

# シソマイシンとセフェム系抗生物質との併用療法に 関する基礎的研究

## —臨床分離大腸菌に対する併用効果

高 橋 勝 雄

岩手医科大学薬剤部\* (主任：池田實教授)

岩手医科大学細菌学教室専攻生 (主任：川名林治教授)

(平成2年1月10日受付・平成2年6月15日受理)

シソマイシン (SISO) と6種のセフェム系抗生物質との組み合わせで、臨床分離大腸菌に対する併用効果をCheckerboard dilution methodで検討した。どの組み合わせにおいても併用効果は認められ、特に SISO とセファゾリン (CEZ) との併用では FIC index が 0.63 と最も小さく、部分的相乗作用を示した。そこで、この組み合わせを用いて、No. 540 の菌株に対し菌の増殖への影響を検討した。SISO 1/2 MIC と CEZ 1/8 MIC の併用で最も著明な菌数の減少が認められ、4時間後においては菌の増殖はほとんど見られなかった。さらに同じ組み合わせで、MIC が 12.5  $\mu\text{g/ml}$  以上の低感受性菌 3 株に対する併用効果も検討した。併用効果は 3 株すべてに対し認められ、SISO の MIC は 12.5  $\mu\text{g/ml}$  あるいは 25.0  $\mu\text{g/ml}$  から 3.13  $\mu\text{g/ml}$  以下に減少した。以上の結果より、SISO は低感受性株に対しても CEZ を併用することにより、副作用の懸念されない低用量で効果を期待できることが示唆された。

**Key words** : シソマイシン、セフェム系抗生物質、セファゾリン、併用効果、臨床分離大腸菌

シソマイシン (以下 SISO) はグラム陽性および陰性菌を含めた広範なスペクトルを有するアミノグリコシド系抗生物質 (以下 AG 剤) であるが、その強い抗菌力にもかかわらず他の同系抗生物質同様、眩暈、耳鳴、難聴、腎障害などの副作用<sup>1-3)</sup>が問題とされやすい。そのため、血中濃度モニタリング<sup>4-6)</sup>の実施はかりではなく、副作用軽減を目的としてペニシリン系やセフェム系抗生物質との併用が臨床の場ではしばしば行われている。

しかし、SISO に関する血中濃度測定法や併用効果についての基礎実験の報告は少なく、同系のゲンタマイシンやアミカシンなどの検討成績<sup>7-9)</sup>を参考とすることが多かった。著者らはこの点に着目し、血中濃度測定法については SISO の簡便・迅速な測定法を考案し報告してきたが<sup>10)</sup>、今回はもうひとつの課題である併用効果について、SISO の臨床使用時の血中濃度を想定した濃度を用い、臨床分離大腸菌に対する *in vitro* 効果を検討したので報告する。

### I. 実験材料ならびに方法

#### 1) 使用薬剤

##### a) AG 剤

Sisomicin (SISO, バイエル薬品)

#### b) セフェム系剤 (CEP 剤)

Cefmetazole (CMZ, 三共株式会社), cefazolin (CEZ, 藤沢薬品), cefamandole (CMD, 塩野義製薬), cefotaxime (CTX, ヘキストジャパン), latamoxef (LMOX, 塩野義製薬), cefbuperazone (CBPZ, 富山化学)

a), b) いずれの抗生物質も力価の明らかなものを用いた。

#### 2) 使用菌株

岩手医科大学附属病院および関連施設において、尿路感染症の患者から分離された大腸菌 61 株を用い、併用効果の実験には、これらの中から SISO に対する MIC がヒトに SISO 50 mg を投与した時の最高血中濃度 (約 4.0  $\mu\text{g/ml}$ )<sup>11)</sup>に近似した値を示す菌株、ならびに MIC 12.5  $\mu\text{g/ml}$  以上を示した菌株を用いた。

