

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する cefuzonam と arbakacin の抗菌併用作用

—微量液体希釈法を応用した成績—

出口 浩一・横田のぞみ・古口 昌美・中根 豊
深山 成美・西村由紀子・小田 清次

東京総合臨床検査センター研究部*

(昭和 63 年 9 月 24 日受付)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は、多剤耐性菌としての性状をもつため、有効な抗菌剤を選択するのが難しい。そこで、中程度の MRSA に比較的強い抗菌力を示す cefuzonam と、高度の MRSA にも抗菌力を示す arbakacin を選び、両剤の試験管内における抗菌併用作用を微量液体希釈法を用いて検討した。

1) MRSA に対する両剤の併用効果は、FIC index ≤ 0.5 の成績が HBK の添加濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ で 38.5%、 $1.0 \mu\text{g/ml}$ では 76.9% であることから、MRSA に対する両剤の抗菌併用作用は、HBK $0.5 \sim 1.0 \mu\text{g/ml}$ すなわち HBK の MIC もしくは subMIC 存在下で、相乗効果が期待できることを示唆した。

2) 微量液体希釈法は、抗菌併用作用のような実験系にも応用が可能であることを確認した。

Key words: MRSA に対する CZON と HBK の抗菌併用作用、微量液体希釈法の応用

著者らは別報¹⁾において、新鮮分離黄色ブドウ球菌の多数株に対する 15 薬剤の MIC 分布を検討し、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する CEPs の MIC 分布は、各々が特有のパターンを示し、なかでも、中程度の MRSA (methicillin の MIC 値 $\leq 50 \mu\text{g/ml}$) に対して flomoxef, cefuzonam, cephalothin が比較的低い MIC 分布を示すこと、高度の MRSA (methicillin の MIC 値 $\geq 100 \mu\text{g/ml}$) には、arbakacin が低い MIC 分布を示すことを確認した。そこで、これらの菌種に対し cefuzonam と arbakacin を選び、両剤の抗菌併用作用を検討した。

別報¹⁾の検討において、微量液体希釈法が単剤の MIC 測定法として充分活用できることを確認したので、異なる作用機を持つ両剤の抗菌併用作用の測定のような実験系にも、微量液体希釈法の応用が可能かという、もうひとつの課題も合わせて検討してみた。

I. 検討方法

1. 供試株

別報¹⁾の検討に用いた *S. aureus* 300 株から、methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) 29 株、MRSA 65 株 (中程度 46 株、高度 19 株) を選

び、検討に供した。

2. 供試薬剤

cefuzonam (CZON, 日本レダリー), arbakacin (HBK, 明治製菓)

3. 抗菌併用作用の測定 (判定) 法

CZON $0.1 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ の Mueller-Hinton broth (Difco, Ca, Mg 添加) の各希釈系列に、HBK $0.1, 0.2, 0.5, 1.0 \mu\text{g/ml}$ を加えた微量液体希釈系列 (4 系列) に対照としての CZON, HBK の各々単独の $0.1 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ 微量液体希釈系列 (2 系列) を加えた合計 6 希釈系列を、1 株に対応する希釈系列とした。

これらの希釈系列の各々に規定の菌数に調製した菌液を接種し、 37°C 20 時間培養後、各々の希釈系列毎の MIC 値を測定した。希釈系列の作製、菌液の接種は、MIC-2000 system (Dynatech, USA) を用いた。

4. 両剤の抗菌併用作用の判定方法

CZON と HBK の抗菌併用作用の判定は、下記の計算式によって fractional inhibitory concentration index (FIC index) を求め、併用作用の効果を判定した。

$$\text{FIC index} = \frac{(\text{CZON} + \text{HBK}) \text{ の MIC 値}}{\text{CZON 単独 MIC 値}}$$

