

【原著・基礎】

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* に対する meropenem と抗 MRSA 薬
との *in vitro* 併用効果土持 典子¹⁾・内田勇二郎²⁾・長崎 洋司¹⁾・江里口芳裕¹⁾
前原 依子¹⁾・門脇 雅子¹⁾・下野 信行^{1,2)}¹⁾九州大学大学院医学研究院病態修復内科学*²⁾同 病院検査部

(平成 19 年 2 月 15 日受付・平成 19 年 7 月 4 日受理)

2003~2005 年に九州大学病院で喀痰、血液および尿検体より分離された methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) のなかで meropenem (MEPM) の MIC が 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の 207 株に対する MEPM と抗 MRSA 薬、すなわち vancomycin (VCM), teicoplanin (TEIC), linezolid (LZD), arbekacin (ABK) との *in vitro* における併用効果をチェッカーボード法で比較検討した。抗 MRSA 薬単剤での MIC は VCM 0.5~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TEIC 0.5~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LZD 0.5~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, ABK の MIC は幅広く分布し 0.25~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。MEPM と VCM, MEPM と TEIC との併用では 207 株全株において相加以上の効果を示し, それぞれ 156 株 (75.4%), 205 株 (99%) に相乗効果を示した。VCM, TEIC, LZD の 3 薬剤においては MEPM との併用で拮抗を示す株は認めなかったが, ABK においては 22 株 (10.6%) で拮抗作用が認められた。これらの株において MEPM を含め, 他 3 つのカルバペネム系薬, imipenem, panipenem, biapenem と ABK との併用効果についてディスク拡散法で検討したところ, MEPM 以外のカルバペネム系薬でも同様に拮抗作用を示した。MRSA 治療において, 個々の抗 MRSA 薬の感受性を把握していることは重要であるが, 難治性の場合など併用効果に関しても把握しておく必要がある。

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, meropenem, checkerboard method, synergistic effect, anti-MRSA agent

1960 年に英国で初めて methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 検出が報告されて以来, その頻度は増加傾向を示している。日本においても 1980 年代後半より急増の一途をたどり, 現在, 黄色ブドウ球菌全体の 60~80% の割合で MRSA が分離され, その割合は増加傾向にある¹⁾。日本で使用可能な抗 MRSA 薬は 1991 年に承認された vancomycin (VCM) をはじめ, arbekacin (ABK), teicoplanin (TEIC), さらに linezolid (LZD) の 4 薬剤である。ただし, これらの 4 薬剤においても耐性化の問題があり, 1997 年には日本で VCM 低感受性株が, 2002 年には米国で VCM 耐性株が分離報告され, VCM 耐性株の蔓延が世界的に懸念されている^{2~5)}。TEIC においても年々感受性の悪化が指摘されており, LZD に対しても海外において長期使用例などで耐性化が指摘されている^{6~9)}。また, MRSA による感染性心内膜炎や膿瘍などの重症難治性感染症, 免疫抑制患者における MRSA 感染症あるいはグラム陰性菌, 特に緑膿菌などとの重複感染症においては, 単剤治療では十分な治療効果が得られない場合もあり, 単剤での抗菌力を把握しておくことはもちろん, 抗菌薬同士の

併用効果についても検討し, 基礎データを集積しておくべきである。

今回われわれは, 九州大学病院で分離された MRSA 207 株に対して meropenem (MEPM) と抗 MRSA 薬の併用効果についてチェッカーボード法を用いて比較検討したので報告する。

I. 材料・方法

1. 使用薬剤

使用薬剤としては, MEPM (大日本住友製薬), VCM (塩野義製薬), TEIC (アステラス製薬), LZD (ファイザー製薬), ABK (明治製菓) のいずれも力価の明らかな標準品を供試した。

2. 使用菌株

2003 年から 2005 年にかけて九州大学病院の臨床検体から分離された MRSA 株のうち MEPM の MIC 値が 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の 207 株を使用した。なお, その検体の内訳は喀痰 105 株, 血液 41 株, 尿 61 株で, 喀痰分離株に関しては可能な限り保菌者からの菌株を除くため, すべて

