

Piperacillin と β -lactam 剤の *in vitro* 併用効果

南 新三郎・中島博美・熊野克彦・渡辺泰雄

保田 隆・高井 明・才川 勇

富山化学工業株式会社総合研究所

(昭和 59 年 8 月 16 日受付)

Piperacillin (PIPC) と他の β -lactam 剤との *in vitro* 併用効果を検討した。

1. *Enterobacter cloacae* H-27, *Proteus vulgaris* T-178, および *Klebsiella pneumoniae* Y-4 を用いた Disk approximation test の結果から, β -lactamase を誘導的に産生する *E. cloacae* H-27, ならびに *P. vulgaris* T-178 では検討した 25 の β -lactam 剤の半数以上が PIPC に対し拮抗的に作用することが明らかになった。構成的に Penicillinase を産生する *K. pneumoniae* Y-4 では PIPC と他の β -lactam 剤の間に相互作用は認められなかった。

2. Disk approximation test に用いた 25 剤の中から Cephem 系 5 剤 (Cefazolin (CEZ), Cefmetazole (CMZ), Cefoperazone (CPZ), Cefbuperazone (CBPZ), Latamoxef (LMOX)) を選び, PIPC との相互作用を Checkerboard dilution method でさらに詳細に検討した。PIPC と CEZ, CMZ の組合せでは *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* で相乗効果がわずかに認められた。また, β -lactamase を誘導的に産生する *Enterobacter*, *Serratia marcescens*, indole 陽性 *Proteus* 属, *Pseudomonas aeruginosa* では 25~72% の範囲で著明な拮抗作用が認められた。一方, PIPC と CPZ, CBPZ, LMOX の組合せでは試験したすべてのグラム陰性桿菌に対して拮抗および相乗の両効果が低頻度で認められた。グラム陽性菌の Methicillin (DMPPC) 感受性の *Staphylococcus aureus* や *Streptococcus faecalis* に対しては PIPC と CMZ, CBPZ, LMOX との組合せで 37% 以上の株で相乗作用が認められた。DMPPC 耐性 *S. aureus* に対しては PIPC と Cephem 系 5 剤との間で 60% 以上の株で相乗作用が認められた。

3. 相乗および拮抗の両作用は殺菌曲線においても確認された。

4. *E. cloacae* GN 5797 に対する PIPC と CMZ の拮抗作用の解析から, 拮抗作用の原因として Cephalosporinase の誘導による薬剤の不活化が推定された。

β -lactam 剤と aminoglycoside との併用に関しては *in vitro*, *in vivo* および臨床を含め多くの報告がある¹⁻⁷⁾。しかしながら近年, 多くの β -lactam 剤が開発され, 臨床の場において β -lactam 剤間の併用が頻繁に行なわれているにもかかわらず, その基礎的検討は未だ不充分のように思われる。そこで筆者らは今回 PIPC を選び, 他の β -lactam 剤との *in vitro* 併用効果, ならびにその作用機序についても若干の検討を加えたので報告する。

I. 材料および方法

1. 使用菌株

臨床材料より分離された下記 8 菌株 274 株を実験に供した。*Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*), インドール陽性 *Proteus* 属 (*P. vulgaris*, *P. morganii*), *Enterobacter*, *Serratia marcescens* (*S.*

marcescens), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus faecalis* (*S. faecalis*).

2. 使用薬剤

以下に示す Penicillin 系 11 剤, Cephalosporin 系 11 剤, Cephamycin 系 3 剤, Oxa-cephalosporin 系 1 剤を使用した。

Penicillin ; Piperacillin (PIPC, 富山化学工業), Ampicillin (ABPC, 富山化学工業), Mezlocillin (MZPC, 吉富製薬), Carbenicillin (CBPC, 藤沢薬品工業), Cloxacillin (MCIPC, 藤沢薬品工業), Sulbencillin (SBPC, 武田薬品工業), Penicillin G (PCG, 明治製薬), Oxacillin (MPIPC, 萬有製薬), Methicillin (DMPPC, 萬有製薬), Dicloxacillin (MDIPC, 萬有製薬), Ticarcillin (TIPC, ビーチャム薬品)。

Cephalosporin ; Cefoperazone (CPZ, 富山化学工

業), Cefotaxime (CTX, 中外製薬), Ceftezole (CTZ, 中外製薬), Ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業), Cefazolin (CEZ, 藤沢薬品工業), Cefmenoxime (CMZ, 武田薬品工業), Cefsulodin (CFS, 武田薬品工業), Cefotiam (CTM, 武田薬品工業), Cephalothin (CET, 塩野義製薬), Cephaloridine (CER, 鳥居薬品), Cefuroxime (CXM, 新日本薬業)。

Cephameycin; Cefbuperazone (CBPZ, 富山化学工業), Cefmetazole (CMZ, 三共), Cefoxitin (CFX, 第一製薬)。

Oxa-cephalosporin; Latamoxef (LMOX, 塩野義製薬)。

3. 併用効果の検討

i) Disk approximation test (近接ディスク法)

SANDERS ら⁹⁾の方法を参考にした。PIPC のディスク中含量はおよそ 30 mm の阻止円を形成するように設定し, *K. pneumoniae* Y-4 では 250 µg/disk, *E. cloacae* H-27 および *P. vulgaris* T-178 では 25 µg/disk とした。併用薬剤のディスク中含量は阻止円を形成しない最大濃度に調製したが抗菌力の弱い薬剤については 250 µg/disk を上限とした。培地上に併用薬剤のディスクを PIPC の予想される阻止円径よりも外側に置き, 37°C, 一夜培養後, PIPC の阻止円径が 3 mm 以上拡大した場合を相乗作用, 同様に 3 mm 以上縮小した場合を拮抗作用と判定した (Fig. 1)。なお培地は Heart infusion agar (HIA, 栄研) に最終菌濃度が 10⁶ cells/ml になるように各菌を混合したものをを用いた。

ii) Checkerboard dilution method

MOELLING & KROGSTAD らの方法⁹⁾に従って行なった。被検菌をペプトン水, または Brain heart infusion broth (BHIB, 日水) で一夜培養後, 生理食塩水で 10⁶ cells/ml に希釈し, 薬剤含有 Müller hinton agar (MHA, 栄

