

抗菌性薬剤の3剤併用に関する研究(Ⅱ)

Sulbactam の添加による cefoperazone と amikacin の *in vitro* 併用効果の増強

渡辺 彰・大泉耕太郎・今野 淳

東北大学抗酸菌病研究所内科学部門*

(昭和63年2月25日受付)

臨床分離の8菌種、各20株、計160株を対象とした微量液体培地希釈チェス盤法により、SBT/CPZ と AMK の *in vitro* 併用効果を、CPZ と AMK の併用効果と比較した。併用効果の判定には FIC index のほかに、三次元チェス盤法の応用として新たに考案した、2種の併用の各々の平均 MIC 曲線下面積の比を表わす併用効果増強指数 (enhancement of combined effect index = ECE index) を用いて比較した。

CPZ と AMK の併用および SBT/CPZ と AMK の併用は、その mean FIC index が8菌種の平均で 0.46 および 0.48 を示して同等であるが、SBT の併用によって CPZ 自体の MIC が 1/2~1/7 に小さくなるため、SBT/CPZ と AMK の併用における平均 MIC 曲線下面積は、CPZ と AMK の併用のそれより小さかった。すなわち、mean ECE index は *S. aureus* 0.34, *E. coli* 0.47, *K. pneumoniae* 0.65, *E. cloacae* 0.26, *S. marcescens* 0.35, *P. mirabilis* 0.87, *M. morgani* 0.81, *P. aeruginosa* 0.35 であった。菌種によって相違は少しあるが、SBT の添加による併用効果の増強は、その β -lactamase 阻害作用により強く発現していることが認められた。

Key words: 3剤併用効果, 三次元チェス盤法, ECE index, Sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ), Amikacin (AMK)

近年の抗菌性薬剤の進歩にもかかわらず臨床の場では薬剤耐性菌の増加が報告されており、私共の施設においても同様の傾向がみられる¹⁾。特に β -lactamase 産生による耐性株の増加が著明であり²⁾、これに対して種々の対策が取られつつある。その一つとして、 β -lactamase 阻害剤を開発して、既存の薬剤と配合あるいは結合する試みがなされており、その一つとして、sulbactam (SBT, 以下同じ) を cefoperazone (CPZ, 以下同じ) と 1対1 の比で配合した SBT/CPZ がすでに実用化されている。

私共はすでに、CPZ とアミノ配糖体系抗生物質との有意の併用効果について報告³⁾しているが、今回は、3剤併用効果の研究の一環として、この併用にさらに SBT を加えた場合の *in vitro* 併用効果について比較検討し、興味ある知見を得たので以下に報告する。

I. 材料と方法

被験菌株: 当科に保存されている *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *M. morgani*, *P. aeruginosa* の8菌種、各20株、計160株を使用した。いずれも東北大学抗酸菌病研究所

および仙台厚生病院において得られた、主に呼吸器由来の臨床分離株である。

抗菌性薬剤: 使用した3薬剤のうち、CPZ と SBT/CPZ は台糖ファイザー株式会社、また、amikacin (AMK) は萬有製薬株式会社から提供されたものを用いた。

抗菌力測定: ダイナテック MIC-2000 システムによる微量液体培地希釈チェス盤法を用いた。すなわち、日本化学療法学会標準法⁴⁾と同様に、各薬剤の倍数希釈系列を Mueller-Hinton broth (MHB, 以下同じ, Difco) を用いて作成し、これを同システムのディスペンサーにより、96個のウェルを有するマイクロタイター・プレートの各ウェルに無菌的に 0.1 ml ずつ分注した。あらかじめ MHB にて 37°C, 20 時間培養した被験株の菌液を 10 倍希釈し、これを同システムのイノキュレーターにより各ウェルに 0.0015 ml ずつ接種した。この方法での接種菌量は *S. aureus* の場合ほぼ 10^5 CFU/ml, グラム陰性桿菌の場合ほぼ 10^6 CFU/ml となる。菌液を接種した後、37°C, 20 時間培養して各ウェル内の混濁を肉眼的に観察し、MIC を判定した。なお、この方法で得ら

