

抗菌性薬剤の3剤併用に関する研究 (IV)

三次元チェス盤法による3剤併用効果のコンピューター解析

渡辺 彰・北村 直人・大泉耕太郎・本田 芳宏

小野 玲子・徳江 豊・庄司 聡・本宮 雅吉

東北大学抗酸菌病研究所内科学部門*

(平成元年6月24日受付・平成元年12月20日受理)

抗菌性薬剤の3剤併用効果を解析する目的で提唱した三次元チェス盤法に関して、コンピューター(PC-9801)を用いて解析する方法を考案した。*Staphylococcus aureus* 10株、*Escherichia coli* 17株、*Klebsiella pneumoniae* 20株、*Serratia marcescens* 20株、*Pseudomonas aeruginosa* 20株の計87株を、MIC 2000システムにより作成したpiperacillin+amikacin+minocyclineの立体的なチェス盤の系列に接種し、37°C、20時間培養後の成績を今回作成したプログラムにデータ入力し、三次元グラフ上のVUS (volume under the surface)を算出して菌種毎に比較すると共に、最適な組み合わせ濃度を求めた。VUS index (3剤各々単独使用時に対する併用時のVUSの比=三次元グラフ上の体積比)が0.75未満を相乗作用、0.75~1.0を部分的相乗作用、1.0以上を拮抗作用と定義した。全87株に対するVUS indexは ≤ 0.702 で相乗作用が認められた。菌種別では*S. aureus*で ≤ 0.867 、*E. coli*で ≤ 0.679 、*K. pneumoniae*で ≤ 0.578 、*S. marcescens*で ≤ 0.726 、*P. aeruginosa*では ≤ 0.847 であった。上記の菌種間で見られた併用効果の程度の差異は、簡便法として提唱したFIC₂ indexによる成績と同様であり、両方法がいずれも有用であることが確認された。

Key words : 3剤併用効果, 三次元チェス盤法, コンピューター, VUS, VUS index

抗菌性薬剤の3剤併用効果の定量評価に関して我々は三次元チェス盤法を考案し、その原理と応用についてすでに報告¹⁻³⁾してきた。特に、その応用については簡便評価法を考案したものの、原理に関しては、2剤併用時の二次元平面上のAUC (area under the curve)に相当する三次元グラフ上のVUS (volume under the surface)の比較という概念を提唱するにとどまった。今回、パーソナル・コンピューターを用いて計算プログラムを作成し、原報で提唱したVUSの算出を実際に行なうと共に、新たに考案したVUS indexを用いて比較・解析して、その有用性を確認したので以下に報告する。

I. 材料と方法

被検菌株：前報³⁾において使用した菌株の一部を使用した。すなわち、*Staphylococcus aureus* 10株、*Escherichia coli* 17株、*Klebsiella pneumoniae* 20株、*Serratia marcescens* 20株、*Pseudomonas aeruginosa* 20株の計87株である。いずれも東北大学抗酸菌病研究所付属病院および仙台厚生病院において得られた、主に呼吸器由来の臨床分離保存株である。

抗菌性薬剤：Piperacillin (PIPC, 以下同じ、富士化学工業株式会社より供与)、amikacin (AMK, 以下同じ、萬有製薬株式会社より供与)およびminocycline (MINO, 以下同じ、日本レグリー株式会社より供与)の3剤を使用した。

抗菌力測定：ダイナテック MIC 2000システムによる微量液体培地希釈法を用いたが、詳細は前報³⁾に述べた。この方法で得られる成績は日本化学療法学会標準法⁴⁾による成績とほぼ相関する^{5,6)}ことが知られている。

薬剤の組み合わせ方と実験方法：前報³⁾に準じてPIPC+AMK+MINOの立体的なチェス盤プレートの系列を作成した。すなわち、PIPC+AMKの2剤併用のチェス盤プレートを多数枚作成しておき、これにMINOの4倍希釈系列を低濃度から順に0, 0.2, 0.78, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ を加えて立体的なチェス盤プレートとした。なお、PIPCの濃度は倍数希釈系列で低濃度から順に0, 0.39, 0.78……100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 、AMKは同様に0, 0.1, 0.2……25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$

*仙台市青葉区星陵町4番1号

Table 1. The VUS (volume under the surface) index was calculated by the three-dimensional checkerboard method to evaluate the *in vitro* combined effect of three antimicrobial agents