研) 平板上にマイクロプランター (佐久間製作所) を用いて一白金耳 (約 0.005 ml) 接種した。37°C, 18 時間培養後, 被検菌の発育が見られない最小濃度を MIC とした。併用効果は Checkerboard から下記に示す式に従い Fractional inhibitory concentration (FIC) index を求め, 0.5 以下の場合を相乗作用, 4 以上を拮抗作用と判定した。

(A 剤と B 剤の併用)

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

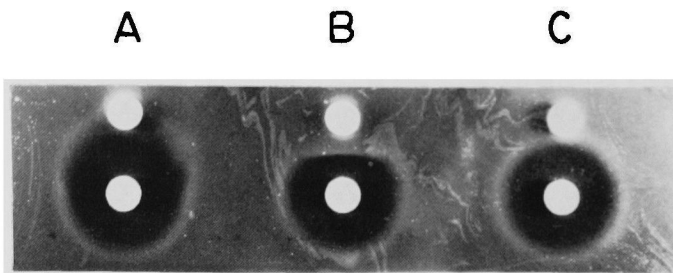
iii) 殺菌曲線に及ぼす影響

被検菌株を HIA 平板上にて一夜培養後, 10⁴~10⁶ cells/ml となるように Nutrient broth (NB, 栄研) に接種し, 薬剤を添加した。薬剤は Checkerboard dilution method で顯著に相乗および拮抗作用を示した PIPC と CMZ の組合せを選び, *S. aureus* F-188 では PIPC 0.2 µg/ml (1/8 MIC), CMZ 0.39 µg/ml (1/4 MIC), *E. coli* TK-4 では PIPC 0.2 µg/ml (1/4 MIC), CMZ 0.2 µg/ml (1/4 MIC), *E. cloacae* GN 5797 では PIPC 12.5 µg/ml (8 MIC), CMZ 25 µg/ml (1/32 MIC) で作用させ, 経時的に生菌数を測定した。

拮抗作用を示した *E. cloacae* GN 5797 の場合, 同時に菌体中 β-lactamase 活性, および培養液中薬剤濃度も測定した。菌体中 β-lactamase 活性は Sonic extracts を用いた常法で, 蛋白濃度を Bovine Serum Albumin (シグマ) を standard とする Lowry 法¹⁰⁾で測定し, 比活性で表わした。

また, 経時的にサンプリングした培養液 (0.5 ml) に直ちに同量のメタノールを加え, 3,000 rpm, 20 分間遠心し, 上清中の薬剤濃度を高速液体クロマトグラフィー

Fig. 1 Disk approximation test. *E. cloacae* H-27 was inoculated into HIA plate to give an inoculum of 10⁶ cells/ml. Lower disks contained 25 µg of PIPC.



- (A) Synergism : Upper disk contained 250 µg of DMPPC.
 (B) Antagonism : Upper disk contained 2.5 µg of CMZ.
 (C) Indifference : Upper disk contained 0.25 µg of CPZ.

で測定した。

4. β -lactamase assay

β -lactamase 活性は UV 法¹¹⁾、およびマイクロロード法¹²⁾で測定し、30°C、0.05 M phosphate buffer (PB, pH7.0) 中で1分間に 1 μ mole の基質を分解するのに必要な酵素量を 1 unit とした。

5. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

PIPC、および CMZ 濃度は高速液体クロマトグラフ (島津製作所, LC-8 型) を用いて測定した。固定相として LiChrosorb RP-18 を用い、移動相は PIPC の場合、アセトニトリル (220 ml)、1 M 酢酸 (14 ml)、1 M トリエチルアミン・酢酸溶液 (27 ml) の混合液に蒸留水を加え 1,000 ml とした溶液を用いた。また、CMZ 測定用にはアセトニトリルの量を 145 ml とした。測定は室温で行ない、流速 2 ml/min とし、検出は 254 nm の UV 吸収の測定で行なった。

6. 位相差顕微鏡による菌の形態変化の観察

NB で一夜培養した *E. coli* TK-4、および *E. cloacae* GN 5797 の菌液を Heart infusion broth (HIB, 栄研) で 100 倍希釈し、37°C で約 2 時間振盪を行ない、対数増殖期となった菌液の 1 白金耳をスライドガラス上に作製した薬剤含有 HIA 上に塗抹し、37°C で培養後位相差顕微鏡 (日本光学) によって形態変化を観察した。薬剤濃度は Checkerboard dilution method によって顕著に相乗および拮抗作用を示した PIPC と CMZ の組合せを選び、*E. coli* TK-4 では PIPC 0.2 μ g/ml (1/8 MIC)、CMZ 0.1 μ g/ml (1/8 MIC)、*E. cloacae* GN

5797 では PIPC 12.5 μ g/ml (8 MIC)、CMZ 25 μ g/ml (1/32 MIC) で行なった。

7. β -lactamase 誘導活性

すでに報告した方法¹³⁾に従い、被検菌の一夜培養液を HIB で 10 倍希釈し、37°C、2 時間振盪培養後、各薬剤 10 μ g/ml を加え更に 2 時間培養後集菌した。菌体から Sonic extracts を作製し、マイクロロード法¹²⁾を用いて酵素活性を、Lowry 法¹⁰⁾を用いて蛋白濃度を測定した。

II. 結 果

1. Disk approximation test による検討

K. pneumoniae Y-4 (constitutive Penicillinase 産生株)、*P. vulgaris* T-178 (inducible Cephalosporinase 産生株)、*E. cloacae* H-27 (inducible Cephalosporinase 産生株) を用いて PIPC と β -lactam 剤の相互作用を Disk approximation test によって検討した結果を Table 1 に示す。

K. pneumoniae Y-4 では PIPC はいずれの薬剤に対しても無作用であったが、*P. vulgaris* T-178 ではほとんどの薬剤で拮抗作用が認められた。*E. cloacae* H-27 では DMPPC, MIPIC, MCIPC, MDIPC の Penicillin 間で顕著な相乗作用が、また LMOX, CBPZ で弱い相乗作用が認められた。拮抗作用は PCG, ABPC, CET, CER, CEZ, CTZ, CFS, CMZ, CFX で認められた。

以上、*P. vulgaris* T-178、*E. cloacae* H-27 の両株に対して PIPC との組合せで無作用であった薬剤は MZPC, SBPC, CTX, CZX, CMX, CPZ の 6 剤であ

