# 臨床分離グラム陰性桿菌に対する Minocycline と Amikacin の in vitro 併用効果

# 渡辺 彰・佐々木昌子・青沼清一・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 6 月 3 日受付)

臨床分離グラム陰性桿菌に対する Minocycline と Amikacin の併用効果を寒天平板希釈チェス 盤法および増殖曲線の観察により検討した。

寒天平板希釈チェス盤法の対象は緑膿菌 15 株, 大腸菌 18 株, 肺炎桿菌 25 株, セラチア 49 株 (当施設分離株 29 株および磐城共立病院分離の院内感染 20 株)の計 107 株である。これらに対する Minocycline と Amikacin の併用の平均 FIC 係数は大腸菌と肺炎桿菌ではともに 0.43 という相乗作用を示し、緑膿菌とセラチアに対しては 0.63, 0.75 および 0.56 という相加作用を示した。

前記 107 株から 4 株(大腸菌と肺炎桿菌各 1 株、セラチア 2 株)を任意に選び増殖曲線に対して併用の与える効果について検討した。セラチア 2 株のうち寒天平板希釈チェス盤法で拮抗作用を示した 1 株の増殖曲線では、Amikacin 単独添加時の生菌数よりもこれに Minocycline の低濃度を併用した場合の生菌数が増加する、という拮抗作用がみられた。寒天平板希釈チェス盤法で相乗作用を示した他の 3 株の増殖曲線では、1 MIC 値以下の低濃度の Minocycline と Amikacin の併用においてこれらの各々単独添加時より生菌数が 1/1,000 以下となる相乗作用がみられた。

われわれ<sup>1)</sup>は 先 に、Minocycline と Dibekacin あるいは Minocycline と Sulbenicillin の併用が種々の臨床分離グラム陰性桿菌に対して有意の併用効果を示すことを報告した。すなわち Minocycline と Dibekacin の併用はセラチアを除く腸内細菌科(大腸菌、肺炎桿菌、エンテロバクター)に対して相乗作用を示し、Minocycline と Sulbenicillin の併用はセラチアと緑膿菌に対して相乗作用を示すことを確認した。またこれらの Minocycline を軸とした併用が臨床における併用療法の第2次選択あるいは条件によっては第1次選択たり得る可能性をも示唆してきた。

今回はこれを他の薬剤についても検討することを目的 として、Minocycline と Amikacin の併用について種 々の臨床分離グラム陰性桿菌に対する in vitro 併用効 果を寒天平板希釈チェス盤法および増殖曲線に与える併 用効果の点について検討し、2、3の事実を知り得たの で以下に報告する。

#### I. 材料と方法

## 1) 使用薬剤

Minocycline は日本レダリー株式会社から、Amikacin は万有製薬株式会社から各々供与を受けた力価の明らかなものを適宜溶解して用いた。

## 2) 対象菌株

東北大学抗酸菌病研究所附属病院、仙台厚生病院およびいわき市立総合磐城共立病院で臨床材料から分離さ

れた計 107 株を対象とした。その内訳は次のとおりである。

1	
Pseudomonas aeruginosa	15 株
Escherichia coli	18 株
Klebsiella pneumoniae	25 株
Serratia marcescens I	29 株
Serratia marcescens II	20 株

上記の中で Sarratia marcescens II を除く計 87 株は 当研究所附属病院および仙台厚生病院で分離されたものであり、Serratia marcescens II の 20 株は磐城共立病院における分離株である。後者は、 磐城共立病院で 1978 年 11 月に始まり 1979 年 8 月をピークとして Serratia marcescens による院内感染例が 多発した<sup>2/3)</sup>が、このうち 1979 年 5 月および 6 月に分離した全ての同菌の中から無作為に抽出した 20 株の供与を受けたものである。抗生物質感受性、血清型別の分布などからこの 20 株中16 株が院内感染に関与したと考えられたが、この詳細については休ら<sup>2),3)</sup>の報告に詳しい。

