

抗生物質の併用療法に関する基礎的研究

Serratia に対する β -lactam 剤とアミノ配糖体剤の併用

川 原 元 司

鹿児島大学医学部泌尿器科学教室

(主任 大井好忠教授)

(昭和 62 年 8 月 18 日受付)

β -lactam 剤 10 種とアミノ配糖体剤 (AGs 剤) 4 種の計 27 の組み合わせで、尿路から分離した *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) 27 株に対する *in vitro* 併用効果を checkerboard 法により minimum fractional inhibitory concentration (FIC) index を求め検討した。さらに併用効果を認めた株と標準株 IFO 12648 株を用いて、sub-MIC レベルのセフェム剤と Gentamicin (GM) あるいは Amikacin (AMK) の併用効果を time kill curve 法で検討するとともに、走査電顕を用いて菌の形態変化を観察した。

minimum FIC index の検討では Latamoxef (LMOX) と GM の併用で 24 株 (89%) が 0.5 以下の相乗効果を示し、平均 minimum FIC index は 0.241 と最小値を示した。LMOX, Cefprozime (CZX), Cefmenoxime (CMX), Cefoperazone (CPZ) と GM, AMK, Tobramycin (TOB), Netilmicin (NTL) の組み合わせでは、CMX と TOB の併用で平均 minimum FIC index が 0.565 の値を示したが、その他の組み合わせでは、0.5 以下の優れた相乗効果を認めた。殺菌曲線における併用効果の検討では sub-MIC レベルの薬剤間の併用で、FIC index に対応する併用効果と菌の形態変化が認められた。

複雑性尿路感染症における *Serratia* および *P. aeruginosa* の分離頻度は高く、難治性感染症や院内感染の主要な原因菌となっている¹⁾。一方、最近の β -lactam 剤の開発の進歩は著しく、*Serratia* および *P. aeruginosa* に対しても抗菌力は増強されている。*S. marcescens* に対しては、いわゆる第 3 世代セフェム剤の出現により充分な治療成績が報告されているが²⁻⁵⁾、耐性株も少なからず認められ、臨床的にも重篤な基礎疾患を有し、感染防御能の低下した症例において本菌感染例が好発するのでより安全で適切な化学療法の確立が望まれる。

作用機序の異なる β -lactam 剤とアミノ配糖体剤 (AGs 剤) の併用は両剤の協同作用ならびに耐性化防止を期待し、副作用の軽減を計る目的で、臨床的には広く行なわれ^{6,7)}、基礎的検討において相乗効果を認める報告は多い⁸⁻¹²⁾。今回、尿路分離 *S. marcescens* に対する β -lactam 剤と AGs 剤の併用効果を *in vitro* で検討し、合わせて菌体の形態変化を観察したので報告する。

I. 実験材料ならびに方法

併用療法の *in vitro* 効果の検討に用いた抗生剤は以

下の通りである。

1) 使用薬剤

i) β -lactam 剤

Latamoxef (LMOX, 塩野義製薬)
Cefmenoxime (CMX, 武田薬品工業)
Ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業)
Aztreonam (AZT, 日本スタイブ)
Ceftriaxone (CTRX, ロジュー)
Cefbuperazone (CBPZ, 富山化学工業)
Cefoperazone (CPZ, 富山化学工業)
Cefminox (CMNX, 明治製薬)
Cefotiam (CTM, 武田薬品工業)
Cefmetazole (CMZ, 三共)

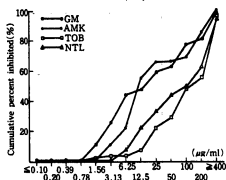
ii) AGs 剤

Gentamicin (GM, エッセクス日本)
Amikacin (AMK, 萬有製薬)
Tobramycin (TOB, 塩野義製薬)
Netilmicin (NTL, エッセクス日本)

β -lactam 剤 10 剤と AGs 剤 4 剤の、いずれも力価の
明らかなものを用いた。

2) 使用菌株

Fig. 3 MICs of AGs (GM, AMK, TOB, NTL) against 27 strains of *S. marcescens* (inoculum size 10^8 CFU/ml)



GM	3	4	5	1	3	1	4	1	5
AMK		3	3	9	3		2	3	4
TOB		1	1	4	2	5	2	12	
NTL		2	4	3	3	1	4	10	

株. NTL に対して 10 株が 400 μ g/ml 以上の高度耐性を示した。

2) *in vitro* 併用効果

β -lactam 剤 10 剤と GM, AMK の 20 通りの組み合

わせにおける併用効果を minimum FIC index をもとに表に示した (Table 1). 27 株の FIC index の平均値からみた併用効果は GM と LMOX の組み合わせが最も良く, 平均 FIC index は 0.241 であり, 27 株中 24 株 (89%) に相乗効果が認められた. GM と CMNX との組み合わせで 0.650, AMK は CTRX, CMNX および CMZ との 3 通りの組み合わせで, それぞれ 0.541, 0.567, 0.900 の値を示したが, その他はすべて 0.500 以下の値を示し, 相乗効果が認められた。

第 3 世代セフェム剤と AGs 4 剤の組み合わせでは, CMX と TOB の組み合わせで 0.565 の値を示したが, その他の組み合わせでは, すべて 0.500 以下の値を示した. NTL は LMOX, CMX との併用で, それぞれ 5 株 (19%), 1 株 (4%) に拮抗がみられた (Table 2)。

GM と LMOX の *in vitro* 併用効果を GM 単独および低濃度の LMOX 併用下での GM に対する感受性分布でみると, 感受性の増強が顕著に認められ, LMOX 6.25 μ g/ml の併用で GM の MIC はすべての株に対して 12.5 μ g/ml 以下の感性域に移動した (Fig. 4)。

β -lactam 剤と AGs 剤の MIC から, 6.25 μ g/ml 以下

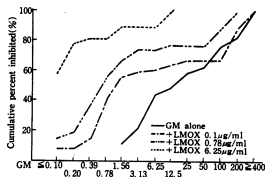
Table 1 Combined effects of β -lactams, and GM or AMK against 27 strains of *S. marcescens* (inoculum size, 10^8 /ml)

