

MRSA に対する cefazolin と imipenem との *in vitro* および *in vivo* 併用効果

渡辺 裕二・若井 芳美・久野京一郎

波多野和男・坂本 博・峯 站 弘

藤沢薬品工業・開発研究所\*

井 上 松 久

群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設

(平成2年3月16日受付・平成2年4月19日受理)

Methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) に対する cefazolin (CEZ) と imipenem (IPM) との併用効果を(1) checkerboard 法, (2) *in vitro* kinetic model での殺菌性および(3)実験感染モデルにおいて検討した。

(1) CEZ と IPM 併用により MRSA 54 株中 45 株 (83%) に相乗効果を認め、そのうち 25 株に FIC index 0.25 以下の強い相乗効果を認めた。また、この相乗作用は、培養条件 (接種菌量、培養温度および 4% NaCl 添加) に関係なく認められた。

(2) 常用量の CEZ (2 g) および IPM (0.5 g) 投与時のヒト血中濃度にシミュレートした *in vitro* kinetic model において、MRSA に対する殺菌性は、各薬剤単独と比べ併用により大幅に増強された。

(3) 正常マウス全身感染に対して CEZ : IPM の 4 : 1 以上の併用比で相乗効果が認められた。MRSA 8 株中 6 株が相乗効果を、残り 2 株も相加効果を示した。また、この相乗効果は、顆粒球減少マウスにおける全身感染および皮下膿瘍、さらにラット心内膜炎のいずれに対しても認められた。

以上の成績は、治療法の限られた MRSA 感染症に対して CEZ と IPM の併用も治療法の一つとなりうることを示唆した。

**Key words :** MRSA, 相乗作用, cefazolin, imipenem, 感染モデル

Methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 感染症は、近年増加傾向を示し、抗ブドウ球菌作用の弱い第二世代あるいは第三世代セフェム系薬の繁用がその増加の原因のひとつと指摘されている<sup>1-3)</sup>。しかも、MRSA は、methicillin (DMPPC) のみならず多くの  $\beta$ -ラクタム系薬、アミノ配糖体系薬、マクロライド系薬等に耐性を示す多剤耐性菌が多く、単独では vancomycin (VCM), minocycline, doxycycline, ST 合剤や rifampicin (RFP) 等限られた薬剤でしか治療可能ではない<sup>2,4,5)</sup>。しかし、VCM は注射の適応がなく、テトラサイクリン類は耐性菌の増加および免疫不全患者での有効性<sup>2,6)</sup>に、さらに RFP は耐性獲得が速い<sup>7)</sup>という問題を抱えている。また、MRSA は基礎疾患に併発した重篤な感染の経緯をたどる場合が多く、化学療法の重要なターゲットのひとつである。

このような背景のもとで MRSA に対する相乗効果を期

待して、*in vitro* 系で種々の抗菌薬の併用効果について数多く検討されている<sup>8-16)</sup>。しかしながら、*in vitro* での相乗効果を実験感染モデルあるいは臨床において証明した例は少ない。井上らは、MRSA に対して cefazolin (CEZ) あるいは ceftizoxime と imipenem (IPM) との *in vitro* 併用により強い相乗効果が得られることおよび各薬剤に対する耐性頻度が著しく減少することを報告した<sup>16)</sup>。本報告は、このうち抗 *S. aureus* 活性の強い組合せである CEZ と IPM の併用を採り上げ、この相乗効果が臨床的にも期待しうるものであるか否かを予想するために、ヒト血中濃度にシミュレートした *in vitro* kinetic model における併用時の殺菌性および各種実験感染モデルにおける併用効果を検討した。

## I 材料および方法

### 1. 使用菌株

1984 年～1986 年に臨床材料より分離された当研究

室保存の *S. aureus* のうち DMPTC の MIC が 6.25  $\mu\text{g/ml}$  以上の耐性株 54 株を用いた。また、MS 15030 および MS 15031 株は、形質導入により得られた MRSA<sup>17)</sup>である。

## 2. 使用薬剤

CEZ (藤沢薬品)、IPM (万有製薬)、cefmetazole (CMZ, 三共)、fosfomycin (FOM, 明治製薬) および VCM (藤沢薬品) を用いた。

