

## 【原著・基礎】

多剤耐性緑膿菌に対する抗菌薬3剤の *in vitro* 併用効果

木場由美子<sup>1)</sup>・猪川 和朗<sup>2)</sup>・小野寺 一<sup>1)</sup>・長岡 里枝<sup>1)</sup>・原 稔典<sup>1)</sup>  
城市由美子<sup>1)</sup>・横崎 典哉<sup>3)</sup>・大毛 宏喜<sup>4)</sup>・森川 則文<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 広島大学病院診療支援部

<sup>2)</sup> 広島大学大学院医歯薬保健学研究院臨床薬物治療学\*

<sup>3)</sup> 広島大学病院検査部

<sup>4)</sup> 同 感染症科

(平成 24 年 2 月 28 日受付・平成 24 年 4 月 13 日受理)

本研究では、多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : MDRP) に対する抗菌薬 3 剤の *in vitro* 併用効果を検討した。広島大学病院において臨床検体から分離された緑膿菌で感染症法上の MDRP 報告基準に該当した株、すなわち抗菌薬の MIC が meropenem (MEPM)  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ , ciprofloxacin (CPFX)  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ , amikacin (AMK)  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  のすべてを満たした 40 株を対象とした。併用した抗菌薬 3 剤の組み合わせは、i) MEPM+CPFX+AMK, ii) piperacillin (PIPC)+aztreonam (AZT)+arbekacin (ABK) であり、i) は MDRP の報告基準をもとに、ii) は荒岡らの報告をもとに 3 薬剤を選択した。これらの抗菌薬を組み合わせたチェッカーボードプレートを作成し、抗菌薬 3 剤の併用効果について検討した。各抗菌薬の平均 MIC 値を比較し、算出した fractional inhibitory concentration (FIC) index により分類された相乗作用と相加作用の総和を「併用効果あり」と判定した。さらに、i) 抗菌薬 3 剤 (MEPM+CPFX+AMK) の併用により MIC 値が低下した株について、MDRP 報告基準に該当し続けるか否かを検討した。これらの検討の結果、i) MEPM の MIC 値 (平均 $\pm$ 標準偏差) は、単剤で  $31.6 \pm 2.53 \mu\text{g/mL}$ , 2 剤併用の MEPM+CPFX で  $30.5 \pm 5.6 \mu\text{g/mL}$ , MEPM+AMK では  $23.6 \pm 11.7 \mu\text{g/mL}$  であり、3 剤併用の MEPM+CPFX+AMK では  $18.5 \pm 12.2 \mu\text{g/mL}$  であった。CPFX, AMK についても、同様に単剤から 2 剤併用、3 剤併用になるにつれて平均 MIC 値の低下が認められた。相乗作用が最も強かったのは MEPM+CPFX+AMK の 4 株 (10.0%) であり、「併用効果あり」でも 24 株 (60.0%) と最も大きかった。ii) PIPC の MIC 値は、単剤  $8.0 \mu\text{g/mL}$ , 2 剤併用の PIPC+AZT で  $6.7 \pm 2.5 \mu\text{g/mL}$ , PIPC+ABK では  $7.8 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$  であり、3 剤併用の PIPC+AZT+ABK では  $3.2 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$  であった。AZT, ABK についても同様に、単剤から 2 剤併用、3 剤併用になるにつれて平均 MIC 値の低下が認められた。相乗作用が最も大きかったのは PIPC+AZT+ABK の 13 株 (32.5%) であり、「併用効果あり」でも 31 株 (77.5%) と最も大きかった。さらに、i) 抗菌薬 3 剤 (MEPM+CPFX+AMK) において、3 剤併用により MIC 値が低下し、MDRP 報告基準に該当する株の割合は 100% (40/40) から 42.5% (17/40) へと減少した。以上より、*in vitro* において抗菌薬 3 剤の併用効果が示された。今後は、3 剤併用療法の意義を明確にするうえで、他の組み合わせについても *in vitro* 併用効果データを集積し比較検討することが重要と考えられた。

**Key words:** multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, checkerboard, FIC index

多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : MDRP) は、感染症法上の「薬剤耐性緑膿菌症」として、広域  $\beta$ -ラクタム、アミノ配糖体、フルオロキノロンの 3 系統の薬剤に対して耐性を示す緑膿菌による感染症とされている<sup>1)</sup>。その報告基準は、MIC 値が imipenem (IPM)  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ , ciprofloxacin (CPFX)  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ , amikacin (AMK)  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  のすべてを満たす緑膿菌とされ、現在では、IPM

以外のカルバペネム系薬剤または CPFX 以外のフルオロキノロン系薬剤に耐性と判定した場合も MDRP の報告基準を満たすことが感染症法関連通達に記載されている。さらに、MDRP は 5 類感染症に指定され、届け出が必要であり、重要な耐性菌の一つとなっている。健康成人では感染症を発症することは少ないが、免疫不全患者や重篤な基礎疾患を有する患者では、敗血症などの重症感染症を発症するおそれがあり、