Drug Combination			Number of strains (%)				
AGs	CEPs	Mean FIC indices	Synergy (≤ 0.5)	Partial synergy (>0.5 (<1.0))	Addition ($=1.0$)	Antagonism (>1.0)	Indifference
GM	LMOX	0.241	24 (89)	1 (4)	0	0	2 (7)
	CMX	0.467	16 (59)	10 (37)	0	0	1 (4)
	CZX	0.322	20 (74)	7 (26)	0	0	0
	AZT	0.286	22 (82)	2 (7)	0	0	3 (11)
	CTRX	0.388	22 (82)	3 (11)	0	2 (7)	0
	CBPZ	0.426	20 (74)	3 (11)	1 (4)	1 (4)	2 (7)
	CPZ	0.310	22 (82)	4 (14)	0	0	1 (4)
	CMNX	0.650	9 (33)	10 (37)	2 (7)	1 (4)	5 (19)
	CTM	0.383	11 (41)	2 (7)	0	1 (4)	13 (48)
	CMZ	0.482	12 (44)	3 (11)	0	11 (41)	1 (4)
AMK	LMOX	0.359	20 (74)	5 (19)	0	0	2 (7)
	CMX	0.484	14 (52)	12 (44)	0	0	1 (4)
	CZX	0.385	21 (78)	6 (22)	0	0	0
	AZT	0.452	16 (59)	7 (26)	0	0	4 (14)
	CTRX	0.541	15 (56)	7 (26)	1 (4)	4 (14)	0
	CBPZ	0.482	12 (44)	9 (33)	0	3 (11)	3 (11)
	CPZ	0.384	17 (63)	9 (33)	0	0	1 (4)
	CMNX	0.567	10 (37)	8 (30)	2 (7)	1 (4)	6 (22)
	CTM	0.276	9 (33)	1 (4)	0	3 (11)	14 (52)
	CMZ	0.900	4 (14)	2 (7)	0	17 (65)	4 (14)

Table 2 Combined effects of CEPs and AGs against 27 strains of *S. marcescens* (inoculum size, 10^6 /ml)

Drug Combination			Number of strains (%)				
AGs	CEPs	Mean FIC indices	Synergy (≤ 0.5)	Partial synergy (>0.5 <math><1.0)	Addition (=1.0)	Antagonism (>1.0)	Indifference
GM	LMOX	0.241	24 (89)	1 (4)	0	0	2 (7)
	CZX	0.322	20 (74)	7 (26)	0	0	0
	CMX	0.467	16 (59)	10 (37)	0	0	1 (4)
	CPZ	0.310	22 (82)	4 (14)	0	0	1 (4)
AMK	LMOX	0.359	20 (74)	5 (19)	0	0	2 (7)
	CZX	0.385	21 (78)	6 (22)	0	0	0
	CMX	0.484	14 (52)	12 (44)	0	0	1 (4)
	CPZ	0.384	17 (63)	9 (33)	0	0	1 (4)
TOB	LMOX	0.493	9 (33)	10 (37)	1 (4)	0	7 (26)
	CZX	0.317	19 (70)	2 (7)	1 (4)	0	5 (19)
	CMX	0.565	11 (40)	8 (30)	3 (11)	0	5 (19)
	CPZ	0.447	14 (52)	7 (26)	0	0	6 (22)
NTL	LMOX	0.498	16 (59)	4 (15)	0	5 (19)	2 (7)
	CZX	0.292	20 (73)	5 (19)	1 (4)	0	1 (4)
	CMX	0.468	13 (48)	13 (48)	0	1 (4)	0

Fig. 4 Sensitivity distribution of GM alone or combined with LMOX (27 strains of *S. marcescens*, inoculum size 10^6 /ml)



の菌株群と 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の菌株群との比較では、菌株数に片寄りはあるが、ほとんどの組み合わせで、12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の菌株群での FIC index の平均値がより小さく、 β -lactam 剤と AGs 剤の併用の合理性が示された (Table 3)。

3) 増殖曲線に及ぼす併用効果

CZX, GM の MIC がともに 6.25 $\mu\text{g/ml}$ で、FIC index 0.141 と著明な相乗作用を認めた患者由来の *S. marcescens* No. 10 を用いて 8 時間目までの殺菌効果を検討した成績を示す (Fig. 5)。各 1/4 MIC の併用で

CZX 1 MIC とほぼ同等の殺菌作用が認められたが、CZX 1/2 MIC と GM 1/4 MIC、さらに CZX 1/4 MIC と GM 1/2 MIC の併用で殺菌効果は著明となった。

本菌株で CZX と AMK の併用で殺菌効果を検討した。AMK の MIC は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ であり、FIC index は 0.749 であった。CZX, AMK の各 1/4 MIC ずつの併用では作用 2 時間での菌数の減少は認められず、静菌的であり、以後、生菌数は増加した。各 1/2 MIC の併用では CZX 1 MIC 単独よりも強い殺菌効果が認められたが、GM との併用時の効果よりも劣り、FIC index とよく相関した (Fig. 6)。

S. marcescens No. 10 を用いて LMOX と GM の sub-MIC の薬剤濃度の併用下における殺菌作用を検討した。FIC index は 0.125 である。1/8, 1/16 MIC ずつの併用では薬剤作用 1 時間目まで生菌数は減少したが、以後は対照の 10~15 分の 1 程度の抑制を示しながら増殖した。これは LMOX 1 MIC 単独時に比べて劣る成績であった (Fig. 7)。さらに同菌株を用いて CPZ と GM あるいは AMK の併用効果を検討した。FIC index は各 0.251 と 0.751 である。Fig. 8 の曲線 1, 2 に示す 1/4 MIC ずつの併用では両者ともに薬剤作用 2 時間目までは殺菌効果が得られたが、その後、AMK との併用では再増殖がみられ対照と大差ない増殖を示した。一方、GM との併用では薬剤作用時約 6 倍の生菌数であるにもかかわらず

Table 3 Combined effects of β -lactams, and GM or AMK
(*S. marcescens* 27 strains)

