

Staphylococcus aureus に対する cefpiramide と cefotetan の併用効果

渡邊 正人・三橋 進
エビゾーム研究所*

井上 松久
群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

(昭和 63 年 10 月 21 日受付)

Methicillin 感受性 (MSSA) および耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) に対する cefpiramide (CPM) と cefotetan (CTT) の *in vitro* 併用効果を検討した。Checkerboard dilution method による併用効果の検討では、両剤は中等度耐性、高度耐性 MRSA に対して良好な相乗効果を示し、殺菌曲線における検討でも相乗的に作用した。さらに CPM, CTT 両剤の存在下で生育した菌は autolysis しやすいことが認められ、これらが相乗効果を示す原因と考えられた。

Key words : MRSA, 併用効果, Cefpiramide, Cefotetan

近年, methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) による感染症が増加し, 院内感染を含め臨床問題となっている^{1,2)}。Cephalosporin 系抗生物質である cefpiramide (CPM) は, いわゆる第 3 世代セフェム剤の中でも *S. aureus* を含めたグラム陽性菌, および *Pseudomonas aeruginosa* を含めたグラム陰性細菌に幅広い抗菌活性を示すことが知られる³⁾。また, cephamycin 系抗生物質である cefotetan (CTT) は *S. aureus* に対する抗菌力は弱い, グラム陰性菌に抗菌活性を示し各種 β -lactamase に対して極めて安定であることが知られる⁴⁾。両剤は体内動態が優れ, ヒトでの血中半減期が CPM は約 4.5 時間, CTT は約 3 時間と持続的に働く^{5,6)}。一般に感染症に有効な薬剤の選択にはまず抗菌力が重視されるが, 臨床上の有効性は薬剤の病巣への移行性と持続性に大きく左右されることも知られている。そこで我々は penicillin-binding proteins (PBPs) に対する親和性様式が異なりかつ, 代表的血中半減期の長い β -lactam 剤である両剤の併用の可能性を考え, まず *in vitro* での methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA), MRSA に対する併用効果を検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 菌株

1985~1986 年に分離された当実験施設保存の臨床分離 MRSA および対照として MSSA である MS 353 株および penicillinase 産生プラスミド pMS 96 を用い

た。

2. 薬剤

Cefpiramide (CPM, 住友製薬), cefotetan (CTT, 山之内製薬), methicillin (DMPPC, 万有製薬), cefotaxime (CTX, 中外製薬) を使用した。

3. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

MIC の測定はブローチ希釈法で行なった。Sensitivity test broth (STB, ニッスイ) で 37°C 一夜静置培養した菌液を同培地を用いて希釈し, 薬剤含有 STB に約 10^5 CFU/ml になるように接種した。37°C, 18 時間培養後, 肉眼で菌の発育の見られない最小濃度を MIC とした。

4. 併用効果の判定

併用効果は checkerboard dilution method により検討し⁷⁾ fractional inhibitory concentration (FIC) index を次式によって求め, 判定基準は以下のようにした。FIC index =

$$\frac{\text{併用時の CPM の MIC}}{\text{単独時の CPM の MIC}} + \frac{\text{併用時の CTT の MIC}}{\text{単独時の CTT の MIC}}$$

FIC index ≤ 0.5 相乗

$0.5 < \text{FIC index} \leq 1.0$ 相加

$1.0 < \text{FIC index} \leq 2.0$ 無関係

$2.0 < \text{FIC index}$ 拮抗

5. 殺菌曲線に及ぼす影響

STB を用いて 37°C 終夜培養した被検菌を 10^4 CFU/ml になるように STB に接種し, 37°C 2 時間培養後, 薬剤を作用させ経時的に生菌数を測定した。薬剤濃度は

