

Cefotaxime とアミノ配糖体剤との試験管内 抗菌協力作用に関する検討

出口浩一・深山成美・西村由紀子・西家綾子
東京総合臨床検査センター研究部

(昭和 59 年 4 月 25 日受付)

Cefotaxime(CTX) と AGs(GM, AMK) との *in vitro* での抗菌協力作用を臨床分離株を用いて Checkerboard method(Agar dilution plate method) で検討した。

1) *P. aeruginosa* の CTX, AGs 感受性株を用いた成績は CTX+GM, CTX+AMK とともに部分的相乗効果を示した。

2) CTX, AGs に低感受性, もしくは耐性の *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *P. morgani*, *P. cepacia* に対して, CTX+GM, CTX+AMK の組合せはいずれも相乗効果を示した。これらの成績は菌種のちがいに影響されることがなかった。

3) β -lactam 系抗生剤+AGs の協力作用は β -lactamase 活性の抑制, 薬剤が菌体内に取り込まれやすくなることなどにより発現する可能性があることが推察できた。

4) CTX+AGs の併用は菌の最小発育阻止濃度 (MIC) を単独の場合に比較して減少させることができ, 臨床的有用性が高いと考えられる。

β -lactam 系抗生剤と AGs の試験管内抗菌協力作用(以下協力作用と略)に関する検討は, 近年多くの研究結果が報告されており, 相加もしくは相乗効果が確認されている¹⁻⁴⁾。しかし, その検討内容は PCs と AGs との協力作用に関するものが多く, CEPs と AGs に関する検討は PCs+AGs のそれと比較して必ずしも多いとはいえない。

そこで CEPs+AGs の協力作用を知る目的で抗菌スペクトラムが広く, かつ β -lactamase に安定性が高いといわれている Cefotaxime(CTX) と, AGs の代表として Gentamicin(GM), Amikacin(AMK) の臨床分離株に対する試験管内協力作用を Checkerboard method(Agar dilution plate method) で検討した。

I. 検討方法

(1) 使用薬剤

Cefotaxime (CTX, 日本ルセル), Gentamicin (GM, エセックス日本), Amikacin (AMK, 萬有) のいずれも力価の明らかなものを用いた。

(2) 供試菌株

当センター保存の以下の臨床分離株を用いた。

- 1) *P. aeruginosa* CTX, GM, AMK 感受性株
- 2) *P. aeruginosa* CTX, AMK 低感受性株
- 3) *P. aeruginosa* CTX, GM 耐性株
- 4) *S. marcescens* CTX, GM 耐性株

5) *S. marcescens* CTX, GM 低感受性株

6) *P. morgani* CTX, GM 耐性株

7) *P. cepacia* CTX, GM 耐性株

(3) 協力作用の測定および判定方法

MIC 測定用培地(栄研)を用いた Checkerboard dilution method によって, 2 剤を併用した場合の最小発育阻止濃度 (MIC) を求め, その結果から FIC index を算出した。接種菌量は 10^6 CFU/ml にて検討した。FIC index (Fractional Inhibitory Concentration index) は次に示す計算式により算出し, Table 1 に示すとおり, 相乗作用, 部分的相乗作用, 相加作用, 拮抗作用に分類した。

$$\text{FIC index} = \frac{\text{MIC of drug A in combination}}{\text{MIC of drug A alone}} + \frac{\text{MIC of drug B in combination}}{\text{MIC of drug B alone}}$$

II. 成績

CTX, GM 感受性, *P. aeruginosa* に対する CTX, GM にとの併用効果を Fig. 1 に, CTX, AMK 感受性 *P. aeruginosa* に対する CTX と AMK との併用効果を Fig. 2 に示した。また CTX, GM 低感受性 *P. aeruginosa* に対する CTX, GM との併用効果を Fig. 4 に示した。