Drug Combination		Mean FIC index	MICs of CEPs		MICs of AGs	
AGs	CEPs		Total (number of strains)	$\leq 6.25 \mu\text{g/ml}$	$\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$	$\leq 6.25 \mu\text{g/ml}$
GM	LMOX	0.241 (25)	0.298 (8)	0.215 (17)	0.242 (12)	0.242 (13)
	CMX	0.467 (27)	0.526 (21)	0.222 (6)	0.524 (12)	0.422 (15)
	CZX	0.322 (27)	0.405 (13)	0.244 (14)	0.277 (12)	0.357 (15)
	AZT	0.296 (24)	0.304 (21)	0.166 (3)	0.303 (12)	0.270 (12)
	CTRX	0.388 (27)	0.516 (7)	0.344 (20)	0.427 (12)	0.358 (15)
	CBPZ	0.426 (26)	0.374 (8)	0.449 (18)	0.396 (12)	0.451 (14)
	CPZ	0.310 (26)	0.516 (1)	0.301 (25)	0.357 (12)	0.269 (14)
	CMNX	0.650 (24)	— (0)	0.650 (24)	0.638 (12)	0.661 (12)
	CTM	0.383 (14)	— (0)	0.383 (14)	0.558 (5)	0.285 (9)
	CMZ	0.482 (26)	0.625 (1)	0.476 (25)	0.637 (12)	0.349 (14)
AMK	LMOX	0.359 (25)	0.416 (8)	0.332 (17)	0.415 (4)	0.349 (21)
	CMX	0.484 (27)	0.551 (21)	0.251 (6)	0.591 (6)	0.454 (21)
	CZX	0.385 (27)	0.457 (13)	0.317 (14)	0.377 (6)	0.387 (21)
	AZT	0.452 (23)	0.478 (20)	0.281 (3)	0.556 (5)	0.424 (18)
	CTRX	0.541 (27)	0.662 (7)	0.499 (20)	0.554 (6)	0.538 (21)
	CBPZ	0.482 (24)	0.592 (8)	0.427 (16)	0.497 (6)	0.477 (18)
	CPZ	0.384 (26)	0.374 (1)	0.385 (25)	0.403 (6)	0.379 (20)
	CMNX	0.576 (24)	— (0)	0.567 (24)	0.473 (6)	0.598 (18)
	CTM	0.276 (14)	— (0)	0.276 (14)	0.316 (6)	0.247 (8)
	CMZ	0.900 (25)	1.062 (1)	0.893 (24)	0.721 (6)	0.956 (19)

(10⁸CFU/ml)

Fig. 5 Killing curves of CZX combined with GM against *S. marcescens* No. 10 strain

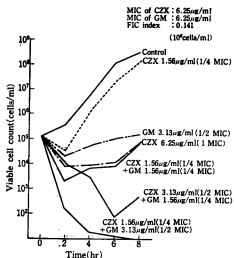
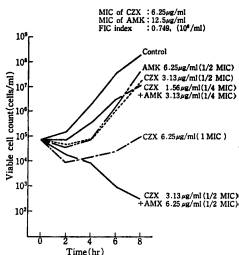


Fig. 6 Killing curves of CZX combined with AMK against *S. marcescens* No. 10 strain



ず、6時間目まで再増殖が抑制され、作用6時間目の菌数差はAMKとの併用時の約100分の1であった。

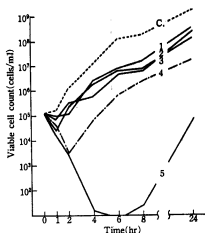
AMKとの併用でもCPZの併用濃度を1/2, 1MICと

増量した場合、曲線4,5に示されるように殺菌作用は著明に増強された。CPZ 1MICとGMあるいはAMKのそれぞれ1/8MICずつの併用では、曲線3と5の比

Fig.7 Killing curves of LMOX combined with GM against *S. marcescens* No. 10 strain

MIC of LMOX : 12.5 μ g/ml
 MIC of GM : 6.25 μ g/ml
 FIC index : 0.125

- C. Control
 1. LMOX 1/8 MIC(1.56)+GM 1/16 MIC(0.39)
 2. LMOX 1/16 MIC(0.78)+GM 1/16 MIC(0.39)
 3. LMOX 1/16 MIC(0.78)+GM 1/8 MIC(0.78)
 4. LMOX 1 MIC(12.5)
 5. LMOX 1/2 MIC(6.25)+GM 1/2 MIC(3.13)
 (μ g/ml)



較で示すように FIC index と相反して AMK との併用がより優れた殺菌作用を示した。これらの成績から、sub-MIC 同士の併用で薬剤間の協力作用の比較を行なう場合には、FIC index から差の出る薬剤濃度の組み合わせを推測できるが、1 MIC 以上の薬剤濃度の併用では必ずしも FIC index と相関した殺菌作用が出現しない組み合わせがあることが考えられた。

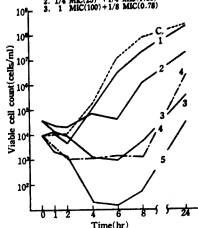
接種菌量差による最小殺菌濃度 (MBC) と 10^6 CFU/ml 接種時の MIC を患者由来の 2 菌株で検討した。検討

Fig.8 Killing curves of CPZ combined with GM or AMK against *S. marcescens* No. 10 strain

MIC of CPZ : 100 μ g/ml
 MIC of GM : 6.25 μ g/ml
 FIC index : 0.251

MIC of AMK : 12.5 μ g/ml
 FIC index : 0.753

- C. Control
 (CPZ) (AMK)
 1. 1/4 MIC(25) + 1/4 MIC(3.13)
 2. 1/2 MIC(50) + 1/4 MIC(3.13)
 3. 1 MIC(100) + 1/8 MIC(1.56)
 4. 1 MIC(100) + 1/4 MIC(1.56)
 5. 1 MIC(100) + 1/8 MIC(0.78)



に用いた薬剤は GM, AMK と CZX, LMOX および CPZ の 5 剤である。*S. marcescens* No. 10 に対する検討で、GM は接種菌量 10^4 から 10^8 CFU/ml まで MBC は 25 μ g/ml であり、 10^8 CFU/ml 接種時の MIC より 2 管高い値を示した。一方、AMK では MBC は 10^4 CFU/ml で 50, 10^6 CFU/ml 接種で 100 μ g/ml と、同じく 2~3 管高い値を示した。有意な差とは考え難いが、FIC index から推測される相乗効果の期待が、GM との併用では 3~4 管低い濃度でも得られるが、AMK との

