

MRSA に対する cefotiam/vancomycin, cefotiam/arbekacin および minocycline/vancomycin の *in vitro* 併用効果

豊川 真弘・浅利 誠志・堀川 晶行
塚本 寿子・田原 和子・砂田 淳子

大阪大学医学部附属病院臨床検査部*

(平成7年12月18日受付・平成8年5月15日受理)

MRSA 88 株に対する cefotiam (CTM)/ vancomycin (VCM), CTM/arbekacin (ABK) および minocycline (MINO)/VCM の *in vitro* 併用効果を 1.25 倍希釈系列を用いた checkerboard 法により測定し, MIC, MBC, fractional inhibitory concentration index (FIC index) および fractional bactericidal concentration index (FBC index) を比較検討した。CTM/ABK および CTM/VCM の組み合わせではそれぞれ 50 および 14 % の株に対し FIC index ≤ 0.50 の相乗効果が認められ, 残りの株に対してはすべて相加効果が認められた。また, 併用時殺菌効果の指標として 12 株を対象に測定した FBC index においても, 両組み合わせともに主として相加効果が認められた。さらに, CTM 点滴静注時に約 3 時間維持可能な血中濃度である CTM 8 $\mu\text{g/ml}$ 存在下では, ABK および VCM の MIC 値が単剤 MIC 値のそれぞれ 8~83 % (平均 39 %) および 30~83 % (平均 58 %) まで低下した。一方, MINO/VCM の組み合わせでは 39 % の株に対し $2.00 < \text{FIC index}$ の拮抗が認められ, また, FBC index ではすべての株 (12 株) に対して拮抗を示し, MINO の併用により VCM の殺菌力が抑制された。以上のことより抗 MRSA 抗菌薬である ABK あるいは VCM と CTM との併用療法は腎機能低下患者における副作用の軽減や抗菌薬移行の不良な部位における MRSA 感染症の治療法として有用である可能性が示唆された。また, MRSA 感染症に対して VCM と MINO の併用は極力避けるべきと考えられた。

Key words: MRSA, *in vitro* 併用効果, arbekacin, vancomycin, cefotiam

MRSA に対し単剤で治療効果が期待できる抗菌薬としては, vancomycin (VCM), arbekacin (ABK), minocycline (MINO) などが挙げられる。VCM は 1991 年に静注薬として承認されて以来 MRSA 感染症に対する第 1 選択薬として位置づけられており, 現在まで VCM に対する耐性株は報告されていない。しかし, VCM および ABK は腎毒性が強いため腎機能低下患者に使用する場合には投薬量の減量, 投与時間の延長および血中濃度測定など, 細心の注意が必要¹⁾である。一方, MINO は副作用は少ないが耐性株の増加²⁾が問題となっている。さらに, 抗 MRSA 抗菌薬単剤での治療においては, 感染病巣部への抗菌薬移行性の問題³⁾, グラム陰性菌との複数菌感染および菌交代現象などの問題がある。このため, 近年ではこれらの抗菌薬の併用療法に関し有効薬剤の組み合わせ, 複数菌感染時の薬剤選択など, 種々の報告²⁻⁶⁾がなされている。

今回, MRSA に対する cefotiam (CTM)/VCM, CTM/ABK および MINO/VCM の *in vitro* 併用効果を checkerboard 法により測定し, 臨床应用到有用な知見を得たので報告する。

I. 材料および方法

1. 供試菌株

当院微生物検査室において 1992 年 8 月から 1993 年 12 月までの間に分離された MRSA 88 株を用いた。

2. 併用効果測定用マイクロプレートの作製

併用効果測定用マイクロプレートは checkerboard 法に従い栄研化学(株)に作製を委託し購入した。すなわち, cation-adjusted Mueller-Hinton broth (MH ブロス) に VCM, ABK については併用効果をより詳しく捉えることを目的とし, さきに報告⁶⁾した 1.25 倍希釈系列を, CTM および MINO については従来通りの 2 倍希釈系列を用いマイクロプレートを作製した。