CTX, GM あるいは AMK 感受性株に対する各薬剤間の協力作用は FIC index 0.750~0.756 で, 部分的相乗

Table 1 Degree of combined effect of antibacterial activities

FIC index ≤ 0.5	Synergistic
>0.5 FIC index <1.0	Partially synergistic
FIC index=1.0	Additive
>1.0 FIC index	Antagonistic

Fig. 1 Combination effect of CTX and GM against *P. aeruginosa* sensitive to both CTX and GM

Inoculum size: 10⁶CFU/ml

		Concentration of GM (μg/ml)				
		0.78	0.39	0.2	0.1	0
Concentration of CTX (μg/ml)	12.5	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	+	+
	3.13	-	-	+	+	+
	1.56	-	+	+	+	+
	0.78	-	+	+	+	+
	0.39	-	+	+	+	+
	0.2	-	+	+	+	+
	0.1	-	+	+	+	+
	0	-	+	+	+	+

- : No growth + : Growth
 □ : Effective area of combined action

Fig. 2 Combination effect of CTX and AMK against *P. aeruginosa* sensitive to both CTX and AMK

Inoculum size: 10⁶CFU/ml

		Concentration of AMK (μg/ml)					
		1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	0
Concentration of CTX (μg/ml)	12.5	-	-	-	-	-	
	6.25	-	-	-	+	+	+
	3.13	-	-	+	+	+	+
	1.56	-	+	+	+	+	+
	0.78	-	+	+	+	+	+
	0.39	-	+	+	+	+	+
	0.2	-	+	+	+	+	+
	0.1	-	+	+	+	+	+
	0	-	+	+	+	+	+

- : No growth + : Growth
 □ : Effective area of combined action

作用であった (Fig. 1, 2)。しかし、薬剤に低感受性または耐性の株になると、その協合作用はほとんどの濃度の組合せで FIC index 0.094~0.188 となり、相乗作用を示した (Fig. 3, 4)。また、以上の菌株に対する CTX

Fig. 3 Combination effect of CTX and AMK against *P. aeruginosa* moderately sensitive to both CTX and AMK

Inoculum size: 10⁶CFU/ml

		Concentration of AMK (μg/ml)							
		50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
Concentration of CTX (μg/ml)	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	+
	25	-	-	-	-	-	+	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	+	+	+
	6.25	-	-	-	-	+	+	+	+
	3.13	-	-	-	+	+	+	+	+
	1.56	-	-	+	+	+	+	+	+
	0.78	-	+	+	+	+	+	+	+
	0	-	+	+	+	+	+	+	+

- : No growth + : Growth
 □ : Effective area of combined action

Fig. 4 Combination effect of CTX and GM against *P. aeruginosa* resistant to both CTX and GM

Inoculum size: 10⁶CFU/ml

		Concentration of GM (μg/ml)										
		1600	800	400	200	100	50	25	1.25	6.25	3.13	0
Concentration of CTX (μg/ml)	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	25	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	6.25	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	3.13	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- : No growth + : Growth
 □ : Effective area of combined action

の MIC, AGs の MIC, 相乗効果を示した組合せの CTX, AGs の MIC, FIC index を Table 2 に示した。

以上の試験の結果は CTX と GM あるいは AMK との併用効果については拮抗作用が否定できること、両剤に低感受性もしくは耐性の株を用いた方が両剤の協合作用がより明瞭に発現することを示唆していたので、その後は薬剤に低感受性もしくは耐性の株を選び、それらの株を用いて同様の検討を行なった。

CTX, GM に耐性の *S. marcescens*, *P. morgani* および *P. cepacia* に対する CTX, GM との併用効果を Fig. 5, 7, 8 に示し, CTX, AMK に低感受性の *S.*