Table 1 Combination effect of PIPC and other β -lactams in disk approximation tests

Test strains	Drugs showing following effect		
	Synergism ^a	Antagonism ^b	Indifference
<i>K. pneumoniae</i> Y-4 (MIC: 50 μ g/ml) ^c			PCG, ABPC, MIPIC, DMPPC, MCIPC, MDIPC, MZPC, CBPC, SBPC, TIPC, CET, CER, CEZ, CTZ, CXM, LMOX, CZX, CMX, CFS, CMZ, CFX, CPZ, CBPZ, CTX
<i>P. vulgaris</i> T-178 (MIC: 3.13 μ g/ml)		PCG, ABPC, DMPPC, MIPIC, MCIPC, CBPC, TIPC, CET, CER, CEZ, CTZ, CXM, LMOX, CTM, CFS, CMZ, CFX, CBPZ	MDIPC, MZPC, SBPC, CTX, CZX, CMX, CPZ
<i>E. cloacae</i> H-27 (MIC: 12.5 μ g/ml)	DMPPC, MIPIC, MCIPC, MDIPC, LMOX, CBPZ	PCG, ABPC, CET, CER, CEZ, CTZ, CFS, CMZ, CFX,	MZPC, CBPC, SBPC, TIPC, CXM, CTM, CTX, CZX, CMX, CPZ

^a Synergism was defined as an enlargement of the zone of PIPC in the close vicinity of other β -lactams.

^b Antagonism was defined as a decrease of the zone of PIPC in the close vicinity of other β -lactams.

^c MICs of PIPC were determined by agar dilution method using inoculum of one loopful of 10^6 cells/ml.

Fig. 2 Combination effect of PIPC and five cepheids on the clinical isolates

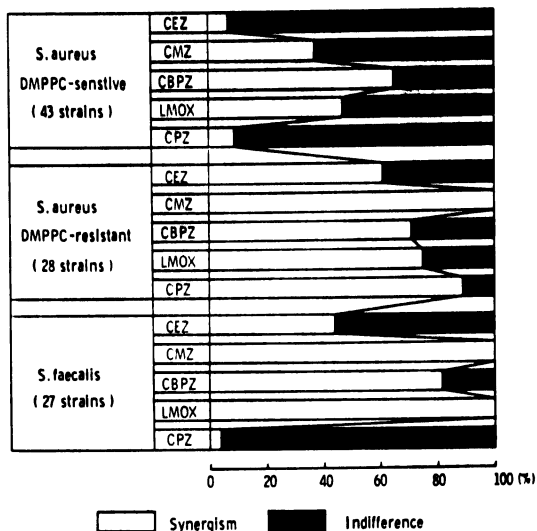
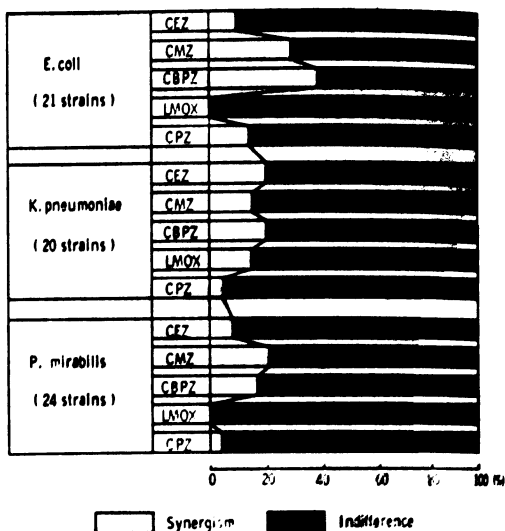


Fig. 3 Combination effect of PIPC and five cepheids on the clinical isolates



り、他の薬剤では菌によって相乗あるいは拮抗作用が認められた。

2. Checkerboard dilution method による検討

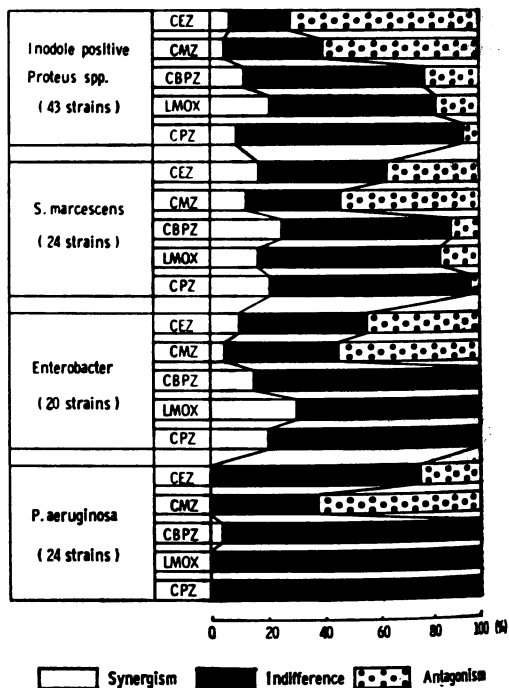
Disk approximation test で *E. cloacae* H-27, *P. vulgaris* T-178 に対して顕著な拮抗作用を示した CEZ および CMZ, *E. cloacae* H-27 で相乗, *P. vulgaris* T-178 で拮抗作用を示した LMOX および CBPZ, 両菌種共に無作用であった CPZ を選び、PIPC との併用効果を Checkerboard dilution method で検討した。

DMPPC 感受性 *S. aureus* 43 株に対して PIPC は CMZ, CBPZ, および LMOX との併用で 37~60% の範囲で相乗効果が認められたが、CEZ, CPZ との間には相乗効果がほとんど認められなかった。さらに DMPPC 耐性 *S. aureus* 28 株に対してはいずれの併用においても 60% 以上の高率で相乗作用が認められ、拮抗作用は認められなかった。また、*S. faecalis* 27 株に対しては PIPC は CPZ を除き、他のすべての薬剤との間に相乗効果が認められた (Fig. 2)。

β -lactamase を誘導しない *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* では一部を除き全般に相乗作用は低率で、また拮抗作用は認められなかった (Fig. 3)。

