

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—

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)

抗菌性薬剤の3剤併用の定量評価の方法として、2剤併用の評価に多用されているチェス盤希釈法を応用して、三次元チェス盤法を考案した。従来の2剤併用のチェス盤複数枚に、3剤目の倍数希釈系列を順次加える。菌接種培養後、得られた成績を三次元のグラフに投影し、球面下の体積 (volume under the surface) を算出する。種々の3剤併用におけるこの体積を比較することで、それらの併用間の優劣を論ずることが可能となる。また、3剤を一定の比率で混合した場合には、二次元の平面上あるいは一次元の直線上に投影した図形の面積、または直線の大小・長短を比較することにより、種々の併用間の比較が可能となる。すなわち、配合剤を含む2剤併用や、3剤同時併用の定量評価などにも、三次元チェス盤法を応用することが可能である。

Key words: 3剤併用効果, 三次元チェス盤法, ECE index, FIC_2 index, FIC_2 index

JAWETZ^{1,2,3)}の報告以来、抗菌性薬剤の2剤併用については多くの研究成果が得られた。併用効果の定量評価に関しても種々の方法が検討されているが、近年では、倍数希釈法にチェス盤法を組み合わせたチェス盤希釈法が、欠点を有するものの、標準的な方法として採用されている^{4,5)}。しかしながら、3剤あるいはそれ以上の薬剤の併用の定量評価に関しては、種々の検討が行なわれてはいるものの、有用な方法論を見出し得ない現状にある。

今回我々は、抗菌性薬剤の3剤併用に関する研究を行なう中で、その定量評価に関する種々の考察を加えて三次元チェス盤法を考案し、さらにこれが、種々の特殊な条件への応用にも適用し得て、かつ有用であることを見出したので以下に報告する。

I. 方法と成績

1. 三次元チェス盤法概念と定義

2剤併用の定量評価において最も汎用されているチェス盤法を、3剤併用に应用した。すなわち、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て、Fig. 1に示すように、最初に2剤 (agent A, B) によるチェス盤マイクロプレート (Plate I) を作成する。次に、これと同じプレートのすべてのウェルに、3番目の薬剤 (agent C) の倍数希釈系列を低濃度から加えたプレートを順次作成 (Plate II, III, IV, …) する。こ

れらのプレートに菌を接種して培養し、菌の発育の認められる部分を、Fig. 1では斜線で表わした。a, bはagent A, BのMICであり、同様にagent CのMICとしてcが求められる。このa, b, cと、各プレートで発育の阻止された最小の組み合わせの濃度の点を結べ

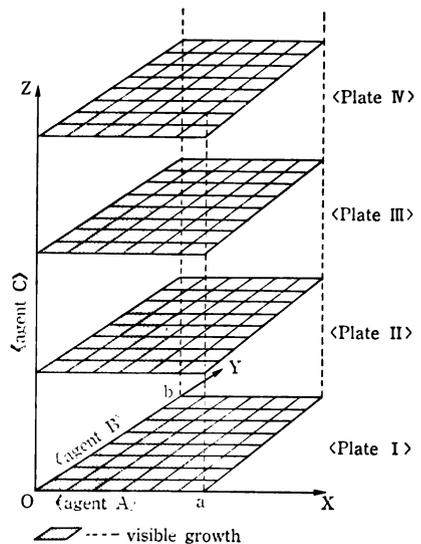


Fig. 1. Application of the checkerboard dilution method to evaluate the effect of a combination of three antimicrobial agents