Range	Criteria
VUS index \leq 0.75	synergy
0.75 < VUS index < 1.0	partial synergy
VUS index = 1.0	indifferent
1.0 < VUS index	antagonism

Table 2. Mean VUS indices of a combination of piperacillin, amikacin and minocycline against clinical isolates

Species	Number of strains	Mean VUS indices
Total	87	\leq 0.702
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	\leq 0.867
<i>Escherichia coli</i>	17	\leq 0.679
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	\leq 0.578
<i>Serratia marcescens</i>	20	\leq 0.726
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	\leq 0.847

とした。このプレートの各ウェルに、前記 87 株の一夜培養菌液を 10 倍希釈し、その 0.0015 ml を接種した。37°C、20 時間培養後に各ウェル内の混濁を肉眼的に判定して MIC を決定した。

3 剤併用効果の判定基準：前報¹⁾に示した概念に従って規定した。すなわち、3 薬剤を各々単独使用したと仮定して想定される抗菌域は三次元グラフ上の直方体（内部が生菌域、外部が抗菌域）によって示される。これに対し、実際に 3 剤を併用したときに生菌域として得られる三次元グラフ上の凹面下の体積 (VUS) が実験より得られるが、さきの単独使用時の直方体の体積に対する 3 剤併用時の凹面下の体積の比を VUS index と定義した。その上で、Table 1 に示すように VUS index が 0.75 未満を相乗作用、0.75 以上で 1.0 未満を部分的相乗作用、1.0 を不関、1.0 以上を拮抗作用とする判定基準を設定した。なお、今回の検討では濃度段階の設定数が少なくデータ数に乏しいため、VUS index やそれを算定する基となる数値が不等号付きの形で呈示されている。

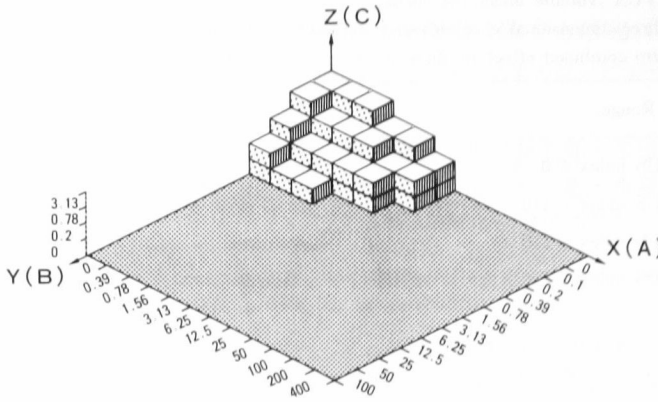
プログラムの作成：パーソナル・コンピューターを使用して以下の計算処理を行なうプログラムを作成し

た。詳細は略するが、NEC PC-9801 システム（日本電気株式会社）を用い、三次元グラフ上に表示された生菌域の体積を計算すると共に VUS index を算出し、また、その図形上で基準点からの距離が最小となる組み合わせの座標を求める計算プログラムを作成した。

データの入力と出力：実験の結果得られた 1 株毎のチェス盤プレート上の成績を、上記のプログラムにデータ入力した。すべてのデータを入力・固定後、計算処理を行なって 1 株毎に成績として出力した。出力された成績は、単独薬剤毎の MIC, VUS index, 基準点からの最短距離の 3 剤組み合わせの濃度および生菌域を示す実際の図形が、正の象限上で各軸より等距離の軸上から俯瞰した構図でコンピューターのディスプレイ上に表示され、かつプリントアウトが可能である。

II. 成 績

全株に対する VUS index および菌種毎の VUS index を Table 2 に示した。全 87 株に対する VUS index は \leq 0.702 であり、PIPC+AMK+MINO の 3 剤併用が相乗作用を示すことが知られた。また、菌種別の VUS index は *S. aureus* に対して \leq 0.867, *E.*