## 3. 使用動物

マウス (ICR 系, 雄, 4 週齢) およびラット (SD 系, 雄, 6 週齢) を用いた。

## 4. 薬剤感受性測定

最小発育阻止濃度 (MIC) は、Mueller-Hinton agar (Difco) を用い、化療標準法<sup>18)</sup>に準拠して測定した。一夜培養菌液の 100 倍希釈液 ( $3 \sim 5 \times 10^6$  cfu/ml) を約 1  $\mu\text{l}$  スタンプ接種し、37°C, 18 時間培養後の MIC を判定した。ただし、特殊な例として 4% NaCl 添加、30°C 培養あるいは一夜培養菌液の原液 ( $3 \sim 5 \times 10^6$  cfu/ml) を用いても測定した。併用効果は、checkerboard 法<sup>19)</sup>により MIC 測定と同一条件で検討し、fractional inhibitory concentration (FIC) index を求め、以下の基準で併用効果を判定した。FIC index  $\leq 0.5$  を相乗,  $0.5 < \text{FIC index} \leq 1.0$  を相加, FIC index = 2.0 を作用なし, FIC index  $> 2.0$  を拮抗とした。

## 5. ヒト血中濃度にシミュレートした *in vitro* kinetic model における殺菌作用

村川らの方法<sup>20)</sup>に従い、CEZ 2 g あるいは IPM 0.5 g の 1 時間点滴静注時のヒト血中濃度推移にシミュレ

ートした段階的 *in vitro* 濃度変化系を Mueller-Hinton broth (Difco) 中で作成した。CEZ および IPM の血中濃度推移は公表値<sup>21,22)</sup>を引用し、併用により各薬剤の濃度推移が変化しないものと仮定した。対数増殖期の菌を接種し、37°C で振盪培養後終時的に生菌数を測定した。

## 6. 実験感染モデルの作成および治療方法

### (1) マウス全身感染

正常マウスまたは感染 4 日前に 200 mg/kg の cyclophosphamide を腹腔内に投与した顆粒球減少マウスの腹腔内に所定の菌数となるよう 5% ムチンに懸濁した菌液 0.5 ml を接種した。1 時間後に各段階に希釈した単独あるいは併用の薬剤を一群 8 匹の感染マウスに皮下投与した。菌接種 4 日後の生存率より Probit 法<sup>23)</sup>で ED<sub>50</sub> を算出した。横田らの報告<sup>24)</sup>に従い、fractional effective dose (FED) index を求め、以下のごとく FIC index と同様の基準で併用効果を判定した。FED index  $\leq 0.5$  を相乗,  $0.5 < \text{FED index} \leq 1.0$  を相加,  $1.0 < \text{FED index} \leq 2.0$  を作用なし, FED index  $> 2.0$  を拮抗とした。

### (2) マウス皮下膿瘍

上記のごとく作成した顆粒球減少マウスの背部皮下に生理食塩水に懸濁した *S. aureus* 5027 株 0.1 ml ( $2.4 \times 10^2$  cfu) を接種した。単独あるいは併用による薬剤治療は、一群 6 匹の感染マウスに菌接種 5 時間後 1 回および翌日より 1 日 2 回 2 日間 (計 5 回) 感染部位より離れた部位に皮下投与した。菌接種 3 日後感染部位の皮膚を切除し、ホモジナイズ後生菌数を測定し

Table 1. Distribution of FIC indices by cefazolin/imipenem combination against 54 MRSA strains

Range of FIC index	No. of strains		
	MRSA	L-MRSA*	H-MRSA <sup>#</sup>
$\leq 0.125$	10	2	8
0.126 - 0.250	15	6	9
0.251 - 0.500	20	16	4
0.501 - 1.000	8	5	3
1.001 - 2.000	1	0	1
$> 2.000$	0	0	0
Total	54	29	25

\* : Strains with methicillin MICs from 6.25 to 25  $\mu\text{g/ml}$

# : Strains with methicillin MICs of 50  $\mu\text{g/ml}$  or higher

た。

### (3) ラット心内膜炎

Santoro らの方法<sup>25)</sup>に従い、麻酔下でラットの頸動脈よりポリエチレンチューブ (内径0.28 mm, 外径0.61 mm) 先端が心臓に接触するまで挿入し、固定した。24 時間後、生理食塩水に懸濁した *S. aureus* 5027 株 ( $5.0 \times 10^4$  cfu) 0.5 ml を尾静脈より接種した。単独あるいは併用による薬剤治療是一群 5 匹の感染ラットに菌接種 5, 24, 32 時間後の計 3 回静注投与した。菌接種 2 日後心臓を摘出し、ホモジナイズ後生菌数を測定した。