* 仙台市星陵町4番1号

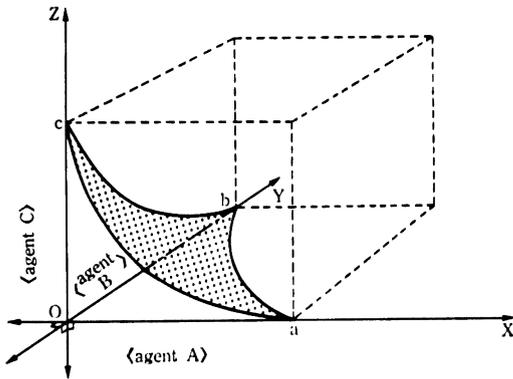


Fig. 2. Illustration of the three-dimensional checkerboard method

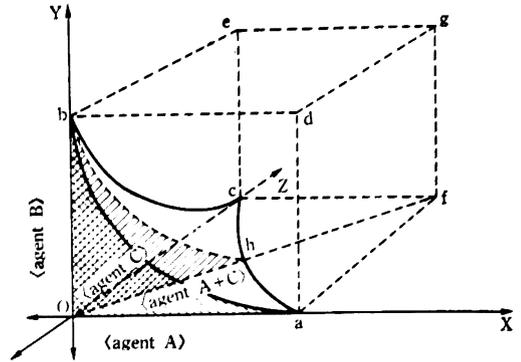


Fig. 3. Application of the three-dimensional checkerboard method to compare a combination of a combined and a single agent, and a combination of two single agents

ば, Fig. 2 の三次元グラフに示すような, a, b, c を結んでかつO点側に凹んでいる, ドットで表わされる凹面が規定される。この凹面よりO点側に近い部分での3剤の組み合わせでは, 菌の発育を阻止できないが, 外側の部分での組み合わせでは発育を阻止できる。そして, この凹面全体がO点に近ければ近いほど, 3剤併用の効果が大きいことを意味する。また, この凹面からO点側の体積 (volume under the surface) を算出し, 次に, 同じ菌に対して, 異なる他の3剤の組み合わせについて同様に体積を算出する。ここで, これらの2つの体積を比較することにより, 異なる2つの併用間での優劣を論ずることが可能となる。

2. 三次元チェス盤法への応用

併用する3薬剤の比率がある一定の割合に固定されている場合は, 前項に示した三次元チェス盤法の, ある特殊な条件下の応用であるといえる。応用例を次に示す。

1) 合剤と単剤の組み合わせによる3剤併用への応用
併用する3薬剤のうち, 2薬剤が一定の比率で配合されている場合にも, 三次元チェス盤法の概念を応用することができる。Fig. 3 に示すように, まず, agent A と agent B の併用による平均 MIC 曲線下面積を a, b, O で示される図形で表わすことができる。次に, agent B はそのまま, agent A に agent C が一定の比率で配合された場合には, その平均 MIC 曲線下面積は, h, b, O で示される図形で表わすことができる。この2つの図形の面積を比較することにより, agent C の添加による効果を定量評価することが可能となる。この際, h, O, a で表わされる角度が 45 度であれば, 合剤中の agent A と C の配合比率は 1 対 1 であり, もし角度が 60 度であれば 2 対 1 となる。このようにして得られた2つの図形を Fig. 4 のように同一面上に投影して表わすことができる。Fig. 4 の a, b, h はそれぞれ agent

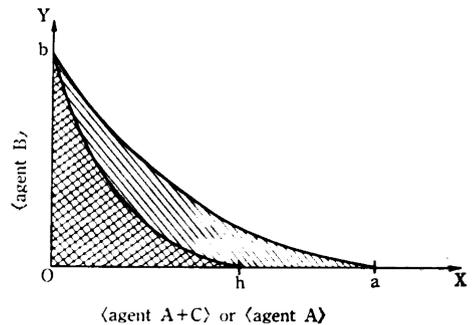


Fig. 4. Comparison of AUCs (area under the MIC curve) in the combination of a combined and a single agent, and the combination of two single agents, plotted on a two-dimensional graph

A, agent B, 合剤 (A+C) の MIC を示している。ここで表わされる曲線 b, a および曲線 b, h はそれぞれの併用の平均 MIC 曲線であり, それらよりO点側の部分は平均 MIC 曲線下面積, すなわち area under the MIC curve (AUC) として表わされる。したがって, a, O, b で表わされる AUC に対する, h, O, b で表わされる AUC の比を算定することにより, agent C の添加による発育阻止効果の増強の程度が算定されるが, 私共はこの比を併用効果増強指数 (enhancement of combined effect index=ECE index) と定義した⁹⁾。そして, この値が小さいほど添加した agent C の効果が大きいことになる。