#### 3) 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

MIC の測定は日本化学療法学会標準法<sup>12)</sup>に準じて寒天平板希釈法により実施した。また、一部の菌株については次のような液体希釈法にても実施した。すなわち、MIC 測定用感受性ブイオン (栄研) にて一夜培

養した菌液を  $10^6$  CFU/ml に調整し、薬剤の希釈系列を含有するパイオンに接種後  $37^\circ\text{C}$ 、20 時間培養し菌の増殖の有無を観察した。薬剤の希釈は SISO, CEP 剤とも、それぞれパイオンを用い倍数希釈により行った。

4) SISO と CEP 剤の *in vitro* での併用効果の検討

Checkerboard dilution method により、MIC 3.13  $\mu\text{g/ml}$  を示した *Escherichia coli* No. 540 に対して実施した。すなわち、SISO と CEP 剤それぞれの培数希釈濃度液を互いに組み合わせた系列を MIC 測定用感受性パイオンにて滅菌小試験管に作成し、前培養して  $10^6$  CFU/ml に希釈調整した菌液を一白金耳接種し、 $37^\circ\text{C}$ 、20 時間培養後菌の増殖を観察した。併用効果の評価は、fractional inhibitory concentration index (FIC index)<sup>13)</sup> を次の式により算出し行った。

$$\text{FIC index} = \frac{\text{MIC of drug A combination}}{\text{MIC of drug A alone}} + \frac{\text{MIC of drug B combination}}{\text{MIC of drug B alone}}$$

5) 菌の増殖に対する併用効果

Checkerboard dilution method で最も併用効果が高いと評価された組み合わせを用い、さらに *E. coli* No. 540 の増殖に対する影響を検討した。前培養して 100 倍に希釈した菌液 (実測値:  $2.4 \times 10^7$  CFU/ml) 1 ml に、単独および組み合わせ薬剤の濃度がそれぞれ該当する濃度となるように添加し、 $37^\circ\text{C}$  にて培養しながら、経時的にサンプリングし生菌数を常法にしたがい測定した。

6) 低感受性株に対する併用効果

増殖に対する影響を検討した同じ組み合わせを用い、それぞれの培数希釈濃度液を互いに組み合わせた系列を作成し、SISO に対する MIC が 12.5  $\mu\text{g/ml}$  以上を示した 3 株の低感受性株をそれぞれ前培養して  $10^6$  CFU/ml に調整し、その一白金耳を接種し  $37^\circ\text{C}$  にて培養後、SISO の MIC の変化を観察した。

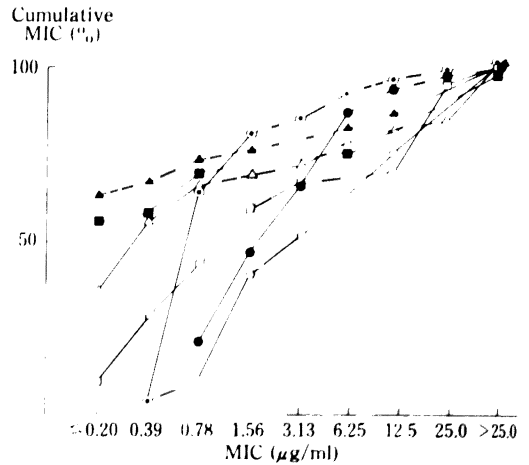
## II. 実験成績

1) SISO および CEP 剤に対する臨床分離大腸菌の感受性

臨床分離大腸菌 61 株の感受性分布を Fig. 1 に示した。菌株の 70% を阻止する濃度、すなわち  $\text{MIC}_{70}$  でみると、SISO 1.56  $\mu\text{g/ml}$ 、CEZ 6.25  $\mu\text{g/ml}$ 、CMZ 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 、CMD 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 、CTX 0.78  $\mu\text{g/ml}$ 、LMOX 3.13  $\mu\text{g/ml}$ 、CBPZ 0.78  $\mu\text{g/ml}$  で、本実験に使用した菌株は比較的 CTX、CBPZ に高い感受性を認めた。