* 群馬県富士見村小暮 2220

最小 FIC index を与える濃度を用いた。

6. Autolysis に及ぼす影響

QURONFLEH et al. の方法に準じて行なった⁶⁾。すなわち一定濃度の薬剤を含有する STB で 37°C 24 時間培養した菌液を、10 mM phosphate buffer (pH 7.0) で 1 回集菌洗浄後、同バッファーに懸濁し、O. D. 600 nm (optical density) が約 0.5 になるように調整後 BIOSCREEN C (Labsystems, JAPAN) を用いて O. D. を経時的に計測し菌の autolysis を観察した。薬剤は最小 FIC

index 近傍で菌の生育の観察された濃度、すなわち MS 16005 株には CPM, CTT とともに 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC), 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (1/8 MIC) 各濃度の薬剤を、MS 16009 株には CPM 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (1/32 MIC), 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC), CTT 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (1/32 MIC), 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC) 各濃度の薬剤を単剤および併用で作用させた。

II. 実験結果

1. CPM と CTT の併用効果

Table 1. Antibacterial activity of CPM, CTT and other cephalosporins against methicillin-susceptible and -resistant *S. aureus*

Organism	PCase ^a	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^b			
		CPM	CTT	DMPPC	CTX
MS353	-	0.39	3.13	0.78	0.78
MS353/pMS96	+	0.78	6.25	0.78	0.78
MS16015	-	6.25	12.5	25	25
MS16094	-	3.13	25	25	25
MS16005	+	25	25	50	200
MS16006	+	12.5	50	100	50
MS16022	+	25	25	50	200
MS16058	-	100	200	800	800
MS16088	-	200	800	1,600	1,600
MS16009	+	50	100	800	800
MS16050	+	100	400	1,600	1,600
MS16052	+	100	400	1,600	1,600

^a: penicillinase production.

^b: determined by broth dilution method.

Table 2. Effect of combination of CPM with CTT against methicillin-susceptible and -resistant *S. aureus*

Organism	Minimal FIC index ^a	Conc. ($\mu\text{g/ml}$) (CPM : CTT)
MS353	0.500	(0.10 : 0.78)
MS353/pMS96	0.375	(0.20 : 0.39)
MS16015	0.375	(1.56 : 1.56)
MS16094	0.281	(0.78 : 0.78)
MS16005	0.375	(6.25 : 3.13)
MS16006	0.375	(3.13 : 6.25)
MS16022	0.313	(1.56 : 6.25), (6.25 : 1.56)
MS16058	0.250	(12.5 : 25)
MS16088	0.500	(200 : 50)
MS16009	0.188	(6.25 : 6.25)
MS16050	0.266	(25 : 6.25)
MS16052	0.266	(25 : 6.25)

^a: determined by checkerboard dilution method.

MSSA の代表として MS 353 株および penicillinase (PCase) 産生プラスミドを保有する MS 353/pMS 96 を用いた。MRSA は DMPPC の MIC が 6.25~400 $\mu\text{g/ml}$ のものを中等度耐性, DMPPC の MIC が ≥ 400 $\mu\text{g/ml}$ のものを高度耐性と分類し, それぞれ 5 株ずつ使用した。PCase の確認はニトロセフィン (Glaxo) を用いて確認した。これらの菌株に対する CPM, CTT, DMPPC, CTX の MIC を Table 1 に示し, 各株の最小 FIC index とそのときの CPM, CTT の濃度を Table 2 に示した。

MSSA である MS 353, および PCase 産生菌 MS 353/pMS 96 に対する CPM と CTT の FIC index は, それぞれ 0.5, 0.375 と相乗効果を示した。CPM および CTT の中等度耐性 MRSA に対する FIC index は 0.281~0.375, 高度耐性 MRSA に対する FIC index は 0.188~0.500 といずれも良好な相乗効果を示した。中等度耐性, 高度耐性 MRSA において, 両薬剤間で拮抗作用は観察されず, また PCase の有無による FIC index の顕著な差も認められなかった。