3) 寒天平板希釈チェス盤法による併用効果の検討日本化学療法学会標準法 $^4$ を 応用して寒天平板希釈チェス盤法により2種の薬剤の組合せの系列を作成して検討した。すなわち Minocycline と Amikacin の 200, 100, 50, ....., 0.39, 0.2, 0.1 および  $0\,\mu g/ml$  という倍数希釈系列を各々作成して,その各濃度段階を互いに組合せて直ちにこれを Heart Infusion Agar (栄研) に含ま

せて寒天平板を作成した。一方、前記の 107 株を Trypticase Soy Broth (BBL) で 37℃, 20 時間培養し、その 100 倍希釈液をミクロプランター(佐久間器械)を用いて先に作成した寒天平板に接種した。この方法による接種菌量はほぼ 104 CFU である。 歯液接種後 37℃ で 20 時間培養し、寒天上のコロニーの発育の有無を 観察して感受性を判定した。

#### 4) 併用効果の定量的評価

2種の薬剤の併用効果の定量的判定には種々の方法があるが各々一長一短がみられる。 主な 方法を 次に 挙げる。

- ① 併用効果指数50~60;薬剤Aと薬剤Bのチェス盤法による併用によって Fig.1 に示した 大枠内の ように MIC 以下の濃度の組合せで菌の発育が阻止された場合, この組合せの 数を数えて 併用効果指数 (Combined action index; CAI) とする。 併用効果指数が大であれば 併用効果の程度も大である。
- ② Isobologram criteria for synergy<sup>®)-11)</sup>; Fig. 1 に示した併用効果を縦軸, 横軸ともに自然数をとってグラフに表わすと Fig. 2 が得られる。Fig. 1 と Fig. 2 のA, B, C, X, Y, Z の各点は 互いに 対応している。これをIsobologram (等生物学的有効線図, ここでは 等菌発育阻止線図) という。併用効果の判定には Fig. 2 に示したように斜線部分を 相乗作用, 打点部分を 相加作用, それより外側部分を拮抗作用, と定義する。 1 株ごとにIsobologram を作成してそれが主にどの部分に入るか,により判定する。
- ③ FIC index<sup>12)</sup>;ある薬剤の FIC (Fractional inhibitory concentration) とは、その薬剤を他の薬剤と併用した時の MIC をその薬剤単独での MIC で除した値であり、1つの組合せにつき2つの異なる FIC が求められることになる。この FIC の合計が最も小さくなるような組合せ点は発育阻止に最も有効な最小濃度の組合せ点を示すことになり、これを FIC 係数 (FIC index)

Fig. 1 Combined effect of drug A and drug B

1	MIC	^				_	_
0.5	MIC	+	+	*x	*	·c	
0.25	MIC	+	+	+	*Z	*—	_
0.125	MIC	+	+	+	+	*Y	_
0.062	MIC	+	+	+	+	+	_
0		$\overline{+}$	+	+	+	+	— в
DrugA	DrugB	0	0.0625 MIC	0.125 MIC	0.25 MIC	0.5MIC	1 MIC

<sup>\*</sup>Combined action index(CAI) = 6

と表現する。FIC 係数が1以下の場合を有意の併用効果とするが、これをくわしく分けて0.5以下の場合を相乗作用、0.5以上1以下を相加作用とする。1以上は拮抗作用である。さらに歯種ごとの全体について FIC 係数を単純平均して平均 FIC 係数を求める。

- (4) 臨床応用を意図して多数の株の成績を関値ごとに1つの Isobologram に表現する試みを EICKHOFF の方法 ISObologram に表現する試みを EICKHOFF の方法 ISObologram に表現する試みを EICKHOFF の方法 ISObologram を求め、 MIC を全株について幾何平均してBの平均 MIC を求める。これをグラフに作因して Isobologram を求め、その併用効果の程度を②の Isobologram でiteria に従って判定する。
- 5) 増殖曲線に与える併用効果の検討 寒天平板希釈チェス盤法に使用した 107 株から次の 4 株を任意に選んで使用した。

