

〈短 報〉

黄色ブドウ球菌のMIC値に接種菌量を与える影響

三宅典子・門脇雅子・佐藤依子・江里口芳裕・長崎洋司・
原田由紀子・内田勇二郎・下野信行

九州大学大学院医学研究院病態修復内科学

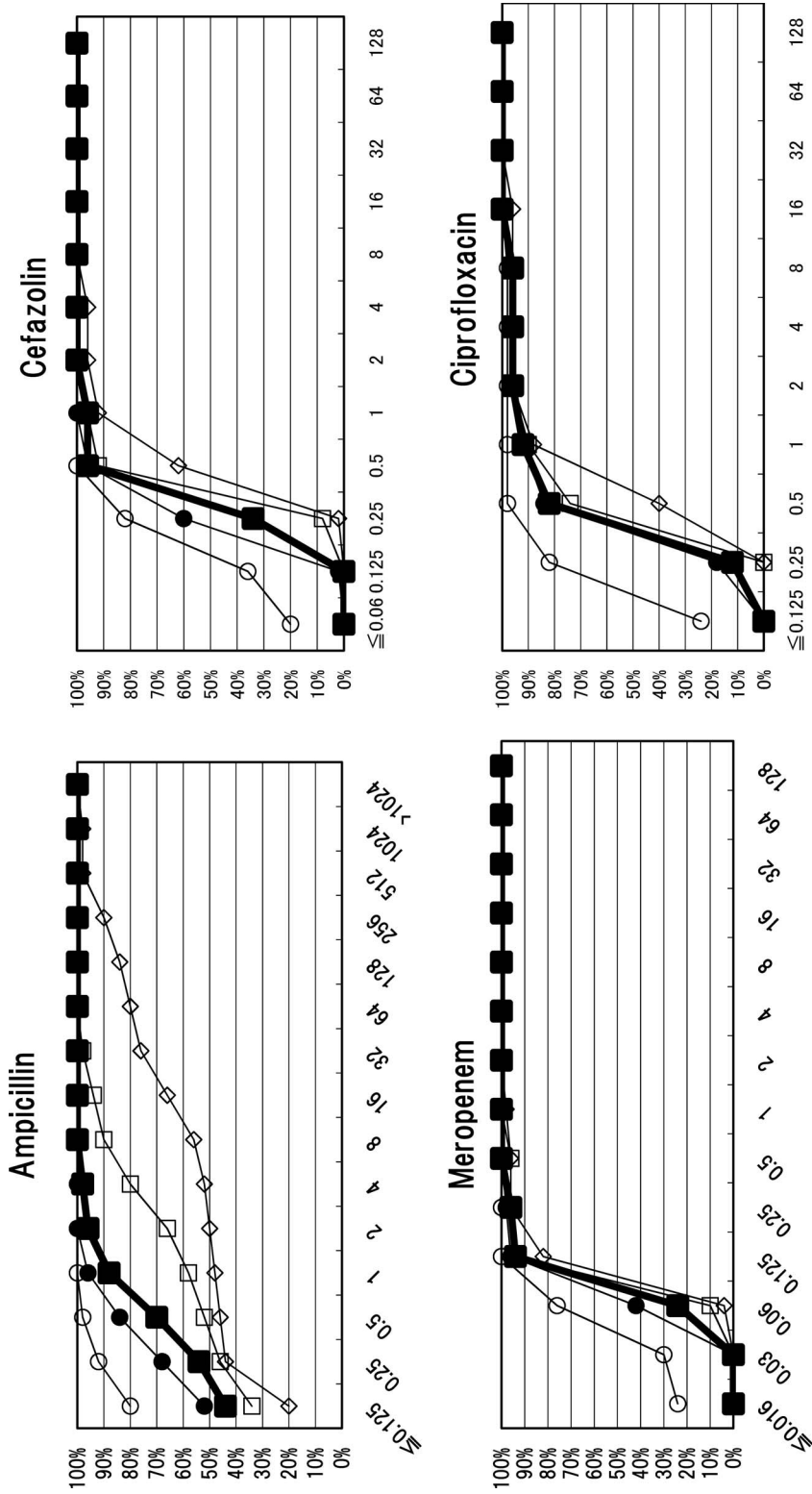
(2011年4月26日受付)