* 東京都足立区千住仲町14-4

$$+ \frac{(\text{HBK} + \text{CZON}) \text{ の MIC 値}}{\text{HBK 単独 MIC 値}}$$

- FIC index : ≤ 0.5 相乗作用
- $> 0.5 \sim \leq 1$ 相加作用
- $> 1 \sim \leq 2$ 弱い相加作用
- > 2 不関または拮抗作用

なお、FIC index > 2 を不関または拮抗作用としたのは、両剤の組み合わせが、CZON 0.1~25 $\mu\text{g/ml}$ の各希釈系列毎に、HBK 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ を添加する方法、つまり、添加試験であり、checkerboard method のように両剤の濃度が対等にならないために不関または拮抗とした。

II. 成績

Figs. 1, 2 に MSSA, MRSA に対する各希釈系列毎の MIC 分布を、そして Tables 1, 2 に MSSA, MRSA に対する HBK 添加濃度別の FIC index 分布を示した。

1. MSSA に対する CZON と HBK の抗菌併用作用
MSSA に対する両剤の抗菌併用作用は、HBK の添加濃度 0.1~0.2 $\mu\text{g/ml}$ では、FIC index 0.63~1.50 の相加もしくは弱い相加作用であるが、0.5 $\mu\text{g/ml}$ では、29 株中 9 株 (31.0%)、さらに 1.0 $\mu\text{g/ml}$ では、29 株中

16 株 (55.2%) が、FIC index ≤ 0.5 の相乗作用を示した。

2. MRSA に対する CZON と HBK の抗菌併用作用
MRSA に対する両剤の抗菌併用作用は、HBK の添加濃度 0.1 $\mu\text{g/ml}$ では FIC index > 2 が 65 株中 50 株 (76.9%) でむしろ不関または拮抗作用が認められた。0.2 $\mu\text{g/ml}$ では FIC index 0.29~0.38 (相乗) が 3 株、同じく 0.62~1.0 (相加) を 4 株認めた。そして、0.5 $\mu\text{g/ml}$ では 25 株 (38.5%)、1.0 $\mu\text{g/ml}$ では 50 株 (76.9%) が FIC index ≤ 0.5 の相乗作用を示した。これにより、MRSA に対する CZON と HBK の抗菌作用は、HBK の添加濃度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上で、高頻度の割合で相乗的に発揮された。

一方、65 株中 7 株 (10.8%) に対しては HBK の添加濃度 1.0 $\mu\text{g/ml}$ でも FIC index が > 2 で、不関または拮抗作用が認められた。これらの成績に共通していることは、CZON 単独の MIC 値が 7 株中 6 株が $> 25 \mu\text{g/ml}$ の高度な MRSA であること、HBK 単独の MIC 値が 7 株中 6 株が 3.13 $\mu\text{g/ml}$ ~6.25 $\mu\text{g/ml}$ だったことである。これら両者間で相乗または相加作用が得られなかった要因については、考察でさらに述べる。

