

# Vancomycin の *in vitro* 抗菌力の検討

永田 弘・東山伊佐夫・近藤 理枝・小松 良英  
塩野義製薬株式会社研究所\*

(平成3年9月2日受付・平成4年2月3日受理)

グリコペプチド系抗生物質 vancomycin の抗菌スペクトル、臨床分離株 (13 菌種、802 株) に対する MIC, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する MBC と生菌数におよぼす影響等を測定し、対照薬 (amoxicillin, cefazolin, flomoxef, imipenem, minocycline および ofloxacin) と比較した。その結果、本剤はグラム陽性細菌にのみ有効で広範囲なグラム陽性細菌 (ブドウ球菌, 連鎖球菌, 腸球菌およびグラム陽性の嫌気性菌等) の臨床分離株に 0.05 ~ 12.5  $\mu\text{g/ml}$  の MIC を示し、幾何平均 MIC 値は、0.17 ~ 1.55  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub> 値は、0.39 ~ 3.13  $\mu\text{g/ml}$  を与え、総じて優れた *in vitro* 抗菌力を示した。特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌を始めとする各種の薬剤耐性株に強い抗菌力を維持しており、その上メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に MIC 値に近似した MBC 値を保ち、殺菌速度は遅いが flomoxef や imipenem より明らかに強い殺菌力を示し、耐性化しにくいことも判明した。欧米で問題化している plasmid が介在する本剤への高度耐性化の兆しは我が国ではまだ認められなく、腸球菌の一部で MIC が 6.25 ~ 12.5  $\mu\text{g/ml}$  程度の低度耐性株が少数検出されるに留まっていた。

**Key words:** vancomycin, flomoxef, imipenem, minocycline, ofloxacin

Vancomycin (VCM) は米国 Eli Lilly 社が開発したグリコペプチド系抗生物質でその構造は Fig. 1 に示す通りである<sup>1-3)</sup>。本剤はすでに 1958 年より米国で臨床に使用されているが、特異な作用機作でグラム陽性細菌の細胞壁合成を阻害する<sup>4-6)</sup>ため、methicillin 耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を始め種々の薬剤耐性グラム陽性細菌に今なお有効なことから最近、再び注目されている。我々は本邦の臨床検査材料から分離された各種細菌に本剤がどのような抗菌力を発揮するのかを主要抗菌剤を対照薬として比較した。

## I. 材料および方法

### 1. 使用薬剤

塩酸バンコマイシン (VCM, Eli Lilly), amoxicillin (AMPC, 藤沢薬品), cefazolin (CEZ, 藤沢薬品), flomoxef (FMOX, 塩野義製薬) imipenem (IPM, 万有製薬), ofloxacin (OFLX, 第一製薬), minocycline (MINO, 武田薬品工業) などを使用した。

### 2. 抗菌力測定法

MIC は日本化学療法学会の定めた最小発育阻止濃度測定法<sup>9,10)</sup>に準じて行った。

増菌用培地としては主に Mueller-Hinton broth

(MHB, Difco) を用いたが *Streptococcus* 属と *Enterococcus* 属の菌株には非働化した馬血清を 5% (容積/容積) 添加した MHB を用いた。また、嫌気性菌には GAM broth (日水) を用いた。

感受性測定用培地としては大部分 Mueller-Hinton agar (MHA, Difco) を用いたが、*Staphylococcus* 属の場合には塩化ナトリウムを 0.5% (重量/容積)

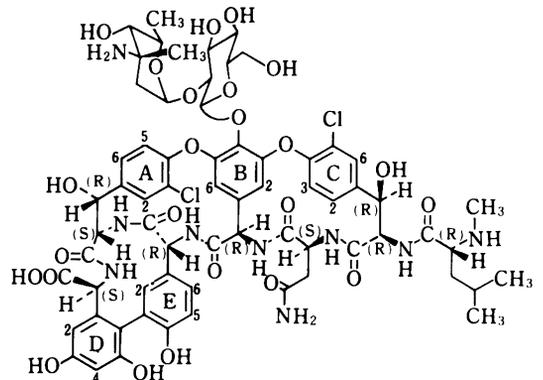


Fig. 1. Chemical structure of vancomycin.

添加したMAHを、*Streptococcus*属と*Enterococcus*属の菌株の場合には非働化した馬血清を5% (容積/容積)を添加したMHAを用いた。

また、嫌気性菌にはGAM agar (日水)を用いた。

接種菌液は増菌用培地で37°C、18~20時間培養した菌液を同培地でそれぞれ約10<sup>8</sup> CFU/mlになるように希釈して調整した。

この菌液1白金耳量(約1μl)を菌接種装置で感受性測定用培地の寒天平板上に点滴塗末し、好気性菌は37°Cで18~20時間培養後、嫌気性菌は嫌気培養装置(N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>=8:1:1)で37°C、24時間培養後、それぞれMICを判定した。

### 3. 被検黄色ブドウ球菌

黄色ブドウ球菌の臨床分離株はFMOXのMICが0.78 μg/ml以下の株をメチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)、同MICが1.56 μg/ml以上の株をメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)<sup>11)</sup>、OFLXのMICが12.5 μg/ml以上のMRSAをオフロキサシン耐性MRSA(OFLX<sup>r</sup>-MRSA)と区分して感受性を調べた。