感染症治療において、*in vitro*での感受性結果が良好でも、臨床の場で治療が奏功しないことがある。その一つの理由として、菌量の増加に伴ってMIC値が上昇する、いわゆる inoculum effect を有する薬剤は *in vitro* で感性と判断されても、*in vivo*での治療成績が悪い可能性が考えられる。今回著者らは、九州大学病院および福岡市近郊の病院より分離された Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) 49株と Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 54株に対し、接種菌量を $5\sim 8\times 10^4$ cfu/mL から $5\sim 8\times 10^8$ cfu/mL の5段階に変化させ、MIC値の変動を検討した。薬剤には Ampicillin (ABPC), Cefazolin (CEZ), Meropenem (MEPM), Ciprofloxacin (CPFX), Vancomycin (VCM), Teicoplanin (TEIC), Linezolid (LZD), Arbekacin (ABK)を使用した。MSSAではABPCにおいて接種菌量の増加に伴うMIC値の変動が大きくみられ、CEZ, MEPM, CPFXでは変動は小さく認められた。抗MRSA薬ではMSSA, MRSAに対する違いは認められず、VCM, ABKでは接種菌量の増加に伴うMIC値の変動は少なく、TEIC, LZDでのMIC値の変動は大きく認められた。これらの結果は *in vitro*のものであるが、菌濃度が高いと予想される感染巣においては薬剤による菌の発育抑制に違いが生じることが予想され、抗菌薬選択の際には組織移行性などと同様にこれらの特徴も考慮すべきと考えられた。

感染症治療における抗菌薬の選択は、感染部位、原因菌、その感受性結果を参考に決定される。なかでも薬剤感受性結果は臨床医が感染症治療で抗菌薬を決定する際に重要な役割を担う。しかしながら、*in vitro*での感受性結果が良好でも臨床の場で治療が奏効しないことがある。その原因として、薬剤感受性試験は高い標準化システムを持っている反面、感染の状況や感染部位の違いは反映されないことが挙げられる。例えば感染部位