Table 4 Correspondence between MICs (HIA, 10^6 /ml) and MBCs (HIB)

Strain	Drug	MICs (μ g/ml)	MBC (μ g/ml) in several inoculum sizes				Comparison with MIC (10^6 /ml)	
			10^4 /ml	10^5 /ml	10^6 /ml	10^7 /ml	MBC 10^4 /ml	MBC 10^5 /ml
<i>S. marcescens</i> No.10	GM	6.25	25	25	25	50	+2 (steps)	+2
	AMK	12.5	50	100	100	200	+2	+3
	CZX	6.25	6.25	12.5	25	>1,600	± 0	+1
	LMOX	12.5	12.5	25	25	200	± 0	+1
	CPZ	100	100	100	400	>1,600	± 0	± 0
<i>S. marcescens</i> No.23	GM	6.25	25	50	50	100	+2	+3
	AMK	400	400	400	400	800	± 0	± 0
	CZX	25	25	50	50	1,600	+1	+1
	LMOX	3.13	6.25	6.25	12.5	>1,600	+1	+1
	CPZ	200	100	200	400	>1,600	-1	± 0

Fig. 9 Killing curves of LMOX combined with GM against *S. marcescens* IFO 12648

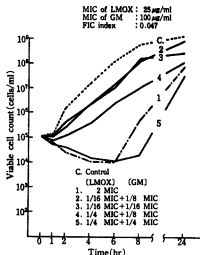
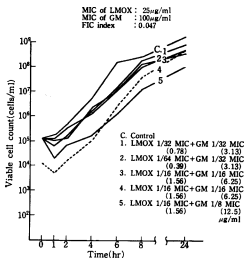


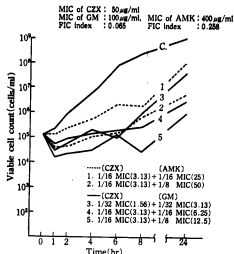
Fig. 10 Killing curves of LMOX combined with GM against *S. marcescens* IFO 12648



併用では1~2管程度であり、増殖曲線に及ぼす併用効果を検討する際には、薬剤作用時の菌数と併用する薬剤のMICが接種菌量によってどの程度影響されるかを予め検討しておく必要があると思われた (Table 4)。

S. marcescens IFO 12648 を用いて LMOX と GM の併用効果を増殖曲線に及ぼす効果で検討した。LMOX 1/16 MIC と GM 1/8 あるいは 1/16 MIC の組み合わせでは、殺菌作用は認められないが、対照に比べ、作用8時間目まで 1/5 ないし 1/10 程度の発育の抑制が得られた。LMOX 1/4 MIC と GM 1/8 MIC の組み合わせで

Fig. 11 Killing curves of CZX combined with GM or AMK against *S. marcescens* IFO 12648



は、さらに菌数の増加は抑制され、1/4 MIC ずつの併用では LMOX 2 MIC 単独と同等の殺菌作用を認め、作用6時間目まで、ゆるやかな菌数の減少がみられたが、以後再増殖した (Fig. 9)。さらに低濃度の併用で検討した。LMOX, GM の 1/32, 1/64 MIC の併用でも 1/16 MIC ずつの併用時とほぼ同等の効果で、対照の 1/5 ないし 1/10 程度の抑制が得られた。また、Fig. 10 の実線3と破線4に示したように、 10^4 接種時の 1/16 MIC ずつの併用効果は 10^5 接種時のそれと比較して作用8時間目までは接種時の菌量差が反映された (Fig. 10)。

標準株に対する薬剤の組み合わせによる差を CZX と GM あるいは AMK の併用で検討した (Fig. 11)。CZX, AMK 各 1/16 MIC 併用時を破線1に、同じく CZX, GM 各 1/16 MIC 併用時を実線4に示した。FIC index は GM との併用で 0.065, AMK との併用で 0.258 の値であった。GM との併用が AMK との併用に比べ、生菌数は 1/10 程度に抑えられ、24時間目までその差が認められた。同様に CZX 1/16 MIC と GM あるいは AMK 1/8 MIC 併用時の両剤の比較でも、曲線2と5に示したように増殖曲線に及ぼす抑制の強さは FIC index と相関した成績であった。曲線3に示すように、CZX と GM 1/32 MIC ずつの併用でも対照に比べ8時間目までの生菌数は 1/100 から 1/1,000 に抑制され、著明な併用効果を認めた (Fig. 11)。これは Fig. 10 に示した LMOX, GM の 1/32 MIC ずつの併用時に比べ有意に強い併用効果を認めたことになり、FIC index の値と相関しない成績であった。

Fig. 12 Combined effects of LMOX and GM against *S. marcescens* No. 6 and No. 12 strains

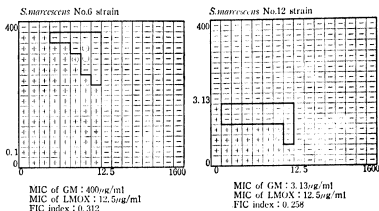
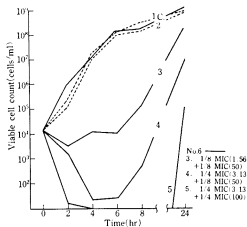


Fig. 13 Killing curves of LMOX combined with GM against *S. marcescens* No. 6 and No. 12 strains

No. 6 strain: MIC of LMOX: 12.5 µg/ml
MIC of GM: 400 µg/ml
FIC index: 0.312

No. 12 strain: MIC of LMOX: 12.5 µg/ml
MIC of GM: 3.13 µg/ml
FIC index: 0.258

No. 12 (1. 1/4 MIC(3.13)+1/16 MIC(0.20)
----- (2. 1/4 MIC(3.13)+1/8 MIC(0.39))



