

緑膿菌に対するピペラシリン・セフォペラゾン・セフスロジン・
ホスホマイシン・トブラマイシン合併による併用効果

高橋 公毅・菅野 治重

千葉大学中検細菌

(昭和 59 年 7 月 25 日受付)

Piperacillin (PIPC) + Fosfomycin (FOM), Cefoperazone (CPZ) + FOM, Cefsulodin (CFS) + FOM, PIPC + FOM + Tobramycin (TOB), CPZ + FOM + TOB, CFS + FOM + TOB の併用効果を臨床材料より分離した緑膿菌を用いて検討した。相乗作用 (FIC 係数 ≤ 0.5) は PIPC + FOM, CPZ + FOM および CFS + FOM の併用でそれぞれ, 80.0%, 85.0%, 82.6% に認められた。上記の各 2 剤の組み合わせに TOB を微量に添加することによって, さらに相乗効果が強化された。

単個および集塊菌に対する 2 剤および 3 剤の組み合わせでも著しい殺菌効果を示した。集塊菌に対する CPZ + FOM + TOB の殺菌作用は PIPC + FOM + TOB や CFS + FOM + TOB に比べて著しく, 薬剤 3 時間後の生菌数ははじめの 10^8 /ml から 10^4 /ml に, 24 時間後では 10^1 /ml にまで減少した。今回行なったこれらの抗生剤の組み合わせは重症な緑膿菌感染症に対する臨床的有用性がうかがわれた。

緑膿菌は日和見感染の主要な原因菌であるが, 現在抗緑膿菌剤には単独で十分な抗菌力をもつ抗生剤はない。重症緑膿菌感染症では, 患者の感染防御能が著しく低下した日和見感染例に多く, 治療上抗生剤のみで可能なかぎり原因菌を殺菌的に処理する方法が要求される。抗生剤の併用療法も殺菌効果より検討される必要がある。そこで細胞壁合成を阻害する FOM と CFS, FOM と CPZ, FOM と PIPC との併用, およびこれらの 2 剤とさらに, 細胞質内の蛋白合成を阻害する TOB を微量添加したときの併用効果を検討したので, その成績を報告する。

I. 実験材料と実験方法

1. 使用薬剤

CPZ と PIPC は富山化学工業から, CFS は武田薬品, FOM は明治製菓, TOB は塩野義製薬から提供を受けた粉末を適宜溶解して用いた。

2. 使用菌株

千葉大学医学部付属病院検査部で臨床材料から分離した *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*) を用いた。

3. 相乗試験

Mueller-Hinton Agar (MHA) (Difco) を用い, 平板希釈チェス盤 (Checkerboard) 法により, PIPC + FOM, CPZ + FOM, CFS + FOM との組み合わせ, さらに 3 剤の組み合わせとして前述の 2 剤の組み合わせに, 一律に各株の minimal inhibitory concentration (MIC)

以下の $0.25 \mu\text{g/ml}$ の TOB を添加して平板とした。これにレプリカ法 (武藤器械, 多目的アパラス使用) で被検株の一夜培養液を一度に多数株接種し, 一夜培養後菌発育のみられぬ抗生剤の最小濃度の組み合わせ点を求めた。PIPC, CPZ, CFS および FOM は $0.5 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ の 2 段階希釈濃度とした。PIPC, CPZ, CFS, および FOM の MIC は, $6.3 \sim 25 \mu\text{g/ml}$, $6.3 \sim 25 \mu\text{g/ml}$, $1.6 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ および $3.2 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ であった。TOB は $0.06 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ の 2 段階希釈濃度とした。供試 23 株に対する TOB の MIC はそれぞれ $1 \mu\text{g/ml}$ 15 株, $2 \mu\text{g/ml}$ 3 株, $4 \mu\text{g/ml}$ 2 株, $> 4 \mu\text{g/ml}$ 3 株であった。併用作用の強さは, 併用による菌発育阻止点での fractional inhibitory concentration (FIC) と FIC 係数で表わし, 最も低い FIC 係数で代表させた^{1,2)}。FIC 係数が ≤ 0.5 を相乗作用, $0.5 < \text{FIC 係数} < 1.0$ を部分相乗作用, FIC 係数 = 1.0 を相加作用, FIC 係数が ≤ 0.5 の場合を有意義な相乗作用とした^{3,4)}。この実験では拮抗作用を示した株はみられなかった。