誘導的に β -lactamase を産生する indole 陽性 *Proteus* 属, *S. marcescens*, *Enterobacter*, *P. aeruginosa* ではいずれの菌種においても相乗作用は低率であったが、PIPC と CEZ または CMZ では拮抗作用が高率に認められた。CBPZ, LMOX, CPZ 等の第 3 世代の薬剤との間には拮抗作用の頻度は低かった (Fig. 4)。

Fig. 4 Combination effect of PIPC and five cepheids on the clinical isolates



そこで、相乗作用を示した代表例として DMPPC 耐性 *S. aureus* を、拮抗作用を示した代表例として誘導的な β -lactamase 産生菌種を選び、相乗または拮抗作用を示した株の、最も強く各作用を示した併用時の MIC の

平均値を求め、薬剤単独時の MIC の平均値と比較した。

DMPPC 耐性 *S. aureus* に対して PIPC 単独では 263~603 $\mu\text{g/ml}$ と高い平均 MIC 値を示したが、セフェム系薬剤と併用することによってその MIC 値は 32~132 $\mu\text{g/ml}$ となった。また、セフェム系薬剤はすべて

PIPC 単独より優れた抗菌力であったが (MIC 6.0~46 $\mu\text{g/ml}$)、PIPC との併用により更に増強された (Table 2)。

誘導的に β -lactamase を産生する菌種のうち indole 陽性 *Proteus* 属、*S. marcescens* の 2 菌種において PIPC と試験したすべての Cephem 剤との間に拮抗作用

Table 2. Geometric mean MICs of PIPC alone and in combination with several cephem in checkerboard methods against DMPPC-resistant *Staphylococcus aureus*

Cephem	No. of strains showing synergism	Geometric mean MIC* ($\mu\text{g/ml}$)			
		PIPC		Cephem	
		Alone	Combination	Alone	Combination
CEZ	17	603	132	24	3.7
CMZ	28	447	51	6.0	0.66
CBPZ	20	263	35	43	3.6
LMOX	21	288	32	40	3.0
CPZ	25	468	69	46	5.3

* Geometric mean MICs (were calculated from) MICs of strains showing synergism.

Table 3 Geometric mean MICs of PIPC alone and in combination with several cephem in checkerboard methods against gram-negative bacilli

Organism	Cephem	No. of strains showing antagonism	Geometric mean MIC* ($\mu\text{g/ml}$)			
			PIPC		Cephem	
			Alone	Combination	Alone	Combination
Indole positive <i>Proteus</i> spp.	CEZ	31	0.78	16	195	251
	CMZ	26	1.0	13	3.5	3.8
	CBPZ	10	2.4	14	2.2	2.4
	LMOX	8	2.2	14	0.28	0.42
	CPZ	3	0.78	0.78	2.0	7.9
<i>S. marcescens</i>	CEZ	9	2.0	19	$\geq 2,570$	$\geq 2,570$
	CMZ	13	5.6	50	15	18
	CBPZ	3	50	56	0.39	2.5
	LMOX	4	240	562	2.6	7.5
	CPZ	1	6.3	50	25	25
<i>Enterobacter</i>	CEZ	9	3.1	14	$\geq 3,200$	$\geq 3,200$
	CMZ	11	2.1	15	57	69
	CBPZ	0	—	—	—	—
	LMOX	0	—	—	—	—
	CPZ	0	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	CEZ	6	3.5	22	$\geq 2,040$	$\geq 2,040$
	CMZ	15	3.6	20	1,820	2,000
	CBPZ	0	—	—	—	—
	LMOX	0	—	—	—	—
	CPZ	0	—	—	—	—

* Geometric mean MICs were calculated from MICs of strains showing antagonism geometrically.

が認められた (Table 9)。indole 陽性 *Proteus* 属においては CPZ を除いた他の Cephem 剤との併用では PIPC の平均 MIC が 5.8~21 倍上昇したが Cephem 剤の平均 MIC はほとんど変化しなかった。CPZ との併用では PIPC の平均 MIC は変らずに CPZ の平均 MIC が約 4 倍上昇し、他の 4 剤と異なるパターンを示した。*S. marcescens* においては CEZ, CMZ ならびに CPZ との併用では PIPC の平均 MIC が 7.9~9.5 倍上昇し Cephem 剤の平均 MIC はほとんど変化しなかった。CBPZ および LMOX との併用では PIPC の平均 MIC はほとんど変化せず、CBPZ では約 6.4 倍、LMOX では約 2.9 倍平均 MIC が上昇した。*E. cloacae* および *P. aeruginosa* の 2 菌種では CEZ ならびに CMZ との間でのみ拮抗作用が認められ、PIPC の平均 MIC が 4.5~7.1 倍上昇し、CEZ および CMZ の平均 MIC はほとんど変化しなかった。

3. 殺菌曲線に及ぼす影響

前項の Checkerboard dilution method の結果から CMZ に対して相乗作用を示した *S. aureus* F-188, *E. coli* TK-4, および拮抗作用を示した *E. cloacae* GN 5797 を用いて PIPC との併用時の殺菌曲線に及ぼす影響を調べた。なお、薬剤濃度は各作用が最も強く現われた濃度を選んだ。

S. aureus F-188 に対して PIPC (0.2 $\mu\text{g/ml}$, 1/8 MIC), および CMZ (0.39 $\mu\text{g/ml}$, 1/4 MIC) 単独群は control に比べ、やや緩やかながら増殖が認められた。併用群は薬剤添加 3 時間後まで抑制していたが、その後殺菌的に推移し、併用による相乗作用が認められた (Fig. 5, A)。

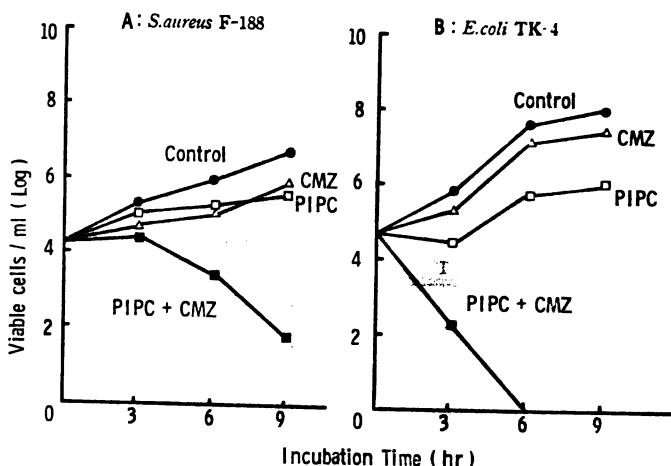
E. coli TK-4 に対して CMZ 単独群 (0.2 $\mu\text{g/ml}$, 1/4 MIC) は control と同様な増殖が認められた。また、PIPC 単独群 (0.2 $\mu\text{g/ml}$, 1/4 MIC) は薬剤添加 3 時間後まで抑制していたが、その後は再増殖がみられた。しかしながら併用群は 3 時間後には生菌数が 1/100 以下まで低下し、その後は検出限界以下となり、*S. aureus* F-188 と同様、併用による相乗効果が確認された (Fig. 5, B)。

