

MRSA と緑膿菌の混合感染における vancomycin と ceftazidime の併用効果

長岐為一郎・森田 健・田口 邦夫・田村 忍
富田 晃代・伊藤 香織・荻野久美子・福田 一郎
日本グラクソ株式会社研究開発本部筑波研究所開発研究センター*

(平成 5 年 5 月 28 日受付・平成 5 年 8 月 31 日受理)

MRSA と緑膿菌の混合感染における vancomycin (VCM) と ceftazidime (CAZ) の併用治療効果を *in vitro* および *in vivo* の両面から検討した。*In vitro* では checker board 法により FIC index を求めた。その結果、両剤の併用では拮抗作用は認められず、いずれの場合にも相加効果が認められた。*In vivo* では腹腔内感染マウスに対する治療効果を検討した。全マウスが死亡する量の MRSA と少量の緑膿菌を混合感染させ、VCM 単独で治療した場合に MRSA から緑膿菌への菌交代現象が観察された。この菌交代モデルに対する併用治療効果を検討した結果、緑膿菌 NG 91003 株では単独感染における CAZ の ED₅₀ が 0.07 mg/mouse であったのに対し、混合感染において 0.3 mg/mouse の VCM と併用した場合にその ED₅₀ は 0.02 mg/mouse に低下した。緑膿菌 NG 91012 株では単独感染に対する CAZ 単独の ED₅₀ と、混合感染に対して同量の VCM と併用した時の ED₅₀ にほとんど差はなくそれぞれ 0.04 および 0.05 mg/mouse であった。また、菌交代モデルにおける血中菌数の推移も測定したが、VCM あるいは CAZ の単独治療ではそれぞれ緑膿菌あるいは MRSA の増殖が確認され、両剤の併用では MRSA および緑膿菌ともに減少または消失した。以上のように、MRSA と緑膿菌の混合感染に対して VCM と CAZ の併用は *in vitro* および *in vivo* において相加効果が認められ、臨床で頻繁に認められるこの混合感染に対して有効な併用療法の 1 つであると考えられた。

Key words: MRSA, 緑膿菌, 混合感染, 併用治療

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は多剤耐性で院内感染の重大な起因菌として注目されている¹⁾。Vancomycin (VCM) は MRSA に対する抗菌力が強く臨床的にも有用である。しかし、ほとんどのグラム陰性菌に対して抗菌力を示さないため菌交代症が問題となっており、特に MRSA から緑膿菌への菌交代症は臨床でも頻繁に認められている²⁾。

実験感染モデルにおいて複数菌の混合感染に対する単剤の治療効果を検討した報告^{3,4)}、あるいは耐性菌の単独感染に対する多剤併用療法による報告⁵⁻⁷⁾は多く見られるが、複数菌の混合感染に対する複数薬剤の併用治療の検討はいまだ報告されていない。そこで、現在もっとも注目されている感染症の 1 つである MRSA から緑膿菌への菌交代に着目し、複数菌の混合感染に対する併用治療効果を検討した。

抗 MRSA 剤としては VCM を、抗緑膿菌剤としては ceftazidime (CAZ) を選択し *in vitro* および *in vivo* の

両面から併用効果を検討し臨床応用への可能性を考察した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

In vitro の検討においては当研究所保有の臨床分離 MRSA 19 株および緑膿菌 20 株を使用した。MRSA は oxacillin に対する MIC が 4 µg/ml 以上であることを基準として選択した。*In vivo* の検討では *in vitro* での検討に使用した株のうち、MRSA は任意に選択して検討した 5 株のうちもっともマウスに対する毒性が強かつ再現性の良い致死活性を示した NG 89003 株 (LD₅₀ = 3.1 × 10⁷ CFU/mouse) を、緑膿菌も同様に検討した 5 株のうち CAZ 感受性でかつマウスに対する毒性が強い株として NG 91003 (LD₅₀ = 2.5 × 10⁴ CFU/mouse) および NG 91012 株 (LD₅₀ = 7.3 × 10³ CFU/mouse) を用いた。

なお、*in vivo* の検討に使用した MRSA NG 89003

* 茨城県つくば市和台 43 番地

株の性状はコアグラゼII型, TSST-1産生, エンテロトキシンC型であった。

2. 使用薬剤

Vancomycin (VCM, 950 $\mu\text{g}/\text{mg}$; 塩野義製薬) および ceftazidime (CAZ, 850 $\mu\text{g}/\text{mg}$; 日本グラクソ) を用いた。

