

## 抗菌性薬剤の3剤併用に関する研究(Ⅲ)

 $\beta$ -ラクタム系とアミノ配糖体系およびテトラサイクリン系薬剤間の3剤併用効果

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)

臨床分離株を対象として、 $\beta$ -ラクタム系、アミノ配糖体系およびテトラサイクリン系の3系統薬剤同時併用の効果について検討した。*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* の計118株を対象とし、3系統等量混合倍数希釈系列の各菌株に対するMICとFIC<sub>2</sub> indexを求め、また、PIPC+AMKのチェス盤にMINOを低濃度から加えてFIC<sub>2</sub> indexの変化を観察した。Mean FIC<sub>2</sub> indexは、PIPC+AMK+MINOとCPZ+AMK+MINOがともに0.73、CZX+AMK+MINOが0.77であった。MINOを低濃度から添加すると、*E. coli*と*K. pneumoniae*ではFIC<sub>2</sub> indexがさらに低下するが、*S. marcescens*と*P. aeruginosa*ではほとんど変化しなかった。

以上より、3剤併用では菌種により強い併用効果が認められるものの、拮抗作用は小さく、難治性感染症への臨床応用の適応が示唆された。

**Key words:** 3剤併用効果, FIC<sub>2</sub> index,  $\beta$ -ラクタム系, アミノ配糖体系, テトラサイクリン系

私共はすでに、抗菌性薬剤の2剤併用について基礎的・臨床的に種々報告<sup>1-13)</sup>してきた。それらのうち、基礎的な成績を要約すると、 $\beta$ -ラクタム系、アミノ配糖体系およびテトラサイクリン系の3系統のうちそれぞれ2系統間には、Fig. 1に示すように、相乗ないし部分的相乗作用という良好な併用効果の存在することが知られた。肺癌二次感染の臨床例に対する抗菌性薬剤の単独療法と併用療法の有用性の比較を行なった私共の成績<sup>9-13)</sup>でも、基本的に、単独療法よりも $\beta$ -ラクタム系とアミノ配糖体系の2剤併用療法の有効性が有意に高いことが知られたが、さらに、テトラサイクリン系をも併用した

3剤併用の有効性が、2剤併用のそれよりも有意に優れていることが知られた<sup>12,13)</sup>。

今回は、これら3系統を同時に併用した場合の*in vitro*併用効果について検討して、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. aeruginosa*の6菌種、計118株を使用した。*E. cloacae*の18株以外はすべて20株であるが、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。実験1では全株を使用した。実験2では*S. aureus* 10株、*E. coli* 18株、*K. pneumoniae*と*S. marcescens*および*P. aeruginosa*の各20株、計88株を使用した。

抗菌性薬剤： $\beta$ -ラクタム系として piperacillin (PIPC, 以下同じ), cefoperazone (CPZ, 以下同じ) および ceftizoxime (CZX, 以下同じ) のうち1剤を使用し、アミノ配糖体系として amikacin (AMK, 以下同じ) を、テトラサイクリン系として minocycline (MINO, 以下同じ) を使用した。

抗菌力測定：ダイナテック MIC-2000 システムによる

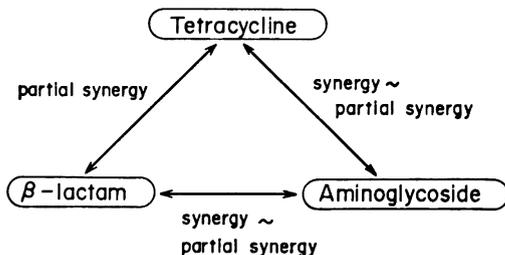


Fig. 1. *In vitro* combined effect of two of three antimicrobial agents ( $\beta$ -lactam, aminoglycoside and tetracycline) against clinical isolates of Gram-negative bacilli

\* 仙台市星陵町4番1号

微量液体培地希釈法を用いた。すなわち、日本化学療法学会標準法<sup>14)</sup>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、次項に示す組み合わせに従って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* の場合はほぼ 10<sup>8</sup> CFU/ml, グラム陰性桿菌の場合はほぼ 10<sup>6</sup> 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て、MIC を判定した。なお、この方法で得られる成績は日本化学療法学会標準法による成績とほぼ相関する<sup>15,16)</sup>ことが知られている。

薬剤の組み合わせ方と実験方法：2つの実験を行なったが、実験1では3系統の薬剤を等量に混合して倍数希釈系列を作成した。β-ラクタム系薬剤が3種類あるため、併用の系列は PIPC+AMK+MINO, CPZ+AMK+MINO および CZX+AMK+MINO の3系列である。ただし、PIPC の場合のみ他剤の4倍量とした。実験2では、実験1で検討した3系列のうち、PIPC+AMK+MINO の系列について詳細に検討した。すなわち、PIPC+AMK のチェス盤に、MINO の4倍希釈系列を低濃度から、0, 0.2, 0.78, 3.13 μg/ml を加えて FIC index の変化を観察した。

