

[原 著]

多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP)
検出用スクリーニング培地の基礎的検討

川村久美子

名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

(平成 21 年 4 月 1 日, 平成 21 年 10 月 4 日受理)

本報では、既存の緑膿菌選択培地に amikacin (AMK), imipenem/cilastatin (IPM), ciprofloxacin (CPFX) を添加することにより、高感度で特異的な「multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) スクリーニング培地」を作製することを試みた。基礎培地には、自家調整により抗菌薬の添加が可能な CHROMagar™ *Pseudomonas* (以下 CHROMagar) と NAC agar を選択した。基礎培地に添加する抗菌薬 3 剤の至適濃度は受信者動作特性曲線を用いて解析し、それを基に抗菌薬の至適濃度の条件を設定した。CHROM agar は、AMK 1 µg/ml, CPFX 1 µg/ml, IPM 4, 6 および 8 µg/ml の 3 条件 (感度 96.3~100%, 特異度 92.6%), NAC agar は、AMK 12 µg/ml, CPFX 1 µg/ml, IPM 12 および 24 µg/ml の 2 条件 (感度 88.9%, 特異度 96.3~100%) を至適条件として選択した。これら 5 種類のスクリーニング培地の性能は、検出感度、安定性および臨床分離株を用いた感度と特異度により再評価した。その結果、CHROMagar に AMK 1 µg/ml, CPFX 1 µg/ml, IPM 4 および 6 µg/ml を添加した設定が最も優れていた。本培地は、簡便性と迅速性を併せ持つ、安価な MDRP 検出法であり、検査の効率アップにより迅速な臨床診断および病院感染対策にも貢献できるものと考えられた。

Key words: MDRP, スクリーニング培地

序 文

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は、ブドウ糖非発酵性のグラム陰性桿菌で、土壌や水中など自然界に広く生息している¹⁾。通常は弱毒であり、健康人に感染症を発生させることはまれであるが、手術後患者や高齢者など免疫能が低下した易感染者に対しては、肺炎、尿路感染症、菌血症などの日和見感染を引き起こすことが知られている¹⁾。特に、病院内においては、インキュベーターや流しなどの湿潤環境やカテーテルなどのデバイスに容易に定着し、易感染患者に感染症を引き起こすことから病院感染の起因菌としても重要である^{2~4)}。現在、これら緑膿菌感染症における主な治療薬としては、アミノグリコシド系、カルバペネム系

およびフルオロキノロン系抗菌薬が用いられているが、近年、これら抗菌薬 3 剤すべてに対して耐性を獲得した、多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *P. aeruginosa*; MDRP) が検出されるようになり、医療現場において大きな問題となりつつある⁵⁾。

MDRP は、amikacin, imipenem/cilastatin および ciprofloxacin の MIC が、それぞれ ≥ 32 µg/ml, ≥ 16 µg/ml および ≥ 4 µg/ml を示す菌株³⁾であり、1990 年代から本菌によるアウトブレイクが報告されるようになった⁶⁾。その後も複数の医療施設から MDRP による病院感染の報告が相次ぎ、2001 年には最初の死亡事例も報告された⁷⁾。現在、国内における MDRP の検出率は、1 施設当たり 1~3% 程度と推定されているが、年間総報告数は年々増加傾向を示しており⁸⁾、適切な抗菌薬治療の実際および院内環境における MDRP 蔓延防止対策のため、正確かつ迅速な検出が求められている。

一般の微生物検査室においては、菌の分離培養、同定試験および薬剤感受性試験の結果から MDRP として判定されており、材料が提出されてから約 3~4 日

著者連絡先: (〒461-8673) 名古屋市東区大幸南 1-1-20
名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学
専攻 基礎検査学講座 微生物学研究室
川村久美子
TEL: 052-719-3116
FAX: 052-719-1506
E-mail: kumiko@met.nagoya-u.ac.jp

