

Hollow fiber system を用いた *in vitro* ヒト血漿中濃度シミュレーションモデルによるレボフロキサシン注射剤とメロペネムの緑膿菌に対する併用殺菌効果

魚山里織¹⁾・神田裕子¹⁾・吉田久美²⁾・星野一樹¹⁾

¹⁾ 第一三共株式会社生物医学研究所

²⁾ 第一三共株式会社ワクチン事業部

(2012年9月10日受付)

緑膿菌による呼吸器感染症は難治性であることが多く、第一選択薬として使用されているカルバペネム系抗菌薬でも治療が困難となる場合がある。今回、Hollow fiber system (HFS) を用いた *in vitro* 血中濃度シミュレーションモデルにより、メロペネム (MEPM) 1000mg (0.5時間点滴) 1日3回投与 (t.i.d.) 時、レボフロキサシン (LVFX) 500mg (1時間点滴) 単回投与 (q.d.) 時、及び2薬剤併用時のヒト血漿中濃度推移をHFS内で24時間再現し、MEPM単剤では治療効果が低いと想定される緑膿菌に対して、生菌数を指標にLVFX併用時の殺菌効果について単剤作用時と比較検討した。供試菌株として、MEPMのMIC: 2~16 μ g/mL及びLVFXのMIC: 2 μ g/mL, *in vitro* チェッカーボード法によるMEPM及びLVFX併用時のFractional inhibitory concentration (FIC) indexが0.625~1を示した臨床分離緑膿菌、計6株を用いた。

MEPM単剤作用時は、いずれの菌株でもシミュレーション開始 ($10^6 \sim 10^7$ CFU/mL) 後に殺菌効果が認められたが、生菌数は検出限界 (100 CFU/mL) 以下に減少することなく、その後再増殖が確認された。LVFX単剤作用時は、いずれの菌株でもシミュレーション開始後に速やかな殺菌効果が確認され、生菌数は検出限界以下まで減少したが、24時間後に再増殖が確認された。一方、MEPMとLVFXの2薬剤併用時は、すべての菌株においてMEPMあるいはLVFX単剤作用時を上回る併用殺菌効果が認められ、生菌数は検出限界以下まで減少した。特に、MEPMのMIC: 2及び4 μ g/mLの菌株では、シミュレーション開始24時間後まで再増殖は確認されなかった。本シミュレーションモデルにおいて、MEPMとLVFXを併用することで単剤作用時と比較して高い殺菌効果が認められることが明らかとなった。また、今回の供試菌株は、一定濃度の薬剤を一定時間作用させた *in vitro* チェッカーボード法では相乗効果ありと判断されなかった菌株 (FIC index > 0.5) であるが、臨床での薬剤濃度暴露を作用させた *in vitro* シミュレーションモデルにおいて強い併用殺菌効果が確認されたことから、臨床においてもMEPMとLVFXを併用することで治療効果を高める可能性が示唆された。

緑膿菌はブドウ糖非醗酵のグラム陰性桿菌であり、日和見感染あるいは院内感染の原因菌としての分離頻度が高いことが知られている。緑膿菌は複数の薬剤耐性機構を有し、種々の抗菌薬に対して耐性を示すため、本菌による感染症治療には難渋することが多い。近年、緑膿菌に効果が期待されている、カルバペネム系薬やフルオロキノロン系薬、さらにアミノグリコシド系薬などに幅広く耐性を示す薬剤耐性緑膿菌の増加が懸念されている¹⁾。実際、緑膿菌による院内肺炎では、適切な治療法が行われなかった場合、他の菌種と比較して有意に死亡率が高まるとの報告もあり^{2,3)}、初期治療における適切な抗菌薬の選択が重要となる。本邦では、緑膿菌による院内肺炎に対し、第一選択薬としてカルバペネム系抗菌薬の使用が推奨されており⁴⁾、その中でメロペネム (MEPM) が最も多く使用されている⁵⁾。MEPMは、グラム陽性菌及び緑膿菌を含むグラム陰性菌に対する抗菌活性を有するカルバペネム系注射剤であり、本邦では重症・難治性感染症にはMEPMとして、1回1gを上限とし、1日3gまで増量することが保険適用上可能である。また、国内での呼吸器由来緑膿菌のMEPMに対する感性率は73.1%と報告されており⁶⁾、カルバペネム系抗菌薬だけでは十分な有効性が期待できない症例に対しては、作用機作の異なる他系統抗菌薬と併用することが推奨されている。他系統抗菌薬では、アミノグリコシド系あるいはキノロン系の注射薬が使用される場合が多いが前者では長期投与による腎毒性等の副作用が懸念されている⁷⁾。一方、 β -ラクタム系薬とキノロン系薬の*in vitro*での併用効果については、チェッカーボード法、時間-殺菌曲線あるいはヒト血中濃度シミュレーションモデルによる報告があるが⁸⁻¹²⁾、必ずしもこれら手法間で効果が一致するとは限らない。本研究では、MEPMとレボフロキサシン (LVFX) 注射剤の併用効果について、より臨床に近い薬剤濃度暴露を*in vitro*で

