

[短 報]

BIVR および Non-BIVR 株に対する Imipenem と
グリコペプチド系薬の併用効果
—接種菌量および培養時間による影響—永沢善三・中島由佳理・於保 恵・草場耕二
佐賀大学医学部附属病院検査部

(平成 20 年 3 月 5 日受付, 平成 20 年 5 月 28 日受理)

Staphylococcus aureus の *in vitro* における抗菌薬併用効果は、チェッカーボード法による fractional inhibitory concentration (FIC) index で評価される。筆者らは β -lactam antibiotic induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR) 株および non-BIVR 株を用い、接種菌量 (10^6 および 10^7 cfu/ml) および培養時間 (24 および 48 時間) を変え imipenem (IPM) と teicoplanin (TEIC) の併用群と、IPM と vancomycin (VCM) の併用群それぞれの FIC index における最小値と最大値について評価した。

BIVR, non-BIVR 株ともに IPM-TEIC 群では接種菌量による FIC index の差はなく、24 時間培養での FIC index は最小値、最大値ともに著しい相乗～相加作用、48 時間培養では相加または不変に低下した。一方、IPM-VCM 群では FIC index 最小値は両培養時間ともに著しい相乗～相加作用を示した。しかし、FIC index 最大値では両培養時間ともに相加～拮抗作用を示し、この傾向は 10^7 cfu/ml の接種および BIVR 株のほうで若干高く、その併用効果に関しては種々のパターンを取ることが判明した。以上より、BIVR 株での β -lactam 系薬とグリコペプチド系薬の併用効果を検討する際は、FIC index が最小を示す薬剤濃度のみならず、接種菌量や培養時間および FIC index が最大を示す薬剤濃度を用い評価する必要がある。

Key words: グリコペプチド系薬, カルバペネム系薬, 薬剤併用効果

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 感染症の治療薬の一つである vancomycin (VCM) の使用頻度は高いが、本薬剤に対して inter-mediated-resistant を示す MRSA {VCM inter-mediated-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA)}¹⁻⁴⁾ や、VCM と β -lactam 薬が拮抗する β -lactam antibiotic induced VCM-resistant MRSA (BIVR) の存在が近年報告されている⁵⁻⁸⁾。MRSA 感染症ではグラム陰性桿菌との混合感染例が多く、臨床の現場では β -lactam 系薬と VCM との併用投与が実際に行われている。特に MRSA が BIVR の性質を有する場合には、 β -lactam 系薬と VCM の併用では拮抗を示すことが予想される。そこで、筆者らは、BIVR および non-

BIVR 株を用い、グリコペプチド系薬である teicoplanin (TEIC) を対象薬とし、接種菌量および培養時間を変えた条件下でのチェッカーボード法による抗菌薬併用の影響を imipenem (IPM) および VCM の併用群と、IPM および TEIC の併用群について fractional inhibitory concentration (FIC) index の最小値と最大値について評価を行った。

使用抗菌薬はカルバペネム系薬として IPM (萬有製薬)、グリコペプチド系薬として VCM (塩野義製薬) および TEIC (アステラス製薬) のそれぞれ力価の明らかなものを使用した。対象菌株は佐賀大学医学部附属病院で 2003~2005 年までに各種臨床材料から検出した MRSA 39 株 (BIVR: 29 株, non-BIVR: 10 株) を使用した。なお、収集した MRSA は 1 菌株、1 患者に限定した。

BIVR の検出方法は臨床材料から検出された MRSA を血液寒天培地 (栄研化学) で 35°C, 18~24 時間培養した後、滅菌生理食塩水にて McFarland No. 1 程

著者連絡先: (〒849-8501) 佐賀市鍋島 5-1-1

永沢善三

TEL: 0952-34-3256

FAX: 0952-34-2069

E-mail: nagasaz@cc.saga-u.ac.jp

度の濁度菌液を調製し、Mu3寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン；BD）に滅菌綿棒で塗布を行った。その後、Mu3寒天培地上に感受性ディスク（aztreonam, cefixime, cefminox; BD）を置き、35°C、24～48時間培養した。培養後、感受ディスク周辺に菌の明らかなリング状の誘導発育帯が認められた場合あるいはMu3寒天培地全面に菌の発育が認められた場合をBIVR株と判定した。