\*広島県広島市南区霞 1-2-3

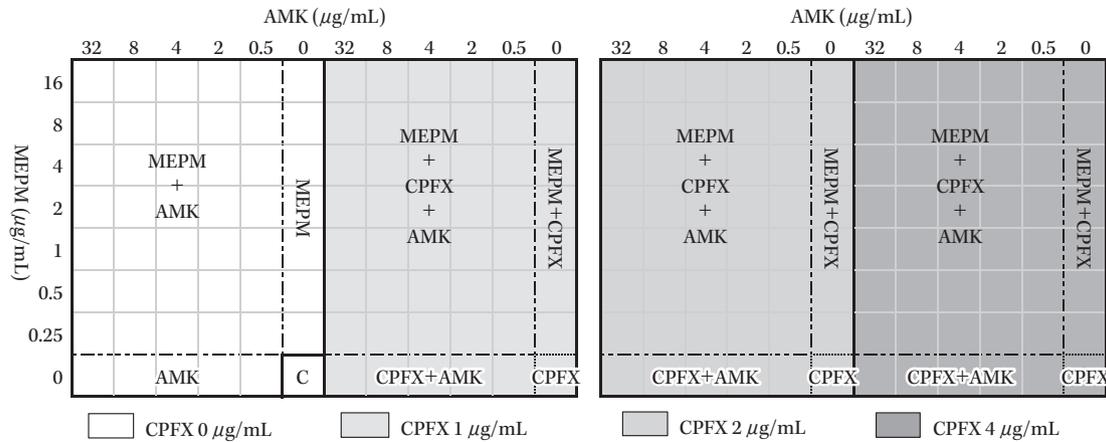


Fig. 1 i). Checkerboard plates for the determination of combined effects (meropenem [MEPM] + ciprofloxacin [CPFX] + amikacin [AMK]). Antibacterial combinations and concentrations were designed with two plates (a total of 192 wells) for single, double and triple combinations.

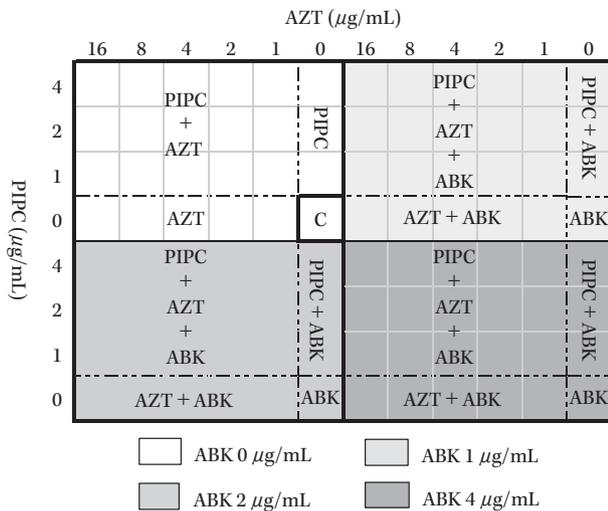


Fig. 1 ii). Checkerboard plate for the determination of combined effects (piperacillin [PIPC] + aztreonam [AZT] + arbekacin [ABK]). Antibacterial combinations and concentrations were designed with one plate (a total of 96 wells) for single, double and triple combinations.

患者の予後を左右するため、適切な治療が求められる。抗菌療法としては、単剤投与で効果が期待できないと考えられており、抗菌薬の併用効果が期待されている。

抗菌薬の併用効果の検査方法には、checkerboard法<sup>2-4)</sup>、spectrophotometer法、殺菌曲線法、ディスク拡散法、E-test配置組み換え法などがあるが、checkerboard法を用いた報告が多くみられる。その後、Tatedaらがbreak-point checkerboard (BC)法にもとづいたBCプレートを考案した<sup>5)</sup>。BCプレート‘栄研’は、1枚のプレートで複数の抗菌薬の組み合わせによる併用効果が判定でき、スクリーニング法として有用であると報告されている<sup>6)</sup>。ただし、併用する組み合わせとして、MDRPに対する2剤の併用効果<sup>2,5-8)</sup>は多く報告されているが、3剤の併用効果は報告されていない。

本研究では、BCプレート‘栄研’を参考に、独自のチェッカーボードプレートを作成し、3剤併用の併用効果と同時に単剤や2剤併用についても比較検討した。薬剤の組み合わせとして2種類のパターンi), ii)を考案した。i)感染症法におけるMDRPの報告基準を参考として、カルバペネム系薬剤のうち、臨床使用量が最も多いと考えられるmeropenem (MEPM)<sup>9)</sup>を選択し、CPFX, AMKとの組み合わせによる併用効果を検討した。他の組み合わせとしてii)荒岡らの報告<sup>10)</sup>を参考にpiperacillin (PIPC), aztreonam (AZT), arbekacin (ABK)の3剤についても検討した。

薬剤を併用することで相乗相加作用によりMICが低下し、薬剤耐性の判定結果が変化することも考えられる。そこで、i)抗菌薬3剤(MEPM+CPFX+AMK)の併用によりMIC値が低下した株について、MDRP報告基準に該当し続けるか否かについても検討した。

## I. 対象と方法

### 1. 対象

2004年から2010年までに、広島大学病院微生物検査室で臨床検体から分離された緑膿菌のうち、薬剤感受性試験によってMDRPと判定された40株を対象とした。MDRPの判定は感染症法におけるMDRP報告基準に従い、MICがMEPM $\geq$ 16  $\mu$ g/mL, CPFX $\geq$ 4  $\mu$ g/mL, AMK $\geq$ 32  $\mu$ g/mLのすべてを満たす緑膿菌とした。なお、同一患者由来の菌株は初回分離株のみ採用し、表現型の特徴から判断して同じ起源と考えられる菌株は除外した。