Table 2 Calculation of FIC index

Organism	CTX alone a_0	GM alone b_0	CTX-GM combination a/b	FIC index $\frac{a}{a_0} + \frac{b}{b_0}$
<i>P. aeruginosa</i> sensitive to both CTX and GM	12.5	0.78	3.13/0.39	0.750
			6.25/0.2	0.756
		AMK alone	CTX-AMK combination	FIC index
<i>P. aeruginosa</i> sensitive to both CTX and AMK	12.5	1.56	3.13/0.78	0.750
			6.25/0.39	0.750
<i>P. aeruginosa</i> moderately sensitive to both CTX and AMK	100	50	1.56/25	0.510
			3.13/12.5	0.281
			6.25/6.25	0.188
			12.5/3.13	0.188
			25/1.56	0.281
		GM alone	CTX-GM combination	FIC index
<i>P. aeruginosa</i> resistant to both CTX and GM	1,600	800	6.25/400	0.504
			12.5/200	0.258
			25/100	0.141
			50/50	0.094
			100/25	0.094
			200/12.5	0.141
400/6.25	0.258			
<i>S. marcescens</i> resistant to both CTX and GM	400	1,600	6.25/100	0.078
			12.5/50	0.063
			25/25	0.078
			50/12.5	0.133
			100/6.25	0.254
		AMK alone	CTX-AMK combination	FIC index
<i>S. marcescens</i> moderately sensitive to both CTX and AMK	100	50	1.56/25	0.516
			3.13/12.5	0.281
			6.25/6.25	0.188
			12.5/3.13	0.188
			25/1.56	0.281
		GM alone	CTX-GM combination	FIC index
<i>P. morgani</i> resistant to both CTX and GM	800	400	6.25/200	0.508
			12.5/100	0.266
			25/50	0.156
			50/25	0.125
			100/12.5	0.156
			200/6.25	0.266
<i>P. cepacia</i> resistant to both CTX and GM	400	1,600	12.5/100	0.094
			25/50	0.094
			50/25	0.141
			100/12.5	0.258

Fig. 5 Combination effect of CTX and GM against *S. marcescens* resistant to both CTX and GM

		Inoculum size : 10 ⁸ CFU/ml								
		Concentration of GM (μg/ml)								
		400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	0
Concentration of CTX (μg/ml)	800	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	200	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	100	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	50	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	25	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	6.25	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	3.13	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	0	-	+	+	+	+	+	+	+	+

- : No growth + : Growth
 □ : Effective area of combined action

Fig. 6 Combination effect of CTX and AMK against *S. marcescens* moderately sensitive to both CTX and AMK

		Inoculum size : 10 ⁸ CFU/ml							
		Concentration of AMK (μg/ml)							
		50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
Concentration of CTX (μg/ml)	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	+
	25	-	-	-	-	-	-	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	+	+	+
	6.25	-	-	-	-	+	+	+	+
	3.13	-	-	-	-	+	+	+	+
	1.56	-	-	+	+	+	+	+	+
	0.78	-	+	+	+	+	+	+	+
	0	-	+	+	+	+	+	+	+

- : No growth + : Growth
 □ : Effective area of combined action

marcescens に対する CTX と AMK の併用効果を Fig. 6 に示した。

S. marcescens, *P.morganii* と *P.cepacia* のいずれの菌種を用いても FIC index が CTX, AMK 低感受性株で 0.188~0.516, CTX, GM 耐性株で 0.063~0.508 となり, 前記の成績と同様に相乗作用が認められた。

特徴としては, 薬剤が異なっても感受性菌のグループ, 低感受性菌のグループ, 耐性菌のグループに対する両薬剤の感受性のパターンは, それぞれのグループごとにはほぼ共通であった。

Fig. 7 Combination effect of CTX and GM against *P.morganii* resistant to both CTX and GM

		Inoculum size : 10 ⁸ CFU/ml									
		Concentration of GM (μg/ml)									
		800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	0
Concentration of CTX (μg/ml)	1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	200	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	100	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	50	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	25	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	6.25	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3.13	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

- : No growth + : Growth
 □ : Effective area of combined action

Fig. 8 Combination effect of CTX and GM against *P.cepacia* resistant to both CTX and GM