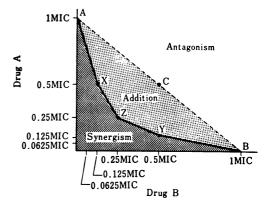
No. 27

Escherichia coli No. 9
Klebsiella pneumoniae No. 19
Serratia marcescens No. 24
(当施設分離株)

Serratia marcescens (磐城共立病院分離株)

これらの株を Heart Infusion Broth (Difco) で 37°C, 20 時間培養し、その 100 倍希釈液から 0.005 ml をとり再び HIB (同) に接種した。この時の菌量はほぼ 10⁴/ml である。37°C て 2 時間培養した後各薬剤を添加し、その後 0,2,4,6,24 時間の生菌数を測定した。生菌数測定は各点ごとに全試料から一定量 (0.1 ml) の菌液をとり、生食水による 10 倍希釈系列を作りその各々の一定量 (0.1 ml) を Heart Infusion Agar (栄研) 平板上にぬりひろげ、37°C, 20 時間培養後のコロニーの数を数えて計算した。この測定限界は 10²/ml である。薬剤濃度は Minocycline の 1 MIC, Amikacin の 1 MIC,

Fig. 2 Isobologram criteria for combined effect



<sup>+;</sup> Visible growth

<sup>-;</sup> No visible growth

Table 1 Percent of strains synergistically inhibited by minocycline combined with amikacin against clinically isolated gram-negative bacilli, and mean FIC index of the combination

	Number of strains	1	14		
		Synergism	Addition	Antagonism	Mean FIC inde
Pseudomonas aeruginosa*	15	6 (40%)	9 (60%)	0	0.63
Escherichia coli*	18	13 (72.2%)	5 (27.8%)	0	0.43
Klcbsiella pncumoniae*	25	19 (76%)	6 (24%)	0	0.43
Serratia marcescens I*	29	5 (17.2%)	21 (72.4%)	3 (10.3%)	0.75
Serratia marcescens II**	20	7 (35%)	13 (65%)	0	0.56

<sup>\*</sup> isolated from the patients in Sendai Kosci Hospital

Minocycline の 1/2~1/128 MIC の うちいずれかと Amikacin の 1~1/8 MIC のうちいずれか、およびその 併用、対照の 6 系列を歯種ごとに任意に設定した。併用 効果の判定は次のように行なった。単独添加で最も殺菌 効果の強い薬剤に対して、併用開始後さらに強い殺菌効果が持続して現われかつ 24 時間後の生菌数がそれらより 1/10³ 以上の 減少を 示した場合は 相乗作用とした。1~1/10³ の間は相加作用とし、併用により生菌数が単独添加の場合より増加した場合は拮抗作用とした。

## II. 成

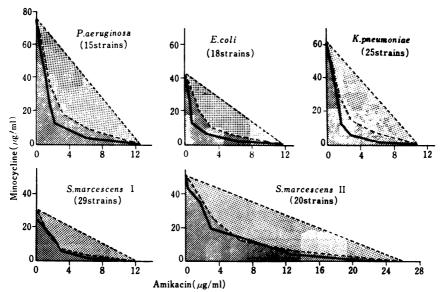
# 1. 2 薬剤併用の MIC (寒天平板希釈法) に及ぼす影 2 薬剤併用の MIC (寒天平板希釈法) に及ぼす影

各菌種についての Isobologram criteria (Fig. 2 参照) による併用効果の成績および平均 FIC 係数を Table 1 に示した。Isobologram criteria による判定では、大腸 菌と肺炎性菌においては各々 70% 以上の株において相乗作用が認められ、残りの全株は相加作用を示した。その平均 FIC 係数はともに 0.43 であり、先に示した定義からこれらの株に対する Minocycline と Amikacinの併用は相乗作用を示している。

