

## 微生物自動増殖解析システムによる monobactam 系 抗生物質 aztreonam の抗菌作用の解析

三上 襄・宇野 潤・矢沢 勝清

千葉大学真核微生物研究センター化学療法部\*

新 井 正

生物学療法研究会

(昭和 63 年 11 月 16 日受付)

Monobactam 系抗生物質, aztreonam の *in vitro* での活性を自動増殖解析システムを用いて検討した。その結果, *Pseudomonas aeruginosa* を用いた場合, aztreonam の存在下での増殖パターンが, 対照として用いた amikacin, ofloxacin および minocycline とは明らかに異なり,  $\beta$ -ラクタム系薬剤に共通の特徴的な 2 段階増殖阻害曲線を示した。また, *Escherichia coli* を用いた場合には, aztreonam は,  $\beta$ -ラクタム系薬剤の中でも, 特に latamoxef に近い特異な増殖曲線を示し, aztreonam は菌の伸長化と引き続いて起こす強い溶菌作用を持つことが確認された。これらの溶菌作用は aztreonam 添加後, 2~3 時間で起こり, また, これらの現象は, 菌量がかかなり多い場合でも観察された。他の薬剤との併用, 特にキノロン系の薬剤との相乗効果もこの増殖解析システムを用いることにより, 確認することができた。

**Key words:** Aztreonam, 増殖阻害曲線, 溶菌, 自動増殖解析システム, 相乗作用

Aztreonam は monobactam 系抗生物質で, 構造的には  $\beta$ -ラクタム環の 1 位に sulfonic acid と 2 位に methyl 基を有することを, また抗菌活性の面からは好気性および通性嫌気性グラム陰性菌, 特に *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae* や *Pseudomonas aeruginosa* 等に対して強い抗菌力を示すが, グラム陽性菌や嫌気性菌に対する抗菌力は弱いことを特徴とし, 従来 of  $\beta$ -ラクタム系抗生物質とはかなり異なった作用を示すことが明らかにされている<sup>1-3)</sup>。

近年における微生物の最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 等の測定のための機器の進歩には著しいものがある。これら自動測定機器の使用は, 労力の削減ばかりでなく, データの再現性に優れ, かつ MIC 値の客観的な判定をもたらすなど, 多くの利点を生み出している。本実験では特に, 新しく開発された微生物自動増殖解析システムを用いて<sup>4,5)</sup>, aztreonam の抗菌作用を解析し, その特徴を他の薬剤との比較において明らかにすることを目的として検討したので報告する。

### I. 材料と方法

#### 1. 使用菌株

臨床分離の *Escherichia coli* を 5 菌株 (千葉大学医学部付属病院中央検査室から分与された), および北里研究所より分与された臨床分離の *Pseudomonas aeruginosa* を 10 菌株使用した。

#### 2. 使用薬剤

以下の使用薬剤はそれぞれの原末を用いた。Amikacin (AMK, 明治製薬), aztreonam (AZT, スクイブ), cefsulodin (CFS, 日本チバガイギー), cefoperazone (CPZ, 台糖ファイザー), gentamicin (GM, 塩野義製薬), latamoxef (LMOX, 塩野義製薬), minocycline (MINO, 日本レダリー), ofloxacin (OFLX, 第一製薬), piperacillin (PIPC, 三共) また norfloxacin (NFLX) については合成したものを使用した。OFLX および NFLX については, dimethylsulfoxide に溶解後, 等量の ethanol に溶解し, 生理食塩水で希釈して使用した。AZT は希水酸化ナトリウム液に溶解し, また他の  $\beta$ -ラクタム系の薬剤および AMK, GM は生理食塩水に溶解し, いずれもメンブランフィルターを通してから希釈して使用した。MINO は methanol に溶解後,

