

Methicillin 耐性黄色ブドウ球菌に対する Vancomycin と他の抗菌剤との併用効果

高橋 公毅・菅野 治重

千葉大学医学部附属病院検査部

陳 瑞 明

千葉大学医学部肺癌研究施設内科

(昭和61年3月27日受付)

Vancomycin (VCM)+Minocycline (MINO), VCM+Rifampicin (RFP), VCM+Cefamandole (CMD) および VCM+Cloxacillin (MCIPC) の併用効果を臨床材料より分離した Methicillin 耐性黄色ブドウ球菌を用い微量液体希釈法により検討した。相乗作用 (FIC index \leq 0.5) は, VCM+MINO で 5.9%, VCM+RFP で 0%, VCM+CMD で 84.0%, VCM+MCIPC で 14.4% であり, VCM+CMD の組み合わせは, 他の組み合わせより優れていた。また VCM+CMD の組み合わせは, 殺菌曲線でも著しい相乗効果を示し, 重症な Methicillin 耐性黄色ブドウ球菌感染症に対する臨床的有用性がうかがわれた。

最近, Methicillin 耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対する感染症が増加し, 臨床問題になっている¹⁾。また千葉大学医学部附属病院での MRSA の分離率も年々増加傾向を示している²⁾。VCM は MRSA に優れた抗菌剤であるが³⁾, 臨床で用いる場合, 副作用の点で大量に投与することができない⁴⁾。VCM の使用量を減らし, 副作用をできるだけ軽減し, MRSA に対する抗菌力を増強させるためにも, 他の抗菌剤との併用が望まれる。それ故, 使用薬剤の作用機作を考慮して, MRSA に対して比較的 MIC の低い MINO⁵⁻⁷⁾, RFP^{8,7)}, CMD⁹⁾ および MCIPC⁹⁾ を用い, VCM との併用効果を検討したので, その成績を報告する。

I. 実験材料と実験方法

1. 使用薬剤

VCM と CMD は塩野義製薬から, FOM は明治製菓, MINO は日本レダリー, MCIPC は藤沢薬品から提供を受けた純末を適宜溶解して用いた。

2. 使用菌株

千葉大学医学部附属病院検査部で臨床材料から分離した MRSA [Methicillin に対する MIC が $>4 \mu\text{g/ml}$ ⁹⁾] 9 株を用いた。ただし, VCM と MINO の併用の場合は, 69 株中 2 株は単剤または両剤の Minimal inhibitory concentration (MIC) が Checkerboard 外にはずい併用効果が判定できなかった。

3. 相乗作用

MRSA に対する VCM, MINO, RFP, CMD および

MCIPC の MIC の測定および *in vitro* での併用効果は, Ca²⁺, Mg²⁺ 加 Mueller-Hinton broth (Difco 社) を用い微量液体希釈法により検討した。濃度の設定は NCCLS⁹⁾ の感受性の基準に基づき, VCM, MINO, RFP, CMD および MCIPC はそれぞれ, 0.06~4.0 $\mu\text{g/ml}$, 0.125~8.0 $\mu\text{g/ml}$, 0.004~0.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.06~64.0 $\mu\text{g/ml}$, 0.008~8.0 $\mu\text{g/ml}$ の 2 段階希釈濃度とした。Table 1 に CMD と MINO の組み合わせ法を示した。斜線の部分は CMD および MINO の最終濃度が 2 $\mu\text{g/ml}$ および 1 $\mu\text{g/ml}$ になるように組み合わせたところを示す。VCM+MINO, VCM+RFP, VCM+CMD, VCM+MCIPC の上記の各々の濃度の組み合わせは Table 1 の方法に従ってプレートを作成しておき, 一夜培養菌を滅菌水で 10 倍に希釈し, 抗菌剤含有培地に接種(この際 0.1 ml の薬剤含有培地に約 5×10^4 個の接種菌量となる)し, 37°C, 48 時間培養後菌発育のみられぬ抗菌剤の最小濃度の組み合わせ点を求めた。併用効果の強さは, 併用による菌発育阻止点での Fractional inhibitory concentration (FIC) と FIC 係数 (FIC index) で表わし, 最も低い FIC index で代表させた^{10,11)}。FIC index が ≤ 0.5 を相乗作用, $0.5 < \text{FIC index} < 1.0$ を部分相乗作用, FIC index = 1.0 を相加作用, FIC index = 2 を不関, FIC index が > 2 を拮抗作用とした。FIC index が ≤ 0.5 の場合を有意義な相乗作用とした^{12,13)}。