* 仙台市星陵町4番1号

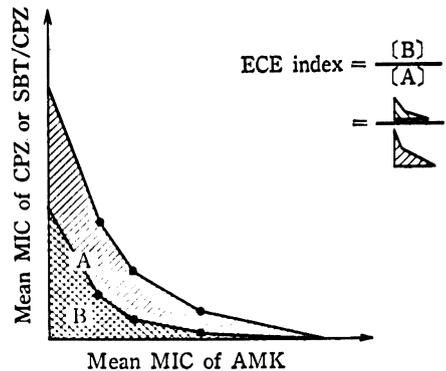
れる成績は日本化学療法学会標準法⁹⁾による成績とほぼ相関する^{9,10)}ことが知られている。

β -lactamase 活性の測定：全株について penicillinase (PCase, 以下同じ) および cephalosporinase (CSase, 以下同じ) の活性を pH 指示薬法¹¹⁾にて検討した。すなわち、基質として penicillin G あるいは cephaloridine を、pH 指示薬として bromocresol purple (Difco) を用いて一定の割合に含有させたディスクを作成した。このディスク上に被験株のコロニー 1 白金耳量を塗抹した。ディスクの色調が塗抹直後から青色から黄色に強く変化する場合に \equiv (strongly positive), 塗抹 5~10 分後までに変化のみられるものを \equiv (moderately positive), 最終的に 30 分後に判定してこの時初めて黄色に変化したものを $+$ (weakly positive), 全く変化しないものを $-$ (negative) と判定した。

併用効果の判定：2種の併用の各々について1株ごとに FIC index を算定し、菌種ごとに幾何平均して mean FIC index とした。また、FIC index だけでは SBT 添加の効果を定量的に表現することができないので、enhancement of combined effect index (ECE index, 以下同じ) すなわち併用効果増強指数を考案して、SBT 添加による併用効果の増強の程度を表わした。ECE index の算定は次のように行なった。すなわち、三次元チェス盤法⁹⁾を応用して、Fig. 1 に示すように、2種の併用各々の平均 MIC 曲線を求め、その曲線下面積 (area under the MIC curve=AUC, 以下同じ) の比を求めて ECE index とした。各菌種ごとに mean ECE index を算定し、これが 0.5 以下の場合には SBT の添加による併用効果の増強は著明、0.5 から 1.0 までの間は軽度の増強とし、1.0 以上は拮抗作用とした。

II. 成 績

Fig. 2 および Fig. 3 に、AMK の存在下の CPZ および SBT/CPZ の平均 MIC 曲線を各菌種ごとに表わした。▲印で連続する曲線が CPZ の、また●印で連続する曲線が SBT/CPZ の平均 MIC 曲線を表わしているが、おおむねこれらは双曲線類似の形態を示した。これらの平均 MIC 曲線とグラフの縦軸との接点は CPZ 単独および SBT/CPZ 単独の平均 MIC を、グラフの横軸との接点は AMK 単独の平均 MIC を表わしている。2種の併用における併用効果の程度は、それぞれの曲線の曲率が大きであるほど強いことを示し、これを定量的に表現したもののが mean FIC index であるが、Table 1 の一部にその成績を示した。2薬剤間の併用効果の判定基準⁹⁾に従えば、全菌種の平均でみた場合、CPZ と AMK の併用の mean FIC index が 0.46, SBT/CPZ と AMK の併用の mean FIC index が 0.48



ECE index criteria for judgement of the combined effect

- ECE index ≤ 0.5 marked enhancement
- $0.5 < \text{ECE index} \leq 1.0$ moderate enhancement
- $1.0 < \text{ECE index}$ antagonism