\* 千葉市女鼻 1-8-1

希釈して用いた。

### 3. 濁度測定法による抗菌作用の測定

被検菌 200 株の濁度を同時にかつ連続的に測定できる微生物全自動増殖解析システム (Bioscreen C, ラボシステム・ジャパン) を用いて行なった。接種菌液は感受性測定用プロス (感性培地, 日水) で 37°C で 18~22 時間培養した菌液を最終濃度が約  $1 \times 10^6$ /ml になるように滅菌生理食塩水で希釈して用いた。通常, 100 穴のマイクロプレート 2 枚で行ない, 各ウエルには, あらかじめ 2 倍濃度に作製しておいた感性培地 100  $\mu$ l に滅菌生理食塩水で希釈した薬剤 50  $\mu$ l および菌液 50  $\mu$ l を加え, 全量で, 200  $\mu$ l を含むようにした。培養温度は *P. aeruginosa* および *E. coli* のいずれの場合も, 長期にわたっての実験も考慮し, またできるだけ溶液の蒸発を防ぐため, 主に 30°C で行なった。菌の生育の測定は 600 nm の波長で, 通常 20 分間隔で 48 時間まで測定した。各増殖曲線は, 2~3 回の平均をコンピューターで求め, その結果を記載した。

### 4. 併用効果の測定

併用効果の測定は同じ感性培地を用い, 96 穴のマイクロプレートを用いた checkerboard 法による様々な濃度の組合せを作製して, 各薬剤存在下での MIC を測定した。また Fractional inhibitory concentration (FIC) index は大井らの方法<sup>6)</sup>に従って求めた。

## II. 成績

### 1. *P. aeruginosa* の増殖に対する AZT の影響

*P. aeruginosa* に有効とされる  $\beta$ -ラクタム系の LMOX, CFS, PIPC, CPZ およびキノロン系の OFLX さらにアミノグリコシド系の AMK, またテトラサイクリン系の MINO を用いて *P. aeruginosa* の増殖に対する影響を, AZT との比較において検討した結果を, Fig. 1a から Fig. 1h に示した。用いた菌株は *P. aeruginosa* DDC 022 株である。

各薬剤の最終濃度は 50  $\mu$ g/ml から 0.08  $\mu$ g/ml である。この濃度範囲内で最も低い濃度で 48 時間後まで *P. aeruginosa* DDC 022 株の生育を完全に抑える作用を示した薬剤は OFLX (Fig. 1f) であった。AZT (Fig. 1a) は CFS (Fig. 1c) および AMK (Fig. 1g) と同様, 次に強い作用を示した。しかし, 他の薬剤は, これらの濃度では, その増殖を完全に抑えることはできなかった。

これら薬剤存在下での増殖曲線を検討した結果, AZT を含む  $\beta$ -ラクタム系抗生物質では増殖曲線 (Fig. 1a-1e) に共通のパターンが見られることが明らかになった。すなわち, *P. aeruginosa* の増殖が抑制されるいずれの薬剤濃度でも, 菌は一度増殖を開始し, 時間の経過

と共に, その増殖が一次的に停止した。さらに時間が経過するにつれて, 幾分濁度が減少する場合も認められた。最終的には薬剤濃度によって異なるが, 菌の増殖がそのまま抑えられる場合と, 再び菌が増殖を開始する場合に分けられた。これらの現象は AZT をはじめ, 5 剤の  $\beta$ -ラクタム剤すべてにおいて観察された。

一方 AMK, MINO, OFLX 等では高濃度の薬剤によって完全にその増殖が抑えられる場合をのぞいて低い薬剤濃度では, 菌は時間の経過と共に増殖を開始し, 増殖が始まれば, その程度が幾分遅くなるにしても,  $\beta$ -ラクタム剤のように, 2 段階的な増殖曲線を示さなかった。すなわち, これらの薬剤では, 菌の立ち上がる時間に違いが見られるのが特徴であった。

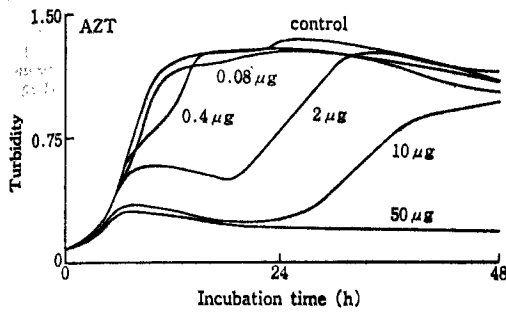
また AZT を除いて, 他の  $\beta$ -ラクタム剤のすべてにおいて, 最終の菌の濁度は用いる薬剤濃度には比例しなかった。この現象では OFLX (Fig. 1f) および MINO (Fig. 1h) でも観察されたが, AMK (Fig. 1g) では, 最終の濁度は, ほぼ用いる薬剤濃度に比例して増加していた。