4. 併用による経時的殺菌曲線

併用による経時的殺菌曲線には, 相乗作用 (FIC in-

Table 1 Combination method of CMD and MINO

		CMD											
		64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0
MINO	8												
	4												
	2												
	1												
	0.5												
	0.25												
	0.125												
	0												

The shadowed portion showed CMD and MINO final concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively when two drugs were combined.

Table 2 Comparison of fractional inhibitory concentration index (FIC index) in two-antibiotic combinations against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

FIC index	No. of strains (%)			
	Vancomycin-Minocycline	Vancomycin-Rifampicin	Vancomycin-Cefamandole	Vancomycin-Cloxacillin
3.0		2 (2.8)		
2.0	39 (58.2)	52 (75.3)		4 (5.7)
1.0	14 (20.8)	15 (21.7)		11 (15.9)
0.75	4		5	26
0.62	3 (14.9)		4 (15.9)	11 (63.7)
0.56	3		2	7
0.5	4 (5.9)		8	9 (14.4)
0.37			20	1
0.31			15 (84.0)	
0.28			11	
0.26			1	
0.25			3	
Range	0.5-2.0	1.0-3.0	0.25-0.75	0.37-2.0
Mean \pm S.D.	1.50 \pm 0.60	1.81 \pm 0.45	0.39 \pm 0.13	0.78 \pm 0.34

$P < 0.01$

$P < 0.01$

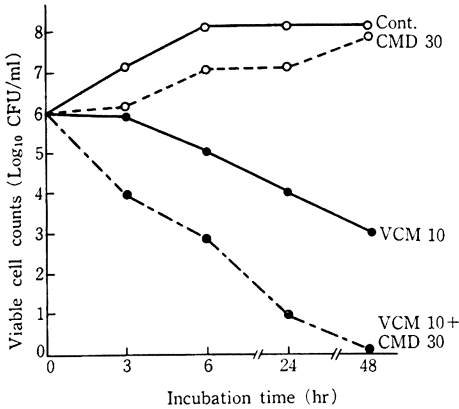
dex ≤ 0.5) を示した株から 6 株選んで用いた。MRSA No. 38, No. 46, No. 54, No. 63 および No. 66 株を Ca^{2+} , Mg^{2+} 加 Mueller-Hinton broth で一夜培養し, MRSA No. 38 株は a), c), f) の薬液に, MRSA No. 46 株は a)~c), e), f) の薬液に, MRSA No. 54 株は a), d), g) の薬液に, MRSA No. 63 株は a), b), e) の薬液に, MRSA No. 66 株は a), d), g) の薬液に, 菌の最終菌液が約 $10^6 \text{CFU}/\text{ml}$ になるように加えて, 37°C で培養し, 3 時間, 6 時間, 24 時間および 48 時間後に生菌数を測定した。殺菌曲線に用いた各薬剤の濃度は常用投与量で得られる平均血中濃度を用いた。薬剤を加えないものを対照とした。

- a) VCM 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- b) MINO 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- c) CMD 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- d) MCIPC 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- e) VCM 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + MINO 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- f) VCM 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + CMD 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- g) VCM 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + MCIPC 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$

II. 実験成績および考察

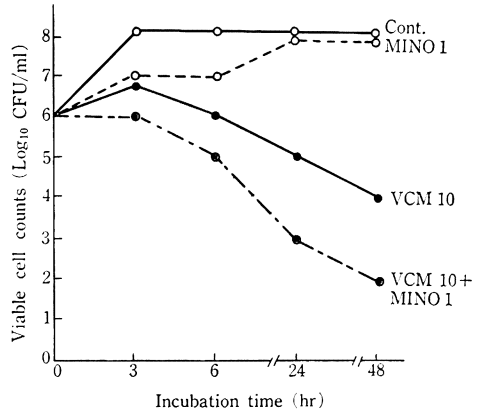
1. 微量液体 Checkerboard 法による併用効果
結果を Table 2 に示した。VCM + MINO の組み合わせで, 相乗作用は 4 株 (5.9%), 部分相乗作用は 10 株 (14.9%), 相加作用は 14 株 (20.8%), 不関は 39 株