2) SISO と CEP 剤との併用効果

Checkerboard dilution method で実験した *E. coli*



inoculum size:  $10^6$  cfu/ml

SISO: sisomicin (—○—), CEZ: cefazolin (—●—),  
CMZ: cefmetazole (—○—) CMD: cefamandole (—□—),  
CTX: cefotaxime (—▲—), LMOX: latamoxef (—▽—),  
CBPZ: cefbuperazone (—◆—)

Fig. 1. Susceptibility distribution of clinical isolates *Escherichia coli* to sisomicin and cephemis

No. 540 に対する併用効果の検討結果を Fig. 2 に示し、それに基づいて算出した FIC index を Table 1 に示した。

FIC index で併用効果を評価すると、どの組み合わせにおいても FIC index は 1.00 以下と相加作用が認められ、拮抗作用を認めた組み合わせはなかった。特に SISO と CEZ との組み合わせでは、1.56  $\mu\text{g/ml}$  (1/2 MIC) 対 0.20  $\mu\text{g/ml}$  (1/8 MIC) の濃度で FIC index が 0.63 と部分的相乗作用を示し、他の CEP 剤との組み合わせに比べ併用効果が強いことが認められた。

3) 菌の増殖に対する併用効果

Checkerboard dilution method により SISO と CEZ との組み合わせが最も強い併用効果を認めたため、本組み合わせを用いて菌の増殖に対する効果を検討し、その結果を Fig. 3 に示した。抗生物質無添加、SISO および CEZ 単独時に比べ、SISO-CEZ の併用は作用直後より明らかに菌の増殖抑制を示し、特に、1/2 MIC+1/8 MIC および 1/4 MIC+1/2 MIC では作用後 4 時間目において菌の増殖がほとんど認められなかった。

4) 低感受性株に対する併用効果

SISO と CEZ との組み合わせを用いて、低感受性株 3 株に対する併用効果を検討した結果を Fig. 4 に示した。図には CEZ の併用により SISO の MIC がどの

MIC		CEZ ( $\mu\text{g/ml}$ )						SISO alone
		6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	
SISO ( $\mu\text{g/ml}$ )	12.5	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-
	3.13	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	-	+
	0.78	-	-	-	-	+	+	+
	0.39	-	-	-	+	+	+	+
	0.20	-	-	-	+	+	+	+
CEZ alone		-	-	-	+	+	+	-

MIC		CMD ( $\mu\text{g/ml}$ )						SISO alone
		6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	
SISO ( $\mu\text{g/ml}$ )	12.5	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-
	3.13	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	+	+
	0.78	-	-	-	-	-	+	+
	0.39	-	-	-	-	+	+	+
	0.20	-	-	-	-	+	+	+
CMD alone		-	-	-	-	+	+	-

MIC		CTX ( $\mu\text{g/ml}$ )						SISO alone
		1.56	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05	
SISO ( $\mu\text{g/ml}$ )	6.25	-	-	-	-	-	-	-
	3.13	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	-	+
	0.78	-	-	-	-	-	+	+
	0.39	-	-	-	-	+	+	+
	0.20	-	-	-	-	+	+	+
	CTX alone		-	-	-	-	+	+

MIC		CMZ ( $\mu\text{g/ml}$ )						SISO alone
		6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	
SISO ( $\mu\text{g/ml}$ )	3.13	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	+	+
	0.78	-	-	-	-	+	+	+
	0.39	-	-	-	+	+	+	+
	0.20	-	-	-	+	+	+	+
	0.10	-	-	-	+	+	+	+
	CMZ alone		-	-	-	+	+	+

MIC		LMOX ( $\mu\text{g/ml}$ )						SISO alone
		1.56	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05	
SISO ( $\mu\text{g/ml}$ )	3.13	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	+	+
	0.78	-	-	-	-	-	+	+
	0.39	-	-	-	-	+	+	+
	0.20	-	-	-	-	+	+	+
	0.10	-	-	-	-	+	+	+
	LMOX alone		-	-	-	-	+	+

