

# *Pseudomonas aeruginosa* に対する各種抗菌薬の 殺菌力におよぼす fosfomycin の影響

菅野由美子・高田 利彦・菅野 利恵・吉田 隆

明治製菓薬品総合研究所創薬研究所\*

(平成 7 年 4 月 19 日受付・平成 7 年 6 月 30 日受理)

Fosfomycin (FOM) と各種抗菌薬の *Pseudomonas aeruginosa* に対する併用作用時における FOM の抗菌力におよぼす種々の条件を検討し、以下の結果を得た。

- 1) 被験菌に対し FOM の sub MIC 濃度で前処理することにより、併用抗菌薬の *P. aeruginosa* に対する殺菌力は増強し、それは FOM の作用濃度に依存的であった。
- 2) 前処理した FOM を除去直後に、併用抗菌薬を添加した場合は、単剤作用時に比べ *P. aeruginosa* に対する殺菌力の増強を示したが、1 時間以上の時間経過後ではほとんど認められなかった。
- 3) これらの併用効果と被験薬剤の *P. aeruginosa* に対する抗菌力との相関関係は、認められなかった。
- 4) 併用効果を示した菌株は、併用効果の認められた FOM の濃度で 1 時間以上処理することにより無処理菌より菌体表層が疎水性を示すようになった。
- 5) FOM と ofloxacin (OFLX) の単独および併用作用時における *P. aeruginosa* に対する形態変化は、電子顕微鏡による観察において、それぞれの薬剤単独作用群よりも両薬剤の併用作用群に、より多くの球形化した菌および溶菌像が観察された。

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, fosfomycin, ofloxacin, 併用効果

*Pseudomonas aeruginosa* は、広く自然界に分布するグラム陰性桿菌であり、ヒトの皮膚や腸管内に常在し、重症感染症や複雑性尿路感染症などの原因菌として重要な位置を占めている<sup>1)</sup>。現在、抗緑膿菌作用を有する抗菌薬が次々と開発されているが、一方では多剤耐性化が進み、臨床の場においても問題視されている<sup>2)</sup>。

緑膿菌感染症の化学療法において、特に慢性呼吸器感染症や日和見感染症では、単剤の抗菌薬では十分な臨床効果が得難く、抗菌剤の併用療法に期待せざるを得ない<sup>3)</sup>。

FOM は、グラム陽性および *P. aeruginosa* を含むグラム陰性菌の抗菌力を示し、種々の薬剤と良好な併用効果を示すことが報告されている<sup>4)</sup>。

そこで、今回我々は、*P. aeruginosa* に対する FOM と各種抗菌薬（特にキノロン剤）との併用効果について検討し、若干の知見を得たので報告する。

## I. 実験材料および実験方法

### 1. 使用菌株

当研究所保存の臨床分離株 *P. aeruginosa* PRC-72, *P. aeruginosa* PRC-49, *P. aeruginosa* PRC-16, *P. aeruginosa* PRC-17, *P. aeruginosa* PRC-55, *P. aeruginosa* PRC-78, *P. aeruginosa* PRC-33, *P. aeruginosa* PRC-20 の計 8 株を使用した。

### 2. 使用薬剤

Fosfomycin (FOM, 746  $\mu\text{g/ml}$ , 明治製菓). piper-

cillin (PIPC, 867  $\mu\text{g/ml}$ , 三共), ceftazidime (CAZ, 750  $\mu\text{g/ml}$ , 田辺製薬), imipenem/cilastatin (IPM/CS, 441  $\mu\text{g/ml}$ , 萬有製薬). gentamicin (GM, 672  $\mu\text{g/ml}$ , 明治製菓), erythromycin (EM, 930  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma), ofloxacin (OFLX, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ , 第一製薬), norfloxacin (NFLX, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma). および ciprofloxacin (CPFX, 858.6  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma) を使用した。なお、OFLX は市販品を当社において抽出、精製し純度を確認したものを使用した。

### 3. 感受性測定

日本化学療法学会標準法<sup>5)</sup>に準じて、Mueller Hinton agar (BBL) を用いた寒天平板希釈法にて、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