Fig. 1 Bactericidal effect of VCM+CMD against MRSA No. 38 strain ($\mu\text{g/ml}$)



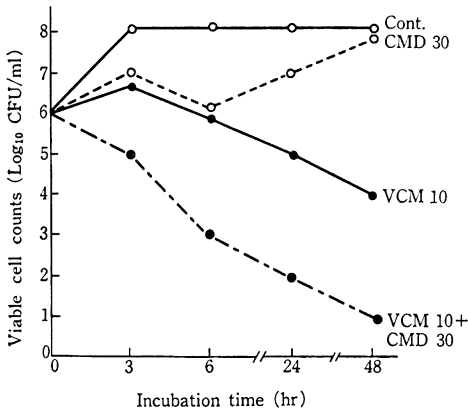
MIC: VCM 2 $\mu\text{g/ml}$, CMD 32 $\mu\text{g/ml}$
FIC index: 0.28

Fig. 3 Bactericidal effect of VCM+MINO against MRSA No. 46 strain ($\mu\text{g/ml}$)



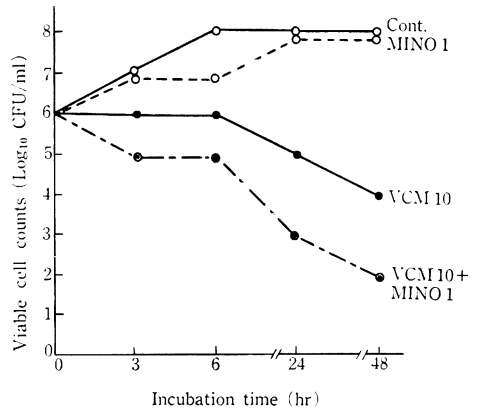
MIC: VCM 2 $\mu\text{g/ml}$, MINO 4 $\mu\text{g/ml}$
FIC index: 0.5

Fig. 2 Bactericidal effect of VCM+CMD against MRSA No. 46 strain ($\mu\text{g/ml}$)



MIC: VCM 2 $\mu\text{g/ml}$, CMD 32 $\mu\text{g/ml}$
FIC index: 0.37

Fig. 4 Bactericidal effect of VCM+MINO against MRSA No. 63 strain ($\mu\text{g/ml}$)



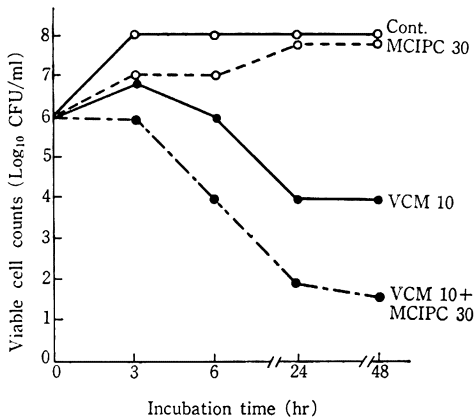
MIC: VCM 2 $\mu\text{g/ml}$, MINO 4 $\mu\text{g/ml}$
FIC index: 0.5

(58.2%)に認められた。VCM+RFPの組み合わせで、相加作用は15株(21.7%)、不関は52株(73.3%)、拮抗作用は2株(2.8%)に認められた。VCM+CMDの組み合わせでは、相乗作用の認められた株は58株(84.0%)、部分相乗作用は11株(15.9%)に認められた。VCM+MCIPCの組み合わせでは、相乗作用は10株(14.4%)、部分相乗作用は44株(63.7%)、相加作用は11株(15.9%)、不関は4株(5.7%)に認められた。VCM+MINO, VCM+RFP, VCM+CMDおよびVCM+MCIPCの平均FIC indexは、それぞれ1.50, 0.81, 0.39および0.78であった。