Fig. 1. Illustration of the enhancement of combined effect (ECE) index

であり、いずれも相乗的な作用を示していた。

また、CPZ の曲線下面積に対して SBT/CPZ の曲線下面積が小さいほど SBT の添加による抗菌力の改善が強いことを示すが、先に述べたように、これを定量的に表現したものが ECE index であり、Table 1 の一部にその成績を示した。これによれば、全菌種の mean ECE index が 0.51 であり、このことは SBT の添加によって CPZ の抗菌力がほぼ 2 倍に増強されたことを意味する。さらに、各菌種ごとの mean ECE index は、*S. aureus*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* の 4 菌種では 0.35 までの小さな値を示し、逆に *P. mirabilis* と *M. morgani* では 0.8 以上の大きな値を示した。SBT 添加による効果が前四者の菌種で強いことを示している。

Table 2 には、 β -lactamase 活性の分布を各菌種ごとに示した。SBT 添加の効果の小さかった *P. mirabilis* と *M. morgani* においては PCase 活性が全く認められなかった。

III. 考 察

CPZ はいわゆる第 3 世代セフェム系抗生物質の一つとして我が国において開発された有用性の高い薬剤である。私共はすでに CPZ とアミノ配糖体系抗生物質の併用効果について報告している⁹⁾が、特に *P. aeruginosa* に対して CPZ と dibekacin (DKB, 以下同じ) との間に相乗的な併用効果が認められ、臨床的にも特に難治性感染症においてこの 2 薬剤の併用が優れていた。しかしながら、 β -lactamase 産生の機序による薬剤耐性菌が増加しつつある⁹⁾現在、 β -lactamase、特に PCase に対してやや不安定な CPZ の臨床使用にはおのずから制限が

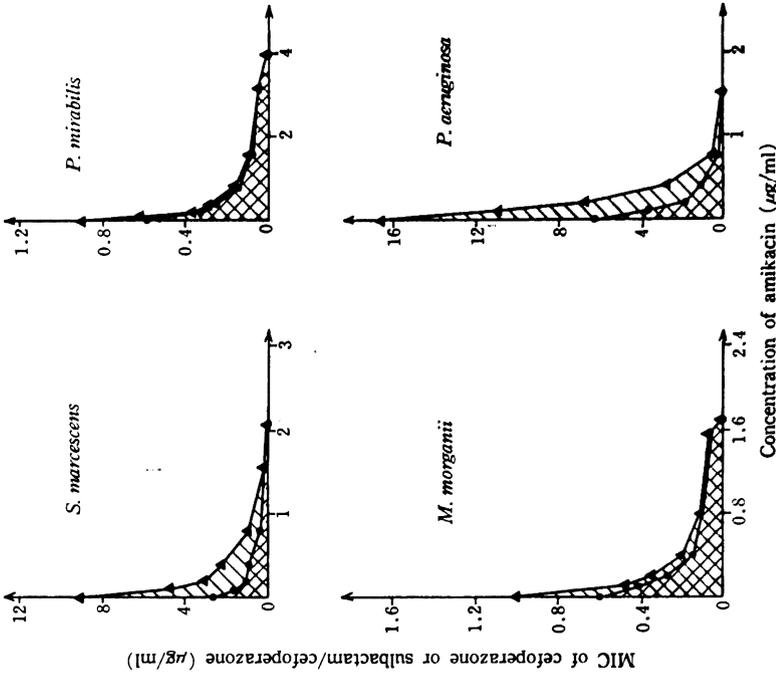


Fig. 3. Mean MIC curves of cefoperazone (\blacktriangle - \blacktriangle) and sulbactam/cefoperazone (\bullet - \bullet) in the presence of amikacin against *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *M. morgani*, and *P. aeruginosa*