### 4. 生菌数変化の測定法

MHBで調整した対数増殖期の*Staphylococcus aureus* SR 3626株菌液(7.5×10<sup>8</sup> CFU/ml)に2倍系列希釈濃度の被検薬剤を作用させ37°Cで静置培養しながら経時的にその一部を採取して生菌数を測定した。

### 5. 最小殺菌濃度(MBC)の測定法

臨床材料より分離したFMOXのMICが12.5 μg/ml以上のMRSA 20株を被検菌とした。

小試験管(15 mm×105 mm)の中で、2倍系列希釈濃度の被検薬剤を含むMHB(Difco)に対数増殖期の被検菌(同培地)を最終1.0~3.4×10<sup>8</sup> CFU/mlとなるように加えて37°Cで培養した。6および24時間後に各試験管より培養液を10 μlづつ採取してシャーレの中で10 mlのTrypto-soy agar(栄研)と混釈、37°Cで24時間培養後に認められたコロニー数を計測して生菌数を算出し、殺菌率が99.9%以下になる最小薬剤濃度を求めMBCとした。また、24時間後の生育状況を観察し生育を抑制する最小薬剤濃度を求め(broth) MICとした。

### 6. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

各種のグラム陽性菌を被検菌として抗菌力におよぼす培地、培地pH、接種菌量および馬血清添加の影響を寒天平板希釈法により測定した。

培地の影響は、Sensitivity Test agar (STA, 日水), MHA (Difco), MHA (栄研), Heart Infu-

sion agar (HIA, 日水), Tryptic Soy agar (TSA, Difco)について調べた。

培地pHの影響は、MHA (Difco)培地のpHをそれぞれ、5.5, 7.0および8.5になるように調整し、接種菌量の影響は、10<sup>8</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, および10<sup>8</sup> CFU/mlの菌液1白金耳をMHA (Difco)に接種し、また、馬血清の影響は非働化馬血清を20% (容積/容積)、あるいは50% (同)をMHA (Difco)に添加して調べた。

## 7. 試験管内耐性獲得試験法

MRSAであるSR 3626株を被検菌とし、培地はMHB (Difco)を用い継代培養により耐性獲得状況を調べた。継代は薬剤無添加の場合とほぼ同じ発育を示す濃度の薬剤を含むMHB培養液を接種菌量が約10<sup>8</sup> CFU/mlになるように、上述の培養液と同一の濃度およびそれより高濃度の薬剤を含むMHBへ移植して37°Cで24時間培養し、これを18回繰り返した。

## II. 実験成績

### 1. 抗菌スペクトル

本剤は各種の好気性グラム陽性細菌の標準株に0.20~1.56 μg/mlのMICを示し、特にMRSA、各種のコアグラーゼ陰性ブドウ球菌、連鎖球菌、および腸球菌にも優れた抗菌力を示した。連鎖球菌にはOFLXより強い抗菌力を示した(Table 1)。

嫌気性のグラム陽性細菌にも0.20~1.56 μg/mlの比較的低いMICを示し、*Clostridium difficile*には、FMOX, IPM, OFLXなどより強い抗菌力を示した(Table 2)。しかし、好気性、嫌気性を問わずグラム陰性細菌には抗菌力をほとんど示さなかった(Tables 1, 2)。

### 2. 臨床分離株に対する抗菌力

当研究所で保有する1978年より1988年の間に本邦各地で分離された各種グラム陽性臨床分離株(13菌種, 669株)に対して本剤のMICを寒天平板希釈法で測定した結果、本剤のMICは0.05~6.25 μg/mlに分布し、幾何平均MIC値は菌種毎に0.17~1.55 μg/ml, MIC<sub>90</sub>は0.39~3.13 μg/ml (Table 3)で、調べたすべての株の生育を6.25 μg/mlで阻止した。即ち、本剤はMSSAに対しては対照薬より弱いMRSAに対してMSSAに対すると同程度の抗菌力を保ち、IPM, FMOX, およびCEZより強い抗菌力を示した。その上、最近増加の傾向にあるOFLX耐性のMRSAにも強い抗菌力を保ち、IPM, FMOX, CEZ, およびOFLXなどより明らかに強い抗菌力を示した。

Table 1. Comparative antibacterial spectra of vancomycin and reference antibacterial agents against aerobic bacteria