の時間を要している。また、MDRP は感受性株に比べ増殖が遅い傾向にあるため、培養時間を延長しなければならないこともあり、治療の遅れにつながりかねないのが現状である。近年、各種耐性遺伝子を PCR 法にて検出する方法も開発されてはいるが^{9,10}、日常検査として実施している施設は限られている。すでに、同じ病院感染起因菌である methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) や vancomycin-resistant *Enterococcus* においては、迅速検出法としてスクリーニング培地が開発されており、臨床検査における有用性も実証されている^{11~13}。これらスクリーニング培地は材料から直接目的菌のみを検出することができる簡便で優れた迅速検出法であり、日常の微生物検査のみならず、病院感染対策のための環境調査にも用いることができ、その有用性は高い。MDRP の検出においても、このような簡便かつ迅速な検出法の導入が望まれているが、いまだ確立された方法はない。そこで、本研究では、MDRP の迅速検出法の構築を目的とし、既存の緑膿菌選択培地に抗菌薬 3 剤を添加する方法により、高感度で特異的な「MDRP スクリーニング培地」の作製を試みた。

材料と方法

1. 使用菌株

菌株は、国立感染症研究所より分与された MDRP 29 株および 2007 年 12 月から 2008 年 2 月の間に愛知県下 7 施設より収集した臨床分離 *P. aeruginosa* 93 株を対象とした。基礎培地の選択性の検討には、*Pseudomonas putida* 3 株 (尿由来)、*Stenotrophomonas maltophilia* 3 株 (血液由来)、*Burkholderia cepacia* 3 株 (喀痰由来)、*Achromobacter xylosoxidans* 3 株 (尿由来)、*Acinetobacter baumannii* 3 株 (喀痰由来)、*Serratia marcescens* 3 株 (血液由来)、*Providencia rettgeri* 3 株 (尿由来)、*Enterobacter cloacae* 3 株 (血液由来)、*Klebsiella oxytoca* 3 株 (喀痰由来)、*Escherichia coli* 3 株 (血液由来) を使用した。これら菌株の同定には、API20E および API20NE システム (日本ビオメリュー(株)) を用い、補足試験として、37, 41, 44°C における発育試験および鞭毛染色を実施した。また、各種検討における対照菌株として、*P. aeruginosa* PAO-1 株 (以下 PAO-1) を使用した。

2. 薬剤感受性試験

MIC の測定は、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 勧告法¹⁴ に準拠し、Mueller Hinton (M-H) 培地 (日本ベクトン・ディッキンソン(株)) を用いた寒天平板希釈法および微量液体希釈法にて行っ

た。薬剤は、amikacin (AMK) (和光純薬工業(株))、imipenem/cilastatin (IPM) (萬有製薬(株))、ciprofloxacin (CPFX) (第一三共(株)) の 3 剤を使用した。

3. MDRP スクリーニング培地作製のための基礎培地の選択

MDRP スクリーニング培地の基礎培地として、自家調整により抗菌薬の添加が可能な緑膿菌選択培地である NAC agar (栄研化学(株)) および CHROM agarTM *Pseudomonas* (以下 CHROM agar) (関東化学(株)) を選択し、それらの他菌種における選択性ならびに検出感度について比較検討した。はじめに選択性については、緑膿菌を含むグラム陰性桿菌 11 種類を McFarland No. 0.5 ($1\sim 9 \times 10^8$ CFU/ml) に調整した後、その 10 μ l を 2 種類の選択培地に接種し、37°C、一夜培養後の発育の有無を観察した。次に McFarland No. 0.5 の菌液を滅菌生食水にて正確に希釈し、 $10^2\sim 10^6$ CFU/ml の 5 段階希釈系列を作製した。これらを 2 種類の緑膿菌選択培地および M-H 寒天培地に 50 μ l ずつ接種し、コンラージ棒にて培地全体に塗抹後 37°C にて一夜培養した。翌日発育した培地上のコロニー数から、各培地の検出感度を比較した。なお、選択性の検討には、各菌種 3 株を、検出感度の比較については、菌株による発育速度の違いを考慮して MDRP 5 株を使用した。また、選択培地での発育の有無および培地上のコロニー数については、48 時間後まで観察を続け、発育に変化が認められた場合には 48 時間後の結果を採用した。これらの実験は、すべて異なる日に 2 回ずつ実施した。