### 4. 併用薬剤の違いによる併用殺菌効果の検討

Heart Infusion agar (Difco) で培養した *P. aeruginosa* PRC-72 を Mueller Hinton broth (BBL) に接種し、37°C で一夜前培養したものを使用菌液とした。その前培養した菌液を Mueller Hinton broth (BBL) で希釈調整し、37°C で 2 時間振盪培養をした。対数増殖期の菌に、FOM (1/2 MIC) を 2 時間作用後、Mueller Hinton broth (BBL) で 100 倍希釈することにより FOM を除き、さらに各種抗菌薬 (sub MIC) を添加して経時的に生菌数を測定した。生菌数測定は Heart Infusion agar (Difco) を用い、寒天塗抹培養法にて行った。また、

\* 横浜市港北区師岡町 760

FOM 無処理菌に対し同様の方法で生菌数を測定し、各種抗菌薬の殺菌力におよぼす FOM の効果を検討した。

#### 5. FOM 作用濃度の違いによる併用効果の検討

*P. aeruginosa* PRC-72 に対し、12.5, 6.25, 3.13 および 1.56  $\mu\text{g/ml}$  の濃度の FOM を 2 時間作用させた後、希釈法により FOM を除き、さらに OFLX (6.25  $\mu\text{g/ml}$ ) または NFLX (3.13  $\mu\text{g/ml}$ ) を作用させ、添加時と 2 時間後の生菌数を測定した。

#### 6. FOM 前処理効果の持続性の検討

*P. aeruginosa* PRC-72 に対し、FOM (12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) を 2 時間作用させた後、希釈法により FOM を除いた。その 0, 1, 2 または 4 時間後に菌液を約  $10^5$  CFU/ml となるように Mueller Hinton broth (BBL) で調整しキノロン剤を作用させた。キノロン剤添加時と 2 時間後の生菌数を測定した。

#### 7. 抗菌薬の感受性の違いによる併用効果の検討

FOM の感受性が同じで OFLX の感受性の異なる *P. aeruginosa* 5 株 (PRC-49, PRC-16, PRC-17, PRC-55 および PRC-78) と、OFLX の感受性が同じで FOM の感受性の異なる *P. aeruginosa* 4 株 (PRC-17, PRC-72, PRC-33 および PRC-20) に対し、併用効果を検討した。すなわち、FOM (12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) を 2 時間作用させた後、希釈法により FOM を除き、さらに OFLX (6.25 および 3.13  $\mu\text{g/ml}$ ) を作用させ、直後と 2 時間後の生菌数を測定した。

なお、5, 6 および 7 の前培養、菌液調整、抗菌薬除去および生菌数測定は 4 と同様の方法で行った。

#### 8. 走査型電子顕微鏡による形態学的検討

走査型電子顕微鏡により、*P. aeruginosa* PRC-72 に対する FOM と OFLX 単剤作用時における形態と、FOM 2 時間作用後に OFLX を作用させた場合の形態とを比較検討した。すなわち、単剤作用では FOM (12.5  $\mu\text{g/ml}$ )、OFLX (3.13  $\mu\text{g/ml}$ ) をそれぞれ 2 時間作用させ、2 剤併用では、FOM (12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) を 2 時間作用後、Mueller Hinton broth (BBL) で 100 倍希釈することにより FOM を除去し、OFLX (3.13  $\mu\text{g/ml}$ ) を

2 時間作用させた。その後、グルタルアルデヒド (最終濃度 2.5%) およびオスミウム酸 (最終濃度 1.0%) で二重固定した。さらに、アルコールで段階脱水 (50%~100%) し、臨界点乾燥後、金蒸着した。このサンプルを走査型電子顕微鏡 (Akashi DS-130) により観察した。

#### 9. 疎水度測定方法

有機溶媒を使用した平井ら<sup>9)</sup>の方法に準じて行い、細胞の水層への移行度を測定した。すなわち、Heart Infusion agar (Difco) で培養した *P. aeruginosa* PRC-72 を L-broth に接種し、37°C で一夜培養した。前培養した菌液を L-broth で希釈調整し、37°C で 3~4 時間振盪培養を行った。この菌液に FOM を作用させ、さらに 3~4 時間培養した対数増殖期後期の細胞を、4°C, 6,000 r.p.m. で 20 分間の遠心により集め、沈渣を PUM buffer (2.22%  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.726%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.18% urea および 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; PH 7.1) にて洗浄した。同様にこの遠心分離、洗浄を 2 度行った後、再度遠心分離し、PUM buffer に懸濁し、O.D.=1.0 に調整した。この懸濁液 2.5 ml に有機溶媒 (n-Hexane または n-Octane) を 1.0 ml 重層し、37°C で 15 分間保った後、Vortex mixer で 2 分間混合した。20 分間静置後、その水層の O. D. を 660 nm で Shimadzu UV-260 分光光度計にて測定した。