## II. 実験結果

### 1. *In vitro* 併用効果

臨床分離 MRSA 54 株に対する CEZ と IPM との併用効果を checkerboard 法により検討した (Table 1)。FIC index 0.5 以下の相乗効果を示した株は 45 株 (83%) 存在し、そのうち 25 株に FIC index 0.25 以下の強い相乗効果を認めた。また、DMPPC の MIC 6.25 ~ 25  $\mu\text{g/ml}$  の中等度耐性株 (L-MRSA) 29 株と 50  $\mu\text{g/ml}$  以上の高度耐性株 (H-MRSA) 25 株に分けてもいずれの株でも相乗効果がみられたが、FIC index 0.25 以下の強い相乗効果を示す株は H-MRSA に多かった。さらに、併用時の両薬剤の抗菌力を特に DMPPC 高度耐性株について調べると、CEZ, IPM 単独時の平均 MIC, 136, 14.8  $\mu\text{g/ml}$  がそれぞれ 8.72, 0.25  $\mu\text{g/ml}$  へ小さくなり、併用による著しい抗菌力増強が認められた。

次に、MRSA の耐性度が高まる各種条件下での相乗

効果を検討した (Table 2)。 $3 \sim 5 \times 10^6$  cfu/ml 接種で 37°C 培養に比べ、接種菌量の増加 ( $3 \sim 5 \times 10^8$  cfu/ml)、培養温度の低下 (30°C) あるいは 4% NaCl 添加により特に L-MRSA において両薬剤の MIC が著しく上昇したが、L-MRSA, H-MRSA 共にこれらのいずれの条件下においても CEZ/IPM による相乗効果が認められた。

### 2. ヒト血中濃度にシミュレートした *in vitro* kinetic model における殺菌性

CEZ/IPM による相乗効果が臨床でも期待できるかを予想するために、ヒト血中濃度シミュレーション系での殺菌性を検討した (Fig. 1)。常用量の CEZ

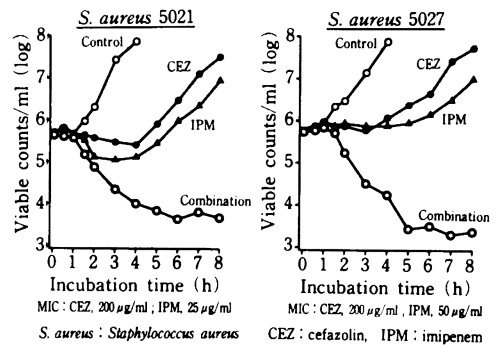


Fig. 1. Bactericidal activity of cefazolin/imipenem combination against 2 MRSA strains in an *in vitro* kinetic model simulating human plasma concentrations

Table 2. Effect of inoculum size, incubation temperature and NaCl supplement on synergism between cefazolin and imipenem against MRSA

Incubation temperature	Inoculum size (cfu/ml)	4% NaCl supplement	Mean MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				Mean FIC index	
			L-MRSA (9)		H-MRSA (11)*		L-MRSA	H-MRSA
			CEZ	IPM	CEZ	IPM		
37°C	$3 \sim 5 \times 10^6$	-	4.3	0.072	230	23	0.47	0.20
	$3 \sim 5 \times 10^8$	-	54	0.84	310	83	0.26	0.40
30°C	$3 \sim 5 \times 10^6$	-	25	0.21	240	60	0.21	0.36
	$3 \sim 5 \times 10^8$	-	86	8.4	380	100	0.27	0.46
37°C	$3 \sim 5 \times 10^6$	-	11	0.14	200	28	0.35	0.30
	$3 \sim 5 \times 10^6$	+	100	0.90	210	15	0.14	0.22

\*: Values in parentheses are numbers of strains used.

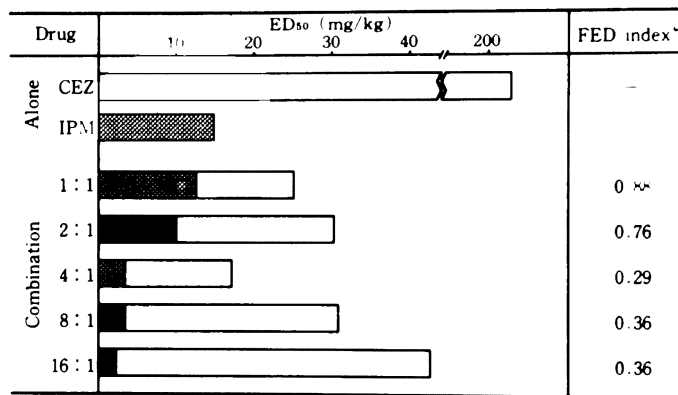
CEZ: cefazolin, IPM: imipenem

Table 3. The MICs and FIC indices of test drugs against 8 MRSA strains in experimental infections

MRSA	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )					FIC index	
	CEZ	IPM	CMZ	FOM	VCM	CEZ/IPM	CMZ/FOM
5036	3.13	0.05	3.13	50	ND*	0.38	0.31
5011	3.13	0.05	3.13	25	ND	0.50	0.62
MS 15030	6.25	0.2	6.25	25	0.78	0.38	0.31
4110	12.5	0.2	6.25	ND	ND	0.25	ND
6004	50	0.39	12.5	12.5	1.56	0.19	0.31
5027	200	12.5	12.5	100	0.78	0.96	0.37
4109	200	6.25	25	ND	ND	0.08	ND
MS 15031	200	50	100	12.5	0.78	0.50	0.31

\* : Not determined

CEZ : cefazolin, IPM : imipenem, CMZ : cefmetazole, FOM : fosfomycin, VCM : vancomycin



Mouse : ICR strain, male, 4 W, n=8

Organism : *S. aureus* 5027,  $2.0 \times 10^8$  cfu, 5% mucin suspension, i.p.