E. cloacae GN 5797 に対して CMZ 単独群 (25 $\mu\text{g/ml}$, 1/32 MIC) は control とほぼ同様に増殖し、殺菌性は認められなかった。PIPC 単独群 (12.5 $\mu\text{g/ml}$, 8 MIC) では殺菌的に推移したのに比べ、併用群は薬剤添加 3 時間後まで生菌数は減少したが、その後は再増殖が認められ、併用による拮抗作用が認められた (Fig. 6, A)。

4. β -lactamase 産生と薬剤残存活性

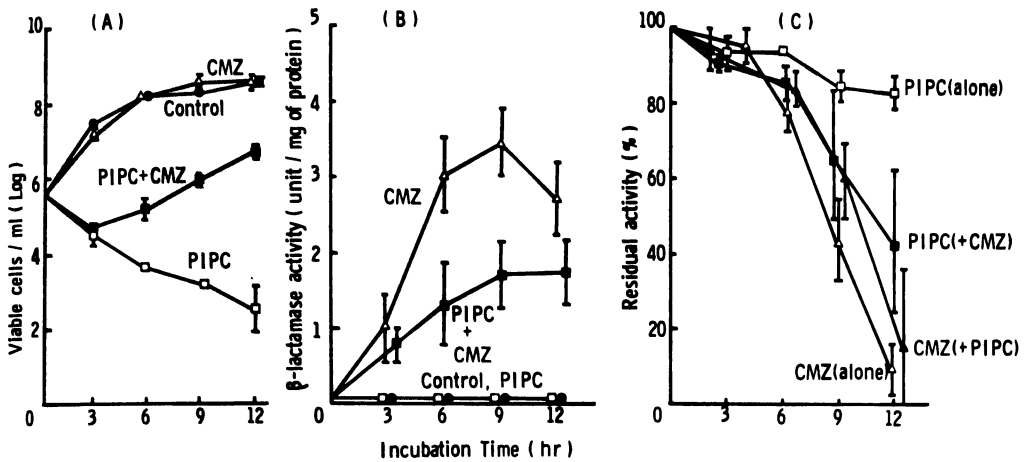
E. cloacae GN 5797 で認められた拮抗作用の原因*

Fig. 5 Killing curve of PIPC combined with CMZ against *S. aureus* F-188 and *E. coli* TK-4



A : PIPC (0.2 $\mu\text{g/ml}$, 1/8 MIC) and CMZ (0.39 $\mu\text{g/ml}$, 1/4 MIC) were added singly or in combination to the culture of *S. aureus* F-188 (2×10^4 cells/ml) and the standing culture was continued at 37°C.

B : PIPC (0.2 $\mu\text{g/ml}$, 1/4 MIC) and CMZ (0.2 $\mu\text{g/ml}$, 1/4 MIC) were added singly or in combination to the culture of *E. coli* TK-4 (3×10^4 cells/ml) and the standing culture was continued at 37°C.

Fig. 6 Viable cells, β -lactamase production and residual activity of PIPC in combination with CMZ

PIPC (12.5 μ g/ml, 8 MIC) and CMZ (25 μ g/ml, 1/32 MIC) were added singly and in combination to the culture of *E. cloacae* GN 5797 (3×10^8 cells/ml) and standing culture was continued at 37 $^{\circ}$ C.

Viable cells (A), β -lactamase activity (B) and residual activity (C) were measured. The data represented the mean \pm S. E. of three examination.

調べるため、 β -lactamase 産生量と培養液中薬剤残存活性を測定した。

菌体中 β -lactamase 活性は control および PIPC 単独群ではほとんど検出することができなかつたが、CMZ 単独群、および併用群では時間と共に増大した (Fig. 6, B)。

また、PIPC の残存活性は PIPC 単独群では 12 時間後まで 85% 程度残存していたが、併用群では約 44% に低下し、菌の増殖に伴い薬剤が加水分解を受けたことが認められた。CMZ の残存活性は併用群の方が単独群よりやや持続的であったが、有意な差はみられなかつた (Fig. 6, C)。

5. β -lactamase に対する安定性、親和性、および誘導活性

E. cloacae GN 5797 由来の β -lactamase に対する薬剤の安定性、親和性および誘導活性を調べた (Table 4)。

上記の酵素に対する安定性は CPZ を基準とした相対 V_{max} で比較すると、CEZ は CPZ に比べ約 54 倍の値を示し最も不安定であった。CMZ は CPZ より約 3 倍程度安定であり、CBPZ, LMOX は 1,000 倍以上安定であった。