Strain : *K. pneumoniae* No.8

MIC_A = 12.5 μg/ml

MIC_B = 0.78 μg/ml

MIC_C ≥ 3.13 μg/ml

VUS index ≤ 52/96

= 0.541667

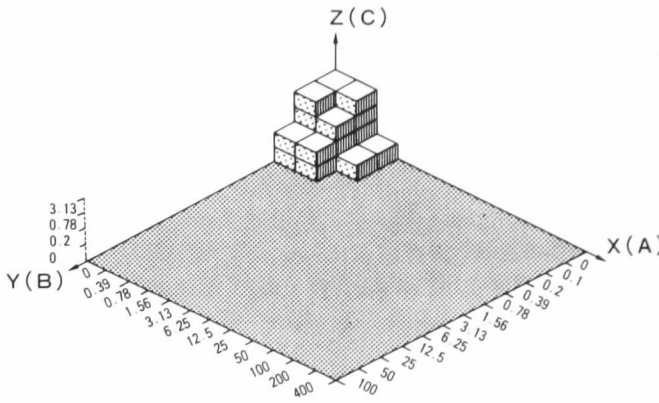
Optimum combination

PIPC_(A) : 0.39 μg/ml

AMK_(B) : 0.1 μg/ml

MINO_(C) : 3.13 μg/ml

Fig. 1. Display of the combined effect on *Klebsiella pneumoniae* No.8



Strain : *S. marcescens* No.1

MIC_A = 1.56 μg/ml

MIC_B = 0.39 μg/ml

MIC_C ≥ 3.13 μg/ml

VUS index ≤ 21/36

= 0.583333

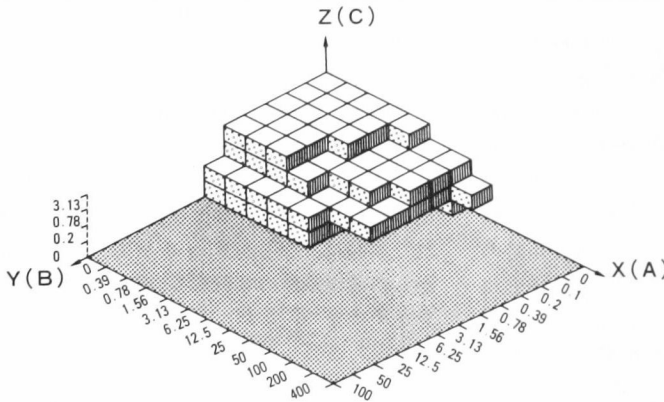
Optimum combination

PIPC_(A) : 0.39 μg/ml

AMK_(B) : 0.1 μg/ml

MINO_(C) : 3.13 μg/ml

Fig. 2. Display of the combined effect on *Serratia marcescens* No.1



Strain : *S. marcescens* No.8

MIC_A = 25 μg/ml

MIC_B = 3.13 μg/ml

MIC_C ≥ 3.13 μg/ml

VUS index ≤ 124/192

= 0.645833

Optimum combination

PIPC_(A) : 1.56 μg/ml

AMK_(B) : 0.39 μg/ml

MINO_(C) : 3.13 μg/ml

Fig. 3. Display of the combined effect on *Serratia marcescens* No.8

coli で ≤ 0.679, *K. pneumoniae* で ≤ 0.578, *S. marcescens* で ≤ 0.726, *P. aeruginosa* で ≤ 0.847 であり, 特に腸内細菌科の菌種に対して明確な相乗作用が認められた。

Fig. 1 から Fig. 3 には, 1 株毎の成績の一部を示したが, コンピューターのディスプレイ上にはこれとほぼ同様の画面が表示される。Fig. 1 は *K. pneumoniae* No.8 の成績であるが, 三次元グラフ上の X 軸は

PIPCの濃度、Y軸はAMKの濃度、Z軸はMINOの濃度を表し、この株ではそれぞれのMICが12.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.78 $\mu\text{g/ml}$, $\geq 3.13 \mu\text{g/ml}$ であることを示している。そして、実際に得られる生菌域は図示された直方体の重なりとして表示されており、その際のVUS index が $\leq 52/96 = 0.541667$ であることを示している。また、基準点からの距離が最小となる最適の組み合わせのPIPC, AMKおよびMINOの濃度が、それぞれ0.39 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であることが示されている。Fig. 2では、*S. marcescens* No.1について同様の成績が示されている。またFig. 3では、*S. marcescens* No.8について同様の成績と共に、一部に突出した拮抗作用を示す三次元の図形が示されている。

