

[原 著]

多剤耐性緑膿菌の検出状況と併用効果

宮本仁志・村上 忍・村瀬光春
愛媛大学医学部附属病院診療支援部

(平成 21 年 2 月 16 日, 平成 21 年 5 月 27 日)

愛媛大学医学部附属病院において、2004 年から 2008 年までに臨床検体から分離された多剤耐性緑膿菌 (multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP) 22 株を対象に各種抗菌薬の薬剤感受性、Metallo- β -lactamase (MBL) 産生性、IMP-1 型 MBL 遺伝子の有無を検討した。さらに Breakpoint Checkerboard Plate (BC-Plate) 法による抗菌薬併用効果を検討した。最近 5 年間の頻度は 0.9~2.5%であった。12 株で MBL 産生と IMP-1 型 MBL 遺伝子が確認された。残り 10 株のうち、ceftazidime (CAZ) 感性株は 6 株であった。MDRP は MBL 産生 12 株 (54.5%) と、非産生株の CAZ 耐性 4 株 (18.2%), CAZ 感性 6 株 (27.3%) の 3 グループに分かれた。MDRP に対しての併用効果で、最も優れていたのは、AZT と AMK の組合せで 59.1%であった。今後、新たな耐性菌が増加するものと考えられ、それらに対して単剤での効果が期待できない場合に、併用効果による薬剤の組合せについて検討していく必要がある。

Key words: multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Breakpoint Checkerboard Plate, Metallo- β -lactamase, ceftazidime

序 文

Pseudomonas aeruginosa は、弱毒菌であるが日和見感染や病院内感染の起炎菌として重要である。近年、カルバペネム系薬の imipenem (IPM), フルオロキノロン系薬の ciprofloxacin (CPFX), アミノグリコシド系薬の amikacin (AMK) すべてに耐性を示す薬剤耐性緑膿菌 (multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP) が分離され、その増加が懸念されている¹⁾。MDRP はカルバペネム系薬、フルオロキノロン系薬、アミノグリコシド系薬のみならず、ペニシリン系薬、セフェム系薬にも耐性で、オール耐性の成績を報告することが多い。単独で効果が期待できる薬剤として colistin (CL) があるが、国内では市販されてなく、個人輸入するしか方法がないため、現在ほとんどの施設では使用されていないのが現状である²⁾。そこで、国内で市販されている抗菌薬を併用し、その相乗効果に期待する試みがなされてきた。評価法として

はチェッカーボード法が用いられるが、手間やコストの点から実際の臨床応用は難しい。そこで、Tateda ら³⁾はブレイクポイント周辺の濃度の組合せで併用効果を簡単にスクリーニングできる Breakpoint Checkerboard Plate (BC-Plate) 法を考案した。この方法は、2 薬剤の S (susceptible) と I (intermediate) の濃度を組合せた 4 個のウェルで併用効果をスクリーニングするので、1 枚のプレートで 24 組の薬剤について検査が可能であり、有効な組合せを簡便に選択することができ、臨床応用が期待できる。

今回筆者らは、MDRP の検出状況、Metallo- β -lactamase (MBL) 産生性の調査検討を行い、MDRP 株について Tateda らの作成した BC-Plate 法を参考にパネルを作成し併用効果について検討を行ったので報告する。

材料と方法

1. 使用菌株

使用菌株は、2004 年から 2008 年の 5 年間に当院細菌検査室に提出された各種臨床材料から分離の *P. aeruginosa* のうち、次項 2 の薬剤感受性検査によって MDRP と判定された株を対象とした。同一患者からの分離株を 1 株として年単位で集約した。すなわ

著者連絡先: (〒791-0295) 愛媛県東温市志津川
愛媛大学医学部附属病院診療支援部
宮本仁志
TEL: 089-960-5621
FAX: 089-960-5627
E-mail: jinmiya@m.ehime-u.ac.jp

ち、2004年227株中2株(0.9%),2005年221株中3株(1.4%),2006年256株中5株(2.0%),2007年241株中6株(2.5%),2008年251株中6株(2.4%)の計22株である。

2. 薬剤感受性測定

薬剤感受性は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に従い微量液体希釈法⁴⁾にてMICを測定した。使用抗菌薬は、piperacillin (PIPC), ceftazidime (CAZ), IPM, meropenem (MEPM), aztreonam (AZT), gentamicin (GM), AMK, CFX, levofloxacin (LVFX) の合計9薬剤である。精度管理菌株は *P. aeruginosa* ATCC27853 を使用した。