薬剤併用試験についてはIPMおよびTEICの併用

群（IPM-TEIC群）と、IPMおよびVCMの併用群（IPM-VCM群）についてマイクロプロス法を用いたチェッカーボード法にて実施した。すなわち、96 wellのプレート2枚を使用し、1枚目の縦列（8 well）にはIPM濃度を0.004～0.25 μg/ml、2枚目の縦列（8 well）にはIPM濃度を0.5～32 μg/ml、横列（12 well）は2プレートともにTEICあるいはVCM濃度を0.03～32 μg/mlとなるようにBrain heart infusion broth（栄研化学）で濃度調製を行い、濃度段階の異なる

Table 1. The combination effects of imipenem and teicoplanin, vancomycin against BIVR and non-BIVR strains assessed with FIC index

		IPM+TEIC			
BIVR: 10 ⁶ cfu/ml		【Minimum】		【Maximum】	
FIC index		24 h	48 h	24 h	48 h
≤0.25		62		45	
0.25<～≤0.5		35		52	
0.5<～≤1		3	79	3	52
1<～≤2			21		48
2<					
%					

		IPM+VCM			
non-BIVR: 10 ⁶ cfu/ml		【Minimum】		【Maximum】	
FIC index		24 h	48 h	24 h	48 h
≤0.25		70		60	
0.25<～≤0.5		30		30	
0.5<～≤1			60	10	40
1<～≤2			40		60
2<					
%					

		IPM+VCM			
BIVR: 10 ⁷ cfu/ml		【Minimum】		【Maximum】	
FIC index		24 h	48 h	24 h	48 h
≤0.25		38		35	
0.25<～≤0.5		45		48	
0.5<～≤1		17	62	17	45
1<～≤2			38		55
2<					
%					

		IPM+VCM			
non-BIVR: 10 ⁷ cfu/ml		【Minimum】		【Maximum】	
FIC index		24 h	48 h	24 h	48 h
≤0.25		40		40	
0.25<～≤0.5		50		50	
0.5<～≤1		10	30	10	20
1<～≤2			70		80
2<					
%					

		IPM+VCM			
BIVR: 10 ⁶ cfu/ml		【Minimum】		【Maximum】	
FIC index		24 h	48 h	24 h	48 h
≤0.25		10	28		
0.25<～≤0.5		76	55		
0.5<～≤1		10	17	21	17
1<～≤2		4		62	52
2<				17	31
%					

		IPM+VCM			
non-BIVR: 10 ⁶ cfu/ml		【Minimum】		【Maximum】	
FIC index		24 h	48 h	24 h	48 h
≤0.25		20	50		
0.25<～≤0.5		60	40		
0.5<～≤1		10	10	20	20
1<～≤2				70	70
2<				10	10
%					

		IPM+VCM			
BIVR: 10 ⁷ cfu/ml		【Minimum】		【Maximum】	
FIC index		24 h	48 h	24 h	48 h
≤0.25		3	7		
0.25<～≤0.5		38	59		
0.5<～≤1		59	34	7	3
1<～≤2				72	66
2<				21	31
%					

		IPM+VCM			
non-BIVR: 10 ⁷ cfu/ml		【Minimum】		【Maximum】	
FIC index		24 h	48 h	24 h	48 h
≤0.25		20	20		
0.25<～≤0.5		20	40		
0.5<～≤1		60	40	20	30
1<～≤2				80	60
2<					10
%					

る薬剤を組合せたフローズプレートを栄研化学に依頼し作製した。これらのプレートを用い、BIVR および non-BIVR 株を血液寒天培地で 35°C、18~24 時間培養した後、滅菌生理食塩水にて McFarland No. 1 程度の濁度菌液に調製し、最終接種濃度を 10⁶ cfu/ml および 10⁷ cfu/ml の 2 種類での試験を実施した。培養は 35°C の好気条件下で 24~48 時間実施し、判定は 24 時間および 48 時間培養後に菌の発育の有無を肉眼的に観察し実施した。