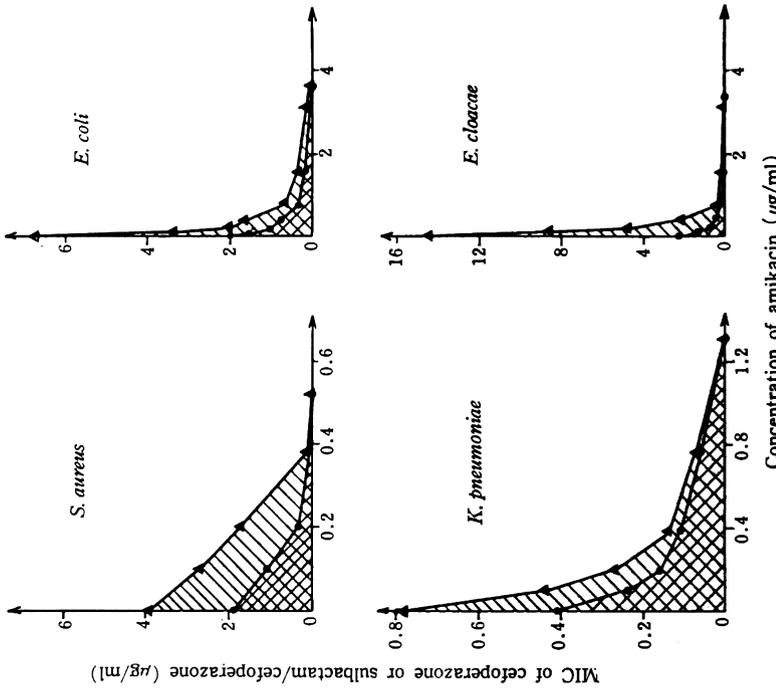


Fig. 2. Mean MIC curves of cefoperazone (\blacktriangle - \blacktriangle) and sulbactam/cefoperazone (\bullet - \bullet) in the presence of amikacin against *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *E. cloacae*

Table 1. Mean FIC indices of cefoperazone plus amikacin and sulbactam/cefoperazone plus amikacin, and ECE indices of two combination regimens

Species	Number of strains	Mean FIC index		ECE index $\left(\frac{((\text{SBT/CPZ}) + \text{AMK})}{(\text{CPZ} + \text{AMK})} \right)$
		CPZ+AMK	(SBT/CPZ)+AMK	
Total	160	0.46	0.48	0.51
<i>S. aureus</i>	20	0.92	0.67	0.34
<i>E. coli</i>	20	0.39	0.47	0.47
<i>K. pneumoniae</i>	20	0.43	0.49	0.65
<i>E. cloacae</i>	20	0.40	0.40	0.26
<i>S. marcescens</i>	20	0.38	0.42	0.35
<i>P. mirabilis</i>	20	0.34	0.40	0.87
<i>M. morgani</i>	20	0.58	0.62	0.81
<i>P. aeruginosa</i>	20	0.44	0.44	0.35

Table 2. Distribution of β -lactamase activity measured semi-quantitatively by pH disk acidometry against strains tested

Species	Number of strains	β -lactamase activity							
		PCase activity				CSase activity			
		-	+	#	##	-	+	#	##
Total	160	106	31	13	10	78	44	24	14
<i>S. aureus</i>	20	3	5	7	5	15	5		
<i>E. coli</i>	20	11	6	2	1	2	10	7	1
<i>K. pneumoniae</i>	20	5	13	2		11	8		1
<i>E. cloacae</i>	20	15	4		1	3	6	8	3
<i>S. marcescens</i>	20	18	1		1	9	3	5	3
<i>P. mirabilis</i>	20	20				20			
<i>M. morgani</i>	20	20				7	9	2	2
<i>P. aeruginosa</i>	20	14	2	2	2	11	3	2	4

加えられよう。この弱点を補うものとして β -lactamase 阻害剤の SBT を CPZ と 1対1の比率で配合した SBT/CPZ が開発され、特に β -lactamase 産生菌に対する基礎的・臨床的有用性が確認されている。