2. 併用による経時的殺菌曲線

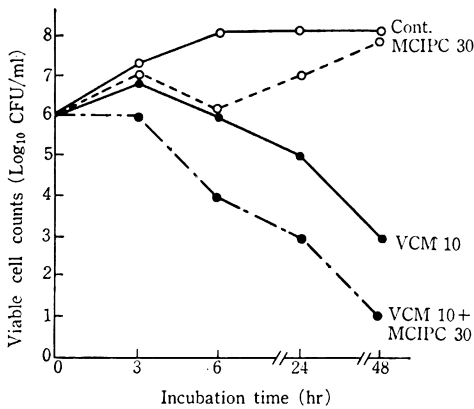
MRSA No. 38株およびNo. 46株に対するVCM+CMDの併用効果をFig. 1および2に示した。No. 38株およびNo. 46株に対するVCMおよびCMDのMICは、2 $\mu\text{g/ml}$ および32 $\mu\text{g/ml}$ であった。Fig. 1に示したように、No. 38株にVCM 10 $\mu\text{g/ml}$ とCMD 30 $\mu\text{g/ml}$ を併用させ3時間作用させると、はじめの接種菌量 10^6 CFU/mlから 10^1 /mlに減少し、24時間後には 10^1 /mlに、48時間後には菌培養不能(10^1 /ml以下)になった。Fig. 2から明らかのように、No. 46株にVCM 10 $\mu\text{g/ml}$ とCMD 30 $\mu\text{g/ml}$ を併用させ、6時間作用させると

Fig. 5 Bactericidal effect of VCM+MCIPC against MRSA No. 54 strain ($\mu\text{g/ml}$)



MIC : VCM 2 $\mu\text{g/ml}$, MCIPC 4 $\mu\text{g/ml}$
FIC index : 0.5

Fig. 6 Bactericidal effect of VCM+MCIPC against MRSA No. 66 strain ($\mu\text{g/ml}$)



MIC : VCM 2 $\mu\text{g/ml}$, MCIPC 4 $\mu\text{g/ml}$
FIC index : 0.5

はじめの接種菌量 10^6 CFU/ml から 10^3 /ml に減少し、24 時間後には 10^2 /ml に、48 時間後には 10^1 /ml にまで減少した。Fig. 3 および 4 に MRSA No. 46 株および No. 63 株に対する VCM+MINO の併用効果を示した。No. 46 株および No. 63 株に対する VCM および MINO の MIC は、2 $\mu\text{g/ml}$ および 4 $\mu\text{g/ml}$ であった。Fig. 3 に示したように、No. 46 株に VCM 10 $\mu\text{g/ml}$ と MINO 1 $\mu\text{g/ml}$ を併用させ、6 時間作用させるとはじめての接種菌量 10^6 CFU/ml から 10^5 /ml に減少し、24 時間後には 10^3 /ml に、48 時間後には 10^2 /ml まで減少した。Fig. 4 から明らかのように、No. 63 株に VCM

10 $\mu\text{g/ml}$ と MINO 1 $\mu\text{g/ml}$ を併用させ、3 時間および 6 時間作用させると、はじめの接種菌量 10^6 CFU/ml から 10^5 /ml に減少し、24 時間後には 10^3 /ml に、48 時間後には 10^2 /ml まで減少した。MRSA No. 54 株および No. 66 株に対する VCM+MCIPC の併用効果を Fig. 5 および 6 に示した。No. 54 株および No. 66 株に対する VCM および MCIPC の MIC は、2 $\mu\text{g/ml}$ および 4 $\mu\text{g/ml}$ であった。Fig. 5 に示したように、No. 54 株に VCM 10 $\mu\text{g/ml}$ と MCIPC 30 $\mu\text{g/ml}$ を併用させ、6 時間作用させると、はじめの接種菌量 10^6 CFU/ml から 10^4 /ml に減少し、24 時間および 48 時間後には約 10^2 /ml に減少した。Fig. 6 から明らかのように、No. 66 株に VCM 10 $\mu\text{g/ml}$ と MCIPC 30 $\mu\text{g/ml}$ を併用させ、6 時間作用させると、はじめの接種菌量 10^6 CFU/ml から 10^4 /ml に減少し、24 時間後には 10^3 /ml に、48 時間後には 10^1 /ml にまで減少した。