FIC index の判定は菌の発育が阻止された well のうち、FIC index が最小および最大となる well の各抗菌薬の MIC より下記の式を用いて FIC index を求めた。なお、FIC index は、 ≤ 0.25 を「著しい相乗作用」、 $0.25 < \leq 0.5$ を「相乗作用」、 $0.5 < \leq 1$ を「相加作用」、 $1 < \leq 2$ を「不変」、 $2 <$ を「拮抗作用」と評価した。

FIC index = 併用時の MIC(A)/単独時の MIC(A) + 併用時の MIC(B)/単独時の MIC(B) (IPM-TEIC 群の場合: (A) は IPM, (B) は TEIC の薬剤を、IPM-VCM 群の場合: (A) は IPM, (B) は VCM の薬剤を意味している)

Table 1 に接種菌量と培養時間を変えた条件下での IPM-TEIC 群および IPM-VCM 群の FIC index を示す。IPM-TEIC 群では BIVR および non-BIVR 株ともに最小および最大となる 24 時間培養での FIC index は主に著しい相乗~相乗 ($\leq 0.25 \sim \leq 0.5$) 作用を示し、一部に相加作用 ($\leq 0.25 \sim \leq 1$) を認めたが、この効果は 10⁶ cfu/ml 接種のほうが若干優れていた。一方、48 時間培養での成績では、24 時間培養に比べ相加あるいは不変 ($0.5 < \leq 2$) と併用作用の低下がみられ、その低下は 10⁷ cfu/ml 接種のほうが若干強かった。

IPM-VCM 群については最小となる FIC index は両培養時間ともに主に著しい相乗~相乗 ($\leq 0.25 \sim \leq 0.5$) を示し、一部に相加作用 ($\leq 0.25 \sim \leq 1$) を認めた。なお、この効果は 10⁶ cfu/ml 接種のほうが若干優れていた。一方、最大となる FIC index については両培養時間ともに相加~拮抗作用 ($0.5 < \sim 2 <$) を示すことが確認され、特に拮抗作用 ($2 <$) を示す傾向は BIVR 株のほうが顕著であった。これらの成績より、IPM-VCM 群の併用に関しては著しい相乗~拮抗作用までの 4 種類の併用作用を示す組合せ濃度があることが確認された。

近年、BIVR の性質を有する MRSA が報告され⁷⁾、その要因の一つとして、MRSA およびグラム陰性桿菌との混合感染症例に対して、VCM および β -lactam

系薬との併用投与が多いことが VCM の市販後調査成績から推察されている⁹⁾。一般的にチェッカーボード法による *in vitro* の実験系で薬剤の併用効果を検証する場合は、接種菌量が約 10⁶ cfu/ml、培養時間が 24 時間培養での FIC index が最小となる指数で併用効果を評価している。そこで筆者らは、同じチェッカーボード法を用い接種菌量および培養時間による違いの有無を FIC index 値の最小および最大値について評価した。

その結果 IPM-TEIC 群では BIVR, non-BIVR 株ともに接種菌量あるいは培養時間の違いによる最小および最大の FIC index では拮抗作用は認められなかったが、IPM-VCM 群については最大となる FIC index において拮抗を示す組合せ濃度があることが確認された。なお、グリコペプチド系薬である VCM と TEIC の間で併用効果に差が認められる要因は不明であるが、作用機序の違いが最も推定される。

従来、MRSA に対する VCM と β -lactam 系薬との併用は *in vitro* 系において相加あるいは相乗作用が発現するという基礎的な研究報告が多数なされている。一般的に FIC index は薬剤の併用効果が最も認められる最小濃度の薬剤間で評価されるため、種々の薬剤濃度で著しい相乗~拮抗作用までを示す菌株が存在する場合には、FIC index (minimum) のみでは拮抗作用があることを見逃してしまふ可能性がある。実際、生体内では種々の薬剤濃度の組合せが生じている可能性があるため、FIC index が最大となる指数での評価も検討する必要があると考えられる。特に拮抗作用を示す組合せ濃度が生体内で生じた場合には、治療に難渋する可能性がある。Haraga ら¹⁰⁾は VCM と IPM の治療過程で起炎菌が MRSA から BIVR に変遷し、治療に失敗した症例を報告している。また、筆者らは *in vitro* でのマイクロブロス法による実験で VCM 8 μ g/ml と低濃度の IPM (0.015~0.0075 μ g/ml) の範囲で拮抗を示唆する現象を報告した¹¹⁾。この現象も花木⁵⁾らが提唱した VCM と β -lactam 薬が拮抗する作用機序による可能性を示唆している。今後さらに臨床例と *in vitro* の実験系を中心に拮抗現象の有無をさらに検討評価する必要がある。

文 献

- 1) Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, et al. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350: 1668-1671.
- 2) Ploy, M. C., C. Grelaud, C. Martin, et al. 1998.