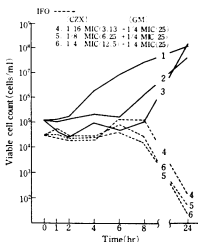
FIC index と殺菌効果との相関を検討する目的で、*S. marcescens* No. 6 と No. 12 を用いて AGs 剤の併用濃度の差を検討した。Fig. 12 に 2 株の LMOX, GM 併用時の checkerboard を示した。LMOX に対する MIC は同じ値であるが、No. 6 は GM に高度耐性で MIC 400 µg/ml と高い値を示している。checkerboard 上に丸印で示した併用濃度で両株に対する殺菌効果を検討した (Fig. 13)。LMOX 1/4 MIC, GM 1/8 MIC 併用時の破線 2 と実線 4 の比較から併用効果に著明な差があること

Fig. 14 Killing curves of CZX combined with GM against *S. marcescens* No. 10 strain and IFO 12648

No. 10: MIC of CZX: 6.25 µg/ml FIC index: 0.141
MIC of GM: 6.25 µg/ml

IFO: MIC of CZX: 50 µg/ml FIC index: 0.065
MIC of GM: 100 µg/ml

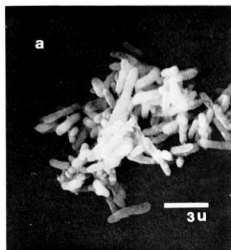
No. 10 (CZX) (GM)
1. 1/16 MIC(0.39)+1/4 MIC(1.56)
2. 1/8 MIC(0.78)+1/4 MIC(1.56)
3. 1/4 MIC(1.56)+1/4 MIC(1.56)



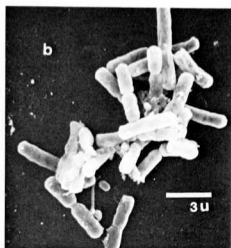
が判明し、FIC index と相反する結果であった。このことから、FIC index の比較は、その算出法から明らかなように 2 倍以上の差を有意とみるべきと考えられ、一方、併用する薬剤、特に AGs 剤の濃度差は sub-MIC 濃度の併用における検討では重要な因子と思われた。

S. marcescens IFO 12648 と *S. marcescens* No. 10 株を用いて併用効果と FIC index との相関を検討した (Fig. 14)。薬剤作用時すでに両者の菌量に約 5 倍の差が

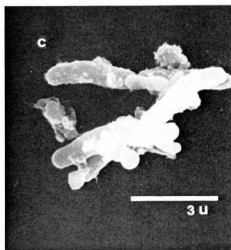
Fig.15 Scanning electron micrographs of *S. marcescens* IFO 12648 exposed to a combination of CPZ 1/16 MIC and GM 1/16 MIC



a) control

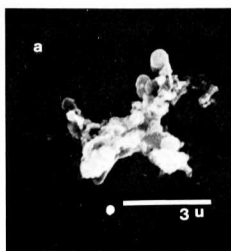


b) CPZ 1/16 MIC (MIC; 100 $\mu\text{g/ml}$)
+ GM 1/16 MIC (MIC; 100 $\mu\text{g/ml}$)
for 0,5 hour

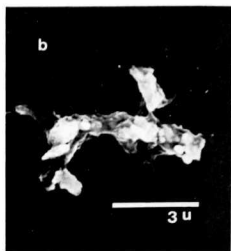


c) CPZ 1/16 MIC + GM 1/16 MIC
for 1 hour

Fig.16 Scanning electron micrographs of *S. marcescens* No.10 strain exposed to a combination of CZX 1/4 MIC and GM 1/16 MIC (a), or GM 1 MIC alone (b) for 1 hour



a) CZX 1/4 MIC (MIC; 6.25 $\mu\text{g/ml}$)
+ GM 1/16 MIC (MIC; 6.25 $\mu\text{g/ml}$)
for 1 hour



b) GM 1 MIC alone (MIC; 6.25 $\mu\text{g/ml}$)
for 1 hour

認められているが、標準株に対しては、いずれの併用でも著明な併用効果を認め、作用6から8時間の再増殖が抑制され、24時間目の生菌数は *S. marcescens* No.10株の対応する併用の場合の約10%の菌数であった。*S. marcescens* No.10株では併用する CZX の濃度が高くなるに従い、再増殖までの時間が延長する傾向が認められた。

4) 走査電顕 (SEM) による観察

S. marcescens IFO12648 に CPZ, GM 各 1/16 MIC の併用で30分作用した時の走査電顕像を Fig.15 に示す。FIC index は 0.032 である。作用30分ですでに細胞壁の一部に変化が認められるが、溶菌像は認められない (Fig.15 b)。60分後には一部に溶菌像を認める (Fig.15-c)。また、FIC index 0.065 を示した *S. marcescens* No.10 株に CZX 1/4 MIC および GM 1/16 MIC を1時間作用した像では、GM 1 MIC 作用の像と同様に、菌体の伸長化は顕著ではないが、溶菌を示す像が認められた (Fig.16)。

SEM による形態的観察から、相乗効果を認めた菌株と薬剤の組み合わせでは殺菌効果の強さに対応する形態変化が認められたが、その変化は一律ではなかった。相乗効果を認めた組み合わせでは短時間に殺菌効果が出現し、不活化酵素に対する薬剤の安定性と sub-MIC レベルの抗菌活性が協力作用に不可欠なことが推測された。

III. 考 察

抗菌化学療法の原因は、原因微生物の確定と有効な抗菌薬剤による monotherapy であることに異論はないが、临床上、重症感染症あるいは現在増加しつつある compromised host における難治性感染症では、併用療法を余儀なくされる場合が多い。抗生物質が普遍的に使用され始めた1950年以降、一般細菌感染症治療のために施行された併用療法の臨床的ならびに基礎的検討は枚挙できない程である。しかし確実に临床上相乗効果が得られる併用の組み合わせは、腸球菌性心内膜炎に対する Penicillin (PC) と Streptomycin (SM) の併用^{16,17} ならびに緑膿菌に対する Carbenicillin (CBPC) と GM の併用^{18,19} であろう。 β -lactam 剤と AGs 剤との併用に関する実験成績は多数報告されているが、それらを通覧すると薬剤数、研究対象菌株数ともに少なく、臨床検査に適用できる簡便で実用的な抗生剤の併用を試験する方法²⁰も少ないので、併用療法にあたっては基礎的な検討成績^{21,22}ならびに経験的的化学療法の臨床成績²³⁻²⁷を参考にせざるを得ないのが現状である²⁸。