MIC		CBPZ ( $\mu\text{g/ml}$ )						SISO alone
		1.56	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05	
SISO ( $\mu\text{g/ml}$ )	6.25	-	-	-	-	-	-	-
	3.13	-	-	-	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-	-	+	+
	0.78	-	-	-	-	-	+	+
	0.39	-	-	-	-	+	+	+
	0.20	-	-	-	-	+	+	+
	CBPZ alone		-	-	-	-	+	+

inoculum size:  $10^6$  cfu/ml, -: No growth, +: Growth  
 SISO: sisomicin, CEZ: cefazolin, CTX: cefotaxime, LMOX: latamoxef,  
 CMD: cefamandole, CMZ: cefmetazole, CBPZ: cefbuperazone

Fig. 2. Combination effect of sisomicin and cepheims against *Escherichia coli* No. 540

ように変化したかを示したが、*E. coli* No. 46 (MIC; SISO 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , CEZ 50.0  $\mu\text{g/ml}$ ), *E. coli* No. 359 (MIC; SISO 25.0  $\mu\text{g/ml}$ , CEZ 25.0  $\mu\text{g/ml}$ ), *E. coli* No.394 (MIC; SISO 25.0  $\mu\text{g/ml}$ , CEZ 50.0  $\mu\text{g/ml}$ ) のいずれの株に対しても CEZ との併用効果が認められた。

### III. 考 察

抗生物質の併用は、抗菌力の増大、抗菌スペクトルの拡大、耐性菌の出現抑制、副作用の軽減などを目的

として行われることが多い。特に AG 剤の場合は、聴器毒性や腎毒性などの副作用が血中濃度との関連で指摘されていることから、その臨床使用にあたっては副作用と効果の両面について注意を払わなければならない。この点は *in vitro* の実験系においても考慮すべきところであるが、SISO に関しては、こうした基礎的研究の報告が少なかった。そこで著者はまず、SISO の副作用が発現しないと言われている濃度での併用効果がどの程度であるかを知る目的で、CEP 剤を併用薬に選

Table 1. Potentiation of anti *Escherichia coli* No. 540 activity of sisomicin in combination with cepheids

SISO alone MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) A <sub>0</sub>	CEPs alone MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) B <sub>0</sub>	SISO CEPs combination A / B	FIC index A / A <sub>0</sub> + B / B <sub>0</sub>	Mixed rate SISO CEPs
3.13	CMZ	1.56 / 0.39	0.75	4 : 1
	1.56	0.78 / 0.78	0.75	1 : 1
	CEZ	1.56 / 0.20	0.63	8 : 1
	1.56	1.56 / 0.39	0.75	4 : 1
		0.78 / 0.78	0.75	1 : 1
	CMD	0.78 / 0.39	0.75	2 : 1
	0.78	1.56 / 0.39	1.00	4 : 1
	CTX	1.56 / 0.05	0.75	32 : 1
	0.20	0.78 / 0.10	0.75	8 : 1
	LMOX	0.78 / 0.10	0.75	8 : 1
	0.20			
	CBPZ	0.78 / 0.10	0.75	8 : 1
0.20				

MIC: minimum inhibitory concentration, FIC: fractional inhibitory concentration

SISO: sisomicin, CMZ: cefmetazole, CEZ: cefazolin, CMD: cefamandole, CTX: cefotaxime,

