

Ceftizoxime と各種抗緑膿菌用抗菌剤の *in vitro* および *in vivo* 併用効果

横田 好子・池田 文昭・峯 靖 弘

藤沢薬品工業株式会社開発研究所\*

(平成元年6月30日受付・平成元年8月21日受理)

Ceftizoxime を中心に amikacin, tobramycin, isepamicin, piperacillin, ticarcillin, aztreonam および carumonam との併用効果について *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* に対し, *in vitro* および *in vivo* で検討した。

1) *In vitro* における MIC および FIC index の検討結果, amikacin, piperacillin および aztreonam が ceftizoxime と優れた併用効果を示した。殺菌作用では ceftizoxime は *P. aeruginosa* に対し amikacin と, *E. coli* および *K. pneumoniae* に対し amikacin, piperacillin あるいは aztreonam と相乗作用を示した。

2) マウス感染実験において *P. aeruginosa* および *E. coli* に対し, ceftizoxime と amikacin との併用は相乗ないし相加作用を示したが, piperacillin あるいは aztreonam との併用は不関であった。

3) ヒトの常用投与量によって得られる血中濃度に simulate した *in vitro* 殺菌作用において, ceftizoxime と amikacin の併用は *P. aeruginosa* の再増殖を長時間抑制することができた。*E. coli* に対しては amikacin および aztreonam との併用は殺菌時間を短縮したが, piperacillin との併用は効果が認められなかった。

**Key words** : Ceftizoxime, 併用効果, *In vitro*, *In vivo*

近年の医薬品の開発および医療技術のめざましい向上は基礎疾患を有する患者に福音をもたらした反面, 宿主の感染に対する抵抗力の低下した compromised host の増加をもたらしているといえる。こうした感染防御能の低下した宿主においては *Pseudomonas aeruginosa* をはじめとする弱毒菌や真菌が重症感染症へと発展する結果となることは多くの臨床報告例にみられる通りである。那須<sup>1)</sup>らの報告によれば敗血症の起病菌は *P. aeruginosa* と *Staphylococcus aureus* が最も多いことを示しているが, 剖検肺からの検出率は圧倒的に *P. aeruginosa* が多いことが挙げられている。また永井<sup>2)</sup>らは造血管器疾患に併発する感染症の起病菌として *Escherichia coli* の他に *Enterobacter cloacae* および *Serratia marcescens* を検出したと報告している。感染予防あるいは術後感染予防を目的とした抗菌剤の投与は一般に first choice として第三世代セフェム剤のような抗菌力の強い薬剤の使用を避けるべきとされるが, 好中球数の減少を伴う免疫低下宿主では感染発症率が高く, 一旦感染すると重篤になり易いため強力な化学療法によって確実に感染を予防することが重要となる。そこで本実験では抗菌スペクトラムの拡大および活

性の増強を目的として *P. aeruginosa* を除くグラム陰性桿菌に強い抗菌活性をもつ ceftizoxime を中心に, 緑膿菌に抗菌活性を有する各種抗菌剤との併用を *in vitro* および *in vivo* で検討した。

## I. 実験材料および方法

## 1. 使用菌種菌株

当研究所保存および1987年から1988年に分離された *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* を用いた。

## 2. 使用薬剤

抗菌剤として ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業株式会社), amikacin (AMK, 万有製薬株式会社), tobramycin (TOB, 塩野義製薬株式会社), isepamicin (ISP, 東洋醸造株式会社), ticarcillin (TIPC, 藤沢薬品株式会社), piperacillin (PIPC, 富士化学工業株式会社), aztreonam (AZT, 日本スクイブ株式会社), carumonam (CRMN, 武田薬品株式会社) を用いた。

## 3. 使用動物

日本エスエルシー株式会社より入手した ICR 系雄

\*大阪市淀川区加島2丁目1番6号

Table 1. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of ceftizoxime and various kinds of antibiotics alone or in combination against clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa*

| Antibiotic     | MIC <sub>50</sub> * |       | MIC <sub>90</sub> * |       | Ratio of<br>MIC <sub>90</sub><br>Comb./Alone |       |
|----------------|---------------------|-------|---------------------|-------|--|-------|
|                | Alone               | Comb. | Alone               | Comb. |  |       |
| Aminoglycoside | AMK                 | 6.25  | 1.56                | 25    | 12.5   | 0.25  |
|                | CZX                 | 100   | 25                  | 200   | 50   | 0.25  |
|                | TOB                 | 1.56  | 0.39                | 50    | 6.25   | 0.25  |
|                | CZX                 | 100   | 12.5                | 200   | 25   | 0.125 |
| Penicillin     | ISP                 | 50    | 6.25                | 100   | 12.5   | 0.125 |
|                | CZX                 | 100   | 25                  | 200   | 50   | 0.25  |
|                | PIPC                | 12.5  | 6.25                | 400   | 50   | 0.5   |
|                | CZX                 | 100   | 25                  | 200   | 50   | 0.25  |
| Monobactam     | TIPC                | 50    | 25                  | 800   | 800  | 0.5   |
|                | CZX                 | 100   | 25                  | 400   | 200  | 0.25  |
|                | AZT                 | 12.5  | 3.13                | 25    | 12.5   | 0.25  |
|                | CZX                 | 100   | 25                  | 400   | 100  | 0.25  |
|                | CRMN                | 6.25  | 1.56                | 25    | 6.25   | 0.25  |
|                | CZX                 | 100   | 25                  | 400   | 200  | 0.25  |

