

【原著・基礎】

Arbekacin 単独と他薬剤との併用による殺菌効果に関する検討

中澤 靖・猿田 克年・進藤奈邦子・坂本 光男・前澤 浩美
吉川 晃司・吉田 正樹・柴 孝也・酒井 紀

東京慈恵会医科大学内科学講座第2*

(平成8年10月16日受付・平成8年11月15日受理)

Arbekacin (ABK) の methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 感染症に対する有用性を検討するために、臨床分離株を用い ABK の MRSA に対する殺菌効果を vancomycin (VCM) のそれと比較検討した。臨床分離 MRSA 株 JM 1010, JM 1011 に対し ABK は VCM に比し優れた用量依存的な短時間殺菌力を示した。しかし 24 時間後の生菌数では VCM 処理の方が、ABK 処理後の生菌数より少なかった。これは MRSA のなかには ABK に対して容易に再増殖する菌が含まれていることを示している。この現象は臨床分離緑膿菌株との混合培養条件下でも同様に認められた。これに対し ABK 単剤に比べ、ABK と imipnem (IPM) との併用時では明らかに殺菌力が増強し、しかも ABK 単剤に比べ、IPM 併用時において再増殖菌を抑制する傾向が認められた。以上の結果より ABK は MRSA に対して、IPM と併用することで短時間殺菌力の増強と再増殖抑制効果を発揮することが認められ、これらの併用は MRSA 感染症の治療方法として有用であると考えられた。

Key words: MRSA, arbekacin, bactericidal activity, imipnem, combine therapy

Methicilin-resistant *Staphyrococcus aureus* (MRSA) 感染症に有効な抗菌薬は現在 arbekacin (ABK) と vancomycin (VCM) のみである。ABK の MRSA 感染症に対する有用性を検討するために、臨床材料から分離した MRSA に対する殺菌力を VCM のそれと比較した。また殺菌力について ABK と imipnem (IPM) との併用の場合もあわせて検討し、過去に報告されている微小コロニーの出現についても観察した¹⁾。

実際、MRSA の検出される患者は他菌種との複数菌感染が多いと言われており、特に緑膿菌やセラチアなどのグラム陰性菌との同時感染が多い²⁾。臨床の場においては原因菌を特定することができずに MRSA とグラム陰性菌を同時に標的とした抗菌化学療法が求められることが多い。この点、ABK は MRSA のみならずグラム陰性菌に対しても強い抗菌力を有するため³⁾、MRSA とグラム陰性菌との混合感染時にも有効な薬剤と考えられる。そこで MRSA と緑膿菌を混合培養した状態での ABK と VCM の殺菌力についても比較検討した。

I. 方 法

1) 使用菌株

菌株は東京慈恵会医科大学付属病院で 1995 年に検出し保存した臨床分離株 MRSA 15 株と JM 1010, JM 1011 株の 2 株と *Pseudomonas aeruginosa* JP 1060, JP 1061 株の 2 株を用いた (Table 1)。JM 1010 および JM 1011 について ABK, VCM, IPM, tobramycin

(TOB) の MIC を日本化学療法学会標準法に準じた微量液体希釈法にて測定した。JP 1060, 1061 について同様に ABK, IPM の MIC を測定した。

2) MRSA に対する ABK, VCM, IPM の殺菌効果の検討

寒天平板上に発育した菌を Mueller Hinton broth に接種し、37℃にて一夜培養した後、分光光度計で 660 nm にて OD=0.3 (約 10⁸cfu/ml) に調整した。これを 1,000 倍希釈し約 10⁶cfu/ml に調整した菌液を 37℃にて 2 時間振盪培養した後、各々の 10 倍濃度の薬液を 0.5 ml を入れたチューブに菌液を 4.5 ml ずつ分注し混和した。37℃にて振盪培養しながら、0, 1, 2, 4, 6, 24 時間ごとにサンプリングし、適当に希釈後 Mueller Hinton agar に塗布して生菌数を測定した。

3) MRSA と *P. aeruginosa* の混合培養系における ABK, VCM+IPM の殺菌効果

2) と同様にして MRSA JM 1011 株と *P. aeruginosa* JP 1061 株をそれぞれ約 10⁶ cfu/ml 含む菌液を作成し、ABK の 10 倍濃度の溶解液 0.5 ml を入れたチューブに菌液を 4.5 ml ずつ分注し混和し、37℃にて振盪培養しながら、0, 1, 2, 4, 6, 24 時間ごとにサンプリングし、TOB 10 µg/ml 含有する Mueller Hinton agar に塗布して MRSA の生菌数、VCM 10 µg/ml 含有する Mueller Hinton agar に塗布して *P. aeruginosa* の生菌数をそれぞれ測定した。VCM と IPM 併用時は VCM,