### 2. 薬剤感受性試験

BCプレート‘栄研’を参考に、独自の薬剤併用感受性チェッカーボードプレートを作成した(Fig. 1)。薬剤感受性試験は、Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI)に準じた微量液体希釈法にて実施した<sup>11)</sup>。培養は35 $^{\circ}$ C, 20時間とし、接種菌量は約 $5 \times 10^4$  CFUで行った。使用した抗菌薬および希釈系列は、i)MEPM(0, 0.25,

Table 1 i). MIC values for single, double and triple combinations of meropenem (MEPM), ciprofloxacin (CPFX) and amikacin (AMK) against 40 strains

MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			Minimum	Maximum	Mean $\pm$ SD	Statistical significance
MEPM	Single	MEPM	16	32	31.6 $\pm$ 2.53	* * *
	Double	MEPM + CPFX	4	32	30.5 $\pm$ 5.6	
		MEPM + AMK	1	32	23.6 $\pm$ 11.7	
	Triple	MEPM + CPFX + AMK	0.25	32	18.5 $\pm$ 12.2	
CPFX	Single	CPFX	8	8	8	* * *
	Double	MEPM + CPFX	1	8	7.6 $\pm$ 1.6	
		CPFX + AMK	1	8	7.5 $\pm$ 1.6	
	Triple	MEPM + CPFX + AMK	1	8	4.1 $\pm$ 3.3	
AMK	Single	AMK	64	64	64	* * *
	Double	MEPM + AMK	0.5	64	50.6 $\pm$ 18.5	
		CPFX + AMK	32	64	60.8 $\pm$ 9.7	
	Triple	MEPM + CPFX + AMK	0.5	64	42.7 $\pm$ 19.0	

\* P &lt; 0.05

0.5, 1, 2, 4, 8, 16  $\mu\text{g/mL}$ ), CPFX (0, 1, 2, 4  $\mu\text{g/mL}$ ), AMK (0, 0.5, 2, 4, 8, 32  $\mu\text{g/mL}$ ), ii) PIPC (0, 1, 2, 4  $\mu\text{g/mL}$ ), AZT (0, 1, 2, 4, 8, 16  $\mu\text{g/mL}$ ), ABK (0, 1, 2, 4  $\mu\text{g/mL}$ ) である。プレートは, i) で 2 枚, ii) では 1 枚使用した。なお, Fig.1 の C は陰性コントロールを表す。

Fig.1 i) では MEPM + CPFX + AMK の組み合わせについて示す。縦に MEPM, 横に AMK, 色分けした領域には CPFX の希釈系列をそれぞれ示した。さらに, MEPM, CPFX, AMK の単剤, MEPM + CPFX, MEPM + AMK, CPFX + AMK の 2 剤併用, MEPM + CPFX + AMK の 3 剤併用の組み合わせのパターンを示した。

Fig.1 ii) では PIPC + AZT + ABK の組み合わせについて示す。縦に PIPC, 横に AZT, 色分けした領域には ABK の希釈系列をそれぞれ示した。さらに, PIPC, AZT, ABK の単剤, PIPC + AZT, PIPC + ABK, AZT + ABK の 2 剤併用, PIPC + AZT + ABK の 3 剤併用の組み合わせのパターンを示した。

### 3. 併用効果の判定

測定した MIC を用いて, 下記の計算式により, fractional inhibitory concentration (FIC) index を算出し<sup>12)</sup>, 得られた FIC index の最小値を FIC index として採用した。2 剤併用の場合,  $\leq 0.5$  を相乗作用,  $0.5 < \sim \leq 1.0$  を相加作用,  $1.0 < \sim \leq 2$  を不関,  $> 2$  を拮抗作用とした。3 剤併用の場合には,  $\leq 0.75$  を相乗作用<sup>13)</sup>,  $0.75 < \sim \leq 1.5$  を相加作用,  $1.5 < \sim \leq 3$  を不関,  $> 3$  を拮抗作用とした。さらに, 相乗作用 + 相加作用を「併用効果あり」と判定した。

#### i) MEPM + CPFX + AMK の FIC index

$$= \frac{\text{併用時の MIC (MEPM)}}{\text{単剤時の MIC (MEPM)}} + \frac{\text{併用時の MIC (CPFX)}}{\text{単剤時の MIC (CPFX)}} + \frac{\text{併用時の MIC (AMK)}}{\text{単剤時の MIC (AMK)}}$$

#### ii) PIPC + AZT + ABK の FIC index

$$= \frac{\text{併用時の MIC (PIPC)}}{\text{単剤時の MIC (PIPC)}} + \frac{\text{併用時の MIC (AZT)}}{\text{単剤時の MIC (AZT)}} + \frac{\text{併用時の MIC (ABK)}}{\text{単剤時の MIC (ABK)}}$$

### 4. 抗菌薬 3 剤 (MEPM, CPFX, AMK) の併用による MDRP 報告基準該当株の割合

3 剤併用により MIC 値が低下した株については, CLSI によるブレイクポイント (CLSI M100-S19) に従った感受性分類 (susceptible [S], intermediate [I], resistant [R]) を新たに行った。そして, 単剤時と 3 剤併用時において, MDRP 報告基準 (MEPM  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  かつ CPFX  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  かつ AMK  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ ) に該当する株の割合を比較した。

### 5. 統計処理

統計ソフトウェア StatFlex for Windows Ver.6.0 (株式会社アーテック) を用いて, 併用の組み合わせによる群間の有意差検定は Dunn 検定, FIC index による比較には  $\chi^2$  検定を行った。有意水準は 5% とした。