Therapy : s.c. + 1 h

$$\text{FED index} = \frac{\text{ED}_{50} \text{ of drug A in combination}}{\text{ED}_{50} \text{ of drug A alone}} + \frac{\text{ED}_{50} \text{ of drug B in combination}}{\text{ED}_{50} \text{ of drug B alone}}$$

CEZ : cefazolin, IPM : imipenem

Fig. 2. Effect of combination ratio of cefazolin and imipenem on protective activity against systemic infection due to MRSA in normal mice

(2 g), IPM (0.5 g) 単独投与時の血中濃度変化系では、用いた H-MRSA 2 株とも 4 ~ 5 時間の lag time の後増菌した。一方、併用時の血中濃度変化系では、著しい生菌数の減少がみられ、8 時間後でも再増殖が認められなかった。すなわち、単独ではいずれも静菌作用の後再増殖を許したが、併用により著明な殺菌作用がみられた。

### 3. マウス全身感染に対する防御活性

感染実験に使用した MRSA 8 株の薬剤感受性および併用時の FIC index を Table 3 に示した。

まず、*S. aureus* 5027 株による正常マウス全身感染系で CEZ/IPM の至適併用比の検討を行った (Fig. 2)。併用効果を FED index で判定すると、CEZ : IPM の 1 : 1 および 2 : 1 併用では相加効果のみであったが、4 : 1 以上の併用により明らかな相乗効果が認められた。なお、FED index および併用時の両剤の ED<sub>50</sub> の合計量共に 4 : 1 併用が最小であった。すなわち、CEZ と IPM の併用比が 4 : 1 の時が最強の相乗効果を示した。

そこで、CEZ : IPM の併用比を 4 : 1 に固定して

Table 4. Protective activity of cefazolin/imipenem combination against systemic infection due to 8 MRSA strains in normal mice

MRSA	Challenge size (cfu/mouse)	Antibiotic	ED <sub>50</sub> (mg/kg)		FED index
			CEZ	IPM	
5036	2.8 × 10 <sup>8</sup>	Alone	76.4	4.79	0.36
		4 : 1 combination	5.58 +	1.40	
5011	2.1 × 10 <sup>8</sup>	Alone	153	17.4	0.42
		4 : 1 combination	20.0 +	5.0	
MS 15030	3.2 × 10 <sup>7</sup>	Alone	3.46	1.40	0.48
		4 : 1 combination	1.02 +	0.255	
4110	6.5 × 10 <sup>7</sup>	Alone	6.97	1.05	0.39
		4 : 1 combination	1.01 +	0.252	
6004	1.6 × 10 <sup>8</sup>	Alone	195	21.1	0.42
		4 : 1 combination	25.0 +	6.25	
5027	1.8 × 10 <sup>8</sup>	Alone	176	19.0	0.38
		4 : 1 combination	20.4 +	5.09	
4109	2.8 × 10 <sup>8</sup>	Alone	34.6	1.42	0.57
		4 : 1 combination	2.76 +	0.689	
MS 15031	3.0 × 10 <sup>7</sup>	Alone	11.6	3.47	0.63
		4 : 1 combination	3.98 +	0.995	

CEZ : cefazolin, IPM : imipenem

MRSA 8 株に対する併用効果を検討した (Table 4)。CEZ/IPM 併用により 8 株中 6 株に FED index 0.5 以下の相乗効果が、残り 2 株 (MS 15031, 4109 株) にも相加効果が認められた。

次に、MRSA に対して臨床的に使用されている併用のひとつである CMZ/FOM との比較を試みた (Table 5)。なお、CMZ/FOM の併用比は臨床用量を参考にして 1 : 1 とした。MRSA 3 株いずれに対しても CEZ/IPM の方が CMZ/FOM より優れ、FED index は小さく、かつ併用時の両剤の ED<sub>50</sub> の和も小であった。