Organism	Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
		VCM	CEZ	FMOX	IPM	OFLX
<i>S. aureus</i>	FDA 209 P JC-1	0.39	0.20	0.20	$\leq 0.006$	0.39
	ATCC 25923	0.78	0.39	0.39	0.025	0.39
	Smith	0.78	0.39	0.39	0.025	0.20
	3131*	0.78	12.5	3.13	0.10	0.20
	SR 1626*	0.78	100	6.25	0.78	0.20
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	0.78	0.39	0.78	0.025	0.39
<i>S. haemolyticus</i>	ATCC 29970	0.39	0.20	0.39	$\leq 0.006$	0.39
<i>S. warneri</i>	ATCC 27836	0.39	0.05	0.10	$\leq 0.006$	0.39
<i>S. pyogenes</i>	C-203	0.39	0.10	0.20	$\leq 0.006$	1.56
	ATCC 10389	0.39	0.10	0.20	$\leq 0.006$	0.78
<i>S. pneumoniae</i>	Type I	0.39	0.10	0.20	$\leq 0.006$	1.56
	Type II	0.20	0.20	0.20	$\leq 0.006$	1.56
	Type III	0.39	0.20	0.20	$\leq 0.006$	3.13
<i>S. agalactiae</i>	SR 1247	0.39	0.20	0.78	0.0125	1.56
<i>E. faecalis</i>	ATCC 19433	0.78	25	100	0.78	3.13
<i>E. faecium</i>	IFO 3181	0.78	>100	25	3.13	1.56
<i>B. subtilis</i>	PCI 219	0.20	0.20	0.39	0.025	0.05
<i>B. cereus</i>	IFO 3001	1.56	3.13	1.56	0.025	0.39
<i>B. anthracis</i>	SR 1005	0.78	0.78	1.56	0.025	0.20
<i>M. luteus</i>	ATCC 9341	0.39	1.56	0.10	0.025	1.56
<i>C. diphtheriae</i>	Tront	0.39	0.05	0.05	$\leq 0.006$	0.20
<i>E. coli</i>	NIH JJC-2	>100	1.56	0.05	0.10	0.05
	ATCC 25922	>100	1.56	0.05	0.10	0.05
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883	>100	1.56	0.05	0.39	0.10
<i>M. morgani</i>	IFO 3848	>100	25	0.39	0.78	0.05
<i>P. rettgeri</i>	IFO 3850	>100	0.78	0.10	0.78	0.10
<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047	>100	>100	25	0.20	0.05
<i>S. marcescens</i>	ATCC 13880	>100	>100	0.39	0.39	0.20
<i>C. freundii</i>	IFO 12681	>100	25	0.39	0.78	0.025
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 25619	>100	>100	>100	0.78	0.78
<i>P. cepacia</i>	ATCC 15416	>100	>100	25	3.13	3.13

MICs were measured by the agar dilution method using Mueller-Hinton agar (Difco). Inoculum size: one loopful of bacterial suspension containing  $10^6$  CFU/ml.

\*Methicillin-resistant strain.

VCM, vancomycin; CEZ, cefazolin; FMOX, flomoxef; IPM, imipenem; OFLX, ofloxacin.

同様なことはコアグラゼ陰性ブドウ球菌に対しても認められ、*Staphylococcus haemolyticus* や *Staphylococcus epidermidis* の IPM 耐性株、FMOX 耐性株および CEZ 耐性株に対しても強い抗菌力を示した (Table 3)。

また、各種連鎖球菌には幾何平均 MIC が 0.17~

0.56  $\mu\text{g/ml}$ 、MIC<sub>90</sub> が、0.39~0.78  $\mu\text{g/ml}$  と OFLX や MINO より強い抗菌力を示し (Table 4)、これらの OFLX 耐性株、MINO 耐性株、および AMPC 耐性株等に対しても感性株に対する場合と変わらぬ強い抗菌力を維持していた。

調べた 3 菌種の腸球菌に対して本剤は、幾何平均

Table 2. Comparative antibacterial spectra of vancomycin and reference antibacterial agents against anaerobic bacteria

Organism	Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		VCM	FMOX	IPM	OFLX
<i>C. difficile</i>	ATCC 9689	0.78	3.13	3.13	6.25
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	0.78	$\leq 0.0125$	0.10	0.39
<i>P. magnus</i>	ATCC 29328	0.39	0.05	0.025	0.39
<i>P. asaccharolyticus</i>	ATCC 14963	0.20	$\leq 0.0125$	0.025	12.5
<i>P. anaerobius</i>	ATCC 27337	0.78	0.10	0.05	0.78
<i>P. prevotii</i>	ATCC 9321	0.78	0.20	0.10	6.25
<i>P. micros</i>	GAI 5540	0.78	0.05	0.025	0.78
<i>S. saccharolyticus</i>	ATCC 14953	1.56	0.05	$\leq 0.0125$	0.39
<i>S. constellatus</i>	ATCC 27823	1.56	1.56	0.05	3.13
<i>P. acnes</i>	ATCC 11827	0.78	0.05	$\leq 0.0125$	0.78
<i>E. limosum</i>	ATCC 8486	1.56	0.20	0.05	1.56
<i>E. aerofaciens</i>	ATCC 25986	0.78	1.56	0.025	0.78
<i>V. parvula</i>	ATCC 10790	100	0.05	$\leq 0.0125$	0.78
<i>B. fragilis</i>	ATCC 25285	50	0.39	0.10	1.56
	GM 7000	25	0.39	0.10	1.56
<i>B. thetaiotaomicron</i>	WAL 3304	50	6.25	0.20	6.25
<i>B. vulgatus</i>	ATCC 29327	12.5	0.20	0.05	1.56
<i>B. ovatus</i>	VI-62	50	6.25	0.20	12.5
<i>F. varium</i>	ATCC 8501	>100	0.78	0.78	12.5
<i>F. necrophorum</i>	ATCC 25286	100	0.05	0.025	3.13
<i>F. nucleatum</i>	ATCC 25586	>100	0.10	0.05	1.56
<i>F. mortiferum</i>	ATCC 9819	>100	0.39	0.20	1.56

MICs were measured by the agar dilution method using GAM agar (Nissui). Inoculum size: one loopful of bacterial suspension containing  $10^8$  CFU/ml.

VCM, vancomycin; CEZ, cefazolin; FMOX, flomoxef; IPM, imipenem; OFLX, ofloxacin.