### 2. *E. coli* の増殖に対する AZT の影響

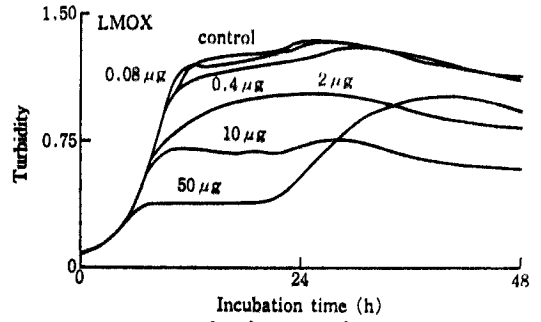
$\beta$ -ラクタム系の LMOX, CPZ, PIPC および AMK, MINO, OFLX の *E. coli* DDC 002 株の増殖への影響を AZT との比較で, 自動増殖解析システムで検討した結果を Fig. 2a から Fig. 2g に示した。薬剤濃度は 5  $\mu$ g/ml から 0.008  $\mu$ g/ml までの 5 段階で行なった。その結果, これらの薬剤濃度では AZT (Fig. 2a) は LMOX (Fig. 2b) および OFLX (Fig. 2e) と同程度に *E. coli* に対して強い作用を示した。AZT はまた LMOX と同様, 高濃度で類似した増殖阻害作用を示した。すなわち, 高濃度の薬剤の添加では, AZT および LMOX のいずれにおいても, 菌は一端増殖し, その後濁度は著明に減少することが観察された。したがって, これらの薬剤濃度では, AZT は LMOX と同様に, 強い殺菌作用, 結果的に溶菌作用を示すものと思われた。しかし, 同じ濃度の他の  $\beta$ -ラクタム剤ではそれらの作用は観察できなかった。この点は本株が  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌 (cefinae test 陽性) であるということと関係があるものと思われる。

### 3. AZT の濃度と添加時間による溶菌現象の変化

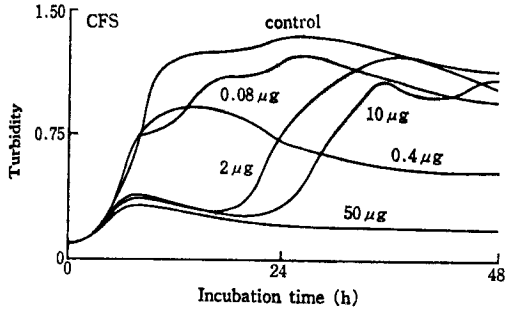
前の実験で, AZT の強い溶菌活性が示唆されたことより, さらに高濃度の AZT も含めて, *E. coli* DDC 002 株に対する薬剤の添加時間と溶菌との関係を検討した。その結果を Fig. 3a から 3d に示した。まず, 初めから AZT を含む系 (Fig. 3a) では, 10  $\mu$ g/ml の AZT 濃度でも溶菌現象が観察された。しかし, 時間の経過と共に次第に, その作用が弱くなるが, AZT が