なお、Index は下記の式により求めた。

$$\text{Index} = (\text{FOM 無処理菌の buffer の O. D.} - \text{FOM 処理菌の buffer の O. D.}) / \text{FOM 無処理菌の buffer の O. D.}$$

## II. 実験結果

### 1. 感受性測定

使用した臨床分離株 8 株に対する FOM, PIPC, CAZ, IPM/CS, GM, EM, OFLX, NFLX および CPFX の MIC を測定し Table 1 に示した。*P. aeruginosa* PRC-72 は、 $\beta$ -lactam 剤をはじめとする多剤耐性が認められたため、Figs. 1~4, 6 および Table 2 に示した検討の使用菌株とした。

### 2. FOM と各種抗菌薬の併用効果の検討

Table 1. MICs of fosfomycin and other antibiotics determined by agar dilution method against *Pseudomonas aeruginosa*

Strain no.	FOM	PIPC	CAZ	IPM/CS	GM	EM	OFLX	NFLX	CPFV
PRC-49	100	25	25	1.56	>100	400	1.56	0.78	0.20
PRC-16	50	50	12.5	25	3.13	1,600	6.25	3.13	0.39
PRC-14	50	25	12.5	0.78	3.13	1,600	12.5	6.25	1.56
PRC-55	100	12.5	6.25	0.78	3.13	1,600	50	25	12.5
PRC-78	50	25	3.13	0.78	6.25	—	200	200	50
PRC-72	25	>100	100	25	3.13	800	12.5	3.13	0.78
PRC-33	>100	>100	100	12.5	3.13	1,600	12.5	3.13	0.78
PRC-20	>100	12.5	6.25	25	3.13	1,600	12.5	6.25	1.56

( $\mu\text{g/ml}$ )

FOM: fosfomycin, PIPC: piperacillin, CAZ: ceftazidime, IPM/CS: imipenem/cilastatin, GM: gentamicin, EM: erythromycin, OFLX: ofloxacin, NFLX: norfloxacin, CPFV: ciprofloxacin

## (a) 各抗菌薬間における併用効果の違い

FOM (1/2 MIC) 前処理後に OFLX (sub MIC) を作用した場合には、OFLX 単剤作用と比し殺菌力の顕著な増強が認められたが、PIPC, CAZ, IPM/CS, GM および EM (すべて sub MIC 作用) を作用した場合には殺菌力の増強はほとんど認められなかった (Fig. 1)。

## (b) 各キノロン剤間における併用効果の違い

FOM (1/2 MIC) 処理菌に対し、各キノロン剤 (sub MIC) を作用させたが、すべて強い併用殺菌効果が認められ、キノロン剤間では併用効果に差が認められな

った (Fig. 2)。

## 3. FOM の作用濃度の違いによる併用効果の検討

FOM の作用濃度を4段階とり、キノロン剤添加2時間後と添加時における生菌数の差 ( $\Delta \log_{10} \text{CFU/ml}$ ) を Fig. 3 に示した。その結果 OFLX および NFLX の殺菌作用の増強は、FOM の作用濃度を増加させると強くなった。

