

アミノ配糖体系抗生物質とβ-ラクタム系抗生物質との *in vitro* 併用効果について

上 洋 司・柴 原 健・松 島 宏 規

シェリング・プラウ株式会社滋賀工場研究開発部*

西 野 武 志

京都薬科大学微生物学教室

(平成元年4月17日受付)

アミノ配糖体系抗生物質 (AGs) である netilmicin (NTL) および isepamicin (ISP) と β-ラクタム系抗生物質 (β-lactams) である flomoxef (FMOX) および imipenem/cilastatin sodium (IPM/CS) の *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* および methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* に対する *in vitro* でのそれぞれの抗菌力および AGs と β-lactams との併用効果を検討し、以下の成績を得た。

1. *E. coli* に対して、いずれの薬剤とも単独で優れた抗菌力を示した。
2. Checker-board dilution method により併用効果を検討した結果、いずれの薬剤の組み合わせもすべての菌種に対して抗菌力の増強を示し、拮抗作用は認められなかった。特に、*S. marcescens* に対して著明な相乗作用が認められ、ISP と FMOX では minimum-FIC index が平均 0.272 と優れていた。
3. *S. marcescens* の増殖曲線に及ぼす影響を検討した結果、それぞれ単独で静菌的な作用を示す薬剤濃度で併用すると、いずれの組み合わせも殺菌的に作用し、特に ISP と FMOX が優れた併用効果を示した。
4. 位相差顕微鏡にて *S. marcescens* に対する形態変化を観察した結果、AGs 単独では対照とほぼ同様な形態が、FMOX では菌体の著しい伸長化が、IPM/CS では球状化が観察された。AGs と FMOX 併用時には菌体は若干伸長化し、溶菌像や菌体の一部が空胞化した像を認めた。AGs と IPM/CS 併用時に球状化した一部の菌体は膨化し、溶菌像や菌体の一部が空胞化した像を認めた。

Key words: アミノ配糖体系抗生物質, β-ラクタム系抗生物質, 併用効果, グラム陰性桿菌, MRSA

作用機序の異なるアミノ配糖体系抗生物質 (AGs) と β-ラクタム系抗生物質 (β-lactams) との併用は、抗菌スペクトルの拡大、抗菌力の増強、起炎菌の耐性化の防止、副作用の軽減などの目的で、臨床的に広く行なわれている。また、基礎的検討において、種々のグラム陰性桿菌に対して協力作用を認める報告¹⁻⁴⁾も多い。

近年、感染症の起炎菌には変貌がみられ、グラム陰性桿菌検出の割合が増加傾向にある一方で、1980年代の第3世代のセフェム系抗生物質の導入に関係があると考えられる腸球菌、*Staphylococcus aureus* などのグラム陽性球菌が再び増加する傾向⁵⁾もみられる。

このような起炎菌の変貌に対応すべく化学療法剤の開

発の進歩も著しい。なかでも、新しいタイプのβ-lactamsであるオキサセフェム系およびカルバペネム系抗生物質が注目されている。しかしこれらの新しい抗生物質においても、1剤のみの効果は絶対的なものではなく、臨床重症感染症あるいは難治性感染症などに併用療法を余儀なくされる場合もある。

今回我々は、オキサセフェム系抗生物質として flomoxef[®]、カルバペネム系抗生物質として imipenem/cilastatin sodium[®]、併用薬剤の AGs として netilmicin および isepamicin を選び、これら薬剤間の *in vitro* における併用効果を臨床分離の *Escherichia coli* *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* お

* 滋賀県甲賀郡水口町笹が丘 1-4

よび methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* について検討した。

I. 材料および方法

1. 使用薬剤

Netilmicin (NTL, シェリング・プラウ株式会社), isepamicin (ISP, シェリング・プラウ株式会社, 東洋醸造株式会社), flomoxef (FMOX, 塩野義製薬株式会社), imipenem/cilastatin sodium (IPM/CS, 萬有製薬株式会社) のいずれも力価の明らかなものを使用した。