Table 1 に 2 剤および 3 剤併用による FIC 係数の求め方を示した。すなわち A, B 2 剤の組み合わせによる併用効果のみられたところは白地の部分で示し, A, B 2 剤の組み合わせに C 剤を加えることによって, さらに併用効果のみられたところを斜線で示した。この Table での 2 剤併用時の最小 FIC 係数とは, 最も併用効果が著明であった A 点の FIC 係数を求め 0.37 とした。さらに, 3 剤併用時の最小 FIC 係数とは, A' 点の FIC 係

Fig.1 The colonies within the suture

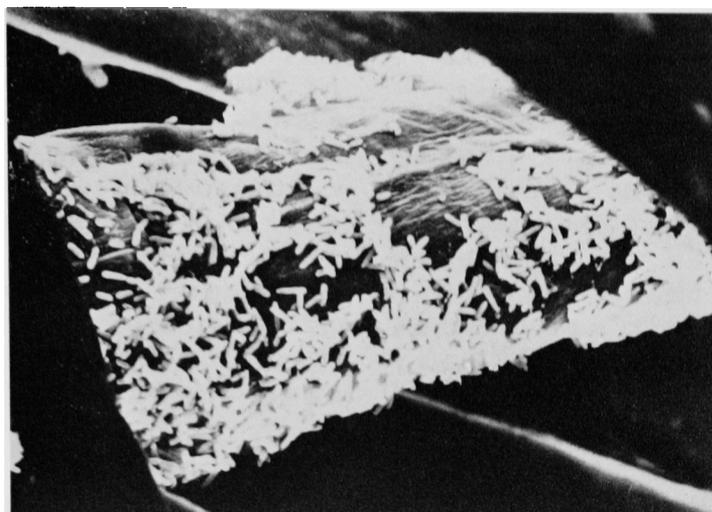


Table 1 FIC index calculation method with two and three drug combinations

		A Drug										
		100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0	
B Drug	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	A					-	-	-	-
	12.5	-	-	C			A		-	-	-	-
	6.25	-	-	C		Drug A		-	-	-	-	
	3.12	-	-	C		Drug A		-	-	-	-	
	1.56	-	-	C		Drug A		-	-	-	-	
	0.78	-	-	C		Drug A		-	-	-	-	
	0.39	-	-	C		Drug A		-	-	-	-	
	0	-	-	C		Drug A		-	-	-	-	

The FIC index at point A in two drug combinations = $\frac{12.5}{50} + \frac{6.25}{50} = 0.37$

The FIC index at point A' in three drug combinations = $\frac{6.25}{50} + \frac{3.12}{50} = 0.18$

数を求め 0.18 とした。

4. 併用による経時的殺菌曲線

1) 液体培地中の単個菌に対する併用効果

Ps. aeruginosa No. 23 および No. 25 を MHB で一夜培養し, *Ps. aeruginosa* No. 23 は a) ~ c), e) ~ g), i) ~ j) の薬液に, *Ps. aeruginosa* No. 25 は a), d), e), h), k) の薬液に, 菌の最終菌数が約 10^6 /ml になるように加えて, 37°C で培養し, 3 時間, 6 時間および 24 時間後に生菌数を測定した。薬剤を加えないものを対照とした。*Ps. aeruginosa* No. 23 および No. 25 に対する 10^6 /ml 接種時の FOM, CPZ, CFS および PIPC の MIC はそれぞれ 50 μ g/ml であった。TOB の MIC は 12.5 μ g/ml であった。

- a) FOM 12.5 μ g/ml
 - b) CPZ 12.5 μ g/ml
 - c) CFS 12.5 μ g/ml
 - d) PIPC 12.5 μ g/ml
 - e) TOB 0.25 μ g/ml
 - f) CPZ 12.5 μ g + FOM 12.5 μ g/ml
 - g) CFS 12.5 μ g + FOM 12.5 μ g/ml
 - h) PIPC 12.5 μ g + FOM 12.5 μ g/ml
 - i) CPZ 12.5 μ g + FOM 12.5 μ g + TOB 0.25 μ g/ml
 - j) CFS 12.5 μ g + FOM 12.5 μ g + TOB 0.25 μ g/ml
 - k) PIPC 12.5 μ g + FOM 12.5 μ g + TOB 0.25 μ g/ml
- 2) 縫糸中の集塊菌に対する併用効果