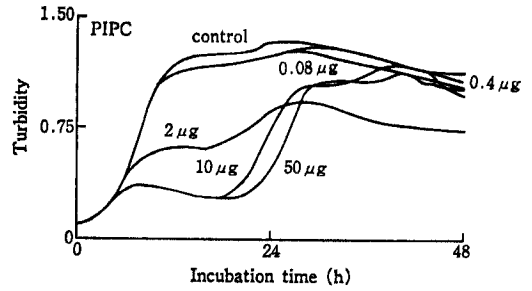
a. aztreonam



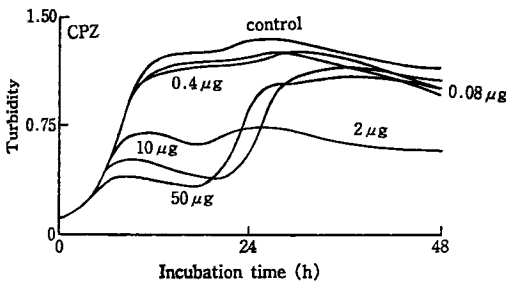
b. latamoxef



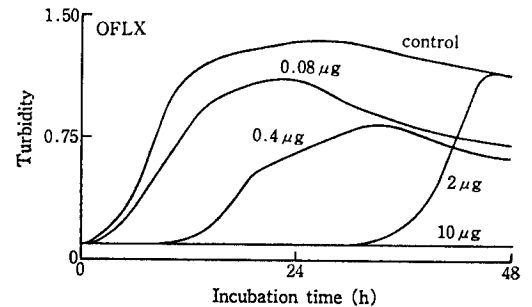
c. cefsulodin



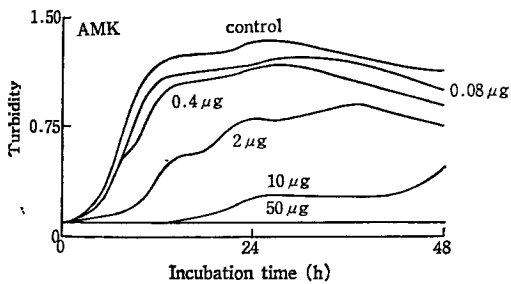
d. piperacillin



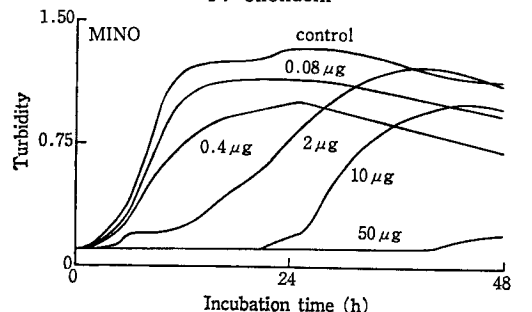
e. cefoperazone



f. ofloxacin



g. amikacin



h. minocycline

Fig. 1. Effect of various concentrations of antimicrobial drugs on growth of *Pseudomonas aeruginosa* DDC 022

100  $\mu\text{g/ml}$  という高濃度であれば濁度が、0.6 位まで増殖してもそのほとんどが溶菌してしまうこともわかった。そこで 100  $\mu\text{g/ml}$  濃度の AZT 添加による増殖への

影響を検討するために、一緒に増殖曲線をまとめたものを Fig. 4 に示した。その結果明らかになったことは、AZT 添加後、約 2 ないし 3 時間で、いずれの添加時間