3. 使用動物

5週齢のICR系雄性マウス(日本SLC), 平均体重22.9g(18.8g~31.5g)を1群8匹として用いた。ただし血中菌数の推移は1群5匹で検討した。

4. MICの測定

MICは Ca^{2+} , Mg^{2+} 加Mueller-Hinton broth (DIFCO)を用い日本化学療法学会標準法⁹⁾に準じ微量液体希釈法により測定した。

5. *In vitro* 併用効果

Fractional inhibitory concentration (FIC) indexをchecker board法¹⁰⁾により求めた。すなわち, 96ウェルのマイクロプレートに単剤および2剤併用の2倍希釈系列を作製し, 一夜培養した寒天平板から採取した被験菌を 10^4 CFU/wellとなるように接種し, 35°C で18時間培養した。各薬剤単独と2剤併用した時のMICからFIC indicesを求め, その最小値を2剤併用時のFIC indexとした。混合菌液に対するFIC indexはそれぞれ 10^4 CFU/wellとなるように接種したプレートを用い, どちらか一方のみが発育する部分から単独菌液の場合と同様にFIC indexを求めた。FIC index ≤ 0.5 の場合に相乗効果あり, $0.5 < \text{FIC index} \leq 1.0$ の場合に相加効果あり, $1.0 < \text{FIC index} \leq 2.0$ の場合に不関, $2.0 < \text{FIC index}$ の場合に拮抗作用ありと併用効果を判定した。

6. *In vivo* 併用効果

普通寒天培地で18時間培養した各菌体を生理食塩液に採取し, 5%ムチン溶液に添加して目的の濃度の菌液を調製し, その菌液0.5mlをマウス腹腔内に感染させ, 感染後5日目の生存率からWeil法によりLD₅₀(50%致死量)あるいはED₅₀(50%有効量)を算出した。攻撃菌量および治療薬剤用量は公比3~5として投与した。治療は感染1時間後に薬剤0.2mlを皮下投与して実施した。

1) 混合感染(菌交代)モデルの作製および併用治療効果

2×10^8 CFU/mouseのMRSA(全マウスが死亡する菌量)と種々濃度の緑膿菌を混合感染させ, 0.3 mg/mouseのVCM(MRSA単独感染に対して全マウスを生存させる投与量)で治療した場合の緑膿菌のLD₅₀を求め単独感染時の値と比較した。この条件下

においてマウスが100%死亡する条件, すなわちVCM単独治療では緑膿菌が増殖してマウスが100%死亡する条件を菌交代モデルとした。この菌交代モデルを用い, 同容量のVCMと種々濃度のCAZを併用し, CAZのED₅₀を求めて単独感染時の値と比較した。

2) マウスの血中菌数の推移

菌交代モデルに対するVCMとCAZの併用治療における血中菌数の推移を無治療, VCMあるいはCAZの単独治療と比較した。菌液投与後1, 3, 5, 8, 24時間目に個体別に心臓採血し, マンニット食塩培地あるいはマッコンキー培地に塗布し菌種別に生菌数を測定し, 菌の増減により死亡原因菌を推定した。

II. 実験成績

1. *In vitro* 併用効果

MRSA単独および緑膿菌単独に対する成績をTable 1に示した。MRSAに対する最小FIC indexは0.56から1.02(平均0.942)の範囲で, いずれの株においてもおたがいの抗菌活性を阻害する作用は認められず, 不関あるいは相加効果を示した。また, 緑膿菌に対するFIC indexは0.37から1.00(平均0.648)で, 緑膿菌では相乗効果あるいは相加効果が認められた。

MRSA NG 89003株と緑膿菌 NG 91012株の混合菌液に対する併用効果をFig. 1に示した。VCMの低濃度域ではMRSAの増殖が, CAZの低濃度域では緑膿菌の増殖がそれぞれ認められ, MRSAに対する最小FIC indexは1.0, 緑膿菌に対する最小FIC indexは0.63であり混合菌液としてもそれぞれ相加効果が認められた。現実には到達し得る血中濃度範囲(0.1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)ではすべて $1.0 < \text{FIC index} < 2.0$ で不関と判定され拮抗作用は認められなかった。

他の4株の緑膿菌(NG 91003, 91009, 91015および91018)についても同様に混合菌液での併用効果を検討し, その結果をTable 2に示した。4株ともにNG 91012株と同様にFIC indexが1以下であり相乗あるいは相加効果が認められた。