集塊菌とは長さ 30 mm の木綿縫糸を *Ps. aeruginosa* No. 23 および No. 25 の菌液に一夜浸みこませたものを集塊菌とした。集塊菌を Fig. 1 に示した。一夜培養した *Ps. aeruginosa* No. 23 の集塊菌を a)~c), e)~g), i)~j) の薬液が、また *Ps. aeruginosa* No. 25 の集塊菌を a), d), e), h), k) の薬液が 60 ml 入った各試験管内に入れ、37°C で培養し、3 時間、6 時間および 24 時間後に各試験管から 2 本の縫糸を取り出し、1 ml の滅菌生食の入った試験管に入れ、攪拌し、縫糸中の細菌を遊出させ、生菌数を測定した。薬剤を加えないものを対照とした。*Ps. aeruginosa* No. 23 および No. 25 の集塊菌に対する集塊菌接種時の FOM, CPZ, CFS および PIPC の MIC はそれぞれ >800 μg/ml であった。TOB の MIC は >100 μg/ml であった。

- a) FOM 200 μg/ml
- b) CPZ 200 μg/ml
- c) CFS 200 μg/ml
- d) PIPC 200 μg/ml
- e) TOB 0.25 μg/ml
- f) CPZ 200 μg+FOM 200 μg/ml
- g) CFS 200 μg+FOM 200 μg/ml
- h) PIPC 200 μg+FOM 200 μg/ml
- i) CPZ 200 μg+FOM 200 μg+TOB 0.25 μg/ml
- j) CFS 200 μg+FOM 200 μg+TOB 0.25 μg/ml
- k) PIPC 200 μg+FOM 200 μg+TOB 0.25 μg/ml

II. 実験成績

1. 平板チ-ス盤法による併用効果

結果を Table 2 に示した。PIPC+FOM, CPZ+FOM および CFS+FOM の組み合わせで、相乗作用を示す菌株はそれぞれ 80.0%, 85.0% および 82.6% にもみられた。PIPC に FOM を併用した時の平均 FIC 係数は 0.48 であった。CPZ+FOM および CFS+FOM の併用の平均 FIC 係数はそれぞれ 0.42 および 0.46 であった。PIPC+FOM, CPZ+FOM および CFS+FOM の各 2 剤の組み合わせに、0.25 μg/ml の微量の TOB を加えることによって、すべての株 (100%) で相乗作用 (FIC 係数 ≤ 0.5) が認められた。PIPC+FOM+TOB, CPZ+FOM+TOB および CFS+FOM+TOB の平均 FIC 係数はそれぞれ、0.30, 0.24 および 0.27 で、2 剤の組み合わせに比べて FIC 係数に有意の低下が認められた。

2. 併用による経時的殺菌曲線

1) 液体培地中の単個菌に対する併用効果

Fig. 2 から Fig. 4 に示したように、PIPC+FOM, CPZ+FOM および CFS+FOM の併用で、3 時間作用させると生菌数は、はじめの接種菌量 10⁶/ml を 10⁴/ml から 10⁵/ml にまで減少した。CPZ+FOM および CFS+FOM の組み合わせで 6 時間作用させると、菌培養不能 (10 CFU/ml 以下) となった。PIPC と FOM の組み合わせで菌培養不能にするためには 24 時間かかった。上記の各薬剤の組み合わせに供試菌の MIC 以下の 0.25 μg/ml の TOB を加えることによって、CPZ+FOM+TOB の組み合わせは、培養後 3 時間で菌培養不能となり、一方 CFS+FOM+TOB および PIPC+

Table 2 Comparison of fractional inhibitory concentration indices in two and three antibiotic combinations against *Ps. aeruginosa*