酵素に対する親和性を K_i 値および K_m 値でみると、CMZ, CBPZ, LMOX が最も低値で親和性が高かつた。

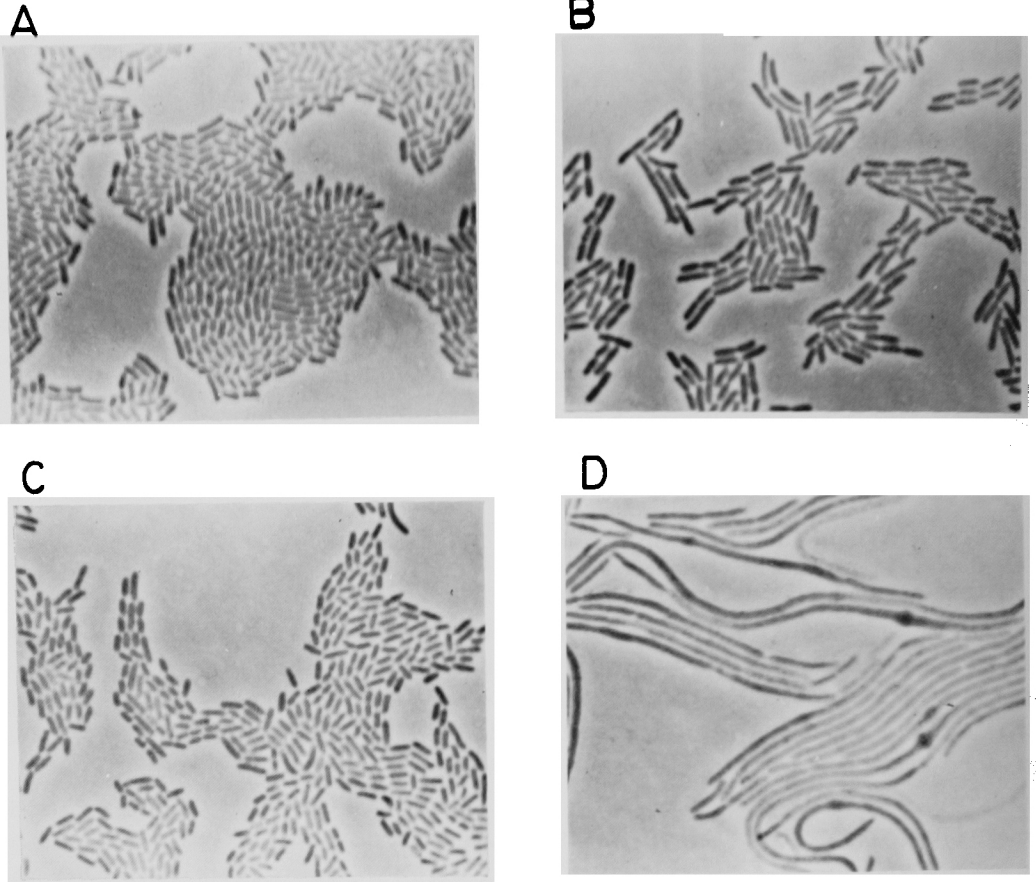
Table 4 Kinetic of hydrolysis of cepheids by β -lactamase from *E. cloacae* GN5797 and inducer activity for β -lactamase production

Drugs	Relative rate of hydrolysis (V_{max}) ^a	K_m (μ M) ^a	K_i (μ M) ^a	β -lactamase activity induced ^b (unit/mg of protein)
CEZ	5,400	189	— ^c	0.69
CMZ	33	—	1.9	2.4
CBPZ	<0.1	—	1.4	2.6
LMOX	<0.1	—	0.8	1.1
CPZ	100	69	—	0.11
PIPC	29	—	18	0.05

^a V_{max} , K_m and K_i were determined by Lineweaver Burk plots. K_i was determined using CET as substrate. V_{max} was expressed as the percentage of the hydrolysis rate of CPZ.

^b The sonic extracts were prepared from cells treated by 10 μ g/ml of drug for 2 hr. and β -lactamase activity was measured by UV method using CER (100 μ M).

^c Not tested.

Fig. 7 Alteration of the morphological effects of PIPC on *E. coli* TK-4 by CMZ

(A) : Drug free control.

(B) : PIPC (0.2 µg/ml, 1/4 MIC).

(C) : CMZ (0.1 µg/ml, 1/4 MIC).

(D) : PIPC (0.2 µg/ml) plus CMZ (0.1 µg/ml).

CPZはこの3剤に比べその親和性は約1/50と低く、さらにCEZは低かった。

誘導活性はCMZ, CBPZ, LMOXが高値を示した。次いでCEZ, CPZの順であり、PIPCは最も低かった。

6. 位相差顕微鏡による菌の形態変化の観察

相乗作用のみられた*E. coli* TK-4、および拮抗作用のみられた*E. cloacae* GN 5797を用いてPIPC、およびCMZ単独時、および併用時の24時間後の形態変化を位相差顕微鏡で観察した。

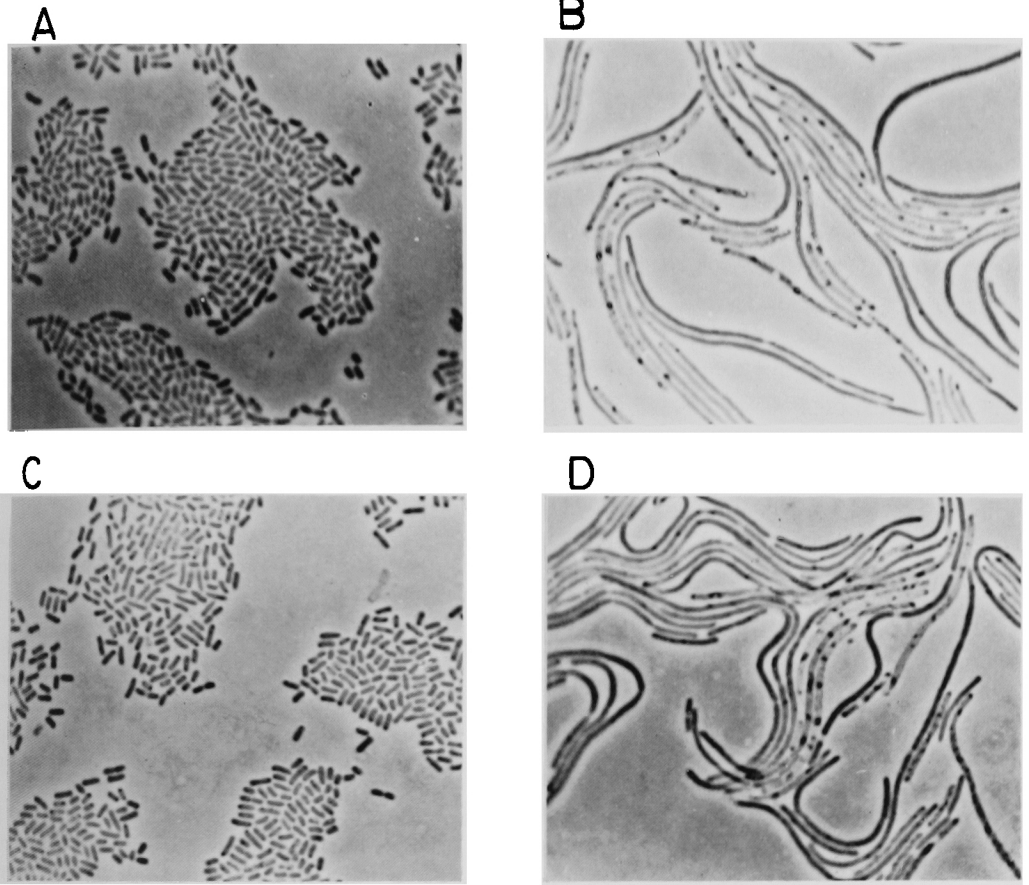
E. coli TK-4の場合、PIPC、CMZ単独時はcontrolに比べ若干長くなったが、大きな変化はみられなかった。併用時ではfilament化し、bulge体、溶菌像が認められた(Fig. 7)。