4. Break-point Checkerboard Plate 法による抗菌薬の相乗効果の判定

MDRP スクリーニング培地に添加する抗菌薬 3 剤間の相乗効果の有無について、Break-point Checkerboard Plate 法を用いて検討した。菌株は耐性度が異なる MDRP 4 株ならびに PAO-1 を用い、抗菌薬は AMK, IPM, CPFX の 3 剤を使用した。方法は Tateda らの方法¹⁵ に従い、以下のように実施した。はじめに各使用菌株の MIC を微量液体希釈法にて測定し、得られた MIC をもとに M-H プロスにて各抗菌薬の 4 濃度希釈系列 ($1/4\text{MIC} \cdot 1/2\text{MIC} \cdot 1 \times \text{MIC} \cdot 2 \times \text{MIC}$) を作製した。各種抗菌薬を含む M-H プロスを 96 穴プレートに 100 μ l ずつ分注し、2 薬剤 (IPM と AMK, AMK と CPFX, CPFX と IPM) を組み合わせた Checkerboard Plate を作製した。次に $1\sim 9 \times 10^7$ CFU/ml に濃度調整した菌液を各ウエルに 10 μ l ずつ接種し、37°C にて一夜培養し、翌日、接種した菌の増殖の有無を判定した。結果の判定は、元の MIC より

も2管以上感受性化した場合を「相乗効果あり」とした。なお、菌株による発育速度の違いを考慮し、48時間後に再度発育の有無を観察し、発育が認められた場合には48時間後の結果を採用した。また、これらの実験は、異なる日に2回実施した。

5. 各種抗菌薬の至適添加濃度の検討

基礎培地に添加する抗菌薬3剤の至適濃度の決定には、感度と特異度の変化を可視化することができる受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic curve; ROC 曲線)^{16~18)}を用いた。はじめに、実験1として AMK 0.5~64 $\mu\text{g/ml}$, IPM 0.5~32 $\mu\text{g/ml}$, CPFX 0.5~8 $\mu\text{g/ml}$ の間で2段階希釈系列を作製し、各々を基礎培地 NAC agar および CHROM agar に添加して、それぞれ280種類のスクリーニング培地を作製した。菌株は、マイクロプランター ((株) 佐久間製作所) による1回の接種菌数 (27株分) を考慮し、non-MDRP 90株の中から27株を、MDRP 29株の中から27株を選択した。これら菌株を $1\sim 9\times 10^7$ CFU/ml に濃度調整した後、マイクロプランターを用い10 μl ずつ各スクリーニング培地に接種し、培養後の発育の有無を判定した。判定は、18時間後および40時間後の2回行い、得られた結果から各薬剤濃度における感度 (スクリーニング培地に発育した菌株数/MDRP 27株) および特異度 (スクリーニング培地に発育しなかった菌株数/non-MDRP 27株) を算出した。次に、実験1において、0.7 (百分率では70%) 以上の感度および特異度が得られた薬剤濃度について、さらに細かい間隔で濃度設定を行い、実験2を実施した。具体的には、NAC agar は、AMK 4, 8, 12, 16 $\mu\text{g/ml}$, IPM 12, 24, 36, 48, 64 $\mu\text{g/ml}$, CPFX 1, 2 $\mu\text{g/ml}$ を組み合わせた40種類のスクリーニング培地を、CHROM agar では、AMK 0.5, 1, 1.5, 2 $\mu\text{g/ml}$, IPM 2, 4, 6, 8, 12 $\mu\text{g/ml}$, CPFX 1, 2 $\mu\text{g/ml}$ を組み合わせた40種類のスクリーニング培地を作製し、non-MDRP 27株およびMDRP 27株を用いて追加測定を行った。これら2つの実験で感度および特異度が0.5 (百分率では50%) 以上を示した条件について、縦軸に感度、横軸に偽陽性率 (曲線の作製には1から特異度を減じた数値を使用) をプロットしたグラフを作製し、得られたROC曲線がグラフの交点である感度1.0 (百分率では100%)、偽陽性0 (百分率では0%) に限りなく近くなる抗菌薬濃度の組み合わせをMDRPスクリーニング培地の至適濃度とした。なお、実験1は1回のみ測定したが、実験2については、2段階希釈系列よりもさらに細かい濃度間隔であるため、異なる日に3回測定を行い、実験の再現性を確認したうえ