今回、私共は SBT/CPZ とアミノ配糖体系抗生物質との併用の対象として AMK を選んで、臨床分離株に対する *in vitro* 併用効果を検討し、CPZ と AMK の *in vitro* 併用効果と比較した。この2種の併用における併用効果それ自体は、*S. aureus* と *M. morgani* に対しては弱いもの、それ以外のグラム陰性桿菌に対してはいずれも FIC index が 0.5 以下の相乗的な併用効果を示した。全菌種の平均でもほぼ同等の FIC index を示しており、この判定法で判断する限り優劣はないかと思われる。しかしながら、SBT の添加によって CPZ 自体の MIC が大きく低下するため、発育阻止に要する SBT/CPZ の量は著明に小さくなる。これを定量的に表現するものとして ECE index を考案して用いたが、全菌種の平均で 0.51 という成績であった。すなわち、SBT を添加することにより、発育を阻止するのに要する CPZ

の量がほぼ 1/2 になったことを意味している。ECE index の値を菌種別にみると、PCase 活性の認められなかった *P. mirabilis* と *M. morgani* では大きく、逆に *S. aureus* をはじめとするその他の菌種では小さいことが知られた。これは、前者で SBT の効果が小さく、後者で大きいことを意味している。

ところで臨床分離株においては、*S. aureus* の産生する β -lactamase はミニプラスミドの支配を受け、強い PCase 活性を有している¹⁰⁾。グラム陰性桿菌では、*K. pneumoniae* は染色体上に PCase 産生遺伝子を持つが、それ以外の菌種では *P. mirabilis* を除くほとんどの菌種において、染色体上に CSase 産生遺伝子を有するとともに、その多くでは臨床に特に問題となっている伝達性細胞質因子、すなわち R プラスミド上にも PCase (TEM 型および OXA 型) 産生遺伝子を持つものが多い¹⁰⁾。そして、今回検討した CPZ は β -lactamase、特に PCase に対しては不安定であるが、CSase に対してよりは PCase に対して特に阻害作用の強い SBT¹¹⁾ を CPZ と配合させた場合には、CPZ 耐性を示す *S. aureus*

や種々の腸内細菌科の菌種の多くに対して、相乗的な抗菌作用が得られるとされる^{12,13)}。今回の検討でも、これらの菌種において SBT の添加による併用効果の改善が大きいことが知られた。すなわち、CPZ と AMK の併用に対してさらに SBT を添加することにより、CPZ と AMK の併用効果を増強させることが可能であり、これは SBT の有する β -lactamase 阻害作用によって発現していることが確認された。このことから、 β -lactamase 産生による薬剤耐性菌が増加しつつある臨床の場合において、SBT/CPZ と AMK の併用が、CPZ 単独と AMK の併用よりも優れた臨床効果を挙げ得る可能性が推察され、この併用に関してさらに臨床的な検討を加える価値があると考えられた。