IPM それぞれ 20 倍濃度液を調整し、各々 0.25 ml ずつチューブに加えた。VCM と IPM 併用時はその濃度を JM 1011 に対する VCM の 1 MIC と JP 1062 に対する IPM の 1 MIC 濃度という組み合わせで添加し検討した。2 MIC の場合も同様に行った。

4) MRSA に対する ABK と IPM の併用殺菌効果

2), 3) と同様にして ABK 単剤, IPM 単剤および ABK と IPM の併用による殺菌力を検討した。その時の生菌数を測定した後に 37℃ にて 24 時間培養し、平板上に微小コロニーが出現するかどうか確認した。また測定した生菌数で除すことにより微小コロニーの出現頻度について検討した。また当教室で保存されている MRSA 15 株を選びそれぞれ ABK と IPM 併用時の Fractional inhibitory concentration (FIC) index を Mueller Hinton broth を用いて checker board 法⁴⁾により求めた。

II. 結 果

1) 使用菌株の MIC

使用菌株に対する MIC を Table 1 に示した。MRSA JM 1010, JM 1011 は VCM 感受性, TOB 耐性であるのに対し, *P. aeruginosa* JP 1060, P 1061 は共に VCM 耐性, TOB 感受性である。

2) MRSA に対する ABK, VCM, IPM の殺菌効果の検討

臨床分離 MRSA 株 JM 1010 および JM 1011 株は 1 MIC, 2 MIC 濃度の抗菌薬存在下での、6 時間までの殺菌力を比較すると、ABK は VCM, IPM に比し、用量依存的に菌数が減少することから強い殺菌力を示した。また 1/2 MIC 濃度でも ABK は殺菌効果を示したのに対し、VCM は JM 1011 株でほとんど殺菌しなかった。JM 1010 株でも VCM は ABK に比べ約 1/2 程度の殺菌力を示したのにすぎず、ABK, VCM, IPM 3 剤のなかでは ABK が JM 1010, JM 1011 株に対してもっとも優れてた短時間殺菌力を示した。しかし 24 時間後の生菌数を検討した結果、VCM は 2 MIC 濃度では明らかな菌数の減少が見られ、1 MIC で若干の菌の再増殖を認めるのにすぎなかった。これに対し ABK は 6 時間まで著しく生菌数を減少させたが、24 時間後は菌の再増殖を認めた。IPM は JM 1010 株に対して生菌数を減少させたが、24 時間後では 2 MIC 濃度以外は菌の再増殖が

認められた (Figs. 1, 2)。

以上の結果から ABK は他の 2 剤よりも短時間殺菌力が優れていたが、24 時間処理では容易に菌を再増殖させてしまう抗菌薬であることがわかった。

3) MRSA と *P. aeruginosa* の混合培養系における ABK, VCM と IPM との併用時の殺菌効果

MRSA JM 1011 株と *P. aeruginosa* JP 1062 株の混合培養系において ABK 単剤と VCM+IPM 併用時の MRSA と *P. aeruginosa* それぞれに対する生菌数の推移を比較検討した。MRSA JM 1011 株に ABK 1 MIC, 2 MIC および 4 MIC 濃度を処理すると 2 時間後の生菌数はもっとも減少したが、その後再増殖する傾向にあった。VCM と IPM の併用時の生菌数の減少は ABK と IPM との併用に比べ少なかったが、24 時間後の生菌数は 6 時間後のそれより低く、再増殖しても軽度であった (Fig. 3)。

この時の *P. aeruginosa* JP 1062 株の生菌数は、ABK 単剤の場合は 6 時間後は測定限界以下、24 時間後でも 10⁶CFU/ml 前後と著明な殺菌力を示した。これに対し VCM と IPM を同時投与した場合には、ABK 投与に比し生菌数の減少は弱く菌の再増殖も見られた。殺菌力も軽度で、再増殖もみられた (Fig. 3)。