2. 使用菌株

京都薬科大学微生物学教室保存の臨床分離株 *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* 各 20 株および昭和大学藤ヶ丘病院保存の methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 10 株を用いた。

3. 抗菌力測定

日本化学療法学会感受性測定法⁹⁾に従って測定した。すなわち, SCD 液体培地 (SCD, 大五栄養) で 37°C, 一夜培養した被験菌を, 薬剤含有 heart infusion agar (HIA, 栄研) 平板上に 10^6 または 10^8 cfu/ml 接種し, 37°C, 18 時間培養後, 最小発育阻止濃度 (MIC, $\mu\text{g/ml}$) を求めた。

4. 併用効果

(1) Checker-board dilution method による併用効果の検討

AGs および β -lactams を種々の濃度に含ませた HIA 平板培地を作成し, 接種菌数 10^8 cfu/ml の MIC を求めた。これらの結果から minimum fractional inhibitory concentration index (min-FIC index) を求めた。min-FIC index が 0.5 以下であれば相乗作用 (synergy) が,

0.5 より大きく 1.0 以下であれば部分的相乗作用 (partial synergy) があるとした。また, 1.0 より大きく 2.0 以下であれば不関 (indifference) とし, 2.0 より大きければ拮抗作用 (antagonism) があるとした。

(2) 増殖曲線に対する影響

被験菌には checker-board dilution method による併用効果の検討において著明な相乗作用が認められた *S. marcescens* のうち既報^{1,6,7)}で種々検討した T-55 株を用いた。SCD で 37°C, 一夜培養した被験菌液を heart infusion broth (HIB) で約 10^5 cfu/ml に希釈後, 37°C で 2 時間振盪培養を行ない, 菌数が約 10^7 cfu/ml となった対数増殖期の菌液に各濃度の薬剤を添加し, 薬剤添加 1, 2 および 4 時間後の生菌数を測定した。

(3) 位相差顕微鏡による形態観察

スライドガラス上に薬剤を含んだ HIA フィルム寒天を作成し, *S. marcescens* T-55 を HIB で約 3 時間振盪培養を行なった対数増殖期の菌液を HIA フィルム寒天に塗抹し, パラフィンで封入した。この標本を 37°C 保温下, 位相差顕微鏡 (オリンパス) により経時的に観察した。

II. 結果

1. 使用菌株の感受性

E. coli, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* および MRSA の接種菌数 10^8 または 10^8 cfu/ml における NTL, ISP, FMOX および IPM/CS 単独の MIC₈₀ を Table 1 に示した。

(1) *E. coli*

NTL, ISP, FMOX および IPM/CS の 10^8 cfu/ml 接種時における MIC₈₀ はそれぞれ 3.13, 3.13, 0.10 および 0.20 $\mu\text{g/ml}$ といずれも優れた抗菌力を示した。

Table 1. Susceptibility of clinical isolates to aminoglycosides and β -lactams

Organism	No. of strains	Inoculum size (cfu/ml)	MIC ₈₀ ($\mu\text{g/ml}$)			
			NTL	ISP	FMOX	IPM/CS
<i>Escherichia coli</i>	20	10^5	3.13	3.13	0.10	0.20
		10^6	1.56	1.56	0.10	0.10
<i>Serratia marcescens</i>	20	10^3	12.5	6.25	100	3.13
		10^6	12.5	6.25	6.25	0.78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	10^3	3.13	6.25	>100	3.13
		10^6	3.13	3.13	>100	1.56
MRSA	10	10^3	25	50	100	50
		10^6	12.5	50	100	50

NTL: netilmicin, ISP: isepamicin, FMOX: flomoxef, IPM/CS: imipenem/cilastatin sodium

Table 2. Combined effects of aminoglycosides and β -lactams against clinical isolates