2. 殺菌曲線に及ぼす影響

中等度耐性 PCase 産生 MRSA である MS 16005 株, および高度耐性 PCase 産生 MRSA の MS 16009 株に対する CPM, CTT の checkerboard の結果を Fig. 1 に示した。これら両株に対する CPM, CTT 併用時の殺菌力を経時的に検討した (Fig. 2)。

MS 16005 株に CTT 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (1/8 MIC) 単独で作用させた時には, 菌の減少は認められなかったが, CPM 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (1/4 MIC) に CTT 3.13 $\mu\text{g/ml}$ を

同時に作用するとより速やかに殺菌が起こった。MS 16009 株に CPM を 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (1/8 MIC) 単独で, あるいは CTT 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC) 単独でそれぞれ作用させたときには菌の減少は観察されなかったが, 両剤を同時に併用することにより菌の減少が観察された。

3. Autolysis の観察

材料および方法に記載した方法により, MS 16005 株, MS 16009 株に CPM, CTT を作用させたときの autolysis を観察した (Fig. 3)。MS 16005 株に CPM を単独で 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC), 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (1/8 MIC) 作用させたときには, コントロールとほぼ同程度の速さで溶菌した。CTT を単独で 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC) 作用させたときにはコントロールよりも約 2 倍程度速く溶菌し, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (1/8 MIC) 作用させたときには約 3 倍程度速く溶菌した。CPM と CTT をそれぞれの濃度で併用したときには, CTT の濃度に依存し CTT 単独で作用させたときと同程度の速さで溶菌した。

また, MS 16009 株に CPM を 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (1/32 MIC), 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC) 単独で作用させたときには, コントロールと同程度の速さで溶菌した。CTT 単独で 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (1/32 MIC), 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (1/16 MIC) 作用させたときにはコントロールよりも約 2 倍程度速く溶菌した。CPM と CTT をそれぞれの濃度で併用すると, CTT 単独で作用させたときと同程度の速さで溶菌した。

以上のように, CPM, CTT 併用時には MS 16005, MS 16009 両株において autolysis しやすくなることが見いだされた。

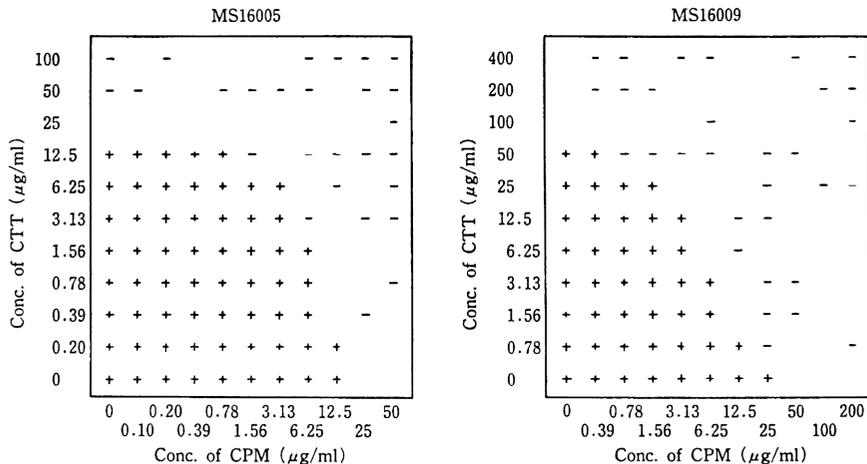


Fig. 1. Combination effect of CPM and CTT against methicillin-resistant *S. aureus* (checkerboard dilution method)