MRSA は生体防御能の低下した患者に重篤な感染を起こし易いため、このモデルとして顆粒球減少マウスにおける全身感染に対する併用効果を検討した (Table 6)。用いたいずれの薬剤も高用量にもかかわらず単独では 25 % 以下の生存率しかもたらさなかつ

たが、CEZ/IPM 併用は 87.5 % のマウスを生存させ、正常マウスの場合と同様に CMZ/FOM より明らかに強い相乗作用を示した。

#### 4. 局所感染に対する治療効果

臨床での MRSA の感染形態として頻度の高い褥創感染や術後感染のモデルとして、顆粒球減少マウスにおける皮下膿瘍 (Table 7) およびラットにおける心内膜炎 (Table 8) に対する CEZ/IPM の併用効果を検討した。

*S. aureus* 5027 株による皮下膿瘍に対して CEZ (200 mg/kg)、IPM (50 mg/kg) 共に単独ではほとんど治療効果を示さなかったが、併用により各剤単独より有意に生菌数を減少させた。

また、同菌株によるラット心内膜炎に対しても、各薬剤単独ではまったく効果がないにもかかわらず併用により明らかな治療効果が認められた。なお、本感染

Table 5. Comparison of protective activity of cefazolin/imipenem and cefmetazole/fosfomycin combinations against systemic infection due to 3 MRSA strains in normal mice

MRSA	Challenge size (cfu/mouse)	Antibiotic		ED <sub>50</sub> (mg/kg)		FED index
		A	B	A	B	
5027	2.1 × 10 <sup>8</sup>	CEZ	IPM	103	10.6	0.14
		4:1 combination		4.28	1.07	
MS 15030	3.2 × 10 <sup>7</sup>	CMZ	FOM	75.9	213	0.77
		1:1 combination		43.1	43.1	
MS 15030	3.2 × 10 <sup>7</sup>	CEZ	IPM	3.46	1.40	0.48
		4:1 combination		1.02	0.255	
MS 15030	3.2 × 10 <sup>7</sup>	CMZ	FOM	24.0	6.07	0.72
		1:1 combination		3.49	3.49	
MS 15031	3.0 × 10 <sup>7</sup>	CEZ	IPM	11.6	3.47	0.63
		4:1 combination		3.98	0.995	
MS 15031	3.0 × 10 <sup>7</sup>	CMZ	FOM	16.9	5.73	1.04
		1:1 combination		4.43	4.43	

CEZ : cefazolin, IPM : imipenem, CMZ : cefmetazole, FOM : fosfomycin

Table 6. Comparison of survival rates by cefazolin/imipenem and cefmetazole/fosfomycin combinations against systemic infection due to MRSA in neutropenic mice

Antibiotic	Dose (mg/kg)	Survival rate on day 4 (%)
Control	—	0
CEZ	200	12.5
IPM	50	25
CEZ/IPM (4:1)	200 + 50	87.5
CMZ	200	12.5
FOM	200	12.5
CMZ/FOM (1:1)	200 + 200	25

Mouse : ICR, Male, 4 W, n=8

Immunosuppression : 200 mg/kg cyclophosphamide, -4 days, i.p.

Organism : *Staphylococcus aureus* 5027, 1.2 × 10<sup>8</sup> cfu, i.p.

CEZ : cefazolin, IPM : imipenem, CMZ : cefmetazole, FOM : fosfomycin

系においては VCM の治療効果も同時に検討したが、CEZ/IPM 併用による治療効果は VCM よりやや劣る傾向を示すものの有意差はなかった。

### III. 考 察

MRSA に対する CEZ/IPM 併用による *in vitro* で  
の強い相乗効果が臨床的にも有用性が期待できること

Table 7. Therapeutic activity of cefazolin/imipenem combination against subcutaneous abscess due to MRSA in neutropenic mice

Antibiotic	Dose (mg/kg)	Viable counts on day 3 (log)
Control	-	7.72 ± 0.10
CEZ	200	7.07 ± 0.30 <sup>#</sup>
IPM	50	7.53 ± 0.11 <sup>#</sup>
CEZ/IPM	200 + 50	5.48 ± 0.53 <sup>*</sup>

Mice: ICR, Male, 4 W, n = 6

Immunosuppression: 200 mg/kg cyclophosphamide, -4 days, i.p.

Organism: *Staphylococcus aureus* 5027,  $2.4 \times 10^2$  cfu, s.c.