## II. 結 果

### 1. MDRP が分離された患者の背景

対象菌株である 40 株のうち, 男女比は男性 : 女性 = 31 : 9, 平均年齢は 66.0 歳 (4 ~ 81 歳) であった。入院・外来では, 入院は 38 株, 外来は 2 株であり, 入院が 95.0% を占めた。臨床材料では, 最も多いのは尿 17 株 (42.5%) であり, 次に便 7 株 (17.5%), 痰 6 株 (15.0%), 血液 3 株 (7.5%), 膿 2 株 (5.0%), 胆汁 2 株 (5.0%), その他 3 株 (7.5%) であった。

### 2. 併用による各抗菌薬の感受性結果

#### i) MEPM + CPFX + AMK

各抗菌薬における MIC 値を Table 1 i) に示す。MEPM の平均 MIC 値は, 単剤 (31.6  $\mu\text{g/mL}$ ) から 2 剤併用 (30.5  $\mu\text{g/mL}$ , 23.6  $\mu\text{g/mL}$ ), 3 剤併用 (18.5  $\mu\text{g/mL}$ ) へと低下した。CPFX や AMK についても同様な低下がみられ

Table 1 ii). MIC values for single, double and triple combinations of piperacillin (PIPC), aztreonam (AZT) and arbekacin (ABK) against 40 strains

MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		Minimum	Maximum	Mean $\pm$ SD	Statistical significance
PIPC	Single PIPC	8	8	8	
	Double PIPC + AZT	1	8	6.7 $\pm$ 2.5	
	Double PIPC + ABK	1	8	7.8 $\pm$ 1.1	
Triple PIPC + AZT + ABK	1	8	3.2 $\pm$ 2.8		
AZT	Single AZT	4	32	29.1 $\pm$ 8.1	
	Double PIPC + AZT	2	32	27.5 $\pm$ 9.2	
	Double AZT + ABK	1	32	20.8 $\pm$ 10.7	
Triple PIPC + AZT + ABK	2	32	16.2 $\pm$ 9.9		
ABK	Single ABK	8	8	8	
	Double PIPC + ABK	4	8	7.9 $\pm$ 0.6	
	Double AZT + ABK	1	8	4.6 $\pm$ 3.2	
Triple PIPC + AZT + ABK	1	8	3.6 $\pm$ 2.7		

\*P&lt;0.05

た。

40株のうち、併用によりMIC値が低下した24株について、MEPMのMIC値をもとにした各菌株の推移をFig. 2 i) に示す。MEPMにCPFXを加えた2剤併用(MEPM+CPFX)でMIC値の有意な低下はみられなかったが、さらにAMKを加えた3剤併用では有意なMIC値の低下がみられた。2剤併用(MEPM+CPFX)から3剤併用になることで2管差以上低下した株、すなわち相乗作用がみられた株は24株中13株(54.2%)であり、最大で7管低下した。一方、MEPMにAMKを加えた2剤併用(MEPM+AMK)では有意なMIC値の低下がみられ、CPFXを加えた3剤併用になることで、有意差はないものの平均MIC値に減少傾向がみられた。2剤併用(MEPM+AMK)から3剤併用になることで2管差以上低下した株、すなわち相乗作用がみられた株は5株(20.8%)であった。

#### ii) PIPC + AZT + ABK

各抗菌薬におけるMIC値をTable 1 ii) に示す。PIPCの平均MIC値は、単剤(8.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )から2剤併用(6.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 7.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 3剤併用(3.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )へと低下した。AZTやABKについても同様な低下がみられた。

40株のうち、併用によりMIC値が低下した31株について、PIPCのMIC値をもとにした各菌株の推移をFig. 2 ii) に示す。PIPCにAZTを加えた2剤併用(PIPC+AZT)でMIC値の有意な低下はみられなかったが、ABKを加えた3剤併用では有意な低下がみられた。2剤併用(PIPC+AZT)から3剤併用になることで相乗作用がみられた株は31株中20株(64.5%)であった。同様に、PIPCにABKを加えた2剤併用(PIPC+ABK)でMIC値の有意な低下はみられなかったが、AZTを加えた3剤併用では有意な低下がみられた。2剤併用(PIPC+ABK)から3剤併用になることで相乗作用がみられた株は31株中

25株(80.6%)であった。

#### 3. FIC index を指標とした併用効果の判定

抗菌薬3剤 i) ii) のFIC indexを指標とした併用効果をTable 2に示す。

##### i) MEPM + CPFX + AMK

相乗作用が最も大きかったのは、3剤併用のMEPM+CPFX+AMKで4株(10.0%)であった。相乗作用と相加作用を加えた「併用効果あり」でも、MEPM+CPFX+AMKが24株(60.0%)と最大値を示した。また、拮抗作用を示す株はどの組み合わせにもみられなかった。

##### ii) PIPC + AZT + ABK

相乗作用が最も大きかったのは、3剤併用のPIPC+AZT+ABKで13株(32.5%)であった。相乗作用と相加作用を加えた「併用効果あり」でも、3剤併用のPIPC+AZT+ABKが31株(77.5%)と最大値を示した。また、拮抗作用を示す株はどの組み合わせにもみられなかった。