緑膿菌とセラチアにおいては相乗作用を認める株は半数以下であり、大部分の株は相加作用を示した。われわれの施設で分離されたセラチアの中には比較的強い拮抗作用を認める株が3株みられた。この3株以外に拮抗作用を示す株はなかった。 緑膿菌の 平均 FIC 係数はセラチア I (当施設分離株)が0.75、セラチア II (磐城共立病院分離株)が0.56 であり、先に示した定義からいずれも相加作用の範囲内に入る。

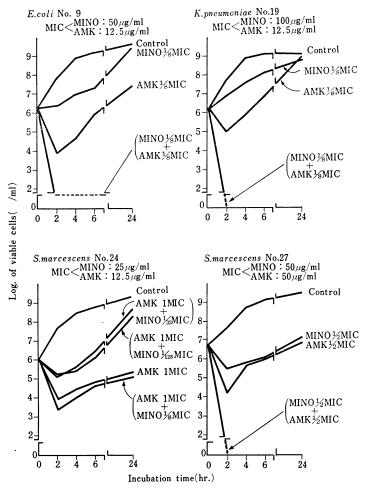
各菌種ごとの Isobologram を Fig. 3 に示した。グラ

Fig. 3 Isobologram of activity of combination of minocycline and amikacin against clinically isolated gram-negative bacilli



<sup>\*\*</sup> isolated from the patients in Iwaki Kyoritsu Hospial

Fig. 4 Killing curve of minocycline combined with amikacin against gram-negative bacilli



フ上の実線が各菌種の成績であり、斜線部分に分布すれば相乗作用、打点部分に分布すれば相加作用を示している。 Fig. 3 の中で大腸菌 18 株と肺炎桿菌 25 株における Isobologram はともに点線より内側の 斜線部分に分布し相乗作用を示している。 緑膿菌 15 株の平均 MIC は Minocycline 75  $\mu$ g/ml, Amikacin 12.5  $\mu$ g/ml であり余り良好な抗菌力とはいえないが、 両薬剤の併用により発育阻止濃度の急激な低下がみられその Isobologram は相乗作用の部分に分布している。 セラチアではわれわれの施設の分離株(29 株)、 磐城共立病院の分離株(20 株)の双方ともグラフ上で相加作用に分布する部分がみられ、その併用効果の程度は低かった。

### 2. 2薬剤併用の増殖曲線に及ぼす影響

Minocycline と Amikacin の併用が増殖曲線に与える 効果を Fig. 4 に示した。大腸菌 No. 9 に対して Minocycline 1/8 MIC, Amikacin 1/8 MIC の各々単独添加で は 24 時間後生菌数が各々 10<sup>9</sup>/ml 台、10<sup>7</sup>/ml 台への再 増殖を許すが、その併用では 24 時間後生菌数は 104/ml であり相乗作用を示している。肺炎桿菌 No. 19 に対して Minocycline 1/8 MIC, Amikacin 1/4 MIC の各々単独添加では 24 時間後生菌数がともに 108/ml 台への再増殖を許すが、その併用での生菌数は 2 時間以降 24 時間まで 102/ml の測定限界以下であり顕著な相乗作用を示している。

セラチア No. 24 (当施設分離株) は寒天平板希釈チェス盤法で拮抗作用を示した株であるが, Amikacin の 1 MIC 単独添加に対し、これに Minocycline の低濃度 (1/128 MIC, 1/32 MIC) を併用した場合には生菌数の増加がみられ著明な拮抗作用を示した。Minocycline をさらに増量して 1/8 MIC を併用した場合には拮抗作用はみられなかった。セラチア No. 27 (磐城共立病院分離株) は血液から分離された院内感染株であるが、両薬剤の 1/2 MIC の併用でその生菌数は 2 時間以降 24 時間まで 10²/ml の測定限界以下となり顕著な相乗作用を示