Organism	Drug combination			Number of strains (%)			
	AGs	β -lactams	mean min-FIC index	synergy (≤ 0.5)	partial synergy ($>0.5, \leq 1.0$)	indifference ($>1.0, \leq 2.0$)	antagonism (>2.0)
<i>Escherichia coli</i> (20 strains)	NTL	FMOX	0.813	1 (5%)	17 (85%)	2 (10%)	0 (0%)
		IPM/CS	0.690	2 (10%)	18 (90%)	0 (0%)	0 (0%)
	ISP	FMOX	0.741	2 (10%)	18 (90%)	0 (0%)	0 (0%)
		IPM/CS	0.627	6 (30%)	14 (70%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Serratia marcescens</i> (20 strains)	NTL	FMOX	0.288	17 (85%)	3 (15%)	0 (0%)	0 (0%)
		IPM/CS	0.561	10 (50%)	9 (45%)	1 (5%)	0 (0%)
	ISP	FMOX	0.272	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
		IPM/CS	0.450	15 (75%)	5 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (20 strains)	NTL	FMOX	0.872	0 (0%)	17 (85%)	3 (15%)	0 (0%)
		IPM/CS	0.690	5 (25%)	14 (70%)	1 (5%)	0 (0%)
	ISP	FMOX	0.767	0 (0%)	15 (75%)	5 (25%)	0 (0%)
		IPM/CS	0.753	4 (20%)	13 (65%)	3 (15%)	0 (0%)
MRSA (10 strains)	NTL	FMOX	0.775	2 (20%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)
		IPM/CS	0.698	1 (10%)	8 (80%)	1 (10%)	0 (0%)
	ISP	FMOX	0.766	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
		IPM/CS	0.670	1 (10%)	8 (80%)	1 (10%)	0 (0%)

NTL : netilmicin, ISP : isepamicin, FMOX : flomoxef, IPM/CS : imipenem/cilastatin sodium

(2) *S. marcescens*

10^8 cfu/ml 接種時における MIC_{80} は、IPM/CS では $3.13 \mu\text{g/ml}$ と優れた抗菌力を示した。ISP および NTL はそれぞれ 6.25 および $12.5 \mu\text{g/ml}$ と比較的強い抗菌力を示したが、FMOX では $100 \mu\text{g/ml}$ と抗菌力は弱かった。

(3) *P. aeruginosa*

NTL および IPM/CS が優れた抗菌力を示し、いずれの MIC_{80} (10^8 cfu/ml) も $3.13 \mu\text{g/ml}$ であった。ISP では $6.25 \mu\text{g/ml}$ であったが、FMOX では 10^8 および 10^6 cfu/ml 接種時いずれにおいても MIC_{80} は $100 \mu\text{g/ml}$ 以上とほとんど感受性を示さなかった。

(4) MRSA

いずれの薬剤に対しても感受性が弱く、 MIC_{80} (10^8 cfu/ml) は NTL で $25 \mu\text{g/ml}$ 、ISP および IPM/CS で $50 \mu\text{g/ml}$ 、FMOX で $100 \mu\text{g/ml}$ であった。

2. Checker-board dilution method による併用効果の検討

被験菌に対する AGs と β -lactams との併用効果につ

いて、checker-board dilution method により求めた min-FIC index を Table 2 に示した。

(1) *E. coli*

IPM/CS と AGs の組み合わせが良く、特に IPM/CS と ISP では min-FIC index の平均は 0.627 と優れていた。いずれの組み合わせも、すべての株において拮抗作用は認められなかった。

(2) *S. marcescens*

FMOX と AGs の組み合わせにおいて優れた併用効果が認められた。FMOX と NTL との併用では平均 min-FIC index は 0.288 であり、FMOX と ISP の併用においてはすべての株に相乗作用が認められ、平均 min-FIC index は 0.272 であった。また、IPM/CS と ISP あるいは NTL との組み合わせにおいても平均 min-FIC index は 0.450 あるいは 0.561 であり、すべての株に対して協力作用を示した。