2) 3剤等量混合希釈系への応用

前項の考えをさらに発展させて, agent A, B, C が一定の比率で混合されている際の併用効果を算定することが可能である。すなわち Fig. 5 の O, i, g で表わさ

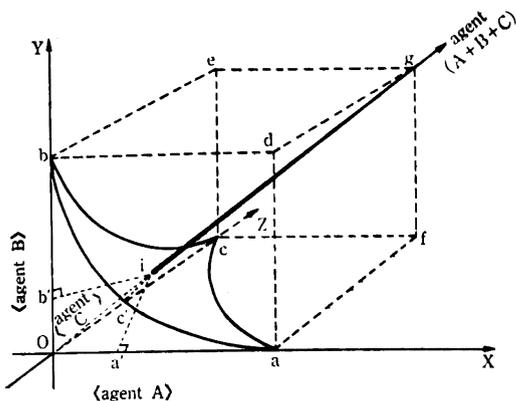


Fig. 5. Evaluation of the efficacy of a combination of equal volumes of three agents projected onto a one-dimensional graph

れる直線のような、三次元グラフの X 軸、Y 軸、Z 軸から等距離を保って、各軸のいずれも正の象限の部分へ伸びる直線は、agent A, B, C が等量に混合希釈された系である。この直線上の O, g の距離に対する O, i の距離の比が小さいほど 3 薬剤併用の効果が大きいことになる。この比は次のように近似させて表わすことができる。すなわち、i 点から各軸へ鉛直に下した a', b', c' の値を求め、それぞれ a, b, c との比を求めて合計し、これを 3 剤併用時の FIC index として、 FIC_3 index と表現することができる⁷⁾。例えば 3 薬剤がともに単独投与時の 1/4 の量で菌の発育が阻止されれば、 FIC_3 index = $1/4 + 1/4 + 1/4 = 0.75$ となる。そして、従来の 2 剤併用における FIC index は FIC_2 index として表現することができる⁷⁾。

Fig. 5 の a, b, c の値が互いに異なれば、等量混合系ではなく、ある一定の比率の混合希釈系列を表わすことになるが、上記と同様の計算で FIC_3 index を求めることができる。

II. 考 察

Penicillin G や streptomycin が実用化された直後から、JAWETZ^{1),2),3)}の報告をはじめとする抗菌性薬剤の 2 剤併用に関する研究が進められてきた。その定量評価に関しては、近年では 2 倍希釈法にチェス盤法を組み合わせ、さらに、それらの組み合わせのうち、最も低濃度で菌の発育を阻止する組み合わせの点を見出して、この点の各々の薬剤単独の MIC との比の合計を算出し、これを FIC index と定義して比較する方法が主となっている^{4),5)}。

しかしながら、FIC index は単なる比で表わされる成績であり、種々の欠点を有する。例えば、FIC index は 2 剤併用の種々の濃度の組み合わせの内の、ある一つの

組み合わせの点における成績を示しているのみであり、その併用の全体像を表わしているわけではない。これに対し、すべての組み合わせの点における成績を総合した私共の三次元チェス盤法は、二次元チェス盤法への応用をも含めて、併用効果の全体像を比較・観察することが可能であり、より有用な方法といえよう。また、FIC index は絶対的数値で表わされる成績ではないので、異なる条件の下での多数の成績を比較することには無理がある。例えば、大きな MIC 値を示す薬剤同士の併用では、FIC index がたとえ小さな値を示したとしても、直ちに臨床的に有用である、とはいえない。MIC 自体の値をも内包している今回の私共の方法は、成績を絶対的な数値で表わすことができるので、臨床的に各種の併用の優劣比較を論ずることが可能である。

