

## メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する clindamycin と imipenem との *in vitro* における併用効果

山口 覚・柴田 昌彦・竹尾 浩美

福岡大学医学部小児科学教室\*

(平成5年11月8日受付・平成6年2月2日受理)

臨床材料から分離された methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 28 株のうち clindamycin (CLDM) と imipenem (IPM) の両方に耐性を示す 15 株に対して両剤の *in vitro* での併用効果を検討した。Checkerboard 法ではこの 2 剤の組み合わせにおいて 37°C 培養で 15 株中 9 株が、32°C 培養で 15 株すべてが fractional inhibitory concentration (FIC) index 0.50 以下を示した。もっとも低い FIC index (0.16) が得られた No.14 株に対する経時的殺菌曲線においても CLDM 100 µg/ml (1/8 MIC) と IPM 1.56 µg/ml (1/32 MIC) の組み合わせで増菌抑制が認められた。以上の結果から高度耐性 MRSA に対して CLDM と IPM との併用により相乗作用が発現することが示唆された。

**Key words:** MRSA, clindamycin, imipenem, 相乗作用

1980 年代に入り本邦においても methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) が臨床の場で問題視され始め、10 年余りの間に急速に全国レベルで蔓延した。しかも薬剤耐性が高度かつ複雑化してきており、MRSA 感染症への対応がますます難しくなっている。

MRSA の特徴として有効な薬剤が少ないことに加え感染症患者が基礎疾患を有しているため、日和見感染、院内感染の形で発症することが多いことがあげられる。したがって、MRSA 感染症の治療に関しては単剤では困難であり多剤併用を余儀なくされる場合も少なくない。これらの理由から、以前より MRSA に対する併用療法に関する基礎的、臨床的検討が数多く報告されてきた。今回、著者らは clindamycin (CLDM) と imipenem (IPM) の組み合わせで、*in vitro* における併用効果について検討を行ったので報告する。

### I. 材料と方法

#### 1. 使用菌株

1992 年度に福岡大学病院小児科病棟に入院した患児から分離された *S. aureus* の中で oxacillin (MIPIC) の MIC が 6.25 µg/ml 以上の MRSA 28 株を用いた。

#### 2. コアグラージェ型別

コアグラージェ型別はブドウ球菌コアグラージェ型別用免疫血清 (デンカ生研) を用い判定した。

#### 3. 使用薬剤

clindamycin (CLDM, 日本アップジョン), imipenem (IPM, 萬有製薬) の 2 剤を用いた。

#### 4. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

MIC の測定は日本化学療法学会標準法<sup>1)</sup>に準じた寒天平板希釈法で行った。Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 加 Mueller-Hinton broth (Difco) で 37°C 一夜培養した菌液を同 broth にて 10<sup>6</sup>CFU/ml となるよう調整した。この 5 µl をマイクロプランター (佐久間製作所) を用い薬剤含有の Mueller-Hinton Agar (Difco) に接種し、37°C で 18 時間培養後 MIC を判定した。

#### 5. *In vitro* 併用試験

MIC 測定結果より CLDM 耐性かつ IPM 耐性の 15 株について、両剤の *in vitro* での併用効果を checkerboard 法<sup>2)</sup>で検討した。これら 2 剤の単独またはその組み合わせの並列希釈薬剤含有平板を Mueller-Hinton Agar (Difco) で作り、37°C と 32°C での MIC を同様の方法で測定した。併用効果は fractional inhibitory concentration (FIC) index を算出し、もっとも低い FIC index で代表させて判定した。FIC index は

$$\frac{\text{CLDM, IPM 併用時の CLDM の MIC}}{\text{CLDM 単独時の MIC}} + \frac{\text{CLDM, IPM 併用時の IPM の MIC}}{\text{IPM 単独時の MIC}}$$

\* 福岡市城南区七隈 7-45-1

の式で算出し、FIC index  $\leq 0.500$  を相乗作用、 $0.500 < \text{FIC index} \leq 1.00$  を部分相乗作用、 $1.00 < \text{FIC index} < 2.00$  を相加作用、 $\text{FIC index} \geq 2.00$  を拮抗作用とした。

