

【原著・基礎】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する vancomycin と cephem 系薬の併用効果

渋谷 泰寛^{1)a)}・大野 高司²⁾・伊東 紘一¹⁾¹⁾自治医科大学臨床検査医学講座*²⁾同 臨床検査部^{a)}現: 東京都立広尾病院呼吸器科

(平成 15 年 4 月 15 日受付・平成 15 年 9 月 5 日受理)

1999 年から 2000 年の 2 年間に自治医科大学付属病院において、血液材料から分離された methicillin 耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 102 株に対する vancomycin (VCM) と第 4 世代 cephem 系薬すなわち cefpirome (CPR), cefoselis (CFSL), cefepime (CFPM) あるいは ceftazidime (CZOP) との併用効果をチェッカーボード法で検討した。VCM と CPR の併用では 102 株中 77 株 (75.5%) に、CFSL との併用では 82 株 (80.4%)、CFPM との併用では 81 株 (79.4%) あるいは CZOP との併用では 76 株 (74.5%) に相乗作用あるいは相加作用が認められた。また、これらの併用における平均 Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index は 0.67~0.75 であった。なお、いずれの併用においても拮抗を示す併用群はなかった。以上の成績より、VCM と第 4 世代 cephem 系薬の間には、MRSA に対し協力作用のあることが明らかとなり、臨床応用が期待できると考えた。

Key words: MRSA, vancomycin, cefoselis, 相乗効果, チェッカーボード法

Methicillin 耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染は耐性菌感染症の代表であり、わが国では、1991 年にグリコペプチド系の抗 MRSA 薬である vancomycin (VCM) の全身投与が承認された。その後、アミノ配糖体系の arbekacin (ABK), 続いてグリコペプチド系の teicoplanin (TEIC) が承認され、現在これらの 3 薬が全身性 MRSA 感染症の治療薬として市販されている。しかし、単独投与では十分な治療効果が得られない場合もあり、併用療法に関する報告がいくつかある。著者ら¹⁾は、血液由来の MRSA に対して、すでに ABK と imipenem/cilastatin あるいは levofloxacin の併用効果について検討しており、平均 Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index はそれぞれ 0.85 および 0.89 であったと報告し、臨床応用への可能性を示唆してきた。

一方、VCM は腎毒性があるために、副作用軽減などの観点から、医療現場では VCM と β -lactam 系薬の併用療法が行われることが多く、清水ら²⁾は 106 例の MRSA 感染症患者のうち、96 例に VCM と β -lactam 系薬などの併用療法を行い、その臨床成績を報告している。しかし、薬剤を併用する場合、併用する薬剤の選択によっては、必ずしも協力的な効果を示すとは限らず^{1,3)}、それぞれの組み合わせについての基礎データを集積する必要があると考えている。

そこで今回、1999 年から 2000 年の 2 年間に当院において血液材料から分離された 102 株の MRSA を用いて、VCM と第 4 世代 cephem 系薬の cefpirome (CPR), cefoselis (CFSL), cefepime (CFPM) および ceftazidime (CZOP) と

の併用効果について、*in vitro* で検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

以下に示す力価の明らかな標準品を供試した。なお、VCM は塩野義製薬、TEIC, CPR および CFSL は藤沢薬品、CFPM は明治製菓、CZOP は武田薬品のものを使用した。また、oxacillin (MIPIC) は Sigma 社製を使用した。

2. 使用菌株

1999 年から 2000 年までの 2 年間に、自治医科大学付属病院において、血液材料から分離された黄色ブドウ球菌で、MIPIC に対する感受性 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) が $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の 102 株を MRSA として供試した。

3. 抗菌力測定

接種菌液は Mueller-Hinton 寒天培地 (BBL) で 37°C 、1 夜培養した菌を滅菌生理食塩液に懸濁し、Mac Farland 0.5 に調整後、生理食塩液で 10 倍希釈した。