で、平均値を用いて感度と特異度の算出を行った。

6. MDRP スクリーニング培地の評価

ROC 曲線の結果より得られた至適薬剤濃度に基づき、基礎培地 NAC agar ベースのスクリーニング培地2種類およびCHROM agar ベースのスクリーニング培地3種類を作製した。これらスクリーニング培地の性能を、検出感度、臨床分離緑膿菌93株およびMDRP29株における感度と特異度、さらに培地の安定性から再評価した。はじめに、5種類のスクリーニング培地およびM-H寒天培地に、 $10^2\sim 10^6$ CFU/ml の5濃度に調整した菌液を50 μl ずつ接種し、コンラージ棒にて培地全体に塗抹した後、37°C にて一夜培養した。翌日培地上に発育したコロニー数を数え、各培地の検出感度を比較した。次に $1\sim 9\times 10^7$ CFU/ml に濃度調整した臨床分離緑膿菌93株をこれら5種類のスクリーニング培地に10 μl ずつ接種し、一夜培養後の発育の有無から、各スクリーニング培地の感度および特異度を算出した。

また、同様に作製したスクリーニング培地5種類を、1日、1, 2, 3, 4週間4°C にて保存し、各保存期間の最終日に $1\sim 9\times 10^7$ CFU/ml に濃度調整したnon-MDRP 27株およびMDRP 27株を、マイクロプランターを用いて10 μl ずつ接種し、37°C 一夜培養後の発育の有無を判定した。得られた結果から、各保存期間における培地の感度および特異度を算出し、それぞれの変動を比較した。

なお、検出感度の比較は、菌株による発育速度の違いを考慮してMDRP 5株を用いて行った。また、選択培地での発育の有無および培地上のコロニー数については、48時間後に再度観察し、発育に変化が認められた場合には48時間後の結果を採用した。これらの実験はすべて異なる日に2回ずつ実施した。

結 果

1. non-MDRP 株の選択

臨床分離緑膿菌93株に対するIPM, AMK およびCPFXのMICを寒天平板希釈法にて測定した結果、3剤すべてに感受性を示した株は53株 (57.0%)、1剤にのみ耐性を示した株はIPM耐性17株およびCPFX耐性2株の計19株 (20.5%)、2剤に耐性を示した株は、IPMおよびAMK耐性1株、IPMおよびCPFX耐性17株の計18株 (19.4%) であった (Table 1)。今回はこの臨床分離株における耐性パターン (population) を参考に、スクリーニング培地の条件設定および培地の性能評価に用いるnon-MDRPの選択を行った。93株の中から、3剤すべてに感受性の株

Table 1. Resistant rate of 93 clinically isolated *P. aeruginosa* for three antimicrobial agents

	Antimicrobial agents	Number of isolates	Resistant rate (%)
Susceptibility		53	57.0
1 drug-resistance	AMK	0	0.0
	IPM	17	18.3
	CPFX	2	2.2
2 drug-resistance	AMK, IPM	1	1.1
	AMK, CPFX	0	0.0
	IPM, CPFX	17	18.3
3 drug-resistance	AMK, IPM, CPFX	3	3.2

を 15 株, 1 剤のみ耐性の株を 6 株, 2 剤耐性の株を 6 株の計 27 株を, ランダムに選択し non-MDRP とした。MDRP については, 93 株中 3 株 (3.2%) という割合であったが, スクリーニング培地の性能についてより多くの情報 (菌株による発育速度の差の影響など) を得るため, non-MDRP と同数の 27 株 (国立感染症研究所から分与) を検討に用いることとした。