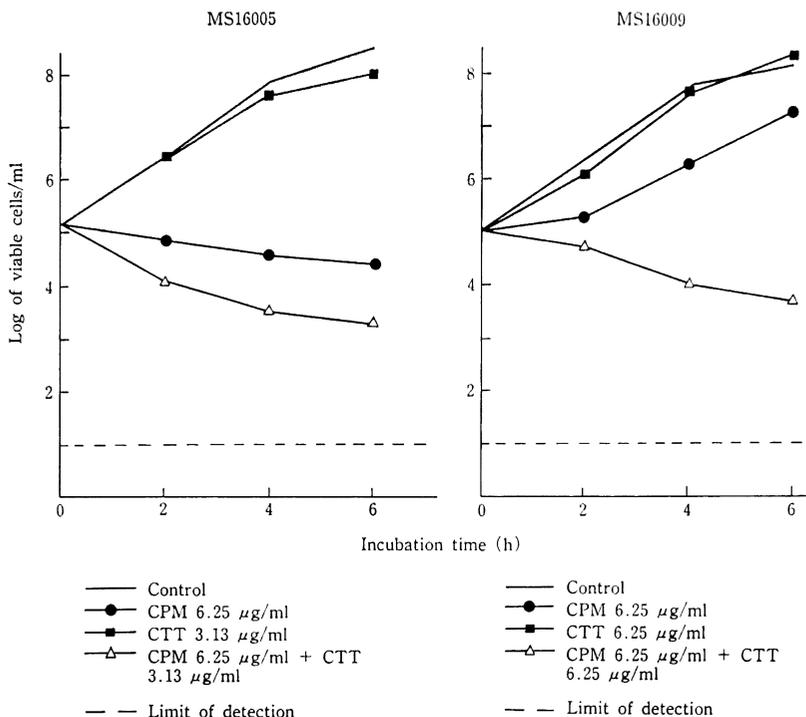


Fig. 2. Bactericidal activity of CPM in combination with CTT against methicillin-resistant *S. aureus*

III. 考 察

MRSA は感受性株ではなく、 β -lactam 剤に親和性の低い、新しいペニシリン結合蛋白質 (PBP-2') を産生しているために耐性化していると考えられており^{9,10}、この PBP は種々の条件で培養することにより誘導的に産生されることが明らかにされている¹¹。この MRSA に対する β -lactam 剤との併用に関する臨床的あるいは実験的報告が数多く報告されている¹²⁻¹⁴。今回我々は体内動態の優れた cephalosporin 系抗生物質である CPM と cephamycin 系抗生物質である CTT の併用効果を検討した。

CPM と CTT の併用は、MSSA、中等度耐性 MRSA、高度耐性 MRSA いずれにおいても良好な相乗効果を示し、殺菌作用の効果においてもそれが観察された (Table 2, Fig. 2)。

この CPM と CTT の相乗効果は、MSSA においても見いだされたことから PBP-2' 以外の作用点がなんらかのかたちで関与していると考えられる。*Escherichia coli* における β -lactam 剤の併用の研究では、異なる致死ターゲット PBP に同時に作用することにより、殺菌力、溶菌力が増強されることが知られており^{15,16}、CPM と CTT の併用時にもこのような作用が *S. aureus* の

PBPs に対して起っている可能性が考えられる。MRSA に対する相乗効果についても、この MSSA でのメカニズムが関与していることが考えられるが、この他に MRSA の耐性に大きく寄与すると考えられている PBP-2' に対して CPM と CTT がどのように作用しているか、さらには CPM の MRSA に対する短時間での作用をみると sub-MIC 濃度でも殺菌的に作用すること (未発表データ)、*S. aureus* の産生する PCase との両剤の酵素学的な相互作用、PCase の発現に及ぼす影響等の諸影響が、どのように両剤の相乗効果に関与しているのかについて、今後さらに詳細な検討が必要であると考えている。

また、両剤併用時に生育した菌の autolysis を観察したところ、コントロールに比べ菌が溶菌しやすくなっていることが判明した (Fig. 3)。

QURONFLEH 等は MRSA に対して DMPPC が autolysis しやすく作用するのは PBP-4 の阻害により 2 次的架橋構築が阻害されることによることを示唆しているが⁹、種々の条件が autolysis に影響を与えることも報告されている¹¹。CPM と CTT の併用時に生育した菌を被検菌として MIC を測定すると、autolysis の起りやすい条件で生育した場合は、薬剤を作用させていない場合