再現したHollow fiber system (HFS) を用いたヒト血漿中濃度シミュレーションモデルにより検討したので報告する。

I. 材料及び方法

1. 使用抗菌薬

LVFXは第一三共プロファーマ株式会社合成品を、MEPMはLKT Laboratories, Inc. より購入して用いた。各抗菌薬の濃度は活性本体の値として表示した。

2. 使用菌株及び抗菌薬感受性

臨床分離緑膿菌0421454, 21407, 21110, 21474, 21316, 及び21353株を用いた。これら菌株に対するLVFXのMICは2 μ g/mL, MEPMのMICは2~16 μ g/mLであった。MEPMとLVFXの併用効果は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹³⁾ に準じた微量液体希釈法によるチェッカーボード法¹⁴⁾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それぞれの抗菌薬濃度の組み合わせにおけるFIC indexを計算し、得られたFIC indexの最小値をFIC indexとして採用した。FIC indexが ≤ 0.5 を相乗作用と判定し、 $>0.5 \sim \leq 1$ を相加作用、 $>1 \sim \leq 2$ を不関と判定した¹⁴⁾。

FIC index = 併用時のMIC (MEPM) / 単剤時のMIC (MEPM) + 併用時のMIC (LVFX) / 単剤時のMIC (LVFX)

3. Hollow fiber system (HFS) を用いた*in vitro*血漿中濃度シミュレーションモデルによる殺菌効果の検討

1) シミュレーションモデルの設定

血漿中濃度推移の再現は、オートシミュレーションシステム (PASS-400, 大日本精機, 京都)

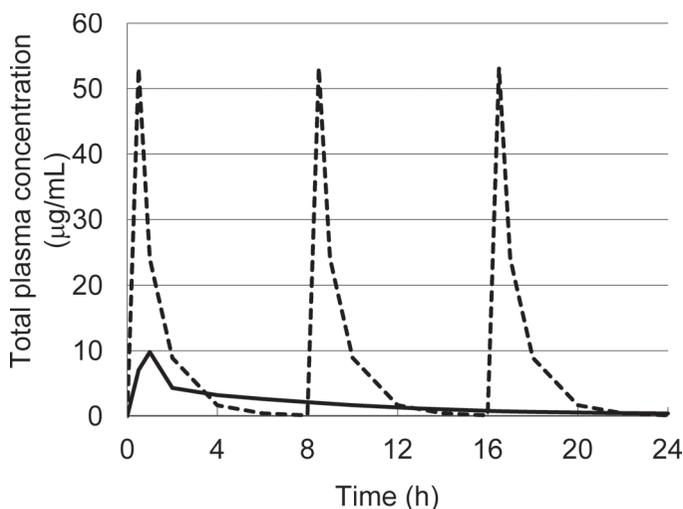
を用いて行った。本実験では、シミュレーションモデルとしてMEPMの最大用量・用法である1000mg (0.5時間点滴) 1日3回投与 (t.i.d.) 時、LVFXの本邦における用量・用法である500mg (1時間点滴) 1日1回投与 (q.d.) 時、ならびにMEPM 1000mg t.i.d. とLVFX 500mg q.d. の併用時の血漿中濃度推移を国内臨床薬理試験における

単回投与時の血漿中濃度推移に基づき設定した (Fig. 1)^{15,16}。各モデルの濃度推移は血漿中Total濃度推移を再現し、濃度はHPLC (日本ウォーターズ株式会社, 東京) を用いて確認した。