MIC が  $0.62 \sim 1.08 \mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub> が  $0.78 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$  と FMOX, IPM, MINO および OFLX などより強い抗菌力を示し (Table 5), これらの IPM 耐性株, AMPC 耐性株, MINO 耐性株, および OFLX 耐性株等に対しても, 感性株に対する抗菌力と同等の強い抗菌力を示した。これらの菌種では最近欧米で, plasmid の介在した本剤に対する高度耐性株が出現している<sup>12-21)</sup>ので本邦における腸球菌の VCM 感受性をさらに詳しく調べるため, 1989年7月から10月の間に東京総合臨床検査センターで分離された比較的新しい腸球菌臨床分離株について改めて本剤の MIC を対照薬と比較したところ Table 6 に明らかなように, *Enterococcus faecalis* に対する MIC は  $0.78 \sim 3.14 \mu\text{g/ml}$  に分布し, 幾何平均 MIC は  $1.56 \mu\text{g/ml}$  で調べたすべての株が AMPC や IPM と同様本剤に感受性を示した。これに対して, *Enterococcus faecium* の

場合には, OFLX, MINO, AMPC および IPM などに調べた株の, それぞれ, 48, 79, 81, および 83% が MIC が  $12.5 \mu\text{g/ml}$  以上の耐性を示し, 本剤に対しては, MIC が  $6.25 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$  の低度耐性株が 43 株中 3 株 (7%) 認められた (Table 6)。

*Enterococcus avium* はわずか 13 株しか調べられなかったが, この中に AMPC と, IPM に MIC が  $12.5 \mu\text{g/ml}$  以上の耐性を示す株が, それぞれ, 11 株と 7 株みられたのに対し, 本剤に対してはすべて  $1.56 \mu\text{g/ml}$  以下の MIC を与え感受性であった (Table 6)。

嫌気性菌の *C. difficile* に対する本剤の MIC は  $0.39 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$  に分布し, 幾何平均 MIC は  $0.77 \mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub> は  $0.78 \mu\text{g/ml}$  で FMOX, IPM, OFLX などより明らかに強い抗菌力を示した (Table 5)。

本剤の抗菌力を FMOX および IPM と比較すると,

Table 3. Comparative antibacterial activity of vancomycin and reference agents against clinical isolates of bacteria ( I )

Organism (no. of strain)	Agent	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
		range	50%	90%	mean	
MSSA (49)	vancomycin	0.78	0.78	0.78	0.78	
	cefazolin	0.20 ~ 3.13	0.78	0.78	0.57	
	flomoxef	0.39 ~ 0.78	0.39	0.78	0.47	
	imipenem	0.025 ~ 0.05	0.025	0.025	0.026	
	minocycline	0.10 ~ 1.56	0.10	0.20	0.11	
	ofloxacin	0.20 ~ 1.56	0.39	0.78	0.42	
MRSA (125)	vancomycin	0.78 ~ 1.56	0.78	0.78	0.80	
	cefazolin	1.56 ~ >100	100	>100	84.2	
	flomoxef	1.56 ~ >100	6.25	50	9.85	
	imipenem	0.05 ~ >100	1.56	50	1.45	
	minocycline	0.10 ~ 25	0.20	6.25	0.38	
	ofloxacin	0.20 ~ 50	0.39	1.56	0.64	
OFLX <sup>r</sup> -MRSA (37)	vancomycin	0.78 ~ 1.56	0.78	1.56	0.96	
	cefazolin	100 ~ >100	>100	>100	>100	
	flomoxef	3.13 ~ 100	25	100	32.5	
	imipenem	0.10 ~ 100	25	50	20.7	
	ofloxacin	12.5 ~ >100	25	50	27.5	
	<i>S. epidermidis</i> (60)	vancomycin	0.78 ~ 1.56	1.56	1.56	1.55
cefazolin		0.20 ~ 50	0.78	1.56	0.76	
flomoxef		0.39 ~ 50	1.56	3.13	1.64	
imipenem		0.013 ~ 50	0.10	12.5	0.12	
minocycline		0.10 ~ 1.56	0.39	1.56	0.41	
ofloxacin		0.20 ~ 0.78	0.39	0.78	0.49	
<i>S. haemolyticus</i> (43)	vancomycin	0.78 ~ 3.13	1.56	3.13	1.49	
	cefazolin	0.20 ~ >100	3.13	>100	6.56	
	flomoxef	0.39 ~ 100	3.13	25	2.88	
	imipenem	0.013 ~ >100	0.10	100	0.47	
	minocycline	0.20 ~ 25	0.39	6.25	0.42	
	ofloxacin	0.20 ~ 3.13	0.39	0.78	0.44	
<i>S. saprophyticus</i> (39)	vancomycin	0.39 ~ 1.56	0.78	1.56	0.84	
	cefazolin	0.39 ~ 100	0.78	3.13	1.22	
	flomoxef	0.39 ~ 12.5	0.78	1.56	0.74	
	imipenem	0.013 ~ 0.39	0.025	0.05	0.034	
	minocycline	0.20 ~ 0.39	0.20	0.39	0.22	
	ofloxacin	0.39 ~ 1.56	0.78	0.78	0.80	

MICs were determined by the agar dilution method using Mueller-Hinton agar (Difco) (inoculum size: one loopful of bacterial suspension containing  $10^8$  CFU/ml).

MSSA: methicillin-susceptible *S. aureus*.

MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*.

OFLX<sup>r</sup>-MRSA: ofloxacin-resistant MRSA.

mean: geometrical mean MIC.