併用効果の判定基準：実験1では、3剤各々単独での MIC をまず求めた。次に、3剤等量混合希釈系における併用時の各々の薬剤の MIC すなわち fractional inhibitory concentration (FIC) を求め、それらと単独使用時の MIC との比を算出する。これらの3薬剤についての比の合計のうち、最小の値が FIC index であるが、Fig. 2 に示すように3剤併用における FIC index を、今回新たに FIC<sub>3</sub> index と定義した。そして、FIC<sub>3</sub> index

$$FIC_3 \text{ index} = \left[ \frac{FIC_A}{MIC_A} \right] + \left[ \frac{FIC_B}{MIC_B} \right] + \left[ \frac{FIC_C}{MIC_C} \right]$$

- FIC<sub>3</sub> index ≤ 0.75 ----- synergy
- 0.75 < FIC<sub>3</sub> index < 1.5 ----- partial synergy
- FIC<sub>3</sub> index = 1.5 ----- addition
- 1.5 < FIC<sub>3</sub> index ----- antagonism

Fig. 2. FIC<sub>3</sub> index for the evaluation of the *in vitro* combined effect of three antimicrobial agents

$$FIC_2 \text{ index} = \left[ \frac{FIC_A}{MIC_A} \right] + \left[ \frac{FIC_B}{MIC_B} \right]$$

- FIC<sub>2</sub> index < 0.5 ----- synergy
- 0.5 < FIC<sub>2</sub> index < 1.0 ----- partial synergy
- FIC<sub>2</sub> index = 1.0 ----- addition
- 1.0 < FIC<sub>2</sub> index ----- antagonism

Fig. 3. FIC<sub>2</sub> index for the evaluation of the *in vitro* combined effect of two antimicrobial agents

が 0.75 以下を相乗作用、0.75 以上で、1.5 未満を部分的相乗作用、1.5 を相加作用、1.5 以上を拮抗作用と定義した。実験2では、MINO 添加時の最小発育阻止濃度の組み合わせを、PIPC および AMK 単独での MIC と比較し、その比の最小となる合計、すなわち FIC index を算出してその変化を観察した。この場合の FIC index の判定は2剤併用における場合<sup>9)</sup>と同じであり、これを Fig. 3 に示すように2剤併用における FIC index, すなわち FIC<sub>2</sub> index と定義した。そして FIC<sub>2</sub> index が 0.5 以下を相乗作用、0.5 以上かつ 1.0 以下を部分的相乗作用、1.0 を相加作用、1.0 以上を拮抗作用と定義した。

Table 1. Mean FIC<sub>3</sub> indices of a combination of equal amounts of three antimicrobial agents against clinical isolates

Species	Number of strains	Mean FIC <sub>3</sub> indices		
		PIPC*+AMK+MINO	CPZ+AMK+MINO	CZX+AMK+MINO
Total	118	0.73	0.73	0.77
<i>S. aureus</i>	20	0.67	0.72	0.75
<i>E. coli</i>	20	0.74	0.74	0.80
<i>K. pneumoniae</i>	20	0.84	0.79	0.81
<i>E. cloacae</i>	18	0.64	0.67	0.66
<i>S. marcescens</i>	20	0.70	0.70	0.74
<i>P. aeruginosa</i>	20	0.69	0.67	0.77

\* The concentration of PIPC was 4 times that of other agents

## II. 成績

Table 1 に実験 1 の成績を示した。Table 1 には 3 種類の併用のそれぞれにおける、各菌種ごとの mean  $FIC_2$  index を示した。最上段には全菌株に対する mean  $FIC_2$  index を示したが、PIPC+AMK+MINO と CPZ+AMK+MINO がともに 0.73、CZX+AMK+MINO が 0.77 であった。先の定義に従えば、前二者の併用が相乗作用、後者が部分的相乗作用を示したことになる。また、各菌種ごとにみると、*E. coli* と *K. pneumoniae* ではやや大きな  $FIC_2$  index が観察されて部分的相乗作用を示したが、その他の菌種ではいずれも相乗作用が認められた。