培地は Mueller-Hinton プロス (Difco) を用い、最終濃度 $25\sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Ca^{2+} および $12.5\sim 25 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Mg^{2+} を添加した Cation-adjusted Mueller-Hinton プロス (CAMHB) を調製した。

感受性 (MIC) は日本化学療法学会の定める標準法⁴⁾に準じて、MIC 2000 による微量液体希釈法で測定した。なお、培養は 35°C 、20 時間とし、接種菌量は約 5×10^4

* 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1

cells/well であった。

4. チェッカーボード法による併用効果測定

VCM と cephem 系薬の併用効果を MIC 2000 による微量液体希釈法のチェッカーボード法で測定し、下記の計算式より、FIC index を算出し、得られた FIC index の最小値を最小 FIC index として表示した。最小 FIC index 値が ≤ 0.5 を相乗作用、 $> 0.5 \sim \leq 1.0$ を相加作用、 $> 1.0 \sim \leq 2.0$ を不関、および > 2.0 を拮抗作用とした⁵⁾。なお、培養は 35°C、20 時間とし、接種菌量は約 5×10^4 cells/well であった。

FIC index =

$$\frac{\text{併用時薬剤 A の MIC 値}}{\text{単独時薬剤 A の MIC 値}} + \frac{\text{併用時薬剤 B の MIC 値}}{\text{単独時薬剤 B の MIC 値}}$$

II. 結 果

1. 抗菌力測定

102 株の MRSA に対する各薬剤の MIC 値を Table 1 に示した。VCM に対する感受性は $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ に分布し、MIC₅₀ 値および MIC₉₀ 値はいずれも $1 \mu\text{g/mL}$ であった。TEIC に対する感受性は $0.25 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ に分布し、VCM に比較して MIC 値の高い菌株が認められたが、MIC₅₀ 値および MIC₉₀ 値はいずれも $1 \mu\text{g/mL}$ であった。各 cephem 系薬の MIC₅₀ 値および MIC₉₀ 値は、CPR ではいずれも $64 \mu\text{g/mL}$ 、CFSL ではいずれも $16 \mu\text{g/mL}$ 、CFPM ではそれぞれ $128 \mu\text{g/mL}$ および $> 128 \mu\text{g/mL}$ 、CZOP ではそれぞれ $32 \mu\text{g/mL}$ および $64 \mu\text{g/}$

mL であり、4 薬中 CFSL の MIC₅₀ 値および MIC₉₀ 値がもっとも低値を示した。

2. VCM と cephem 系薬の併用効果

VCM と各 cephem 系薬の併用時の最小 FIC index の結果を Table 2 に示した。VCM に CPR を併用した場合、最小 FIC index が ≤ 0.5 、すなわち相乗を示したものはなく、 $> 0.5 \sim \leq 1.0$ の相加を示したものは 77 株 (75.5%)、 $> 1.0 \sim \leq 2.0$ の不関のものは 25 株 (24.5%) であった。この組み合わせにおける各菌株の最小 FIC index は $0.51 \sim 1.50$ に分布し、平均は 0.75 ± 0.3 であった。同様に、VCM と CFSL の併用では相乗が 3 株 (2.9%)、相加が 79 株 (77.5%)、不関が 20 株 (19.6%)、最小 FIC index は $0.38 \sim 1.25$ に分布し、平均 0.71 ± 0.2 であった。VCM と CFPM の併用では相乗が 1 株 (1%)、相加が 80 株 (78.4%)、不関が 21 株 (20.6%)、最小 FIC index の分布は $0.5 \sim 1.5$ 、平均は 0.67 ± 0.2 であり、また VCM と CZOP の併用では相乗が 4 株 (3.9%)、相加が 72 株 (70.6%)、不関が 26 株 (25.5%)、最小 FIC index の分布は $0.5 \sim 1.5$ 、平均は 0.74 ± 0.2 であった。なお、いずれの組み合わせにおいても、最小 FIC index が > 2.0 の拮抗を示すものはなかった。

