

マウス実験感染に対する Piperacillin と Aminoglycoside 系抗生剤の併用効果

高畑 正裕・福岡 義和・保田 隆・才川 勇

富山化学工業株式会社総合研究所

(昭和61年2月20日受付)

グラム陰性菌に対する Piperacillin (PIPC) と aminoglycoside 剤 4 剤, Gentamicin (GM), Debekacin (DKB), Amikacin (AMK) および Tobramycin (TOB) それぞれとの併用効果について、主に *in vivo* 実験の検討を行なった。グラム陰性菌の *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens* の 4 菌種を接種菌とするマウス腹腔内感染症に対する両剤の併用効果を PIPC : aminoglycoside 剤 = 10 : 1 で検討した結果、いずれの菌株による感染においても優れた相乗効果を示した。また、腹腔内生菌数の経時的推移からも、併用投与による殺菌作用の増強が認められた。

β -lactam 剤と aminoglycoside 系抗生剤との *in vivo* における併用効果については多くの報告がある¹⁻³⁾。しかしながら penicillin 系抗生剤である Piperacillin と aminoglycoside 系抗生剤の併用については、*in vitro* で *Enterobacteriaceae*⁴⁻⁶⁾ や *Pseudomonas*⁷⁻⁹⁾ に関する報告が数多くされているにもかかわらず、*in vivo* での成績に関するものは極めて少ない。今回、我々は現在市販されている代表的な aminoglycoside 系抗生剤 4 剤と Piperacillin との *in vivo* 併用効果を、*K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens* などのグラム陰性菌を用い、マウス腹腔内感染系にて検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 実験動物

SLC/ICR の 4 週齢、雄性マウス 19~22 g を用いた。

2. 使用薬剤

Piperacillin (PIPC : 富山化学工業), aminoglycoside 抗生物質に Gentamicin (GM : 塩野義製薬), Debekacin (DKB : 明治製薬), Amikacin (AMK : 萬有製薬), Tobramycin (TOB : 塩野義製薬) を用いた。

3. 使用菌株

富山化学総合研究所保存の臨床分離由来 *Klebsiella pneumoniae* Y-84, *Enterobacter cloacae* H-49, *Enterobacter aerogenes* H-54, *Serratia marcescens* W-61 4 株を用いた。なお本菌株の各抗生剤に対する感受性測定にあたっては Heart infusion agar (HIA : 栄研薬) を用い、日本化学療法学会標準法⁹⁾に従って行った。

4. 感染および治療実験

5% ムチン (半井化学) 液に感染菌を懸濁し、0.5 ml ずつマウス腹腔内へ接種した。感染 1 時間後に PIPC および aminoglycoside 剤を単独あるいは 10 : 1 に併用して 0.25 ml マウスの背部皮下に投与した。1 群 15 匹のマウスを使用し、7 日後のマウス生存率から ED₅₀ および信頼限界を LITCHFIELD-WILCOXON 法¹⁰⁾により算出した。併用効果を定量的に求めるために KAWAKAMI ら¹¹⁾の方法に従い、相乗効果比 (Synergistic ratio) を次式により求めた。

$$\text{相乗効果比 (Synergistic ratio)} = \frac{D_a}{D_a}$$

$$\frac{1}{D_a} = \frac{R_1}{D_1} + \frac{R_2}{D_2}$$

$$R_1 = \frac{C_1}{C_1 + C_2}$$

$$R_2 = \frac{C_2}{C_1 + C_2}$$

D_a : 併用効果が相加的であるとして求めた ED₅₀ の計算値

D_d : 併用時の ED₅₀ の実験値

D_1, D_2 : 薬剤単剤の ED₅₀

C_1, C_2 : 併用時の薬剤比率

相乗効果比が >1.0 の場合、相乗効果ありと判定した。

5. 腹腔内生菌数の測定

1 群 5 匹のマウスを使用し、*E. cloacae* H-49, *H. aerogenes* H-54 について PIPC と GM の組み合わせで行なった。感染菌量は、*E. cloacae* H-49, *E. aerogenes* H-54, それぞれ 2.0×10^8 cells/mouse (10 MLD), 3.0

Table 1 Synergistic effect of PIPC and aminoglycoside antibiotics against experimental infection in mice caused by *K. pneumoniae* Y-84