Drug combination		PIPC+FOM ^a	PIPC+FOM+TOB	CPZ+FOM	CPZ+FOM+TOB	CFS+FOM	CFS+FOM+TOB									
FIC ^c index	0.75	3 } (20.0) ^b		1 } (15.0)		1 } (17.3)										
	0.61															
	0.52							2 }								
	0.50	9 } (80.0)		2 } (100)		6 } (85.0)		1 } (100)	9 } (82.6)	1 } (100)						
	0.37										4 }	5 }	10 }	1 }	8 }	2 }
	0.31										2 }	2 }	1 }	3 }	1 }	6 }
	0.25										1 }	8 }	1 }	3 }	1 }	8 }
	0.24													3 }		
	0.19			2 }				9 }		6 }						
	0.15			1 }												
FIC index range		0.25~0.75	0.15~0.50	0.31~0.75	0.19~0.50	0.25~0.75	0.19~0.50									
Mean±S.D.		0.48±0.13	0.30±0.09	0.42±0.13	0.24±0.07	0.46±0.11	0.27±0.07									
No. of strains used		20		20		23										

^a PIPC: Piperacillin, CPZ: cefoperazone, CFS: cefsulodin, FOM: fosfomycin, TOB: tobramycin.

^b Numbers in parentheses represent percentages.

^c FIC: Fractional inhibitory concentration.

Fig. 2 Bactericidal effects of PIPC+FOM, and PIPC+FOM+TOB against *Ps. aeruginosa* No. 25 strain in broth ($\mu\text{g/ml}$)

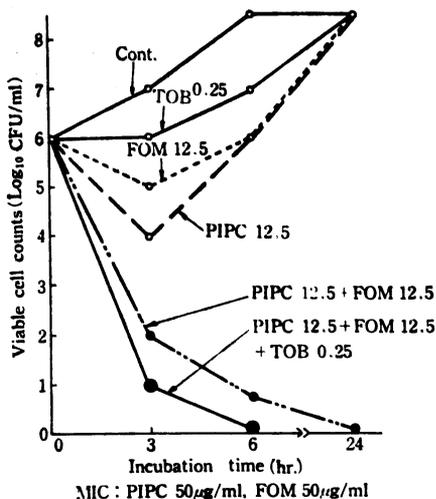


Fig. 3 Bactericidal effects of CPZ+FOM, and CPZ+FOM+TOB against *Ps. aeruginosa* No. 23 strain in broth ($\mu\text{g/ml}$)

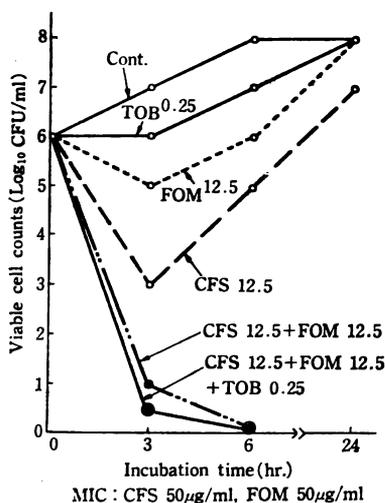


Fig. 4 Bactericidal effects of CFS+FOM, and CFS+FOM+TOB against *Ps. aeruginosa* No. 23 strain in broth ($\mu\text{g/ml}$)

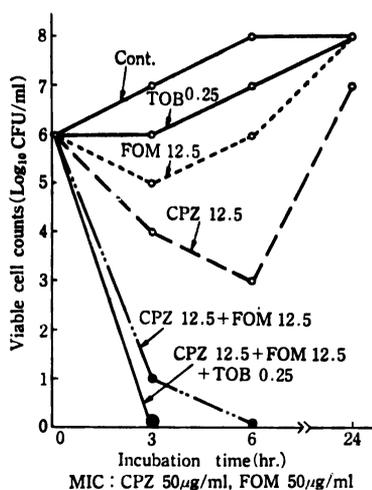
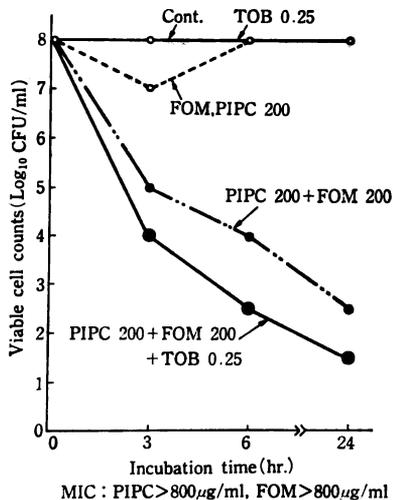