3. 微量液体希釈法を応用した今回の成績

前述 1, 2 で述べたように、両剤の併用効果は、HBK

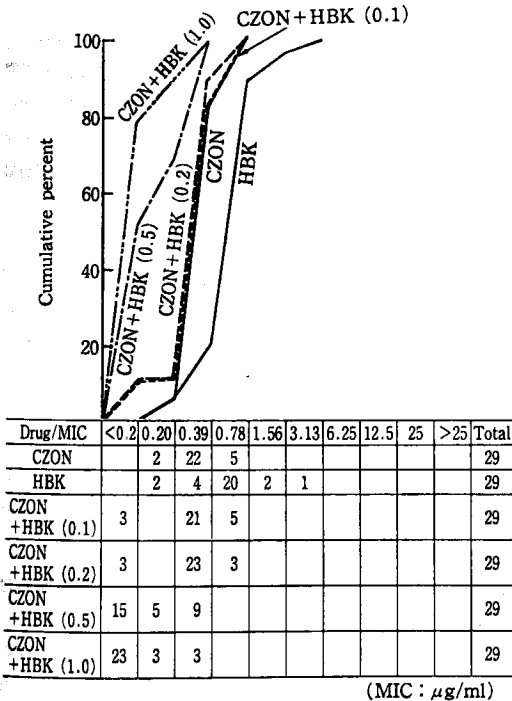


Fig. 1. Distribution of MICs of MSSA in 6 series of dilution

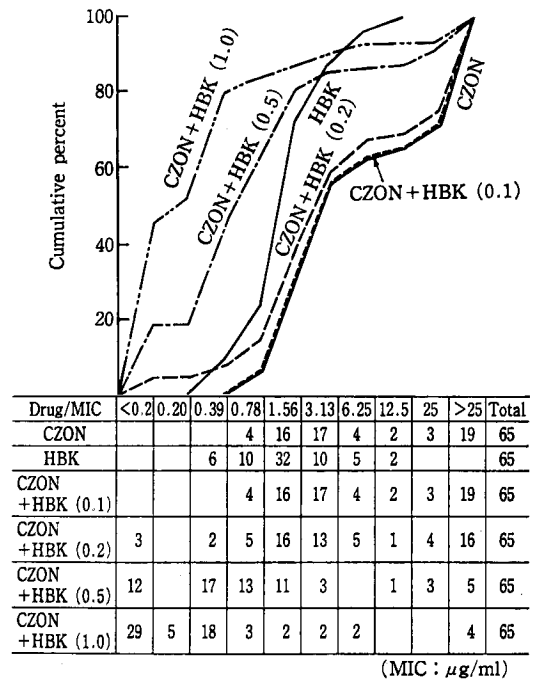


Fig. 2. Distribution of MICs of MRSA in 6 series of dilution

Table 1. Distribution of FIC indices for MSSA by concentrations of added HBK

FIC index range	Drug		CZON+HBK(0.1)		CZON+HBK(0.2)		CZON+HBK(0.5)		CZON+HBK(1.0)	
	FIC index	No. of strains	FIC index	No. of strains	FIC index	No. of strains	FIC index	No. of strains	FIC index	No. of strains
≤0.5					0.29	1	0.26	3		
					0.32	2	0.29	1		
					0.38	6	0.32	2		
							0.38	10		
Sub-total	0		0		9		16			
<0.5~≤1	0.63	1	0.63	1	0.51	3	0.51	4		
	0.76	1	0.76	1	0.63	1	0.63	1		
	1.00	1	1.00	3	0.76	1	0.76	1		
					0.77	4	0.77	3		
					1.00	6	1.00	3		
Sub-total	3		5		15		12			
>1~≤2	1.12	1	1.12	1	1.03	1	1.50	1		
	1.25	2	1.25	2	1.50	4				
	1.50	14	1.50	14						
Sub-total	17		17		5		1			
>2	Sub-total		9		7		0		0	
Total	29		29		29		29			

の添加濃度が上昇するに伴い、両剤の併用効果としての FIC index が小さい値となること、すなわち両剤の抗菌剤併用効果が HBK の濃度と共に作用することを示すことから、作用機序の異なる抗菌剤の併用効果を調べるような実験系にも、微量液体希釈法は、充分に応用できることを確認した。

III. 考 察

MRSA に対する併用療法は、横田のすすめる cefmetazole (CMZ) と fosfomycin (FOM) が以前から知られているが、それは FOM の sub MIC 存在下で増殖した MRSA は、感性感化するからとされている²⁾。しかし、この場合には、対象となる MRSA が、FOM に耐性でない場合に限ると考えられる。著者らは、MRSA の FOM 耐性が増加傾向を示していることを報告しているが³⁾、同じような傾向は他施設からも報告されている^{4,5)}。

一方、ある薬剤による単独療法としては、MRSA に感性率の高い vancomycin (VCM), rifampicin (RFP) の有用性が高いが、VCM の日本での使用は経口剤としてのみ認可されておらず、RFP は耐性変異株の出現率が高いこと⁶⁾ などから、これらの薬剤の単独使用が難しい。