- First clinical isolate of vancomycin—intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* 351: 1212.
- 3) Smith, T. L., M. L. Pearson, K. R. Wilcox, et al. 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 340: 493–501.
 - 4) Sieradzki, K., R. B. Roberts, S. W. Haber, et al. 1999. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N. Engl. J. Med.* 340: 517–523.
 - 5) 花木秀明, 山口禎夫, 砂川慶介. 2002. 注目される MRSA (BIVR) 株と抗 MRSA 治療薬の使用方法. *治療* 84: 2459–2464.
 - 6) Hanaki, H., Y. Yamaguchi, S. Nomura, et al. 2004. Method of detecting β -lactam antibiotic induced vancomycin resistant MRSA (BIVR). *Int. J. Antimicrob. Agent* 23: 1–5.
 - 7) 山口禎夫, 花木秀明, 茨田一成, 他. 2003. バンコマイシンと β -lactam 薬が拮抗する MRSA の疫学調査. *感染症誌* 77: 661–666.
 - 8) Yanagisawa, C., H. Hanaki, T. Inamatsu, et al. 2004. Emergence and method of detecting β -lactam antibiotic induced vancomycin resistant MRSA (BIVR) in Japan. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington DC, p. 141.
 - 9) 島田 馨, 村尾裕史, 三輪亮寿. 2002. MRSA 感染症と抗菌薬治療—訴訟問題も解説—. p. 11–56. 株式会社ミット, 東京.
 - 10) Haraga, I., S. Nomura, S. Fukamachi, et al. 2002. Emergence of vancomycin resistance during therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn patient—importance of low-levels resistance to vancomycin. *IJID* 6: 1–7.
 - 11) 永沢善三, 草場耕二, 高柳 恵, 他. 2003. β -Lactam antibiotic induced vancomycin resistant メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出状況と抗菌薬の併用効果. *日治療会誌* 51: 631–637.

Effects of Concomitant Use of Imipenem and Glycopeptides on BIVR and Non-BIVR Strain —Assessment Using Different Amounts of Inoculated Bacteria and Incubation Times—

Zenzo Nagasawa, Yukari Nakashima, Megumi Oho, Kouji Kusaba
Department of Clinical Laboratory, Saga University Hospital

The checkerboard method is used to assess antimicrobial combinations for *Staphylococcus aureus in vitro* and the fractional inhibitory concentration (FIC) index is calculated for evaluation. We selected β -lactam antibiotic induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR) strain and a non-BIVR strain and adjusted the inoculum contents (10^6 cfu/ml, 10^7 cfu/ml) and incubation periods (24 hours, 48 hours). We evaluated the maximum and minimum FIC indexes obtained from the two combination treatment groups: the imipenem (IPM) and teicoplanin (TEIC) treatment group and the IPM and vancomycin (VCM) treatment group.

In the IPM–TEIC group, the inoculum contents of the BIVR strain and non-BIVR strain made no difference on the FIC index. The maximum and minimum FIC indexes after 24 hour incubation indicated a marked synergistic to additive effect, while after a 48 hour incubation indicated an additive effect or negligible change suggesting a downward trend. On the other hand, in the IPM–VCM group, the minimum FIC indexes after 24 and 48 hour incubation showed a remarkable synergistic to additive effect, while the maximum FIC indexes after 24 and 48 hours of incubation showed an additive to antagonistic effect. These tendencies were slightly more remarkable after inoculation at a concentration of 10^7 cfu/ml and after inoculation with the BIVR strain. The effect of this combination was found to be shown in various patterns. Consequently, the assessment of the effects of combinations of β -lactam antibiotics and glycopeptide antibiotics using BIVR strains, we should use the drug concentrations that allow for inoculum content, incubation period and FIC index to show their maximum values as well as those that allow FIC index to show its minimum value.