		Inoculum size : 10 ⁸ CFU/ml									
		Concentration of GM (μg/ml)									
		1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	0
Concentration of CTX (μg/ml)	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	50	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	12.5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	6.25	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- : No growth + : Growth
 □ : Effective area of combined action

III. 考 察

β-lactam 系抗生剤と aminoglycoside 系抗生剤との協力作用についてはこれまで数多くの報告がある¹⁻⁸⁾。

青沼らは PIPC+DKB¹⁾, TIPC+DKB¹⁾, CFS+DKB²⁾ の併用作用に関して, PCs あるいは CFS 単独の MIC が高い株の方が MIC または MBC で求めた FIC index, または FBC index が双方とも小さな値を示し, 併用効果が認められたとしている。二橋らも CB PC+Astromicin(ASTM) の協力作用の検討³⁾で Astromicin (ASTM) に耐性である *P. aeruginosa* に相乗作用を認めている。また MURRAY⁷⁾ も *P. aeruginosa* を接種菌として CTX+AGs の併用効果をみたときに, CTX+GM, CTX+TOB, CTX+AMK では *P. aeru-*

ginosa に対する MIC を薬剤単独の時よりも明らかに減少させることができ、特に GM に強い耐性を示す株に著明な CTX+GM の相乗効果を認めている。これらは菌の耐性の程度が *in vitro* における相乗効果発現に影響をあたえる可能性があることを示唆している。

本研究では CTX と AGs (GM, AMK) に感受性、低感受性あるいは耐性を示す菌株を用いて菌の耐性の程度が併用効果に及ぼす影響を検討したが、*P. aeruginosa* を接種菌とした場合、CTX あるいは AGs に強い耐性を示す株に著明な相乗作用が認められた。また、これらは、*S. marcescens*, *P. morgani*, および *P. cepacia* においても認められており、菌種が異なっても、FIC index を指標とした相乗効果は菌の耐性の程度に依存している可能性を示唆している。

林ら⁹⁾は CER 高度耐性 *E. cloacae* で微量の GM, CP を併用したときに、 β -lactamase, タンパク合成が抑制されたとしている。また真山ら⁴⁾は *E. coli* と *K. pneumoniae* を用い、TOB と CET を同時に作用させた場合に併用効果が最も強く、次いで CET 作用後に TOB を作用させた場合で、TOB 作用後に CET を作用させた場合が最も併用効果が弱かったとしている。

斎藤ら⁸⁾は SISO および DKB に CTT, CTX, LMOX あるいは CFS を併用した場合の相乗効果発現の理由として、 β -lactam 系薬剤により AGs が菌体内に取り込まれやすくなったためであろうと推察している。本研究の CTX と AGs を併用した場合の相乗効果も、併用により薬剤が菌体内に取り込まれやすくなったこと、また併用により β -lactamase, AGs 不活化酵素の産生により菌の耐性化の要因が抑制されたことによるのではないかと推察される。しかしその詳細については不明である。

近年、新しい抗生物質の開発は目ざましいものがある。しかし重度の感染症に対する化学療法では、基礎疾患や抵抗力の低下、耐性菌の多様化などにより治療が困難な症例も多いといわれており、抗生剤の併用療法も試みられている。J. KLASTERSKY ら¹⁰⁾は好中球減少マウスに sub effective dose を用いた場合、CTX, AMK 単独薬剤治療群と比較して、CTX, AMK 併用時に明らかな併用効果を認めている。薬剤の併用により菌の発育を阻止するのに要する薬剤濃度が単独の場合よりも減少することは、血中濃度や組織内濃度が MIC 以下のため単独では効果が期待できない場合でも、併用により効果が期待できる場合もあることが考えられる。しかしながら臨床での適用に際しては、薬剤の血中濃度半減期、組織内への移行性などを考慮した配合比の設定や、腎毒性などの副作用の発現などについて、*in vivo* での研究を行なう