2) 殺菌効果の検討

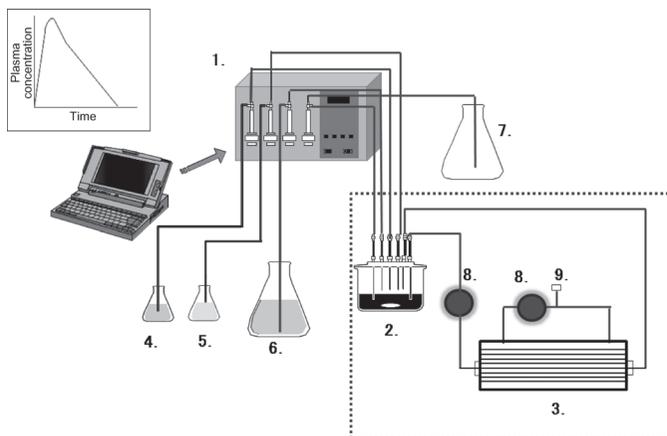
Cation-Adjusted Mueller Hinton II Broth (CAMHB; BBL, Becton, Dickinson and Company,

Fig. 1. Simulated total plasma concentration of levofloxacin and meropenem in an *in vitro* pharmacokinetic model.



Line, LVFX 500 mg (1 hour infusion) q.d.; dotted line, MEPM 1000 mg (0.5 hour infusion) t.i.d.

Fig. 2. *In vitro* simulation model with a hollow fiber system.



1. Pharmacokinetics auto simulation system (PASS-400), 2. Central compartment (Reservoir), 3. Infection compartment (Hollow fiber cartridge), 4. Drug 1 (LVFX), 5. Drug 2 (MEPM), 6. Diluted solution (CAMHB), 7. Elimination, 8. Peristaltic pumps, 9. Inoculation and sample port, dotted line inside; Incubator

Sparks, MD., USA) を用いて一夜培養した菌株を CAMHB にて $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL になるように希釈後, Hollow fiber カートリッジ FCS-C2011 (Fibercell Systems Inc., Frederick, MD., USA) に接種し, 35°C で培養した。ペリスタポンプを用いて PASS-400 のリザーバー及び HFS 内の CAMHB を環流後, 薬剤作用 (シミュレーション) を開始した (Fig. 2)。Hollow fiber カートリッジ内の菌液は, シミュレーション開始後 24 時間まで適宜サンプリングし, 希釈後, トリプトソイ寒天平板培地 (栄研化学株式会社, 東京) 上に塗布し, 35°C で一夜培養後, 寒天平板培地上のコロニー数を計測し生菌数を算出した。なお, 検出限界値は 100 CFU/mL とした。

II. 結果

1. *In vitro* チェッカーボード法による MEPM と LVFX の併用効果

供試菌株における MEPM と LVFX 併用時の FIC index を Table 1 に示した。いずれの菌株における FIC index も 0.625~1 と 0.5 を上回ったことより, 相乗効果ありとは判定されなかった。

2. *In vitro* 血漿中濃度シミュレーションモデルを用いた MEPM と LVFX の殺菌作用

MEPM 1000 mg t.i.d., LVFX 500 mg q.d. 単剤投与時, 及び併用投与時のヒト血漿中濃度推移をシミュレートした際の各供試菌株における生菌数変化を Fig. 3A~F に示した。いずれの菌株においても Control の生菌数は培養開始後に増加し, 約 10^{10} CFU/mL に達した。