LMOX: latamoxef, CBPZ: cefbuparone

び臨床分離大腸菌に対し検討した。

併用効果を評価する *in vitro* の方法としては、MIC を基本とした Checkerboard dilution method や生菌増殖におよぼす影響などを検討する方法がよく用いられているが、本来生体内に投与された抗生物質は、吸収、分布、代謝、排拙といった pharmacokinetic なパラメータに基づいてその濃度が変化するため、実験終了時まで同一濃度を菌に接触させているこれらの実験結果を即 *in vivo* の効果に結びつけることはできないという難点がある。一方、副作用の面から考えると、SISO も GM 同様、12.0  $\mu\text{g/ml}$  以上の血中濃度では副作用の発現が懸念されるため、これ以上の濃度を実験に使用することは実際の臨床面からすれば実用的とは思われない。とはいっても MIC 以下の濃度では無意味である。したがって、SISO の場合にも、12.0  $\mu\text{g/ml}$  以下の濃度で併用効果の期待できる他抗生物質との組み合わせを考えるべきと思われた。今回の臨床分離大腸菌に対する SISO の感受性試験では、MIC<sub>70</sub> は 1.56  $\mu\text{g/ml}$ 、MIC<sub>95</sub> は、3.13  $\mu\text{g/ml}$  であることから、約 85% の

菌株に対しては 3.13  $\mu\text{g/ml}$  以下の濃度で効果が期待されることが認められた (Fig. 1)。しかし、MIC が SISO の副作用が懸念される 12.5  $\mu\text{g/ml}$  以上の低感受性菌株に対して SISO を用いるには前述したように相加あるいは相乗効果を期待した他系抗生物質の併用を行い、濃度をそれ以下にすることが望まれた。そこで 6 種類の CEP 系剤を併用薬に選び SISO に対する MIC が 3.13  $\mu\text{g/ml}$  の株に対し検討したところ、どの組み合わせにおいても併用効果が認められ、特に SISO-CEZ の併用で最も FIC index が低かった (Table 1)。しかもこの組み合わせを用いての低感受性株に対する併用効果をみると、No. 46 および No. 359 では CEZ 25.0  $\mu\text{g/ml}$  の併用で SISO の MIC が 3.13  $\mu\text{g/ml}$ 、1.56  $\mu\text{g/ml}$  以下となり、No. 394 においても、CEZ 50.0  $\mu\text{g/ml}$  の併用で 3.13  $\mu\text{g/ml}$  を示した (Fig. 4)。この成績は、CEZ の側から見れば SISO の濃度が増すに従い、CEZ の MIC も低下することを示しており両者の併用効果は明らかであった。副作用の点からすれば、併用により MIC が低下することは臨床での

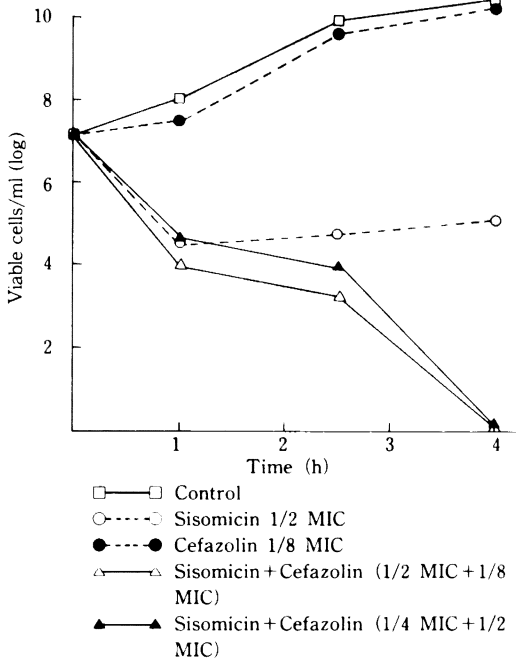
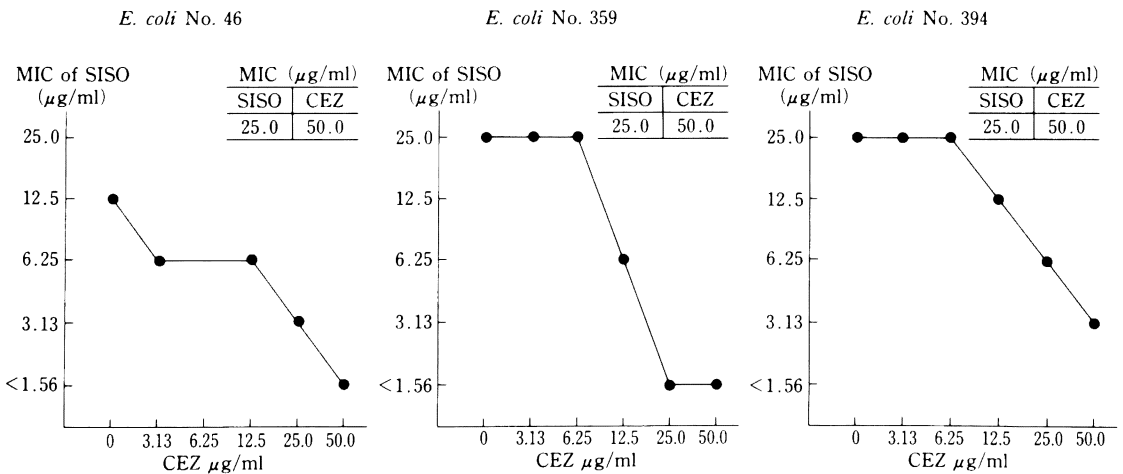