III. 考 察

我々は、抗菌性薬剤併用の最大の適応は悪性新生物を保有するような場合の併発感染症であり、基礎に悪性新生物を保有しない、いわゆる原発性感染症での適応は少ないことをすでに報告してきた⁷⁻¹⁰⁾。これらの研究を通して、臨床における併用療法の機会自体は比較的少ないものの、厳密な病態の把握と診断により適応を決定して併用療法を施行することにより、高い有効率を挙げ得ることを確認してきた。さらに、肺癌二次感染例に対しては、 β -ラクタム系抗生物質とアミノ配糖体系抗生物質の2剤併用もさることながら、それらにさらにテトラサイクリン系抗生物質を加えた3剤併用の有効率が有意に高いことを確認・報告してきた⁸⁻¹⁰⁾。以上の成績を受けて、これら3系統間の併用効果の作用機序に関しても検討を加える必要があると考えるが、一方で3剤併用効果の定量評価に関して有用な方法論を確立すべきであると考えてきた。その一端として、我々は三次元チェス盤法を考案し、その原理と応用についてすでに報告¹⁻³⁾してきた。その応用については、配合剤の評価に適用するECE index²⁾や3剤等量併用時に適用するFIC₃ index³⁾等による簡便評価法を考案したものの、原理に関しては三次元グラフ上のVUS (volume under the surface)の比較という概念を提唱するにとどまった¹⁾。

今回、上記概念を実証する方法論を確立することを目的として、パーソナル・コンピューターを用いた計算プログラムを作成し、原報¹⁾で提唱したVUSの算出を実際に行なうと共に、VUSの定量比較のために新たに考案したVUS indexを用いて比較・解析した。今回得られた成績は、この方法論の有用性を裏付けるものであった。と言える。すなわちコンピューターを用いる今回の方法により、生菌域を示す三次元グラフ

上の図形の体積 (VUS) の算出しその比較、VUS indexの算出および最適な薬剤組み合わせ濃度の決定が簡単に行ない得た。また、生菌域を示す三次元図形が実際にコンピューター画面にディスプレイされるため、任意の3薬剤の組み合わせで実際に菌の発育が阻止されるか否か、が直接に読み取れる利点を有する。たとえば、Fig. 1の*K. pneumoniae* No.8に関する成績を見ると、PIPC 0.39 $\mu\text{g/ml}$, AMK 0.1 $\mu\text{g/ml}$ および MINO 3.13 $\mu\text{g/ml}$ の3薬剤濃度では、それらのいずれの2剤を互いに併用したとしても菌の発育は阻止し得ないのに対し、これら3剤を同時に併用した時に初めて菌の発育が阻止されることが示されている。Fig. 2の*S. marcescens* No.1においても、PIPC 0.39 $\mu\text{g/ml}$, AMK 0.1 $\mu\text{g/ml}$ および MINO 3.13 $\mu\text{g/ml}$ の3薬剤濃度では、同様にそれらのいずれの2剤を互いに併用したとしても菌の発育は阻止し得ないの対し、これら3剤を同時に併用して初めて発育が阻止されることが示されている。また、このような3剤併用による発育阻止効果は、Table 1の成績に示されるごとく菌種別に異なっており、菌種毎の3剤併用の適応の大小も簡単に求めることが可能であった。さらに、この菌種別の成績は、さきに我々が簡便法として提唱したFIC₃ indexによる成績³⁾とほぼ一致しており、これらの2つの方法の有用性がそれぞれ実証されたものと言えよう。

ところで、Fig. 3の*S. marcescens* No.8においては、3剤同時併用の相乗的な効果と共に、MINOの低濃度添加時に逆に菌の発育が助長される拮抗作用が一部に見られ、しかもこの拮抗作用は特にPIPCとMINOの併用間に際立っていた。このような拮抗作用の発現は今回の例でも極めて少数株にとどまったが、我々の以前の検討でも同様の成績が得られている。すなわち、MINOとdibekacin (DKB)¹¹⁾あるいはANK¹²⁾との併用、というテトラサイクリン系抗生物質とアミノ配糖体系抗生物質相互よりも、MINOとsulbenicillin (SBPC)の併用¹¹⁾、というテトラサイクリン系抗生物質とペニシリン系抗生物質の併用間に拮抗作用が少数ながら見られた。JAWETZ¹³⁻¹⁵⁾が述べた殺菌的抗生物質と静菌的抗生物質との併用では拮抗作用が見られる、という概念を一部裏付けるものとも言える。しかしながら我々の実験で発現した拮抗作用の程度は極めて軽度であり、むしろ相乗作用の発現の程度が極めて大であるので、臨床的な使用に際しては相乗作用が大きく発現して、拮抗作用の発現は無視し得る程度であろうことが推察される。