Table 1. Summary of MIC distribution for anti-MRSA microbial agents alone and combination with meropenem against 207 strains of MRSA

Antimicrobial agents	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)		MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
	alone	combination	alone	combination	alone	combination
vancomycin	0.5 ~ 4	$\leq 0.125 \sim 0.5$	1	0.25	2	0.5
meropenem	32 ~ 128	$\leq 1 \sim 64$	32	4	64	8
teicoplanin	0.5 ~ 8	$\leq 0.125 \sim 1$	2	0.25	2	0.25
meropenem	32 ~ 128	$\leq 1 \sim 32$	32	1	64	4
linezolid	0.5 ~ 2	$\leq 0.125 \sim 1$	1	0.5	2	1
meropenem	32 ~ 128	$\leq 1 \sim 64$	32	8	64	32
arbakacin	0.25 ~ 16	$\leq 0.125 \sim 8$	1	0.5	2	4
meropenem	32 ~ 128	$\leq 1 \sim 64$	32	8	64	32

膿性痰で Miller&Jones 分類で P2 以上の痰からの分離株に限り、また全検体とも初回検査の分離株のみを用いた。

3. 抗菌力測定

培地は抗菌力測定およびチェッカーボード法ともに Mueller Hinton II Agar (MHA: Becton, Dickinson and Company) を使用した。抗菌力の測定は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 法に従い寒天平板希釈法で行った¹⁰⁾。上記菌株を Tryptic-soy broth で 18 時間培養後 Mc Farland 0.5 相当に懸濁調整し、その 10 倍希釈液をマイクロプランター (佐久間製作所) を用いて接種した。判定は 37°C 20 時間培養後、CLSI に従い肉眼で判定した。なお、ABK は CLSI に判定基準が設定されていないため、gentamicin (GM) のブレイクポイントを代用した。

4. 抗菌薬併用効果測定

MEPM と抗 MRSA 薬の併用効果を寒天平板希釈法によるチェッカーボード法で測定した。両薬剤の相互作用は下記の計算式より fractional inhibitory concentration (FIC) index を算出し判定した。すなわち菌の発育を阻止したおのおのの抗菌薬濃度の組み合わせにおける FIC index を計算し、チェッカーボードの菌の発育パターンから相加・相乗・不関効果を示すものは得られた FIC index の最小値を、拮抗効果を示すものは FIC index の最高値を併用 FIC index とした。併用 FIC index が ≤ 0.5 を相乗作用、 $>0.5 \sim \leq 1$ を相加作用、 $>1 \sim \leq 2$ を不関、 >2 を拮抗作用と判定した。また、それぞれの抗菌薬を併用した時に算定された併用 FIC index を示す各種抗菌薬濃度を併用時の MIC 値とし、単剤 MIC 値とともに感受性累積百分率を作成した。

FIC index = (併用時薬剤 A の MIC 値/単剤時薬剤 A の MIC 値) + (併用時薬剤 B の MIC 値/単剤時薬剤 B の MIC 値)

MEPM と ABK の併用で拮抗を示した株については、MEPM ディスク (10 μg , 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京) と IPM ディスク (10 μg , 日本ベク

トン・ディッキンソン株式会社, 東京), PAPM ディスク (10 μg , 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京), BIPM ディスク (10 μg , KB ディスク: 栄研化学, 東京) のカルバペネム系 4 薬剤と ABK ディスク (10 μg , 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京) を用い、その併用効果をディスク拡散法で確認した。