Table 4. Comparative antibacterial activity of vancomycin and reference agents against clinical isolates of bacteria (II)

Organism (no. of strain)	Agent	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		range	50%	90%	mean
<i>S. pneumoniae</i> (33)	vancomycin	0.05 ~ 0.39	0.20	0.39	0.17
	flomoxef	0.025 ~ 0.39	0.10	0.20	0.10
	amoxicillin	0.013 ~ 0.025	0.013	0.025	0.015
	imipenem	0.013 ~ 0.025	0.013	0.013	0.013
	minocycline	0.05 ~ 25	1.56	6.25	1.14
	ofloxacin	0.39 ~ 3.13	1.56	3.13	1.32
<i>S. pyogenes</i> (30)	vancomycin	0.20 ~ 0.39	0.39	0.39	0.37
	flomoxef	0.10 ~ 0.39	0.20	0.39	0.20
	amoxicillin	0.013 ~ 0.025	0.013	0.025	0.014
	imipenem	0.013	0.013	0.013	0.013
	minocycline	0.05 ~ 12.5	0.10	6.25	0.25
	ofloxacin	0.78 ~ 3.13	1.56	1.56	1.16
<i>S. agalactiae</i> (56)	vancomycin	0.20 ~ 0.39	0.39	0.39	0.39
	flomoxef	0.39 ~ 3.13	0.39	0.78	0.58
	amoxicillin	0.025 ~ 0.39	0.10	0.10	0.093
	imipenem	0.013 ~ 0.05	0.013	0.013	0.013
	minocycline	0.10 ~ 50	25	50	5.59
	ofloxacin	0.78 ~ 6.25	1.56	3.13	1.73
<i>S. mitis</i> (17)	vancomycin	0.39 ~ 0.78	0.39	0.78	0.46
	flomoxef	0.20 ~ 50	1.56	12.5	1.56
	amoxicillin	0.025 ~ 25	0.20	3.13	0.31
	imipenem	0.013 ~ 1.56	0.05	0.39	0.053
	minocycline	0.10 ~ 50	0.39	25	1.33
	ofloxacin	0.78 ~ 12.5	1.56	3.13	2.17
<i>S. sanguis</i> (19)	vancomycin	0.39 ~ 0.78	0.78	0.78	0.56
	flomoxef	0.10 ~ 25	0.78	25	1.21
	amoxicillin	0.025 ~ 3.13	0.05	3.13	0.16
	imipenem	0.013 ~ 0.78	0.025	0.78	0.061
	minocycline	0.20 ~ 50	6.25	50	2.09
	ofloxacin	1.56 ~ 3.13	3.13	3.13	2.91

MICs were determined by the agar dilution method using Mueller-Hinton agar (Difco) (inoculum size: one loopful of bacterial suspension containing  $10^8$  CFU/ml).  
mean: geometrical mean MIC.

Table 3に明らかなようにOFLX耐性を含むMRSA, 各種腸球菌および嫌気性菌 *C. difficile* 等に対してFMOXやIPMより優れていた。連鎖球菌およびコアグラゼ陰性ブドウ球菌にはIPMより劣っていた。

### 3. 抗菌力におよぼす諸因子の影響

各種のグラム陽性細菌に対する本剤の抗菌力におよ

ぼす培地, 培地 pH, 接種菌量および馬血清添加の影響を調べた成績は以下のとおりである。

#### a. 培地の影響

本剤のMICを5種類の異なる寒天培地を使用して寒天平板希釈法により測定した。Table 7に示したように, 各被検菌に対するMICはいずれの培地においても2倍以内に収まり, 培地による本剤の抗菌力への

Table 5. Comparative antibacterial activity of vancomycin and reference agents against clinical isolates of bacteria (III)

Organism (no. of strain)	Agents	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
		range	50%	90%	mean	
<i>E. faecalis</i> (50)	vancomycin	0.78~ 3.13	0.78	3.13	1.08	
	flomoxef	25 ~ >100	100	>100	>100	
	amoxicillin	0.10~ 1.56	0.78	0.78	0.71	
	imipenem	0.10~ 3.13	0.78	1.56	1.03	
	minocycline	0.10~ 50	25	50	9.47	
	ofloxacin	0.78~ >100	3.13	50	3.96	
<i>E. faecium</i> (49)	vancomycin	0.39~ 3.13	0.78	0.78	0.62	
	flomoxef	6.25~ >100	25	>100	57.6	
	amoxicillin	0.10~ 100	1.56	50	3.65	
	imipenem	0.10~ >100	3.13	>100	9.16	
	minocycline	0.10~ 50	0.10	25	0.78	
	ofloxacin	0.78~ 100	3.13	12.5	4.45	
<i>E. avium</i> (21)	vancomycin	0.39~ 6.25	0.78	0.78	0.84	
	flomoxef	1.56~ 25	12.5	25	10.25	
	amoxicillin	0.10~ 25	0.78	12.5	1.42	
	imipenem	0.10~ 100	0.78	12.5	1.16	
	minocycline	0.05~ 25	12.5	25	7.37	
	ofloxacin	1.56~ 50	3.13	6.25	3.02	
<i>C. difficile</i> (41)	vancomycin	0.39~ 1.56	0.78	0.78	0.77	
	flomoxef	1.56~ 25	3.13	12.5	4.77	
	amoxicillin	0.20~ 3.13	0.78	1.56	7.56	
	imipenem	3.13~ 25	6.25	6.25	5.28	
	ofloxacin	6.25~ >100	12.5	12.5	12.1	

MICs were determined by the agar dilution method using Mueller-Hinton agar (Difco) for enterococci and GAM agar (Nissui) for *C. difficile*. Inoculum size: one loopful of bacterial suspension containing  $10^8$  CFU/ml.  
mean: geometrical mean MIC.