4) MRSA に対する ABK と IPM の併用殺菌効果と微小コロニー出現率

MRSA JM 1010, JM 1011 株に対し、ABK 1 MIC 濃度に IPM 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 MIC 各濃度を併用した場合の殺菌力について検討した。ABK 単剤に比べ、IPM を併用した方が明らかに生菌数の著しい減少が見られた。しかも生菌数が一度低下した 6 時間の生菌数と 24 時間のそれとの差は、ABK 単剤に比べ IPM を併用した時の方が少なかった。この結果は ABK と IPM の併用は 24 時間後でも菌の再増殖を抑制することを示している (Fig. 4)。

また引き続き培養を行い微小コロニーの出現を観察したところ、ABK 単剤および ABK と IPM を併用したいずれの場合でも少なからず微小コロニーの出現が観察された。検出された微小コロニー数を生菌数で除した微小コロニー出現率は、ABK 単剤および ABK と IPM との併用でもともに同程度であった (Fig. 5)。

5) FIC index による ABK と IPM の併用効果の検

Table 1. MICs of arbekacin, vancomycin, imipenem and tobramycin against MRSA and *Pseudomonas aeruginosa*

Strain	Arbekacin	Vancomycin	Imipenem	Tobramycin
MRSA JP 1010	1	2	32	>128
MRSA JP 1011	2	2	16	>128
<i>P. aeruginosa</i> JP 1060	4	>128	4	2
<i>P. aeruginosa</i> JP 1061	4	>128	1	1

Number indicates the MIC ($\mu\text{g/ml}$).

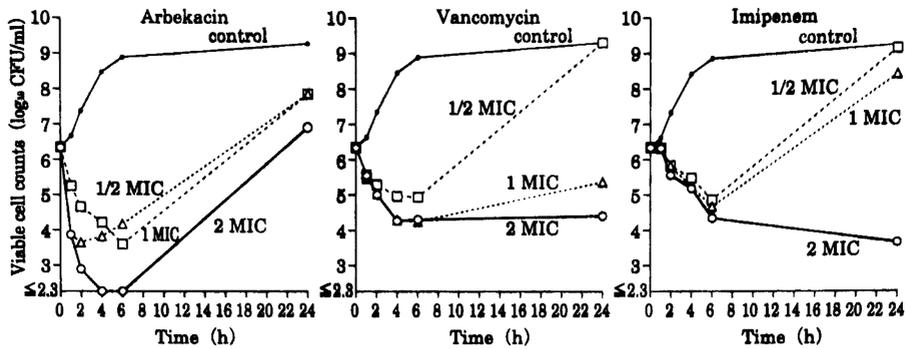


Fig. 1. Bactericidal activities of arbekacin, vancomycin and imipenem against *Staphylococcus aureus* JM 1010.

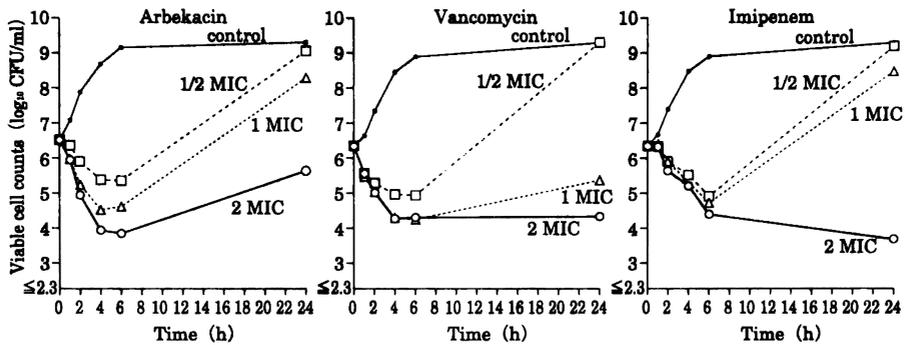


Fig. 2. Bactericidal activities of arbekacin, vancomycin and imipenem against *Staphylococcus aureus* JM 1011.