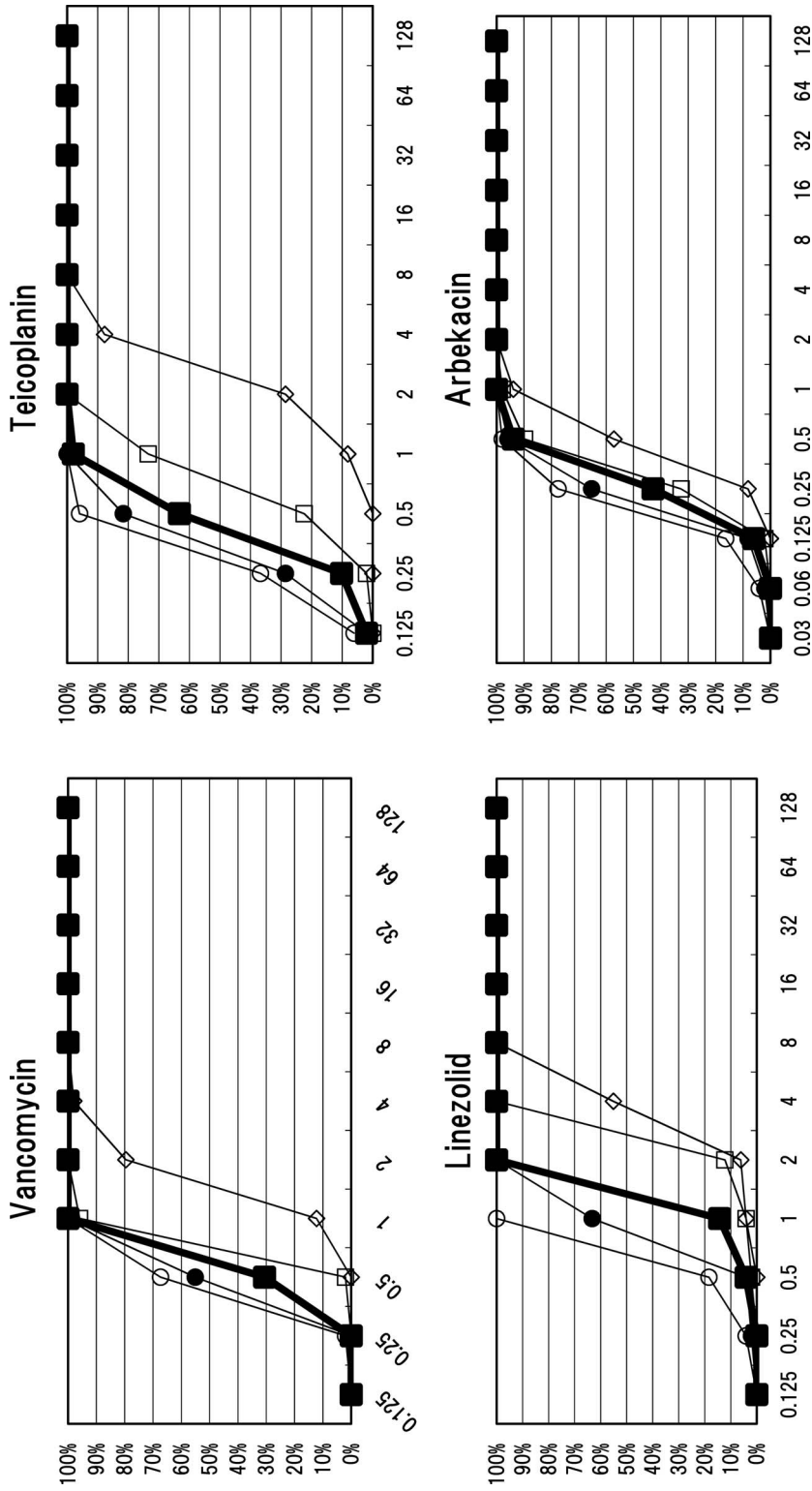
が低酸素状態や嫌気状態、酸性かアルカリ性によって、いくつかの薬剤では活性が下がることが報告されており¹⁻³⁾、そのほかβ-ラクタマーゼ産生株やMethicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA)、緑膿菌などに対する薬剤感受性試験において、接種菌量を増加させると、抗菌薬によってはMIC値が上昇するとの報告もなされている⁴⁻¹⁰⁾。そこで著者らは接種菌量の違いがMIC値に及ぼす影響に注目し、敗血症や重症感染症で

Fig. 1(A). Comparison of the inoculum-induced changes in antimicrobial activity of ampicillin, cefazolin, meropenem, ciprofloxacin against MSSA.