3. MIC ブレイクポイントおよび多剤耐性の判定

MICの感性、耐性ブレイクポイントは、CLSIの基準⁴⁾を用い、多剤耐性の判定は感染症法の判断基準を用いた。すなわちCAZにおいては8μg/ml以下を感性株、16μg/ml以上を耐性株として扱った。また、IPMが16μg/ml以上、AMKが32μg/ml以上、CFXが4μg/ml以上を示した株をMDRPとした。

4. MBL 産生菌のスクリーニング

日常検査におけるMBL産生菌のスクリーニングは、CAZの判定が耐性を示し、IPMの判定が感性以外を対象とし、Shibataら⁵⁾によるメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)による阻害試験に準じて行った。す

なわち、「メタロ-β-ラクタマーゼSMA‘栄研’」ディスクを用い、対象薬はCAZおよびIPMディスクである。

5. PCR 法による MBL 遺伝子検出

MBL 遺伝子の検出は、Shibata らの方法に準じて行い、IMP-1 遺伝子 (*bla_{IMP-1}*) を検索した。なお、遺伝子検索はCAZに耐性を示す16株についてのみ行った。

6. 併用効果の測定および併用効果の判定

Tateda らの考案したBC-Plate法を参考にし、パネルを作成した(図1)。併用効果の判定は、Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC index) を求め、FIC index ≤ 0.5 を相乗効果、0.5 < FIC index ≤ 1 を相加効果、1 < FIC index ≤ 2 を不関、FIC index > 2 を拮抗と判定し、FIC index ≤ 1 を併用効果ありと判定した。FIC index を求める算式を以下に表す。

$$\text{FIC index} = \frac{\text{併用時の A 薬剤の MIC 値} / \text{単独時の A 薬剤の MIC 値} + \text{併用時の B 薬剤の MIC 値} / \text{単独時の B 薬剤の MIC 値}}$$

結 果

1. MDRP の検出状況

2004年から2008年におけるMDRPの検出状況をMBL産生菌、MBL以外に分けて図2に示した。

		1	2		3	4		5	6		7	8		9	10		11	12
		MEP			CAZ			PIPC			AZT			AZT			Control	
		4	8		4	8		4	8		4	8		4	8			
A	OPFX	1	2		OPFX	1	2		OPFX	1	2		OPFX	1	2		Control	
B	OPFX	2			OPFX	2			OPFX	2			OPFX	2				
		MEP			CAZ			PIPC			AZT			CFPX			RFP	
		4	8		4	8		4	8		4	8		1	2		2	4
C	AMK	16			AMK	16			AMK	16			AMK	16			16	
D	AMK	32			AMK	32			AMK	32			AMK	32			32	
		MEP			CAZ			PIPC			AZT			CFPX			CL	
		4	8		4	8		4	8		4	8		1	2		1	2
U	RFP	2			RFP	2			RFP	2			RFP	2			2	
U	RFP	4			RFP	4			RFP	4			RFP	4			4	
		MEP			CAZ			PIPC			AZT			CFPX			AMK	
		4	8		4	8		4	8		4	8		1	2		16	32
G	CL	1			CL	1			CL	1			CL	1			1	
H	CL	2			CL	2			CL	2			CL	2			2	

図1. パネル配置図 濃度(μg/ml)

MEPM: meropenem, CAZ: ceftazidime, PIPC: piperacillin, AZT: aztreonam, CFX: ciprofloxacin, AMK: amikacin, RFP: rifampicin, CL: colistin