Method: Checkerboard method

Organism: *Pseudomonas aeruginosa* (20 strains)

Medium: Mueller Hinton agar (Difco)

Inoculation: Stamp method (10<sup>6</sup> cfu/ml)

Incubation: 37°C (20 h)

\* MIC: μg/ml

AMK: amikacin, CZX: ceftizoxime, TOB: tobramycin, ISP: isepamicin,

PIPC: piperacillin, TIPC: ticarcillin, AZT: aztreonam, CRMN: carumonam

マウス (4週齢 19~21g) を用いた。

#### 4. 実験的顆粒球減少症の作成

非絶食のマウスの腹腔内に用時滅菌生理食塩水で溶解した cyclophosphamide (CY, 塩野義製薬株式会社): 200 mg/kg を投与し, 4日後に顆粒球減少マウスとして実験に使用した<sup>3)</sup>。

#### 5. 抗菌力測定

日本化学療法学会感受性測定法に従い測定した<sup>4)</sup>。すなわち Mueller-Hinton broth (MH-broth, Difco) で 37°C, 20時間培養後の被験菌の 100倍希釈液を, 2倍希釈系列の薬剤含有 Mueller Hinton agar (MH-agar) 平板上にスタンプ接種し, 37°C, 20時間培養後, 最小発育阻止濃度 (MIC, ug/ml) を判定した。

#### 6. Checkerboard dilution method による併用効果

CZX と併用すべき薬剤の種々の濃度を組合せた平板培地を作成し, 被験菌の 10<sup>6</sup> cfu/ml を接種し, 培養後 MIC を判定した。得られた結果から minimum

fractional inhibitory concentration (min. FIC index) を求めた<sup>5)</sup>。min. FIC index より 0.5 以下を相乗作用, 0.5 から 1.0 を相加作用, 1 から 2 を不関, 2 以上を拮抗作用とした。

#### 7. 殺菌作用

*P. aeruginosa* ATCC 25615 および *E. coli* 7101 を 37°C, 20時間培養後, MH-broth に 5% になるように接種し, 37°C, 1時間振盪培養した。これをさらに 100 倍に希釈した菌液 (*P. aeruginosa*: 3.0~7.1×10<sup>5</sup> cfu/ml, *E. coli*: 3.6×10<sup>5</sup> cfu/ml) に各濃度の薬剤を添加し, 37°C で振盪培養し, 経時的に反応液中の残存生菌数を測定した。

#### 8. ヒト血清中濃度に simulate した系における *in vitro* 殺菌作用

臨床常用投与量すなわち CZX (2g, 1時間点滴)<sup>6)</sup>, AMK (200 mg, 筋注)<sup>7)</sup>, PIPC (2g, 1時間点滴)<sup>8)</sup>, AZT (1g, 1時間点滴)<sup>9)</sup> でえられたヒト血清中濃

Table 2. Mean FIC indexes of ceftizoxime and various kinds of antibiotics in combination against clinical isolates

| Antibiotic     | Mean FIC index                     |                              |                                   |      |
|----------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------|
|                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (20) | <i>Escherichia coli</i> (20) | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (20) |      |
| Aminoglycoside | AMK                                | 0.58                         | 0.71                              | 0.88 |
|                | TOB                                | 0.58                         | 0.77                              | 0.66 |
|                | ISP                                | 0.58                         | 0.79                              | 0.81 |
| Penicillin     | PIPC                               | 0.72                         | 0.79                              | 1.05 |
|                | TIPC                               | 1.27                         | 0.62                              | 0.80 |
| Monobactam     | AZT                                | 0.76                         | 0.63                              | 0.69 |
|                | CRMN                               | 0.98                         | 0.75                              | 0.63 |

Method : Checkerboard method

Organism : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (20 strains)

Medium : Mueller-Hinton agar (Difco)

Inoculation : Stamp method ( $10^6$  cfu/ml)

Incubation : 37°C (20h)

AMK : amikacin, TOB : tobramycin, ISP : isepamicin, PIPC : piperacillin,

TIPC : ticarcillin, AZT : aztreonam, CRMN : carumonam

度を MH-broth を用いステップワイズに濃度を変化させ、この系に試験菌 (*P. aeruginosa* 6042 :  $6.0 \times 10^6$  cfu/ml, *E. coli* 7107 :  $9.4 \times 10^7$  cfu/ml) を接種して 37°C で振盪培養し、経時的に生菌数を測定した。

## 9. マウス感染実験

*P. aeruginosa* 26 および *E. coli* 7107 を試験菌に用いた。すなわち所定の菌数を 5% ムチンに浮遊しマウスの腹腔内に 0.5 ml 接種した後 1 時間後に薬剤を皮下投与した。3 日ないし 4 日間マウスの生死を観察し、生存数からプロビット法により ED<sub>50</sub> を求めた<sup>11)</sup>。単独時に対する有意差検定は併用時に含有されるそれぞれの薬剤との間で行なった。また併用時の ED<sub>50</sub> から FIC index と同様の計算法で Fractional ED<sub>50</sub> (FED) を求めた。

## II. 結 果

### 1. *In vitro* 併用効果

CZX との併用剤としてアミノ配糖体 (AMK, TOB, ISP), ペニシリン (PIPC, TIPC) およびモノバクタム (AZT, CRMN) を選び checkerboard 法で MIC と FIC index について検討した。

(1) *P. aeruginosa* 20 株に対する MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>80</sub>