今回の研究では、PIPCとAMKについては2倍希

釈系列とし、一方、MINOは4倍希釈系列として濃度上限を $3.13 \mu\text{g/ml}$ とする変則的な検討方法を採用した。このため、VUS indexの算定の際に分母となる直方体の体積が不等号付きの数値で表現され、VUS indexもそれと逆の不等号付きの形で表現されることになってしまった。したがって、今回得られたVUS indexを用いての比較には一定の制限が加わることとなる。これは、今回の研究の主題があくまでも、3次元チェス盤法として提唱したVUSをはじめとする諸概念に関してコンピューター解析を行なう、その方法論の有用性を実証することにあるためである。すなわちサンプル数を絞って検討を行なったためである。これに関しては、作業量が增大するものの、サンプル数を増大させて定型的な形での検討を加え、我々の提唱した方法の有用性をさらに実証する必要があるであろう。

さて、2剤併用効果の評価に現在多く用いられているFIC index^{7,16,17)}は、2つの併用薬剤のある組み合わせ濃度の一点のみに関する成績であって、併用効果の全体像を表現するものではなく、また、その成績は単なる相対比較にとどまって絶対的な定量評価は行ない得ない。したがって、併用効果の全体像を適確に表現すると共に、定量比較を行ない得る方法論が必要であるが、その意味で、我々の提唱してきた3次元チェス盤法は優れた方法論と言えよう。すなわちAUCやVUSの比較およびECE indexの比較という方法、さらに、VUS indexおよび最適な濃度の組み合わせを簡便に求めることの可能な今回の方法がそれであり、これまでに実証してきたごとく有用なものと言える。さらに、この3次元グラフは絶対値で表現されるので、そのグラフ上に各薬剤の血中濃度や病巣内濃度を外挿して重ね合わせれば具体的な適応範囲がさらに求め易くなり、より臨床的な応用が期待できるものと思われる。ところで、今回の方法では、実験を行なった後、そのデータを計算プログラムに入力するまでの作業に関しては省力化されていないが、データ入力後の成績の出力に関しては省力化されており、その操作は容易であった。今後は実験そのものと入力作業の省力化が課題であろう。

なお、我々は抗菌力の測定に関しては以前から微量液体培地希釈法を使用しており、この方法で得られる成績が日本化学療法学会標準法(寒天平板法)による成績とほぼ相関することも報告している⁵⁾。ただし、*S. aureus*については微量液体培地希釈法と寒天平板法との間で差があるとされており、併用時、特に今回の検討のような3剤併用時に解離が大きくなる

かどうかについて検討すべきであるが、今回の研究の主題とは若干離れているので、別途検討すべき問題であると考えられる。

以上、抗菌性薬剤の3剤併用効果を解析・評価する目的で提唱した3次元チェス盤法に関して、コンピューターを用いて検討する方法を考案し、その有用性を確認したが、多種類の多剤併用に関して、これまで我々の提唱してきた種々の応用法を組み合わせることにより適応の決定が容易となり、より有用性の高い併用療法を選択することが可能になると考える。また、今回の方法は抗菌性薬剤のみならず、抗癌剤や消炎鎮痛剤、降圧剤その他の、現実に多剤併用が行なわれている事例の解析に関しても実質的な応用が可能である、と考える。

なお、本論文の要旨は第37回日本化学療法学会総会(1989年5月、東京)において発表した。

文 献

- 1) 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(I), 3次元チェス盤法による3剤併用効果の定量評価の試み. *Chemotherapy* 36: 613 ~ 616, 1988
- 2) 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* 36: 732 ~ 737, 1988
- 3) 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* 36: 738 ~ 742, 1988
- 4) 日本化学療法学会: 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) 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 渡辺 彰, 青沼清一, 大沼菊夫, 今野 淳: ブドウ球菌, グラム陰性桿菌に対するDynatech MIC 2000 Systemおよび化学療法学会標準法(HI培地およびMH培地)で測定した常用抗生物質最小発育阻止濃度の比較. *Chemotherapy* 32: 10 ~ 20, 1984
- 6) 角井 徹, 中野 博, 世古昭三, 榎 知果夫, 畑地康介, 仁平博巳: MIC 2000システムによるMIC測定法の検討: 日本化学療法学会標準法によるMIC測定との比較. *Chemotherapy* 33: 537 ~ 543, 1985
- 7) 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
- 8) 渡辺 彰: 抗生物質併用の適応と組み合わせかた. *Medical Practice* 3: 990 ~ 995, 1986
- 9) 今野 淳, 渡辺 彰: 悪性腫瘍患者と感染—肺癌