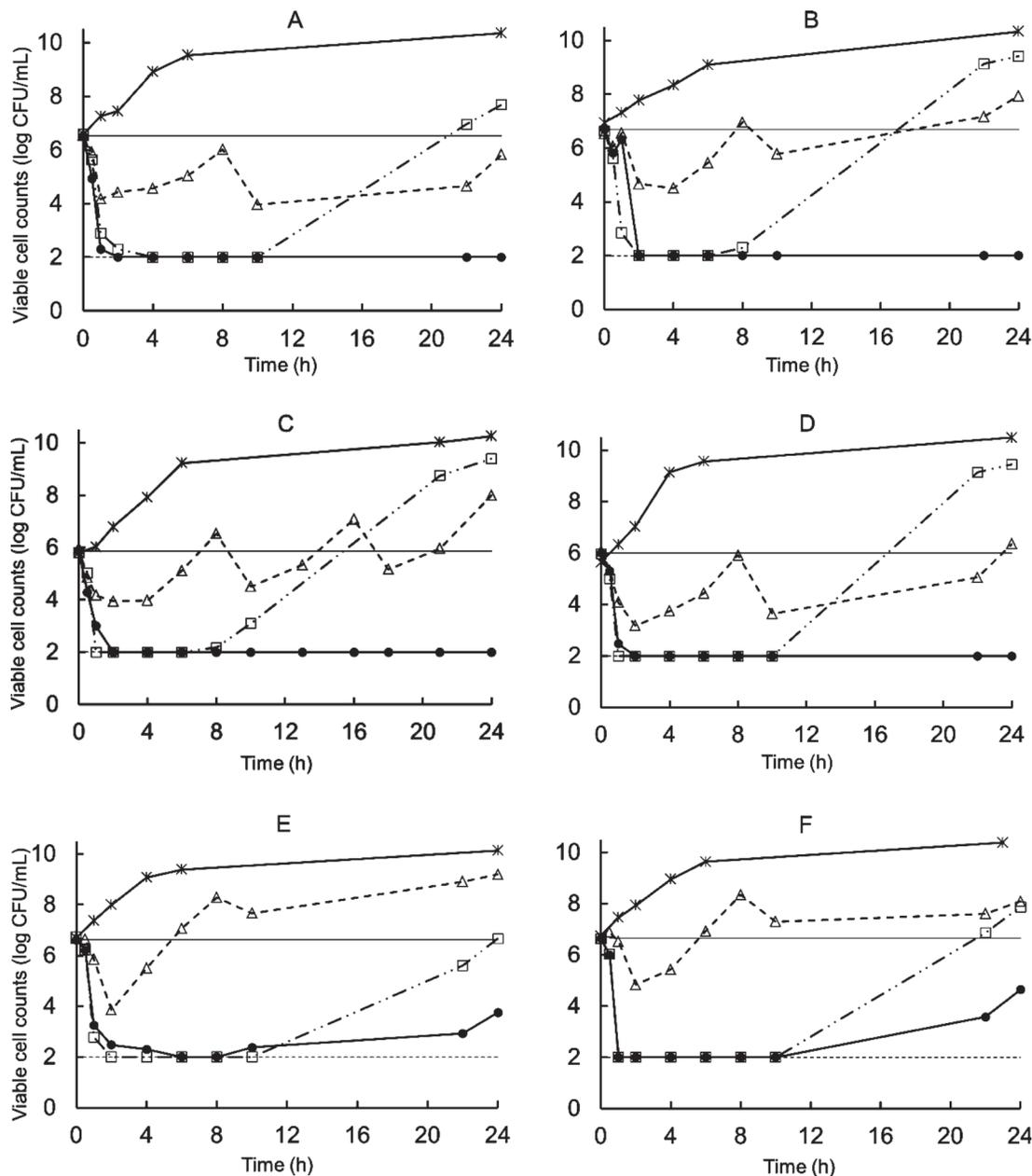
MEPM 及び LVFX の MIC がいずれも $2\mu\text{g/mL}$ の *Pseudomonas aeruginosa* 0421454 株に対する単剤及び併用時の殺菌効果を Fig. 3A に示した。MEPM を単剤で作用させた場合, 生菌数はシミュレーション開始後に約 $1/10^2$ に減少したが, 24 時間後には初期菌数近くまで再増殖した。LVFX を単剤で作用させた場合, 生菌数はシミュレーション開始 4 時間後に検出限界 (100CFU/mL) 以下まで減少したが, 24 時間後には初期菌数を上回っていた。一方, MEPM と LVFX を併用した場合, シミュレーション開始 2 時間後に生菌数は検出限界以下まで減少し, その後 24 時間まで再増殖は認められず, 高い併用殺菌効果が確認された。

MEPM 及び LVFX の MIC がそれぞれ 4 及び $2\mu\text{g/mL}$ の *P. aeruginosa* 21407, 21110, 及び 21474 株に対する単剤及び併用時の殺菌効果を Fig. 3B~D に示した。供試した 3 株すべてにおいて MEPM を

Table 1. MIC and FIC index of levofloxacin and meropenem against *P. aeruginosa*.