## 4. FOM 前処理効果の持続性の検討

FOM 除去後にキノロン剤を添加する時間を変化させ、キノロン剤添加2時間後と添加時における生菌数の

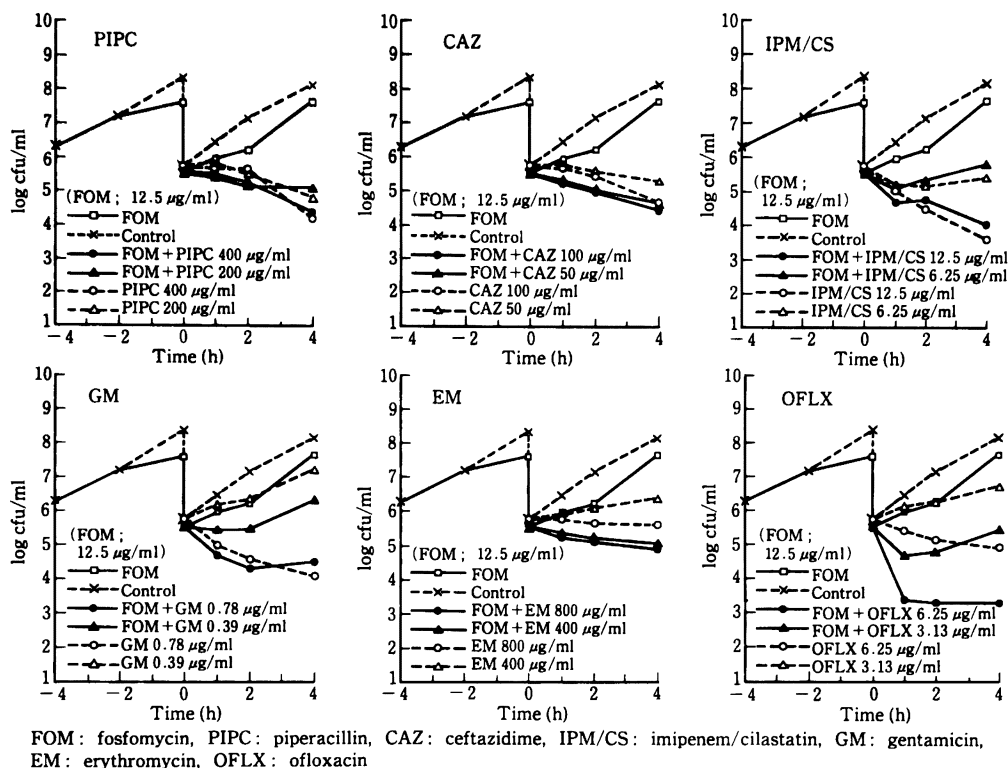


Fig. 1. Combined effects of fosfomycin and various antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* PRC-72.

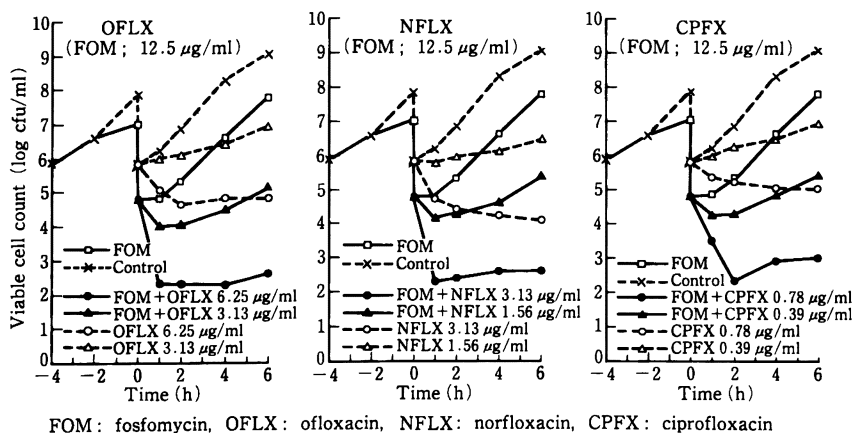


Fig. 2. Combined effects of fosfomycin and new quinolones on *Pseudomonas aeruginosa* PRC-72.

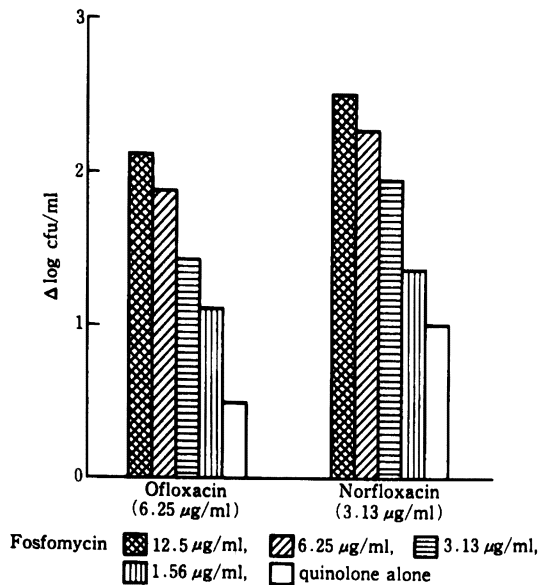


Fig. 3. Combined effects of FOM and new quinolones at several concentrations of fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* PRC-72.