上述したような事情から MRSA 感染症には、併用療法が検討されている。佐々木らは併用の一方の薬剤に FOM, minocyclin (MINO), RFP, ビリドンカルボン酸系を⁷⁾、菅野は、MINO, HBK, VCM, RFP, FOM を併用剤として挙げている⁸⁾。

HBK が MRSA に強い抗菌力を示すことは和田ら⁹⁾、菅野⁸⁾、山下ら⁹⁾、神田ら¹⁰⁾、そして著者らは 1982 年¹¹⁾、1987 年¹²⁾に報告している。今日の日本で分離される MRSA の大部分は AGs 修飾酵素を産生するが、gentamicin (GM) 耐性菌は 2"-APH, 6'-AAC, tobramycin (TOB) 耐性菌は 4',4"-AAD を産生する。紺野¹³⁾によれば、多くの MRSA は、上述の AGs 修飾酵素の両方を産生するとしている。山下らは、HBK はそうした MRSA の産生する AGs 修飾酵素の基質となり難しい性質を持つため、抗菌力を発揮するとしている⁹⁾。山下らは、さらに 4',4"-AAD を産生する *S. aureus* は MRSA としての性格を有していると指摘している¹⁴⁾。

上述したことから、MRSA に対して HBK が示す抗菌力は、MRSA の持つ耐性機序の理論に対応した内容をもつと考えられる¹⁵⁾。今回の抗菌剤併用作用の検討における一方の薬剤に HBK を選んだのは、こうした理由

Table 2. Distribution of FIC indices for MRSA by the concentrations of added HBK

FIC index range	Drug		CZON+HBK(0.1)		CZON+HBK(0.2)		CZON+HBK(0.5)		CZON+HBK(1.0)	
	FIC index	No. of strains	FIC index	No. of strains	FIC index	No. of strains	FIC index	No. of strains	FIC index	No. of strains
≤0.5			0.29	1	0.07	2	0.03	2		
			0.32	1	0.13	1	0.07	7		
			0.38	1	0.14	1	0.08	2		
					0.16	2	0.10	2		
					0.19	1	0.13	5		
					0.26	3	0.14	1		
					0.29	1	0.16	4		
					0.31	2	0.19	5		
					0.32	3	0.26	6		
					0.37	3	0.27	1		
					0.38	1	0.29	1		
					0.50	5	0.31	1		
							0.32	3		
						0.37	5			
						0.38	1			
						0.50	4			
	Sub-total	0		3		25		50		
<0.5~≤1			0.62	1	0.52	3	0.62	2		
			0.75	1	0.53	2	0.75	4		
			1.00	2	0.56	1	0.77	1		
					0.62	3	1.00	1		
					0.75	7				
					1.00	2				
	Sub-total	0		4		18		8		
>1~≤2		1.25	2	1.03	1	1.03	2			
		1.50	4	1.25	2	1.06	1			
		2.00	9	1.50	6	1.25	2			
				2.00	7	1.50	5			
					2.00	1				
	Sub-total	15		16		11		0		
<2	Sub-total	50		42		11		7		
Total		65		65		65		65		

によるものである。

今回の検討では、もう一方の薬剤に CZON を選んだ。MRSA に対する CZON の抗菌力は、別報¹⁾で詳細に報告しているように、methicillin の MIC 値 $\leq 50 \mu\text{g/ml}$ の、すなわち中程度の MRSA に低い MIC 分布を示す特徴を捉えることができたからである。さらに、抗菌剤併用作用は、本質的に異なる作用機作を持つ薬剤間で起

こりうるという、過去の実験成果をもとに¹⁶⁾、HBK の相手に CZON を選んだ。

今回の検討の実験系としては、ふたつの特徴をもつ。第一は、checkerboard method のように、両剤の濃度比をたがいに変更しながらも、最小と最大の濃度は同等であるのと異なる。