Strain No.	MIC of alone ($\mu\text{g/mL}$)		MIC of combination ($\mu\text{g/mL}$)		FIC index
	MEPM	LVFX	MEPM	LVFX	
0421454	2	2	1	0.25	0.625
21407	4	2	1	1	0.75
21110	4	2	2	1	1
21474	4	2	2	1	1
21316	16	2	8	0.5	0.75
21353	16	2	8	1	1

Fig. 3. Bactericidal activity of levofloxacin and meropenem against clinical isolates of *P. aeruginosa* in an *in vitro* pharmacokinetic model.



A, *P. aeruginosa* 0421454; B, *P. aeruginosa* 21407; C, *P. aeruginosa* 21110; D, *P. aeruginosa* 21474; E, *P. aeruginosa* 21316; F, *P. aeruginosa* 21353.

● ; LVFX 500 mg q.d.+MEPM 1000mg t.i.d. combinations, □ ; LVFX 500mg q.d. alone, △ ; MEPM 1000mg t.i.d. alone, * ; control

—; beginning number of bacteria, - - -; detection limit

単剤で作用させた場合、生菌数はシミュレーション開始後に約 $1/10^2 \sim 1/10^3$ に減少したが、24時間後には初期菌数を超える再増殖が認められた。LVFXを単剤で作用させた場合、シミュレーション開始1~2時間後に生菌数は検出限界以下まで減少したが、24時間後には初期菌数を超える生菌数が確認された。一方、MEPMとLVFXを併用した場合、シミュレーション開始2時間後に生菌数は検出限界以下まで減少し、その後24時間まで再増殖は認められず、高い併用殺菌効果が確認された。

MEPM及びLVFXのMICがそれぞれ16及び $2\mu\text{g}/\text{mL}$ の*P. aeruginosa* 21316及び21353株に対する単剤及び併用時の殺菌効果をFig. 3E及びFに示した。供試した2株ともにMEPMを単剤で作用させた場合、生菌数はシミュレーション開始後に約 $1/10 \sim 1/10^2$ に減少したが、24時間後には初期菌数を超える再増殖が認められた。LVFXを単剤で作用させた場合、生菌数はシミュレーション開始1~2時間後に検出限界以下まで減少したが、24時間後には再増殖が確認された。一方、MEPMとLVFXを併用させた場合、シミュレーション開始1~6時間後に生菌数は検出限界以下まで減少した。その後再増殖が確認されたが、24時間後の生菌数は初期菌数の約 $1/10^3$ あるいは $1/10^2$ であった。

III. 考察

緑膿菌を含む感染症治療においては感染部位での起炎菌除菌が一義的に重要である。MEPMあるいはイミペネム (IPM) のカルバペネム系薬とLVFXとの併用効果に関しては、LOUIEら及びLISTERらが緑膿菌に対する単剤あるいは併用作用時の殺菌性について*in vitro*シミュレーションシステムを用いて検討しており^{11,12)}、併用による殺菌性の増大あるいは耐性ポピュレーションの抑制

が報告されている。しかし、いずれもLVFXは海外で承認されている1回あたりの最高用量・用法の750mg 1日1回投与で検討されており、本邦で2010年10月に承認されたLVFX 500mg 1日1回投与の検討報告はない。また、本邦では、抗菌薬の*in vitro*血漿中濃度をシミュレーションする場合、オートシミュレーションシステムPASS-400が使用されることが多い^{17,18)}。しかし、本システムにてカルバペネム系薬のように C_{max} が高く、半減期の短い薬剤のヒト血漿中濃度を再現する場合、薬剤希釈とともにリザーバー内に接種された菌も希釈されるため、正確な生菌数を測定できない。一方、海外での*in vitro*血漿中濃度シミュレーションの検討では、Hollow fiberカートリッジを用いることが多い¹⁹⁾。Hollow fiberカートリッジを用いた場合、薬液はHollow fiber内を環流するため、カートリッジの中に接種された菌は、薬剤希釈の影響を受けることなく増殖可能である。今回我々は、PASS-400とHFSを組み合わせたモデルを構築し、本邦で承認されているMEPMの最大用量である1000mg 1日3回及びLVFX 500mg 1日1回の血漿中濃度推移を併用した際の殺菌性について検討した。一般に、*in vitro*で2薬剤の併用効果を検討する際には、チェッカーボード法あるいは時間-殺菌曲線による殺菌作用の検討が行われているが、得られる結果は必ずしも一致していない^{8,20)}。いずれの手法もある一定濃度の薬剤を一定時間作用させた時の併用効果であり、臨床での薬剤濃度推移とは大きく異なる。一方、*in vitro*血漿中濃度シミュレーションモデルでは、2薬剤のヒト血漿中濃度推移を再現した条件で併用効果を検討することができ、臨床における併用療法での効果を予測するのにより適した手法と考えられる。しかしながら、あくまで*in vitro*システムであり、宿主免疫が働かない環境であることから、相対的な殺菌効果を比較検証する目的で利用することが望ましいと考えられる。