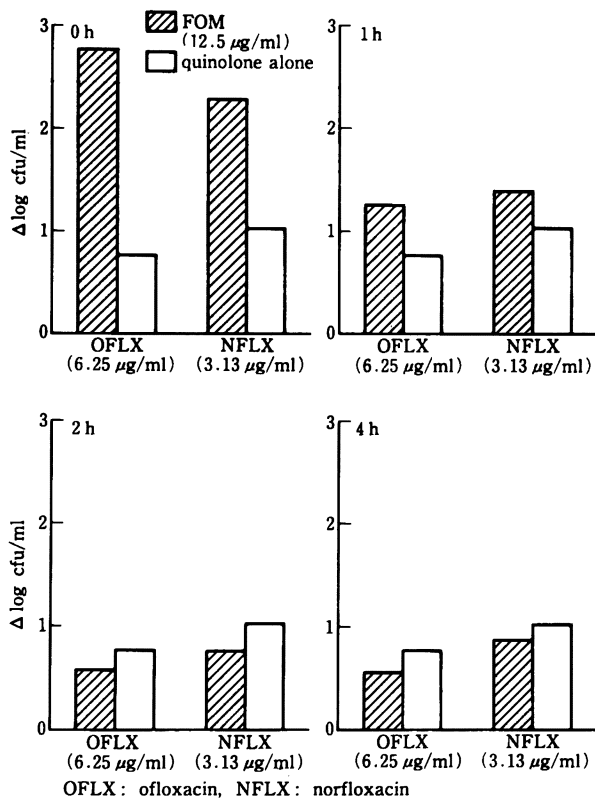


Fig. 4. Combined effects of fosfomycin and new quinolones at several dose intervals of quinolones on *Pseudomonas aeruginosa* PRC-72.

差 ( $\Delta \log_{10} \text{CFU/ml}$ ) を Fig. 4 に示した。FOM 除去直後 (0 h) にキノロン剤を添加した場合は、キノロン剤単独と比べて殺菌力の増強が強く認められるが、FOM 除去 1 時間後に添加した場合は殺菌力の増強がわずかし

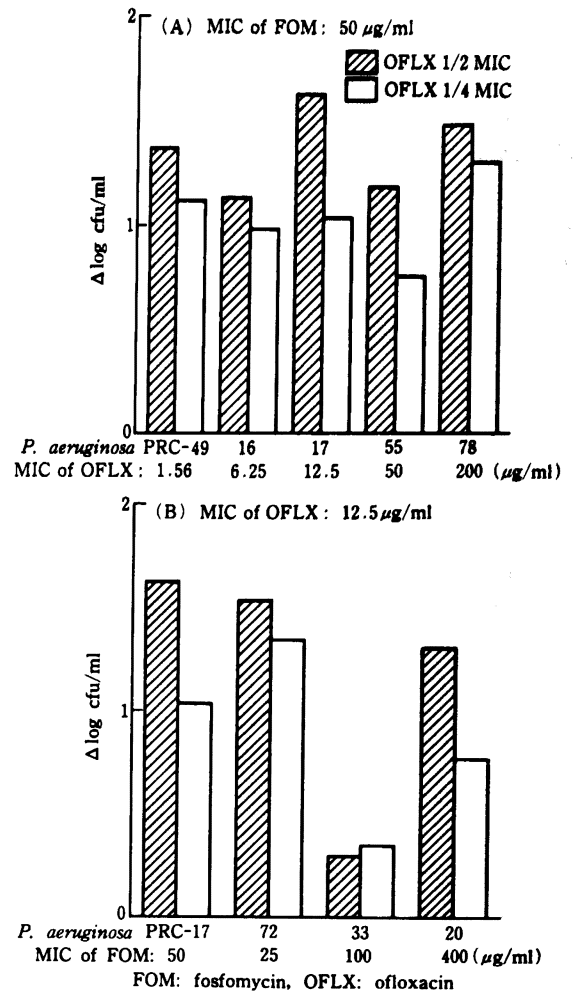


Fig. 5. Correlation between the combined effects and MICs of fosfomycin and new quinolones on *Pseudomonas aeruginosa*.