2. スクリーニング培地作製のための基礎培地の選択

緑膿菌を含むグラム陰性桿菌 (腸内細菌科 5 種類, ブドウ糖非発酵菌 6 種類) を 2 種類の選択培地に接種し, 各培地の選択性を比較検討した。Table 2 に示すように, CHROM agar には緑膿菌のほかに, ブドウ糖非発酵菌である *P. putida*, *S. maltophilia*, 腸内細菌科である *S. marcescens*, *P. rettgeri*, *E. cloacae*, *E. coli* など多くの菌種が発育した。一方, NAC agar では *B. cepacia*, *S. marcescens*, *E. cloacae* の発育が認められたものの, CHROM agar よりも良好な選択性を示した (Table 2)。

2 種類の選択培地の検出感度を比較すると, NAC

Table 2. Selective ability of two selective media for detecting *P. aeruginosa*

Bacteria ^{a)}	CHROM agar	NAC agar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3)	+	+
<i>Pseudomonas putida</i> (3)	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (3)	+	-
<i>Burkholderia cepacia</i> (3)	-	± ^{b)}
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (3)	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (3)	-	-
<i>Serratia marcescens</i> (3)	+	±
<i>Providencia rettgeri</i> (3)	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (3)	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> (3)	-	-
<i>Escherichia coli</i> (3)	+	-

+, All of three isolates grew on the selective media; -, None of three isolates grew on the selective media.

^{a)} Values in parentheses indicate number of isolates tested.

^{b)} Plus minus (±) indicates that one of three isolates was positive and the other isolates were negative.

agar は緑膿菌検出のために 10^3 CFU/ml 以上の菌量が必要であったが, CHROM agar は 100 CFU/ml 以下の微量の緑膿菌を検出することが可能であった (Table 3)。

3. Break-point Checkerboard Plate 法による抗菌薬の相乗効果の判定

MDRP スクリーニング培地に添加する抗菌薬間の相乗効果の有無を Break-point Checkerboard Plate 法にて調べた。1 剤のみ作用させたときの MIC に比べ, 2 剤を同時に作用させた場合で 1 管低値になるものもみられたが, 2 管以上感受性化した薬剤の組み合わせは認められず, 今回調べた 3 薬剤の間での相乗効果はないと判定した。

Table 3. The detection limit of non-MDRP isolates on two selective media for detecting *P. aeruginosa* ($n=5$)

Medium	Growth of following dilution (No. of colonies) ^{a)} :				
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Mueller-Hinton agar	##	##	##	##	+(80)
CHROM agar	##	##	##	+(680)	+(60)
NAC agar	##	+(570)	+(76)	+(2)	-

-, no growth; +, less than 99 colonies; #, 100-999 colonies; ##, more than 1,000 colonies.

^{a)} Values in parentheses indicate mean number of colonies calculated from the results of five isolates.

4. 各種抗菌薬の至適添加濃度の検討

MDRP スクリーニング培地に添加する抗菌薬の至適濃度の組み合わせを ROC 曲線にて解析した。感度、特異度ともに良好な抗菌薬濃度の組み合わせは、NAC agar を基礎培地とした場合には、AMK 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、CPFX 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、IPM が 12 および 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 2 条件 (感度 88.9%, 特異度 96.3~100%), CHROM agar を基礎培地とした場合には、AMK 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、CPFX 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、IPM 4, 6 および 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 3 条件 (感度 96.3~100%, 特異度 92.6%) であった (Fig. 1)。いずれの場合も MDRP の判断基準よりも低い濃度となり、特に CHROM agar を基礎培地としたスクリーニング培地ではその傾向が著明であった。

5. MDRP スクリーニング培地の評価

5.1. MDRP スクリーニング培地の検出感度

ROC 解析により得られた結果に基づき、5 種類の MDRP スクリーニング培地を試作し、それらの検出感度を比較した。CHROM agar を基礎培地としたスクリーニング培地では約 300 CFU/ml 程度の少量菌の検出も可能であり、なかでも AMK 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、CPFX 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、IPM 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む培地の検出能が優れていた。一方、NAC agar を基礎培地としたスクリーニング培地では、いずれの条件も MDRP 検出のために 10^3 CFU/ml 以上の菌量を必要とした (Table 4)。