次に、最小 FIC index を算出した時の各 cephem 系薬の濃度を調べ、VCM の存在により、各 cephem 系薬の抗菌力がどのように影響されたかについてまとめ直した結果を Table 3 および Fig. 1 に示した。Cephem 系薬

Table 1. Summary of MIC distributions of antimicrobials in MRSA isolated from blood cultures

	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Vancomycin	0.5-1	1	1
Teicoplanin	0.25-8	1	1
Cefpirome	1-128	64	64
Cefoselis	2-64	16	16
Cefepime	2->128	128	>128
Cefozopran	2-128	32	64
Oxacillin	4->128	>128	>128

*102 strains

Table 2. Combined effects of cepheims and vancomycin against MRSA isolated from blood cultures

	FIC index		%			
	mean \pm SD	range	synergy	addition	no relation	antagonism
Cefpirome	0.75 ± 0.3	0.51-1.50	0.0	75.5	24.5	0
Cefoselis	0.71 ± 0.2	0.38-1.25	2.9	77.5	19.6	0
Cefepime	0.67 ± 0.2	0.5-1.50	1.0	78.4	20.6	0
Cefozopran	0.74 ± 0.2	0.5-1.50	3.9	70.6	25.5	0

*102 strains

Table 3. Summary of MIC distributions for cephems combined with vancomycin against MRSA isolated from blood cultures

		MICs		
		range ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Cefpirome	alone	2–128	32	64
	combination	0.125–32	2	16
Cefoseils	alone	2–64	16	16
	combination	0.125–16	2	8
Cefepime	alone	8–512	128	256
	combination	1–128	8	64
Cefozopran	alone	2–128	32	64
	combination	0.125–64	4	16

*102 strains

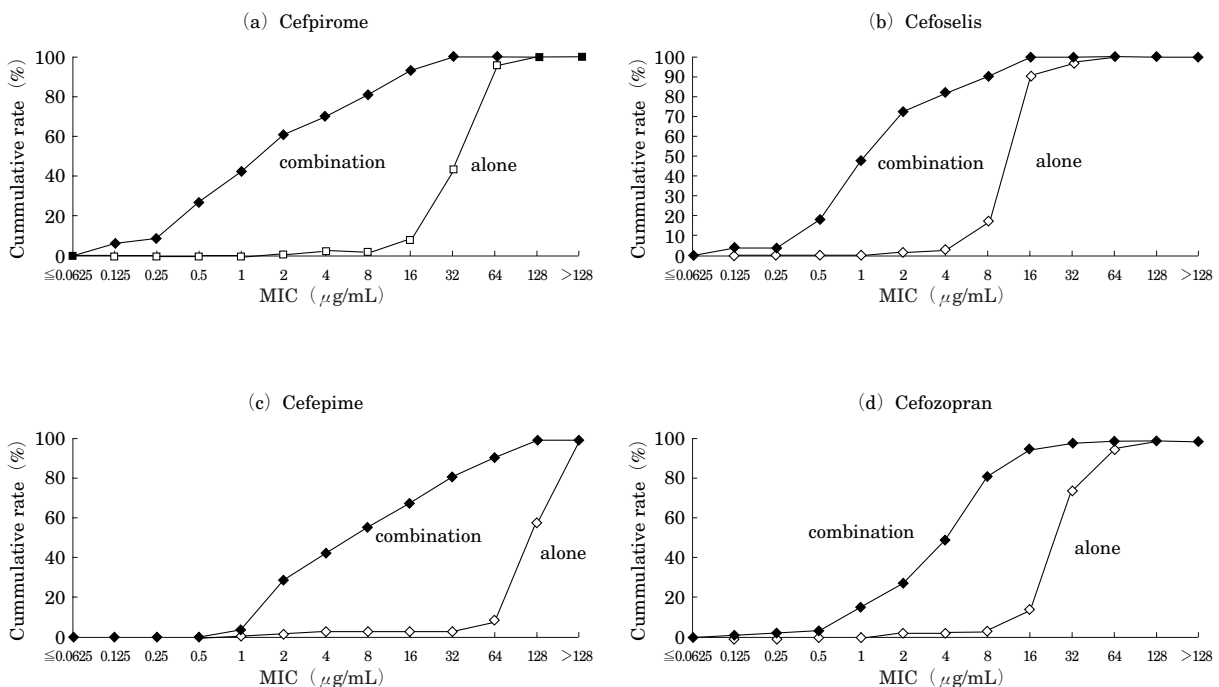


Fig. 1. MIC distributions of four vancomycin–cephem combined treatments in MRSA isolated from blood cultures.