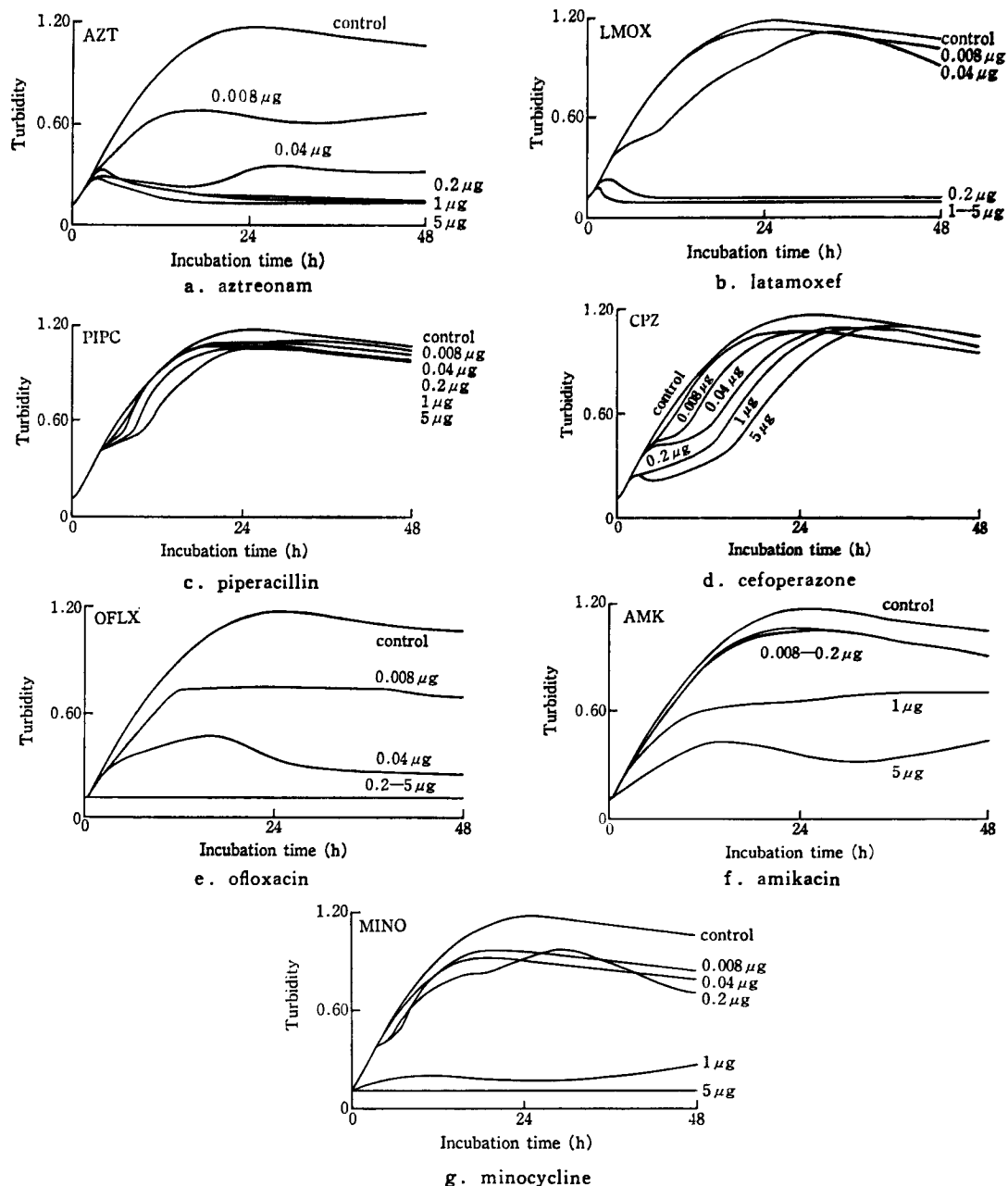


Fig. 2. Effect of various concentrations of antimicrobial drugs on the growth of *Escherichia coli* DDC 002

においても溶菌が起こることが確認された。

#### 4. キノロン系薬剤との AZT の相乗作用

AZT はすでにいくつかの薬剤との間で併用により相乗効果を示すことが明らかにされているので、ここでは、その相乗作用がほとんど検討されていないキノロン系の薬剤である OFLX および NFLX との併用を検討

した。まず始めに、96 穴のマイクロプレートを用いた通常のチェッカーボード法により、これら 3 薬剤と AZT との併用を検討した。その結果の FIC index を Table 1 に示した。対照として用いた AMK および GM との併用では、用いたほとんどの *P. aeruginosa* 株に対して相乗効果を示したが、MINO との併用効果は、ほとんど