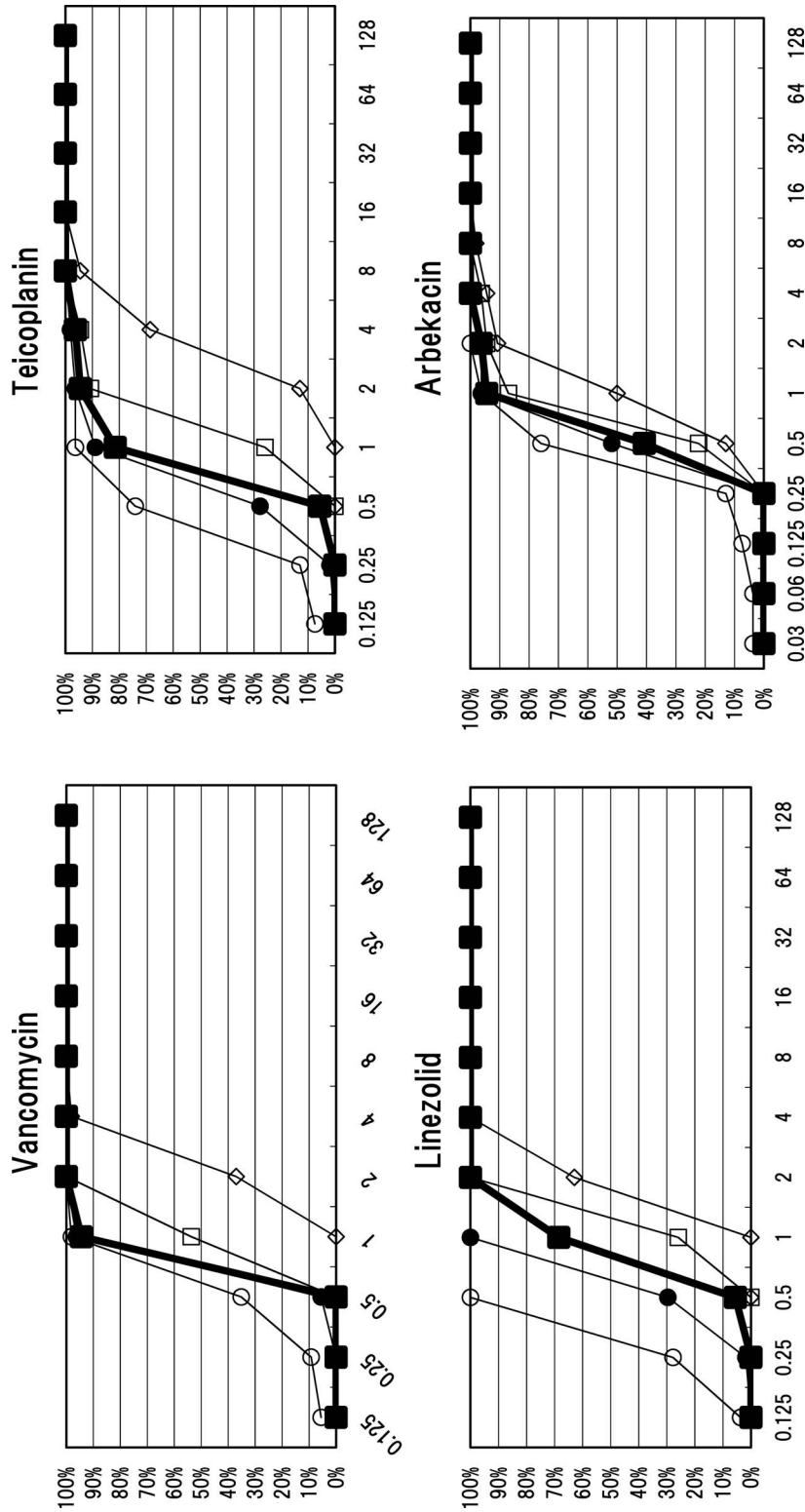
Open circle: $2.5\sim 4\times 10^2$ cfu/spot, closed circle: $2.5\sim 4\times 10^3$ cfu/spot, closed square: $2.5\sim 4\times 10^4$ cfu/spot, open diamond: $2.5\sim 4\times 10^6$ cfu/spot
 Bold line showed standard inocula of agar dilution procedure determined in CLSI.

Fig. 1(B). Comparison of the inoculum-induced changes in antimicrobial activity of vancomycin, teicoplanin, linezolid, arbekacin against MSSA.



Open circle: $2.5 \sim 4 \times 10^5$ cfu/spot, closed circle: $2.5 \sim 4 \times 10^6$ cfu/spot, open square: $2.5 \sim 4 \times 10^5$ cfu/spot, open diamond: $2.5 \sim 4 \times 10^6$ cfu/spot
Bold line showed standard inocula of agar dilution procedure determined in CLS.

Fig. 2. Comparison of the inoculum-induced changes in antimicrobial activity of vancomycin, linezolid, teicoplanin, arbekacin against MRSA.



Open circle: $2.5\sim 4\times 10^2$ cfu/spot, closed circle: $2.5\sim 4\times 10^3$ cfu/spot, closed square: $2.5\sim 4\times 10^5$ cfu/spot, open diamond: $2.5\sim 4\times 10^6$ cfu/spot
Bold line showed standard inocula of agar dilution procedure determined in CLS.

Table 1. MIC₅₀, MIC₉₀ and MIC₉₀ ratio for MSSA and MRSA at changing inoculum size.