影響はほとんどないと考えられた。

#### b. 培地 pH の影響

pH を 5.5, 7.0 および 8.5 にそれぞれ修正した MHA を用いて本剤の MIC を測定した結果, 菌株によっては酸性側に比べてアルカリ側で本剤の MIC がかなり増大する場合もみられたが, 多くの場合著しい影響は受けなかった (Table 7)。

#### c. 接種菌量の影響

接種菌量を  $10^8$  CFU/ml の菌液 1 白金耳量から  $10^6$  CFU/ml の菌液 1 白金耳量に増やしても本剤の MIC の変動は 4 倍以内で影響を受けにくかった (Table 8)。

#### d. 馬血清添加の影響

MHA に馬血清を 20% (容積/容積) あるいは 50% (同) 添加しても本剤の MIC は 2~4 倍程度の変動で収まった (Table 8)。

以上の成績から本剤の抗菌力は, 培地, 培地 pH, 接種菌量および馬血清添加等の影響を受けにくいことが明らかとなった。

#### 4. 殺菌作用

多くの  $\beta$ -ラクタム剤に高度の耐性を示す *S. aureus* SR 3626 株 (MRSA) に VCM を作用させ, 生菌数におよぼす影響を FMOX や IPM と比べたところ, VCM は殺菌速度は遅いが FMOX や IPM より明らかに優れた殺菌力を示した (Fig. 2)。

臨床検査材料から分離された FMOX や IPM に高

Table 6. Susceptibility of recent clinical isolates of enterococci to vancomycin and reference antibacterial agents

Enterococcal species	Antibacterial agents	Distribution of MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )										Mean MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100			>100
<i>E. faecalis</i> (78)	vancomycin			6	60	12							1.56	3.13
	imipenem			45	31	2							1.07	1.56
	amoxicillin		20	56	2								0.67	0.78
	minocycline		33			1	2	1	28	12	1		4.54	50
	ofloxacin				11	53	9			4	1		3.70	6.25
<i>E. faecium</i> (42)	vancomycin			39			2	1					0.92	0.78
	imipenem			1	3	3		1	1	6	15	12	52.54	>100
	amoxicillin		3	3	1		1		21	10	3		17.10	50
	minocycline	3		3		1	2	6	23	4			11.90	25
	ofloxacin				4	13	5	2	4	6	4	4	12.71	50
<i>E. avium</i> (13)	vancomycin			7	6								1.08	1.56
	imipenem			1	2	2	1		3	1	3		11.85	100
	amoxicillin			2				8	3				9.58	25
	minocycline			1			3	4	5				11.24	25
	ofloxacin					12	1						3.30	3.13

MICs were measured by the agar dilution method using Mueller-Hinton agar (Difco). Inoculum size: one loopful of bacterial suspension containing  $10^6$  CFU/ml.

Table 7. Effect of assay medium and medium pH on the antibacterial activity of vancomycin using the agar dilution method

Organism	Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of vancomycin on					MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of vancomycin on MHA-D at		
		MHA-D	MHA-E	STA	HIA	TSA	pH 5.5	pH 7.0	pH 8.5
<i>S. aureus</i>	209 P JC-1	0.39	0.39	0.39	0.78	0.39	0.20	0.39	1.56
	ATCC 25923	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56	0.78	0.78	1.56
	SR 2030	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.39	0.39	0.78
	SR 3626	0.39	0.39	0.39	0.78	0.78	0.39	0.39	0.78
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78	0.78
<i>S. haemolyticus</i>	ATCC 29970	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.39	0.78	0.78
<i>B. cereus</i>	IFO 3001	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.39	0.78	1.56
<i>E. faecalis</i>	ATCC 19433	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.39	0.78	1.56
<i>E. faecium</i>	ATCC 8043	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56

MHA-D: Mueller-Hinton agar (Difco).

MHA-E: Mueller-Hinton agar (Eiken).

STA: Sensitivity Test agar (Nissui).

HIA: Heart Infusion agar (Difco).

TSA: Tryptic Soy agar (Difco).

MICs were measured by the agar dilution method (inoculum size: one loopful of bacterial suspension containing  $10^6$  CFU/ml).