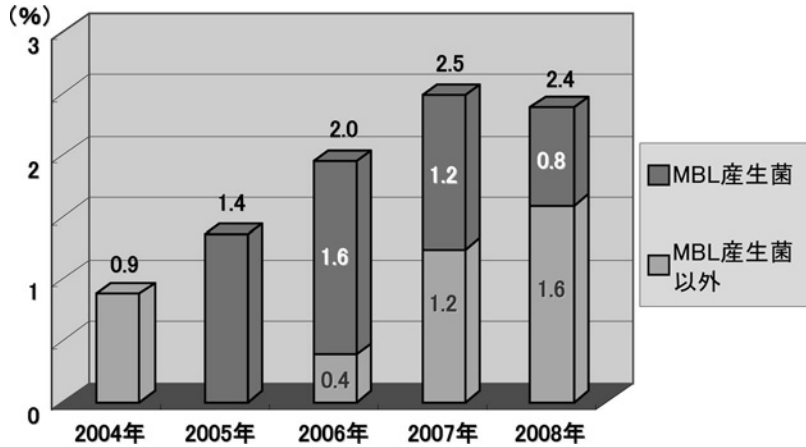


図2. 多剤耐性緑膿菌の検出状況
MBL: Metallo-β-lactamase

表1. メタロ-β-ラクタマーゼ産生性および各種薬剤のMIC値

No.	MIC (μg/ml)									メタロ (遺伝子型)
	PIPC	CAZ	IPM	MEPM	AZT	GM	AMK	CPFX	LVFX	
1	>128	32	>32	>32	32	>32	32	8	>16	— ^{a)}
2	>128	32	>32	>32	32	>32	32	8	>16	—
3	32	>64	>32	>32	16	16	128	>8	>16	IMP-1
4	16	>64	>32	>32	32	16	64	>8	>16	IMP-1
5	64	>64	>32	>32	32	16	128	>8	>16	IMP-1
6	8	2	32	16	16	16	64	>8	>16	—
7	>128	>64	>32	>32	>64	16	128	>8	>16	IMP-1
8	64	>64	>32	>32	64	16	128	>8	>16	IMP-1
9	>128	>64	>32	>32	64	>32	64	>8	>16	IMP-1
10	64	>64	>32	>32	32	32	>128	>8	>16	IMP-1
11	128	2	32	32	64	8	32	>8	>16	—
12	128	4	32	32	64	8	32	>8	>16	—
13	>128	>64	>32	>32	64	>32	32	>8	>16	IMP-1
14	>128	>64	>32	>32	64	>32	32	>8	>16	IMP-1
15	>128	>64	>32	>32	>64	8	64	>8	>16	—
16	>128	>64	>32	>32	64	>32	32	>8	>16	IMP-1
17	>128	>64	>32	>32	64	>32	32	>8	>16	IMP-1
18	128	2	32	>32	64	8	32	>8	>16	—
19	>128	4	32	>32	64	8	32	>8	>16	—
20	>128	>64	32	16	>64	>32	128	>8	>16	—
21	>128	4	32	>32	64	8	32	>8	>16	—
22	128	>64	>32	>32	32	32	>128	>8	>16	IMP-1

a) メタロ-β-ラクタマーゼ非産生株

検出状況においては2004年から2007年にかけて0.9%から2.5%へと増加傾向が認められたが、2008年は2.4%で前年と同率であった。MBL産生菌は2004年には分離されていないものの、2005年以降は認められ、0.8%から1.6%分離されていた。

2. MBL産生性および各種薬剤のMIC測定成績

MBL産生性(遺伝子型)および各種薬剤のMIC測定成績を表1に示す。

SMAディスクを用いたMBL産生菌のスクリーニングで22株中12株が陽性となり、PCR法によるMBL遺伝子の検討では、12株すべてから *bla*_{IMP-1}

group 遺伝子が検出された。CAZ 耐性で MBL 産生菌のスクリーニング陰性となった 4 株は *bla*_{IMP-1} group 遺伝子は検出されなかった。

MBL 陽性の 12 株および MBL 陰性の 10 株における MIC 分布の比較では、CAZ を除く 8 薬剤で大きな違いは認められなかった。しかし、CAZ においては MBL 陽性株はすべて 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で、MBL 陰性株は 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上と明らかに違いが認められた。

そこで、MBL 陰性株を CAZ 耐性の 4 株と CAZ 感性の 6 株の 2 グループに分け、MBL 陽性 12 株を含めた三つのグループで比較検討を行った。

3. FIC index の算出法

FIC index の算出は、BC-Plate パネルで未発育の薬剤の組合せがある場合を対象とし、単剤で MIC 値が >32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合は 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を単独時のその薬剤の MIC 値として対応した。なお、すべて発育の認められた組合せの場合は、判定不能として、また、CAZ に感性を示す 6 株については、CAZ の併用効果については判定を行っていない (表 2)。

4. 併用効果の成績

AMK と他の薬剤での併用効果が確認されたため、MEPM, CAZ, PIPC, AZT, CPFYX の 5 薬剤との併用効果について検討した。いずれかの組合せで併用効果が認められたのは 15 株でその内訳は、MBL 産生株では 8 株、CAZ 耐性株では 4 株、CAZ 感性株では 3 株であった。