#### 4. 抗菌薬3剤(MEPM+CPFX+AMK)の併用によるMDRP報告基準該当株の割合

単剤時と3剤併用時における感受性分類の結果をTable 3に示す。3剤併用になることでMIC値が低下する菌株が認められ、MDRP報告基準すなわちMEPM $\geq$ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , CPFX $\geq$ 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , AMK $\geq$ 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のすべてを満たす株の割合は、100%(40/40)から42.5%(17/40)へと低下した。

### III. 考 察

MDRP感染症治療法に関して、海外では注射用colistin (CL) が使用されているが<sup>14)</sup>、国内ではまだ承認されていない。よって、既存の抗菌薬での治療に制限されているが、単剤での治療は難しく、併用療法による治療が求められている。現在までに国内では、MDRPに対する2剤の併用効果が*in vitro*<sup>2,5-8)</sup>や臨床<sup>10,15-17)</sup>でも有用であ

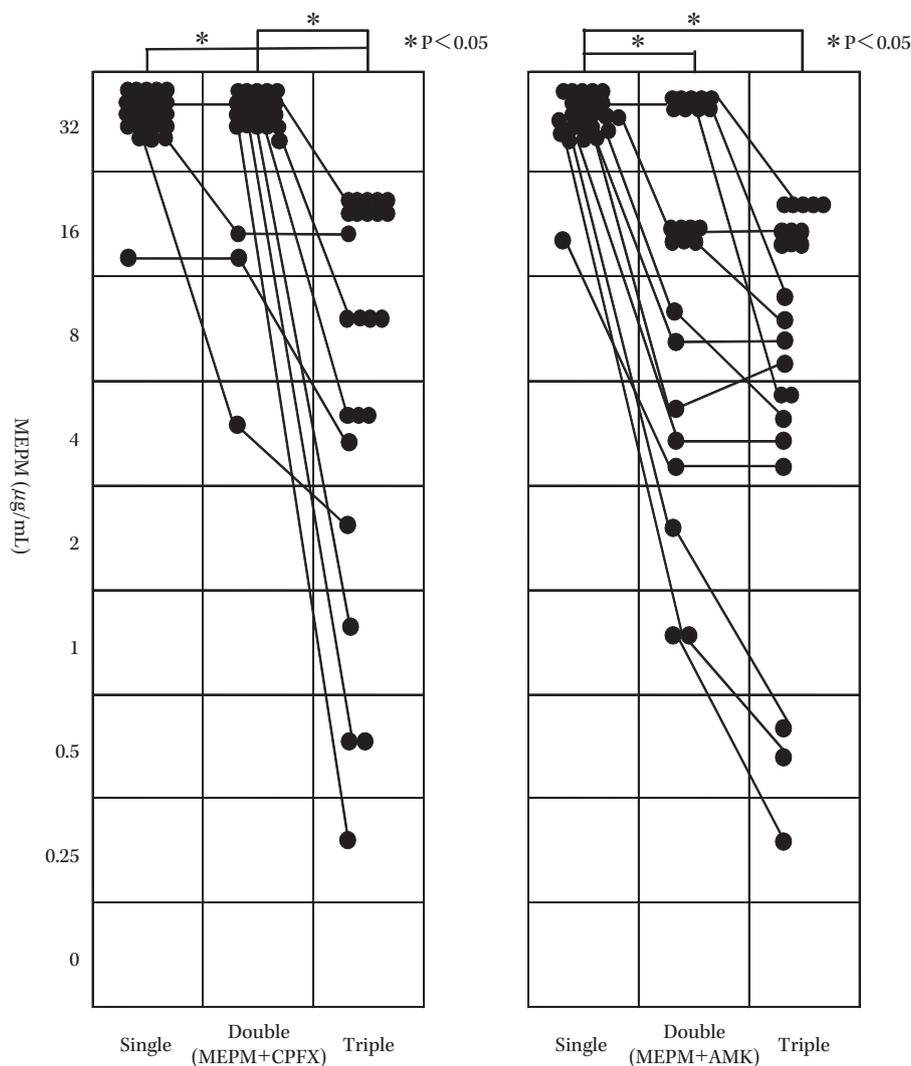


Fig. 2 i). Line graphs of MIC values for MEPM against 24 strains for single (meropenem [MEPM]), double (MEPM + ciprofloxacin [CPFX], MEPM + amikacin [AMK]) combinations, and triple (MEPM + CPFX + AMK) combinations.

ると多く報告されているものの、3剤の併用効果は報告されていない。そこで、今回、既存の抗菌薬のなかから3剤の併用効果を検討した。検討した抗菌薬の組み合わせはi) MEPM+CPFX+AMK, ii) PIPC+AZT+ABKである。i)は感染症法におけるMDRPの報告基準であるMEPM+CPFX+AMKの3剤を選択した。ii)に関して、荒岡らがAZTとの併用薬としてAMK以外のアミノ配糖体の効果を検討した結果、ABKも有力な候補であることが示唆されたと報告している<sup>10)</sup>。また、西尾らが検討したMDRPの薬剤感受性試験において、PIPCはCLに次いで耐性率が低い結果であったことを報告している<sup>6)</sup>。これらの報告をふまえ、PIPC+ABK+AZTの3剤を選択し、併用効果を検討した。

今回検討した*in vitro*での併用効果は、i) MEPM+CPFX+AMK, ii) PIPC+AZT+ABKのそれぞれの組み合わせについて、最も大きい併用効果が認められたのは、