か認められず、2 および 4 時間後ではほとんど認められなかった。

#### 5. 感受性の違いによる併用効果の検討

*P. aeruginosa* に対する FOM と OFLX の MIC が異なる 8 株に対し、FOM と OFLX との併用効果と MIC との関連について、Fig. 5 に示した。殺菌力増強指数 (I) は、FOM 処理群に OFLX 添加時と 2 時間後の生菌数の差(a)から無処理群に OFLX を添加した時と 2 時間作用後の生菌数の差(b)を減じた値 ( $\Delta \log_{10} \text{CFU/ml} = a - b$ ) として表わした。この値を棒グラフにした。その結果、FOM の MIC が一定で、OFLX の MIC が異なる株を用いた場合に併用効果の増強は、OFLX の MIC と一定の傾向が認められなかった。また、OFLX の MIC が一定で FOM の MIC が異なる株を用いた場合に併用効果の増強は、FOM の MIC と一定の傾向が認められなかった。

#### 6. 形態学的検討

走査型電子顕微鏡による形態学的検討結果を Fig. 6

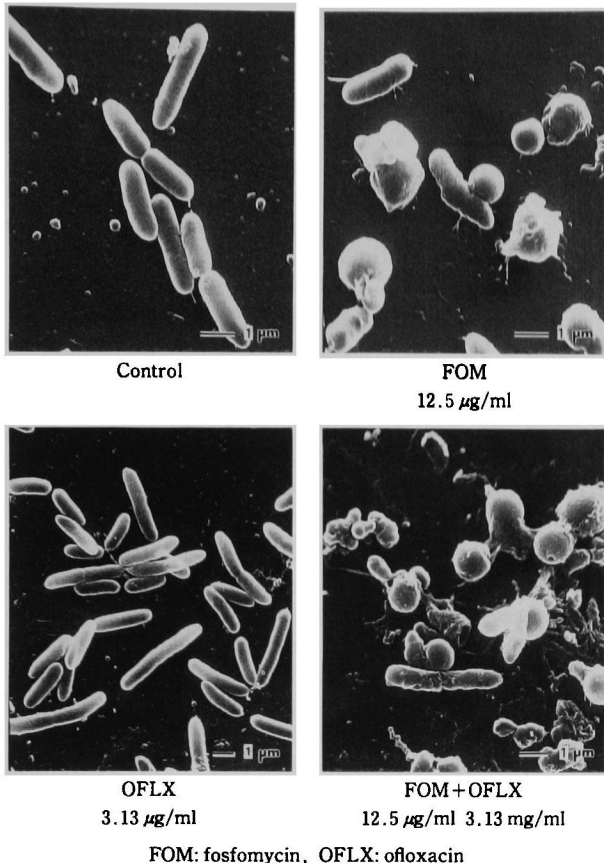


Fig. 6. Scanning electron micrographs of *P. aeruginosa* PRC-72 exposed to fosfomycin and ofloxacin.

に示した。FOM 12.5 µg/ml を単独作用させた場合には、菌の球形化およびパルジ構造が観察され、OFLX 3.13 µg/ml 単独させた場合には、菌の若干の伸長化が観察された。一方、FOM 12.5 µg/ml を 2 時間作用後 FOM を除き、OFLX 3.13 µg/ml を作用させた場合には、各単剤の作用に比べて数多くの球形化した菌および溶菌像が観察された。

#### 7. 菌体表層の疎水性の違いと併用効果の検討

FOM の菌体表層の疎水性に及ぼす影響の検討結果を Table 2 に示した。(A)には、FOM を 12.5, 3.13 および 0.78 µg/ml 作用させたときの影響を示した。併用効果のみられる濃度 12.5 µg/ml を作用させたとき、併用効果のでない濃度 0.78 µg/ml を作用させたときとを比較すると、併用効果のでる濃度を作用させたときの方が、約 10~70 倍菌体表層を疎水性に傾けた。また、FOM 12.5 µg/ml を 0.5, 1, 2 および 4 時間作用させたときを(B)に示した。その結果、FOM を 1 時間以上の作用させることにより菌体表層を疎水性に変化させることが認められた。