II. 結 果

1. 抗菌力測定

207 株の MRSA に対する MEPM と抗 MRSA 薬の単剤および併用時の MIC 値を Table 1 に示す。VCM に対する感受性は 0.5~4 $\mu\text{g/mL}$ に分布し、CLSI で intermediate に相当する低感受性株が 1 株みられた。TEIC は 0.5~8 $\mu\text{g/mL}$ に分布しすべて感性であった。LZD も 0.5~2 $\mu\text{g/mL}$ に分布しすべて感性であった。ABK は 0.25~16 $\mu\text{g/mL}$ に幅広く分布し低感受性株が 4 株、耐性株が 1 株にみられた。MIC₅₀ 値は TEIC が 2 $\mu\text{g/mL}$ でその他の薬剤は 1 $\mu\text{g/mL}$, MIC₉₀ 値はすべての薬剤で 2 $\mu\text{g/mL}$ であった。VCM に対する感受性が 4 $\mu\text{g/mL}$ を示した株の TEIC 感受性は 8 $\mu\text{g/mL}$ であった。

抗 MRSA 薬の MEPM 併用時の MIC を単剤での MIC と比較すると、MEPM と VCM との併用では 1/4 へ、TEIC との併用では 1/8 へ、LZD との併用では 1/2 へ低下した。MEPM と ABK との併用では MIC₅₀ で比較すると 1/2 へ低下したのに対し、MIC₉₀ では 2 倍へ上昇した。

2. MEPM と各抗 MRSA 薬の併用効果 (Table 2)

併用 FIC index の分布 (平均) は、MEPM と VCM との併用で 0.19~1.00 (0.43 \pm 0.1), MEPM と TEIC との併用で 0.09~0.63 (0.20 \pm 0.1), MEPM と LZD との併用で 0.28~1.25 (0.67 \pm 0.2) であった。MEPM と ABK との併用では 0.28~16.25 で、拮抗株以外の 185 株では 0.28~1.50 で平均 0.75 \pm 0.3 であった。併用 FIC index より相乗、相加作用と判定された株は、MEPM と VCM との併用では 156 株 (75.4%), 51 株 (24.6%), TEIC との併用では 205 株 (99.0%), 2 株 (1.0%), LZD との併用では 50 株 (24.2%), 146 株 (70.5%), ABK との併用では 14 株 (6.8%) と 145 株 (70.0%) であった。

Table 2. Combined effect of anti-MRSA agents and meropenem against 207 strains of MRSA

	FIC index range	No. strain (%)			
		synergism	additive	indifferent	antagonism
Vancomycin	0.19 ~ 1.00	156 (75.4%)	51 (24.6%)	0 (0%)	0 (0%)
Teicoplanin	0.09 ~ 0.63	205 (99.0%)	2 (1.0%)	0 (0%)	0 (0%)
Linezolid	0.28 ~ 1.25	50 (24.2%)	146 (70.5%)	11 (5.3%)	0 (0%)
Arbekacin	0.28 ~ 16.25	14 (6.8%)	145 (70.0%)	26 (12.6%)	22 (10.6%)