度耐性を示す MRSA (20 株) に対する VCM の MBC (24 時間作用時) の分布は  $1.56\sim 6.25 \mu\text{g/ml}$  で同剤の MIC 値と近似していた。また、VCM の MBC 値は FMOX や IPM の MBC 値より著しく低く、分布

範囲も狭かった (Fig. 3)。

24 時間作用させた時の幾何平均 MBC 値は  $1.99 \mu\text{g/ml}$  と幾何平均 MIC 値 ( $1.73 \mu\text{g/ml}$ ) と接近しており FMOX や IPM の幾何平均 MBC 値 (FMOX

Table 8. Effect of inoculum size and horse serum on the antibacterial activity of vancomycin

Organism	Strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of vancomycin at inoculum size				MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of vancomycin on MHA with horse serum		
		$10^6$	$10^8$	$10^7$	$10^8$	0%	20%*	50%*
<i>S. aureus</i>	209 P JC-1	0.39	0.39	0.39	0.78	0.39	0.78	1.56
	ATCC 25923	0.78	0.78	0.78	1.56	0.78	1.56	1.56
	Smith	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56
	SR 3626	0.39	0.39	0.78	1.56	0.39	0.78	0.78
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	0.78	0.78	0.78	1.56	0.78	0.78	1.56
<i>S. haemolyticus</i>	ATCC 29970	0.39	0.39	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56
<i>B. cereus</i>	IFO 3001	0.78	0.78	1.56	1.56	0.78	1.56	3.13
<i>E. faecalis</i>	ATCC 19433	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56
<i>E. faecium</i>	IFO 3181	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56

MICs were measured by the agar dilution method using Mueller-Hinton agar (Difco).

\*Volume per volume %.

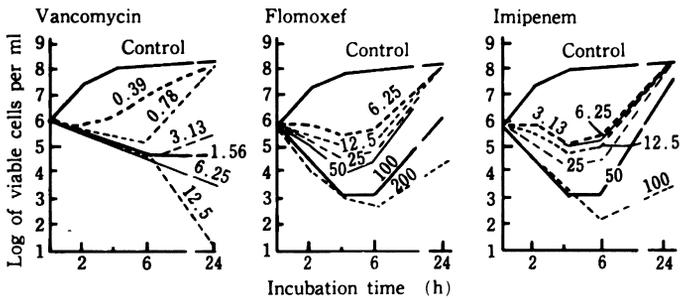


Fig. 2. Comparative bactericidal activity of vancomycin, flomoxef and imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain SR 3626.

The figures represent final concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) of the antibiotics added.

>200  $\mu\text{g/ml}$ , IPM 123  $\mu\text{g/ml}$ ) よりかなり小さく優れた殺菌力を有していることが明らかとなった。しかし、作用6時間でのMBC値はいずれも100  $\mu\text{g/ml}$ 以上であったことから、本剤の殺菌速度は遅いことも判明した (Fig. 3)。Fig. 2の生菌数の経時変化もこれを支持していた。

### 5. 試験管内耐性獲得

MRSAであるSR 3626株を18代にわたって薬剤増量継代培養を行ったが耐性度は8倍の上昇に留まり、本MRSAは本剤に耐性化しにくい傾向にあることが判明した (Fig. 4)。

### III. 考 察

本邦の広範囲のグラム陽性細菌の臨床分離株に対して、VCMは幾何平均MICが0.17~1.55  $\mu\text{g/ml}$ 、

MIC<sub>90</sub>が0.39~3.13  $\mu\text{g/ml}$ と強い抗菌力を示した。特に種々の抗菌剤に耐性化した臨床分離株に有効で、本剤は黄色ブドウ球菌やコアグラゼ陰性のブドウ球菌の種々の薬剤に対する耐性株に対して感性株と変わらぬ強い抗菌力を示した。そして、本剤はMRSAにFMOXやIPMより明らかに強い殺菌力を示した。その上、MRSA株は本剤に耐性化しにくい傾向を示した。

これらの結果は、各種耐性ブドウ球菌による感染症、たとえば、敗血症、心内膜炎、骨髄炎、関節炎、熱傷・手術創などの表在性二次感染、肺炎、肺化膿症、膿胸、腹膜炎、および髄膜炎などの治療に有効である可能性を示唆しているように思われる。

さらに、本剤は各種の連鎖球菌および腸球菌にも強

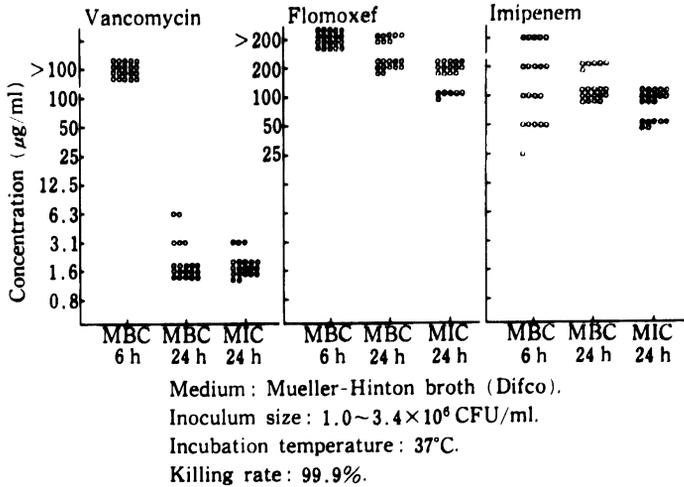


Fig. 3. MBC against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (20 strains).

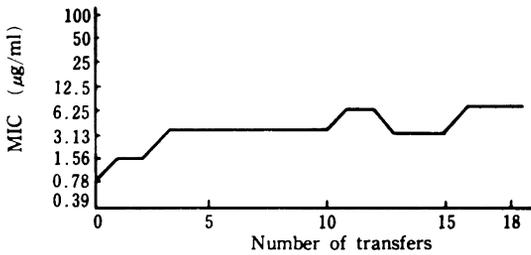


Fig. 4. Development of resistance to vancomycin by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain SR 3626.