### III. 考 察

*P. aeruginosa* は、一般にその病原性は低いものとされているが、Compromised host に対しては感染力を発揮し、その病態は難治性に移行しやすく、単剤における

Table 2. Influence of fosfomycin on cell-surface hydrophobicity in *Pseudomonas aeruginosa* PRC-72

(A)

Fosfomycin (µg/ml)	Cell-surface hydrophobicity index	
	n-Hexane	n-Octane
12.5	0.73	0.73
3.13	0.42	0.39
0.78	0.06	0.01

(B)

Time (h)	Cell-surface hydrophobicity index	
	n-Hexane	n-Octane
0.5	0.004	0.050
1	0.613	0.532
2	0.560	0.524
4	0.683	0.530

(FOM; 12.5 µg/ml)

治療には限界があり、併用療法の対象菌種と考えられている<sup>3,7-9)</sup>。

また、併用療法は、抗菌力の増大、耐性化の防止、副作用の軽減などを図る手段<sup>1,10)</sup>として注目されている。

*P. aeruginosa* に対して FOM (1/2 MIC) と NFLX (1/2 MIC) を作用させると、単独では静菌的に推移後再増殖し、併用においては、FOM 添加後に NFLX を作用させると同時添加と比較し、より殺菌的な作用を示した<sup>11)</sup>との報告がある。

そこで今回我々は、*P. aeruginosa* に対する FOM と各種薬剤との併用効果、特に FOM を前処理することによる影響について検討した。

FOM 処理菌に対し、PIPC, CAZ, IPM/CS, GM, EM, OFLX, NFLX および CFX を作用させることにより、特にキノロン剤については、単剤作用と比較し、顕著に殺菌力の増強が認められた。また、走査型電子顕微鏡による観察においては、FOM と OFLX を併用することにより、各単剤の作用と比較し数多くの溶菌像が観察され、形態学的にも併用効果が認められた。

キノロンの取り込みは Mg<sup>2+</sup> で阻害され、脱共役剤などでプロトン駆動力を解消すると取り込み量が増加する<sup>12)</sup>ことがいわれている。

また、FOM は強い陽イオンである燐を持っているため、燐イオンが外膜の電位のバランスを崩し、Mg<sup>2+</sup> に影響を与えていることが考えられる。

一方、MRSA に対し FOM を 1/16 MIC 作用させると PBPII' の産生が少なくなり、また、グラム陰性菌においても失われる PBP 画分が認められる<sup>13)</sup>という報告がある。

このような FOM の作用機作により、各種抗菌薬の菌体内への取り込みが高められ殺菌力の増強が認められたものと推察される。

今回我々の実験において、FOMの作用濃度を増加させると、OFLX、NFLXともに併用効果が増強することから、濃度依存的な併用効果を示すことがわかった。また、このFOMの前処理効果は、FOMを除いた後短時間(1時間以内)に減弱することがわかった。さらに、これらの併用効果と*P. aeruginosa*に対するFOMとOFLXの感受性との相関関係は、認められなかった。

一方、*P. aeruginosa*の菌体表層の疎水性におよぼす抗菌剤の影響に関し、Godfrey A Jら<sup>14)</sup>は、6-APAの作用を調べた結果、増殖培養系において変化を認めている。我々は、菌体表層の疎水性におよぼすFOMの影響について検討し、FOMを併用効果の認められる濃度を1時間以上作用させると菌体表層を疎水性に傾けることがわかった。

グラム陰性菌は、外膜の薬剤透過性が低く疎水性経路が存在しない<sup>13,15)</sup>といわれており、一方、*P. aeruginosa*は培地中のリン酸の影響により、Porin蛋白であるProtein Pを誘導する<sup>16)</sup>ことがいわれている。また、疎水性抗菌剤に感受性を有するグラム陰性菌の外膜は、糖鎖の短いLPSを持つ<sup>16)</sup>ことが報告されている。