3. *In vitro* 併用効果測定法

1) MIC および FIC index の測定

上記マイクロプレートに最終接種菌量 10^6 CFU/ml の菌液を摂取し, 35 $^{\circ}\text{C}$, 24 時間培養後, 発育の有無を観察し単剤 MIC 値を判定した。さらに, 両抗菌薬存在下において菌の発育を完全阻止している各々の最小濃度を併用時 MIC 値と判定した。また, FIC index は以下の計算式により求めた。

$$\frac{\text{薬剤 A の併用時 MIC 値}}{\text{薬剤 A の単剤 MIC 値}} + \frac{\text{薬剤 B の併用時 MIC 値}}{\text{薬剤 B の単剤 MIC 値}}$$

なお, FIC index の値が ≤ 0.50 を相乗効果, $0.50 <$

から ≤ 1.00 を相加効果, $1.00 <$ から ≤ 2.00 を不関, $2.00 <$ を拮抗とした。

2) MBC および FBC index の測定

FIC index を測定した 88 株中コアグラエゼ型別 II, III, IV, VII 型を示した各 3 株, 計 12 株を対象として MBC および FBC index の測定を行った。

FIC index の測定後マイクロプレート十分に攪拌し, 各ウェルより菌液 $1 \mu\text{l}$ を採取し MH 寒天に接種した。その後, 35°C , 24 時間培養し発育の認められない最小濃度 (99.9 % 阻止濃度) を MBC と判定した。また, FBC index は以下の式により求め, その判定は FIC index に準拠した。

$$\frac{\text{薬剤 A の併用時 MBC 値}}{\text{薬剤 A の単剤 MBC 値}} + \frac{\text{薬剤 B の併用時 MBC 値}}{\text{薬剤 B の単剤 MBC 値}}$$

3) CTM ($8 \mu\text{g/ml}$) 存在下における VCM および ABK の MIC 低下率の検討

CTM 静脈内点滴投与時に血中濃度として約 3 時間維持可能な濃度 ($8 \mu\text{g/ml}$) が存在する場合の VCM および ABK の併用時 MIC 値を上述した checkerboard により判定し, 以下の式により MIC 低下率を算出した。

$$\text{MIC 低下率} = \frac{\text{併用時 MIC 値}}{\text{単剤 MIC 値}} \times 100$$

なお, 今回作製した併用効果測定用マイクロプレー

トの濃度設定範囲を外れた菌株は対象から除外した (表中 excluded で示す)。

II. 結 果

1. MIC および FIC index

Table 1 に MRSA に対する各種薬剤の MIC 値分布を示した。CTM は $8 \sim 1,024 \mu\text{g/ml}$ と幅広い 3 峰性の分布を示した。VCM は全株の MIC 値が $0.5 \sim 2.0 \mu\text{g/ml}$ の範囲内であり, 耐性株は認められなかった。一方, ABK, MINO ではそれぞれ 17, 34 % の株が耐性を示した。

各組み合わせの FIC index 分布を Table 2 に示した。CTM/ABK および CTM/VCM の組み合わせではすべての株に対して相乗あるいは相加効果が認められた。そのなかで相乗効果を示した株は CTM/ABK で 50 %, CTM/VCM で 14 % であった。一方, MINO/VCM の組み合わせでは 39 % の株において拮抗が認められ, 48 % が不関, 13 % が相加効果であった。

平均 FIC index を比較すると, CTM/ABK の組み合わせで 0.501 ともっとも低値を示し, CTM/VCM および VCM/MINO がそれぞれ 0.628, 1.625 であった。

2. MBC および FBC index

Table 3 に各抗菌薬の MIC と MBC の関係を示した。CTM, ABK および VCM は全株 (12 株) に対して $\text{MBC} \leq 4 \text{ MIC}$ であった。VCM は 67 % の株が MBC

Table 1. Distribution of MIC against MRSA

$\mu\text{g/ml}$	≤ 2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	$>1,024$
Cefotiam			2	7	5	3	10	22	11	28	
$\mu\text{g/ml}$	0.6	0.8	1	1.2	1.6	2	2.4	3.2	4	8	≥ 16
Arbekacin	2	1	2	7	4	6	5	11	11	24	15
$\mu\text{g/ml}$	0.25	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1	1.2	1.6	2	
Vancomycin				2	20	26	21	16	2	1	
$\mu\text{g/ml}$	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	
Minocycline	1	13	25	2	6	2	3	6	19	11	
Number of isolates											