3剤併用であった。i)について、単剤から2剤、3剤と併用する抗菌薬が増えるに従い、平均MIC値が低下した。2剤併用 (MEPM+AMK) と3剤併用では、有意差は認められなかったものの、低下傾向を示した。FIC indexでは、2剤併用 (MEPM+AMK) と3剤併用において、相乗作用で有意差は認められなかったが、相乗作用+相加作用の「効果あり」では有意差が認められた。ii)についても同様に、併用する抗菌薬が増えるに従い、平均MIC値が低下した。2剤併用 (AZT+ABK) と3剤併用で有意差は認められなかったものの、低下傾向を示した。FIC indexでは、2剤併用 (AZT+ABK) と3剤併用において、相乗作用で有意差が認められた。

国内において、抗菌薬3剤の併用効果に関する報告は、1986年に陳ら<sup>18)</sup>が臨床新鮮分離緑膿菌株を対象として行ったもので、tobramycin (TOB)+cefsulodin+fosfomicinの3剤併用が臨床に有用であり、治療効果が期待

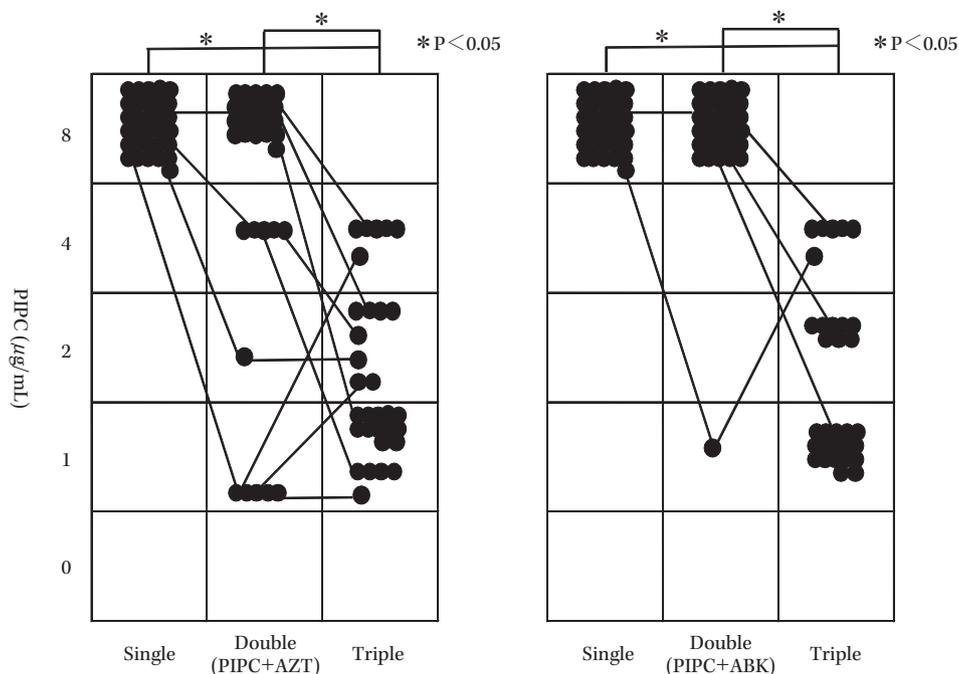


Fig. 2 ii). Line graphs of MIC values for PIPC against 31 strains for single (piperacillin [PIPC]), double (PIPC + aztreonam [AZT], PIPC + arbekacin [ABK]) combinations, and triple (PIPC + AZT + ABK) combinations.

Table 2. Combined effects (synergism, addition, indifference or antagonism) based on the fractional inhibitory concentration (FIC) index for antibacterial combinations (meropenem [MEPM], ciprofloxacin [CPFX] and amikacin [AMK]; piperacillin [PIPC], aztreonam [AZT] and arbekacin [ABK]) against 40 strains

	Drug combination	FIC index		FIC effect					
		Range	Average	Synergism	Addition	Synergism + Addition	Indifference	Antagonism	
i)	Double	MEPM + CPFX	0.6-2.0	1.9	0 ( 0%)	2 ( 5.0%)	2 ( 5.0%)	38 (95.0%)	0 (0%)
	Double	MEPM + AMK	0.5-2.0	1.5	3 ( 7.5%)	12 (30.0%)	15 (37.5%)	25 (62.5%)	0 (0%)
	Double	CPFX + AMK	0.6-2.0	1.9	0 ( 0%)	4 (10.0%)	4 (10.0%)	36 (90.0%)	0 (0%)
	Triple	MEPM + CPFX + AMK	0.4-3.0	1.8	4 (10.0%)	20 (50.0%)	24 (60.0%)	16 (40.0%)	0 (0%)
ii)	Double	PIPC + AZT	0.6-2.0	1.8	0 ( 0%)	6 (15.0%)	6 (15.0%)	34 (85.0%)	0 (0%)
	Double	PIPC + ABK	0.6-2.0	2	0 ( 0%)	1 ( 2.5%)	1 ( 2.5%)	39 (97.5%)	0 (0%)
	Double	AZT + ABK	0.4-2.0	1.3	3 ( 7.5%)	18 (45.0%)	21 (52.5%)	19 (47.5%)	0 (0%)
	Triple	PIPC + AZT + ABK	0.5-3.0	1.4	13 (32.5%)	18 (45.0%)	31 (77.5%)	9 (22.5%)	0 (0%)