今回我々は千葉大学医学部附属病院検査部で臨床材料から分離した MRSA を用いて、VCM+MINO, VCM+RFP, VCM+CMD および VCM+MCIPC の併用効果について検討した。VCM+RFP の併用効果については、いままでに幾つかの論文が報告されているが、それらの結果は研究者によって異なっている。例えば、WATANAKUNAKORN らは、VCM+RFP の併用で、供試した MRSA 50 株中 43 株に拮抗作用が認められたと報告している¹⁴⁾。FOLDES らは相乗作用も拮抗作用も認められなかったと報告し¹⁵⁾、VARALDO らは、供試 24 株中大多数の MRSA に対して不関を示し、2 株に相乗作用が認められ、拮抗作用は認められなかったと報告している¹⁶⁾。TUAZON と MILLER は、VCM+RFP の併用で供試菌の 12.1% に相乗作用が認められたと報告している¹⁷⁾。今回の実験で、我々は VCM+RFP の組み合わせで、供試 69 株中 52 株に不関を示し、2 株 (2.8%) に拮抗作用を認めた。相乗作用は認められなかった。拮抗作用を示した株は、69 株中 2 株とわずかであったが、増加すれば治療上大きな問題となることが予想される。今後拮抗作用を示す MRSA が増加するかどうかその推移を見守っていく必要があると思われる。日本ではまだ VCM の治療例が少ない。それ故、一日も早く VCM の効果的な使用法の確立が望まれる。

今回我々は、VCM+CMD の組み合わせで、供試菌株 69 株の 84.0% と著しい相乗作用が認められた。EIN らは、同じ薬剤の併用で Methicillin 耐性表皮ブドウ球菌 14 株の全株に相乗作用が認められたと報告している¹⁸⁾。

この実験で、我々は VCM に蛋白合成阻害剤である MINO または RFP の併用と VCM に細胞壁合成阻害

剤である CMD または MCIPC の併用を行なったが、VCM に MINO または RFP を組み合わせた時の平均 FIC index は、それぞれ 1.50 と 1.81 で、VCM と MINO の組み合わせの FIC index の方が低い値を示し、明らかに両者間に有意の差が認められた。VCM に細胞壁合成阻害剤である CMD または MCIPC を組み合わせた場合、VCM+CMD の平均 FIC index は 0.39、VCM+MCIPC の平均 FIC index は 0.78 で、VCM と CMD の組み合わせの FIC index の方が低い値を示し、明らかに両者間に有意の差が認められた。また VCM に蛋白合成阻害剤 (MINO または RFP) を併用した場合と VCM に細胞壁合成阻害剤 (CMD または MCIPC) を併用した場合を比較すると、明らかに VCM と細胞壁合成阻害剤の組み合わせの方に著しい併用効果が認められた。今回我々が行なった VCM+MINO、VCM+RFP、VCM+CMD、VCM+MCIPC の組み合わせのうち、明らかに VCM+CMD の組み合わせで著しい相乗作用のあることが、FIC index および殺菌曲線で証明された。HIRSCHL らは、MRSA は *in vitro* では CMD に対して感受性であったが、*in vivo* では臨床的効果がなかった。それ故、MRSA 感染症の治療に CMD を用いる場合には他の薬剤と併用すべきだと示唆している⁹⁾。我々は、緑膿菌呼吸器感染症に対する Tobramycin, Cefsulodin, Fosfomycin 3 剤の併用療法の研究において¹⁰⁾ *in vitro* での FIC index と臨床効果には相関が認められたので、VCM+CMD の併用は臨床に用いてみる価値があると思われる。