(3) *P. aeruginosa*

IPM/CS と AGs の組み合わせにおいて比較的良好的な併用効果がみられ、IPM/CS と ISP では試験した株の

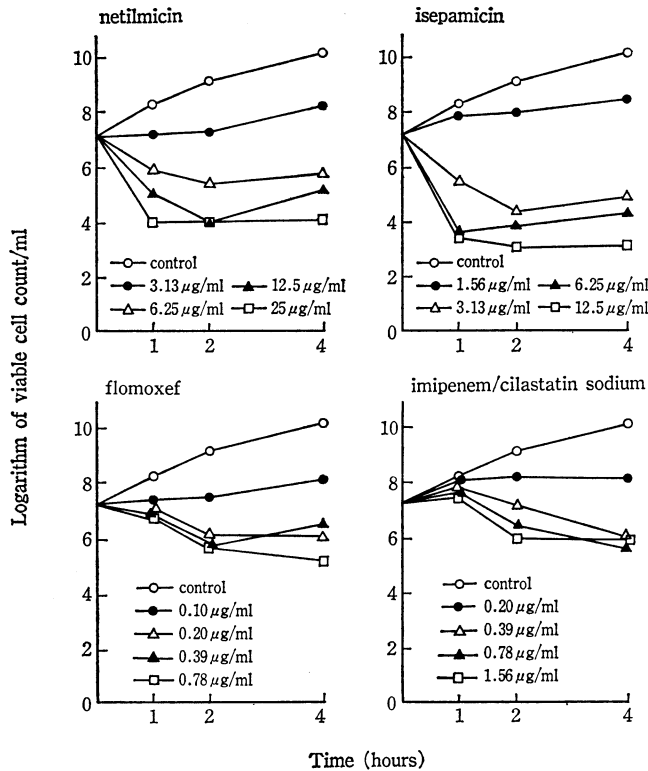


Fig. 1. Bactericidal effect of netilmicin, isepamicin, flomoxef and imipenem/cilastatin sodium alone against *Serratia marcescens* T-55

85% に協力作用 (うち相乗作用 20%) が, IPM/CS と NTL では 95% に協力作用 (うち相乗作用 25%) が認められた。FMOX と AGs では部分的相乗作用は認められたものの, 相乗作用は認められなかった。

(4) MRSA

FMOX と AGs の組み合わせにおいてすべての株に対して協力作用が, また IPM/CS と AGs の組み合わせにおいても 90% の株に協力作用が認められた。

3. 増殖曲線に対する影響

S. marcescens T-55 に対して, AGs と β -lactams をそれぞれ単独または併用して作用させた場合の増殖曲線に及ぼす影響を生菌数測定により検討した。Fig. 1 に示したように, 単独作用時には ISP および NTL はそれぞれ濃度に依存して生菌数が減少し, 1 時間後から顕著な殺菌作用が見られ, その効果は FMOX あるいは IPM/CS よりも強かった。次に, 単独作用時には静菌のあるいはやや増加傾向を示す濃度の AGs と β -lactams を併用させた時の増殖曲線を Fig. 2 に示した。いずれの組み合わせにおいても併用効果が認められ, 特に FMOX と AGs との組み合わせが優れていた。なかでも, FMOX