#### 6. 併用による殺菌効果

もっとも低い FIC index (0.16) が得られた No. 14 株について killing-curve method<sup>9)</sup> を用い経時的殺菌効果を検討した。被検菌に対する MIPIC の MIC は  $800 \mu\text{g/ml}$  以上と高度耐性 MRSA である。被検菌株を  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  加 Mueller-Hinton broth (Difco) にて  $37^\circ\text{C}$  で一夜培養した後、同 broth で 100 倍希釈し菌液を調整した。薬剤添加 Mueller-Hinton broth (Difco) に調整した菌液を加え  $37^\circ\text{C}$  で培養し、3 時間、6 時間、24 時間後の生菌数を測定した。添加した薬剤の濃度は最小 FIC index (0.16) を与える濃度、すなわち CLDM  $100 \mu\text{g/ml}$  (1/8 MIC)、IPM  $1.56 \mu\text{g/ml}$  (1/32 MIC) とし、それぞれの単剤での系と 2 剤を併用した系で実験を行った。

## II. 成 績

### 1. 分離材料とコアグララーゼ型別

Table 1 に今回の検討に用いた MRSA の分離材料とコアグララーゼ型別を示す。28 株中 18 株が鼻腔からの分離で、多くは colonization と考えられるものであった。コアグララーゼ型別では VII 型が 19 株、II 型が 2 株、III 型・II+III 型が各 3 株、型別不能が 1 株と約 2/3 が VII 型であった。

### 2. CLDM、IPM の MIC 分布

Fig. 1 に CLDM の MIC 分布を示す。 $0.2 \mu\text{g/ml}$  以下が 10 株、 $800 \mu\text{g/ml}$  以上が 18 株と完全に二峰性をなし、耐性株の方が多かった。コアグララーゼ型別と MIC の関係では MIC が  $800 \mu\text{g/ml}$  以上の株では VII 型 16 株、II 型 2 株、MIC が  $0.2 \mu\text{g/ml}$  以下の株では VII 型 3 株、III 型・II+III 型各 3 株、型別不能 1 株であった。

Fig. 2 に IPM の MIC 分布を示す。 $0.2 \mu\text{g/ml}$  以

下から  $100 \mu\text{g/ml}$  まで幅広く分布しており、全体では  $3.13 \mu\text{g/ml}$  以下が 10 株、 $12.5 \mu\text{g/ml}$  以上が 18 株と耐性株の方が多かった。コアグララーゼ型別と MIC の関係では MIC が  $12.5 \mu\text{g/ml}$  以上の株では VII 型 15 株、II 型・III 型・II+III 型各 1 株、MIC が  $3.13 \mu\text{g/ml}$  以下の株では VII 型 4 株、II 型 1 株、III 型・II+III 型各 2 株、型別不能 1 株であった。VII 型では CLDM、IPM に対して耐性を示す株が多くみられた。

### 3. Checkerboard 法による併用効果

CLDM 耐性かつ IPM 耐性の 15 株に対する checker-

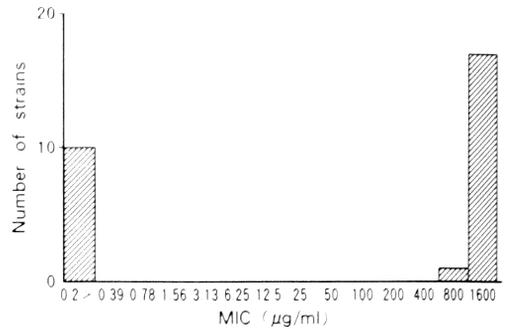


Fig. 1. Susceptibility of MRSA to clindamycin.

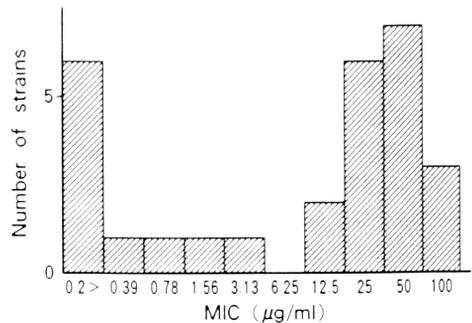


Fig. 2. Susceptibility of MRSA to imipenem.