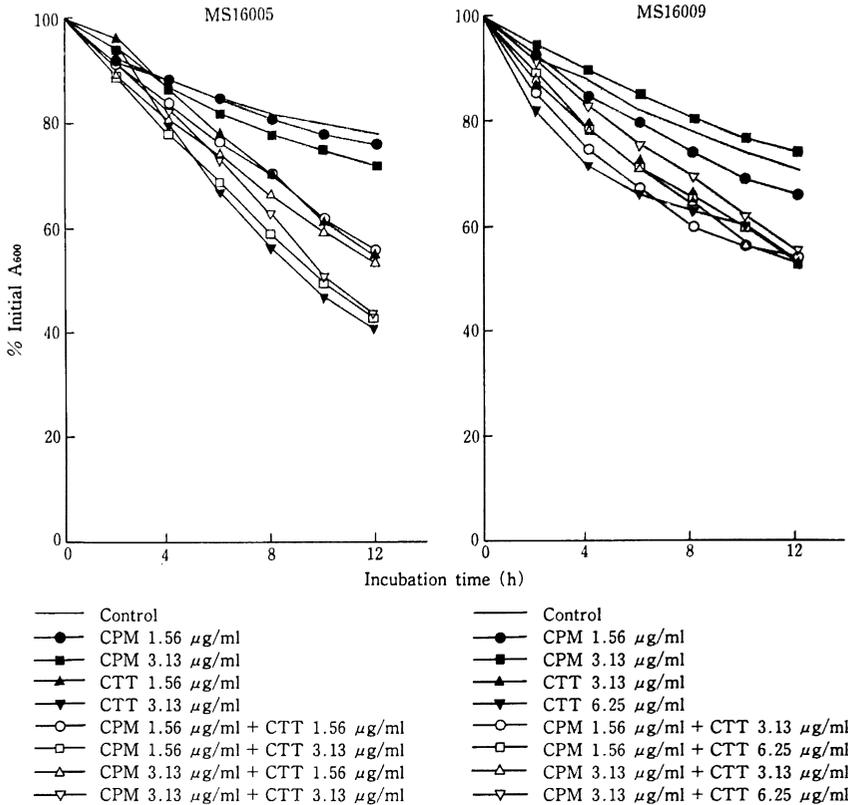


Fig. 3. Autolysis of methicillin-resistant *S. aureus* in the presence of CPM and CTT

に比べて CPM の MIC 値が低下していたこと (未発表データ) から, 両剤の併用によりもたらされる autolysis しやすくなる現象は MRSA の感受性化を引き起しており, 上述した PBP-4 の阻害の関与の可能性を含め今後の検討が必要であると考えている。

当報告において CPM と CTT が *in vitro* で MRSA に対して相乗効果を見出すことを示した。MRSA は条件により PBP-2' の誘導の度合いが異なるためすぐに臨床での有用性を予測できないが, MRSA においても血中半減期, 組織移行性が良好な場合には *in vitro* で予想される以上の効果が *in vivo* で得られることが報告されていること¹⁷⁾や, また *in vitro* で相乗効果が得られても *in vivo* で相乗効果が現われるのに必要な濃度を十分に維持できない薬剤が多い中で, 両剤の併用はその優れた体内動態からこの条件を最も良く満たす β -lactam 剤の組合せであると考えられること等から, 両剤併用の臨床での有用性が期待される。

文 献

- 1) BARBER M: Methicillin-resistant Staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 14: 385~393, 1961
- 2) 島田 馨, 安達桂子, 田中喜久子, 上条仁子, 佐

々木宗男, 畠山 勤, 稲松孝思, 浦山京子: セフェムを含む多剤耐性黄色ブドウ球菌の分離状況と 41 抗生剤に対する感受性. *Chemotherapy* 31: 835~841, 1983