また、三次元チェス盤法は種々の応用を行なうことによって、配合剤を含んだ併用や、2 剤併用の定量評価にも適用し得ることが可能である。すなわち、三次元チェス盤法の 3 軸のうち、2~3 軸の数値をある比率で固定することでそれが可能である。例えば、配合剤を含む併用について私共は、その MIC 曲線下面積 (AUC) 同士を比較するものとして enhancement of combined effect index (ECE index, 併用効果増強指数) を考案して、実地に応用している⁶⁾が、このことから、2 剤併用は 3 剤併用の応用である、ということができよう。さらに、私共は 3 剤同時併用時の併用効果の screening に役立つものとして、3 剤等量混合希釈系における併用効果の大小を表わす FIC_3 index を考案して実地に応用している⁷⁾。また、従来の 2 剤併用における FIC index を FIC_2 index として、2 剤併用と 3 剤併用を区別しながら表現することが可能である。

ところで、FIC index においては臨床例における起炎菌の薬剤感受性や、投与薬剤の血中濃度や持続時間などの体内動態の成績などは全く考慮されておらず、併用効果の臨床評価を行なうに当たってはあまり参考とはならない。今回の私共の方法をも含めて、このような欠点を克服する新たな方法論が必要とされよう。一つの試みとして、藤井⁸⁾は病原細菌の薬剤感受性と、薬剤の血中濃度の成績を組み入れた antibiotic combination efficacy index (ACE index) を考案しており、単なる FIC index の比較よりはるかに優れた方法論といえよう。私共の方法をも含めて、このような改良を種々考案することで、臨床における併用療法の適用がさらに大きく拡大され、かつ確実になるものと思われる。

文 献

- 1) JAWETZ, E GUNNISON J B and COLEMAN V R : The combined action of penicillin with strep-

- tomycin or chloromycetin on enterococci *in vitro*. Science 111 : 254~256, 1950
- 2) JAWETZ, E GUNNISON J B and SPECK R S : Antibiotic synergism and antagonism. N E J M 245 : 966~968, 1951
 - 3) JAWETZ, E and GUNNISON J B : Studies on antibiotic synergism and antagonism : A scheme of combined antibiotic action. Antibiotics and Chemotherapy 11 : 243~248, 1952
 - 4) PEREA, E J NOGALES M C AZNAR J MARTIN E and IGLESIAS M C : Synergy between cefotaxime, cefsulodin, azlocillin, mezlocillin and aminoglycosides against carbenicillin resistant or sensitive *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 6 : 471~477, 1980
 - 5) 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
 - 6) 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 投稿中
 - 7) 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 (III), β -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. Chemotherapy 投稿中
 - 8) 藤井良知 : 抗菌薬相互の併用, FIC index は果して臨床に結びつくか. 臨床医 12 : 201~207, 1986

COMBINATIONS OF THREE ANTIMICROBIAL AGENTS (I)

EXPERIMENTAL THREE-DIMENSIONAL CHECKERBOARD DILUTION METHOD FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE *IN VITRO* COMBINED EFFECT OF THREE ANTIMICROBIAL AGENTS

AKIRA WATANABE, KOTARO OIZUMI and KIYOSHI KONNO

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

We have established an experimental three-dimensional checkerboard dilution method for quantitative analysis of the *in vitro* combined effect of three antimicrobial agents. We designed this method through a modification of the checkerboard dilution method used for two antimicrobial agents. In this experiment, we used a micro-broth dilution method using the Dynatech MIC-2000 system. A two-fold serial dilution of a third agent was added to the checkerboard containing the first and second agents. Then, 0.0015 ml of a bacterial suspension was inoculated and incubated for 24 hours at 37°C. The results obtained were plotted on a three-dimensional cubic graph so as to describe a spherical surface, and the volume under the surface (VUS) was calculated. By comparing the VUS, with the relative proportion of the three agents fixed at a certain ratio, it was possible to compare the efficacy of triple antimicrobial combinations. For example, by application of the three-dimensional checkerboard method, we could evaluate the effect of the combination of a combined agent with a single agent, or the combination of equal amounts of three agents.