Fig. 5 Bactericidal effects of PIPC+FOM, and PIPC+FOM+TOB against colonies of *Ps. aeruginosa* No. 25 strain within the suture ($\mu\text{g/ml}$)



FOM+TOB の組み合わせでは、培養後 6 時間で菌培養不能となった。

2) 縫糸中の集塊菌に対する併用効果

Fig. 5 から Fig. 7 に示したように、PIPC+FOM, CPZ+FOM, CFS+FOM, PIPC+FOM+TOB, CPZ+FOM+TOB, および CFS+FOM+TOB の組み合わせではほぼ同じような殺菌効果が得られた。すなわち各薬剤の組み合わせで、はじめの接種菌量の $10^8/\text{ml}$ を接種後 3 時間で $10^3/\text{ml}$ から $10^5/\text{ml}$ まで減少させ、24

時間作用させると、 $10^1/\text{ml}$ から $10^3/\text{ml}$ まで減少させることができた。

III. 考 察

緑膿菌に対する抗生剤の併用効果についてはすでに報告されているが⁵⁻¹¹⁾、最近青沼らは Aminoglycoside と PIPC¹²⁾、TIPC¹²⁾、CFS¹³⁾ および FOM¹⁴⁾ の *in vitro* の併用で相乗作用を認めている。

NEU らは CPZ と GM の併用で供試菌株の 30% に

Fig. 6 Bactericidal effects of CPZ+FOM, and CPZ+FOM+TOB against colonies of *Ps. aeruginosa* No. 23 strain within the suture ($\mu\text{g/ml}$)

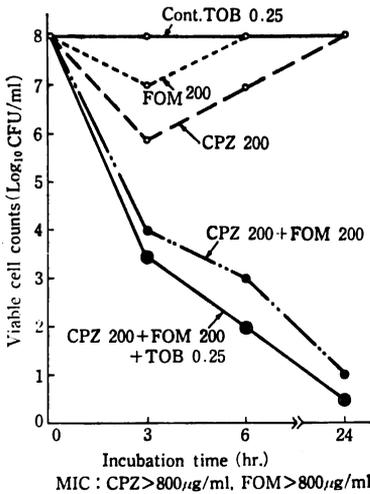
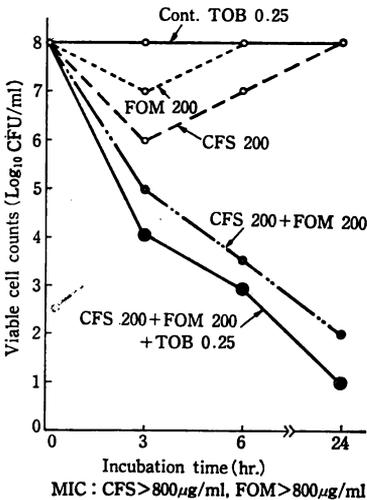


Fig. 7 Bactericidal effects of CFS+FOM, and CFS+FOM+TOB against colonies of *Ps. aeruginosa* No. 23 strain within the suture ($\mu\text{g/ml}$)



相乗効果があったと報告している¹⁵⁾。

PAVILLARD らおよび HOOEKAMP-KORSTANJE らも同じ薬剤の併用で 62~70% の相乗作用があったことを認めている^{16,17)}。今回我々は臨床材料から分離した緑膿菌を用いて PIPC+FOM, CPZ+FOM, CFS+FOM の組み合わせで、80.0%, 85.0% および 82.6% と著しい相乗作用が認められ、これらの組み合わせに、0.25 $\mu\text{g/ml}$ という微量の TOB を添加することによって、さらに相乗

作用が強化され、微量の TOB が存在すれば Penicillin 系や Cephem 系, FOM の抗菌力がかなり増強されることを明らかにした。

単個の細菌に対する抗生剤の単独または併用の効果の検討は、生物学活性をみているにすぎない。生体内では細菌は集塊として存在し、膿瘍を形成している場合も考えられる。したがって臨床的にはこれへの抗生剤の抗菌態度の検索が望まれる。本報では培地内で人工的に集塊菌を作成し、これへの抗生剤の単独ないし併用効果を検討した。その結果、単個菌には短時間で殺菌的に作用した抗生剤の組み合わせでも集塊菌にはより高濃度で長時間の作用が必要であることが判明した。

