC, 1/2 MIC それぞれ単独で、さらに CEZ (1/2 MIC) + DKB (1/2 MIC) で薬剤を加えて 37°C, 2 時間培養した後、遠沈洗浄により集菌した。これを一部は 0.5% 酢酸ウランで陰性染色を施し全菌像として電顕観察し、同じ試料をエタノール系列で脱水後、エポキシに包埋し超薄切片像として電顕観察を行なった。

II. 実験結果

1. *K. pneumoniae* PCI 602 に対する殺菌効果

生菌数の変化を Table 1 に示し、Fig. 1 にはグラフで示した。CET 単独の場合、2 時間まではほぼ静菌的であるが、2 時間から 4 時間にかけてすでに再増殖を開始していた。CEZ 単独の場合はほぼ静菌的であった。CMZ 単独では、1/2 MIC の場合はほぼ静菌的であるが、1 MIC の場合は殺菌作用を認めた。しかしその程

Table 1 Combined effect of cephems and aminoglycosides on killing of *Klebsiella pneumoniae* PCI 602

	Viable count (cells/ml)		
	0	2 hr. after	4 hr. after
Control	2.7×10^7	1.5×10^8	6.0×10^8
CET(1 MIC)		2.2×10^7	4.0×10^7
CET(1/2 MIC)		2.6×10^7	1.3×10^8
AMK(1 MIC)		1.2×10^5	5.6×10^5
AMK(1/2 MIC)		9.8×10^5	1.1×10^6
CET(1/2 MIC)+AMK(1/2 MIC)		3.3×10^4	1.0×10^5
CEZ(1 MIC)		1.0×10^7	3.6×10^6
CEZ(1/2 MIC)		2.5×10^7	1.2×10^7
DKB(1 MIC)		1.3×10^5	7.0×10^5
DKB(1/2 MIC)		1.0×10^6	2.2×10^5
CEZ(1/2 MIC)+DKB(1/2 MIC)		2.5×10^4	1.9×10^3
CMZ(1 MIC)		2.2×10^6	7.2×10^5
CMZ(1/2 MIC)		2.6×10^7	7.8×10^6
CMZ(1/2 MIC)+DKB(1/2 MIC)		3.4×10^4	9.9×10^2

度は 1/2 MIC の DKB よりも弱かった。AMK または DKB の 1/2 MIC, 1 MIC 単独では殺菌作用が認められた。しかし CET と AMK, CEZ と DKB, CMZ と DKB のそれぞれ 1/2 MIC ずつの併用では、いずれも 1 MIC の AMK あるいは DKB よりも強い殺菌作用を認めた。すなわち 2.7×10^7 /ml から、薬剤作用 2 時

間で、それぞれ 3.3×10^4 , 2.5×10^4 , 3.4×10^4 /ml と約千分の一に生菌数が減少し、薬剤作用 4 時間では、それぞれ 1.0×10^5 , 1.9×10^3 , 9.9×10^2 /ml と約一万分の一に減少した。

2. *K. pneumoniae* PCI 602 に対する CEZ, DKB による形態変化

CEZ 単独の場合、1 MIC では菌体は殆んど伸長化せず膨化していたが、外膜は良く保存されており溶菌像はあまりみられなかった (Fig. 2)。4 MIC では菌体の膨化がみられ、溶菌像を示すものが多かった。これに対して 1/2 MIC では菌体は伸長化するものの、膨化しているものは殆んどなく、溶菌像もみられなかった。

DKB 単独の場合、8 MIC では蛋白合成阻害作用を示

Fig. 2 A thin section of *K. pneumoniae* PCI 602 in the presence of 1 MIC of CEZ (see spheroplast formation)



Fig. 1 Combined effect of cephems and aminoglycosides on killing of *K. pneumoniae* PCI 602