三つのグループごとに集計した併用効果の結果を表 3 に示す。MBL 産生株においては AZT、次いで PIPC で併用効果が認められていた。MBL 陰性の CAZ 耐性株では MEPM, CAZ, PIPC では 4 株中 3 株で、AZT, CPFYX では 4 株中 2 株で併用効果が認められていたが、CAZ 感性株では AZT の 6 株中 3 株に併用効果が認められたものの、他の薬剤においては併用効果が期待できない成績であった。

考 察

今回、対象期間とした 2004 年から 2008 年の間に分離された MDRP は 22 株認められ、分離率は 0.9% から 2.5% であった。長沢⁶⁾による全国 79 施設での結果分離状況は 2004 年 3.5%、2005 年 2.5% であり、

表 2. AMK と各種薬剤の相乗効果 (FIC index)

No.	MEPM+AMK	CAZ+AMK	PIPC+AMK	AZT+AMK	CPFYX+AMK	メタロ (遺伝子型)
1	0.56	0.625	0.52	0.63	0.63	
2	0.56	0.625	0.52	0.63	0.63	
3	— ^{a)}	—	0.38	0.63	—	IMP-1
4	—	—	1	0.75	—	IMP-1
5	—	—	—	—	—	IMP-1
6	1	S ^{b)}	0.75	0.75	—	
7	—	—	—	—	—	IMP-1
8	—	—	—	—	—	IMP-1
9	—	—	—	—	—	IMP-1
10	—	—	—	0.38	—	IMP-1
11	1.25	S	1.03	1.06	1.06	
12	1.25	S	1.03	1.06	1.13	
13	1.06	0.53	0.52	0.56	0.56	IMP-1
14	0.56	0.53	0.52	0.56	0.56	IMP-1
15	—	0.53	—	—	—	
16	1.06	1.03	1.02	0.63	1.06	IMP-1
17	1.06	1.03	0.52	0.56	1.06	IMP-1
18	1.06	S	0.56	0.56	0.63	
19	1.06	S	1.02	0.63	1.13	
20	0.37	—	0.16	—	—	
21	1.06	S	1.02	1.06	1.06	
22	—	—	—	0.37	—	IMP-1

a) 判定不能

b) CAZ 感性

表3. 各種薬剤の AMK との併用効果率

種 類	MEPM	CAZ	PIPC	AZT	CPFX
メタロ陽性 (12株)	8.3	16.7	41.7	66.6	16.7
CAZ 耐性 (4株)	75.0	75.0	75.0	50.0	50.0
CAZ 感性 (6株)	16.7	—	33.3	50.0	16.7

同年での比較では、当院のほうが低率であった。当院では2006年以降増加傾向が確認されていることより、全国的なサーベイランスの報告が待たれる。

MDRPの耐性パターンによる分類では、22株中12株(54.5%)がMBL陽性(IMP-1型)であった。MBL陰性株ではCAZの感受性成績で感性6株(27.3%)と耐性4株(18.2%)の2種類に分類された。岡ら⁷⁾はMDRP57株すべてがMBL陽性株と、また福島ら⁸⁾によるとMDRP35株中5株(14.3%)がMBL陽性株、MBL陰性30株中CAZ耐性が5株(14.3%)、CAZ感性が25株(71.4%)と報告しており、2施設とも明らかに当院の分離状況とは異なる成績であり施設間差が大きいことより、今後とも動向に注目していく必要がある。

MDRPに対してMEPM, CAZ, PIPC, AZT, CPFXの5薬剤とAMKにおける併用効果が確認された。最も優れていたのは、AZTとAMKの組合せで59.1%、次いでPIPCの45.5%、MEPM, CPFXの22.7%であった。CAZは単剤で感性を示す6株を除いた16株についての結果になるが、31.3%併用効果が確認された。

BC-Plate法を用いたMDRPに対する併用効果の検討は、Tatedaらによる報告が最初である。Tatedaらは筆者らが使用したAMKの代わりにGMを使用し、12株についてAZT, PIPC, CAZ, IPMの併用効果検討し、GMとAZTで8株、GMとPIPCで5株併用効果が認められたと報告している。GMとAMKの違いはあるものの、アミノグリコシド系薬とAZT, PIPCで併用効果が期待できるという、筆者らと同様な成績であった。また、福島らはE-test配置換え法にて検討し、cefepime (CFPM)とCPFX, AZTとAMKで相乗効果が認められたことを報告している。CFPMとCPFXについては今回検討を行っていないため、筆者らの成績と比較はできないが、AZTとAMKにおいては同様な成績である。