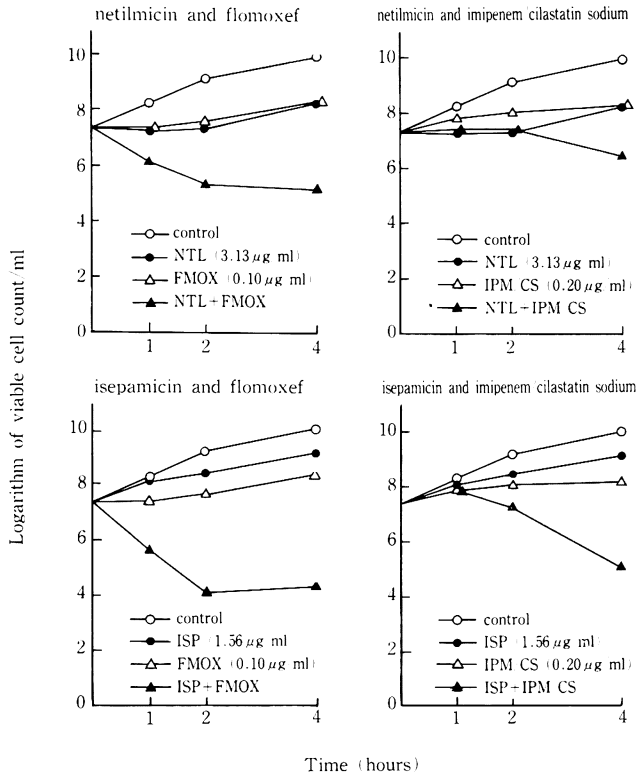
と ISP の組み合わせは, 薬剤作用後 2 時間で生菌数は開始時の 1,000 分の 1 以下に減少した。

4. 位相差顕微鏡による形態観察

S. marcescens T-55 に対して単独でそれぞれ静菌的作用を示す濃度の AGs と β -lactams をそれぞれ単独または併用して作用させた場合の形態変化を位相差顕微鏡により観察し, 薬剤作用 4 時間後の結果を Fig. 3 に示した。対照では, 時間の経過と共に正常に増殖していく像が観察された。AGs 作用時には対照とほとんど同様の形態が観察され, FMOX 作用時には菌体の著しい伸長化が, IPM/CS では菌体の球状化が認められた。一方, AGs と FMOX 併用時には菌体が若干伸長し, 溶菌像や菌体の一部が空胞化した像が見られた。また, AGs と IPM/CS 併用時には球状化した菌が膨化し, 溶菌像や菌体の一部が空胞化した像が観察された。このような形態変化の観察結果からも AGs と β -lactams との間の協力作用を確認することができた。

III. 考 察

最近の β -lactams の開発の進歩は著しく, 従来のペニシリン系・セフェム系に加えてオキサセフェム系・カル



NTL : netilmicin, FMOX : flomoxef, IPM/CS : imipenem/cilastatin sodium, ISP : isepamicin

Fig. 2. Bactericidal effect of netilmicin, isepamicin, flomoxef and imipenem/cilastatin sodium in combination against *Serratia marcescens* T-55

バベネム系など新しいタイプの薬剤が登場し、注目されている。

FMOX は、好気性・嫌気性を問わずグラム陽性菌およびグラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトルを有するオキサセフェム系抗生物質である。特に、MRSA に対し既存のセフェム系抗生物質より強い抗菌力を示す反面、セラチア属に対する抗菌力は比較的弱く、緑膿菌には抗菌力をほとんど示さない⁶⁾と報告されている。