Groups	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Combination ratio	Determined ED ₅₀ (Dd) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)	Hypothetical ED ₅₀ (Da) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)	Synergistic ratio (Da/Dd)	Confidence limit (P=0.05)
1	PIPC alone	6.25	—	0.65	0.42-1.00				
2	GM alone	0.39	—	0.015	0.014-0.016				
3	DKB alone	0.78	—	0.022	0.020-0.024				
4	AMK alone	1.56	—	0.080	0.068-0.093				
5	TOB alone	0.39	—	0.059	0.052-0.073				
6	PIPC+GM	—	10:1	0.062	0.046-0.079	0.142	0.105-0.191	2.30	2.11-2.51
7	PIPC+DKB	—	10:1	0.077	0.058-0.107	0.180	0.145-0.233	2.34	2.13-2.57
8	PIPC+AMK	—	10:1	0.124	0.084-0.181	0.282	0.192-0.415	2.27	2.02-2.54
9	PIPC+TOB	—	10:1	0.155	0.101-0.220	0.340	0.257-0.448	2.19	1.83-2.62

Challenge dose: 2.0×10^7 cells/mouse with 5% mucin (10 MLD).

Therapy: s.c. injection at 1 hr after infection.

Hypothetical ED₅₀ in which additive effect of combined antibiotics assumed.

Table 2 Synergistic effect of PIPC and aminoglycoside antibiotics against experimental infection in mice caused by *E. cloacae* H-49

Groups	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Combination ratio	Determined ED ₅₀ (Dd) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)	Hypothetical ED ₅₀ (Da) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)	Synergistic ratio (Da/Dd)	Confidence limit (P=0.05)
1	PIPC alone	25	—	0.66	0.32-1.37				
2	GM alone	0.78	—	0.019	0.013-0.021				
3	DKB alone	1.56	—	0.042	0.031-0.056				
4	AMK alone	0.78	—	0.074	0.056-0.098				
5	TOB alone	1.56	—	0.11	0.076-0.15				
6	PIPC+GM	—	10:1	0.062	0.037-0.10	0.158	0.123-0.202	2.54	2.04-3.15
7	PIPC+DKB	—	10:1	0.094	0.062-0.14	0.282	0.185-0.428	3.01	2.29-3.94
8	PIPC+AMK	—	10:1	0.174	0.117-0.257	0.453	0.298-0.697	1.90	1.63-2.20
9	PIPC+TOB	—	10:1	0.238	0.147-0.383	0.384	0.293-0.503	2.20	1.72-2.82

Challenge dose: 1.0×10^8 cells/mouse with 5% mucin (5 MLD).

Therapy: s.c. injection at 1 hr after infection.

Hypothetical ED₅₀ in which additive effect of combined antibiotics assumed.

$\times 10^8$ cells/mouse (12 MLD) とした。腹腔内接種 1 時間後に PIPC と GM を同時あるいは一方の薬剤を投与した後、さらにもう 1 時間後にもう一方を皮下投与する治療群およびそれぞれの単独治療群を無治療群と比較した。投与量は両菌株共それぞれ単独投与では ED₅₀ 以下の治療効果しか認められない PIPC 0.5 mg/mouse, GM 0.05 mg/mouse とし治療後、経時的に腹水を採取、適宜滅菌生理食塩水で希釈し、平板塗抹法にて生菌数を測定した。

II. 実験成績

1. マウス実験的感染症に対する治療効果

供試した各菌種感染における薬剤単独群および併用群の治療効果を ED₅₀ 値 (mg/mouse) として示した。また PIPC と各 aminoglycoside 剤との相乗効果比を示し

た (Table 1, 2, 3, 4)。

K. pneumoniae Y-84 の場合、PIPC 単独群、GM 単独群の ED₅₀ 値はそれぞれ 0.65 mg/mouse, 0.015 mg/mouse であったが両剤を 10:1 で併用することにより、0.062 mg/mouse と PIPC 単独群の約 1/10 量に減少した。また GM との相乗効果比は 2.30 であり、他の aminoglycoside 剤の場合も同様の成績を示した。*E. cloacae* H-49 の場合、PIPC 単独群、GM 単独群の ED₅₀ 値はそれぞれ 0.66 mg/mouse, 0.019 mg/mouse であったが、両剤を併用することにより、0.062 mg/mouse となり相乗効果比は 2.54 と強い相乗効果を示した。他の aminoglycoside 剤の中では DKB が相乗効果比 3.01 と最も優れていた。*E. aerogenes* H-54 株を用いた場合、PIPC 単独群、GM 単独群の ED₅₀ 値はそれぞ

Table 3 Synergistic effect of PIPC and aminoglycoside antibiotics against experimental infection in mice caused by *E. aerogenes* H-54