Criteria for double combination

Synergism: FIC index  $\leq 0.5$

Addition:  $0.5 \leq$  FIC index  $\leq 1.0$

Indifference:  $1.0 \leq$  FIC index  $\leq 2.0$

Antagonism: FIC index  $> 2.0$

Criteria for triple combination

Synergism: FIC index  $\leq 0.75$

Addition:  $0.75 \leq$  FIC index  $\leq 1.5$

Indifference:  $1.5 \leq$  FIC index  $\leq 3.0$

Antagonism: FIC index  $> 3.0$

できると報告している。それ以降、MDRP に対する抗菌薬 3 剤併用効果の国内報告例は、調べた限りでは確認できなかった。一方、海外では Bianca ら<sup>19)</sup>が囊胞線維症患者から分離された MDRP において、MEPM + AMK + ceftazidime は MEPM + CPFX と比べて、より効果的というわけではなく、最も効果的な治療は TOB + MEPM、

TAZ/PIPC, CPFX, AZT, ceftazidime であると報告している。また、近年、増加している薬剤耐性 *Acinetobacter baumannii* に対して *in vitro* での 2 剤併用や 3 剤併用の効果を検討した報告例もある<sup>20)</sup>。このように海外では、*in vivo* での検討が進んでおり、他の薬剤耐性菌についても 2 剤併用だけでなく、3 剤の併用効果が検討されている。

Table 3. Comparisons of MIC and susceptibility (susceptible [S], intermediate [I] or resistant [R]) for each tested strain (n = 40) between single (meropenem [MEPM], ciprofloxacin [CPFX] or amikacin [AMK] alone) and triple (MEPM + CPFX + AMK) combination. The strains which meet the reporting criteria for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (the MIC was  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  of MEPM,  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  of CPFX, and  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  of AMK) are shown in boldface.

Strain No.	Single			Triple (MEPM + CPFX + AMK)		
	MEPM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CPFX ( $\mu\text{g/mL}$ )	AMK ( $\mu\text{g/mL}$ )	MEPM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CPFX ( $\mu\text{g/mL}$ )	AMK ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
2	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	4 (S)	1 (S)	32 (I)
3	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
4	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
5	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	1 (S)	2 (I)	32 (I)
6	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
7	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	8 (I)	1 (S)	32 (I)
8	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
9	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	0.5 (S)	2 (I)	32 (I)
10	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
11	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	2 (S)	2 (I)	8 (S)
12	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	16 (R)	1 (S)	32 (I)
13	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
14	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	0.25 (S)	1 (S)	32 (I)
15	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	4 (S)	1 (S)	32 (I)
16	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	8 (I)	1 (S)	32 (I)
17	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	4 (S)	4 (R)	32 (I)
18	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	8 (I)	1 (S)	32 (I)
19	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	4 (S)	1 (S)	32 (I)
20	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	16 (R)	1 (S)	32 (I)
21	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	16 (R)	1 (S)	32 (I)
22	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	8 (I)	2 (I)	32 (I)
23	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
24	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
25	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
26	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
27	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
28	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	16 (R)	2 (I)	4 (S)
29	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
30	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	16 (R)	1 (S)	32 (I)
31	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
32	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
33	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	16 (R)	1 (S)	32 (I)
34	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>16 (R)</b>	<b>4 (R)</b>	<b>32 (I)</b>
35	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	16 (R)	1 (S)	32 (I)
36	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	16 (R)	1 (S)	0.5 (S)
37	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	16 (R)	1 (S)	32 (I)
38	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>32 (R)</b>	<b>8 (R)</b>	<b>64 (R)</b>
39	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	0.5 (S)	1 (S)	32 (I)
40	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	16 (R)	1 (S)	32 (I)

今回の検討で、i)MDRPの報告基準であるカルバペネム系薬剤のMEPM、フルオロキノロン系薬剤のCPFX、アミノ配糖体のAMKの3剤を併用すると、併用によりMIC値が低下した菌株が認められた。MIC値が低下したことで感受性分類にも変化がみられ、MDRP報告基準 (MEPM $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ かつCPFX $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ かつAMK $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ )に該当する株の割合は100% (40/40)から42.5% (17/40)へと低下した。したがって、MEPM、CPFX、AMKの各抗菌薬の単剤には耐性を示しても、3剤を併用することで抗菌作用が期待できることが示された。他の組み合わせとして、ii)PIPC + AZT + ABKにお

いても *in vitro* での3剤併用効果が示された。

現在、2剤併用療法では *in vitro* 併用効果データに裏付けられたMDRP症例での治療効果の有用性が多く報告されているものの<sup>15-17)</sup>、3剤併用療法については明らかでない。今後は、3剤併用療法の意義を明確にするうえで、他の組み合わせについても *in vitro* 併用効果データを集積し、比較検討することが重要と考えられた。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ：  
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-42.html>