Table 2. Distribution of FIC index

Combination	Number of isolates, (%)					Range	Mean
	FIC index >2.00	$2.00 \geq$ FIC index >1.00	$1.00 \geq$ FIC index >0.50	$0.50 \geq$ FIC index	Excluded*		
CTM/ABK	—	—	29 (50)	29 (50)	30	0.113~0.958	0.501
CTM/VCM	—	—	76 (86)	12 (14)	—	0.383~0.849	0.628
VCM/MINO	34 (39)	42 (48)	11 (13)	—	1	0.506~ >2.00	1.625

*out of assay range in this study

CTM: cefotiam, ABK: arbekacin, VCM: vancomycin, MINO: minocycline

Table 3. Comparison of MIC and MBC

Antibiotic	MBC=MIC	MBC=2 MIC	MBC=4 MIC	MBC>4 MIC	Excluded*
Cefotiam	4 (33)	5 (42)	3 (25)	—	—
Arbekacin	2 (22)	6 (67)	1 (11)	—	3
Vancomycin	8 (67)	4 (33)	—	—	—
Minoocycline	—	—	—	9 (100)	3

Number of isolates, (%)

*out of assay range in this study

Table 4. Distribution of FBC index

Combination	Number of isolates					Range	Mean
	FBC index >2.00	2.00 ≥ FBC index >1.00	1.00 ≥ FBC index >0.50	0.50 ≥ FBC index	Excluded*		
CTM/ABK	—	1	3	1	7	0.281~1.083	0.727
CTM/VCM	—	—	11	1	—	0.402~0.835	0.624
VCM/MINO	12	—	—	—	—	>2.00	>2.00

*out of assay range in this study

CTM: cefotiam, ABK: arbekacin, VCM: vancomycin, MINO: minocycline

=MIC であり, CTM, ABK では MBC=2 MIC を示した株がもっとも多くそれぞれ 42, 67 % であった。一方, MINO の MBC はすべての株に対して 32 μg/ml 以上であり, MBC 値は 4 倍 MIC 値より高値を示した。

FBC index を比較 (Table 4) すると, FBC index ≤ 0.50 の相乗効果が認められた株は CTM/ABK で 5 株中 1 株, CTM/VCM では 12 株中 1 株であった。また, CTM/ABK, CTM/VCM の組み合わせでは 2.00 < FBC index の拮抗は認められなかったが, VCM/MINO では 12 株すべてにおいて拮抗を示した。

3. CTM (8 μg/ml) 存在下における ABK および VCM の MIC 低下率の検討

CTM 8 μg/ml 存在下では ABK および VCM の MIC 値がそれぞれの単剤 MIC 値の 8~83 % (平均 39 %) および 30~83 % (平均 58 %) まで低下した (Fig. 1)。

III. 考 察

抗菌薬併用の目的としては, ①抗菌力の増強による難治性感染症の治療, ②投薬量の減量と副作用の軽減, ③抗菌スペクトラムの拡大 (複数菌感染症の治療), ④耐性化の防止などが挙げられる。特に MRSA 感染症に頻用される VCM や ABK は腎毒性が強く, 腎機能低下患者や新生児では使用困難なケースが多い。このため, これらの患者では投薬量の減量あるいは多剤併用療法⁷⁾が必要とされる。今回, 我々は MRSA に対する VCM および ABK と他剤との併用効果を checkerboard 法により比較検討した。

VCM の MIC 値は前回の報告⁶⁾と同様 0.5~2.0 μg/ml に分布し耐性株は認められなかったが, ABK および MINO はそれぞれ 17, 34 % の株が耐性であった。