単独での MIC 値と VCM 併用時の cephem 系薬の MIC 値を比較したところ、いずれも VCM の併用によって、各 cephem 系薬の MIC₅₀ 値は 1/8 倍、MIC₉₀ 値は 1/2 倍から 1/4 倍に小さくなることがわかった。すなわち、併用により、各 cephem 系薬の MIC 累積曲線は感受性側、すなわち効果が高くなることがわかった。

なお、各 cephem 系薬との併用による VCM の MIC 値は 1/2 倍から 1/4 倍に小さくなった。

III. 考 察

VCM は MRSA 感染症の第一選択薬として汎用されているが、腎毒性などの副作用が強いために、副作用軽減策のひとつとして、また VCM の移行性が悪い組織での MRSA 感染症対策として、臨床現場では β -ラクタム系薬との併用療法が実施されている²⁾。

しかしながら、選択される併用薬剤によっては、必ずしも協力的な効果を示すとは限らず、むしろ拮抗的に働くとの報告も散見される^{1,3)}。そこで今回、1999 年から 2000 年の 2 年間に当院で分離された 102 株の MRSA を用いて、VCM と第 4 世代 cephem 系薬の CPR、CFSL、CFPM あるいは CZOP のそれぞれの併用効果について、チェッカーボード法により *in vitro* での検討を行い、併用至適薬剤を検討した。

VCM と CPR の併用では 102 株中 77 株 (75.5%) に、CFSL との併用では 82 株 (80.4%)、CFPM との併用では 81 株 (79.4%)、および CZOP との併用では 76 株 (74.5%) に相乗作用あるいは相加作用が認められた。また、それぞれの併用における平均最小 FIC index は 0.67~0.75 であり、拮抗を示す併用群はなかった。ま

た、島倉ら⁶⁾はVCMとpiperacillinを併用した時の殺菌効果を*in vitro*で検討した結果、殺菌効果が増強したと報告している。波多野ら⁷⁾はVCMとCFSLの*in vitro*での併用効果が*in vivo*効果に反映されるかどうかを確認するために、マウス実験的MRSA感染症で検討した結果、*in vivo*においても併用効果のあることを報告している。なお、MRSAに対するVCMと今回検討したcephem系薬との併用効果のメカニズムは明らかではない。VCMは細胞質膜で合成されたGlcNAc-MurNAc-pentapeptide-pp-lipidがペリプラズムに到達した後、pp-lipidを遊離するとともに既存の細胞壁ペプチドグリカンの成長末端部に転移付加される反応を阻害するといわれている⁷⁾。一方、cephem系薬はpenicillin-binding proteinsに結合して、細胞壁でグリカン鎖の重合とペプチド相互間の結合、すなわち架橋反応を阻害するといわれている。このように、両薬剤とも共通して、細菌細胞壁合成阻害に関与するがその作用点が異なっており、細胞壁合成をダブルブロックすることにより協力的な作用が発現したものと推定している。

また、今回の結果によってVCMと検討したcephem系薬との間に併用効果が認められ、VCMのMIC値は1/2倍から1/4倍に小さくなった。したがって、臨床現場で投与するVCM量を軽減させることが可能であり、VCMの毒性の軽減につながる可能性がある⁸⁾。

以上のように、*in vitro*の試験成績より、VCMと併試cephem系薬との間には併用効果が認められ、臨床応用が期待できることが示唆されることから、今後は*in vitro*および*in vivo*の基礎データが臨床面に反映されるかどうか確認する必要がある。