本実験においても同様の結果が得られたが、MRSA に対する抗菌力は、同時に試験した AGs あるいは IPM/CS の抗菌力には及ばなかった。

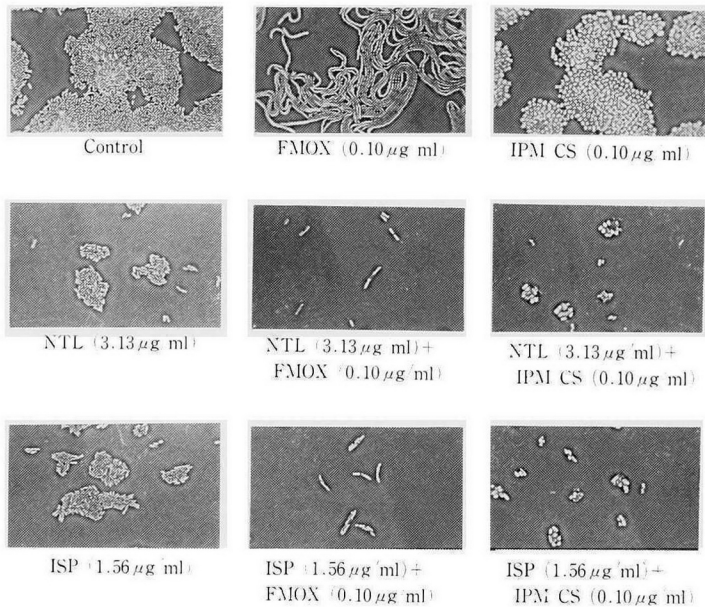
FMOX と AGs との併用では、*S. marcescens* に対して優れた併用効果を示し、特に、FMOX と ISP との組み合わせにおいては試験したすべての株に対して min-FIC index 0.5 以下と優れた相乗作用が認められた。この時の薬剤の配合比を調べた結果、FMOX と NTL の場合 1 : 32~32 : 1、FMOX と ISP の場合 1 : 64~64 : 1 の付近に協力を示す株が多く見られた。*S. marces-*

cens の増殖曲線に及ぼす影響を検討した結果、checker-board dilution method による結果と同様に FMOX と AGs (特に ISP) との組み合わせにおいて優れた併用効果が認められた。

IPM/CS は、imipenem が腎の酵素 dehydropeptidase-1 により代謝を受け不活性化されることより、この不活性化を抑制する cilastatin sodium を配合した薬剤⁹⁾である。嫌気性を含むグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対し広範な抗菌スペクトルを有し、特に、黄色ブドウ球菌、腸球菌、緑膿菌および *Bacteroides fragilis* に対し ceftizoxime, cefoperazone 等の第 3 世代セフェム系抗生物質よりも強い抗菌力を示すと報告^{7,10)}されている。

本実験においても、IPM/CS は *E. coli*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* に対し優れた抗菌力を示した。また、MRSA に対しては FMOX より強い抗菌力を示した。

IPM/CS と AGs との併用では、試験したいずれの菌



FMOX : flomoxef, IPM/CS : imipenem/cilastatin sodium, NTL : netilmicin, ISP : isepamicin

Fig. 3. Phase-contrast micrographs of *Serratia marcescens* T-55 exposed to aminoglycosides and β -lactams for 4 hours

種に対しても単剤に比べ抗菌力は増し、平均 min-FIC index も 0.45~0.75 の範囲にあり良好であった。また、*S. marcescens* に対する薬剤の配合比を調べた結果、IPM/CS と NTL の場合 1 : 64~1 : 2、IPM/CS と ISP の場合 1 : 1~1 : 32 付近に協働作用を示す株が多く見られた。

S. marcescens T-55 に対する位相差顕微鏡による形態観察を行なった結果、FMOX が菌体をフィラメント化するのとは対照的に IPM/CS は菌体を球状化した。これはグラム陰性菌のペニシリン結合蛋白 (PBPs) に対して、FMOX は隔壁形成に関与する PBP-3 に強い結合親和性を示す¹¹⁾が、IPM/CS は桿菌の形態保持に関係する PBP-2、細胞の伸長時のムレイド架橋に必要な PBP-1A および 1B に強い親和性を有する¹²⁾ためと考えられる。また、AGs と併用した場合、FMOX あるいは IPM/CS により菌体が伸長化あるいは球状化するとともに、膜の透過性が変化して AGs の作用を受けやすくなり、菌体の一部空胞化、さらには溶菌に至ると考えられる。

グラム陰性桿菌および MRSA に対する AGs と β -lactams との *in vitro* の併用効果について検討した結果、いずれの菌種に対しても相乗作用あるいは協働作用が認められ、拮抗作用は認められなかった。特に *S. marcescens* に対して FMOX と ISP または NTL との併用に