今回我々が供試した臨床分離緑膿菌は、LVFXのブレイクポイントMICである $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、MEPMのブレイクポイントMICである $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及びそれ以上を示す耐性株を用いた。MEPMのMICが $2\mu\text{g}/\text{mL}$ の菌株では、MEPM単剤作用24時間後の効果は静菌的であったが、MEPMのMICが $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の菌株ではMEPM単剤作用24時間後に初期菌量を上回る再増殖が確認され、その殺菌効果は低かった。MEPMの殺菌効果については、黒田らの報告によると、MEPM 1000mg b.i.d. シミュレーションモデルにおいて、MEPMのMIC: $4\mu\text{g}/\text{mL}$ の菌株で静菌的、MEPMのMIC: $8\mu\text{g}/\text{mL}$ の菌株で初期菌量を上回る再増殖が確認されている²¹⁾。我々の検討では黒田らより低い殺菌効果が確認されたが、使用しているシミュレーションモデル系の相違、実験条件の相違に起因するものと考えられる。また、今回供試した緑膿菌は、チェッカーボード法で相乗効果が認められなかった菌株を対象としたにも関わらず、本*in vitro*シミュレーションモデルにおいては、これら2薬剤を併用することで強い併用殺菌効果が確認された。MEPMとLVFXの併用に関しては、他施設の報告でもチェッカーボード法で相乗を示す菌株のポピュレーションは少ないこと、また、FIC indexが必ずしも臨床での併用効果の指標として確立されていないことより、今回供試した菌株においてより臨床に近い薬剤濃度で明確な併用殺菌増強効果が確認された意義は高いと考察する。

以上のことより、臨床における緑膿菌による呼吸器感染症に対して、MEPMとLVFXを併用することで治療効果を高める可能性が示唆された。今後、臨床でのエビデンス蓄積に期待したい。

本論文内容は、第59回日本化学療法学会東日本支部奨励賞受賞演題を論文化したものである。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本試験にご協力いただきました田辺美穂氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) TSUJI, A.; I. KOBAYASHI, T. OGURI, *et al.*: An epidemiological study of the susceptibility and frequency of multiple-drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at medical institutes nationwide in Japan. *J. Infect. Chemother.* 11: 64~70, 2005
- 2) GARNACHO-MONTERO, J.; M. SA-BORGES, J. SOLE-VIOLAN, *et al.*: Optimal management therapy for *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: an observational, multicenter study comparing monotherapy with combination antibiotic therapy. *Crit. Care Med.* 35: 1888~1895, 2007
- 3) MUELLER, E. W.; S. D. HANES, M. A. CROCE, *et al.*: Effect from multiple episodes of inadequate empiric antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia on morbidity and mortality among critically ill trauma patients. *J. Trauma* 58: 94~101, 2005
- 4) 呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会：成人院内肺炎診療ガイドライン。日本呼吸器学会，東京，2008
- 5) 河野 茂，渡辺 彰，松島敏春，他：全国多施設での院内肺炎の実態と初期治療におけるmeropenemの位置づけ。日本化学療法学会雑誌54: 453~464, 2006
- 6) 山口恵三，石井良和，岩田守弘，他：Meropenemを含む各種注射用抗菌薬に対する2009年臨床分離株の感受性サーベイランス。 *Jpn. J. Antibiotics* 64: 53~95, 2011
- 7) CRAIG, W. A. & D. ANDES: Aminoglycosides are useful for severe respiratory tract infections. *Semin. Respir. Infect.* 12: 271~277, 1997
- 8) VISALLI, M. A.; M. R. JACOBS & P. C. APPELBAUM: Determination of activities of levofloxacin, alone and combined with gentamicin, ceftazidime, cefpirome, and meropenem,