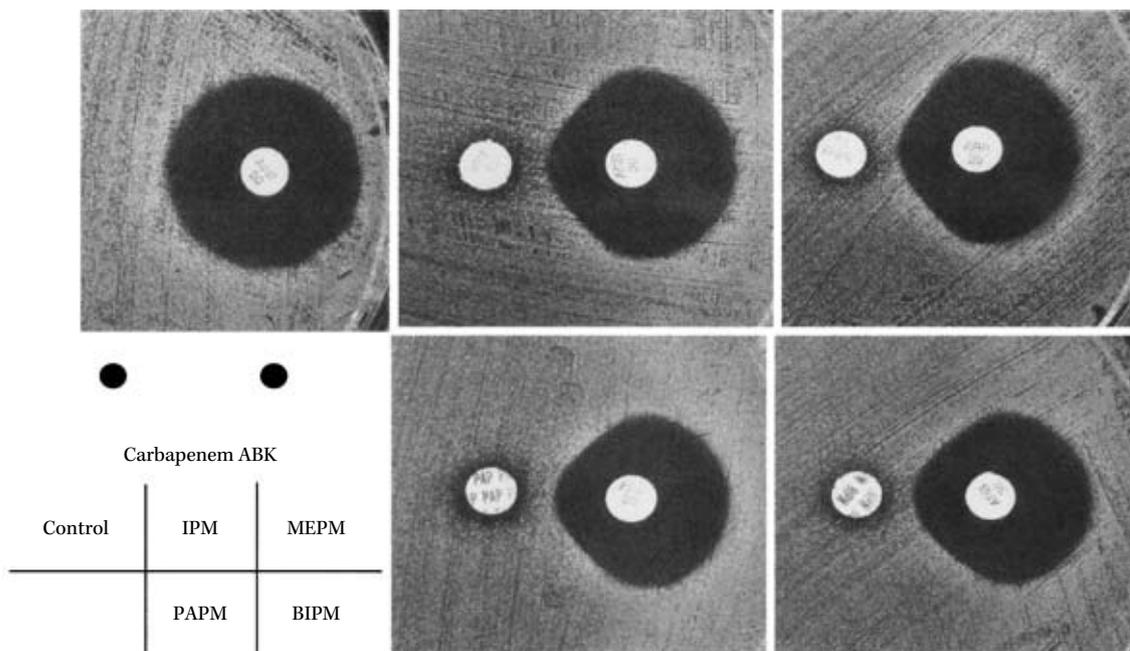


Fig. 1. Carbapenem and arbekacin (ABK) double-disk diffusion pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain having antagonistic activity. Antagonism is shown by the truncation of the zone of growth inhibition around the ABK disk in the direction of all carbapenems (MEPM, IPM, PAPM, and BIPM).

VCM, TEIC, LZD では MEPM との併用で拮抗作用を示す株は認められなかったが、MEPM と ABK の併用において 22 株 (10.6%) に拮抗作用を認めた。MEPM と ABK との併用で拮抗作用を示した 22 株の検体内訳は喀痰が 9 株、血液が 5 株、尿が 8 株であった。

3. ディスク拡散法による併用効果

MEPM と ABK との併用で拮抗作用を示した 22 株について、MEPM を含む他のカルバペネム系抗菌薬 4 薬剤と ABK の併用効果についてディスク拡散法で確認した。結果の典型例を Fig. 1 に示す。22 株中 21 株において MEPM と ABK との間で阻止円形成の抑制を認め、拮抗作用を確認した。また他のカルバペネム系薬においても MEPM と同様に拮抗作用を示した。残り 1 株はディスク拡散法では相加作用を呈し、拮抗作用は確認されなかった。

III. 考 察

化学療法治療中による好中球減少患者や免疫抑制薬投与中の患者、血管カテーテルなどの異物挿入患者などの

易感染性宿主に MRSA 感染症が引き起こされると、グリコペプチド系薬などの抗 MRSA 薬単独の治療では効果不十分なことが多い¹¹⁾。また MRSA とグラム陰性菌、特に緑膿菌との混合感染を起こした場合、グリコペプチド系薬の単剤では治療効果が得られず、カルバペネム系薬などの併用が必要となる。1978 年に Chang らが MRSA に対して VCM と imipenem (IPM) の相乗効果を報告して以来¹²⁾、グリコペプチド系薬などの抗 MRSA 薬と β -ラクタム系薬との併用で相乗効果があるとの報告が多数ある^{1,13-19)}。しかしながらその一方で、MRSA 感染症に対して β -ラクタム系薬投与下で VCM を投与すると、VCM 耐性株 (β -lactam antibiotic induced vancomycin-resistant MRSA: BIVR) が出現するとの報告²⁰⁾や、ABK と β -ラクタム系薬との併用で拮抗を示したとの報告²¹⁾、新生児より分離された MRSA 49 株についてグリコペプチド系薬と β -ラクタム系薬との併用効果を *in vitro* で検討し、2~6 株に VCM と β -ラクタム系薬との併用で拮抗を示したとの報告¹⁸⁾もあり、地域や施設