MDRPの耐性機構の一つであるMBLはカルバペネム系薬のみならず、ペニシリン系薬、セフェム系薬にも耐性を示すカルバペネマーゼでAmblerの分類によりClass Bに分類される⁹⁾が、近年KPC型カルバペネマーゼ¹⁰⁾やOXA型カルバペネマーゼ¹¹⁾といったClass A型やClass D型の新しいカルバペネマーゼ産生菌が分離され、各国で報告が散見し世界的規模で広がっている。また、アミノグリコシド修飾酵素が、ある種のキノロン系薬に対しても修飾作用を示すことが報告¹²⁾されるようになり、新しい耐性機構が次々と確認されてきている。今後、*P. aeruginosa*以外の菌種においてもさまざまな耐性機構を同時に獲得することによってカルバペネム系薬、アミノグリコシド系薬、フルオロキノロン系薬すべてに耐性を示す株が増加することが懸念される。当院でも、IPMが32 µg/ml以上、AMKが64 µg/ml以上、CPFXが8 µg/mlのMICを示す*Serratia marcescens*が分離され、MDRPと同様な多剤耐性を示していた(未発表データ)。*S. marcescens*はCLに自然耐性であるため、有効な薬剤は併用効果の測定しなく、CAZとAMK, AZTとAMKで併用効果が確認された。併用効果測定の有用性が実証された症例であった。

以上述べてきたように、今後、多剤耐性菌の増加が懸念され、併用効果を測定する必要があると考えられる。

文 献

- 1) Tsuji, A., I. Kobayashi, T. Oguri, et al. 2005. 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.
- 2) 米山彰子. 2007. MDRP治療の方向性—臨床の立場から—. *臨床と微生物* 34: 137-141.
- 3) Tateda, K., Y. Ishii, T. Matsumoto, et al. 2006. 'Break-point Checkerboard Plate' for screening of appropriate antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scand. J. Infect. Dis.* 38: 268-272.
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement CLSI document M100-S8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- 5) Shibata, N., Y. Doi, K. Yamane, et al. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo-β-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* 41:

- 5407-5413.
- 6) 長沢光章. 2007. 多剤耐性緑膿菌の疫学情報. 臨床と微生物 34: 113-118.
 - 7) 岡 陽子. 2005. 多剤耐性緑膿菌に対する抗菌薬の併用効果. 日本化学療法学会雑誌 53: 476-482.
 - 8) 福島奈央, 棚町千代子, 橋本好司, 他. 2006. 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. 日臨微誌 16: 127-133.
 - 9) 荒川宜親. 2003. 広域β-ラクタム薬耐性に関与するβ-ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関. 日臨微誌 13: 150-161.
 - 10) Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, et al. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents. Chemother. 45: 1151-1161.
 - 11) Donald, H. M., W. Scaife, S. G. Amyes, et al. 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrob. Agents. Chemother. 44: 196-199.
 - 12) Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, et al. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat. Med. 12: 83-88.

Prevalence and Combined Effects of Antibacterial Agents against Clinically Isolated Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains

Hitoshi Miyamoto, Shinobu Murakami, Mitsuharu Murase
Division of Medical Technology, Ehime University Hospital

The effectiveness of antibacterial agents against 22 strains of clinically isolated multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) was measured by the micro-dilution method. The all strains produced Metallo-β-lactamase (MBL), and the IMP-1 gene was detected by the polymerase chain reaction (PCR). The combined effects of antibacterial agents were tested against 22 strains of MDRP selected by the Breakpoint Checkerboard Plate method after evaluation by the fractional inhibitory concentration (FIC) index. The incidence of MDRP was ranged from 0.9 to 2.5% in the last 5 years. Twelve MBL-positive strains were detected in genes for the IMP-1 group by PCR. Six of the other 10 strains were susceptible for CAZ. MDRP showed good susceptibilities to the combination of aztreonam and amikacin in 59.1%. Further studies are needed to find a new effective combination of antimicrobial agents to multi-drug resistant strains.