Antimicrobial agents	MIC ₅₀ (μg/mL)					
	Inoculum size(cfu/spot)					
	2.5~4×10 ²	2.5~4×10 ³	2.5~4×10 ⁴	2.5~4×10 ⁵	2.5~4×10 ⁶	
MSSA	ABPC	≤0.125	0.25	0.5	2	2
	CEZ	0.25	0.25	0.5	0.5	1
	MEPM	0.06	0.125	0.125	0.125	0.125
	CPFX	0.25	0.5	0.5	0.5	1
	VCM	0.5	1	1	1	2
	TEIC	0.5	0.5	0.5	1	4
	LZD	1	1	2	4	4
	ABK	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5
MRSA	VCM	1	1	1	1	4
	TEIC	0.5	1	1	2	4
	LZD	0.5	1	1	2	2
	ABK	0.5	0.5	1	1	1

Antimicrobial agents	MIC ₉₀ (μg/mL)					MIC ₉₀ ratio	
	Inoculum size(cfu/spot)						
	2.5~4×10 ²	2.5~4×10 ³	2.5~4×10 ⁴	2.5~4×10 ⁵	2.5~4×10 ⁶		
MSSA	ABPC	0.5	1	2	8	256	512
	CEZ	0.5	0.5	0.5	0.5	1	2
	MEPM	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	2
	CPFX	0.5	1	1	1	2	4
	VCM	1	1	1	1	4	4
	TEIC	0.5	1	1	2	8	16
	LZD	1	2	2	4	8	8
	ABK	0.5	0.5	0.5	1	1	2
MRSA	VCM	1	1	1	2	4	4
	TEIC	1	2	2	2	8	8
	LZD	0.5	1	2	2	4	8
	ABK	1	1	1	2	2	2

ABPC: ampicillin, CEZ: cefazolin, MEPM: meropenem, CPFX: ciprofloxacin, VCM: vancomycin, TEIC: teicoplanin, LZD: linezolid, ABK: arbekacin

原因菌となり最も重要な *S. aureus* を試験菌とし、*S. aureus* 感染症に対し使用される抗菌薬が接種菌量の違いでどのようにMIC値が変化するかを検討した。

九州大学病院と福岡市近郊の病院から分離された MSSA49 株 (喀痰 14 株, 咽頭 12 株, 血液 3 株, 気管支洗浄液 1 株, 膿瘍 19 株) と Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 54 株 (喀痰 7 株, 尿 6 株, 血液 5 株, 膿瘍 36 株) を用い、寒天平板希釈法で薬剤感受性試験を行った。使用薬剤は Ampicillin (ABPC) (Meiji Seika

ファルマ), Cefazolin (CEZ) (アステラス製薬), Meropenem (MEPM) (大日本住友製薬), Ciprofloxacin (CPFX) (Meiji Seika ファルマ), Vancomycin (VCM) (Meiji Seika ファルマ), Teicoplanin (TEIC) (サノフィ・アベンティス), Linezolid (LZD) (ファイザー), Arbekacin (ABK) (Meiji Seika ファルマ) のいずれも力価の明らかな標準品を供試した。培地は Mueller Hinton II Agar (MHA: Becton, Dickinson and Company, France) を使用し、接種菌量は 5~8×10⁴ cfu/mL から 5~8×10⁸ cfu/mL の 5 段階とし、マイクロプラ

ンター（佐久間製作所）にて寒天平板へ接種した。マイクロプランターの1本あたりの接種菌液量は0.005 mLで、最終接種菌量は $2.5\sim 4\times 10^2$ cfu/spotから $2.5\sim 4\times 10^6$ cfu/spotとなった。判定は18~24時間後に行い、MICを決定した。

接種菌量を $2.5\sim 4\times 10^2$ cfu/spotから $2.5\sim 4\times 10^6$ cfu/spotへ変化させた時のMSSAの薬剤感受性累積分布をFig. 1(A), Fig. 1(B)に、MRSAに対する薬剤感受性累積分布をFig. 2に示し、CLSIで定められている寒天平板希釈法の最終接種菌量(10^4 cfu/spot)の値を太線で示した¹⁾。MSSAではABPCで接種菌量の増加に伴いMIC値の変動が大きく、その他のCEZ, MEPM, CPFYではMIC値の変動は小さく見られた。抗MRSA薬で比較すると、MSSA, MRSAともにVCMとABKでは接種菌量の増加に伴ったMIC値の変動は小さく、TEIC, LZDではMIC値の変動は大きく認められた。

