

## *Serratia marcescens* に対する T-1982 と他の抗生剤との併用効果

才川 勇・保田 隆・福岡義和・山城芳子

池田 靖・永田優子

富山化学工業株式会社総合研究所

T-1982 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 との併用効果について、臨床材料から分離された *Serratia marcescens* を被検菌として *in vitro* および *in vivo* で検討した。その結果、T-1982 は、*in vitro* 抗菌力においてアミノグリコシッド系抗生剤 (Gentamicin, Dibekacin) と強い協力作用を示したが、マクロライド系抗生剤 (Erythromycin) および Tetracycline とは弱い併用効果を示した。また、マウス実験的感染症に対する治療効果においても、T-1982 はアミノグリコシッド系抗生剤と相乗効果を示した。

T-1982 (Fig. 1) は、富山化学工業株式会社総合研究所で開発された新規な注射用半合成セフェム系抗生剤である<sup>1)</sup>。T-1982 は Cefmetazole より強い抗菌力を示し、特にインドール陽性 *Proteus* 属、*Serratia*、*Enterobacter* などのグラム陰性桿菌に対して優れた抗菌力を示す<sup>2)</sup>。

一方、 $\beta$ -lactam 系抗生剤と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、併用による有効性を示唆する多くの報告がある<sup>3-5)</sup>。

今回著者らは、T-1982 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、T-1982 の抗菌力において特徴のある 1 菌種 *S. marcescens* 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. 実験材料および方法

#### 1) 使用薬剤

T-1982 は、当社総合研究所で合成された凍結乾燥品 (941  $\mu$ g 力価/mg) を用いた。Gentamicin sulfate (GM: 塩野義製薬)、Dibekacin sulfate (DKB: 明治製薬)、Erythromycin lactobionate (EM: 大日本製薬)、Tetracycline hydrochloride (TC: 富山化学) の注射用市販品を用いた。

#### 2) 抗菌力測定法

Checkerboard dilution 法により、T-1982 は 100~0.05  $\mu$ g/ml、他剤は 100~0.2  $\mu$ g/ml までの倍々希釈した濃度範囲で全濃度段階を互いに組合せた系列を作製して Heart infusion agar (HIA) 平板とした。臨床材料から分離された *S. marcescens* は Trypto-soy broth (TSB) で、37°C、1 夜培養し、その 100 倍希釈液を 1 白金耳検定平板上に接種した。これを 37°C、1 夜培養後、菌の増殖を判定し、併用効果の程度を combined action index<sup>6)</sup> 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抑制された組合せの数を表示した。数が大きくなるにつれ併用効果が大きいことを示している。

#### 3) 殺菌作用

TSB で 37°C、1 夜培養した菌液を新鮮 TSB に接種後、37°C で振とう培養して生菌数が約  $10^6$  cells/ml になった時に薬剤を添加し、経時的に菌数を測定した。

#### 4) マウス実験的感染症に対する治療実験

被検菌を、HIA 上で 37°C、1 夜培養し集菌後 5% Gastric mucin (半井化学) に懸濁し、1 群 15 匹の SLC/ICR 系雄性マウス ( $19 \pm 1$  g) に腹腔内接種した。薬剤は感染 1 時間後に背部皮下投与した。7 日後のマウス生存率から ED<sub>50</sub> および信頼限界を LITCHFIELD-WILCOXON 法<sup>7)</sup> により算出した。併用効果を定量的に求めるために KAWAKAMI ら<sup>8)</sup> の方法に従い、相乗比 (synergistic ratio) を次式により求めた。

$$\begin{aligned} \text{相乗比} &= \frac{D_a}{D_d} \\ \frac{1}{D_a} &= \frac{R_1}{D_1} + \frac{R_2}{D_2} \\ R_1 &= \frac{C_1}{C_1 + C_a} \\ R_2 &= \frac{C_2}{C_1 + C_a} \end{aligned}$$

Fig. 1 Chemical structure of T-1982

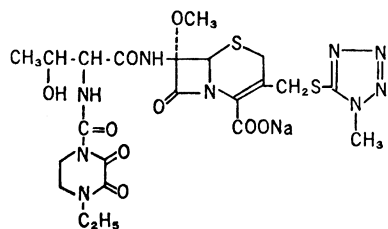
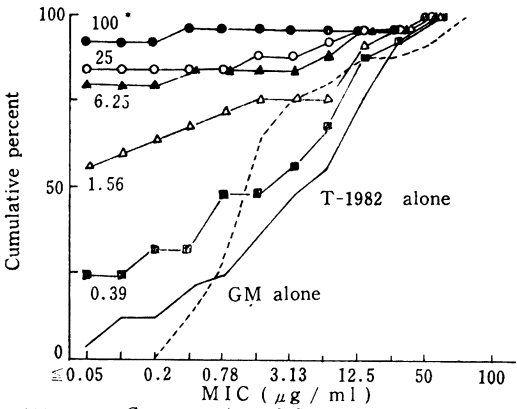


Table 1 Distribution of combined action index of GM, DKB, EM or TC with T-1982 against clinical isolates of *S. marcescens* (25 strains)

Combined with	Combined action index*														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
GM	1	3	6	4	4	1		1	3	1				1	
DKB	3	5	4	4	1	2	2		3		1				
EM	8	8	4	2	2	1									
TC	14	5	1	1	3		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.