2. *In vivo* 併用効果の検討

1) 単独感染に対する治療効果

それぞれの単独感染に対するVCMおよびCAZ単剤の治療効果(ED₅₀)をTable 3に示した。MRSAに対するVCMのED₅₀は0.09 mg/mouseであった。このMRSAに対してCAZは検討した最高濃度の10 mg/mouseで無効であった。緑膿菌に対するCAZのED₅₀はNG 91003株で0.07 mg/mouse, NG 91012株で0.04 mg/mouseであった。これらの緑膿菌に対

Table 1. The MICs of vancomycin (VCM) and ceftazidime (CAZ) and FIC indices of the VCM/CAZ combination against MRSA (19 strains) and *Pseudomonas aeruginosa* (20 strains)

MRSA				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Strain no.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		FIC index	Strain no.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		FIC index
	VCM	CAZ			VCM	CAZ	
NG 89003	1.56	400	0.75	NG 91001	6,400	3.13	0.75
NG 89004	1.56	400	1.00	NG 91002	6,400	1.56	0.50
NG 89005	3.13	400	1.02	NG 91003	12,800	1.56	1.00
NG 89008	3.13	400	1.00	NG 91004	12,800	3.13	0.75
NG 89016	0.78	400	1.00	NG 91005	6,400	50	0.38
NG 89017	1.56	200	1.00	NG 91006	12,800	1.56	0.75
NG 89029	3.13	400	1.00	NG 91007	12,800	1.56	1.00
NG 89031	1.56	200	1.02	NG 91008	6,400	400	0.56
NG 89035	3.13	200	1.00	NG 91009	6,400	1.56	0.75
NG 89037	3.13	400	1.02	NG 91010	6,400	3.13	0.50
NG 89041	1.56	800	1.00	NG 91011	12,800	12.5	0.75
NG 89045	1.56	400	1.00	NG 91012	12,800	3.13	0.63
NG 89046	3.13	400	0.75	NG 91013	12,800	3.13	0.63
NG 89047	3.13	400	0.75	NG 91014	3,200	3.13	0.75
NG 91005	1.56	400	1.00	NG 91015	6,400	100	0.50
NG 91011	1.56	400	1.00	NG 91017	12,800	3.13	0.37
NG 91013	3.13	400	0.56	NG 91018	12,800	0.78	0.75
NG 91024	3.13	200	1.00	NG 91019	12,800	3.13	0.50
NG 91036	1.56	400	1.02	NG 91021	12,800	6.25	0.53
		Mean \pm SD	0.942 \pm 0.129	NG 91023	6,400	1.56	0.63
						Mean \pm SD	0.648 \pm 0.175

Inoculum size: 10^4 CFU/well

VCM: vancomycin, CAZ: ceftazidime.

FIC index: minimum fractional inhibitory concentration index.

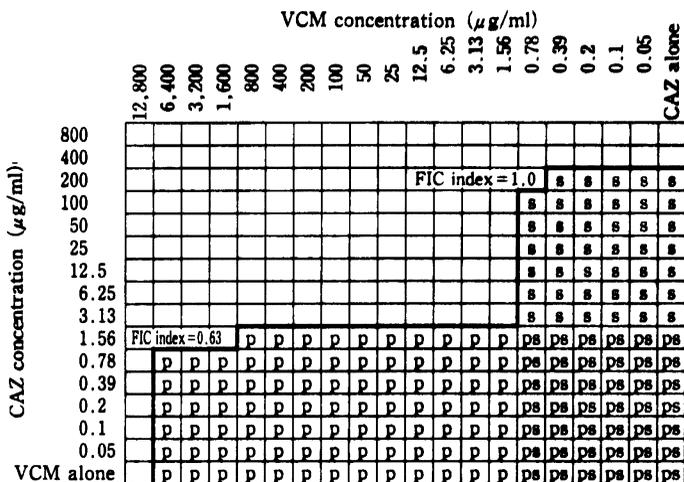
する VCM の治療効果は詳細には検討しなかったが、0.3 mg/mouse (MRSA に対する ED_{50} の約 3 倍量) ではまったく無効であった。

2) 混合感染モデルの作製

2×10^8 CFU/mouse (LD_{50} の約 7 倍量) の MRSA と種々濃度の緑膿菌で混合感染し、0.3 mg/mouse の VCM (MRSA 単独感染に対して全マウスを生存させる投与量) で治療した時の 2 株の緑膿菌について