Table 2 に実験 2 の成績を示した。この実験では、MINO の最大添加濃度が 3.13  $\mu\text{g/ml}$  までであり、それ以上の観察は行ない得なかった。菌種ごとにみた場合、*S. aureus* では MINO 0.2  $\mu\text{g/ml}$  単独でもその全株の発育が阻止されるため、併用の成績は得られなかった。*E. coli* と *K. pneumoniae* では、MINO を低濃度から添加していくと、 $FIC_2$  index がさらに低下するものの *S. marcescens* と *P. aeruginosa* ではほとんど変化せず、むしろ逆に上昇して、0.5 以上の  $FIC_2$  index という部分的相乗作用の範囲に分布する拮抗的な動きもみられた。

## III. 考察

私共は、先に述べたように抗菌性薬剤の 2 剤併用に関して、 $\beta$ -ラクタム系、アミノ配糖体系およびテトラサイクリン系薬剤の間には良好な *in vitro* 併用効果が存在するという成績を報告してきた<sup>2,3,5-7</sup>)。また、臨床的にも肺癌二次感染例では、 $\beta$ -ラクタム系とアミノ配糖体系薬剤との併用療法の有用性が高いことを確認・報告している<sup>9-13</sup>)。しかも、テトラサイクリン系薬剤をさらに加えた 3 剤併用療法の有効性が、2 剤併用のそれよりも有意に高い<sup>12,13</sup>)ことが知られ、この併用に関して基礎的な検討を加える価値があると考えられた。

今回の検討では、組み合わせる薬剤をある程度限定し

て、 $\beta$ -ラクタム系として PIPC, CPZ および CZX, アミノ配糖体として AMK, テトラサイクリン系として MINO を選択したが、この範囲内の検討だけでも、以上に挙げた 3 系統の薬剤間には良好な 3 剤併用の効果が存在することが知られた。すなわち、臨床分離グラム陰性桿菌および黄色ブドウ球菌に対して、3 剤等量混合希釈系は、3 剤併用効果の指数である  $FIC_2$  index が 0.75 前後という値を示し、これは、今回私共の示した定義に従えば、相乗作用から部分的相乗作用の範囲に分布することになる。また、すでに併用効果の認められている PIPC+AMK の併用の系列に、MINO を低濃度から添加した場合にも、特に *E. coli* と *K. pneumoniae* では 2 剤併用効果の指数である  $FIC_2$  index が順調に低下して行き、MINO を添加することの意義が認められた。他方、*S. marcescens* と *P. aeruginosa* に対しては一部分に拮抗的な作用を示す動きもみられた。しかし、このことは、この 2 つの菌種に対する MINO の抗菌力が *E. coli* や *K. pneumoniae* に対する場合より若干弱く、しかも、今回検討した MINO の濃度が、これらの菌種に対する MIC よりもかなり低くてその抗菌作用がほとんど発揮されなかったために、PIPC と AMK の併用効果を増強する作用が少なかったものと思われた。したがって、今回検討した MINO の濃度よりさらに高いレベルで、同様の検討を行なう必要があると考えられた。しかしながら私共の一連の検討でみる限り、強い拮抗作用は認められず、今回得られた基礎的な成績は臨床的な 3 剤併用療法の有用性を一部裏付けるものと考えられる。また、このことから難治性感染症に対する 3 剤併用療法の適応が示唆されよう。

今回の検討では、3 剤併用効果の定量評価として 2 つの方法を採用した。すなわち、良好な併用効果を示す薬剤の組み合わせを見出す目的のためには、前々報<sup>17</sup>)に記した三次元チェス盤法を応用して、等量混合希釈系における  $FIC_2$  index を算出する方法を採用した。さらに、

Table 2. Changes of  $FIC_2$  indices when minocycline (MINO) was added to a combination of piperacillin (PIPC) and amikacin (AMK)

Species	Number of strains	Mean $FIC_2$ indices			
		PIPC+AMK	PIPC+AMK+MINO (0.2 $\mu\text{g/ml}$ )	PIPC+AMK+MINO (0.78 $\mu\text{g/ml}$ )	PIPC+AMK+MINO (3.13 $\mu\text{g/ml}$ )
<i>S. aureus</i>	10	0.62	/*	/*	/*
<i>E. coli</i>	18	0.48	0.43	0.27	0.23
<i>K. pneumoniae</i>	20	0.54	0.48	0.27	0.15
<i>S. marcescens</i>	20	0.50	0.53	0.46	0.36
<i>P. aeruginosa</i>	20	0.40	0.43	0.43	0.45

\* The growth of all strains of *S. aureus* was inhibited by 0.2  $\mu\text{g/ml}$  of MINO alone