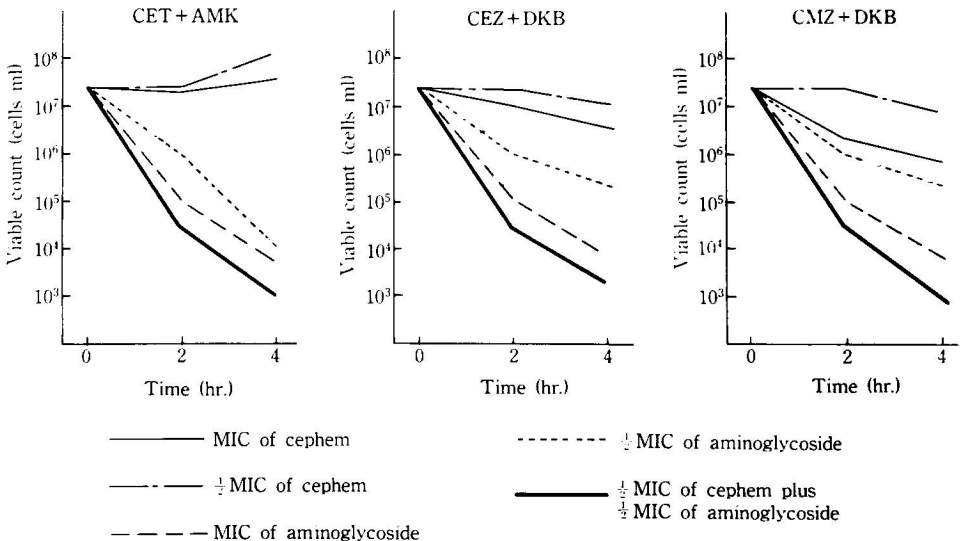


Fig. 3 A thin section of *K. pneumoniae* PCI 602 in the presence of 8 MIC of DKB (see destruction of outer membrane)

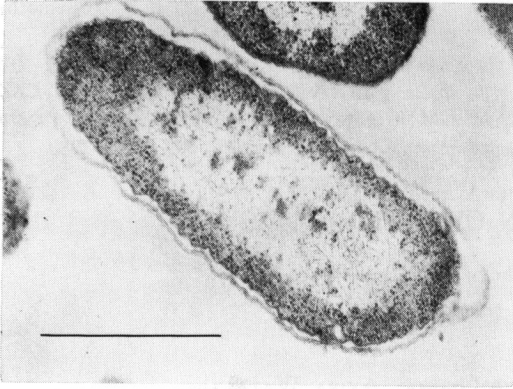


Fig. 4 A negative staining picture of *K. pneumoniae* PCI 602 in the presence of 1/2 MIC of CEZ and 1/2 MIC of DKB in combination (see destruction of cellular body)

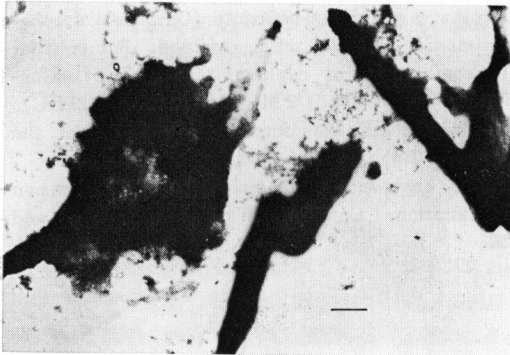
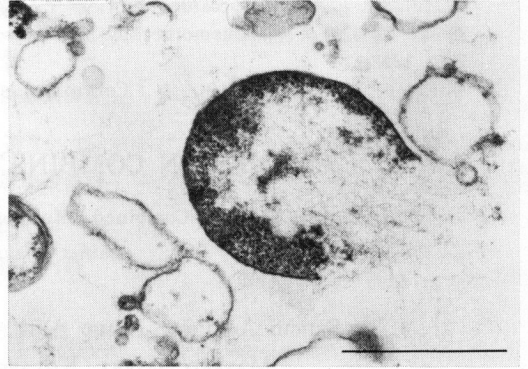


Fig. 5 A thin section of *K. pneumoniae* PCI 602 in the presence of 1/2 MIC of CEZ and 1/2 MIC of DKB in combination (see cell wall detachment and destruction of cytoplasmic membrane)



に感染抵抗力が减弱している肺癌患者においては、併発呼吸器感染症により不幸な転帰をとることが多い。しかし肺炎桿菌による肺癌二次感染症に対しては CEPs と AGs の併用療法が、 β -ラクタム剤単独またはペニシリン剤と AGs の併用療法よりも有意に優れた治療効果を示している²⁾。

肺炎桿菌の標準株を用いて短時間の薬剤作用による殺菌作用を検討した結果、MIC 以下の CEPs と AGs の併用で強い殺菌作用を示した。また CEZ と DKB の場合は電子顕微鏡による菌の形態変化の観察も行ない、その結果は併用時の殺菌作用の増強を支持するものであった。局所的・全身的に感染抵抗力が减弱した肺癌患者に併発する、肺炎桿菌による呼吸器感染症に対して CEPs と AGs の併用療法が優れた治療成績を示すのは、以上のような MIC 以下の低濃度の併用で短時間における著明な殺菌力の増強という *in vitro* の実験結果からうなずけるであろう。