一方、VCMと同じグリコペプチド系抗菌薬のTEICについては、今回cephem系薬との併用効果の検討を行わなかった。しかし、TEICはVCMと同様に β -lactam系薬との併用効果発現率が高いという報告もあり⁹⁻¹¹⁾、今後TEICについても、今回の試験と同様の検討を行う

必要がある。

本論文の要旨は第47回日本化学療法学会東日本部会総会(2000年10月、旭川市)で発表した。

文 献

- 1) 渋谷泰寛, 大野高司, 伊東紘一: 血液由来MRSAに対する各種抗菌薬とABKとの併用効果。日化療会誌49: 89~94, 2001
- 2) 清水喜八郎, 折津 愈, 菅野治重, 他: MRSA感染症に対するバンコマイシンの使用経験。Jpn J Antibiotics 49: 782~799, 1996
- 3) 豊川真弘, 浅利誠志, 堀川晶行, 他: MRSAに対するcefotiam/vancomycin, cefotiam/arbekacinおよびminocycline/vancomycinの*in vitro*併用効果。日化療会誌44: 590~593, 1996
- 4) 日本化学療法学会: 微量液体希釈法MIC測定法。Chemotherapy 38: 102~105, 1990
- 5) Hewlett P S: Measurement of potencies of drug mixtures. Biometrics 25: 477~487, 1969
- 6) 波多野和男, 若井芳美, 東 康之, 他: *In vivo* pharmacokinetic modelによるmethicillin耐性Staphylococcus aureusに対するvancomycinとcefoselisの併用治療効果。日化療会誌44: 213~219, 1996
- 7) Barna J C J, Williams D H: The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. Ann Rev Microbiol 38: 339~357, 1984
- 8) 浅利誠志: MRSA消毒・除菌と治療—チーム医療で退治できるMRSA—。改訂増補第2版, p.57~58, 最新医学社, 大阪, 2000
- 9) 島倉雅子, 堀りつ子, 高畑正裕, 他: Methicillin-resistant Staphylococcus aureusに対するpiperacillinとvancomycin, teicoplaninおよびarbekacinの*in vitro*併用効果。臨床と微生物27: 227~230, 2000
- 10) 宇津井幸男, 石井千加, 阿部友美, 他: 高度耐性MRSAに対するテイコプラニンとパニペネムの併用効果。Jpn J Antibiotics 52: 268~277, 1999
- 11) 大塚喜人, 吉部貴子, 濤岡美穂, 他: MRSAに対するテイコプラニンと β -ラクタム系抗菌薬の併用効果。Jpn J Antibiotics 53: 643~651, 2000

Combined antibacterial effects of between vancomycin and cepheims in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Yasuhiro Shibuya^{1)a)}, Takashi Ohno²⁾ and Kouichi Itoh¹⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi, Japan

²⁾Department of Clinical Laboratory, Jichi Medical School Hospital

^{a)}Present address: Department of Respiratory Medicine, Tokyo Metropolitan Hiroo General Hospital

In vitro interactions between vancomycin (VCM) and cefpirome (CPR), cefoselis (CFSL), cefepime (CFPM), or ceftazidime (CZOP) were studied using the micro-dilution checkerboard technique in 102 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). All strains were isolated from blood samples obtained from patients admitted to Jichi Medical School between 1999 and 2000. Out of 102 strains, synergism or an additive action was observed in 77 strains (75.5%) treated with VCM plus CPR, 82 strains (80.4%) treated with VCM plus CFSL, 81 strains (79.4%) treated with VCM plus CFPM, and 76 strains (74.5%) treated with VCM plus CZOP. The fractional inhibitory concentration (FIC) indexes for VCM plus each of the four cepheims were between 0.67 and 0.75. Antagonism was not observed in any of the VCM-plus-any cephem combinations. Treatment with a combination of VCM and a fourth-generation cephem, such as CPR, CFSL, CFPM or CZOP, produces synergistic or additive effect and should be considered for the treatment of MRSA infections.