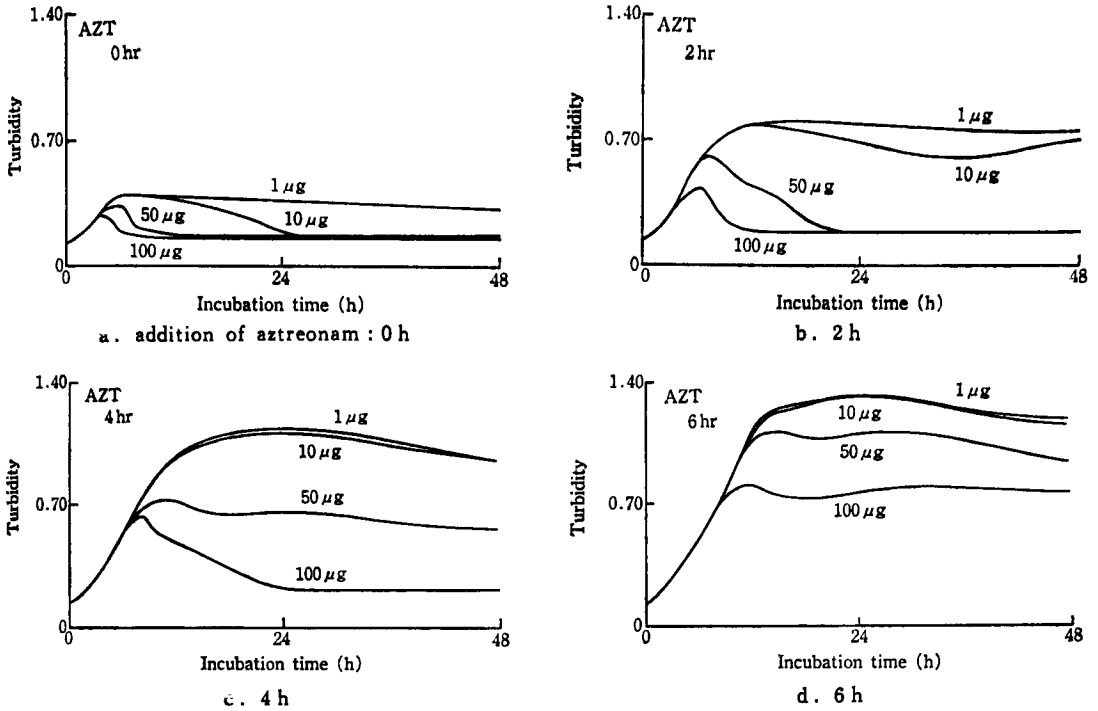


Fig. 3. Time course of effect of aztreonam on the growth of *Escherichia coli* DDC 002

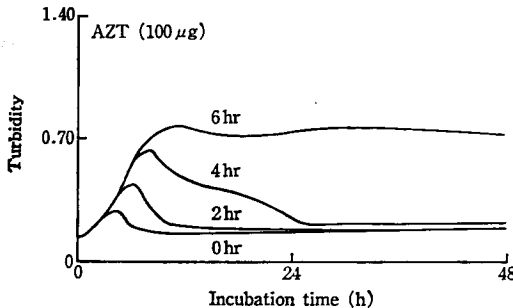


Fig. 4. Summary of lytic activities of 100 µg/ml of aztreonam against *Escherichia coli* DDC 002. Aztreonam was added at time indicated

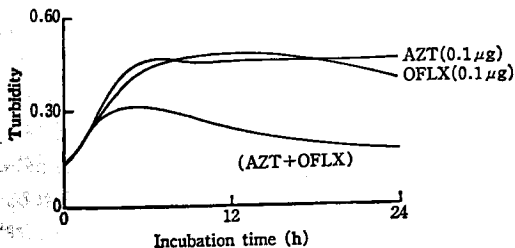


Fig. 5. Combination effect of aztreonam and ofloxacin against *Escherichia coli* DDC 002

見られなかった。キノロン系薬剤と AZT との併用では、検討した半数以上の株で相乗効果が認められた。またそのデータは示さなかったが、*E. coli* でも同じような現象が観察されたので、OFLX との併用時、比較的高い相乗効果を示した *E. coli* DDC 002 株を用いて、自動増殖解析システムによる AZT との相乗作用を検討した。その結果、Fig. 5 に示したように、明らかな相乗効果を確認できたが、この相乗効果はすべての薬剤濃度の組合せでは、確認できず、比較的濃度の高い薬剤同士の組合せの場合により強く認められた。さらに、AZT と OFLX を用いて、その相乗作用における薬剤の添加の時間的影響を検討した。その結果は Fig. 6 に示したが、OFLX を最初に加えた後に AZT を加えた方が、AZT と OFLX を同時に、あるいは AZT をはじめに加えた後に OFLX を後に添加した場合よりもその効果が強くなる傾向が見られた。

### III. 考 察

微生物の増殖曲線は、一見単純に見えるが、その中には多くの情報を含んでいる。今回用いた微生物自動増殖解析システムは、一度に 200 サンプルの試料の増殖を、同時に測定、比較することができるシステムであり、また用いる量も 200 µl と少量で、薬剤の感受性の測定に

Table 1. Combination effect of aztreonam and new quinolones in comparison with that of amikacin, gentamicin and minocycline against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Drug combination	FIC index (number of strains/tested strains)	
	≤0.5 (synergy)	>0.5 (partial synergy or no reaction)
AZT+AMK	6/6	0/6
GM	5/5	5/5
MINO	3/5	2/5
OFLX	6/10	4/10
NFLX	2/4	2/4