- 2) 岡 陽子：多剤耐性緑膿菌に対する抗菌薬の併用効果。日化療会誌 2005; 53: 476-82
- 3) 前崎繁文, 山口敏行, 佐々木一雅, 橋北義一, 渋谷俊介, 渡辺正治, 他：臨床分離薬剤耐性緑膿菌における各種抗菌薬の併用効果の検討。Jpn J Antibiot 2006; 59: 11-20
- 4) 渋谷泰寛, 大野高司, 伊東絢一：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。日化療会誌 2003; 51: 621-5
- 5) Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, Yamaguchi K: 'Break-point Checkerboard Plate' for screening of appropriate antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Scand J Infect Dis 2006; 38: 268-72
- 6) 西尾久明, 小松 方, 末吉範行, 木田兼以, 木下承皓：多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* に対する併用薬スクリーニングのためのブレイクポイント・チェッカーボード法の有用性。日化療会誌 2011; 59: 29-33
- 7) 宮本仁志, 村上 忍, 村瀬光春：多剤耐性緑膿菌の検出状況と併用効果。日本臨床微生物学誌 2009; 19: 157-62
- 8) 福島奈央, 棚町千代子, 橋本好司, 堀田史乃, 中田一徳, 佐川公矯：久留米大学病院で検出された多剤耐性緑膿菌に対する抗菌薬の併用効果。日本臨床微生物学誌 2006; 16: 127-33
- 9) 小笠原康雄, 荒川孝之, 池本雅章, 岡田麻衣子, 岡野太一, 竹山知志, 他：広島県下 19 施設における抗菌薬使用密度と耐性菌検出率に関するサーベイランス。環境感染誌 2011; 26: 378-84
- 10) 荒岡秀樹, 馬場 勝, 米山彰子：Checkerboard plate を用いた多剤耐性緑膿菌に対する aztreonam とアミノグリコシド系抗菌薬の併用効果の検討。感染症学雑誌 2009; 83: 133-5
- 11) Clinical Laboratory and Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 19th Informational Supplement, CLSI document M100-S19, Clinical Laboratory and Standards Institute, Wayne, PA, 2009
- 12) Yajko D M, Kirihara J, Sanders C, Nassos P, Hadley W K: Antimicrobial synergism against *Mycobacterium avium* complex strains isolated from patients with acquired immune deficiency syndrome. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 1392-5
- 13) Bhusal Y, Shiohira C M, Yamane N: Determination of *in vitro* synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Antimicrob Agents 2005; 26: 292-7
- 14) Linden P K, Kusne S, Coley K, Fontes P, Kramer D J, Paterson D: Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2003; 37: 154-60
- 15) 荒岡秀樹, 馬場 勝, 辰島啓太, 高木伸介, 松野直史, 和氣 敦, 他：好中球減少患者の多剤耐性緑膿菌敗血症に対し薬剤併用療法が奏功した 1 例。感染症学雑誌 2008; 82: 466-70
- 16) 樽本憲人, 阿部良伸, 山口敏行, 前崎繁文：多剤耐性緑膿菌による尿路感染症に Aztreonam と Arbekacin の併用療法が奏功した 1 例。環境感染誌 2009; 24: 279-82
- 17) 河添 仁, 滝口祥令, 井上達也, 山口佳津騎, 田中裕章, 加地雅人, 他：同種造血幹細胞移植患者における多剤耐性緑膿菌による感染症治療。The Pharmaceutical Society of Japan 2008; 128: 657-61
- 18) 陳 瑞明, 菊池典雄, 村木憲子, 渡辺正平, 高橋公毅, 菅野治重：臨床新鮮分離緑膿菌に対する Tobramycin,  $\beta$ -lactam 系抗菌剤および Fosfomycin 3 剤併用の相乗効果の検討。Chemotherapy 1986; 34: 294-301
- 19) Lang B J, Aaron S D, Ferris W, Hebert P C, MacDonald N E: Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162: 2241-5
- 20) Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal J J: *In vitro* double and triple synergistic activities of Polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 753-7

Combined effects of triple antibacterial agents *in vitro*  
against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Yumiko Koba<sup>1)</sup>, Kazuro Ikawa<sup>2)</sup>, Makoto Onodera<sup>1)</sup>,  
Rie Nagaoka<sup>1)</sup>, Toshinori Hara<sup>1)</sup>, Yumiko Joichi<sup>1)</sup>,  
Michiya Yokozaki<sup>3)</sup>, Hiroki Ohge<sup>4)</sup> and Norifumi Morikawa<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Clinical Support, Hiroshima University Hospital

<sup>2)</sup> Department of Clinical Pharmacotherapy, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University,  
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, Japan

<sup>3)</sup> Department of Clinical Laboratory, Hiroshima University Hospital

<sup>4)</sup> Department of Infectious Diseases, Hiroshima University Hospital

This *in vitro* study examined the combined effects of triple antibacterial agents against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP). The tested isolates in Hiroshima University Hospital were 40 strains which met the reporting criteria for MDRP, that is, the minimum inhibitory concentration (MIC) was  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  of meropenem (MEPM),  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  of ciprofloxacin (CPFX) and,  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  of amikacin (AMK). Combinations of antibacterial agents were: i) MEPM, CPFX and AMK, and ii) piperacillin (PIPC), aztreonam (AZT) and arbekacin (ABK). Using the original checkerboard plates, MIC values were determined for single, double and triple combinations. Based on the MIC values, fractional inhibitory concentration index values were calculated and the combined effects (synergetic action or additional action) were evaluated. In terms of the combination i), MEPM + CPFX + AMK showed the greatest combined effects against 24 strains (60.0% of 40 strains), decreasing in the mean MIC value of each antibacterial agent. The proportion of strains which met the reporting criteria for MDRP (the MIC was  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  of MEPM,  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  of CPFX, and  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  of AMK) decreased from 100% (40/40) to 42.5% (17/40). In terms of the combination ii), PIPC + AZT + ABK showed the greatest combined effects against 31 strains (77.5% of 40 strains), decreasing in the mean MIC value of each antibacterial agent. These combined effects of triple antibacterial agents against MDRP tested *in vitro* should be verified and compared with those of other combinations.