上記の方法で見出した薬剤の組み合わせについて、併用効果の発現の程度を詳細に検討するためには、三次元チェス盤法そのものを採用した。このように2つの実験を組み合わせることにより、さらに効率的な検討が行なえるものと考えられる。すなわち、今回の検討のうちの等量混合希釈系は、併用すべき薬剤の組み合わせを見出す screening に使い得る方法と考えられる。そして、三次元チェス盤法は詳細な検討を行なうのに適している、と考えられた。また、今回の検討と直接の関連はないが、配合剤の併用効果の定量評価には前報<sup>18)</sup>に挙げた併用効果増強指数 (ECE index) が有用であると考えられる。そして、これらの方法論により、併用効果のさらに効果的な定量評価が行なえるものと考えられる。

#### 文 献

- 1) 今野 淳, 本宮雅吉, 大泉耕太郎, 佐々木昌子, 中井裕之, 斎藤園子, 渡辺 彰, 富樫秀生, 小六丸貞裕, 青沼清一, 鈴木修治: 肺癌に合併する呼吸器感染症の意義。肺癌 20: 1~9, 1980
- 2) 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
- 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— $\beta$ -lactam 剤とアミノ配糖体の併用—。日本医事新報 No. 2978, 26~31, 1981
- 4) 今野 淳, 大泉耕太郎: 抗生物質併用療法の適応と選択。内科 48: 397~401, 1981
- 5) 今野 淳, 大泉耕太郎, 青沼清一: アミノ配糖体と  $\beta$ -ラクタム剤併用の意義。医薬ジャーナル 17: 51~56, 1981
- 6) 渡辺 彰, 佐々木昌子, 青沼清一, 大泉耕太郎, 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
- 7) 渡辺 彰, 大泉耕太郎, 佐々木昌子, 青沼清一, 大沼菊夫, 今野 淳: 難治性呼吸器感染症に対する Minocycline とアミノ配糖体系抗生物質の併用効果。Chemotherapy 30: 1257~1269, 1982
- 8) 大泉耕太郎: 系統の異なる抗菌性物質による併用療法。化学と生物 21: 500~501, 1983
- 9) 大泉耕太郎: 担癌患者の呼吸器感染症。Progress in Medicine 4: 308~314, 1984
- 10) 今野 淳, 佐々木昌子, 大泉耕太郎: 各種病態時の抗菌薬の使い方, 悪性腫瘍に合併した感染症, 肺癌を中心にして。治療 67: 901~906, 1985
- 11) 大泉耕太郎: 抗菌薬相互の併用, 抗菌薬併用療法の解析。臨床医 12: 182~188, 1986
- 12) 渡辺 彰: 抗生物質併用の適応と組み合わせかた。Medical Practice 3: 990~995, 1986
- 13) 今野 淳, 渡辺 彰: 悪性腫瘍患者と感染—肺癌二次感染を中心の一。最新医学 42: 1139~1145, 1987
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 角井 徹, 中野 博, 世古昭三, 榊 知果夫, 畑地康介, 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
- 17) 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
- 18) 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 (II), Sulbactam の添加による cefoperazone と amikacin の *in vitro* 併用効果の増強。Chemotherapy 36: 732~737, 1988

## COMBINATIONS OF THREE ANTIMICROBIAL AGENTS (III)

IN VITRO COMBINED EFFECT OF A  $\beta$ -LACTAM, AMINOGLYCOSIDE  
AND TETRACYCLINE

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 examined the *in vitro* combined effect of  $\beta$ -lactams, aminoglycosides and tetracyclines against 118 strains of clinical isolates of six different species (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens* and *P. aeruginosa*). The *in vitro* combined effect was determined by a three-dimensional checkerboard dilution method, a modification of the method for two antimicrobial agents, using the Dynatech MIC-2000 system. The MIC and FIC<sub>3</sub> index of a 1:1:1 mixture of a two-fold serial dilution of the three antimicrobial agents against the above strains were determined. Also, the rate of change of the FIC<sub>2</sub> index was evaluated when minocycline (MINO) was added to the checkerboard of piperacillin (PIPC) and amikacin (AMK). The value of the mean FIC<sub>3</sub> index of the combination of PIPC+AMK+MINO and that of cefoperazone (CPZ)+AMK+MINO against all the strains were both 0.73, and that of ceftizoxime (CZX)+AMK+MINO 0.77. Though the FIC<sub>2</sub> indices of PIPC+AMK against *E. coli* and *K. pneumoniae* gradually decreased when increasing concentrations of MINO were added to the checkerboard of PIPC+AMK, those against *S. marcescens* and *P. aeruginosa* remained almost the same. From the above results, we conclude that the combination of three antimicrobial agents exhibited a potent synergistic activity against clinical isolates, especially of *E. coli* and *K. pneumoniae*, without any antagonistic action. Our data thus suggest that the above combinations are indicated against severe infections.