LD_{50} を求め、Table 4 に示した。それぞれの LD_{50} は NG 91003 株で 2.6×10^3 CFU/mouse, NG 91012 株で 5.0×10^2 CFU/mouse で、2 株とも単独感染時の LD_{50} に比べ低く、NG 91003 株では 1/10, NG 91012 株では 1/14 に低下した。この時に VCM 単独治療では全マウスが死亡する量の緑膿菌を混合感染させた条件を菌交代モデルとした。

3) 混合感染における治療効果



Inoculum size: 10⁴ CFU/well (both MRSA and *P. aeruginosa*)
 Medium: Mueller-Hinton broth
 s: Growth of MRSA NG 89003
 p: Growth of *P. aeruginosa* NG 91012
 VCM: vancomycin, CAZ: ceftazidime.
 FIC index: minimum fractional inhibitory concentration index.

Fig. 1. *In vitro* combined effect of vancomycin plus ceftazidime on a polymicrobial suspension of MRSA and *Pseudomonas aeruginosa*.

Table 2. FIC indices of the vancomycin/ceftazidime combination in polymicrobial suspensions

Organism		FIC index against MRSA	FIC index against <i>P. aeruginosa</i>
MRSA	<i>P. aeruginosa</i>		
NG 89003	NG 91003	1.0	0.63
	NG 91009	1.0	0.56
	NG 91012	1.0	0.63
	NG 91015	0.75	0.50
	NG 91018	0.75	1.0
Mean ± SD		0.900 ± 0.137	0.664 ± 0.196

One strain of MRSA and five strains of *P. aeruginosa* were used.
 Inoculum size: 10⁴ CFU/well (both MRSA and *P. aeruginosa*)
 VCM: vancomycin, CAZ: ceftazidime.
 FIC index: minimum fractional inhibitory concentration index.

MRSA NG 89003 株と緑膿菌 NG 91012 株とを混合感染させた菌交代モデルを用いて治療効果を検討した結果を Table 5 に示した。

VCM と種々濃度の CAZ で併用治療した場合に CAZ の投与量に依存して生存率が上昇し、CAZ の

ED₅₀ は NG 91003 株で 0.05 mg/mouse, NG 91012 株で 0.024 mg/mouse, NG 91003 株では単独感染時の約 1/3, NG 91012 株ではほぼ同等の値であった。なお、VCM あるいは CAZ 単独で治療した場合にはマウスは 100% 死亡した。

Table 3. Protective effect of vancomycin and ceftazidime in mice (monomicrobial infection)

Strain	Challenge dose (CFU/mouse)	ED ₅₀ (mg/mouse)	
		VCM	CAZ
MRSA NG 89003	2.6×10 ⁸	0.09	>10
<i>P. aeruginosa</i> NG 91003	2.2×10 ⁸	NT	0.07
<i>P. aeruginosa</i> NG 91012	1.2×10 ⁸	NT	0.04

Mice were infected monomicrobially with the individual strain and then treated with monotherapy using the individual antibiotics.

NT: Not tested

VCM: vancomycin, CAZ: ceftazidime.

ED₅₀: 50% effective dose

Table 4. LD₅₀ of *Pseudomonas aeruginosa* in mice (monomicrobial or polymicrobial infection)

<i>P. aeruginosa</i> strain	LD ₅₀ (CFU/mouse)	
	monomicrobial infection	polymicrobial infection
NG 91003	2.5×10 ⁴	2.6×10 ⁸
NG 91012	7.3×10 ⁸	5.0×10 ⁸

LD₅₀ of *P. aeruginosa* in polymicrobial infection was determined using the mice which had been infected with MRSA (at dose of 7×LD₅₀) and various doses of *P. aeruginosa* and then treated with VCM monotherapy.

VCM: vancomycin, CAZ: ceftazidime.