おいて強い相乗作用を示したことは、臨床の場合においてもこれら薬剤の併用による有用性が期待されるものと考えられる。

文 献

- 1) 大月秀夫, 上 洋司, 柴原 健, 大槻雅子, 西野武志: Netilmicin とセフェム系抗生物質との *in vitro* 併用効果の検討。Chemotherapy 37: 115~124, 1989
- 2) 川原元司: 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—。Chemotherapy 35: 803~816, 1987
- 3) 島田 剛: 緑膿菌に対する化学療法の基礎的検討—併用療法について—。Chemotherapy 35: 889~903, 1987
- 4) LEBEL M, PELLERIN M, BERGERON M G: Serum bactericidal activity of ceftazidime increased by netilmicin. Drug Intelligence and Clinical Pharmacy 19: 932~936, 1985
- 5) 五島瑤智子, 西田 実: 感染症の変遷と耐性菌に関する諸問題。J Antibact Antifung Agents 16: 177~184, 1988
- 6) 西野武志, 大槻雅子, 東山伊佐夫, 山下由佳, 谷野輝雄: 新しい oxacephem 系抗生物質 6315-S (flomoxef) に関する細菌学的評価。Chemotherapy 35 (S-1): 57~75, 1987
- 7) 西野武志, 中村和則, 田中真由美, 後藤季美, 大槻雅子, 谷野輝雄: Imipenem (MK-0787) の

- in vitro* 抗菌力について。Chemotherapy 33 (S-4) : 74~90, 1985
- 8) 日本化学療法学会 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
- 9) KAHAN F M, KROPP H, SUNDELOF J G, BIRNBAUM J : Tienamycin : Development of imipenem-cilastatin. J Antimicrob Chemother 12 (Suppl D) : 1~35, 1983
- 10) 朝日良成, 渡辺邦友, 今朝洞忠孝, 上野一恵 : Imipenem/cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791) の嫌気性菌に対する抗菌力。Chemotherapy 33 (S-4) : 1~13, 1985
- 11) 横田 健, 鈴木映子, 新井京子, 加藤尚代 : 新 oxacephem 6315-S (floximef) の試験管内抗菌力, β -lactamase 安定性, 作用点ペニシリン結合蛋白 (PBP) に対する安定性, および血清補体と白血球との協力的食菌・殺菌作用。Chemotherapy 35 (S-1) : 33~43, 1987
- 12) 横田 健, 丸山映子, 鈴木映子, 新井京子, 加藤尚代 : Imipenem (MK-0787) の試験管内抗菌力, β -lactamase 不活化作用, ペニシリン結合蛋白親和性及びマウスの脳と腎ホモジネートに対する安定性。Chemotherapy 33 (S-4) : 43~53, 1985

IN VITRO SYNERGISTIC EFFECT OF AMINOGLYCOSIDES AND β -LACTAMS

HIROSHI KAMI, TAKESHI SHIBAHARA, HIROCHIKA MATSUSHIMA

Research and Development Laboratories, Schering-Plough Kabushiki Kaisha,
1-4 Sasagaoka, Minakuchi-cho, Kouga-Gun, Shiga 528, Japan

TAKESHI NISHINO

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

The *in vitro* combined action of aminoglycosides (AGs), isepamicin (ISP) or netilmicin (NTL), with β -lactams, floximef (FMOX) or imipenem/cilastatin sodium (IPM/CS), was studied against *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The following results were obtained :

1. The antibacterial activity of each antibiotic by itself against *E. coli* was strong.
2. Synergistic action of ISP or NTL with FMOX or IPM/CS was observed in all bacteria, especially *S. marcescens*. The combination of ISP with FMOX was most effective (mean minimum FIC index : 0.272).
3. With each combination bactericidal activity was observed in *S. marcescens* T-55 at concentrations in which the respective drugs alone showed only bacteriostatic activity.
4. Phase-contrast microscopic observation of *S. marcescens* T-55 demonstrated that the bacterial cells treated with FMOX showed a filament-like form, those treated with IPM/CS a spherical form and those treated with ISP or NTL almost a normal form. With each combination lysed cells were observed.