文 献

- 1) WENZEL, R. P.: The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann. Intern. Med. 97: 440~442, 1982
- 2) 菅野治重: 耐性菌の疫学的検索—千葉大学附属病院における薬剤耐性菌の疫学的検索—。臨床と微生物 13: 141~153, 1986
- 3) SORRELL, T. C.; D. R. PACKHAM, S. SHANKER, M. FOLDES & R. MUNRO: Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann. Intern. Med. 97: 344~350, 1982
- 4) FEKETY, R.: Vancomycin. Med. Clin. N. Am. 66: 175~181, 1982
- 5) MINUTH, J. N.; T. M. HOLMES & D. M. MUSHER: Activity of tetracycline, doxycycline and minocycline against methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococci*. Antimicrob. Agents Chemother. 6: 411~414, 1974
- 6) 菅野治重: 千葉大学附属病院における MRSA の検出状況、院内感染とその対策を考える。東八幡平シンポジウム (川名林治編), 55~73, 1985
- 7) 菅野治重, 寺尾 清: Methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* とその流行。千葉医学雑誌 59: 1~6, 1983
- 8) HIRSCHL, A.; G. STANEK & M. ROTTER: Effectiveness of cefamandole against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus in vitro* and in experimental infections. J. Antimicrob. Chemother. 13: 429~435, 1984
- 9) National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS Proposed Standard: PSM-7. Standard methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria which grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 1980
- 10) 高橋公毅, 菅野治重: 緑膿菌に対するピペラシリン・セフォペラゾン・セフスロジン・ホスホマイシン・トブラマイシン合併による併用効果。Chemotherapy 32: 966~971, 1984
- 11) ELION, G. B.; S. SINGER & G. H. HICHINGS: Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combination of biochemically related antimetabolites. J. Biol. Chem. 208: 477~488, 1954
- 12) PARSLEY, T. L.; R. B. PROVONCHEE, C. GLICKSMAN & S. H. ZINNER: Synergistic activity of trimethoprim and amikacin against gram-negative bacilli. Antimicrob. Agents Chemother. 12: 349~352, 1977
- 13) BUSCH, D. F.; V. L. SUTLER & S. M. FINEGOLD: Activity of combination of antimicrobial agents against *Bacteroides fragilis*. J. Infect. Dis. 133: 321~328, 1976
- 14) WATANAKUNAKORN, C. & J. C. GUERRIERO: Interaction between vancomycin and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 1089~1091, 1981
- 15) FOLDES, M.; R. MUNRO, T. C. SORRELL, S. SHANKER & M. TOOHEY: *In-vitro* effects of vancomycin, rifampicin, and fusidic acid, alone and in combination, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 11: 21~26, 1983
- 16) VARALDO, P. E.; E. DEBBIA & G. C. SCHITO: *In vitro* effects of vancomycin and rifampicin, alone and combination, against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococci*. J. Antimicrob. Chemother. 14: S 35~S 41, 1984
- 17) TUAZON, C. V. & H. MILLER: Comparative *in vitro* activities of teichomycin and vancomycin alone and in combination with rifampicin and aminoglycosides against *Staphylococci* and *Enterococci*. Antimicrob. Agents Chemother. 25: 411~412, 1984
- 18) EIN, M. E.; N. J. SMITH, J. F. ARUFFO, M. S. HEEREMA, M. W. BRADSHAW & T. W. WILLIAMS, JR.: Susceptibility and synergy studies of

methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 16: 655~659, 1979

19) 陳 瑞明, 菊池典雄, 村木典子, 長尾啓一, 渡辺

昌平, 高橋公毅, 菅野治重: 緑膿菌呼吸器感染症に対する Tobramycin, Cefsulodin, Fosfomycin 三剤の併用療法—FIC index と治療効果について。Chemotherapy 34: 688~704, 1986

EFFECTS OF COMBINATIONS OF VANCOMYCIN WITH OTHER ANTIBIOTICS AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

KOHKI TAKAHASHI and HARUSHIGE KANNO

Department of Laboratory Medicine, Chiba University Hospital, Chiba

RUEY-MEI CHEN

Department of Chest Medicine, Institute of Pulmonary Cancer Research, School of Medicine, Chiba University, Chiba

The effects of antibiotic combinations against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) frequently found in hospitalized patients were investigated. By means of the microtiter broth dilution checkerboard method, the combinations of VCM+MINO, VCM+RFP, VCM+CMD, and VCM+MCIPC were synergistic against 5.9%, 0%, 84.0% and 14.4% of the strains tested. The mean fractional inhibitory concentration indices of VCM+MINO, VCM+RFP, VCM+CMD, and VCM+MCIPC were 1.50, 1.81, 0.39 and 0.78, respectively. The effect of combination of VCM+CMD was superior to those of VCM+MINO, VCM+RFP, and VCM+MCIPC. In the time-killing curve studies, the combination of VCM+CMD also showed bactericidal effect against the selected strains of MRSA tested. This combination therapy may be useful for severe MRSA infections.