Therapy: s.c., +5, +24, +32, +48, +56 h (total 5 times)

\*: Significantly different from control ( $p < 0.05$ )#: Significantly different from CEZ/IPM ( $p < 0.05$ )

CEZ: cefazolin, IPM: imipenem

Table 8. Therapeutic activity of cefazolin/imipenem combination against endocarditis due to MRSA in rats

Antibiotic	Dose (mg/kg)	Viable counts in heart on day 2 (log)
Control	-	8.51 ± 0.37
CEZ	40	8.41 ± 0.22 <sup>#</sup>
IPM	10	8.38 ± 0.14 <sup>#</sup>
CEZ/IPM	10 + 10	6.10 ± 0.49 <sup>*</sup>
VCM	10	5.01 ± 0.64 <sup>*</sup>

Rats: SD, Male, 6 W, n=5

Organism: *Staphylococcus aureus* 5027,  $5.0 \times 10^4$  cfu, i.v.

Therapy: i.v., +5, +24, +32 h (total 3 times)

\*: Significantly different from control ( $p < 0.05$ )#: Significantly different from CEZ/IPM ( $p < 0.05$ )

CEZ: cefazolin, IPM: imipenem, VCM: vancomycin

を checkerboard 法による *in vitro* 併用効果, ヒト血中濃度にシミュレートした系での殺菌性および感染防御活性の3側面より推定した。

まず, *in vitro* において, 用いた MRSA 54 株のうち耐性度に関係なく約 8 割の株に CEZ/IPM による相乗効果が認められた。なお, 約 2 割の株に相乗効果の認められなかった原因の詳細は明らかではないが, IPM に対する感受性の著しく高い ( $MIC \leq 0.05 \mu\text{g/ml}$ ) あるいは低い ( $MIC \geq 50 \mu\text{g/ml}$ ) 株が多かった。また, MRSA の  $\beta$ -ラクタム剤に対する耐性度を高める高接種菌量, 低温での培養および 4% NaCl 添加のいずれの条件においても, CEZ/IPM による強い相乗

効果が認められたことは, 臨床でも起こりうるこの種の  $\beta$ -ラクタム剤に不利な条件下での本併用の意義を示唆した。さらに, この増強された活性が臨床でも意味を持つことは, 常用量 (CEZ 2 g, IPM 0.5 g) の 1 時間点滴静注時のピーク濃度 (CEZ: 約  $200 \mu\text{g/ml}$ , IPM: 約  $20 \mu\text{g/ml}$ ) が DMPPC 高度耐性株に対しても CEZ, IPM の併用時の平均 MIC ( $14.8, 0.25 \mu\text{g/ml}$ ) より充分高いことから推測された。また, このときの time above MIC についてみても, CEZ, IPM 単独の場合の 0.84, 1.69 時間が併用によりそれぞれ 5.76, 6.89 時間に延長した。特にこのヒト血中濃度と併用時の活性の関係は, 両剤の常用量投与時の血中濃度にシ

ミュレートした *in vitro* kinetic model における殺菌性の検討によりさらに確かめられた。すなわち、単独に比べ併用による著しい殺菌性の増強がえられ、各薬剤の血中濃度が MIC よりはるかに低下する 8 時間後 (CEZ: 約 6  $\mu\text{g/ml}$ , IPM: 0.1  $\mu\text{g/ml}$  以下) でも菌の再増殖を許さなかった。これは、CEZ/IPM 併用による殺菌性の増強に加え、グラム陽性菌に対して  $\beta$ -ラクタム剤一般にみられる postantibiotic effect<sup>29)</sup> を反映した結果と考えられる。したがって、1 日 2 回の併用治療により十分な効果が得られることが予想された。

この *in vitro* での強い相乗効果はマウス全身感染系でも同様に認められ、しかも、Fig. 2 に示したように CEZ, IPM の常用量の投与量の比率である 4 : 1 が最強の相乗効果であった。各薬剤のマウスとヒトでの血中半減期 (CEZ: 0.33, 1.62 時間, IPM: 0.22, 0.94 時間) の関係がほぼ等しいことから、この併用が臨床でも十分な効果を発揮する可能性が示唆された。また、CEZ と IPM の併用比を増しても強い相乗効果が得られることから痙攣等の副作用が懸念される場合 IPM の投与量を減量できる可能性も考えられる。さらに、MRSA に対して臨床で使用されている CMZ/FOM の併用より ED<sub>50</sub>, FED index ともに CEZ/IPM の併用が優れたことは、本併用の臨床的価値を予想させた。また、日本では注射の適応はないが欧米では MRSA に対する第一選択薬とされる VCM との比較でもラット心内膜炎モデルにおいて CEZ/IPM 併用が VCM に近似した治療効果を示したことも本併用の価値を考える上で参考になると考えられる。

MRSA 感染は生体防御能の低下を伴う基礎疾患を有する患者に発症し易いが、このような臨床に近い感染モデルとして検討した顆粒球減少マウスにおける全身感染、皮下膿瘍のいずれの系においても CEZ/IPM 併用が単独より明らかに強い治療効果を示したことは意義深い。