臨床分離 *P. aeruginosa* 20 株に対する MIC を求めた (Table 1)。

CZX は *P. aeruginosa* 20 株に対し、12.5 から 800  $\mu$ g/ml の分布を示す株であるが、4 回の実験で得られた MIC<sub>50</sub> は 100, MIC<sub>80</sub> は 200 ~ 400  $\mu$ g/ml であっ

た。これに対しアミノ配糖体である AMK, TOB および ISP のそれぞれ MIC<sub>50</sub> は 6.25, 1.56 および 50  $\mu$ g/ml であったが CZX との併用でそれぞれ 1.56, 0.39 および 6.25  $\mu$ g/ml と単独時より 1/8 ~ 1/4 の MIC 値がえられた。同様にペニシリンである PIPC あるいは TIPC と併用した場合の MIC<sub>50</sub> は PIPC では単独の 12.5  $\mu$ g/ml が 6.25  $\mu$ g/ml に、TIPC は 50  $\mu$ g/ml が 25  $\mu$ g/ml となった。モノバクタムである AZT および CRMN ではそれぞれ単独の 12.5  $\mu$ g/ml が 3.13  $\mu$ g/ml に、6.25  $\mu$ g/ml が 1.56  $\mu$ g/ml となった。またこれらの薬剤と併用した CZX の MIC は 1/10 ~ 1/3 になった。なお MIC<sub>80</sub> で表示すると表の通り全般に並行して低下した。すなわち *P. aeruginosa* に対し CZX と上記の薬剤の併用はいずれも単独時に比べ MIC を著しく減少させることが明らかとなった。

(2) *P. aeruginosa*, *E. coli* および *K. pneumoniae* に対する平均 FIC index と相乗作用の頻度

上記の実験において得られた結果から個々の菌株の FIC index を算出し平均を求めた (Table 2)。*P. aeruginosa* 20 株に対するアミノ配糖体の平均 FIC index は 3 剤ともすべて 0.58 であったが、ペニシリンでは PIPC (0.72) のほうが TIPC (1.27) より優れ、モノバクタムでは AZT (0.76) のほうが CRMN (0.98) よりやや優れていた。*E. coli* 20 株に対してはアミノ配糖体、ペニシリンおよびモノバクタムの 7 剤は FIC index が 0.62 ~ 0.79 の範囲内にあり、FIC

| Organism       | % of frequency | <i>P. aeruginosa</i> (20)                              |    |     | <i>E. coli</i> (20)                                    |    |     | <i>K. pneumoniae</i> (20)                              |    |     |
|----------------|----------------|--|----|-----|--|----|-----|--|----|-----|
|                |                | 0  | 50 | 100 | 0  | 50 | 100 | 0  | 50 | 100 |
| Aminoglycoside | AMK            | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     |
|                | TOB            | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     |
|                | ISP            | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     |
| Penicillin     | PIPC           | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     |
|                | TIPC           | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     |
| Monobactam     | AZT            | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     |
|                | CRMN           | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     | [Bar chart showing synergistic effect at 50% and 100%] |    |     |

AMK : amikacin, TOB : tobramycin, ISP : isepamicin, PIPC : piperacillin, TIPC : ticarcillin, AZT : aztreonam, CRMN : carumonam  
*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* : *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* : *Klebsiella pneumoniae*

Fig. 1. Frequency of synergistic effect by ceftizoxime and various kinds of antibiotics in combination

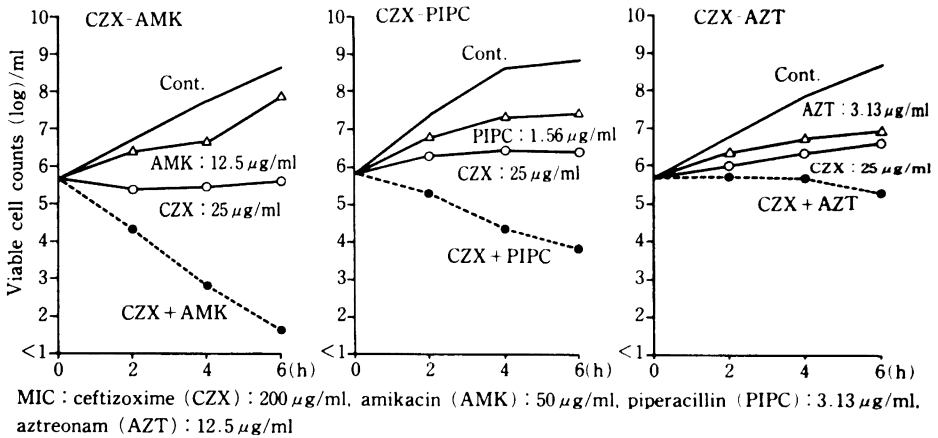


Fig. 2. Bactericidal activity of ceftizoxime and amikacin, piperacillin or aztreonam in combination against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619