Fig. 3. Bactericidal effect of combined sisomicin and cefazolin against *Escherichia coli* No. 540

投与量の減量にも繋がりが望ましいこととも考えられる。特に、SISO の場合は常用量の 50 mg を筋注した際の最高血中濃度は約 4 μg/ml であることから<sup>11)</sup>、この成績は MIC が副作用の懸念される 12.5 μg/ml 以上の低感受性の菌株に対しても、CEZ を併用することにより SISO を用いることが臨床可能であることを示唆するものでもあった。さらに菌の増殖に対する併用効果の成績も、単独投与に比べ明らかな殺菌効果の増強が認められ (Fig. 3)、併用の意義はきわめて大きいものと考えられた。

これまでの AG 剤と他系抗生物質との併用効果に関する報告では、細菌に対する効果の強弱を見ているものが多く、各薬剤の血中濃度と効果の関連性についてはあまり触れていない。しかし、前述したように投与された薬剤の濃度は相対する細菌の MIC 以上でしかも副作用の恐れのない濃度でなければならないし、また、その濃度が確実に減少するという事も考慮しなければならない。そこで本研究では併用効果もさることながら、併用によって SISO の濃度を安全レベルまで下げ得るかについても検討した。特に、AG 剤では、副作用と血中濃度がきわめて相関していることからこの問題は重要である。検討菌株は少ないものの今回の実験成績から SISO の副作用が懸念される濃度以上の MIC を示す低感受性株に対しても、CEZ を併用することにより SISO 濃度の減少が認められ、しかも高い効果が確認された。今後は臨床における、より適



SISO : sisomicin, CEZ : cefazolin, *E. coli* : *Escherichia coli*

Fig. 4. Minimum inhibitory concentration of sisomicin combined with cefazolin against resistant strains of *Escherichia coli*