- against 124 strains of *Pseudomonas aeruginosa* by checkerboard and time-kill methodology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 953~955, 1998
- 9) MCNABB, J.; R. QUINTILIANI, C. H. NIGHTINGALE, *et al.*: Comparison of the bactericidal activity of trovafloxacin and ciprofloxacin, alone and in combination with ceftipime, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* 46: 383~389, 2000
- 10) KLEPSEK, M. E.; K. B. PATEL, D. P. NICOLAU, *et al.*: Comparison of the bactericidal activities of ofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with ceftazidime and piperacillin against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2503~2510, 1995
- 11) LOUIE, A.; C. GRASSO, N. BAHNIUK, *et al.*: The combination of meropenem and levofloxacin is synergistic with respect to both *Pseudomonas aeruginosa* kill rate and resistance suppression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 2646~2654, 2010
- 12) LISTER, P. D. & D. J. WOLTER: Levofloxacin-imipenem combination prevents the emergence of resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 40 (Suppl. 2): S105~S114, 2005
- 13) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement. M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2012
- 14) ELIOPOULOS, G. & R. C. MOELLERING, Jr.: Antimicrobial combinations. In V. LORIAN (ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.: 330~396, 1996
- 15) 中島光好, 植松俊彦, 金丸光隆, 他: Meropenem の第I相臨床試験。日本化学療法学会雑誌40 (S-1): 258~275, 1992
- 16) 柴 孝也, 深瀬広幸: 健康成人男性を対象とした levofloxacin 注射剤の第I相臨床試験。日本化学療法学会雑誌59 (S-1): 1~9, 2011
- 17) 神田裕子, 千葉めぐみ, 井上和江: *In vitro* 血中濃度シミュレーションを用いた *Streptococcus pneumoniae* および *Escherichia coli* 耐性化防止のための levofloxacin の至適投与方法の検討。日本化学療法学会雑誌57: 1~14, 2009
- 18) 久田晴美, 福田淑子, 古家由理: *In vitro* pharmacokinetic model における *Streptococcus pneumoniae* に対する pazufloxacin の殺菌効果および耐性化の検討。日本化学療法学会雑誌58: 644~649, 2010
- 19) SEVILLANO, D.; L. AGUILAR, L. ALOU, *et al.*: Exposure-response analysis of tigecycline in pharmacodynamic simulations using different size inocula of target bacteria. *Internat. J. Antimicrob. Agents* 36: 137~144, 2010
- 20) CAPPELLETY, D. M. & M. J. RYBAK: Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 677~683, 1996
- 21) 黒田直美, 宗景 正, 山野佳則: Pharmacodynamic model における doripenem の殺菌効果。日本化学療法学会雑誌53 (S-1): 96~103, 2005

Bactericidal effect of levofloxacin injection in combination with meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* using an *in vitro* simulation model with a hollow fiber system

SAORI UOYAMA¹⁾, HIROKO KANDA¹⁾, KUMI YOSHIDA²⁾ and KAZUKI HOSHINO¹⁾

¹⁾ Biological Research Laboratories, R&D Division, Daiichi Sankyo Co., Ltd.

²⁾ Vaccine Business Strategy Department, Vaccine Business Intelligence Division, Daiichi Sankyo Co., Ltd.

An *in vitro* human plasma concentration simulation model with a hollow fiber system was established and used to evaluate the bactericidal effect of levofloxacin (LVFX) 500mg q.d. in combination with meropenem (MEPM) 1000mg t.i.d. against *Pseudomonas aeruginosa*. Six clinical isolates of *P. aeruginosa* which had MEPM MICs of 2~16 μ g/mL, LVFX MICs of 2 μ g/mL, and fractional inhibitory concentration (FIC) indices by the *in vitro* checkerboard method of 0.625~1 were used. In the treatment with MEPM alone, initial viable counts (10^6 ~ 10^7 CFU/mL) decreased, but did not reach below the detection limit (100CFU/mL) and the regrowth of bacteria was observed. In the treatment with LVFX alone, viable counts decreased once below the detection limit, although increased after treatment for 24 hours. On the other hand, in the treatment with LVFX-MEPM combination, more potent bactericidal effects were observed compared to LVFX or MEPM alone in all strains. Especially, in the strains with MEPM MICs of 2 and 4 μ g/mL, viable counts rapidly decreased below the detection limit and no regrowth was observed until 24 hours. These results suggested that LVFX-MEPM has a potential to be an effective combination against *P. aeruginosa* by synergistic rapid bactericidal action in clinical settings, even in the strain against which no significant synergy is confirmed by the traditional *in vitro* checkerboard method.