している。

## III. 考 察

感染症の起炎菌は常に変貌を遂げており、これは抗生物質の発展そのものと表裏一体の関係にあり、また近年の臨床の場の事情として宿主側の要因の変化が挙げられる。すなわち患者の高齢化、胆癌患者の増加や、副腎皮質ホルモン剤、免疫抑制剤、抗癌剤の投与、さらに放射線の照射等により免疫能の低下したいわば感染準備状態にある患者の増加である。こうした要因により従来は問題とならなかった弱毒菌による Opportunistic infection (日和見感染あるいは便乗感染)が激増している。 Opportunistic pathogen としては緑膿菌や緑膿菌以外のブドウ糖非酸酵性グラム陰性桿菌が最近挙げられるようになったが、腸内細菌科の菌種でも従来の大腸菌や肺炎桿菌とともにセラチアやエンテロバクター、変形菌などが目立つようになった。

このような種々のグラム陰性桿菌による難治性感 染症への対策として、われわれも併用の試みを基礎 的 $^{71,81,141,151}$ , 臨床的 $^{141,161}$ に検討してきた。その基本は $\beta$ -ラクタム剤とアミノ配糖体系抗生物質の併用であり、種 々のグラム陰性桿菌に対して有意の併用効果が得られる ことが知られた。多くの研究者の報告においても同様で あり菌種ごとに整理すると、緑膿菌に対しては Carbenicillin, Sulbenicillin あるいは Piperacillin とアミノ配 糖体系抗生物質の併用5),6),13),17)~19)が、セラチアに対して は同様に広域合成ペニシリンとアミノ配糖体系抗生物質 の併用11),20)が有効であり、また肺炎桿菌に対してはセフ ァロスポリン系抗生物質とアミノ配糖体系抗生物質の併 用19,21)~23)が、変形菌に対しても 同様に セファロスポリ ン系抗生物質とアミノ配糖体系抗生物質の併用24)が有効 である、と報告されている。現時点ではこれらの組合 せ (β-ラクタム剤とアミノ配糖体系抗生物質の併用)が 併用療法を行なう場合の第1次選択であるが、臨床的に は副作用やその他の条件でこれらの薬剤を投与できない 場合もあり、またこれらの併用がすべての菌種に対して 併用効果を発現するわけではない。さらに広い視野に立 って新しい併用療法の可能性を検討する必要がある、と 考える。

われわれ<sup>1</sup>は先に、臨床分離菌に対する Minocycline を軸とした *in vitro* における併用効果を検討し、併用療法における第 2 次選択として Dibekacin あるいは Sulbenicillin との 併用の 有効性を 示唆した。 す なわ ち Minocycline と Dibekacin の併用はセラチアを除く腸内細菌科の菌種に対して強い相乗作用を示し、セラチアと緑膿菌に対しては相加作用から一部に拮抗作用を示す部分が増加し、むしろ Minocycline と Sulbenicillin の

併用が有効であることを確認した。

今回 Minocycline との併用を検討した薬剤はアミノ 配糖体系抗生物質の中では耐性菌による不活化の機序 が他剤とは一部異なる態度を示す Amikacin であるが, Dibekacin の場合と ほぼ同様の併用効果を 示すことが 確認された。 すなわち大腸菌と肺炎桿菌に 対しては 70 % 以上の株で良好な 相乗作用が示され、 逆にセラチア と緑膿菌においては単なる相加作用を示す株がほとんど で一部には明らかな拮抗作用を示す株もみられた。ただ し Fig.3 の Isobologram を検討するとセラチアや緑膿 菌に対してもこの併用を行なうことにより、菌の発育阻 止に要する薬剤の最小濃度が双方の薬剤でともに著明に 低下しており、大腸菌や肺炎桿菌の場合に近い併用効果 を期待できる、と考えられる。この中でセラチアは先の われわれの報告<sup>1)</sup>でも Minocycline と Dibekacin の併 用が拮抗作用を示す部分がみられたが、今回の Amikacin との併用でもわれわれの施設の分離株ではこの傾向 がみられた。磐城共立病院の分離株ではこの傾向は弱か った。