Groups	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Combination ratio	Determined ED ₅₀ (Dd) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)	Hypothetical ED ₅₀ (Da) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)	Synergistic ratio (Da/Dd)	Confidence limit (P=0.05)
1	PIPC alone	50	—	2.0	0.92-4.3				
2	GM alone	0.78	—	0.046	0.028-0.074				
3	DKB alone	1.56	—	0.090	0.064-0.126				
4	AMK alone	0.78	—	0.28	0.18-0.43				
5	TOB alone	1.56	—	0.175	0.12-0.24				
6	PIPC+GM	—	10:1	0.187	0.096-0.372	0.411	0.277-0.409	2.17	1.79-2.62
7	PIPC+DKB	—	10:1	0.26	0.159-0.423	0.683	0.480-0.969	2.68	2.29-3.14
8	PIPC+AMK	—	10:1	0.62	0.379-1.04	1.027	0.689-1.572	2.04	1.56-2.17
9	PIPC+TOB	—	10:1	0.63	0.389-0.985	1.283	0.872-1.821	1.67	1.56-2.17

Challenge dose : 1.0×10^8 cells/mouse with 5% mucin (4 MLD).

Therapy : s.c. injection at 1 hr after infection.

Hypothetical ED₅₀ in which additive effect of combined antibiotics assumed.

Table 4 Synergistic effect of PIPC and aminoglycoside antibiotics against experimental infection in mice *S. marcescens* W-61

Groups	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Combination ratio	Determined ED ₅₀ (Dd) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)	Hypothetical ED ₅₀ (Da) (mg/mouse)	Confidence limit (P=0.05)	Synergistic ratio (Da/Dd)	Confidence limit (P=0.05)
1	PIPC alone	25	—	2.30	1.58-3.33				
2	GM alone	0.39	—	0.022	0.031-0.023				
3	DKB alone	6.25	—	0.084	0.080-0.088				
4	AMK alone	6.25	—	0.11	0.10-0.12				
5	TOB alone	3.13	—	0.072	0.067-0.077				
6	PIPC+GM	—	10:1	0.098	0.075-0.12	0.203	0.148-0.278	2.08	1.85-2.32
7	PIPC+DKB	—	10:1	0.46	0.32-0.64	0.655	0.511-0.838	2.34	2.13-2.57
8	PIPC+AMK	—	10:1	0.28	0.23-0.35	0.677	0.480-0.947	1.45	1.27-1.65
9	PIPC+TOB	—	10:1	0.33	0.24-0.45	0.722	0.555-0.938	2.19	1.83-2.62

Challenge dose : 4.0×10^7 cells/mouse with 5% mucin (10 MLD).

Therapy : s.c. injection at 1 hr after infection.

Hypothetical ED₅₀ in which additive effect of combined antibiotics assumed.

2.0 mg/mouse, 0.046 mg/mouse であったが、併用は 0.137 mg/mouse と PIPC 単独群の約 1/15 量に少した。相乗効果比は DKB が 2.68, 次いで GM が 2.17 であった。

S. marcescens W-61 を用いた場合、PIPC 単独、GM 単独の ED₅₀ 値はそれぞれ 2.30 mg/mouse, 0.022 mg/mouse であったが、併用することにより 0.098 mg/mouse となり相乗効果比も 2.08 と強い併用効果を示した。

2. マウス腹腔内生菌数の推移

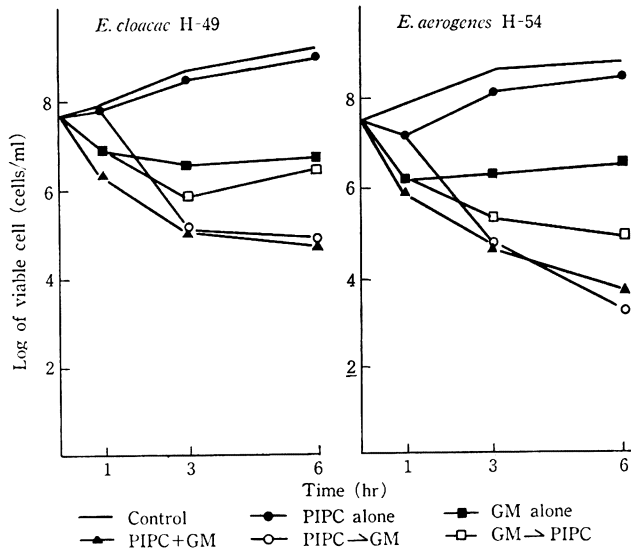
E. cloacae H-49, *E. aerogenes* H-54 において感染治療後の腹腔内生菌数の変動を対照群と比較した (Fig. 3)。