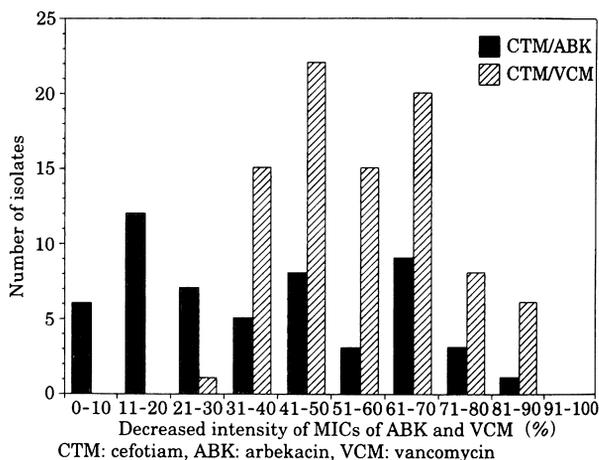


Fig. 1. Distribution of the decreased intensity of MICs of arbekacin and of vancomycin by means of combining with cefotiam of 8 μg/ml.

MBC 値を測定した 12 株に関して MIC 値と MBC 値の関係を比較すると, VCM は 67 % の株が MIC=MBC, 33 % が 2 MIC=MBC と比較抗菌薬中もっとも優れた殺菌効果を示した。青木らは VCM の MRSA に対する殺菌効果は VCM と MRSA との接触時間に依存し, 短時間接触では殺菌効果は弱いなが長時間接触時に優れた殺菌効果を示すと報告⁸⁾しており, 今回測定した MBC 値は 24 時間接触後の殺菌効果を反映しているためこのような優れた結果となったものと思われる。一方, テトラサイクリン系抗菌薬である MINO は全株が 4 MIC < MBC の静菌的作用であった。

In vitro 併用効果を FIC index で比較すると, 相乗効果が認められた株は CTM/ABK の組み合わせでもっとも多く 50 %, CTM/VCM では 14 % であった。また,

これらの組み合わせではすべての株に対して相乗あるいは相加効果が認められ、不関および拮抗は認められなかった。今回、併用時殺菌効果の指標として用いた FBC index においても同様な傾向が認められ、検討株数は少ないものの CTM/ABK (5 株中 4 株) および CTM/VCM (12 株全株) で相乗あるいは相加効果を示し、CTM 併用による殺菌力の増強が認められた。一方、VCM/MINO の組み合わせでは、39 % の株に対して $2.00 < \text{FBC index}$ の拮抗が認められ、さらに、併用時殺菌効果は全株 (12 株) が $2.00 < \text{FBC index}$ であり、MINO を併用することにより VCM の優れた殺菌効果が消失した。以前から知られているように静菌的抗菌薬と殺菌的抗菌薬との間には拮抗的な作用⁹⁾が認められており、VCM と MINO の間にも同様な現象が認められた。MRSA 感染症は感染防御能の低下した易感染性宿主に好発し、また、敗血症や感染性心内膜炎などの重篤な感染症例では強力な殺菌効果を有する抗菌薬による治療が重要であるため、MRSA 感染症に対する VCM と MINO の併用は極力避けるべきであると思われる。

従来より併用効果の指標として用いられている FIC index には抗菌薬の血中到達濃度が考慮されていないため、今回、CTM の点滴投与により血中で約 3 時間維持可能な濃度である $8 \mu\text{g/ml}$ での併用効果を ABK、VCM の MIC 低下率として検討した。その結果、CTM/ABK および CTM/VCM の組み合わせでは、CTM 併用時の ABK、VCM の MIC 値は単剤 MIC 値のそれぞれ 8~83 % (平均 39 %) および 30~83 % (平均 58 %) まで低下し、CTM の併用による VCM、ABK の投薬量減量の可能性が示唆された。また、VCM の抗菌力は抗菌薬濃度には依存せず接触時間に依存するため、CTM との併用と共に少量頻回投与などの投与法の工夫^{8, 10)}を行えば副作用の軽減が可能であると思われる。

以上をまとめると、①抗 MRSA 抗菌薬である ABK および VCM と CTM との併用は、臨床的に達成可能な CTM の濃度でも FIC index、FBC index とともに相乗、または相加作用を認める株が多く、腎機能低下患者や

抗菌薬移行の不良な部位における MRSA 感染症の治療法として有用である可能性が示唆された。②MRSA 感染症に対して、殺菌的抗菌薬である VCM と静菌的抗菌薬である MINO の併用は極力避けるべきと考えられた。