Table 1. Clinical origin and coagulase type of MRSA (28 isolates)

Specimen	Coagulase type					Total
	II	III	II+III	VII	NT	
Nasal cavity	1	1	2	13	1	18
Skin	1			3		4
Blood		1	1			2
Sputum		1		1		2
Others				2		2
Total	2	3	3	19	1	28

board 法での 2 剤併用時の FIC index を Table 2 に示す。15 株中 14 株がコアグラセVII型, 1 株がII型であった。37°C培養では 15 株中 9 株 (60%) が, 32°C培養では 15 株すべてが FIC index 0.50 以下を示した。Fig. 3 にもっとも低い FIC index (0.16) が得られた No. 14 株の checkerboard を示す。CLDM の MIC は 800 µg/ml から 100 µg/ml へ, IPM の MIC は 50 µg/ml から 1.56 µg/ml へと低下した。

4. Killing-curve method による経時的殺菌効果  
Fig. 4 に結果を示す。CLDM 100 µg/ml (1/8 MIC), IPM 1.56 µg/ml (1/32 MIC) のそれぞれ単独では control と同様, 培養開始後より生菌数の増加が認められた。一方, 2 剤を加えた場合 6 時間後までは増菌が抑制され, 24 時間後の生菌数をみると 32°C 培養の方が少ない傾向を示した。

III. 考 察

MRSA は院内感染の主要起炎菌であり, 全国的に深刻な問題となっている。その分離率, 薬剤感受性は施設により異なり MRSA 感染症に有効な薬剤も必ずしも一定していない<sup>9)</sup>。MRSA はペニシリン系のみならずその他の薬剤に対しても同時に耐性を有する多剤耐性株がほとんどである。したがって, 有効な薬剤が限られており治療に難渋する場合も少なくない。現在のところ vancomycin (VCM) がもっとも確実とされているが, 他の薬剤に比べ副作用が多いこと, できる限り耐性菌を作らないようにしたいことなどから, 乱用を避け症例を選んで慎重に投与すべきである。Arbekacin (ABK)<sup>9)</sup>, minocycline (MINO)<sup>6)</sup>, CLDM<sup>7)</sup>, IPM<sup>8)</sup> などが有効との報告もあるが, 少な

Table 2. FIC index in combination of clindamycin and imipenem against MRSA (15 strains)

FIC index	Number of strains (%)	
	37°C	32°C
0.56	3 } (40.0)	2 } (100.0)
0.53		
0.50	4 }	
0.38	1 }	
0.31	1 }	
0.28	2 }	
0.27	1 }	5 }
0.16		2 }

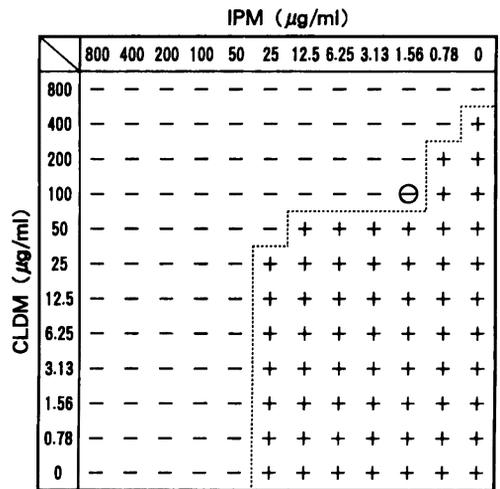


Fig. 3. Combined effect of clindamycin (CLDM) and (IPM) against MRSA no.14 strain.

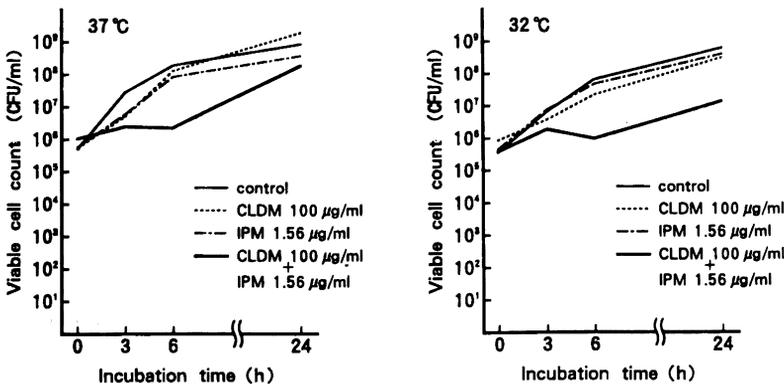


Fig. 4. Bactericidal effect of clindamycin (CLDM) + imipenem (IPM) against MRSA strain no.14.