E. cloacae H-49 の場合、PIPC 単独群ではほとんど

生菌数の減少が認められなかった。これに対し、GM を 1 時間後にさらに投与することにより、以後の生菌数の減少が著しく認められて、3 時間後には同時併用群と同様、菌数は 10^{-2} 以下に減少した。また GM 先投与群は初期治療時の菌数減少はみられるものの、以後のクリアランスは前述の群に比較し、以後 PIPC を併用した群も含めて弱かった。

E. aerogenes H-54 の場合、PIPC, GM 単独投与群は 3 時間後にはすでに再増殖が始まっているのに対しどの併用群も 6 時間目まで生菌数の減少が認められた。特に PIPC, GM 同時投与群、PIPC 先投与併用群は GM 併用後のクリアランスの程度が強く、*E. cloacae* H-49 の場合と同様の傾向を示した。

Fig. 1 Combination effect of PIPC and GM in peritoneal cavity



III. 考 察

β -lactam 系抗生剤と aminoglycoside 系抗生剤の併用に関しては多くの報告があり、臨床的にも有用な治療手段といわれている。今回我々はマウス実験感染で β -lactam 剤の PIPC と繁用されている aminoglycoside 剤 4 剤を用いて併用効果を調べた。その結果いずれの場合も PIPC は aminoglycoside 系抗生剤と生体内で相乗的に作用し、優れた治療効果が得られた。また腹腔内生菌数の変動からも PIPC は aminoglycoside 系抗生剤と併用効果が認められ、それぞれの単独群よりも生菌数の減少が認められた。我々が行なった実験において aminoglycoside 系抗生剤は PIPC の 1/10 量とした。これはそれぞれの単独 ED₅₀ 値が PIPC より aminoglycoside 剤の方が 1 オーダー小さい点から適当な配合比と考えられた。嶋田ら¹²⁾も Latamoxef と Tobramycin の *in vivo* 併用効果で 10:1 で充分併用効果が発現することを報告している。一般に β -lactam 系抗生剤と aminoglycoside 系抗生剤との *in vitro* 併用の検討を checkerboard titration 法で行なった場合、相乗効果が認められるのは FIC index の概念からほぼ 64:1:1 の比率である。他方、各薬剤の血中濃度はヒトでは投与方法や投与量が異なるため、bioavailability の単純な比較はできないが、マウスではピーク値でみると、例えば PIPC 0.4 mg/mouse S.C. で約 5 μ g/ml¹³⁾、GM 0.5 mg/mouse S.C. で約 38 μ g/ml¹⁴⁾ と総じて aminoglycoside 系抗生剤の方が濃度的に高い。臨床においては aminoglycoside 系抗生剤は呼吸器系内科疾患でもその腎毒性や抗菌

活性の強さの点から 200~400 mg/day の投与量が通常であり、penicillin 系薬剤はこれに対し 4~6 g/day と多い¹⁵⁾。したがって実験的に aminoglycoside 剤を PIPC の 1/10 量にしたことは投与量の比率からいっても、臨床の場に近似しており、この面からも適した配合比と考えられた。一方、投与に際しては PIPC を aminoglycoside 系抗生剤と同時に、先に投与する方が併用効果が強く、西野ら¹⁶⁾が報告した結果と一致した。 β -lactam 系抗生剤と aminoglycoside 系抗生剤との併用効果の機序については不明な点も多いが、 β -lactam 剤が aminoglycoside 系抗生剤の膜透過性を良好にしているとの報告もある。嶋田ら¹²⁾は *P. aeruginosa* 感染系を用い、併用効果に及ぼす諸因子の影響を検討しているが、 β -lactam 剤単独投与では投与時期が遅れるに従って治療効果が低下すること、 β -lactam 剤と aminoglycoside 剤の同時併用は投与開始時期が遅れても充分に認められることを報告している。これらの点に関しては β -lactam 剤、aminoglycoside 剤の体内動態やそれぞれの菌感受性に対する詳細な検討が必要であると思われる。KROGSTAD と MOELLERLING¹⁷⁾ は多くの文献から β -lactam 剤と aminoglycoside 剤の併用効果が *in vitro* で認められた菌種を列記しており、グラム陽性菌の *S. faecium* や陰性菌の *Klebsiella* 属、*Enterobacter* 属、*Acinetobacter* 属においても認められている。また、Piperacillin と aminoglycoside 系抗生剤の *Enterobacteriaceae* に対する併用効果に関しては、Fu ら¹⁸⁾が *Klebsiella* 株に対して、ROBINSON らが、*Klebsiella* とインドール陽性 *Proteus* 属