このようなことから、FOMが外膜蛋白やLPSに対して影響を与えていることが考えられ、今後検討していくことが必要である。

#### 文 献

- 1) 水間良祐: 緑膿菌に対する抗生物質の併用療法に関する基礎的研究(第3報) —  $\beta$ -lactam薬と新キノロン薬について —。Chemotherapy 40: 1188~1199, 1992
- 2) 那須 勝, 山崎 透: 緑膿菌ムコイド株・非ムコイド株の粘膜付着性と病原性。日本臨床 49: 2239~2243, 1991
- 3) 陣 瑞明, 菊池典雄, 村木憲子, 渡辺昌平, 高橋公毅, 菅野重治: 臨床新鮮分離緑膿菌に対する Tobramycin,  $\beta$ -lactam系抗菌剤および Fosfomycin 3剤併用の相乗効果の検討。Chemotherapy 34: 294~301, 1986
- 4) 林 泉, 大沼菊夫, 庭田 寧, 平井敬二, 鈴木清

吾, 入倉 勉: 呼吸器科領域における Norfloxacin と Fosfomycin との併用について。感染症学雑誌, 61: 1382~1394, 1987

- 5) 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
- 6) Hirai K, Aoyama H, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mituhashi S: Isolation and Characterization of Norfloxacin-Resistant Mutants of *Escherichia coli* K-12. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 30: 248~253, 1986
- 7) 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: 889~902, 1987
- 8) de Jough C A, Joshi J H, Newman K A, Moody M R, Wharton R, Standiford H C, Schimpff S C: Antibiotic synergism and response in gram-negative bacteremia in granulocytopenic cancer patients. Am J Med 80 (Suppl 5 C): 96~100, 1986
- 9) Hilf M, Yu V L, Sharp J, Zuravleff J, Korvick J A, Murder R R: Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: Outcome correlations in a prospective study of 200 patients. Am J Med 87: 540~546, 1989
- 10) 菅野治重: 緑膿菌および緑膿菌感染症(併用)。緑膿菌 — その基礎と臨床 —, 188~195, 1993
- 11) 青山 博, 保坂雅喜, 庭田 寧, 平井敬二, 林 泉: 緑膿菌に対する norfloxacin と fosfomycin の併用効果発現について Chemotherapy 39: 366, 1991
- 12) 山口明人, 澤井哲夫: 抗生物質の細菌細胞膜透過機構。ファルマシア: 867~871, 1992
- 13) 横田 健: 新しい抗生物質の使い方 — その基礎理論 —。ライフサイエンス, 87~89, 1992
- 14) Godfrey A J, Bryan L E: Cell Surface Changes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO 4069 in Response to Treatment with 6-Aminopenicillanic Acid. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33: 1435~1442, 1989
- 15) 中江太治: ポーリンと抗生剤の膜透過。代謝, 791~799, 1986
- 16) 中江太治: 外膜透過性と薬剤対性。緑膿菌 — その基礎と臨床 —, 44~52, 1993

Influence of fosfomycin on the bactericidal activity of various antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*

Yumiko Kanno, Toshihiko Takata, Toshie Sugano, Takashi Yoshida  
Meiji Seika Kaisha, Ltd., Pharmaceutical Research Center, 760 Morooka-cho,  
Kohoku-ku, Yokohama 222, Japan

We examined *in vitro* the synergistic effect of fosfomycin (FOM) and other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* under various conditions. The results were as follows.

- 1) In combination with FOM and other antibiotics, the bactericidal activities against *P. aeruginosa* pretreated with sub MIC of FOM were greater than those of non-pretreated bacteria, and these synergistic effects increased with increasing concentrations of sub-MIC of FOM.
- 2) In FOM and other antibiotic combinations, good synergism was found when an antibiotic was added for less than 1 hours after the removal of FOM for the pretreatment of cells. No apparent synergism was observed when the antibiotic was added for more than 1 hour later after FOM was removed.
- 3) We did not observe a correlation between these synergistic bactericidal effects and the antipseudomonal susceptibilities of each antibiotic.
- 4) In the test strains that revealed synergistic effects the cell surface of *P. aeruginosa* became more hydrophobic than without FOM treatment.
- 5) The combination of FOM and ofloxacin (OFLX) induced lysis at higher frequencies than that either FOM or OFLX alone according to morphological observation by scanning electron microscope.