Serratia は複雑性尿路感染症患者の難治性感染症例の主要な起炎菌であり、いわゆる第3世代セフェム剤やモノバクタム剤の開発により、*Serratia* 感染症に対する治療成績は向上し、*Serratia* の尿路からの分離頻度は1983年頃から減少の傾向にある。しかし、菌株によって

は β -lactam 剤, AGs 剤に高度耐性であり³¹⁾, 特に, 尿路由来株では AGs 剤に対する感受性の低下が報告されて^{14,32,33)}いるので臨床的に有用かつ確実な併用療法の確立が要望されている。

今回, 尿路感染症患者から分離した *Serratia* に対する β -lactam 剤と AGs 剤の併用効果をより総合的に研究する目的で, 教室において分離同定した *Serratia* 100 株の中から, 基本的な薬剤の MIC 分布からみてランダムに 27 株を抽出して実験材料とするものと現在使用可能な β -lactam 剤と AGs 剤をできるだけ多く用いて, それぞれの併用効果を検討した。*in vitro* の併用効果の定量的評価法としては, checkerboard dilution method^{34,35)} と time-kill curve method^{34,35)} の 2 法があり, 前者から Combined Action Index, Isobologram および FIC index^{36,37)} が導かれ, 検討されているが今回は 10^8 CFU/ml 接種時の checkerboard 法を用いて minimum FIC index を算出し併用効果を検討した。その結果, *Serratia* に対して多くの β -lactam 剤と AGs 剤は相乗効果を示し, 実験に用いた 27 通りの組み合わせのうち, LMOX と GM の組み合わせで, その minimum FIC index は, 平均で 0.241 と最小の値を示した。これらの成績は, β -lactam 剤と AGs 剤の併用における他の報告と同様の成績であった^{34,35)}。しかし, FIC index は接種菌量により変動することが指摘されており³⁷⁾, 今回の実験系でも抗菌力が接種菌量によって変動する薬剤の併用では, FIC index の解釈にあたり注意を要すると思われた。

また, FIC index は併用により各薬剤の MIC が何段階変動するかを数値で示すものであるが, 相乗効果が得られた菌株と薬剤の組み合わせについては別の評価法である増殖曲線における殺菌能ならびに形態観察によっても, 併用された sub-MIC の 2 薬剤の菌体には及ぼす作用を検討することができた。

in vitro の併用効果が, そのまま *in vivo* ならびに臨床に反映されるとは考えられないが^{34,38)}, *in vitro* で併用効果が認められない薬剤の組み合わせでは臨床的に併用効果を示すとは考え難く, その意味では基礎的検討が不可欠と思われる。しかし, 併用効果を比較する際には測定法の相違による差異, 菌株間の差などの因子が関係しているため, 個々の実験成績を比較することは難しく, 将来, 何らかの基準を設定する必要があるものと思われる。JAWETZ ら³⁹⁾も相乗, 拮抗という併用効果は菌株の反応の多種多様性から, 一定に出るものではないと述べており, 併用効果の検討には慎重であるべきことを指摘している。

また, 渡辺ら³⁹⁾は, 臨床分離の *Serratia* に対する Mi-

nocycline (MINO) と Dibekacin (DKB) の併用効果の検討で, checkerboard 法で拮抗を認めた菌株でも増殖曲線においては拮抗作用の発現はなかったと報告し, これも *in vitro* の併用効果の検討における測定法による相違であろうと指摘している。このように FIC index が殺菌作用における併用効果と常に相関するとはいえないが, 今回の実験では, Fig. 5, 6 に示した *S. marcescens* No. 10 に対する CZX と GM または AMK の組み合わせの比較や Fig. 11 に示した *S. marcescens* IFO 12648 に対する同じ組み合わせの比較から, 同一菌株において殺菌効果における組み合わせの差を検討する場合, FIC index と 관련된成績が得られ, 有意差の出る組み合わせが推測可能と思われた。しかし, Fig. 12, 13 に示した *S. marcescens* No. 6 と No. 12 を比較した成績や Fig. 14 における *S. marcescens* No. 10 と IFO 12648 に対する同じ薬剤併用下の殺菌効果の比較からは, FIC index をもとに sub-MIC 濃度の薬剤の組み合わせで比較検討する場合には, 感受性株と耐性株では併用する薬剤の濃度と接種菌量に由来する実験結果の差に充分注意して成績をよむ必要があることが示唆された。併用の成績が菌株間の比較で有意なものかどうかを判定するのは容易ではないが, sub-MIC レベルにおける薬剤の併用により協力作用がどの程度期待できるかを薬剤間において比較検討するには, これらの実験系は有用であると思われた。

今回は β -lactam 剤と AGs 剤の interaction については検討していないが, McLAUGHLIN ら⁴⁰⁾は, ある条件下で CBPC が GM を不活化することを報告し, *in vivo* での拮抗作用の出現する可能性を指摘している。PICKERING ら⁴¹⁾は, CBPC, Ticarcillin (TIPC) と GM, AMK, TOB および NTL の interaction を *in vitro* で検討し, CBPC は AGs 剤 4 剤すべてを不活化したが, TIPC は高濃度の併用においても, AMK, NTL に対して不活性化を認めなかったと報告している。また, YOUNG ら⁴²⁾も尿流障害時に CBPC による GM の不活化は著明であったと *in vivo* の実験成績を報告している。WEIBERT ら⁴³⁾は急性腎不全の 1 症例において, 高濃度の CBPC の併用で, 低濃度血清レベルの GM も不活化されたと報告し, 併用時の薬剤投与量の設定を考慮し, 相互の薬剤濃度のモニタリングの必要性を指摘している。今回の実験に用いた β -lactam 剤と AGs 剤に interaction を認めた報告はないが, 現在は AGs 剤が点滴静注でも使用されており, 同一容器内に両剤が混合されることもあり得るので, 十分に検討すべき点と思われる。さらに, 森ら⁴⁴⁾は pH の変化にともなう GM の抗菌力の変動について検討した実験から, 酸性域での抗菌活性の