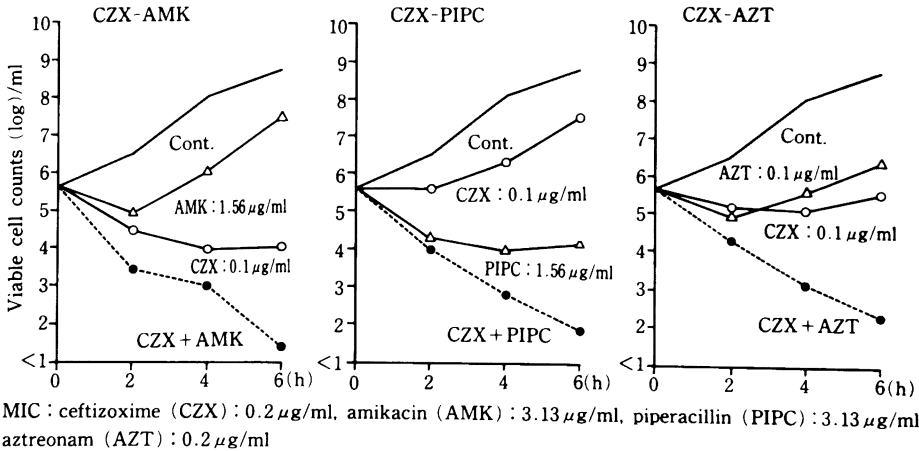


Fig. 3. Bactericidal activity of ceftizoxime and amikacin, piperacillin or aztreonam in combination against *Escherichia coli* 7101

index で見る限りほぼ同等の効果であった。*K. pneumoniae* 20 株に対しては TOB, AZT および CRMN が、0.63～0.66 の FIC index を示した。

一方、これらの菌種に対して併用効果のあった菌株の出現頻度を Fig. 1 に示した。すなわち *P. aeruginosa* 20 株に対する AMK との併用は相乗作用が 55%、相加作用が 40%、不関が 5% で、ほとんどの菌株に対し相乗ないし相加作用であることが確認された。TOB および ISP においてもその傾向はほぼ同様であった。ペニシリンでは PIPC との併用で 80% の株に対し相乗ないし相加作用が出現したが、TIPC はその出現率が悪く 55% であった。モノバクタムでは AZT で相乗および相加作用が 85% 認められたのに対し CRMN との併用では相加作用 (80%) のみであった。*E. coli* および *K. pneumoniae* に対しては各グループの中では AMK, TOB, TIPC および AZT がそれぞれ比較的良好な併用効果を示した。

以上の抗菌活性の結果から CZX と比較的優れた併用薬となりうる薬剤はアミノ配糖体では AMK, ペニシリンでは PIPC, モノバクタムでは AZT であったので、以下これらの薬剤との併用について検討した。

### (3) *P. aeruginosa* および *E. coli* に対する殺菌作用

CZX と上記で選択した AMK, PIPC および AZT を併用した時の *P. aeruginosa* および *E. coli* に対する殺菌作用を検討した (Figs. 2, 3)。

CZX の MIC は 200  $\mu\text{g/ml}$ , AMK は 50  $\mu\text{g/ml}$  の高度耐性を示す *P. aeruginosa* ATCC25619 に対し CZX の 1/8 MIC (25  $\mu\text{g/ml}$ ) が静的に作用したのに対し、

AMK の 1/4 MIC (12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) では菌の増殖を抑制し得なかったが、CZX と AMK の併用は著しい殺菌を示した。また CZX と PIPC (1/2MIC, 1.56  $\mu\text{g/ml}$ ) および CZX と AZT (1/4MIC, 3.13  $\mu\text{g/ml}$ ) の併用はともに殺菌力が増強したが、AMK との併用ほど顕著なものではなかった。

*E. coli* 7101 に対し CZX の 1/2MIC (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) および AMK の 1/2 MIC (1.56  $\mu\text{g/ml}$ ) の併用はそれぞれ単独より強い殺菌作用を示した。また PIPC の 1/2 MIC (1.56  $\mu\text{g/ml}$ ) および AZT の 1/2 MIC (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) との併用においてもいずれも単独に比べ強い殺菌作用を示した。

データを省略したが *K. pneumoniae* に対する検討では 3 剤とも *E. coli* の場合と同様の結果を得た。

## 2. *In vivo* 併用効果

*P. aeruginosa* 26 および *E. coli* 7107 を試験菌としマウス実験感染に対する併用効果を正常マウスおよび顆粒球減少マウスで検討した。

### (1) *P. aeruginosa* 26 に対する効果

CZX に 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , AMK に 1.56  $\mu\text{g/ml}$  の MIC を示す株を用いた (Table 3)。正常マウスにおける *P. aeruginosa* 26 感染に対し CZX の ED<sub>50</sub> は 187 mg/kg であったのに対し AMK は 2.63 mg/kg であった。また両剤を 10 : 1 の割合で投与した場合の ED<sub>50</sub> は 17.4 mg/kg であったが、この中に含有される CZX 量は 15.8 mg/kg, AMK は 1.58 mg/kg となり CZX は単独投与時より有意に減少し約 1/10 量に、AMK は 1/2 量に軽減することができ相加的作用

Table 3. Protective effect of ceftizoxime and amikacin alone or in combination against *Pseudomonas aeruginosa* infection in normal and granulocytopenic mice

| Antibiotic  |                  | ED <sub>50</sub> (mg/kg) |                         |
|-------------|------------------|--------------------------|-------------------------|
|             |                  | Normal mice*             | Granulocytopenic mice** |
| Alone       | CZX              | 187                      | >200                    |
|             | AMK              | 2.63                     | 3.48                    |
| Combination | CZX-AMK (10 : 1) | 17.4 (0.68)#             | 11.8 (0.36)##           |

Mouse : ICR, Male, n=8

Organism : *Pseudomonas aeruginosa* 26, i.p. challenge (5% mucin suspension)

\* 5.0×10<sup>6</sup>cfu/mouse, \*\* 8.0×10<sup>4</sup>cfu/mouse

Therapy : s.c. injection, 1h after challenge

Observation : 3 or 4 days after challenge

( ) : FED index

Significant difference from alone (# : CZX, ## : AMK, P<0.05)