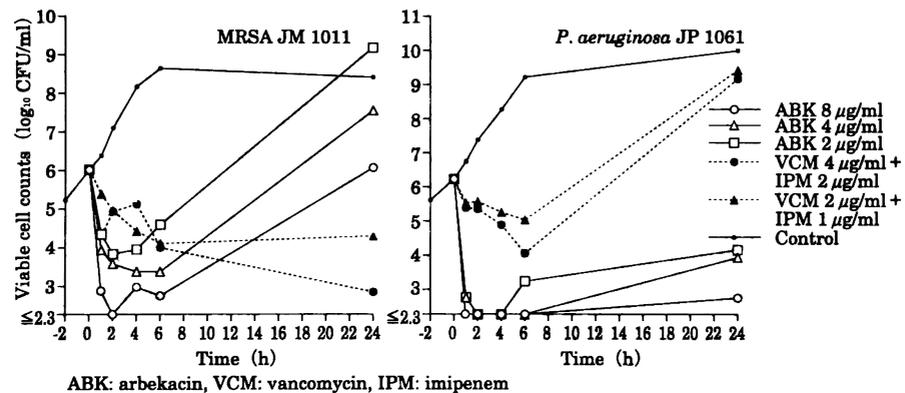


Fig. 3. Bactericidal activities against MRSA JM 1011 and *Pseudomonas aeruginosa* JP 1061: mixed culture.

討

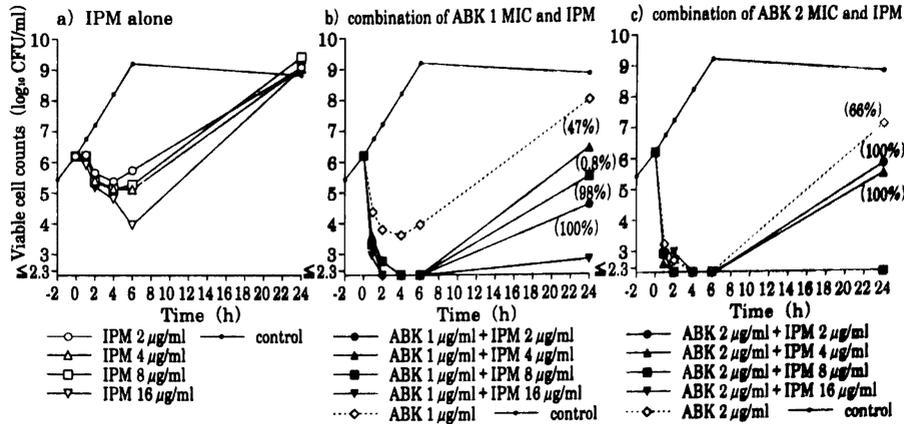
MRSA 保存菌株 15 株に対する ABK と IPM 併用時の FIC index を検討したところ、その平均は 0.661 であった。0~1 未満の株が 12 株であり ABK と IPM の相乗効果を示す株が多かった。残りの 3 株の FIC index は 1.0 の株が 2 株、2.0 の株が 1 株であった。

III. 考 察

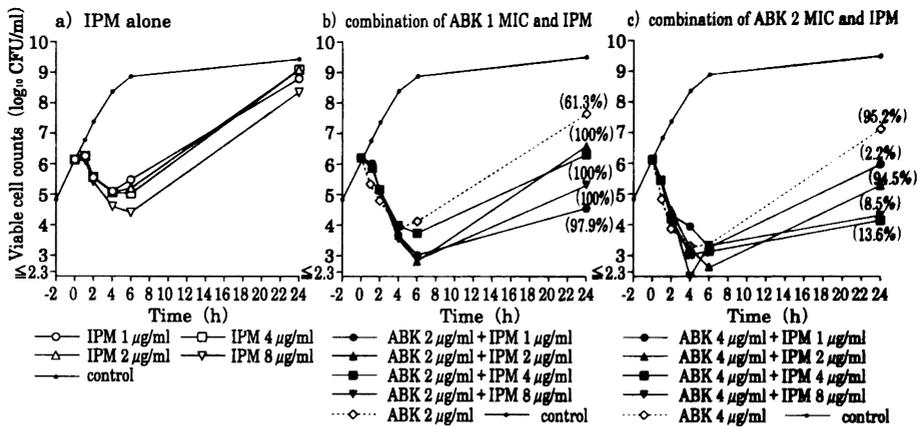
MRSA 感染症に対する ABK の有効性を検討するために、まず MRSA に対する ABK 単剤の殺菌力を VCM のそれと比較した。ABK は VCM に比し優れた用量依存的な短時間殺菌力を示した。しかし 24 時間後の生菌数を比較した場合 VCM では生菌数の減少が認め

られるのに対し、ABK は処理 6 時間後の生菌数に比べ 24 時間後の生菌数の方が多いという菌の再増殖傾向を認めた。これらの結果は過去の報告と一致するものである⁶⁾。この短時間殺菌力の差は、患者が重症でより早い治療効果を期待するときには ABK の方が VCM に比べ適していることを示している。

MRSA 感染症は複数菌感染症であることが多く、ABK は緑膿菌にも強い抗菌力を示し³⁾ 複数菌感染に有効であると考えられる。そこで MRSA と *P. aeruginosa* の混合培養における ABK 単剤の殺菌力を、VCM および ABK と、IPM との併用の場合とで比較した。ABK は両菌に対して優れた短時間殺菌力を有してお



() : rate of appearance of small re-growth colonies. IPM : imipenem, ABK : arbekacin
 Fig. 4. Bactericidal activities of arbekacin and imipenem against MRSA JM 1010 and rate of appearance of small re-growth colonies.