低下を指摘し、尿路感染症における尿 pH のチェックの必要性を述べている。

β -lactam 剤と AGs 剤の併用効果の出現は、 β -lactam 剤による細胞壁障害が AGs 剤の菌体内への移行を良好にするためと考えられ⁴⁾、今回の実験でも低濃度の β -lactam 剤の併用で AGs 剤の効果が増強され、同様の機作が推測された。細菌の細胞壁を選択的に障害する β -lactam 剤を使用した場合に、細胞質内の蛋白質合成阻害剤である AGs 剤の作用が増強されることは容易に考えられることである。しかし、前述の実験結果から *S. marcescens* に対してランダムにこの両剤を併用しても、必ずしも相乗効果が同等に得られるとは限らないので、臨床的には、各領域における *S. marcescens* に対して最も小さな FIC index を示す薬剤の組み合わせと *in vitro* における殺菌効果を確認しておくことは、必要に迫られて併用抗菌化学療法を行なう場合に普遍的に有用であろう。

今回の実験はすべて *in vitro* において同時投与の検討を行なったが、将来さらに *in vitro* における最も有用な時間差投与の検討を行なう必要があるものと考えられる。これらの検討は sub-MIC における殺菌効果の検討とともに、必要最少量の抗菌薬剤の使用量の設定と副作用の軽減に役立つものと思われる。

[謝辞] 稿を終るにあたり、御指導、御校閲をいただいた恩師大井好忠教授に心から感謝いたします。また、本研究に御協力いただいた後藤俊弘講師をはじめ教室の諸兄に感謝します。

(本論文の要旨は第 31 回および第 32 回日本化学療法学会総会、第 31 回日本化学療法学会西日本支部総会ならびに第 14 回回際化学療法学会において発表した)

文 献

- 1) 上田 泰, 他 (15 施設): *S. marcescens* に関する基礎的・臨床的研究。第 1 報 臨床分離株における新旧株, 分離材料別および色素産生能別による検出率と薬剤感受性の比較。Chemotherapy 27: 841~847, 1979
- 2) 川島尚志, 大井好忠, 小島道夫, 後藤俊弘, 柿木敏明, 岡元健一郎, 阿世知節夫, 坂本日朗, 新村研二: 尿路感染症における Cefprozime の基礎的, 臨床的検討。Chemotherapy 28 (S-5): 797~811, 1980
- 3) 川島尚志, 大井好忠, 小島道夫, 後藤俊弘, 長沼弘三郎, 岡元健一郎: 尿路感染症における Cefoperazone (T-1551) の基礎的, 臨床的検討。Chemotherapy 28 (S-6): 768~778, 1980
- 4) 後藤俊弘, 大井好忠, 川島尚志, 小島道夫, 柿木敏明, 岡元健一郎, 陣内謙一, 前山泰典: 尿路感染症における 6059-S の基礎的, 臨床的検討。Chemotherapy 28 (S-7): 871~882, 1980
- 5) 川島尚志, 大井好忠, 後藤俊弘, 小島道夫, 岡元健一郎, 阿世知節夫, 坂本日朗, 新村研二, 永田道一, 陣 英輝: 尿路感染症における Cefmenoxime (SCE-1365) の基礎的, 臨床的検討。Chemotherapy 29 (S-1): 897~911, 1981
- 6) ANDERSON, E. T.; L. S. YOUNG & W. L. HEWITT: Antimicrobial synergism in the therapy of gram-negative rod bacteremia. Chemotherapy 24: 45~54, 1978
- 7) 深谷一太: 抗菌剤相互の併用。日本臨床 39: 33~40, 1981
- 8) 横田好子, 村川武雄, 西田 爽: Cefazolin と Gentamicin の併用に関する基礎評価。Chemotherapy 27: 696~703, 1979
- 9) 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
- 10) 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) 臨床分離菌に対する Piperacillin と Dibekacin の *in vitro* 併用効果に関する実験的考察。Chemotherapy 30: 776~779, 1982
- 11) 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(Ⅳ) 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
- 12) 斎藤 正人, 吾妻共子, 西野 武志, 谷野輝雄: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* 及び *Pseudomonas aeruginosa* に対する Sisomicin, 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
- 13) 出口浩一, 深山成美, 西村由紀子, 西家綾子: 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。Chemotherapy 33: 120~125, 1985
- 14) 後藤俊弘, 川原元可, 大井好忠: 尿路分離 *Serratia marcescens* の薬剤感受性。Chemotherapy 32: 709~717, 1984
- 15) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度(MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 16) HUNTER, T. H.: The treatment of subacute bacterial endocarditis with antibiotics. Am. J. Med. 1: 83~92, 1946
- 17) HUNTER, T. H.: Use of streptomycin in treatment of bacterial endocarditis. Am. J. Med. 2: 436~442, 1947
- 18) WEINSTEIN, R. J.; L. S. YOUNG & W. L. HEWITT: Comparison of methods for assessing in