I 項で述べたように、HBK の定められた濃度を

CZON の各希釈系列に順次添加する方法、すなわち添加試験である。この方法を設定したのは次の理由からである。私たちは試験管内における抗菌併用作用の検討目的は、拮抗作用の否定と相乗効果の証明にあると考えている。相乗効果は、一方の薬剤ともう一方の薬剤が共に低濃度で加わって起こる。つまり、Aの薬剤に対してBの薬剤の MIC もしくは subMIC 程度の濃度を添加して、FIC index が ≤ 0.5 の成績が過半数を越えないような検討は、実験系としてその有用性が低いと考えられる。

さらに、実際の併用療法を行なう場合に用いる両剤の使用量とそれに伴う体内移行の問題である。セフェム系の CZON はグラム単位なのに対してアミノグリコシド系の HBK は 100~200 mg 程度の使用量であるため、両剤の体内分布は 5:1 か 10:1 であることが推察されたからである。

第二の特徴は、今回の検討方法が微量液体希釈法の応用としての性格を持つことである。微量液体希釈法に用いる各種の機器は主に単剤の MIC, MBC 測定用であるが、抗菌剤の併用作用のような、こうした分野にも応用が可能かも合わせて検討した。

以上のことから、MRSA に対する CZON と HBK の併用作用は MSSA に対する成績でも同一の傾向を示すことから HBK の 0.5~1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、すなわち HBK の MIC もしくは tub-MIC 存在下で相乗効果が期待できると考えられる。

なお、MRSA の 65 株中 7 株に対しては併用効果が認められなかった。この要因のひとつとして HBK の MIC 値が HBK の添加濃度を越えているためとも考えられる。しかし、これとは別の実験結果も多数確認されていることから、HBK の MIC 値と添加濃度にその要因を求めることは矛盾する。したがって、これらの MRSA の性質が、両剤の併用作用にも菌株により限界をもたらすことを示唆しているとも思える。

微量液体希釈法は、こうした実験系にも応用が可能である。渡辺ら¹⁷⁾、菅野ら¹⁸⁾も、同様の方法で薬剤の併用の結果を報告している。著者らは、別報¹¹⁾において、微量液体希釈法の活用法を論じたが、今回の経験から、微量液体希釈法は、抗菌力の検討をすすめるうえで、活用範囲の広い測定法であることを学んだ。