切な SISO の投与計画のため, *in vivo* を想定した抗生物質の濃度変化と抗菌活性との関連についても検討が必要と思われる。

稿を終えるにあたり, ご指導, ご助言を賜りました岩手医科大学細菌学教室 川名林治教授ならびに同大学薬剤部 池田實教授に深謝いたします。

なお, 本論文の要旨は第 130 回日本感染症学会(盛岡)において発表した。

#### 文 献

- 1) Smith C R, Lipsky J J, Lietman P S: Relationship between aminoglycoside induced nephrotoxicity and auditory toxicity. *Antimicrob. Agents Chemother* 15: 780~782, 1979
- 2) 山作房之輔, 武田 元: 急性腎不全の薬物中毒 抗生剤による中毒性腎疾患—血液と脈管 5 (5): 27~35, 1974
- 3) 武田 元, 庭山昌俊, 岩永守登, 蒲沢知子, 田中容, 木下康民, 川島士郎, 高頭正長: Sisomicin の基礎的, 臨床的研究。 *Chemotherapy* 26: 107~117, 1978
- 4) Barza M, Scheife R T: Drug therapy reviews: antimicrobial spectrum, pharmacology and therapeutic use of antibiotics, part 4; aminoglycosides. *Am J Hosp Pharm* 34: 723~732, 1977
- 5) Barza M, Lauerman M: Why monitor serum levels of gentamicin? *Clin Pharmacokinet* 3: 202~215, 1978
- 6) Gilman A G, Goodman L S, Gilman A: The pharmacological basis of therapeutics 6th ed. (Macmillan), pp. 1175~1176, 1989
- 7) 横田好子, 村川武雄, 西田 実: Cefazolin と gentamicin の併用に関する基礎的評価。 *Chemotherapy* 27: 696~703, 1979
- 8) 宇塚良夫, 永武 毅, 松本慶蔵, 大戸春子, 力富直人, 渡辺貴和雄: 実験肺炎を場とする CEZ-GM 併用療法の解析—GM 小量併用の効果の確認—。 *Chemotherapy* 28: 809~815, 1980
- 9) 吉沼清一, 有路文雄, 大沼菊夫, 渡辺 彰, 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 今野 淳: 抗生物質の併用に関する研究 (V) 肺炎かんきんに対するセフェム剤とアミノグリコシド剤との *in vitro* 併用効果に関する実験的考察—電顕観察も加えて—。 *Chemotherapy* 30: 1461~1464, 1982
- 10) 高橋勝雄, 池田 實, 川名林治: Gentamicin enzyme immunoassay kit の血中シソマイシン濃度測定への応用。 *Chemotherapy* 36: 467~472, 1988
- 11) Gruenwaldt G, Doenicke A, Scheer M, Fink H: Vergleichende Untersuchungen zur Pharmakokinetik von sisomicin und gentamicin. *Infection* 4 (s-4): 370~375, 1976
- 12) 日本化学療法学会 MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 13) Elion G B, Simger S, Hitchings G H: Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J. Biol. Chem.* 208: 477~488, 1952

COMBINED EFFECT OF SISOMICIN AND CEPHEMS AGAINST  
CLINICALLY ISOLATED *ESCHERICHIA COLI*

Katsuo Takahashi

Hospital Pharmacy, Iwate Medical University (Director: Prof. Ikeda M),  
19-1 Uchimaru, Morioka 020, Japan

A graduate student, Department of Microbiology, School of Medicine,  
Iwate Medical University (Director: Prof. Kawana R)

We studied the combined *in vitro* activity of sisomicin (SISO) and six cepheims (CEPs) against clinically pathogenic *Escherichia coli* No. 540 using the checkerboard dilution method. Combination of SISO and CEPs seemed to enhance the bactericidal effect. The fractional inhibitory concentration (FIC) index value of SISO and cefazolin (CEZ) was lowest (FIC index: 0.63). This result showed partial synergistic effect. The growth curve of *E. coli* No. 540 was also studied after addition of SISO or CEZ alone and SISO plus CEZ. When bacilli were treated with a combination of SISO (1/2 MIC) and CEZ (1/8 MIC), the viable cell count decreased markedly in comparison with others and colony forming units were not found until 4 later. The combined effect of SISO plus CEZ on three SISO-resistant strains (MIC 12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) was examined. The MIC of SISO decreased from 12.5  $\mu\text{g/ml}$  or 25.0  $\mu\text{g/ml}$  to 3.13  $\mu\text{g/ml}$  or less for all strains. These *in vitro* results suggest that SISO combined with CEZ may be used against SISO-resistant strains without inducing toxicity.