文 献

- 1) 島田 馨, 花谷勇治, 日黒英典, 菅野治重: MRSA による重症感染症に対する注射用塩酸バンコマイシンの臨床研究. *Chemotherapy* 40: 86~101, 1992
- 2) 豊川真弘, 浅利誠志, 堀川晶行, 塚本寿子, 田原和子, 砂田淳子, 網野信行, 宮井 潔: MRSA に対する各種薬剤の *in vitro* 併用効果測定に基づく *in vivo* 有用性の検討. *基礎と臨床* 26: 3793~3801, 1992
- 3) 渡辺 彰, 庄司 聡, 樋口 徹, 井上松久: 多剤耐性黄色ブドウ球菌に関する研究 (Ⅶ). *Chemotherapy* 42: 19~25, 1994
- 4) 飯沢祐史, 北本直美, 中尾雅文, 小此木研二: メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* と *Pseudomonas aeruginosa* の実験的混合感染に対する vancomycin と cefsulodin または carumonam との併用効果. *Chemotherapy* 42: 14~18, 1994
- 5) 長谷川裕美, 江成唯子, 柴田雄介, 菊地 賢, 戸塚恭一, 清水喜八郎: MRSA に対する vancomycin と β -lactam 剤の *in vitro* 併用効果. *Chemotherapy* 41: 465~475, 1993
- 6) 豊川真弘, 浅利誠志, 堀川晶行, 塚本寿子, 田原和子, 砂田淳子, 網野信行: 併用効果測定のための 2 倍希釈系列を用いた checkerboard 法における問題点. *Chemotherapy* 42: 841~848, 1994
- 7) 堀川晶行, 浅利誠志, 豊川真弘: 細菌の薬剤耐性—最近の知見—. *臨床科学* 30: 991~998, 1994
- 8) Aoki Y, Kashiwagi H: Bactericidal activity of vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Chemotherapy* 40: 997~1004, 1992
- 9) Jawetz E et al.: Studies on antibiotic synergism and antagonism; schema of combined antibiotic action. *Antibiot Chemother* 2: 243~248, 1952
- 10) 長谷川裕美, 清水喜八郎: 併用の基礎—MRSA—. *臨床と微生物* 20: 261~265, 1993
- 11) 塚本寿子, 浅利誠志, 堀川晶行, 豊川真弘, 田原和子, 砂田淳子, 網野信行, 宮井 潔: Arbekacin の MRSA に対する *in vitro* における抗菌力. *基礎と臨床* 25: 205~214, 1991

In vitro combined effects of cefotiam/vancomycin, cefotiam/arbekacin,
and minocyclin/vancomycin on MRSA

Masahiro Toyokawa, Seishi Asari, Masayuki Horikawa, Hisako Tsukamoto,
Kazuko Tahara and Atsuko Sunada

Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital,
2-15 Yamadaoka, Suita City, Osaka 565, Japan

We determined the *in vitro* combined effects of cefotiam (CTM) plus vancomycin (VCM); of CTM plus arbekacin (ABK); and of minocycline (MINO) plus VCM on 88 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by the modified checkerboard method with serial 1.25-fold dilutions. And compared their MICs, MBCs, fractional inhibitory concentration indices (FIC indices), and fractional bactericidal concentration indices (FBC indices). Combinations of CTM plus ABK and CTM plus VCM indicated synergistic effects, an FIC index of ≤ 0.50 , against 50% and 14% of the strains respectively and additive effects against all other strains. By comparing the FBC indices (12 strains), both combination mainly indicated additive killing effects. In addition, the MICs of ABK and of VCM in combination with CTM of 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$: which concentration could be maintained during about three hours in serum, decreased to 8-83% (mean 39%) and 30-83% (58%) of each MICs in antibiotic alone, respectively. On the other hand, combination of MINO plus VCM was antagonistic, an FIC index of >2.00 , against 39% of the strains and showed antagonistic killing effects, an FBC index of >2.00 , against all (12) strains. These results suggest that the combination therapy of ABK or VCM with CTM is useful for the treatment of MRSA infection at a site where a penetration of antibiotics is less and may help to reduce a side effects of ABK or VCM in a patient with renal dysfunction, and that the combination therapy of MINO with VCM should be used carefully on MRSA infection.