Table 5. Protective effect of ceftazidime in the superinfection model

MRSA		<i>P. aeruginosa</i>		ED ₅₀ of CAZ (mg/mouse)
strain no.	challenge dose (CFU/mouse)	strain no.	challenge dose (CFU/mouse)	
NG 89003	2.8×10 ⁸ (9×LD ₅₀)	NG 91003	2.8×10 ⁴ (11×LD ₅₀)	0.024
	2.8×10 ⁸ (9×LD ₅₀)	NG 91012	4.7×10 ⁸ (9×LD ₅₀)	0.05

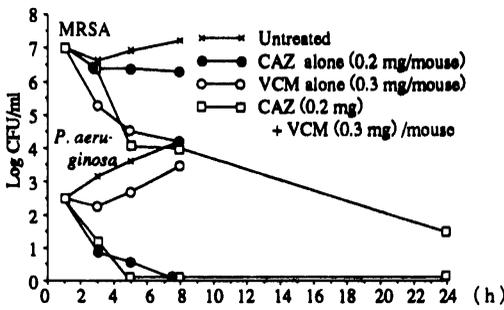
ED₅₀ of CAZ was determined using the mice which had been infected polymicrobially with MRSA and *P. aeruginosa* (at above doses) and then treated with a combination of VCM (0.3 mg/mouse) plus various doses of CAZ.

VCM: vancomycin, CAZ: ceftazidime.

ED₅₀: 50% effective dose

4) 混合感染時の血中菌数の推移
治療効果を検討したものと同条件の菌交代モデルを用い、血中菌数の経時的推移を検討した結果を Fig. 2 に示した。

無治療群では治療直前(感染1時間後)には MRSA が 1.1×10^7 CFU/ml, 緑膿菌が 3.2×10^2 CFU/ml の血中菌数であったものが, 8時間後には MRSA が 1.6×10^7 CFU/ml, 緑膿菌が 1.6×10^3



Mice were challenged polymicrobially and treated with monotherapy or combination therapy 1 hour after the challenge. Blood samples were taken from the mice at 1, 3, 5, 8 and 24 hours. Viable organisms in the blood were counted using appropriate selective media.

Challenge dose: MRSA NG 89003; 2.6×10^8 CFU/mouse, *P. aeruginosa* NG 91012; 5.7×10^8 CFU/mouse.

Treatment: CAZ; 0.2 mg/mouse, VCM; 0.3 mg/mouse
VCM: vancomycin, CAZ: ceftazidime.

Fig. 2. Transition of viable organisms in blood in the superinfection model.

CFU/mlに増殖し、マウスは24時間以内に全例死亡した。VCMあるいはCAZの単独治療ではそれぞれに感受性を示す株は減少あるいは消失したが、非感受性菌すなわちVCM単独治療群では緑膿菌が、CAZ単独治療群ではMRSAが無治療群に近い推移で増加した。その結果、24時間までに各群で全例が死亡し、単独治療の場合は非感受性菌の増殖によりマウスが死亡したと推察された。

VCMとCAZを併用した場合にはMRSAおよび緑膿菌ともにそれぞれの単独治療の場合と同等あるいは若干早い推移で減少し、生菌数の推移においても両剤の拮抗作用は認められず、*in vitro*での相加効果と一致した。

III. 考 察

MRSAと緑膿菌の混合感染時におけるVCMとCAZの併用治療効果を*in vitro*および*in vivo*の両面から検討した。

*In vitro*ではFIC indexを指標としてMRSA単独、緑膿菌単独およびそれらの混合菌液について検討した。その結果、この2剤の組合せでは拮抗作用は認められず、すべての条件において相乗あるいは相加効果が認められた。

*In vivo*においては、大量のMRSAと少量の緑膿菌を混合し、VCM単独で治療した場合に全マウスが死亡する菌交代モデルに対する治療効果を検討した。今回の実験ではCAZ感受性緑膿菌を用いて治療効果

を検討したが、2株とも単独感染時の治療効果と比較して同等もしくはそれ以上の治療効果を示した。ヒトにおける静脈内投与とマウスにおける皮下投与との違いはあるが、この結果は臨床にも応用できる結果であると考えられた。

血中菌数の推移を検討した結果では、VCM単独治療では緑膿菌が、逆にCAZ単独ではMRSAが増殖しそれぞれマウスは100%死亡した。それに対し2剤で併用治療した場合はMRSAおよび緑膿菌は同時に減少あるいは消失し、*in vivo*においてもCAZとVCMはそれぞれの抗菌力をたがいに阻害することなく有効な治療効果が認められた。

以上のように、大量のMRSAと少量の緑膿菌(単独感染時におけるLD₅₀量あるいは2LD₅₀量)を混合感染させVCMのみで治療した場合に、MRSAは減少するが緑膿菌は増加し菌交代現象によりマウスは死亡した。このことは、基礎疾患としてMRSA感染がある場合には、臨床においても同様の菌交代が起こる可能性が考えられるため混合感染が疑われる場合には、早期にVCMと抗緑膿菌活性のある薬剤とで併用治療することの必要性が示唆された。今回の結果から、CAZとVCMの併用は相乗効果のような劇的な有効性はないが、個々の特徴を相殺することなくMRSAから緑膿菌への菌交代に対して有効であることが示された。