() : rate of appearance of small re-growth colonies. IPM : imipenem, ABK : arbekacin
 Fig. 5. Bactericidal activities of arbekacin and imipenem against MRSA JM 1011 and rate of appearance of small re-growth colonies.

り、特に緑膿菌の共存下では MRSA に対する抗菌力は顕著であったことから、MRSA と緑膿菌との複数菌感染症における有効性が示唆された。この MRSA 単独の時と比した短時間殺菌効果の増強は緑膿菌の存在下で MRSA の増殖が抑制されたためと考えられる。ABK は緑膿菌に対して長時間でもその増殖を抑制したが、MRSA に対しては長時間培養すると菌の著明な再増殖を認めた。

ABK を常用量である 100 mg 点滴静注したときの最高血中濃度は 7.56 $\mu\text{g/ml}$ である⁹⁾。MRSA に対して ABK 8 $\mu\text{g/ml}$ 存在下でも 24 時間後生菌数の増加が認められたことを考えると、ABK 単回投与で十分な治療効果は期待できない可能性が考えられた。一方、ABK は他のアミノ配糖体と同様に Post antibiotic effect (PAE) を MRSA に対して発揮する報告や⁷⁾、薬剤濃度シュミレーションシステムを用いた検討では ABK が MRSA の再増殖を薬剤消失後も抑制しているという報告がある⁸⁾。しかし我々の今回の結果では 24 時間後の菌数が ABK 8 $\mu\text{g/ml}$ でも認められたことは ABK の

PAE が特に長いとは考えられない。また ABK 処理後の増殖菌の MIC が処理前のそれに比べて上昇していないことから、再増殖の理由は今後の課題である。

また細菌の再増殖を生体の免疫機構が抑制してくれる期待もあるが、MRSA 感染症の患者はそのほとんどが免疫の低下したいわゆる immunocompromised host である⁹⁾。したがって本研究で見られた ABK 存在下での MRSA の再増殖は、臨床効果においても影響をおよぼす可能性がある。そのため再増殖菌を抑制しさらに殺菌力も増強するような併用療法がより効果的であると考えられる。

今まで ABK と臨床的に併用効果が認められるとする報告のあるものに IPM^{10,11)} がある。そこで今回 IPM と ABK を併用した場合の MRSA に対する殺菌力を検討したところ、明らかに併用による短時間の殺菌効果の増強が認められた。また IPM の併用により若干であるが MRSA の再増殖も抑制される傾向にあった。細菌学的な面からも ABK と IPM の相乗効果が認められ、臨床での有用性が示唆された。鈴木らは MRSA に ABK

を作用させた場合の耐性菌出現について報告している¹⁰⁾。それによれば、ABKの濃度がMIC濃度より高くなればなるほど耐性菌が選択され難いと述べている。この結果、今回我々が示したABKとIPMの併用によって、FIC indexからMRSA 15株に対して併用効果が見られたことから、併用時のABKのMICの低下は血中濃度との差をより大きくすることを意味すると考えれば、耐性菌もABK単剤投与に比べ、併用時の方が出にくいといえよう。併用療法によりMRSAのABK耐性菌の出現頻度が減少することも期待できることも重要な点である。またIPMだけではなく他の β -lactam系抗菌薬¹³⁾などの組み合わせもABKと併用効果を示す可能性があり、より効果的な組み合わせと投与方法について検討をする意義があろう。

また青木らはABK単剤の存在下で24から48時間培養するとMRSAの微小コロニーが出現することを報告している¹¹⁾。この微小コロニーが臨床効果に影響をおよぼしている可能性は少ないと報告されているが、原因や病原性について不明である。今回の検討でもABK単独で48時間までに微小コロニーが観察された。この現象はアミノ配糖体に多く認められると言うこれまでの報告¹⁴⁾から、IPMの併用で微小コロニーの出現が抑制されるのではないかと考え検討した。しかし今回の検討ではABK単独、IPMとの併用いずれの場合も微小コロニーの再増殖菌が抑制されるというデータは得られなかった。ABK処理によって出現したこれらの微小コロニー形成菌の分裂に要する世代時間は、比較的長いことは間違いない。しかしそれ以外の細菌学的性状や生体でのかかわりは不明であり、ABKと微小コロニーについてはさらなる基礎的な検討が必要である。