によって単剤での抗菌力のみならず併用効果も異なり、それぞれの施設での併用効果を把握しておくことは重要である。

われわれの今回の検討では併用 FIC index でみると、MEPM と VCM または TEIC との併用ではすべての株に相乗・相加作用を認め、中でも TEIC との併用においては 99.0% に相乗効果を認めた。相乗または相加効果は LZD でも 94.7% に、ABK で 76.8% に認めたが、ABK との併用では 10.6% (22 株) と少ないものの拮抗する株を認めた。これら拮抗を示した株は *SmaI* を用いた pulsed-field gel electrophoresis により 80% 以上の相同性をもつ 6 つのパターンにわけられ、1 株はまったく異なったクローンであった (データ未発表)。

また、MEPM の抗菌力を MIC₅₀ の推移でみると、VCM との併用において 1/8 へ、TEIC、LZD、ABK との併用でそれぞれ 1/32、1/4、1/4 へ小さくなっており、特に TEIC との間で併用効果が著明で MIC の低下が認められた。

以上より当院で分離された MRSA に対しては MEPM と抗 MRSA 薬、特にグリコペプチド系薬との間には併用効果が認められ、臨床応用が期待されることが示唆された。一方、一部の株では MEPM と ABK との間に拮抗作用を示す株があり、注意が必要と思われる。MRSA 感染症に ABK を用いる場合、ABK は殺菌力が強いこと、MIC は広範囲に及ぶが感受性のかかなり良好なものが存在すること、他の抗 MRSA 薬と異なりグラム陰性菌にも抗菌力があることなどを考慮すると、単剤で使用することも一つの選択肢である。

今回われわれは *in vitro* における検討のみを行ったが、*in vitro* の結果が *in vivo* に必ずしも反映するとは限らないとの報告もある。Jacqueline らによると、MRSA に対し LZD と GM との併用効果について検討したところ、*in vitro* では拮抗作用を示したにもかかわらず、感染性心内膜炎モデルによる *in vivo* で検討したところ、*in vitro* の結果に反し併用により vegetation の菌量を減らすことができたとしている^{22,23)}。また、今回のわれわれの検討では MEPM と LZD の併用効果は VCM や TEIC に劣る結果であったが、LZD の高い組織移行性を考慮すると、重症肺炎や心内膜炎といった高い組織内濃度が重要である感染症においては、選択肢の一つとなりえるであろう。

本論文の要旨は第 54 回日本化学療法学会総会 (2006 年 5 月、京都) で発表した。

文 献

- 1) Totsuka K, Shiseki M, Kikuchi K, Matsui Y: Combined effects of vancomycin and imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *in vitro* and *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 455-60
- 2) Hiramatsu K, Aritake N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al: Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 135-6
- 3) Chang S, Sievert D M, Hageman J C, Boulton M L, Tenover F C, Downes F P, et al: Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *vanA* resistant gene. *N Engl J Med* 2003; 348: 1342-7
- 4) Bozdogan B, Esel D, Whitener C, Browne F A, Appelbaum P C: Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical center. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 864-8
- 5) Tenover F C, Weigel L M, Appelbaum P C, McDougal L K, Chaitram J, McAllister S, et al: Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 275-80
- 6) Robert J, Bismuth R, Jarlier V: Decreased susceptibility to glycopeptides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 20 year study in a large French teaching hospital, 1983-2002. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 506-10
- 7) Wilson A P, Cepeda J A, Hayman S, Whitehouse T, Singer M, Bellin G: *In vitro* susceptibility of gram-positive pathogens to linezolid and teicoplanin and effect on outcome in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 470-3
- 8) Gales A C, Sader H S, Andrade S S, Lutz L, Machado A, Barth A L: Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 300-2
- 9) Robert S M, Freeman A F, Harrington S M, Holland S M, Murray P R, Zelazny A M: Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in two pediatric patients receiving low-dose linezolid therapy. *Pediatric Infect Dis J* 2006; 25: 562-4
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth Information Supplement M100-S16. CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2006
- 11) Barr J G, Smyth E T M, Hogg G M: *In vitro* antimicrobial activity of imipenem in combination with vancomycin or teicoplanin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 1990; 9: 804-909
- 12) Chang S C, Hsieh W C, Luh K T, Ho S W: Effect of antibiotic combinations on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro*. *J Formosan Med Assoc* 1989; 88: 488-92
- 13) 渋谷泰寛, 大野高司, 伊藤絢一: 血液由来 MRSA に対する各種抗菌薬と arbekacin の併用効果の検討。日化療会誌 2001; 49: 89-94
- 14) 渋谷泰寛, 大野高司, 伊藤絢一: 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
- 15) 本田順一, 吉無田太郎, 衛藤弘寿, 廣川雅士, 藤木玲, 相澤久道: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する teicoplanin と各種抗菌薬の *in vitro* 併用効果。日化