文 献

- 1) 竹末芳生, 横山 隆, 児玉 節, 藤本三喜夫, 瀬分均, 村上義昭, 今村 祐: 院内感染としてのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の検討. *Chemotherapy* 37: 137~142, 1989
- 2) 迎 寛, 他: 当院の過去4年間におけるMethicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の分離状況. *感染症学雑誌* 10: 1275~1286, 1990
- 3) 松岡喜美子, 金廣郁子, 永富由美子, 松原正樹: MRSA感染例における同時分離菌種と併用療法について. 第40回日本化学療法学会西日本支部総会抄録, p.54, 1992
- 4) 小川正俊, 辻 明良, 川崎賢二, 吉田 勇, 五島聡智子: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*の実験的単独感染および混合感染における化学療法の効果と菌交代現象について. *Chemotherapy* 31: 221~230, 1983
- 5) 吉田 勇, 小川正俊, 宮崎修一, 金子康子, 五島聡智子: 大腸菌, 緑膿菌の実験的混合感染における各種cephem系抗菌薬の感染防御効果. *Chemotherapy* 30: 861~870, 1982
- 6) 小川正俊, 宮崎修一, 五島聡智子: 抗菌薬併用に関する実験的研究. *Chemotherapy* 34: 233~239, 1986
- 7) 小林義直, 園部直美, 土肥正善, 村上和久, 吉田

- 正: メチシリン耐性ブドウ球菌に対する flomoxef と cefamandole の *in vitro* および *in vivo* 併用効果。Chemotherapy 39: 968~975, 1991
- 8) 渡辺裕二, 若井芳美, 久野京一郎, 波多野和男, 坂本博, 峯 靖弘, 井上松久: MRSA に対する cefazolin と imipenem との *in vitro* および *in vivo* 併用効果。Chemotherapy 38: 797~806, 1990
- 9) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会: 微量液体希釈法による MIC 測定法。Chemotherapy 38: 102~105, 1990
- 10) Ellion G B, Singer S, Hitchings G H: Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combination of biochemically related antimetabolism. J. Biol. Chem, 208: 477~488, 1954

An MRSA to *Pseudomonas aeruginosa* superinfection model in mice and the effect of ceftazidime plus vancomycin combination therapy

Tameichiro Nagaki, Takeshi Morita, Kunio Taguchi,
Shinobu Tamura, Teruyo Tomita, Kaori Ito,
Kumiko Ogino and Ichiro Fukuda

Preclinical Research Center, Tsukuba Research Labo, Research and Development Division,
Nippon Glaxo LTD, 43 Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-42, Japan

We investigated the efficacy of ceftazidime (CAZ) plus vancomycin (VCM) combination therapy in polymicrobial infection by MRSA and *Pseudomonas aeruginosa*, both *in vitro* and *in vivo*. In the *in vitro* study, fractional inhibitory concentration indexes were determined by the checkerboard method. The combination exhibited no antagonism, but was additive in all cases. In the *in vivo* study, the effects of combination therapy were assessed in mice which had been infected intraperitoneally. MRSA to *P. aeruginosa* superinfection was observed when mice were infected polymicrobially with a small amount of *P. aeruginosa* and a large amount of MRSA, and then treated with VCM monotherapy. The effect of combination therapy was assessed using this superinfection model. The 50% effective dose (ED₅₀) of CAZ in monomicrobial infection with *P. aeruginosa* NG 91003 strain was 0.07 mg/mouse, and the ED₅₀ of CAZ in the superinfection model treated with 0.3 mg/mouse VCM combination therapy was lowered to 0.02 mg/mouse. In the case of the *P. aeruginosa* NG 91012 strain, the ED₅₀ of CAZ in both the monomicrobial infection and superinfection model were almost equal (0.04 mg/mouse and 0.05 mg/mouse respectively). Changes in viable cells in the blood were assessed using selective media. An increase in MRSA or *P. aeruginosa* was observed when the mice were treated with monotherapy using CAZ or VCM. In the case of combination therapy, both MRSA and *P. aeruginosa* were found to decrease or disappear. These results suggested that the CAZ plus VCM combination is one of the most effective forms of therapy for the MRSA and *P. aeruginosa* polymicrobial infections which is frequently observed clinically.