文 献

- 1) 渡辺 彰：呼吸器感染症一起炎菌の変貌と化学療法剤の使いかた一。クリニカ 12：813～819, 1985
- 2) 渡辺 彰：抗生物質療法—最近の動向—： β -ラクタム系抗生剤を中心に、 β -ラクタマーゼ阻害剤と配合剤。Progress in Medicine 5 (Suppl. 2)：1951～1959, 1985
- 3) 今野 淳，本宮雅吉，大泉耕太郎，佐々木昌子，渡辺 彰，青沼清一，大沼菊夫：抗生物質の併用に関する研究— β -lactam 剤とアミノ配糖体の併用—。日本医事新報 No.2978, 26～31, 1981
- 4) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29：76～79, 1981
- 5) 佐々木昌子，大泉耕太郎，渡辺 彰，青沼清一，大沼菊夫，今野 淳：ブドウ球菌，グラム陰性桿菌に対する Dynatech MIC-2000 System および化学療法学会標準法 (HI 培地および MH 培地) で測定した常用抗生物質最小発育阻止濃度の比較。Chemotherapy 32：10～20, 1984
- 6) 角井 徹，中野 博，世古昭三，榊 知果夫，畑地廉介，仁平寛巳：MIC-2000 システムによる MIC 測定方法の検討：日本化学療法学会標準法による MIC 測定との比較。Chemotherapy 33：537～543, 1985
- 7) 五島瑛智子，辻 明良： β -ラクタム系抗生物質と β -ラクタマーゼ。検査と技術 9：464～471, 1981
- 8) 渡辺 彰，大泉耕太郎，今野 淳：抗菌性薬剤の 3 剤併用に関する研究 (I)，三次元チェス盤法による 3 剤併用効果の定量評価の試み。Chemotherapy 36：613～616, 1988
- 9) 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
- 10) 上田 泰，清水喜八郎編：化学療法ハンドブック (改訂第 3 版)，I-5. 耐性化の生化学的機作 (横田 健)，42～56 頁，永井書店，1986
- 11) FU K P, NEU H C：Comparative inhibition of β -lactamases by novel β -lactam compounds. Antimicrob Agents & Chemother 15：171～176, 1979
- 12) YU P K W, WASHINGTON II J A：Bactericidal activity of cefoperazone with CP-45, 899 against large inocula of β -lactamase producing *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents & Chemother 20：63～65, 1981
- 13) FU K P, NEU H C：Synergistic activity of cefoperazone in combination with β -lactamase inhibitors. J Antimicrob Chemother 7：287～292, 1981

COMBINATIONS OF THREE ANTIMICROBIAL AGENTS (II)

ENHANCEMENT OF THE *IN VITRO* COMBINED EFFECT OF CEFOPERAZONE PLUS AMIKACIN BY ADDITION OF SULBACTAM

AKIRA WATANABE, KOTARO OIZUMI and KIYOSHI KONNO

Department of Internal Medicine, Research Institute for Chest Diseases and Cancer, Tohoku University, Seiryomachi 4-1, Sendai 980, Japan

We compared the *in vitro* combined effect of sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ=1:1) plus amikacin (AMK) against a total of 160 strains of clinical isolates of eight different species with that of CPZ plus AMK. The *in vitro* combined effect was determined by a checkerboard broth dilution method using the Dynatech MIC-2000 system. The FIC index, mean MIC values of SBT/CPZ, or CPZ in combination with varying concentrations of AMK, and the enhancement of combined effect index (ECE index) were then determined and expressed in terms of the geometrical mean. The ECE index was defined as the ratio of the area under the MIC curve of SBT/CPZ, or CPZ in combination with two different combinations of AMK.

The combination of CPZ and AMK was found to be remarkably synergistic against all the species except *S. aureus*, as shown by a mean FIC index of 0.46. Also, a remarkable synergistic combined effect (mean FIC index of 0.48) was found between SBT/CPZ and AMK against all the species. Although the FIC indices of the above two combination regimens were almost the same, the addition of SBT reduced the MICs of CPZ. The area under the MIC curve of SBT/CPZ combined with AMK thus became smaller than that of CPZ plus AMK. Namely, the ECE index of SBT in combination with CPZ plus AMK was 0.34 against *S. aureus*, 0.47 against *E. coli*, 0.65 against *K. pneumoniae*, 0.26 against *E. cloacae*, 0.35 against *S. marcescens*, 0.87 against *P. mirabilis*, 0.81 against *M. morgani*, and 0.35 against *P. aeruginosa*. In addition, enhancement of the *in vitro* combined effect by the addition of SBT was remarkable against β -lactamase-producing strains.

The above results suggest that the combination of SBT with CPZ plus AMK is useful in the treatment of severe infections, especially those caused by β -lactamase-producing strains.