E. cloacae GN 5797の場合、CMZ単独時はcontrolとかわらず、PIPC単独時ではfilament化し、一部

densityの強い粒子様の構造が認められた。併用群ではPIPC単独時に比べdensityの強い粒子様構造の形成が少なかった。また、filamentの長さはPIPC単独時より短く、一部filamentが分裂し始めている像もみられた(Fig. 8)。

III. 考 察

抗菌剤間の併用については古くからβ-lactam剤とテトラサイクリン¹⁴⁾、マクロライド¹⁵⁾、アミノ配糖体¹⁻⁷⁾などで多くの検討がなされており、特にアミノ配糖体との併用時の基礎的検討は临床上の有用性から詳細に行なわれている。また、β-lactamaseに基因する耐性菌に対してABPCとMCIPC¹⁶⁾、AMPCとクラブラン酸¹⁷⁾、CPZとSulbactam¹⁸⁾との合剤が開発され基礎的臨床的検討が行なわれている。近年多くのβ-lactam剤が開発され、β-lactam剤間の*in vitro*併用効果が検討されて

Fig. 8 Alteration of the morphological effects of PIPC on *E. cloacae* GN 5797 by CMZ

(A): Drug free control. (B): PIPC (12.5 µg/ml, 8 MIC).
 (C): CMZ (25 µg/ml, 1/32 MIC). (D): PIPC (12.5 µg/ml) plus CMZ (25 µg/ml).

おり、PIPC についても CET, Cefamandole (CMD), CFX, CTX, LMOX, CZX など で検討されている^{19)~21)}。その成績をまとめてみると、グラム陰性菌に対して LMOX, CTX, CZX との併用ではほとんど無作用でわずかに相乗あるいは拮抗作用が認められている。CMD, CFX, CET との併用では逆に高頻度に拮抗作用が認められているが、グラム陽性菌に対しては CFX との併用で相乗作用が認められることが明らかにされている。今回、筆者らの検討成績は諸家の成績と多くの点で一致しており、新たに CBPZ, CPZ は LMOX, CTX, CZX などと、CMZ, CEZ は CFX と類似した併用効果を示すことが明らかとなった。また、特に興味深い点は近年問題になっている DMPPC 耐性 *S. aureus* に対して CMZ, CBPZ, LMOX との併用で高頻度に相乗効果が認められたことである。

一方、*in vitro* の併用効果に比べ、その作用メカニズムについての詳細な検討は充分になされていないようである。拮抗作用メカニズムについては Neu ら^{19,22)} が薬剤の β -lactamase 誘導によるものと推定しているが、ACAR ら²³⁾ は CBPC と 6-Aminopenicillanic acid (6-APA), および CER 間の拮抗作用を見出したが、6-APA や CER によって誘導された β -lactamase による CBPC の不活化を証明できなかったことを報告している。KOUHAL ら²⁴⁾ も β -lactamase 誘導は彼らが調べた Penicillin と Cephem 剤間の相互作用の証明にならないと結論している。しかしながら、今回の *E. cloacae* GN 5797 を用いた検討成績から、CMZ による β -lactamase の誘導とそれによる PIPC の不活化がこの拮抗作用の原因の一つであることが示唆された。即ち PIPC は β -lactamase を誘導しないが、CMZ が存在することによ

り β -lactamase 活性は著しく上昇する。そのため PIPC が不活化され、殺菌性が低下したものと考えられる。したがって、今回用いた薬剤間では β -lactamase 誘導が拮抗作用の一因であることは明らかである。また、PIPC と CMZ を併用した時の *E. cloacae* GN 5797 の形態変化から、作用点 (Penicillin binding proteins, PBPs) での相互作用も関与しているように思われるが、その程度は β -lactamase 誘導によるものより小さいものと現在考えている。また、 β -lactamase 誘導活性の比較的高い CBPZ, LMOX と PIPC との併用時に拮抗作用が CMZ に比べ低率であった理由はおそらく、 β -lactamase に対し CBPZ, LMOX が CEZ に比べ安定性が優れているためと考えられる。この安定性について我々はすでに CBPZ がグラム陰性菌産生の CSase に対し CMZ より安定であることを明らかにしている²⁵⁾。

相乗作用メカニズムに対しては β -lactamase 阻害剤との併用以外の報告は少ないが、Orsuki²⁶⁾ が Cephalixin (CEX) と Mecillinam (MPC) の併用で作用点での協力作用がその相乗作用の一因であることを明らかにしている。今回の PIPC と CMZ との併用時の *E. coli* TK-4 の形態変化の成績も PBPs での協力作用が相乗作用の一因であることを示唆しているが、*E. coli* TK-4 の PBPs に対する PIPC, CMZ の親和性については TK-4 株が低レベルながら β -lactamase を産生するために明確な結論は得られなかった。また、この低レベルの β -lactamase 産生と PIPC と CMZ 間の相乗作用の関係についても今回明らかにすることはできなかった。相乗作用については更に詳細な検討が必要であると考えている。

今回の *in vitro* での PIPC と Cephem 剤間の相互作用が *in vivo* および臨床にどのように反映するかについては、今後の検討を要するところである。