文 献

- 1) Aoki Y: Bactericidal activity of arbekacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* comparison with that of vancomycin Jap. J. Antibiotics 47: 640~646, 1994
- 2) 中澤 靖, 他: 国立東宇都宮病院におけるMRSAの分離状況。第43回日本感染症学会東日本支部総会講演抄録集 p 72, 1994
- 3) 木村昭夫, 西澤健司, 青砥泰二, 大塚敏文: 臨床検体より分離された緑膿菌に対するArbekacinの抗菌力の検討。感染症誌 67: 1138~1139, 1993
- 4) Ellison 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
- 5) 石井孝弘, 高山吉弘, 高瀬由美子, 折笠義則: ArbekacinおよびvancomycinのMRSAに対する基礎的検討。Jap. J. Antibiotics 47: 647~654, 1994
- 6) 山本 敬, 小山 優, 中川圭一: HBKの臨床第一相試験 Chemotherapy 34 (supple. 1) : S104~116, 1986
- 7) 戸塚恭一, 清水喜八郎, 三富奈由, 新里鉄太郎, 荒明美奈子: Arbekacinの一日一回投与方法の検討。Jap. J. Antibiotics 47: 676~692, 1994
- 8) 辻 明良, 菅野利恵, 山口恵三, 五島瑳智子, 高田利彦, 高瀬由美子, 吉田 隆: 薬剤濃度シュミレーションシステムを用いたMRSAと緑膿菌の混合培養におけるArbekacinの抗菌効果。Jap. J. Antibiotics 47: 655~663, 1994
- 9) 中澤 靖, 柴 孝也: 耳鼻科における院内感染, MRSAを中心として。耳鼻咽喉科展望 39: 88~93, 1996
- 10) 高田利彦, 高瀬由美子, 高山吉弘, 折笠義則, 吉田隆: MRSAと*Pseudomonas aeruginosa*との混合培養および混合感染におけるarubekacinとimipenem/cilastatinの併用効果 Chemotherapy 42: 997~1008, 1994
- 11) 橋本敦郎, 大坪孝和, 朝野和典, 他: MRSA感染症におけるArbekacinとImipenem/Cilastatinとの併用療法に関する臨床的検討。Jap. J. Antibiotics 47: 804~812, 1994
- 12) 鈴木孝夫, 藤田欣一, 長町幸雄, 大久保豊司: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*のArbekacin耐性菌出現について。Jap. J. Antibiotics 47: 634~639, 1994
- 13) 渡辺忠洋, 蘇武建一, 高瀬幸夫, 川端敏枝, 関野麻紀子, 吉田 隆: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対するArbekacinと β ラクタム剤の併用効果に関する基礎的検討。Jap. J. Antibiotics 47: 701~709, 1994
- 14) Soren L, Nilsson L: Regrowth of Aminoglycoside-Resistant Variants and its Possible Implication for Determination of MICs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 26: 501~506, 1984

Bactericidal activity of arbekacin and it combined with imipenem against MRSA

Yasushi Nakazawa, Katsutoshi Saruta, Naoko Shindo, Mitsuo Sakamoto,
Hiromi Maesawa, Kouji Yoshikawa, Masaki Yoshida,
Kouya Shiba and Osamu Sakai

Jikei University School of Medicine, Internal Medicine 2,
3-25-8, Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo, Japan

We examined the bactericidal activity of arbekacin (ABK) against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in comparison with that of vancomycin (VCM). Against MRSA JM 1010 and JM 1011, isolated clinical materials, ABK showed good bactericidal activity in a dose dependent manner, while VCM showed time dependent activity. Over 6 hours, however we observed a marked tendency for re-growth of MRSA after ABK treatment. We also examined synergistic activities of a combination of ABK and imipenem (IPM) against MRSA. With treatment utilizing both drugs, we observed good synergistic effects producing strong bactericidal activity and inhibition of the re-growth phenomenon as compared with ABK alone. We therefore recommended combination therapy with ABK and IPM for patients with MRSA infections.