に対して等数多くの報告がある。しかし実験感染に関する報告は少なく今回前に報告¹⁸⁾した、*P. aeruginosa* 以外の4菌種についても同様に強い併用効果が認められたことは弱毒菌感染の起因菌にこれらを含む場合は PIPC と aminoglycoside 系抗生剤の併用が有用であると期待された。

本論文の要旨は第32回日本化学療法学会総会で報告した。

文 献

- 1) CHANBUSARAKUM, P. & P. R. MURRAY: Analysis of the interaction between piperacillin, ticarcillin, or carbenicillin and aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 14: 505~506, 1978
- 2) SHAH, P. P.; D. J. BRIDIS, H. G. ROBSON & J. P. CONTERATO: *In vitro* activity of piperacillin compared with that of carbenicillin, ticarcillin, ampicillin, cephalothin, and cefamandole against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 15: 346~350, 1979
- 3) COMBER, K. R.; M. J. BASKER, C. D. OSBORNE & R. SUTHERLAND: Synergy between ticarcillin and tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 11: 956~964, 1977
- 4) GORDON, A. & F. R. FEKETY, J. R.: Experimental endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. II Therapy with carbenicillin and gentamicin. *J. Infect. Dis.* 136: 327~335, 1977
- 5) ANDRIOLE, V. T.: Synergy of carbenicillin and gentamicin in experimental infection with *Pseudomonas*. *J. Infect. Dis.* 124 (Suppl.): 46~55, 1971
- 6) FU, K. P. & H. C. NEU: Piperacillin, a new penicillin active against many bacteria resistant to other penicillins. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 13: 358~367, 1978
- 7) KURTZ, T. O.; D. J. WINSTON, D. A. BRUCKNER & W. J. MARTIN: Comparable *in vitro* Synergistic activity of new beta-lactam antimicrobial agents and amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 20: 239~243, 1981
- 8) ROBINSON, R. G.; J. SAUNDERS, R. CASSEL, C. S. BLOCK & H. J. KORNHOF: Comparative *in vitro* appraisal of piperacillin, including its activity against *Salmonella typhi*. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 18: 493~501, 1980
- 9) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について: *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 10) LITCHFIELD, J. T. J. R. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiment. *J. Pharmacol. & Exp. Therap.* 96: 99~113, 1949
- 11) KAWAKAMI, M.; Y. NAGAI, S. SHIMIZU, & S. MITSUHASHI: Antimicrobial effect of combinations of colistin methanesulfonate and chloramphenicol. I. *In vitro* Effect. *J. Antibiotics*: XXIV, No. 12, 884~891, 1971
- 12) 嶋田基五郎, 斎藤 篤, 柴 孝也, 他: 実験的緑膿菌感染に対する Latamoxef と Tobramycin の併用効果. *Chemotherapy* 31: 1102~1107, 1983
- 13) 第23回日本化学療法学会東日本支部総会, 新薬シンポジウム I. T-1220 (東京), 1976
- 14) 第28回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム I. KW1070 (東京), 1980
- 15) 副島林造: 抗菌性抗生物質の正しい使い方. 薬局 35: No. 4, 1984
- 16) 西野武志, ら: 抗緑膿菌作用をもつアミノ配糖体抗生物質の使い方. *メディカルトリビューン*: 55, 1982
- 17) KROGSTAD, D. J. & R. C. MOELLERING: Combinations of antibiotics, mechanisms of interaction against bacteria. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Lorian, V. (Ed.), Williams & Wilkins, Baltimore/London, 298, 1982
- 18) 才川 勇, 保田 隆, 田井 腎, 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: 797~800, 1977

SYNERGISM OF PIPERACILLIN(PIPC) AND
AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS AGAINST
EXPERIMENTAL INFECTION IN MICE

MASAHIRO TAKAHATA, YOSHIKAZU FUKUOKA, TAKASHI YASUDA
and ISAMU SAIKAWA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd., Toyama, Japan

The *in vivo* interaction of piperacillin(PIPC) and 4 aminoglycoside antibiotics, gentamicin(GM), dibekacin(DKB), amikacin(AMK) and tobramycin(TOB) were examined with experimental infection in mice. In experimental infection in mice with *Klebsiella pneumoniae*, followed by *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens*, a excellent synergistic effect were observed the fixed combination of PIPC and aminoglycoside antibiotics in the ratio of 10 : 1. *In vivo* experiments using *E. cloacae* H-49 or *E. aerogenes* H-54, the combination therapy of PIPC and GM was more effective than a single therapy in reducing bacterial counts in peritoneal cavity of mice.