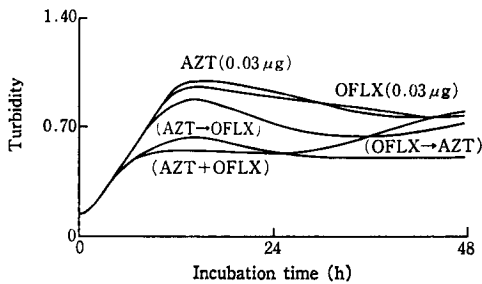


Fig. 6. Drug addition impact on the combination effect of aztreonam and ofloxacin against *Escherichia coli* DDC 002

AZT→OFLX: AZT and OFLX were added respectively 0 and 2 h after incubation.

OFLX→AZT: OFLX or AZT was added 0 or 2 h after incubation, respectively.

AZT+OFLX: AZT and OFLX were added at 0 h.

は、優れた効果を発揮することが期待できる。特に、同じ菌株を用いての薬剤の感受性の比較には、優れているといえる。

AZT の作用の特徴を増殖阻害の面から検討した結果、*P. aeruginosa* を用いた場合には、他の  $\beta$ -ラクタム系の薬剤も含めて、特徴的な2段階増殖曲線を示すことが明らかとなった。その理由として  $\beta$ -ラクタム系の薬剤は、いったん増殖を開始してから、その作用が現れること、さらに多くの薬剤が菌の形態変化を導くために、結果的に、濁度で調べる増殖曲線は、菌に特徴的になるものと考えられた。一方 AMK, OFLX および MINO は、その作用点がまったく異なるにもかかわらず類似の増殖曲線を示すことは興味のあることと思われるが、その理由として、最も考えられるものは、すべての作用が最終的に菌の生育を抑え、その結果増殖の開始の遅滞ということになるものと思われる。AZT で観察された *E. coli* の増殖曲線で最も特徴的な現象は、薬剤添加後、2~3 時間以内に観察される濁度の減少であった。この現象はその

後の検討で、菌が溶菌した結果であることが明らかとなった。この場合、AZT が、*E. coli* の菌を著しく伸長化させて、その一部が溶菌していることを顕微鏡的にも確認している。これらの溶菌作用はすでにいくつかの  $\beta$ -ラクタム系薬剤で報告<sup>7)</sup> されているが、今回検討した菌と用いた薬剤の濃度との組合せでは、AZT および LMOX において著明であり、AZT は強い溶菌活性を示すグループに属するといえることができる。このように、それぞれの薬剤は用いる菌と薬剤濃度との組合せで、それぞれの薬剤に固有な増殖阻害曲線を示すことから、増殖阻害曲線を用いての薬剤のグルーピングが可能であるかも知れないが、このことを確かなものとするためには、さらに薬剤耐性菌についての詳細な研究が必要である。

Fig. 4 に示したように AZT は菌量が多くても 100  $\mu\text{g/ml}$  程度の濃度であれば、数時間で溶菌が認められる。成人に 1 g の AZT を静脈内投与すると、その血清中の AZT 濃度は、約 100  $\mu\text{g/ml}$  に達することから<sup>8)</sup>、生体内で、かなり大量に菌の増殖が起こった場合でも、その感染病巣によっては、これらの溶菌現象が期待できるかも知れない。

難治性の感染症に対して、ペニシリンとアミノ配糖体抗生物質の併用効果が、*in vitro* のみならず *in vivo* においても報告されている。AZT とアミノ配糖体抗生物質である AMK, GM との間での相乗作用についても、すでにいくつかの報告<sup>9-11)</sup> が見られる。これら対照として用いた AMK や GM に比べるとその効果はさほど強くはなかったが、今回、まだ報告のほとんど見られない AZT とキノロン系薬剤との併用によって、その相乗効果が確認できた。また、本システムのように一度に多くの試料を同時に測定できる方法は、このような相乗効果を検討するためには、優れた機器であると考えられる。特に、Fig. 6 に示したように、薬剤の添加時期等の検討には極めて有利と思われる。本システムを用いた予備の実験で、AZT とキノロン系の薬剤での相互関係では、