本論文の要旨は第 32 回日本化学療法学会東日本支部総会 (1983, 東京) において発表した。

文 献

- 1) NEU, H. C. & K. P. FU: Synergy of azlocillin and mezlocillin with aminoglycoside antibiotics and cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 813~819, 1978
- 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 [I] 臨床分離緑膿菌に対する Piperacillin, Ticarcillin と Dibekacin との *in vitro* 併用効果に関する実験的考察。 *Chemotherapy* 30: 149~153, 1982
- 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 [III] 臨床分離細菌に対する Piperacillin と Dibekacin の *in vitro* 併用効果に関する実験的考察一肺炎桿菌に対する殺菌効果を含めて。 *Chemotherapy* 30: 776~780, 1982
- 4) 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
- 5) 二橋 滋, 辻 明良, 五島瑛智子: *P. aeruginosa* における Astromicin (KW-1070) と Carbenicillin との併用効果の検討。 *Chemotherapy* 31: 29~35, 1983
- 6) 嶋田甚五郎, 斎藤 篤, 柴 孝也, 山路武久, 井原裕宣, 北条敏夫, 加地正伸, 三枝幹文, 宮原正, 三和秀明, 堀 賢司, 松浦真三: 実験的緑膿菌感染に対する Latamoxef と Tobramycin の併用効果。 *Chemotherapy* 31: 1102~1108, 1983
- 7) 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
- 8) SANDERS, C. C.; W. E. SANDERS & R. V. GOERING: *In vitro* antagonism of beta-lactam antibiotics by cefoxitin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 968~975, 1982
- 9) MOELLERING, R. C. & D. J. KROGSTAD: Combination of antimicrobial agents, mechanisms of interaction against bacteria. In "Antibiotics in Laboratory Medicine" ED., V. LORIAN, pp. 298~341, WILLIAMS & WILKINS, Baltimore, 1980
- 10) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275, 1951
- 11) WALEY, S. G.: A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139: 780~781, 1974
- 12) NOVICK, R. P.: Microiodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83: 236~240, 1962
- 13) MINAMI, S.; A. YOTSUJI, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 382~385, 1980
- 14) 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
- 15) ALLEN, N. E. & J. K. EPP: Mechanism of penicillin-erythromycin synergy on antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 849~853, 1978
- 16) NISHIDA, M.; Y. MINE & S. KUWAHARA: Synergistic activity of ampicillin and cloxacillin

- on enzymatic degradation of ampicillin by penicillinase, and therapeutic activity of mixture of ampicillin and cloxacillin. *J. Antibiotics* 22 : 144~150, 1969
- 17) 第 29 回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム。BRL 25000, 1981, 長崎
 - 18) 第 30 回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム。Sulbactam/Cefoperazone, 1982, 東京
 - 19) NEU, H. C.: Combination of ceftioxime with azlocillin, mezlocillin, piperacillin and ticarcillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 10 : 63~68, 1982
 - 20) KUCK, N. A.; R. T. TESTA & M. FORBES: *In vitro* and *in vivo* antibacterial effects of combinations of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19 : 634~638, 1981
 - 21) MOODY, M. R.; V. M. YOUNG & S. C. SCHIMPF: Synergistic activity of piperacillin-moxalactam-amikacin combinations. Abstracts of 20th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract No. 752, 1982
 - 22) 池田文昭, 高栗 仁, 西田 実, 五島雅智子, 桑原章吾: Cephem 系薬剤間の antagonism とグラム陰性桿菌における β -lactamase 誘導。 *Chemotherapy* 31 : 304~308, 1983
 - 23) ACAR, J. F.; L. D. SABATH & P. A. RUCH: Antagonism of the antibacterial action of some penicillins by other penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Invest.* 55 : 446~453, 1975
 - 24) KROUPAL, L. R.; B. WEISSBERGER & E. O. STAPLEY: *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* A 65, p.11, 1980
 - 25) MINAMI, S.; N. MATSUBARA, A. YOTSUJI, H. ARAKI, Y. WATANABE, T. YASUDA, I. SAIKAWA & S. MITSUHASHI: Inactivation of cephamycins by various β -lactamases from gram-negative bacteria. *J. Antibiotics* 37 : 51~61, 1984
 - 26) OTSUKI, M.: Synergistic effect of cephalixin with mecillinam. *J. Antibiotics* 34 : 739~752, 1981

IN VITRO COMBINATION EFFECT OF PIPERACILLIN AND OTHER β -LACTAMS

SHINZABUROU MINAMI, HIROMI NAKASHIMA, KATSUHIKO KUMANO,
YASUO WATANABE, AKIRA TAKAI and ISAMU SAIKAWA
Research Laboratory, Toyama Chemical Co. Ltd., Toyama, Japan.

In vitro combination effect of piperacillin(PIPC) and other β -lactams was investigated using gram-negative and gram-positive bacteria.

1. Disk approximation test using β -lactamase-producing strains such as *Enterobacter cloacae* H-27, *Proteus vulgaris* T-178, and *Klebsiella pneumoniae* Y-4 revealed that more than half of 25 β -lactams tested showed antagonistic effect on PIPC against *E. cloacae* H-27 and *P. vulgaris* T-178 which produced an inducible β -lactamase. No interaction between PIPC and other β -lactams was observed against *K. pneumoniae* Y-4 which produced a constitutive penicillinase.

2. Five cepheids i.e. cefazolin(CEZ), cefmetazole(CMZ), cefoperazone(CPZ), cefbuparazone (CBPZ), and latamoxef(LMOX) were chosen for extensive examination of the combination effect with PIPC.

The combination of PIPC and CEZ or CMZ showed a marked antagonistic effect against 25 to 72% of *Enterobacter* species, *Serratia marcescens*, indole positive *Proteus* species, and *Pseudomonas aeruginosa* which are species producing an inducible β -lactamase, while in this combination, synergistic effect was observed against a few of *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*. The combination of PIPC and CBPZ, CPZ or LMOX hardly showed neither antagonistic nor synergistic effect against all the gram-negative species tested.

Synergistic effect against more than 30% of gram-positive cocci such as *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* which were methicillin sensitive strains was observed in the combination of PIPC and CMZ, CBPZ, or LMOX. Against 61 to 100% of methicillin resistant *S. aureus*, the combination of PIPC and the five cepheids showed synergistic effect.

3. Both synergistic and antagonistic effect were confirmed by the growth curves using *E. coli*, *S. aureus*, and *E. cloacae* strains.

4. The extensive analysis of antagonism between PIPC and CMZ against *E. cloacae* GN 5797 showed that the inactivation of drugs by the induced β -lactamase might play an important role in the antagonism.