CZX : ceftizoxime, AMK : amikacin

Table 4. Protective effect of ceftizoxime and various kinds of antibiotics alone or in combination against *Escherichia coli* infection in normal and granulocytopenic mice

| Antibiotic  | ED <sub>50</sub> (mg/kg) |                         |
|-------------|--------------------------|-------------------------|
|             | Normal mice*             | Granulocytopenic mice** |
| Alone       | CZX                      | 0.324                   |
|             | AMK                      | 1.32                    |
|             | PIPC                     | >15                     |
|             | AZT                      | 0.160                   |
| Combination | CZX-AMK (10:1)           | 0.245 (0.70)**          |
|             | CZX-PIPC (1:1)           | 0.630 (0.99)**          |
|             | CZX-AZT (1:1)            | 0.273 (1.58)            |

Mouse: ICR, Male, n=8

Organism: *Escherichia coli* 7107, i.p. challenge (5% mucin suspension)

\*  $6.0 \times 10^6$  cfu/mouse, \*\*  $7.0 \times 10^4$  cfu/mouse

Therapy: s.c. injection, 1h after challenge

Observation: 3 or 4 days after challenge

( ): FED index

Significant difference from alone (\*: CZX, \*\*: other drug,  $p < 0.05$ )

CZX: ceftizoxime, AMK: amikacin, PIPC: piperacillin, AZT: aztreonam

(FED: 0.68)であることが示された。一方、CY処理による顆粒球減少マウスにおける感染に対してはCZXのED<sub>50</sub>が>200 mg/kg, AMKが3.48 mg/kgと正常マウスに比較してそれぞれ治療効果は低下したもののCZXとAMKの併用時のED<sub>50</sub>は11.8 mg/kg (CZX: 10.7 mg/kg, AMK: 1.07 mg/kg)とそれぞれ1/20量および1/3量に軽減が可能で共に単独投与時に対し有意差が認められ、FED indexで見ると0.36と相乗的作用であった。

#### (2) *E. coli* 7107に対する効果

CZXに0.2 μg/ml, AMK; 3.13 μg/ml, PIPC; 3.13 μg/ml, AZT; 0.2 μg/mlの感受性を示す*E. coli* 7107を用い検討した (Table 4)。

正常マウスに対するCZXのED<sub>50</sub>は0.324 mg/kg, AMK; 1.32 mg/kg, PIPC; >15 mg/kg, AZT; 0.160 mg/kgであるのに対しCZXとAMKの10:1の併用は0.245 mg/kg (FED: 0.70), CZXとPIPCの併用は0.63 mg/kg (FED: 0.99)とそれぞれ相加作用が認められたが、AZTとの併用は不関 (FED: 1.58)であった。一方、顆粒球減少マウスの感染に対してはAMKとの併用においてのみ相乗作用が認められたが、PIPCおよびAZTとの併用では不関であった。

#### 3. ヒトの血清中濃度変化系における *in vitro* 殺菌作用

##### (1) *P. aeruginosa* に対する効果

臨床における有効性を推測するために抗菌作用および殺菌作用において相乗作用の認められたCZXとAMKを用い、CZXの臨床常用量である2 g 1時間点滴を6時間間隔で2回実施した時の血清中濃度推移とAMK 200 mg/kgを6時間間隔で2回筋注時の血清中濃度推移をMH-brothで再現し、*P. aeruginosa* 6042を接種し経時的に生菌数を測定した (Fig. 4)。

CZXは投与1時間後に124 μg/mlをピークに徐々に消失し6時間後7.6 μg/mlが存在する濃度変化系において*P. aeruginosa* (MIC: CZX: 50 μg/ml, AMK: 12.5 μg/ml)は増殖も減少もせず静菌の状態が継続した。これに対しAMKは1時間後に9.8 μg/mlをピークとし、その後ゆるやかに減少し、6時間後に1.8 μg/mlが残存した濃度変化系において菌数は時間の経過とともに著しく減少したものの6時間後の再投与にもかかわらず菌数はさらに著減することはなかった。またそれぞれの薬剤を組合せた2剤の濃度変化系において菌数は6時間までAMK単独と全く同じ挙動を示したが、8時間以降12時間まで菌を検出しなかった。

##### (2) *E. coli*に対する効果

臨床常用量 (CZX: 2 g, AMK: 200 mg, PIPC: 2 g, AZT: 1 g)の一回の投与モデルを設定し*E. coli* 7107を高量接種して検討した (Fig. 5)。

CZX は本菌に対し一過的に MIC の 600 倍以上の濃度と接触する時点もあり殺菌作用は顕著で 4 時間後には菌を検出できなかった。これに対し AMK は最高時で 3 倍の MIC の接触があるものの殺菌作用は弱く 5 時間までに約 3 オーダの菌数が減少した後は徐々に増加した。これに対し両剤の併用は CZX 単独よりもさらに殺菌時間は短縮し 2 時間後には菌を検出できなかった。PIPC は最高濃度は  $84 \mu\text{g/ml}$  (1 時間, 約 26 MIC) となるが, 菌の消失は緩慢で 8 時間にわたりゆ

るやかな菌数減少が認められ, CZX との併用においても CZX 単独の効果を越えることはできなかった。AZT の最高濃度は  $93 \mu\text{g/ml}$  と約 465 MIC に達するにもかかわらず菌数の減少は顕著ではなく 8 時間までゆるやかな減少をつづけたが CZX との併用は殺菌時間をより短縮することができた。