- vitro* antibiotic synergism against *Pseudomonas* and *Serratia*. J. Lab. Clin. Med. 86 : 853~862, 1975
- 19) ANDRIOLE, V. T.: Antibiotic synergy in experimental infection with *Pseudomonas*. II. The effect of carbenicillin, cephalothin, or cephanone combined with tobramycin or gentamicin. J. Inf. Dis. 129 : 124~133, 1974
- 20) DOUGHERTY, P. F.; D. W. YOTTER & T. R. MATTHEWS : Microdilution transfer plate technique for determining *in vitro* synergy of antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 11 : 225~228, 1977
- 21) GARROD, L. P. & P. M. WATERWORTH : Methods of testing combined antibiotic bactericidal action and significance of the result. J. Clin. Pathol. 15 : 328~338, 1962
- 22) MOELLERING, R. C. & D. J. KROGSTAD : Combinations of Antibiotics. Mechanisms of Interaction against Bacteria. In "Antibiotics in Laboratory Medicine" Ed., V. LORIAN, pp. 298~341, 1980
- 23) WEINSTEIN, A. J. & R. C. MOELLERING : Penicillin and gentamicin therapy for enterococcal infection. JAMA 223 : 1030~1032, 1973
- 24) KLASTERSKY, J.; C. HENSGENS & F. M. CARPENTIER : Comparative effectiveness of combinations of amikacin with penicillin G and amikacin with carbenicillin in Gram-negative septicemia : Double-blind clinical trial. J. Inf. Dis. 134-S : 433~440, 1976
- 25) KLASTERSKY, J. et al. : Significance of antimicrobial synergism for the outcome of Gram negative sepsis. Amer. J. Med. Sci. 273(2) : 157~167, 1977
- 26) EORTC project group : Three antibiotic regimens in the treatment of infection in febrile granulocytopenic patients with cancer. J. Inf. Dis. 137(1) : 14~29, 1978
- 27) SCHIMPF, S.; W. SATTERLEE, V. M. YOUNG & A. SERPICK : Empiric therapy with carbenicillin and gentamicin for febrile patients with cancer and granulocytopenia. New Eng. J. Med. 284 : 1061~1065, 1971
- 28) RAHAL, J. J. Jr. : Antibiotic combinations ; The clinical relevance of synergy and antagonism. Medicine 57 : 179~195, 1978
- 29) POGWIZD, S. M. & S. A. LERNER : *In vitro* activity of gentamicin, amikacin, and netilmicin alone and in combination with carbenicillin against *S. marcescens*. Antimicrob. Agents Chemother. 10 : 878~884, 1976
- 30) 上田 泰, 他 (15 施設) : *S. marcescens* に関する基礎的・臨床的研究。第2報 アミノグリコシド系抗生剤に対する感受性の検討。Chemotherapy 28 : 1~8, 1980
- 31) 木村光子, 沢田和江, 川原 薫, 菅野理恵子, 池田達夫, 木村貞夫 : *S. marcescens* の Aminoglycoside 抗生物質耐性と R plasmid に関する研究。Chemotherapy 34 : 115~124, 1986
- 32) NAKAZAWA, S.; T. NISHINO, M. OTSUKI, M. NAKAO & T. NOMURA : Bacteriological studies on the combined action of aminoglycoside antibiotics and synthetic penicillins against *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antibiotics 27 : 989~991, 1974
- 33) MOELLERING, R. C. : Antimicrobial synergism—An elusive concept. J. Inf. Dis. 140 : 639~641, 1979
- 34) JAWETZ, E. & J. B. GUNNISON : An experimental basis of combined antibiotic action. JAMA 150 : 693~695, 1952
- 35) 渡辺 彰, 佐々木昌子, 青沼清一, 大泉新太郎, 今野 淳 : 臨床分離グラム陰性桿菌に対する Minocycline と Amikacin の *in vitro* 併用効果。Chemotherapy 30 : 308~314, 1982
- 36) ELION, G. B.; S. SINGER & G. H. HITCHINGS : Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. J. Biol. Chem. 208 : 477~488, 1952
- 37) 嶋田甚五郎, 他 (2 施設) : 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
- 38) REYES, M. P. et al. : Synergy between carbenicillin and an aminoglycoside against *P. aeruginosa* isolated from patients with endocarditis and sensitivity of isolates to normal human serum. J. Inf. Dis. 140(2) : 192~202, 1979
- 39) MCLAUGHLIN, J. E. & D. S. REEVES : Clinical and laboratory evidence for inactivation of gentamicin by carbenicillin. Lancet Feb. 6 : 261~264, 1971
- 40) PICKERING, L. K. & P. GEARHART : Effect of time and concentration upon interaction between gentamicin, tobramycin, netilmicin, or amikacin and carbenicillin or ticarcillin. Antimicrob. Agents Chemother. 15 : 592~596, 1979
- 41) YOUNG, L. S.; G. DECKER & W. L. HEWITT : Interaction of gentamicin by carbenicillin in the urinary tract. Chemotherapy 20 : 212~220, 1974
- 42) WEIBERT, R. T. & W. F. KEANE : Carbenicillin, gentamicin interaction in acute renal failure. Amer. J. Hosp. Pharm. 34 : 1137~1139, 1977
- 43) 森 賢治, 岩永正明 : Gentamicin の抗菌力に

に関する研究。Chemotherapy 29: 482~487, 1981
44) 吉田 隆, 他 (2 施設): 大腸菌に対するアンピ

シリンとジベカシンの併用に関する細菌学的研究。Chemotherapy 27: 857~864, 1979

COMBINED THERAPY WITH ANTIBIOTICS

—IN VITRO SYNERGISTIC EFFECTS OF β -LACTAMS AND AMINOGLYCOSIDES AGAINST *S. MARCESCENS*—

MOTOSHI KAWAHARA

Department of Urology, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima
(Director: Prof. Y. OHI)

The purpose of this study was to examine the fractional inhibitory concentration (FIC) index of β -lactams and aminoglycosides (AGs) against *S. marcescens*. The correlation between growth curves and morphological changes in the bacteria was also clarified at sub-MIC levels.

In vitro activities of 27 kinds of combination of 10 β -lactams and 4 AGs against 27 strains of *S. marcescens* isolated from patients with urinary tract infections and *S. marcescens* strain IFO 12648 were studied using the checkerboard method.

Combination of so-called third-generation cepheps (CEPs) and AGs seemed to enhance the bactericidal effect against almost all strains tested. Growth curves of these strains and the standard strain were studied after addition of each drug at sub-MIC level. The initial inoculum size was $10^4 \sim 10^6$ CFU/ml.

Scanning electron microscopic (SEM) observations were also performed.

Synergistic inhibitory rates and minimum FIC indices were: LMOX 89% (0.241), CZX 74% (0.322), CPZ 82% (0.310), all in combination with GM; and LMOX 74% (0.359), CZX 78% (0.385) and CPZ 63% (0.384) with AMK.

A bactericidal effect of LMOX with GM against *S. marcescens* No.10 strain (minimum FIC index; 0.125) was observed after adding 1/2 and 1/4 MIC, respectively. After incubation with 1/8 and 1/16 MIC, respectively, for 8 hours, viable bacteria decreased to 1/10 to 1/100 of the controls. With each 1/16 MIC of CZX and GM (minimum FIC index; 0.065) the standard strain was suppressed to 1/100 to 1/1,000 of the controls 8 hours later.

SEM demonstrated prominent bacteriolysis and/or filament formation after combination of sub-MICs in comparison with a single regimen.

Although the minimum FIC indices did not always coincide with antibacterial synergism, growth curve tests always reflected morphological changes as far as sub-MIC combinations of the third-generation CEPs and AGs were concerned.