5.2. 臨床分離緑膿菌における感度および特異度

5 種類の MDRP スクリーニング培地に MDRP 29 株および臨床分離緑膿菌 93 株 (MDRP 3 株, non-

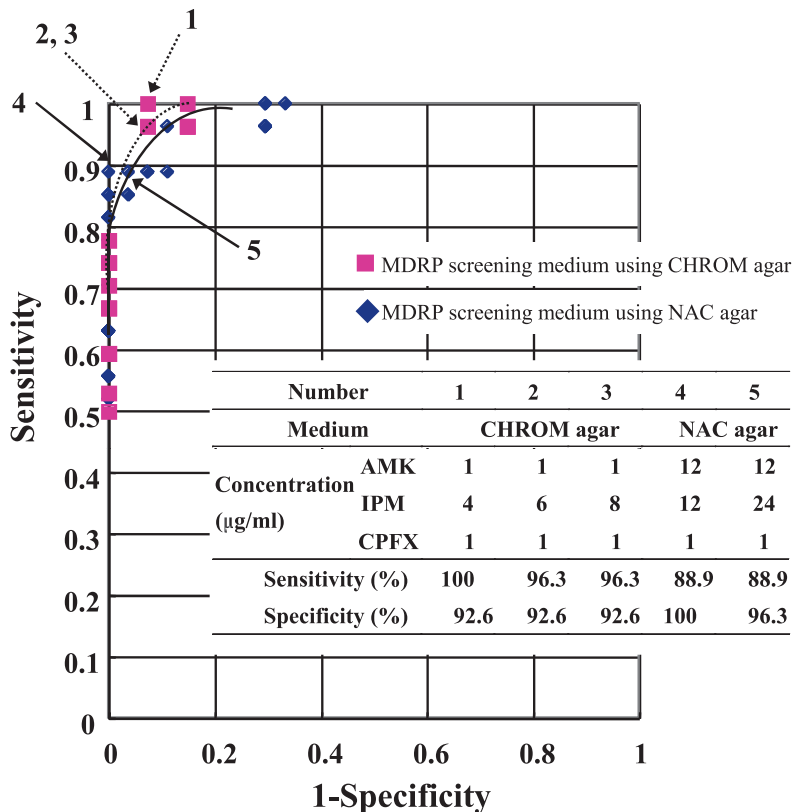


Fig. 1. Analysis of the optimal concentrations of the antimicrobial agents by ROC curve.

MDRP screening media were prepared by adding various combinations of antimicrobial agents into the CHROM or NAC agar. Then, the optimal concentrations of the three antimicrobial agents added to the media were determined using a ROC curve.

Abbreviations: ROC, receiver operating characteristic; IPM, imipenem/cilastatin; AMK, amikacin; CPFX, ciprofloxacin.

MDRP 90 株) を接種し, MDRP を正確に検出する
かを検討した。MDRP 検出の特異性については,
CHROM agar (特異度 97.8%) および NAC agar (特
異度 98.9~100%) とともに良好な結果を得たが, 感
度については, NAC agar (感度 90.6%) よりも
CHROM agar (感度 96.9~100%) を基礎培地にした

ほうが優れていた (Table 5)。

5.3. スクリーニング培地の安定性の検討

培地作製後, 1 日, 1, 2, 3, 4 週間保存した MDRP ス
クリーニング培地の感度および特異度を見ると, わず
かに低下が認められるものの, 今回検討した 4 週間ま
ではほぼ安定であることが証明された (Table 6)。

Table 4. Detection limit of MDRP isolates on each MDRP screening medium

(n=5)

Medium	Antimicrobial agents ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			Growth of following dilution (No. of colonies) ^{b)} :		
	AMK	IPM	CPFX	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Mueller-Hinton agar	0	0	0	##	##	+(280)
	1	4	1	##	##	+(30-250)
CHROM agar ^{a)}	1	6	1	##	##	+(20-250)
	1	8	1	##	+(400-950)	+(20-90)
NAC agar ^{a)}	12	12	1	+(50-410)	+(2-50)	-
	12	24	1	+(200-700)	+(0-40)	-

-, no growth; +, less than 99 colonies; #, 100-999 colonies; ##, more than 1,000 colonies.