- 療会誌 2004; 52: 270-2
- 16) Kobayashi Y: Study of the synergy between carbapenem and vancomycin or teicoplanin against MRSA, focusing on S-4661, a carbapenem newly developed in Japan. *J Infect Chemother* 2005; 11: 259-61
- 17) Jacqueline C, Navas D, Batard E, Miegerville A F, Mabeccque V L, Kergueris M F, et al: *In vitro* and *in vivo* synergistic activities of linezolid combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 45-51
- 18) 佐藤吉壮, 山藤 満, 岩田 敏, 秋田博伸, 砂川慶介: Methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* に対するグリコペプチド系と β -ラクタム系抗菌薬の *in vitro* 併用効果。日化療会誌 2006; 54: 95-101
- 19) 永沢善三, 草場耕二, 高柳 恵, 青木洋介, 永山在明: β -lactam antibiotic induced vancomycin-resistant メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出方法と抗菌薬の併用効果。日化療会誌 2003; 51: 631-7
- 20) Hosokawa Y, Hanaki H, Yanagisawa C, Yamaguchi Y, Matsui H, Nakae T, et al: Nosocomial infection of β -lactam antibiotic-induced vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (BIVR). *J Infect Chemother* 2006; 12: 181-4a
- 21) Ida T, Okamoto R, Nonoyama M, Irinoda K, Kurazono M, Inoue M: Antagonism between aminoglycosides and β -lactams in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate involves induction of an aminoglycoside-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1516-21
- 22) Jacqueline C, Caillon J, Le Mabeccque V, Miegerville A F, Donnio P Y, Bugnon D, et al: *In vitro* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 857-64
- 23) Jacqueline C, Asseray N, Batard E, Kergueris M F, Dube L, Bugnon D, et al: *In vivo* efficacy of linezolid in combination with gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 393-6

Combined antibacterial effects of between meropenem and vancomycin, teicoplanin, linezolid, or arbekacin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Noriko Tsuchimochi¹⁾, Yujiro Uchida²⁾, Yoji Nagasaki¹⁾, Yoshihiro Eriguchi¹⁾,
Yoriko Maehara¹⁾, Masako Kadowaki¹⁾ and Nobuyuki Shimono^{1,2)}

¹⁾ Faculty of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Japan

²⁾ Faculty of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

In vitro interaction between meropenem (MEPM) and vancomycin (VCM), teicoplanin (TEIC), linezolid (LZD), or arbekacin (ABK) was studied using the checkerboard technique in 207 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (MIC of MEPM ≥ 32). Of 207 strains, synergistic or additive action was observed in all strains by combination of MEPM and VCM or TEIC. A combination of MEPM and LZD or ABK showed synergistic or additive 196 strains (94.7%) and 159 strains (76.8%). Antagonism was not observed in any combination of MEPM and VCM, TEIC, or LZD, but 22 strains (10.6%) exhibited antagonism in combination with MEPM and ABK. It is thus important to know both the susceptibility of anti-MRSA agents alone and the combined effects of agents.