い抗菌力を示し、かつ、これらの IPM<sup>-</sup>、MINO<sup>-</sup>、AMPC<sup>-</sup> および OFLX<sup>-</sup> 耐性株にそれぞれ有効であった。

最近欧米では腸球菌の中に plasmid によって仲介される VCM 高度耐性株が出現している<sup>12-21)</sup>が、本邦においてはまだこの兆候はみられなく、*E. faecium* と *E. avium* に MIC が 6.25~12.5 µg/ml 程度の VCM 低度耐性株が少数みられただけであった。

本剤は嫌気性グラム陽性細菌にも有効で、*C. difficile* の臨床分離株に対して FMOX、IPM、および OFLX 等より強い抗菌力を示した。

#### 謝 辞

本研究に当たり、貴重な腸球菌臨床分離株を多数分与下された東京総合臨床検査センターの出口浩一先生に深謝致します。

#### 文 献

- 1) Sheldrick G M, Jones P G, Kennard O, Williams D H, Smith G A: Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-alanine. *Nature*. 271: 223~225, 1978
- 2) McCornick M H, Stark W M, Pittenger G E, Pittenger R C, McGuire J M: Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. In *Antibiotics Annual 1955~1956* (Welch H, and Marli-Ibanez F ed.), pp.606~611, Medical Encyclopedia, Inc., New York, 1956
- 3) Williamson M P, Williams D H: Structure revision of the antibiotic vancomycin. The use of nuclear Overhauser effect difference spectroscopy. *J Am Chem Soc* 103: 6580~6585, 1981
- 4) Watanakunakorn C: The antibacterial action of vancomycin. *Rev Infect Dis* 3 (supplement): s 210~215, 1981
- 5) Jordan D C, Inniss W E: Selective inhibition of ribonucleic acid synthesis in *Staphylococcus aureus* by vancomycin. *Nature (London)* 184: 1894~1895, 1959
- 6) Nieto M, Perkins H R: Modifications of the acyl-D-alanyl-D-alanine terminus, affecting complex-formation with vancomycin. *Biochem J* 123: 789~803, 1971
- 7) Barna J C J, Williams D H: The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu Rev Microbiol* 38: 339~357, 1984
- 8) Nagarajan R: Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 605~

- 609, 1981
- 9) 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
  - 10) 嫌気性菌 MIC 測定検討委員会: 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 27: 559~560, 1979
  - 11) 村上和久, 南出和喜夫, 和田浩司, 中村悦男, 寺岡宏, 渡辺幸彦: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の PCR 法による同定. *臨床病理* 39: 1325~1330, 1991
  - 12) Leclercq R, Derlot E, Duval E, Courvalin P: Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New Engl J Med* 319: 157~161, 1988
  - 13) Uttely A H, Collins C H, Naidoo J, George R C: Vancomycin-resistant enterococci, *Lancet* 1: 57~58, 1988
  - 14) Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, Courvalin P: Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 10~15, 1989
  - 15) Williamson R, Al-Obeid S, Shlaes J H, Goldstein F W, Shlaes D M: Inducible resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D 366. *J Infect Dis* 159: 1095~1194, 1989
  - 16) Shlaes D M, Bouvet A, Devine C, Shlaes J H, Al-Obeid S, Will-iamson R: Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecalis* A 256. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 198~203, 1989
  - 17) Nicas T I, Wu C Y E, Hobbs Jr J N, Preston D A, Allen N E: Characterization of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1121~1124, 1989
  - 18) Al-Obeid S, Collatz E, Gutmann L: Mechanism of resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D 366 and *Enterococcus faecalis* A 256. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 252~256, 1990
  - 19) Handwerker S, Kalokathis A: Induction of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* by inhibition of transglycolation. *FEMS Microbiol Lett* 70: 167~170, 1990
  - 20) Knox J R, Pratt R F: Different modes of vancomycin and D-alanyl-D-alanine peptidase binding to cell wall peptide and a possible role for the vancomycin resistance protein. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 1342~1347, 1990
  - 21) Bugg T D H, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh C T: Identification of vancomycin resistance protein Van A as a D-alanine: D-alanine ligase of altered substrate specificity. *Biochem* 30: 2017~2021, 1991

## IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF VANCOMYCIN

Hiroshi Nagata, Isao Higashiyama, Rie Kondoh  
and Yoshihide Komatsu

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.,  
Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

The *in vitro* activity of the glycopeptide antibiotic vancomycin was determined against 802 clinical isolates of aerobic and anaerobic gram-positive bacteria, including strains highly resistant to many of the antibacterial agents currently available. Vancomycin was highly active against resistant strains of staphylococci, streptococci, and enterococci, which produce severe infections, and had a very narrow range of inhibitory values for most species. All *Staphylococcus aureus* resistant to cefazolin, flomoxef, imipenem, minocycline and/or ofloxacin were inhibited by 1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of vancomycin. It was also active against coagulase-negative staphylococci resistant to the above antibacterial agents. It strongly inhibited minocycline-resistant strains of various streptococci and enterococci, and imipenem-, amoxicillin- and/or ofloxacin-resistant strains of enterococci. The antibacterial activity of vancomycin was not significantly affected by assay-media, medium pH, inoculum size or the addition of horse serum. The bactericidal activity of vancomycin against cephem-resistant strains of *S. aureus* was much greater than that of imipenem or flomoxef. Laboratory-induced resistance of *S. aureus* SR 3626, an MRSA, occurred in a very slow, stepwise fashion.