Fig. 2 Combination effect of GM on MIC of T-1982 against *S. marcescens* (25 strains)



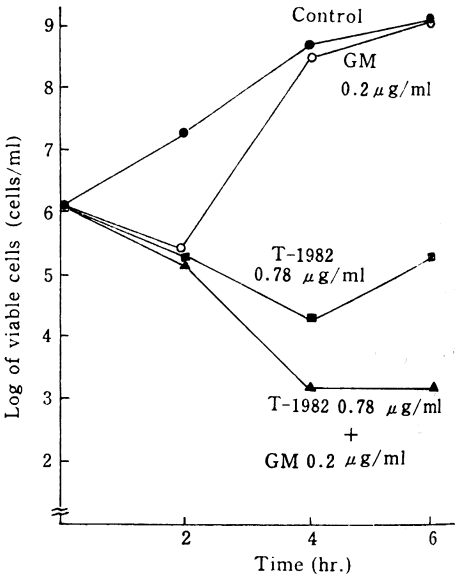
• 100~0.39 Concentration of GM combined (μg/ml)

Fig. 3 Combined action of T-1982 and GM

		<i>S.marcescens</i> W-24								<i>S.marcescens</i> W-50							
		GM (μg/ml)								GM (μg/ml)							
		100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	0	100	50	25	12.5	6.25
T-1982 (μg/ml)	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	12.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3.13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T-1982 (μg/ml)	0.39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

D<sub>a</sub>: 併用効果が相加的であるとして求めた ED<sub>50</sub> の計算値  
D<sub>1</sub>: 併用時の ED<sub>50</sub> の実験値  
D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>: 薬剤単剤の ED<sub>50</sub>  
C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>: 併用時の2薬剤比率

Fig. 4 Individual or combined bactericidal effect of T-1982 and GM on *S. marcescens* W-24



The MIC of T-1982 was 1.56 μg/ml and the MIC of GM was 12.5 μg/ml.

併用効果は、相乗比が1の時は相加作用、1以上であれば相乗作用、1以下であれば拮抗作用を示す。

II. 実験結果および考察

1) Checkerboard dilution 法での併用効果

*S. marcescens* 25 株を用い、checkerboard dilution 法により T-1982 と他の抗生剤との併用効果を検討した。

Table 1 に T-1982 と GM, DKB, EM および TC との *S. marcescens* に対する combined action index の分布を示した。T-1982 は GM, DKB と強い協力作用を示したが、EM, TC と弱い協力作用を示した。

そこで、T-1982 と強い協力作用を示した GM との

Table 2 Combination effect of T-1982 and GM on intraperitoneal infection with *S. marcescens* W-24 in mice

Group	Antibiotics	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Combination ratio	Determined ED <sub>50</sub> (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)
1	T-1982	1.56	—	0.55	0.43 — 0.69
2	GM	12.5	—	0.054	0.045—0.065
3	T-1982+GM	—	10 : 1	0.14	0.11 — 0.18

Challenge dose :  $5 \times 10^7$  cells/mouse. (3.3 MLD)  
Therapy : s. c. injection at 1 hr after infection.

Table 3 Combination effect of T-1982 and GM on intraperitoneal infection with *S. marcescens* W-50 in mice

Group	Antibiotics	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Combination ratio	Determined ED <sub>50</sub> (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)
1	T-1982	1.56	—	1.02	0.86 — 1.21
2	GM	1.56	—	0.070	0.059—0.083
3	T-1982+GM	—	10 : 1	0.30	0.25 — 0.36

Challenge dose :  $2 \times 10^7$  cells/mouse. (16.7 MLD)  
Therapy : s. c. injection at 1 hr after infection.

Table 4 Synergistic ratio of therapeutic effect of combined antibiotics

Strain	Combination	Hypothetical ED <sub>50</sub> * (mg/mouse) (Da)	Confidence limit (P=0.05)	Synergistic ratio (Da/Dd)	Confidence limit (P=0.05)
<i>S. marcescens</i> W-24	T-1982+GM (10 : 1)	0.30	0.26—0.35	2.14	1.56—2.93
<i>S. marcescens</i> W-50	T-1982+GM (10 : 1)	0.46	0.40—0.52	1.53	1.22—1.91

\*Hypothetical ED<sub>50</sub> in which additive effect of combined antibiotics assumed.