今までのところ、AZT がキノロン系薬剤の活性を強める作用を有する結果も得られており、現在その詳細について本システムを用い検討している。

今回の実験では主に *P. aeruginosa* DDC 022 および *E. coli* DDC 002 株での結果を示したが、他のそれぞれの菌株でもほぼ同様の結果が確認されている。

#### 文 献

- 1) SYKES R B, BONNER D P, BOSH K, GEORGOPAPADAKOU N H: Aztreonam (SQ 26, 776), a synthetic monobactam specifically active against aerobic Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 85~92, 1982
- 2) 横田 健, 吉田玲子, 鈴木映子: Aztreonam (SQ 26, 776) の抗菌力,  $\beta$ -lactamase 安定性および補体と白血球との協力的殺菌作用. *Chemotherapy* 33(S-1): 14~23, 1985
- 3) 紀藤恭輔, 勝 鎌政, 佐藤 勝, 杉原芳樹, 渡辺直彰, 豊沢逸生, 森山めぐみ: Aztreonam (SQ 26, 776), 新単環性  $\beta$ -ラクタム抗生物質の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について. *Chemotherapy* 33(S-1), 87~114, 1985
- 4) THOMAS D S, HENSCHKE P A, GARLAND B G, TUCKNOTT O G: A microprocessor controlled photometer for monitoring microbial growth in multi-welled plates. *J. Appl. Bact.* 59: 337~346, 1984
- 5) 三上 襄, 陳 豪勇, 矢沢勝清, 宇野 潤, 新井 正, 菅野治重: Amphotericin B の *in vitro* および *in vivo* 活性の再評価. *真菌誌* 28: 373~384, 1987
- 6) 大井好忠, 川原元司, 島田 剛, 後藤俊弘:  $\beta$ -Lactam 薬とアミノ配糖体薬の *in vitro* に於ける併用効果. *臨床医* 12: 170~174, 1986
- 7) 西野武志: 抗菌薬相互の作用 3. 抗菌薬の併用と菌体の形態変化. *臨床医* 12: 19~26, 1986
- 8) NAKASHIMA M, UEMATSU T, TAKIGUCHI Y, MAEDA Y: Pharmacokinetics and safety of aztreonam in healthy Japanese volunteers. *RINSYO-YAKURI* 16: 409~416, 1985
- 9) BUESING M A, JORGENSEN J H: *In vitro* activity of aztreonam in combination with newer  $\beta$ -lactams and amikacin against multiply resistant Gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 283~285, 1984
- 10) GIAMARELLI H, ZISSIS N P, TAGARI G, BOUZOS J: *In vitro* synergistic activities of aminoglycosides and new  $\beta$ -lactams against multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 534~536, 1984
- 11) LAETHEN Y V, HUSSON M, KLASTERSKY J: Serum bactericidal activity of aztreonam, cefoperazone, and amikacin, alone or in combination, against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 224~227, 1984

TURBIDOMETRIC CHARACTERIZATION OF GROWTH  
INHIBITION BY AZTREONAM, A SYNTHETIC  
MONOBACTAM ANTIBIOTIC

YUZURU MIKAMI, JUN UNO and KATSUKIYO YAZAWA

Department of Experimental Chemotherapy, Research Center for Pathogenic  
Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chiba 280, Japan

TADASHI ARAI

Biotherapy Research Association

An automatic turbidometric growth analysis system was employed to characterize the *in vitro* activity of aztreonam, a new synthetic monobactam antibiotic, in comparison with those of various  $\beta$ -lactams, aminoglycosides and new quinolones commonly used for the treatment of Gram-negative bacterial infections. The growth inhibition curve of aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* was found to be characterized by a two-step growth inhibition pattern. This pattern was also observed with the  $\beta$ -lactams tested, but not with amikacin, gentamicin, minocycline or ofloxacin. When *Escherichia coli* was used, an early decrease in growth indicating lysis of *E. coli* cells, was observed with aztreonam. This strong lytic phenomenon occurred 2 to 3 hours after aztreonam addition and was observed even in phases of rapid cell growth. The lytic activity was also observed with latamoxef. A combination effect of aztreonam and new quinolones was observed against about 50% of the pseudomonads tested. The usefulness of the present multi-well turbidometric system for the characterization of growth inhibition curves of antimicrobial drugs is discussed.