- 二次感染を中心に。最新医学 42:1139 ~ 1145, 1987
- 10) 渡辺 彰: 抗菌性薬剤の3剤併用に関する研究。抗酸菌病研究所雑誌 40:253 ~ 269, 1988
- 11) 渡辺 彰, 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 今野 淳: Minocycline と Dibekacin あるいは Sulbenicillin との臨床分離グラム陰性桿菌に対する *in vitro* 併用効果について。Chemotherapy 28:594 ~ 604, 1980
- 12) 渡辺 彰, 佐々木昌子, 青沼清一, 大泉耕太郎, 今野 淳: 臨床分離グラム陰性桿菌に対する minocycline と amikacin の *in vitro* 併用効果。Chemotherapy 30:308 ~ 314, 1982
- 13) JAWETZ E., GUNNISON J B, COLEMAN V R: The combined action of penicillin with streptomycin or chloromycetin on *Enterococci in vitro*. Science 111:254 ~ 256, 1950
- 14) JAWETZ E, GUNNISON J B, SPECK R S: Antibiotic synergism and antagonism. N. E. J. M. 245:966 ~ 968, 1951
- 15) JAWETZ E, GUNNISON J B: Studies on antibiotic synergism and antagonism: A scheme of combined antibiotic action. Antibiotics and chemotherapy 11:243 ~ 248, 1952
- 16) PEREA E J, NOGALES M C, AZNAR J, MARTIN E, 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
- 17) 青沼清一, 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 (I), 臨床分離緑膿菌に対する piperacillin, ticarcillin と dibekacin との *in-vitro* 併用効果に関する実験的考察。Chemotherapy 30:149 ~ 153, 1982

COMBINATIONS OF THREE ANTIMICROBIAL AGENTS (IV)
THE *IN VITRO* COMBINED EFFECT OF THREE ANTIMICROBIAL AGENTS
ANALYZED BY THE THREE-DIMENSIONAL CHECKERBOARD METHOD
USING A PERSONAL-COMPUTER SYSTEM

AKIRA WATANABE, NAOTO KITAMURA, KOTARO OIZUMI, YOSHIHIRO HONDA,
REIKO ONO, YUTAKA TOKUE, SATORU SHOJI and MASAKICHI MOTOMIYA
Department of Internal Medicine, Research Institute for Chest Diseases and Cancer,
Tohoku University, Seiryomachi 4-1, Aoba-ku, Sendai 980, Japan

We have devised a new method for the analysis of the *in vitro* combined effect of three antimicrobial agents by using the three-dimensional checkerboard method as reported by us previously, in which a new program designed by us for a personal computer system (NEC PC-9801, Nihon-Denki Co. Ltd., Japan) was applied. 1.5×10^{-4} ml of an overnight culture of 87 strains consisting of 10 strains of *Staphylococcus aureus*, 17 of *Escherichia coli* and 20 each of *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* were inoculated into the microtiter plates containing varying concentrations of piperacillin (PIPC), amikacin (AMK) and minocycline (MINO) which were prepared by the MIC 2000 system based on the three-dimensional checkerboard method. The MIC values were input into the program after 20 hours' incubation at 37°C, and then VUS (volume under the surface) values, VUS index and optimum combinations of three agents were calculated for each strain and species. A VUS index of less than 0.75 was evaluated as "synergism", one between 0.75 and 1.0 as "partial synergism". The effect of combination as "indifference" when the VUS index was 1.0 and as "antagonism" when it was more than 1.0. The combination of the three agents was found to be synergistic against all the species as shown by a mean VUS index of 0.702. The mean VUS index for each species was 0.867 against *S. aureus*, less than 0.679 against *E. coli*, 0.578 against *K. pneumoniae*, 0.726 against *S. marcescens* and 0.847 against *P. aeruginosa*. We conclude from the above results that the computer-aided three-dimensional checkerboard method is useful for the analysis of the *in vitro* combined effect of three antimicrobial agents.