磐城共立病院で分離されたセラチアの中で増殖曲線についても検討した No. 27 株は敗血症症例(この症例では血液、尿、喀痰のいずれからもセラチアを分離した)の血液分離株である。林ら<sup>2)</sup>が述べているようにこの株は多剤耐性を示した株であり、現用の主な抗生物質の中では Minocycline と Amikacin のみに感受性を示すことからこの2剤の併用効果を測定して FIC index 0.533 という成績を得た。そして臨床的にもこの2剤の併用に踏切って治癒させ得たが、その詳しい内容については林ら<sup>2)</sup>の報告にその場を譲りたい。

テトラサイクリン系薬剤とアミノ配糖体系薬剤を併用 して相乗作用の生ずる機序については次の可能性が考え られる。第1点として、細菌の蛋白合成の過程における 2つの薬剤の作用点が近似しているために相乗作用が生 ずることが考えられる。すなわちテトラサイクリン系薬 剤もアミノ配糖体系薬剤も 共に 細菌のリボゾームの 30 S サブユニットに 作用するとされ ている。 蛋白合成の 開始の 段階では アミノ配糖体系薬剤は 70S initiation complex の形成を阻害し、ペプチド鎖の伸長の段階では テトラサイクリン系薬剤も アミノ配糖体系薬剤 も 共に 70S リボゾームあるいは 30S サブユニットのA位への aminoacyl tRNA の結合を 阻害するように 作用する, とされている。第2点として、グラム陰性桿菌の cell membrane に対する アミノ配糖体系薬剤の 直接阻害作 用によりテトラサイクリン系薬剤が菌体内へより多く到 達するようになることが考えられる。以前からアミノ配 糖体系薬剤の存在下でグラム陰性桿菌の cell membrane

に破壊現象がみられるという報告 $^{61,25\sim29}$ があり、われわれはこれらについてアミノ配糖体系薬剤の直接作用により cell membrane に破壊現象が生ずることを報告している $^{30,31}$ 。またテトラサイクリン系薬剤に対する種々の細菌の耐性の機序は主に cell membrane の変化に伴う薬剤透過性の低下による、とされているので、この2剤を併用した場合にアミノ配糖体系薬剤がまず cell membrane に対してこれを破壊するように作用し、そのためにテトラサイクリン系薬剤が菌体内へ到達しやすくなる可能性が強く考えられる。

われわれの Minocycline と Dibekacin の 2 剤併用の検討 $^{32)}$ では、併用効果が最も強く現われるのは 2 剤を同時に作用させた場合であり、Dibekacin を先に作用させた場合にはこれに次ぐ効果がみられ、逆に Minocycline を先に作用させた場合には併用の効果が弱くなる、という事実が知られ、このことは上記の第 2 点目の可能性を強く示唆するものであった。しかし第 1 点目の可能性についてもこれを全く否定するものではなく、この点については拮抗作用が生ずる機序についての考察をも含めて今後の検討課題としたい。

併用効果の定量的評価については種々の方法があるこ とは既に述べたが 各々に 一長一短が ある。 併用効果指 数<sup>5~8)</sup>や FIC index<sup>12)</sup> を求める方法はその成績が数値で 表示されていて 一見合理的であるが, あくまでも MIC を基準としてこれに対する相対的な成績が表わされてい るに過ぎない。 MIC が種々異なる値を示す臨床分離株 の間で併用効果指数,および FIC index を比較すること の意義は少ない。FIC index が同じ値を示していてもそ の基準になる MIC の数値の大きい株では実際に発育阻 止に要する濃度は高くなり、FIC index の成績を直接臨 床へ反映させることのできない理由がここにある。これ に対し、絶対数をグラフ軸として表わした Isobologram により成績を表示すればこれらの欠点は克服できる。本 稿では さらに 一歩進めて EICKHOFF の 方法13)に 準じて 多数の株の 成績を 1 つの Isobologram に 表現する試み (材料と方法の 4), ④参照) を行なってみた。これによ れば多数の株の 成績を1つの 成績に 集約する ことがで き、異なる菌種間の成績を比較判定することが可能とな る。しかもグラフは絶対的な数値で表示されるため、臨 床的に病巣部位で得られる薬剤濃度を想定しながら併用 の有効性を検討することが可能となる。理論的にはグラ フ上の各点の濃度の組合せが病巣部位で得られればよい ことになる。