併用について更に詳しく検討した。T-1982 に GM を添加した時、T-1982 の MIC の累積百分率に対する影響を検討しその結果を Fig. 2 に示した。T-1982 は低濃度で阻止される菌株数が増加し、顕著な併用効果を示した。

次に *S. marcescens* W-24 および W-50 の 2 株に対する T-1982 と GM との併用効果を Fig. 3 に示した。その結果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* W-24, W-50 でそれぞれ13と7であった。

この *in vitro* における協力作用機作としては、 $\beta$ -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おり<sup>9)</sup>、T-1982 も同様の機作によるものと推定される。

2) 殺菌力における併用効果

T-1982 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調べるため、checkerboard dilution 法において併用効果の認められた *S. marcescens* W-24 を用いて、T-1982 と GM の単独および併用時の殺菌力を検討した。Fig. 4 に示すごとく、GM 0.2  $\mu\text{g/ml}$  では殺菌力を示さず、また T-1982 0.78  $\mu\text{g/ml}$  でも 6 時間後に菌の増殖傾向を示したが、両者の併用により殺菌的に作用した。

3) マウス実験の感染症に対する併用効果

*In vitro* で認められた T-1982 と GM の併用効果が、*in vivo* においても認められるか否かを確認するため、実験的感染マウスを用いて検討した。*S. marcescens* W-24 感染マウスに対する T-1982, GM 単独投与群の ED<sub>50</sub>

は各々 0.55, 0.054mg/mouse であった (Table 2)。この ED<sub>50</sub>の比が約10:1であることから両剤併用時の投与比を10:1として併用群の ED<sub>50</sub>を求めたところ 0.14mg/mouse であった。S. marcescens W-50 感染マウスに対しても同様に T-1982, GM 単独投与群あるいは両剤併用群の ED<sub>50</sub>を求めたところ各々 1.02, 0.070, 0.30mg/mouse であった (Table 3)。また, Table 4 に KAWAKAMI ら<sup>8)</sup>の方法によって算出したこれらの相乗比を示した。T-1982 感受性の S. marcescens W-24 および W-50 に対する T-1982 と GM 併用時の相乗比は各々 2.14, 1.53 と相乗的であり, *in vitro* と同様 *in vivo* においても併用効果を示した。以上のように, T-1982 は他の  $\beta$ -lactam 系抗生剤と同様, 臨床においてアミノグリコシッド系抗生剤との協力作用が期待できる。

### 文 献

- 1) 高野俊太郎, 高倉 勇, 落合裕一, 桃井海秀, 田仲 清, 藤堂洋三, 保田 隆, 田井 賢, 福岡義和, 滝 秀雄, 才川 勇:  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の薬学的研究 (第13報) 7 $\beta$ -[ $\alpha$ -(4-alkyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)- $\alpha$ -substituted acetamido]-7 $\alpha$ -methoxycephalosporanic acid 類の合成ならびに構造活性相関。薬学雑誌102: 629~645, 1982
- 2) TAI, M.; Y. FUKUOKA, A. YOTSUJI, K. KUMANO, M. TAKAHATA, H. MIKAMI, T. YASUDA, I. SAIKAWA & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T-1982, a new semisynthetic

cephamycin antibiotic, Antimicrob. Agents & Chemother., 投稿中。

- 3) POGWIZD, S. M. & S. A. LERNER: *In vitro* activity of gentamycin, amikacin and netilmicin alone and in combination with carbenicillin against *Serratia marcescens*. Antimicrob. Agents & Chemother. 10: 878~884, 1976
- 4) 才川 勇, 保田 隆, 田井 賢, 高畑正裕, 津田久嗣, 中川三千子: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* に対する T-1220 と Gentamicin の併用効果。Chemotherapy 25(5): 797~800, 1977
- 5) 才川 勇, 保田 隆, 田井 賢, 高畑正裕, 前三千子: *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* に対する Cefoperazone (T-1551) と他剤との併用効果。Chemotherapy 28(S-6): 151~156, 1980
- 6) NAGATOMO, H.; M. KAKIZAKI & K. TSUCHIYA: Combined action of sulbenicillin and gentamicin. J. Antibiotics 27: 199~205, 1974
- 7) LITCHFIELD, J. T., JR. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose effect experiments. J. pharmacol. & Exp. Ther. 96: 99~113, 1949
- 8) KAWAKAMI, M.; Y. NAGAI, S. SHIMIZU & S. MITSUHASHI: Antimicrobial effect of combinations of colistin methanesulfate and chloramphenicol. I. *In vitro* effect. J. Antibiotics 24: 884~891, 1971
- 9) ZIMMERMANN, R. A.; R. C. MOELLER, JR. & A. N. WEINBERG: Mechanism of resistance to antibiotic synergism in Enterococci. J. Bacteriol. 105: 837~879, 1971

## COMBINED ACTION OF T-1982 AND VARIOUS ANTIBIOTICS AGAINST *SERRATIA MARCESCENS*

ISAMU SAIKAWA, TAKASHI YASUDA, YOSHIKAZU FUKUOKA,  
YOSHIKO YAMASHIRO, YASUSHI IKEDA and YUUKO NAGATA  
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

The *in vitro* and *in vivo* combined actions of T-1982 and aminoglycosides, macrolide, or tetracycline against *Serratia marcescens* were studied.

The combinations of T-1982 and aminoglycosides (gentamicin, dibekacin) showed markedly synergistic activity in both *in vitro* antibacterial activity and therapeutic effect on experimental infection in mice, and the combined actions were bactericidal.

On the other hand, *in vitro* combinations of macrolide (erythromycin) or tetracycline with T-1982 showed rather weak synergism.