以上によって緑膿菌に試験管内である種の抗生剤間で相乗作用のあることが判明した。これは FIC 係数および集塊菌を用いての殺菌曲線で証明され、臨床に用いてみる価値があると思われる。

文 献

- 1) 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
- 2) ELION, G. B.; S. SINGER & G. H. HICHINGS: Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combination of biochemically related antimetabolites. *J. Biol. Chem.* 208: 477~488, 1954
- 3) PARSELY, T. L.; R. B. PROVONCHEE, C. GLICKSMAN & S. H. ZINNER: Synergistic activity of trimethoprim and amikacin against gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 12: 349~352, 1977
- 4) BUSCH, D. F.; V. L. SUTLER & S. M. FINEGOLD: Activity of combination of antimicrobial agents against *Bacteroides fragilis*. *J. Infect. Dis.* 133: 321~328, 1976
- 5) 富岡 一, 小林芳夫: グラム陰性菌に対する Sulbenicillin と Dibekacin の併用効果に関する研究. *Jap. J. Antibiotics* 29: 597~600, 1976
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) NEU, H. C.; N. J. MERPOL & K. P. FU: Antibacterial activity of ceftriaxone (Ro 13-

- 9904), a β -lactamase-stable cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 414~423, 1981
- 10) FASS, R. J.: Comparative *in vitro* activities of β -lactam-tobramycin combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and multidrug-resistant gram-negative enteric bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 1003~1006, 1982
- 11) WATANAKUNAKORN, C.: *In vitro* activity of ceftriaxone alone and in combination with gentamycin, tobramycin, and amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 305~306, 1983
- 12) 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[1] 臨床分離緑膿菌に対する Piperacillin, Ticarcillin と Dibekacin との *in vitro* 併用に関する実験的考察。 *Chemotherapy* 30: 149~153, 1982
- 13) 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 Aminoglycoside の併用に関する基礎的・臨床的研究。 *Chemotherapy* 30: 760~769, 1982
- 14) 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 [N] Fosfomycin と Dibekacin の各種病原細菌に対する *in vitro* 併用効果および呼吸器感染症に対する臨床的検討。 *Chemotherapy* 30: 781~785, 1982
- 15) NEU, H. C.; K. P. FU, N. ASWAPOKKEE, P. ASWAPOKKEE & K. KUNG: Comparative activity and β -lactamase stability of cefoperazone, a piperazine cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 150~157, 1979
- 16) PAVILLARD, E. R. & H. MILES: A study of cefoperazone alone and in combination with tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Therapeutics* 3: 134~138, 1980
- 17) HOOBKAMP- KORSTANJE, J. A. A.; C. M. POT & N. A. C. WESTERDAAL: *In vitro* activity of cefoperazone and penicillin alone and in combination with aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 8: 101~106, 1981

**PIPERACILLIN-CEFOPERAZONE-CEFSULODIN-FOSFOMYCIN-
TOBRAMYCIN SYNERGISM AGAINST
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

KOHKI TAKAHASHI and HARUSHIGE KANNO

Department of Laboratory Medicine, Chiba University
Hospital, Chiba, Japan

The effects of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* which is a main causal bacteria of the opportunistic infections were investigated. By means of the plate agar dilution checkerboard method, the combinations of PIPC+FOM, CPZ+FOM, and CFS+FOM were synergistic against 80.0, 85.0 and 82.6% of the strains tested. The mean fractional inhibitory concentration indices of PIPC+FOM, CPZ+FOM and CFS+FOM were 0.48, 0.42 and 0.46, respectively. Synergism of each two antibiotic combinations mentioned above were enhanced by the addition of a subinhibitory concentration of TOB (0.25 μ g/ml). The time-killing curve studies also showed marked bactericidal effects against the clinical isolated strains of *Pseudomonas aeruginosa*. These combinations may be useful for severe *Pseudomonas* infections.