MRSA 感染に対する  $\beta$ -ラクタム剤の治療効果は *in vitro* 活性から予想されるよりも弱い場合が多いが、この原因として MRSA は heterogeneous な耐性菌であり一部存在する高度耐性ポピュレーションが治療中に選択されるためと考えられている<sup>27)</sup>。また、MRSA に対する *in vitro* 活性の優れる IPM でも sub-MIC で起こる耐性誘導により単独での使用が懸念されている<sup>28)</sup>。井上らは、CEZ/IPM 併用が *in vitro* において MRSA の耐性頻度を減少させることを明らかにし、高度耐性菌の選択の可能性が低いことを示唆した<sup>16)</sup>。この事実は、Fig. 1 に示した *in vitro* kinetic model における殺菌性の検討でも、単剤は静菌作用後

再増殖を許したが、併用により著明な殺菌作用が 8 時間認められたことから推定された。したがって、本報告で明らかとした *in vivo* での優れた併用効果はこのような高度耐性菌の選択の防止の観点からも意義深いであろう。

このように MRSA に対して  $\beta$ -ラクタム剤同士の CEZ/IPM 併用が強い相乗効果を発揮する機作に関して現時点では明確ではない。予備的な成績から  $\beta$ -ラクタム低感受性の PBP 2' に対する結合における相乗効果ではなく、併用による溶菌の増強が関与する可能性が示唆された。これは、MRSA の  $\beta$ -ラクタム耐性の機作として PBP 2' に加え溶菌系の関与が考えられている<sup>29)</sup>ことと無関係ではないと考えられる。

以上、MRSA に対する CEZ/IPM 併用による相乗効果が *in vitro* だけでなく *in vivo* でも認められ臨床での有用性が予想されたが、実際に意味があるか否かは今後の臨床検討の成績を待たねばならない。また、本報告では CEZ と IPM の同時併用のみ検討したが、flomoxef と FOM 併用で報告されている<sup>30)</sup>ように併用順序により相乗効果の強さが変動することもあるので、CEZ と IPM の場合にも最大の併用効果を得るための投与方法に関してさらに明らかにする必要がある。

#### 文 献

- 1) 紺野昌俊: MRSA 感染症の発症の基盤と感染防止対策. 最新医学 44: 2544~2553, 1989
- 2) 横田 健: MRSA の耐性機構から見た対策. 順天堂医学 34: 334~342, 1988
- 3) 渡辺正治, 久保勢津子, 石山高子, 島山靖子, 斉藤知子, 高橋公毅, 菅野治重: 千葉大学附属病院における methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の分離状況—最近 5 年間の観察—. Chemotherapy 35: 467~475, 1987
- 4) Blumfitt W, Hamilton Miller J: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. New Engl. J. Med. 320: 1188~1196, 1989
- 5) Hackenbarch C J, Chambers H F: Methicillin-resistant staphylococci: detection methods and treatment of infections. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 995~999, 1989
- 6) Schaeffler S, Jones D, Perry W, Rubinskaya L, Baradet T, Mayr E, Wilson M E: Emergence of gentamicin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in New York city hospitals. J. Clin. Microbiol. 13: 754~759, 1981
- 7) Mandell G L, Moorman D R: Treatment of experimental staphylococcal infections: effect of rifampin alone and in combination on development of rifampin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 17: 658~662, 1980