臨床応用については別稿 $^{33)}$ で報告するが、これまでの 検討では Minocycline とアミノ配糖体系抗生物質 の 併 用例において高い有効率が得られている。

以上をまとめると、われわれいが先に示唆した対象菌種により異なる併用効果が今回もみられ、しかもAmikacin の場合と Dibekacin の場合の双方が同様のパターンであることが指摘できる。このことからグラム陰性桿菌に対する Minocycline とアミノ配糖体系抗生物質の併用はセラチアを除く腸内細菌科の菌種に対して相乗作用を表わし、セラチアと緑膿菌に対しては併用効果の程度は低く相加作用の域にとどまる、と考えられる。セラチアでは一部に拮抗作用を示す部分が存在することが明らかになった。

#### 対 対

- 1) 渡辺 彰, 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 今野 淳: 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。Chemotherapy 28: 594~604, 1980
- 2) 林 泉,岡本宏明,大泉耕太郎,佐々木昌子, 青沼清一,渡辺 彰,大沼菊夫,今野 淳,川名 林治:当院におけるセラチア院内感染について。 感染症学雑誌投稿中
- 3) 林 泉:当院における Serratia による院内感 染について (第2報)。第27回日本化学療法学会 東日本支部総会抄録集, p.49, 1980
- 4) 日本化学療法学会 MIC 測定法改定委員会:最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改定について。 Chemotherapy 22:1126~1128, 1974
- 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) 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
- 7) 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。日本臨牀別冊: 20~26, 1976
- 8) 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
- Loewe, S.: The problem of synergism and antagonism of combined drugs. Arzneimittel Forschung 3: 285~290, 1953
- Lacey, B. W.: Mechanisms of chemotherapeutic synergy. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 8:247~288, 1958
- 11) 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.  $86:853{\sim}862$  1975
- 12) ELION, 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, 1952
- 13) Eickhoff, T.C.: In vitro effects of carbenicillin combined with gentamicin or polymixin B against Pseudomonas aeruginosa. Applied Microbiology 18: 469~473, 1969
- 14) 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
- 15) 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 今野 淳: β-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, p.124, 1978
- 16) 佐々木昌子,渡辺 彰,今野 淳: Beta-lactam 系抗生物質と Aminoglycoside の併用 効果一難 治性呼吸器感染における Sulfobenzyl-PC(SBPC) と3',4'-Dideoxy-kanamycin B(DKB)の使用経 験。第25回日本化学療法学会総会抄録集, p.91, 1977
- 17) Sonne, M. & E. Jawetz: Combined action of carbenicillin and gentamicin on *Pseudomonas* aeruginosa in vitro. Appl. Microbiol. 17: 893~896, 1969
- 18) 小林芳夫, 富岡 一, 長谷川弥人:緑膿菌感染症に対する抗生剤療法の *in vitro* における検討。 Jap. J. Antibiotics 30:210~213, 1977
- 高橋公毅,小林章男:緑膿菌,クレブシェラ,セラチアに対する抗生剤の併用効果。Chemotherapy 27:848~856,1979
- 20) Fu, K.P. & C.H. Neu: In vitro synergistic effect of netilmicin, a new aminoglycoside antibiotic. Antimicr. Agents & Chemoth. 10: 511~518, 1976
- 21) 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。Chemotherapy 24:451~454, 1976
- 22) 真山三賀雄, 永田 弘, 青井いずみ: In vitro に おける Tobramycin と Cephalothin または