から耐性菌が存在し十分な臨床効果が得られない場合もでてくる。このように MRSA に対する単剤療法には限界があるため、以前から様々な併用療法について検討されてきた。

横田らは cefmetazole (CMZ), cefzonam (CZON) などの  $\beta$ -lactam 剤と fosfomycin (FOM) との併用効果について検討を行い、その有用性を見出すとともに penicillin binding protein (PBP) の解析により相乗作用の機序を明らかにした<sup>9-11)</sup>。MRSA は  $\beta$ -lactam 剤に親和性の低い PBP-2' を有しているため、 $\beta$ -lactam 剤単独では細胞壁合成を十分に阻害することができない。FOM は PBP-2' の産生を抑制するため  $\beta$ -lactam 剤と併用することにより細胞壁の合成が阻害されるようになる。しかし、FOM に高度耐性を示す MRSA ではこのような相乗作用は認められない<sup>12)</sup>。最近では IPM と ampicillin (ABPC)<sup>13)</sup>、cefazolin (CEZ)<sup>14)</sup>、cefotiam (CTM)<sup>15)</sup>、CZON<sup>16)</sup> などの  $\beta$ -lactam 剤との併用効果についての報告が数多くみられる。

今回、著者らは蛋白合成阻害剤である CLDM と IPM との併用により相乗作用が発現することを示した。これらは *in vitro* での成績であり、CLDM の血中到達濃度を考慮すると *in vivo* での効果を直接反映しているわけではない。しかし、生体内での抗菌剤による殺菌効果には白血球との協力作用も関与している<sup>17)</sup>。IPM には白血球との協力的殺菌効果が認められ<sup>18)</sup>、CLDM も好中球やマクロファージ内へ高濃度に移行し、その機能を高める作用がある<sup>19-21)</sup>といわれている。したがって、*in vivo* においては *in vitro* よりも低い薬剤濃度で相乗作用が発現する可能性がある。さらに CLDM、IPM はともに *S. aureus* を含むグラム陽性球菌に対し強い PAE (postantibiotic effect) を有しているため両者の併用で PAE が増強され、より有効に働く可能性も考えられる。

抗菌剤の相乗作用の発現機序についてはいまだ不明な点も多い。MRSA の耐性機構については PBP-2' の産生のみではなく、他にもいくつかの可能性が示唆されている。PBP-2' は 30~32°C で培養すると、その産生量が増加し MIC は上昇する<sup>22)</sup>。しかし、CLDM と IPM を併用した場合、逆に 37°C よりも 32°C 培養の方で強い相乗作用が得られた。このことから詳細は不明ではあるが PBP-2' 以外のなんらかの作用機転が関与しているものと考えられる。IPM は PBP-2' に対する親和性が低いにもかかわらず単独でもある程度 MRSA に抗菌力を示す。これは MRSA が有する PBP の minor 分画、特に PBP-m2 を IPM が抑制

することによると説明されている<sup>17)</sup>。IPM 耐性 MRSA では PBP-m2 の変化が認められており、 $\beta$ -lactam 剤との併用効果の機序としてこの PBP-m2 に対する相乗作用が考えられている<sup>18)</sup>。CLDM と IPM の組み合わせにおいて相乗作用が認められるのも PBP-m2 が関与しているのかもしれない。

MRSA 感染症に対する抗菌剤の併用療法を考えるうえで、CLDM と IPM の組み合わせも選択の候補となることが期待される。ただ、*in vitro* での成績のみでは不十分であるため、薬剤の体内動態を含めたより詳細な検討が必要である。また、今回検討に用いた MRSA の多くはコアグラーゼ VII 型であり他の型についても同様な結果が得られるかどうか今後の課題である。