- 3) 加藤益弘, 深沢万左友, 井上松久, 三橋 進: Cefpiramide (SM-1652) の細菌学的検討. *Chemotherapy* 31(S-1): 1~13, 1983
- 4) TODA M, SAITO T, YANO K, SUZAKI K, SAITO M, MITSUHASHI M: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of YM-09330, a new cephamycin derivative. In: *Current chemotherapy and infectious diseases* (Nelson L D and Grassi C. eds.), 1: 208-281, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1980
- 5) 中川圭一, 小山 優, 松井秀文, 池田智恵子, 矢野邦一郎, 中津留直樹, 吉長孝二, 野口隆志: Cefpiramide (SM-1652) の健康成人における体内動態. *Chemotherapy* 31(S-1): 144~157, 1983
- 6) NAKAGAWA K, KOYAMA M, TACHIBANA A, KOMIYA M, KIKUCHI Y, YANO K: Pharmacokinetics of cefotetan (YM-09330) in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 935~941, 1982

- 7) ELION G B, SINGER S, HICHINGS G H : Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combination of biochemically related antimetabolites. *J. Biol. Chem.* 208 : 477~488, 1954
- 8) QURONFLEH M W, WILKINSON B L : Effects of growth of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* in the presence of β -lactams on peptidoglycan structure and susceptibility to lytic enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29 : 250~257, 1986
- 9) UBUKATA K, YAMASHITA N, KONNO M : Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 : 851~857, 1985
- 10) UTSUI Y, YOKOTA T : Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28 : 397~403, 1985
- 11) MADIRAJU M V V S, BRUNNER D P, WILKINSON B J : Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 : 1727~1733, 1986
- 12) ALVAREZ S, JONES M, BERK S L : *In vitro* activity of fosfomicin alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28 : 689~690, 1985
- 13) 高橋公毅, 菅野治重, 陳 瑞明 : 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。 *Chemotherapy* 34 : 847~852, 1987
- 14) 横田好子, 池田文昭, 西田 実, 岩井芳美, 松本哲, 峰 靖弘 : メチシリン耐性の *Staphylococcus aureus* に対する cefazolin の *in vitro* 抗菌力と *in vivo* 効果 II. 各種抗生剤との併用効果。 *Chemotherapy* 35 : 77~82, 1987
- 15) GUTMANN L, VINCENT S, BILLOT-KLEN D, ACAR J F, MRENA E, WILLIAMSON R : Involvement of penicillin-binding protein 2 with other penicillin-binding proteins in lysis of *Escherichia coli* by some β -lactam antibiotics alone and in synergistic lytic effect of amdinocillin (mecillinam). *Antimicrob. Agents Chemother.* 30 : 906~912, 1986
- 16) TOUMANEN E, GILBERT K, TOMASZ A : Modulation of bacterolysis by cooperative effects of penicillin-binding proteins 1a and 3 in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30 : 659~663, 1986
- 17) 横田好子, 岩井芳美, 松本 哲, 池田文昭, 峰靖弘 : メチシリン耐性の *Staphylococcus aureus* に対する cefazolin の *in vitro* 抗菌力と *in vivo* 効果 I. cefmetazole との比較。 *Chemotherapy* 35 : 77~82, 1987

COMBINATION EFFECT OF CEFPIRAMIDE AND CEFOTETAN AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

MASATO WATANABE and SUSUMU MITSUHASHI

Episome Institute, Fujimi-mura, Seta-gun, Gunma, Japan

MATSUHISA INOUE

Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, School of
Medicine, Gunma University

We studied the *in vitro* antibacterial activity of cefpiramide (CPM) in combination with cefotetan (CTT) against methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant (MRSA) *Staphylococcus aureus*, using the checkerboard dilution method. The combination with CPM and CTT showed good synergistic activity against moderately and highly resistant MRSA strains and also synergistic bactericidal activity. The MRSA strains grown in the presence of both CPM and CTT were autolyzed easily, and these results may represent the synergistic activity.