以上の結果から *P. aeruginosa* に対し CZX は AMK と協力して再増殖を長時間にわたり抑制し, *E. coli* に対しては AMK および AZT との併用で殺菌時間を短縮することができた。しかし, PIPC に対して協力効果は得られなかった。

### III. 考 察

顆粒球減少宿主は往々にして敗血症を併発するケースが多く血液材料からの分離状況をみるとグラム陽性球菌とならんで *P. aeruginosa* および *E. coli* が多いことが挙げられる。CZX は *P. aeruginosa* に対し  $12.5 \sim 800 \mu\text{g/ml}$  の中等度ないし高度耐性を示すが, アミノ配糖体, ペニシリンおよびモノバクタムとの併用により  $\text{MIC}_{50}$  は  $1/4 \sim 1/8$  になった。またアミノ配糖体 (AMK, TOB, ISP) は  $1/4 \sim 1/8$  に, ペニシリン (PIPC, TIPC) およびモノバクタム (AZT, CRMN) においてもそれぞれ  $\text{MIC}_{50}$  は  $1/2 \sim 1/4$  になることが明らかとなった。ただ PIPC および TIPC は *P. aeruginosa* に対し単独での抗菌力が強くないため CZX との併用において抗菌活性は期待する程増強されなかった。*P. aeruginosa* に対する短時間内殺菌作用はそれぞれ単独では殆ど活性を示さない CZX の  $1/8$  MIC および AMK の  $1/4$  MIC の併用で顕著な殺菌作用が確認された。さらにヒト常用投与量の血清中

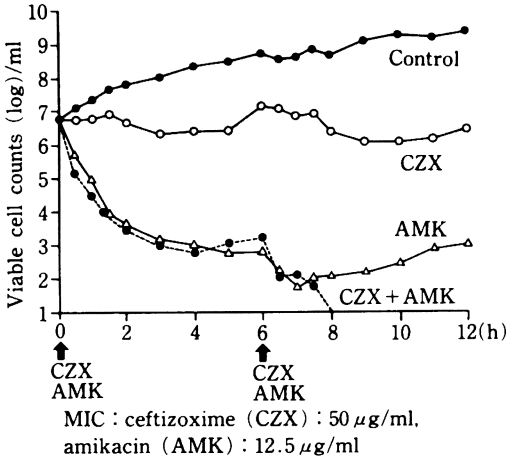


Fig. 4. Bactericidal activity of ceftizoxime and amikacin in combination against *Pseudomonas aeruginosa* 6042 in an *in vitro* model simulating human serum levels

CZX : 2 g, d.i./1 h.  
AMK : 200 mg, i. m.

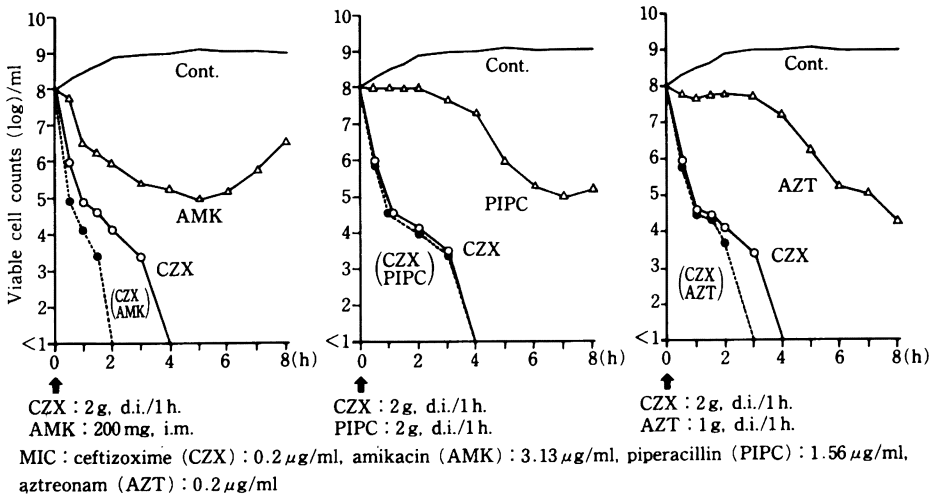


Fig. 5. Bactericidal activity of ceftizoxime and amikacin, piperacillin or aztreonam in combination against *Escherichia coli* 7107 in an *in vitro* model simulating human serum levels

濃度を simulate した系における CZX と AMK の併用においては AMK 単独で認められた再増殖を長時間にわたり抑制することができた。in vitro におけるこれらの殺菌活性の増強はマウス感染実験に十分に反映されており *P. aeruginosa* 感染に対する AMK の使用量は理論的には約 1/2 ~ 1/3 量に軽減することが可能となる。さらに *E. coli* 感染に対してはより少量で同等の効果が得られることが明らかとなった。ただ注意すべきことはアミノ配糖体は一般に血中濃度は持続するもののピーク濃度は低いという特徴を持ち起因菌によっては MIC レベル以上の濃度に達することが困難な場合もある。したがって heterogenous な cell 分布をもつ弱毒菌においては低濃度の作用によって耐性 cell が選択され易いことが考えられる。たとえば Fig. 5 の *E. coli* 7107 の実験で AMK 単独作用 7 時間目の反応液中から得られたコロニーについて AMK に対する MIC を測定した結果、反応スタート時 AMK に 3.13  $\mu\text{g/ml}$  の感受性をもっていた親株が反応後 20 コロニー中 18 コロニーが 12.5  $\mu\text{g/ml}$  の感受性となり、残り 2 コロニーは 6.25  $\mu\text{g/ml}$  であった。すなわち、Fig. 5 における AMK 作用時の再増殖は薬剤の作用によって明らかに耐性 cell が選択された結果であることが示された。