また、接種菌量を $2.5\sim 4\times 10^2$ cfu/spotから $2.5\sim 4\times 10^6$ cfu/spotへ変化させたときのMIC値の変動をMIC₉₀ ratio (接種菌量 $2.5\sim 4\times 10^6$ cfu/spotのMIC₉₀/接種菌量 $2.5\sim 4\times 10^2$ cfu/spotのMIC₉₀)として決定し、薬剤毎に比較した(Table 1)。CEZ, MEPM, CPFY, VCM, ABKではMIC₉₀ ratioは4以下と低値で、TEIC, LZDは8~16, ABPCは512と高値を示した。

しかし薬剤によっては接種菌量の変化がMIC値に影響を与えることが判明した一方で、菌株ごとにMIC値の変動を比較すると、同じ薬剤でも菌株によって接種菌量の変化に伴いMIC値が変化しない株が存在することもわかった。

本検討より*S. aureus*に対し接種菌量が異なるとMIC値が大きく変動する薬剤と、そうでない薬剤があることがわかった。これらの結果は*in vitro*での現象ではあるが、感染巣の菌濃度が高いとされる感染性心内膜炎や化膿性関節炎、骨髄炎、膿瘍といった深部感染症における治療においての治療

失敗例ではこれらの結果が原因の一つとして考慮されるべきだと考えられた。

文 献

- 1) MALANOSKI, G. J.; G. M. ELIOPOULOS, M. J. FERRARO, *et al.*: Effect of pH variation on the susceptibility of *Helicobacter pylori* to three macrolide antimicrobial agents and temafloxacin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 131~133, 1993
- 2) KÖNIG, C.; H. P. SIMMEN & J. BLASER: Effect of pathological changes of pH, pCO₂ on the activity of antimicrobial agents *in vitro*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 519~526, 1993
- 3) BOLMSTROM, A.; K. ESBERG, A. WIMAN, *et al.*: Effects of CO₂ incubation on MICs of macrolides? In Programs and abstracts of the thirty-sixth interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy, New Orleans, LA, 1996, Poster D38, p. 67, American society for microbiology, Washington, DC, US
- 4) MIZUNAGA, S.; T. KAMIYAMA, Y. FUKUDA, *et al.*: Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on *in vitro* activities and *in vivo* efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 91~96, 2005
- 5) BONFIGLIO, G. & D. M. LIVERMORE: Inoculum effects on E tests and agar dilution minimum inhibitory concentrations. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 163~166, 1994
- 6) KÖNIG, C.; H. P. SIMMEN & J. BLASER: Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid implications for bactericidal activity of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 227~232, 1998
- 7) LAPLANTE, K. L. & M. J. RYBAK: Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agent Chemother.*

- 48: 4665~4672, 2004
- 8) THOMSONN, K. S. & E. S. MOLAND: Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3548~3554, 2001
- 9) NANNINI, E. C.; M. E. STRYJEWSKI, K. V. SINGH, *et al.*: Inoculum effect with cefazolin among clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: frequency and possible cause of cefazolin treatment failure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3437~3441, 2009
- 10) NANNINI, E. C.; M. E. STRYJEWSKI, K. V. SINGH, *et al.*: Determination of an inoculum effect with various cephalosporins among clinical isolates of Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 2206~2208, 2010
- 11) Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard-*Seventh Edition*: Approved Standard M7-A7. CLSI, Wayne, PA, USA, 2006

Influence of inoculum size on MICs for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on *in vitro*

NORIKO MIYAKE, MASAKO KADOWAKI, YORIKO SATO, YOSHIHIRO ERIGUCHI,
YOJI NAGASAKI, YUKIKO HARADA, YUJIRO UCHIDA and NOBUYUKI SHIMONO

Faculty of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of
Medical Science, Kyushu University

Using 49 clinical methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and 54 clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates, we examined the change of MIC using five different inocula ($2.5\sim 4\times 10^2$ cfu/spot~ $2.5\sim 4\times 10^6$ cfu/spot). We found the big change of the MIC with the increase of the inoculum size in ampicillin against MSSA, and the change was small in cefazolin, meropenem, ciprofloxacin. For anti-MRSA antibiotics, we found the small change with the increase of the inoculums size in vancomycin and arbekacin, and the middle change in teicoplanin and linezolid against MSSA and MRSA.

The data from this study suggest that in serious and high inocula infections caused by *S. aureus*, the presence of an inoculum effect should be considered in curing.