本論文の要旨は第 24 回小児感染症学会において発表した。

#### 文 献

- 1) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 2) Elion G B, Singer S, Hitchings G H: Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. J. Biol. Chem. 208: 477~488, 1954
- 3) 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
- 4) 穴戸春美, 松本慶蔵, 高橋 淳, 永武 毅, 渡辺貴和雄, 植木信介, 田村厚久, 永井英明, 米田良蔵: 多剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染症の現状。化学療法の領域 4: 2293~2302, 1988
- 5) 坂上吉一, 梶村計志, 伴美貴子, 吉永哲男, 田中美智男, 松尾清光: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する抗生物質および殺菌消毒剤の効果—3 病院間での感受性の推移—。Chemotherapy 41: 200~210, 1993
- 6) Minuth J N, Holmes T M, Muscher D M: Activity of tetracycline, doxycycline, and minocycline against methicillin-susceptible and -resistant Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 6: 411~414, 1974
- 7) 向野賢治, 小貫圭介, 戸原慶一, 武田誠司, 芝 香子: MRSA 肺炎に対する CLDM-P 注の臨床的検討。Prog. Med. 10: 1035~1038, 1990
- 8) Fan W R del Busto, Love M, Markowitz N, Cendrowski C, Cardenas J, Quinn E, Saravolatz L: Imipenem-cilastatin in the treatment of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Antimicrob. Agents Chemother. 29: 26~29, 1986
- 9) 横田 健: MRSA 感染症の現状と対策。メディカル

- レビュー社, 1990
- 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) Utsui Y, Ohya S, Magaribuchi T, Tajima M, Yokota T: Antibacterial activity of cefmetazole alone and in combination with fosfomicin against methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 30: 917~922, 1986
  - 12) 横田 健: 新しいMRSAの基礎的展開。化学療法領域 6: 1149~1156, 1990
  - 13) 西園寺克, 設楽政次, 三宅紀子, 井上久美子, 小林寅吉: MRSA に対する imipenem と ampicillin の併用効果の検討。Jap. J. Antibiotics 43: 1685~1697, 1990
  - 14) 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
  - 15) Matsuda K, Asahi Y, Sanada M, Nakagawa S, Tanaka N, Inoue M: *In vitro* activity of imipenem combined with  $\beta$ -lactam antibiotics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 27: 809~815, 1991
  - 16) 笹原武志, 樋口 徹, 井上松久: マウス MRSA 感染症における薬剤併用効果のモデル実験。1. cefzonam と imipenem との併用。Chemotherapy 41: 351~357, 1993
  - 17) 横田 健: MRSA の耐性機構から見た対策。順天堂医学 34: 334~342, 1988
  - 18) Adinolfi L E, Bonventre P F: Enhanced phagocytosis, killing, and serum sensitivity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* treated with sub-MICs of imipenem. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1012~1018, 1988
  - 19) Hand W L, King-Thompson N L: Membrane transport of clindamycin in alveolar macrophages. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 241~247, 1982
  - 20) 古賀宏延, 中里博子, 長沢正夫, 渡辺購一, 福田義昭, 田中 光, 朝長昭光, 重野芳輝, 藤田紀代, 鈴山洋司, 山口恵三, 齊藤 厚, 原 耕平, 小笠原正良: 各種抗生剤のヒト多形核好中球内への移行に関する研究。Chemotherapy 33: 688~695, 1985
  - 21) Lianou P E, Bassarist H P, Votta E G, Papavassiliou J T: Interaction of subminimal inhibitory concentrations of clindamycin and gram-negative aerobic organisms: effects on adhesion and polymorphonuclear leukocyte function. J. Antimicrob. Chemother. 15: 481~487, 1985
  - 22) 菅野治重: 細菌検査における MRSA の判定基準。最新医学 44: 2510~2514, 1989

*In vitro* combined effect of clindamycin and imipenem against  
methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Satoru Yamaguchi, Masahiko Sibata and Hiromi Takeo

Department of Pediatrics, School of Medicine, Fukuoka University, 7-45-1,  
Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-01, Japan

The *in vitro* combined effect of clindamycin (CLDM) and imipenem (IPM) was studied in 15 strains resistant to both drugs among 28 clinically isolated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. By means of the checkerboard agar dilution method, the fractional inhibitory concentration (FIC) index of this combination was 0.5 or less in 9 of 15 strains at 37°C, and in all of 15 strains at 32°C. Further, in the time-killing curve studies, this combination showed a synergistic effect against the no.14 strain obtained a minimal FIC index (0.16). These results suggest that the combination of CLDM and IPM produced a synergistic action against highly resistant MRSA strains.