^{a)} The MDRP screening medium was prepared by adding various combinations of three antimicrobial agents into the CHROM agar or NAC agar.

^{b)} Values in parentheses indicate number of colonies calculated from the results of five isolates.

Table 5. Sensitivity and specificity of each MDRP screening medium in 32 MDRP and 90 non-MDRP isolates

Medium	Antimicrobial agents ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			Positive culture/MDRP ^{a)} (%Sensitivity)	Negative culture/non- MDRP (%Specificity)
	AMK	IPM	CPFX		
CHROM agar	1	4	1	32/32 (100)	88/90 (97.8)
	1	6	1	31/32 (96.9)	88/90 (97.8)
	1	8	1	31/32 (96.9)	88/90 (97.8)
NAC agar	12	12	1	29/32 (90.6)	90/90 (100)
	12	24	1	29/32 (90.6)	89/90 (98.9)

^{a)} MDRP isolates include 29 MDRP isolates distributed from National Institute of Infectious Diseases and 3 MDRP isolates selected from 93 clinical isolates collected in the present study.

Table 6. Examination of the stability of each MDRP screening medium

(a) NAC agar

Preserved period	Medium 1		Medium 2	
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
1 day	88.9	100	85.2	100
1 week	92.6	88.5	88.9	100
2 weeks	96.3	100	88.9	100
3 weeks	92.3	100	85.2	100
4 weeks	96.3	100	88.9	100

Medium 1, AMK 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, IPM 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CPFX 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Medium 2, AMK 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, IPM 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CPFX 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

(b) CHROM agar

Preserved period	Medium 1		Medium 2		Medium 3	
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
1 day	92.6	92.3	96.3	92.3	96.3	92.3
1 week	96.3	100	96.3	100	85.2	100
2 weeks	96.3	92.6	88.9	88.9	88.9	88.9
3 weeks	96.3	96.3	96.3	92.6	96.3	96.3
4 weeks	92.6	96.3	92.6	92.6	92.6	92.6

Medium 1, AMK 1 $\mu\text{g/ml}$, IPM 4 $\mu\text{g/ml}$, CPFY 1 $\mu\text{g/ml}$; Medium 2, AMK 1 $\mu\text{g/ml}$, IPM 6 $\mu\text{g/ml}$, CPFY 1 $\mu\text{g/ml}$; Medium 3, AMK 1 $\mu\text{g/ml}$, IPM 8 $\mu\text{g/ml}$, CPFY 1 $\mu\text{g/ml}$.

考 察

我が国の医療機関では、薬剤耐性菌による病院感染事例が相次いで発生しており、臨床の現場では耐性菌を早期に発見し、対策を講じることが最優先課題となっている。なかでも、MDRP については、数年前より大学附属病院などの特定機能病院における集団感染事例が相次いで報告されており、感染症の実態や動向の把握がますます重要になってきている。このような状況を踏まえ、臨床検査における MDRP 迅速検出法の確立が急務と考え、微生物検査室でも作製可能な「MDRP スクリーニング培地」の構築を試みた。

優れたスクリーニング培地の条件として高感度と高特異度であることが挙げられるが¹²⁾、MDRP スクリーニング培地を作製する場合、基礎培地の選択性および検出感度がそれらを左右する要因の一つと考えられた。検出感度においては、CHROM agar のほうが NAC agar よりも優れていたが、複数の腸内細菌科菌種も発育するなどその選択性には若干問題が残った。一方、NAC agar は優れた選択性を示し、腸内細菌科菌種を含むグラム陰性桿菌を強く抑制したが、反面、緑膿菌自身も抑制され、検出感度は著しく低値となった。このように選択培地の種類によって検出感度および選択性に相違が認められることは、これまで報告されていないが、おそらく培地に含まれる選択剤の種類およびその量が影響するものと考えられた。今回検討した CHROM agar および NAC agar については、選択性や検出感度に各々問題を有していたが、添加する抗菌薬濃度の最適化により、スクリーニング培地として十分な感度と特異度が得られるよう工夫することにした。