(本論文の要旨は第 28 回日本化学療法学会東日本支部総会において発表した)。

文 献

- 1) 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* 28: 825~835, 1980
- 2) 今野 淳, 本宮雅吉, 大泉耕太郎, 佐々木昌子, 渡辺 彰, 青沼清一, 大沼菊夫: 抗生物質の併用に関する研究— β -lactam 剤とアミノ配糖体の併用. *日本医事新報* 2978: 26~29, 1981
- 3) 青沼清一, 大沼菊夫, 渡辺 彰, 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 今野 淳: 抗生物質の併用に関する研究 (I) 臨床分離緑膿菌に対する Piperacillin, Ticarcillin と Dibekacin との *in vitro* 併用効

III. 考 按

肺炎桿菌に対して CEZ と Gentamicin の併用は *in vitro* および *in vivo* において相乗作用が認められている⁵⁻⁷⁾。

われわれの施設で扱うことの多い肺癌に併発する呼吸器感染症(肺癌二次感染症)は肺炎桿菌に起因する場合が多い。基礎疾患およびその治療により局所的・全身的

す細胞質の変性像と共に、外膜が破壊されている像がみられた (Fig. 3)。しかし、1 MIC および 1/2 MIC では明らかな形態変化がみられなかった。

1/2 MIC の CEZ と 1/2 MIC の DKB との併用では、全菌像でみると菌は殆んど伸長化せず、そのまま膨化し破壊されていた (Fig. 4)。超薄切片像でみると菌体から細胞壁が脱落し、細胞質膜の破壊により菌体内内容物が菌体外へ遊出している像がみられ、また菌体の周囲には細胞壁の残渣と思われるものがみられた (Fig. 5)。

- 果に関する実験的考察。Chemotherapy 30 : 149~153, 1982
- 4) 青沼清一, 大沼菊夫, 渡辺 彰, 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 今野 淳, 林 泉, 岡本宏明: 抗生物質の併用に関する研究(II) 緑膿菌に対する Cefsulodin と Aminoglycosides 併用に関する基礎的・臨床的研究。Chemotherapy 30 : 770~775, 1982
- 5) 横田好子, 村川武雄, 西田 実 : Cefazolin と Gentamicin の併用に関する基礎評価。Chemotherapy 27 : 696~703, 1979
- 6) 高橋公毅, 小林章男: 緑膿菌, クレブシエラ, セラチアに対する抗生剤の併用効果。Chemotherapy 27 : 848~856, 1979
- 7) 宇塚良夫, 永武 毅, 松本慶蔵, 宍戸春美, 力富直人, 渡辺貴和雄: 実験肺炎を場とする CEZ・GM 併用療法の解析—GM 少量併用の効果の確認—。Chemotherapy 28 : 809~815, 1980

STUDIES ON COMBINATION OF ANTIBIOTICS (V)

In vitro Combined Effect of Cephems and Aminoglycosides
against *Klebsiella pneumoniae*

SEIICHI AONUMA, FUMIO ARIJI, KIKUO ONUMA, AKIRA WATANABE,
MASAKO SASAKI, KOTARO OIZUMI and KIYOSHI KONNO

Department of Internal Medicine, The Research Institute for Chest
Disease and Cancer, Tohoku University

In vitro combined activity of cephalothin (CET) and amikacin (AMK), cefazolin (CEZ) and dibekacin (DKB), cefmetazole (CMZ) and DKB against *K. pneumoniae* PCI 602 was examined. Bactericidal activity against *K. pneumoniae* PCI 602 was enhanced by combination of cepheims (CEPs) and aminoglycosides (AGs). When bacilli were treated for two hours with CEPs (1/2 MIC) plus AGs (1/2 MIC), the viable cell count decreased markedly and the colony-forming unit was found to be 1/1,000 of the initial inoculum.

Morphological changes of *K. pneumoniae* PCI 602 were observed by electron microscopy, when bacilli were treated with CEZ and DKB alone and in combination. Combination of CEZ (1/2 MIC) and DKB (1/2 MIC) caused marked destruction of the bacilli.