第 37 回化学療法学会の抗菌薬投与計画シンポジウムにおいて戸塚<sup>12)</sup>らは  $\beta$ -lactam 剤の効果は血中濃度の MIC を上回る時間が治療効果に影響し、アミノ配糖体は MIC 以上の血中濃度の AUC に相関すると発表している。アミノ配糖体の殺菌活性は濃度に比例し、1/4 MIC 以下では殆ど殺菌活性を示さないが、 $\beta$ -lactam 剤は sub MIC の低いレベルにおいても静菌的作用を示すことからアミノ配糖体は分割せずに投与し、 $\beta$ -lactam 剤は MIC 以上の血中濃度が維持されるような分割投与が良いとしている。確かに高い血中濃度が得がたいアミノ配糖体の特性から来る耐性 cell の選択等のことも考慮にいれるならばアミノ配糖体は一回の投与量を減量するのではなく、CZX との併用によって投与間隔をあげ回数を減らすことが副作用軽減につながり長期投与を余儀なくされる重症患者には有用な方法であろうと考えられる。一方、 $\beta$ -lactam 剤同士のマウス感染実験において我々は同時期に 2 剤投与を実施し併用効果を認めなかったが、戸塚<sup>12)</sup>らの理論に従い両剤を時差投与し有効血中濃度を持続させたならば良い治療効果が得られたかもしれない。

本実験の結果では in vitro MIC および殺菌作用をみる限り *P. aeruginosa*, *E. coli* および *K. pneumoniae* に対し CZX と AMK, PIPC および AZT との併用は比

較的高率に相乗ないし相加作用が認められたが、マウス感染実験における限定された投与方法では CZX と AMK の併用が最も良いという結果を得た。さらに正常マウスの約 1/100 の菌量の接種における顆粒球減少マウスの感染において各種抗菌剤の ED<sub>50</sub> が正常マウスの単独投与に比べて一様に約 3 倍の効果が低下した。しかしながら PIPC および AZT は別として CZX と AMK の併用効果は *E. coli* および *P. aeruginosa* 感染に対し、正常マウスの併用時の効果に比べ低下することはない。

島田<sup>13)</sup>らは尿路分離の *P. aeruginosa* 54 株に対し CZX と AMK の併用は平均 FIC index が 0.53 で相乗作用の頻度は 41% であったとしている。また SCRIBNER<sup>14)</sup>らの報告では cystic fibrosis より分離された *P. aeruginosa* 60 株に対し AMK と PIPC は 53% の割合で相乗作用を示したが、 $\beta$ -lactam 剤同士では 10% 前後と頻度が低かった。 $\beta$ -lactam 剤とアミノ配糖体の併用は  $\beta$ -lactam 剤の細胞壁合成阻害がアミノ配糖体の菌体内への透過性を良好にするものと考えられ、競合阻害作用による  $\beta$ -lactam 剤同士の併用よりも異なった作用点をもつ薬剤の併用の方が相乗作用の出現頻度が高いという報告が一般に多い<sup>15-18)</sup>。またある種の  $\beta$ -lactam 剤の併用では  $\beta$ -lactamase の誘導により in vitro および in vivo において antagonism が出現することが知られているが、本実験に用いた薬剤の組合せでは antagonism は観察されなかった<sup>19-21)</sup>。一方、臨床例<sup>22)</sup>では *P. aeruginosa* による難治性呼吸器症に対する PIPC とアミノ配糖体の併用療法の臨床有効率は PIPC 単独が 41.7% であったのに対し、TOB との併用は 58.3%、NTL との併用は 57.1% と有意差で併用群が優れる成績が得られている。ただ岡野<sup>23)</sup>らは LMOX と TOB の併用療法において臨床無効例より分離された *P. aeruginosa* に対し in vitro では相乗作用がみられたとしている。

このように複雑な宿主背景をもつ臨床効果は in vitro および in vivo 実験の成績を直接反映するとは限らないが起因菌の消失が治癒への第一ステップである以上、やはり抗菌スペクトラムおよび抗菌活性の増強が期待できる併用療法は重症感染症に対して今後も検討されるべき手段だと考えている。ただ沢山の薬剤が氾濫する現在、我々基礎研究の立場からは各種の評価モデルを用い各種薬剤の組合せにおいてより有用と思われる併用薬の情報を理論的根拠に基づいて提供することが直接的間接的に医療に役立つことができると考えている。