- Carbenicillin との併用作用。Jap. J. Antibiotics 31:153~165, 1978
- 23) Klastersky, J.; F. Meunier-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. 134:271~276, 1976
- 24) HYAMS, P. J.; M. S. SIMBERKOFF & J. J. J. RAHAL : Synergy between cephalosporin and aminoglycoside antibiotics against *Providencia* and *Proteus*. Antimicr. Agents & Chemoth. 5: 571~577, 1974
- 25) Anand, N. & B. D. Davis: Effect of streptomycin on *Escherichia coli*. Damage by streptomycin to the cell membrane of *Escherichia coli*. Nature 185: 22~23, 1960
- 26) 有路文雄, 山口淳二, 真所弘一, 岡 捨己:3',4'-dideoxykanamycin B を作用させた肺炎桿菌の超 微構造。抗酸菌病研究雑誌 25:128~133, 1973
- 27) 福士主計, 平野富男: 3', 4'-dideoxykanamycin B を作用させた緑膿菌の電子顕微鏡的観察。抗酸菌病研究雑誌 25:134~137, 1973
- 28) IIDA, K. & M. KOIKE: Cell wall alteration of gram-negative bacteria by aminoglycoside antibiotics. Antimicr. Agents & Chemoth. 5: 95~97, 1974
- 29) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA: Morphological alteration of *Pseudomonas aeruginasa* by aminoglycoside antibiotics. Journal of Electron Microscopy 24:73~86, 1975
- 30) 有路文雄,佐々木昌子,今野 淳:緑膿菌の菌膜 でみた DKB の影響―その電顕観察。第 26 回日 本化学療法学会総会抄録集,p.123,1978
- 31) 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一。日本医事新報 2978:26~31, 1981
- 32) 未発表
- 33) 渡辺 彰,大泉耕太郎,佐々木昌子,青沼清一, 大沼菊夫,今野 淳:難治性呼吸器感染症に対す る Minocycline とアミノ配糖体系抗生物質の併 用効果。Chemotherapy 投稿中

# IN VITRO SYNERGISM BETWEEN MINOCYCLINE AND AMIKACIN AGAINST CLINICAL ISOLATES OF GRAM-NEGATIVE BACILLI

AKIRA WATANABE, MASAKO SASAKI, SEIICHI AONUMA,
KOTARO OIZUMI and KIYOSHI KONNO
Department of Internal Medicine,
The Research Institute for Chest Diseases and Cancer,
Tohoku University

In vitro inhibitory effects of minocycline in combination with amikacin on the growth of a total of 107 clinical isolates of gram-negative bacilli were examined by a checker board dilution method. Following strains were included in this experiment; 15 strains of P. aeruginosa, 18 strains of E. coli, 25 strains of K. pneumoniae and 49 strains of Serratia marcescens (20 of the 49 strains were epidemic strains of a nosocomial episode in Iwaki City Hospital).

The average fractional inhibitory concentration index (FIC index) of minocycline in combination with amikacin against *E.coli* and *K.pneumoniae* was 0.43. Thus, the combined effects were found to be synergistic. The average FIC index against *P.aeruginosa* was 0.63, that against *Serratia marcescens* 0.56 and that against the epidemic strains in Iwaki City Hospital 0.73. Thus, it was found that the inhibitory effects of minocycline in combination with amikacin on the growth of *P.aeruginosa* and *Serratia* was not synergistic, but only additive.

Four of 107 strains tested were selected at random and the effects of minocycline in combination with amikacin on the growth of the above four strains was examined in broth by counting the viable cells.

In a strain of Serratia, on which the inhibitory effect of minocycline in combination with amikacin had exerted antagonistic effects, as evaluated by a checker board dilution method, the combined effects on growth in broth was antagonistic as well.

The growth inhibitory effects of minocycline plus amikacin on one strain each of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Serratia* were confined by a checker board dilution method, and then experiments of similar nature in broth were undertaken.

The number of viable cells in two-drug experiment, in which the concentrations of both drugs were below 1 MIC, decreased at 2 hour of incubation to less than 1:1,000 as compared with that found in the single-drug experiment.

Thus, it was found that minocycline in combination with amikacin, at the concentrations below 1 MIC each, exerted a synergistic and bactericidal action against these 3 strains.