必要があると思われる。

文 献

- 1) 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], 臨床分離細菌菌に対する Piperacillin, Ticarcillin, Dibekacin との *in vitro* 併用効果に関する実験的考察. *Chemotherapy* 30: 149~153, 1982
- 2) 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 [II], 細菌菌に対する, Cefsulodin と Aminoglycoside の併用に関する基礎的, 臨床的研究. *Chemotherapy* 30: 771~775, 1982
- 3) 二橋 道, 辻 明良, 五島雅智子: *P. aeruginosa* における Astromycin(KW-1070) と Carbenicillin との併用効果の検討. *Chemotherapy* 31: 29~35, 1983
- 4) 真山三雄雄, 永田 弘, 青井いずみ: *in vitro* における Tobramycin と Cephalothin, Carbenicillin との併用作用. *Jap. J. Antibiotics* 31: 153~165, 1978
- 5) 斎藤正人, 吾妻共子, 西野武志, 谷野舞雄: *E. coli* と *S. marcescens* 及び *P. aeruginosa* に対する Sisomycin, Dibekacin と Cefotetan, Cefotaxime, Latamoxef, Cefsulodin 間の併用に関する細菌学的研究. *Jap. J. Antibiotics* 36: 2833~2843, 1983
- 6) OHASHI, Y.; H. KAWABE, K. SATO, N. NAKAMURA, S. KURASHIGE & S. MITSUHASHI: Fortimicin A. a new aminoglycoside antibiotic. In *Microbial Drug Resistance II*. S. MITSUHASHI (ed.) Japan Scientific Societies Press. Univ. Park.
- 7) MURRAY, PATRIC R.: Activity of Cefotaxime-Aminoglycoside combination against Aminoglycoside-resistant *Pseudomonas*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Mar. 1980 474~476
- 8) KLASTERSKY, J. et al.: Cefotaxime and Amikacin: result of *in vitro* and *in vivo* studies against Gramnegative bacteria and *S. aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 6 (Suppl. A): 55~61, 1980
- 9) 林 弘美, 西谷 肇, 小松 喬, 国井乙彦: CER 耐性菌における CER と GM の併用および CER と CP の併用時の協力効果について. 第 29 回日本化学療法学会東日本支部総会一般演題. *Chemotherapy* 31: 395~396, 1983
- 10) 小林芳夫, 小沢幸雄, 山上憲一, 富岡 一, 内田博, 安藤泰彦: Cefotaxime に関する基礎的臨床的検討. *Chemotherapy* 28: 237~242, 1980
- 11) 横田 健: 新しい抗生物質の使い方, その基礎と理論, 耐性の生化学的しくみ, 1. β -lactam 系薬剤に対する耐性のしくみ. pp. 27~33, ライフサイエンス, 1983

COMBINED EFFECTS OF CEFOTAXIME WITH AMINOGLYCOSIDES *IN VITRO*

KŌICHI DEGUCHI, SHIGEMI FUKAYAMA,

YUKIKO NISHIMURA and AYAKO NISHIKE

Research Department, Tokyo Clinical Research Center

The combined *in vitro* antibacterial effects of cefotaxime (CTX) and aminoglycosides (AGs) were studied by the checkerboard method, using clinical isolates.

1. Combinations of CTX plus gentamicin (GM) and CTX plus amikacin (AMK) showed partial synergism against *P. aeruginosa* sensitive to CTX, GM and AM.

2. Combinations of CTX plus GM and CTX plus AMK showed synergism against *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *P.morganii* and *P. cepacia* which are all weakly sensitive or resistant to CTX, GM and AMK. These results indicated that the difference in species did not influence the synergism.

3. It can be surmised that the synergistic action of β -lactam antibiotics with AGs may be revealed to be in accordance with a certain mechanism of action.

4. Since the concomitant use of CTX with AGs can decrease the minimum inhibitory concentration (MIC) of these drugs against resistant strains compared with that obtained with their separate use, it can be considered that these combinations would have high clinical utility.