## 文 献

- 1) 那須 勝, 後藤陽一郎: Compromised host 感染症における臨床細菌学. 最近医学 42 (6), 1125 ~ 1132, 1987
- 2) 金丸昭久, 永井清保, 正岡 徹, 柴田弘俊, 木谷照夫, 谷口信博, 堀内 篤, 長谷川広文, 川越裕也, 平田充彦, 岡本緩子, 藤竹英樹, 米沢 毅, 金山良男: 血液疾患に合併した重症感染症に対する Ceftizoxime の臨床効果と安全性の検討. J. J. Antibiotics XXXVII-1, 140 ~ 148, 1984
- 3) 横田好子: 実験的免疫低下宿主の感染防御機構と免疫賦活剤. 日細菌誌 39: 29 ~ 46, 1984
- 4) 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
- 5) ELISON G B, SINGER S, HITCHINGS G H: Antagonists of nucleic acid derivatives, VIII. Synergism in combination of biochemically related antimetabolites. J. Biol. Chem. 208: 477 ~ 486 1954
- 6) 新薬シンポジウム (ceftizoxime), 第 26 回日本化学療法学会東日本支部総会, 1979
- 7) 新薬シンポジウム (HAPA-B), 第 31 回日本化学療法学会東日本支部総会, 1984
- 8) 新薬シンポジウム (T-1220), 第 23 回日本化学療法学会東日本支部総会, 1976
- 9) 新薬シンポジウム (SQ 26, 776), 第 30 回日本化学療法学会東日本支部総会, 1983
- 10) 村川武雄, 広瀬俊治, 西田 実: 生体内濃度に simulate した *in vitro* model における抗生物質の殺菌作用 (2). Two-compartment 理論による新しい gradient 濃度変化 model について. Chemotherapy 28 (1): 26 ~ 30, 1980
- 11) BLASS C I (Ed.): Statistics of bioassays. Academic Press Inc., New York, 1953
- 12) 戸塚恭一: 抗菌薬の投与計画, シンポジウム (治療薬としての抗菌薬投与計画), 第 37 回日本化学療法学会総会, 1989
- 13) 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 (12): 889 ~ 902, 1987
- 14) RONALD K SCRIBNER, MELVIN I MARKS, ANDREW H WEBER, MARTHA M TARPAY, DAVID F WELCH : Activities of various  $\beta$  lactams and aminoglycosides, alone and in combination, against isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. Antimicrob. Agents and Chemother. 21 (5): 939 ~ 943, 1982
- 15) 川原元司: 抗生物質の併用療法にかんする基礎的研究, *Serratia* に対する  $\beta$ -lactam 剤とアミノ配糖体剤の併用. Chemotherapy 35 (11): 803 ~ 816, 1987
- 16) 大月秀夫, 上 洋司, 柴原 健, 大槻雅子, 西野武志: Netilmicin セフェム系抗生物質との *in vitro* 併用効果の検討. Chemotherapy 37 (2): 115 ~ 123, 1989
- 17) 甲畑俊郎, 金 樹林, 藪内英子: 非発酵グラム陰性桿菌に対する aztreonam の試験管内抗菌作用ならびにアミノ配糖体系抗生物質との併用効果. Chemotherapy 37 (1): 5 ~ 14, 1989
- 18) SCUDAMORE R A, GOLDNER M: Penetration of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* by synergistic combination of  $\beta$ -lactam and aminoglycoside antibiotics. Antimicrob. Agents and Chemother 21: 1007 ~ 1010, 1982
- 19) 池田文昭, 高乘 仁, 西田 実, 五島嵯智子, 桑原章吾: Cephem 系薬剤間の antagonism とグラム陰性菌における  $\beta$ -lactamase 誘導について. Chemotherapy 31 (3): 304 ~ 308, 1983
- 20) CHRISTINE C SANDERS, W EUGENE SANDERS J R : Emergence of resistance to cefamandole: possible role of ceftioxin-inducible beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 15 (6): 792 ~ 797, 1979
- 21) KUCK N A, TESTA R T, FORBES M: *In vitro* and *in vivo* antibacterial effects of combinations of beta-lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 19 (4): 634 ~ 638, 1981
- 22) 副島林造, 他: 難治性呼吸器感染症に対する piperacillin とアミノ配糖体の併用療法の検討. Chemotherapy 36 (S-7): 55 ~ 71, 1988
- 23) 岡野昌彦, 佐藤篤彦, 本田和徳: 持続する緑膿菌感染のびまん性汎気管支炎に対する latamoxef と tobramycin の併用療法の検討. Chemotherapy 36 (3): 179 ~ 185, 1988

IN VITRO AND IN VIVO SYNERGISTIC EFFECT OF CEFTIZOXIME AND  
VARIOUS KINDS OF ANTIBIOTICS IN COMBINATION

YOSHIKO YOKOTA, FUMIAKI IKEDA and YASUHIRO MINE

Product Development Laboratories Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 1-6, 2-chome,  
Kashima-cho, Yodogawa ku, Osaka, Japan

We studied the *in vitro* and *in vivo* synergistic effect of ceftizoxime in combination with amikacin, tobramycin, isepamicin, piperacillin, aztreonam or carumonam against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

1. The MICs and FIC indexes of ceftizoxime with amikacin, piperacillin or aztreonam were superior in activity to those of each alone. The bactericidal activity of ceftizoxime and amikacin in combination against *P. aeruginosa* was synergistic, and the activity of ceftizoxime in combination with amikacin, piperacillin or aztreonam against *E. coli* and *K. pneumoniae* was also synergistic.

2. In treatment against infection with *P. aeruginosa* or *E. coli* in mice, ceftizoxime and amikacin in combination had synergistic or additive effect, but ceftizoxime combined with piperacillin or aztreonam did not.

3. In an *in vitro* model simulating human serum levels of ceftizoxime (2g/1h) and amikacin (200 mg, i.m.), ceftizoxime and amikacin in combination markedly inhibited regrowth of *P. aeruginosa* treated by amikacin alone for a long time. The bactericidal time of ceftizoxime combined with amikacin or aztreonam was shorter than that of ceftizoxime alone, but there was no such effect in the combination of ceftizoxime and piperacillin.