文 献

- 1) 出口浩一, 横田のぞみ, 中根 豊, 深山成美, 西村由紀子, 小田清次: 新鮮分離黄色ブドウ球菌に対する 15 抗菌剤の MIC 分布—微量液体希釈法を用いた成績—。Chemotherapy 37: 717~722, 1989
- 2) 横田 健: MRSA の耐性機構をめぐって, MRSA 感染症。1~10, ライフサイエンス, 東京, 1986
- 3) 杉田守正, 豊永義清, 竜野国弘, 保科定頼, 黒坂公生, 出口浩一, 堀 誠: 臨床材料より分離されたセフェム耐性黄色ブドウ球菌の各抗生剤に対する感受性および phage 型について (第 6 報)。第 36 回日本化学療法学会総会 p.173 June. 1988 (神戸)
- 4) 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, fosfomycin, minocycline および cefamandole の併用効果について。Chemotherapy 35: 180~183, 1987
- 5) 和田光一, 武田 元, 荒川正昭, 尾崎京子, 高野操: 多剤耐性黄色ブドウ球菌感染症の検討。Chemotherapy 35: 213~218, 1987
- 6) MOORMAN D R, MANDELL G L: Characteristics of rifampicin-resistant variants obtained from clinical isolates of *Staphylococcus aureus* Antimicrob. Agents Chemother. 20: 709~713, 1981
- 7) 佐々木昌子, 大泉耕太郎, 渡辺 彰, 青沼清一, 今野 淳: 各科領域における化学療法剤の併用, 呼吸器感染症。化学療法の領域 35: 665~671, 1987
- 8) 菅野治重: MRSA に対する抗菌剤の併用効果。臨床と微生物, 15: 168~173, 1988
- 9) 山下直子, 生方公子, 野々口律子, 後藤 朗, 松下真理, 紺野昌俊: アミノ配糖体液に耐性のブドウ球菌に対する HBK の抗菌作用。Chemotherapy 34(S-1): 33~40, 1986
- 10) 神田佳代子, 横田 健: 最近分離した高度メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の 13 薬剤に対する感受性。Chemotherapy 36: 289~293, 1988
- 11) 出口浩一: 臨床分離株のアミノ配糖体剤を主とする抗生物質に対する感受性。Jap. J. Antibiotics 35: 1977~1986, 1982
- 12) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 深山成美, 西村由紀子, 村尾久子, 小田清次, 田中節子, 佐藤久美子, 加藤三枝子, 福本寅雄: 血液, 呼吸器由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の各種アミノ配糖体抗生物質に対する感受性。Chemotherapy 35: 476~481, 1987
- 13) 紺野昌俊: MRSA におけるアミノ配糖体薬剤および β -ラクタム剤耐性。臨床と微生物 15: 157~167, 1988
- 14) 山下直子, 生方公子, 松下真理, 紺野昌俊, 増田真理子, 野々口律子: メチシリン・セフェム耐性の黄色ブドウ球菌に対する β -ラクタム系薬剤の抗菌力測定時における培養温度の影響。Chemotherapy 33: 743~752, 1985
- 15) 紺野昌俊: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する化学療法の進歩と問題点。第 36 回日本感染症学会東日本地方会総会。第 34 回日本化学療法学会東日本支部総合合同学会。会長講演要旨。Chemotherapy 36(6): 427~428, 1988

- 16) 出口浩一, 深山成美, 西村由紀子, 西家綾子: Cefotaxime とアミノ配糖体剤との試験管内抗菌協力作用に関する検討。Chemotherapy 33: 120~125, 1985
- 17) 渡辺 彰, 大泉耕太郎, 青沼清一, 小野玲子, 本田芳宏, 徳江 豊, 北村直人, 今野 淳: MRSA に対する cefuzonam と minocycline の *in vitro* 併用効果 (MSSA との比較)。第 36 回日本化学療法学会総会 p.174. June. 1988 (神戸)
- 18) 菅野治重, 渡辺正治, 落合武徳, 陳 瑞明, 加藤繁次, 菊池典雄, 黒崎知道, 宇塚良夫: 黄色ブドウ球菌感染症に対する fosfomycin と cephem 剤との併用療法の有用性について (その 1) —臨床効果について—第 36 回日本化学療法学会総会 p.175, June. 1988

SYNERGISTIC ACTION OF CEFUZONAM AND ARBEKACIN ON METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

—RESULTS OF APPLICATION OF THE MICRODILUTION METHOD—

KOICHI DEGUCHI, NOZOMI YOKOTA, MASAMI KOGUCHI, YUTAKA NAKANE,
SHIGEMI FUKAYAMA, YUKIKO NISHIMURA and SEIJI ODA
Research Department, Tokyo Clinical Research Center

Since methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains are also multiple drug-resistant, it is difficult to select an effective antibiotic. We therefore chose cefuzonam (CZON) which has relatively potent activity against moderate MRSA and arbekacin (HBK) which is active against high MRSA, and investigated their synergistic action *in vitro*, using a microdilution broth method.

1) An FIC index ≤ 0.5 was obtained by the synergistic action of the 2 antibiotics on MRSA using 38.5% of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of HBK, and 76.9% of 1.0 $\mu\text{g/ml}$ of CZON. This suggests that synergistic action of the 2 antibiotics on MRSA can be achieved with HBK concentrations of 0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$, that is, with MIC or sub-MIC levels.

2) We also confirmed that the microdilution broth method is applicable to experimental systems such as the synergistic action of antibiotics.