- 8) Watanakunakorn C, Tisone J C: Synergism between vancomycin and gentamicin or tobramycin for methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 903~905, 1982
- 9) Alvarez S, Jones M, Berk S L: *In vitro* activity of fosfomycin alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 689~690, 1985
- 10) Walsh T J, Auger F, Tatem B A, Hansen S L, Standiford H C: Novobiocin and rifampin in combination against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* comparison with vancomycin plus rifampin. *J. Antimicrob. Chemother.* 16: 1~8, 1985
- 11) 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, 1986
- 12) 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
- 13) 吉川修身, 大島信一, 高江浩也, 大滝雅文, 中村隆二郎: Methicillin 耐性黄色ブドウ球菌に対する latamoxef と cefamandole の相乗効果—*in vitro* と臨床効果の検討—。 *化学療法の領域* 4: 105~110, 1988
- 14) 渡邊正人, 三橋 進, 井上松久: *Staphylococcus aureus* に対する cefpiramide と cefotetan の併用効果。 *Chemotherapy* 37: 406~411, 1989
- 15) 出口浩一, 横田のぞみ, 古口昌美, 中根 豊, 深山成美, 西村由記子, 小田清次: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する cefuzonam と arbekacin の抗菌併用作用—微量液体希釈法を利用した成績—。 *Chemotherapy* 37: 744~749, 1989
- 16) 井上松久, 橋本 一, 松井初江, 桜井奈津子, 大久保豊司: MRSA に対する cefazolin または ceftizoxime と imipenem との併用効果について。 *Chemotherapy* 37: 869~876, 1989
- 17) 井上松久, 大久保豊司, 橋本 一, 生方公子, 紺野昌俊: 黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性と病原性。第36回日本化学療法学会東日本支部総会, 1989
- 18) 日本化学療法学会 MIC 測定法検討委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 19) Ellion G B, Singer S, Hitchings G H: Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combination of biochemically related antimetabolites. *J. Biol. Chem.* 208: 477~488, 1954
- 20) 村川武雄, 上村利明, 岡田直彦, 坂本 博, 横田好子, 西田 実: 生体内濃度に simulate した *in vitro* model system における cephalosporin 類の殺菌作用。 *Chemotherapy* 25: 585~590, 1977
- 21) 山作房之輔, 鈴木康稔: Cefazolin とセファマイシン系薬剤 (cefmetazole, cefoxitin) の静脈内持続注入時の吸収排泄および薬動学的性状について。 *Chemotherapy* 29: 857~864, 1981
- 22) 中川圭一, 小山 優, 早瀬 清, 今朝洞忠孝: Imipenem (MK-0787), cilastatin sodium (MK-0791), MK-0787/MK-0791 臨床第一相試験。 *Chemotherapy* 33 (S-4): 357~378, 1985
- 23) Blass C I (Ed.): *Statistics of bioassays*, Academic Press Inc., New York, 1953
- 24) 横田好子, 池田文昭, 若井芳美, 松本 哲, 峯 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. 各種抗菌剤との併用効果。 *Chemotherapy* 35: 77~82, 1987
- 25) Santoro J, Levison M E: Rat model of experimental endocarditis. *Infect. Immun.* 19: 915~918, 1978
- 26) Craig W A: The postantibiotic effect, In "Antibiotics in Laboratory Medicine" ed. V. Lorian. pp. 515~536, Williams and Wilkins, New York, 1986
- 27) Chambers H F, Hackbarth C J, Drake T A, Rusnak M G, Sande M A: Endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rabbits: expression of resistance to beta-lactam anti-biotics *in vivo* and *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 149: 894~903, 1984
- 28) Forbes B A, McClatchey K D, Schaberg D R: Subinhibitory concentrations of imipenem induce increased resistance to methicillin and imipenem *in vitro* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 491~493, 1984
- 29) Qoronfleh M W, Wilkinson B J: Effects of growth of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* in the presence of  $\beta$ -lactam on peptidoglycan structure and susceptibility to lytic enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 250~257, 1986
- 30) 長谷川裕美, 渡辺忠洋, 柴田雄介, 菊池 賢, 深田智子, 片平潤一, 戸塚恭一, 清水喜八郎: MRSA 感染症における併用療法の投与方法についての検討。 *最新医学* 44: 2515~2521, 1989

IN VITRO AND IN VIVO SYNERGISM BETWEEN CEFAZOLIN AND IMPENEM  
AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Yuji Watanabe, Yoshimi Wakai, Kyoichiro Kuno, Kazuo Hatano,  
Hiroshi Sakamoto and Yasuhiro Mine

Product Development Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,  
2-1-6 Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

Matsuhisa Inoue

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

Synergism between cefazolin (CEZ) and imipenem (IPM) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was confirmed by (1) an *in vitro* checkerboard method, (2) in an *in vitro* kinetic model for the bactericidal test and (3) several experimental infection models for the protection test.

(1) A combination of CEZ and IPM synergistically inhibited 45 (83 %) of the 54 MRSA strains on agar by a checkerboard method. FIC indices for 25 of the 45 strains were 0.25 or lower and those for the remaining 20 strains ranged from 0.25 to 0.5. This synergism was also recognized in several culture conditions such as high inoculum (about  $10^8$  cfu/ml), low temperature (30°C) and supplement of 4 % NaCl.

(2) In an *in vitro* kinetic model simulating human plasma concentrations at their usual clinical doses of 2.0 g (CEZ) and 0.5 g (IPM), the bactericidal activity of CEZ and IPM in combination was by far stronger than that of each drug alone.

(3) Against systemic infection in normal mice the synergism was also recognized at a ratio of 4 : 1 or higher (CEZ to IPM). The FED indices for 6 of the 8 MRSA strains were not more than 0.5 (synergism) and those for the other strains were 0.57 and 0.63 (additive). This combination was also synergistically active against systemic and subcutaneous infections in neutropenic mice and endocarditis in rats.

The results suggest that the combination of CEZ and IPM is useful in treating refractory MRSA infections.