基礎培地の成分が抗菌薬活性に影響を及ぼすことは Ike ら¹⁶⁾ が明らかにしている。今回は緑膿菌選択培地を基礎培地とするため、MDRP の判定基準をそのまま添加濃度として適応することはできず、新たに濃度

設定をしなければならなかった。ROC 曲線に基づく至適濃度の解析の結果、基礎培地が CHROM agar の場合には、AMK 1 $\mu\text{g/ml}$ 、CPFY 1 $\mu\text{g/ml}$ 、IPM 4、6 および 8 $\mu\text{g/ml}$ の 3 条件が、NAC agar の場合には、AMK 12 $\mu\text{g/ml}$ 、CPFY 1 $\mu\text{g/ml}$ 、IPM 12 および 24 $\mu\text{g/ml}$ の 2 条件が至適条件と思われた。興味あることに、CHROM agar を用いた場合の抗菌薬の至適濃度は、MDRP の判定基準値 (AMK $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ 、IPM $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ 、CPFY $\geq 4 \mu\text{g/ml}$) よりも、はるかに低い濃度となった。今回のように複数の抗菌薬を添加する際には抗菌薬間の相乗効果を考えなければならないが、Break-point Checkerboard Plate 法による検討では、AMK、IPM、CPFY の 3 薬剤間に相乗効果は認められず、これらの結果は Tateda¹⁵⁾ や Cappelletty らの報告²⁰⁾ と一致していた。おそらく、緑膿菌選択培地に含まれる選択剤と抗菌薬が相互に作用し、抗菌薬の殺菌力が増強された可能性が考えられるが、CHROM agar の場合、すべての培地成分が明らかにされているわけではないため、詳細は不明である。

ROC 解析の結果選択された条件に基づいて、5 種類の MDRP スクリーニング培地を試作し、それらの性能を再評価した。MDRP 29 株および臨床分離緑膿菌 93 株 (MDRP3 株、non-MDRP 90 株) における MDRP の検出では、いずれの培地も感度 90% 以上、特異度 97.8% 以上となり、スクリーニング培地として十分満足できる検出能を有していた。また、培地の安定性も作製後 4 週間まで維持されており、これらの結果はすでに臨床的有用性が報告されている MRSA スクリーニング培地と比較しても遜色ない成績であった^{11~13)} しか、検出感度を見ると、NAC agar を基礎培地とした 2 種類の培地では 10³ CFU/ml 以上の MDRP が存在しなければ検出できず、日常検査で使用するには不安が残る結果であった。この検出感度の低さは基礎培地の特性に由来したものであり、条件変

更による改善の余地はないものと思われた。一方、CHROM agar を基礎培地とした場合では、100 CFU/ml 程度の少量の MDRP も検出可能であった。コスト的には、CHROM agar (約 125 円/枚) が NAC agar (約 23 円/1 枚) に比べ、1 枚当たり約 5 倍高価となるが、感度、特異度、検出感度、培地の安定性から総合的に判断して、AMK 1 µg/ml, IPM 4 および 6 µg/ml, CPFY 1 µg/ml の条件が、現時点での最適条件であると判断した。

添加薬剤の至適濃度を設定するに当たり、臨床化学分野でスクリーニング検査の評価や検査法の比較に用いられている ROC 曲線^{17~19)}を使用した。これまで微生物学分野で ROC 曲線を用いた報告はなく、初の試みではあるが、今回は添加薬剤が 3 剤であることから、一度に多くの組み合わせを比較する必要があり、感度と特異度の変化を視覚化できる本解析法の使用が適当ではないかと考えたためである。しかし、本解析法の適応には課題もあり、それらを念頭においた結果の解釈とさらなる検討が必要である。一つめの課題は、MDRP の判定 (MDRP の定義であり基準法となるもの) と新規検出法 (MDRP スクリーニング培地) がともに MIC 値を検出基準にしていることである。新規の検出法を評価する際には、どのような方法を基準法 (golden standard) にするかが重要である。例えば、MRSA スクリーニング培地を検討する際、PCR 法による「*mecA* 遺伝子の検出」が国際的 golden standard となっているように、本来は目的とする耐性菌の「決定遺伝子の検出」を基準法とし、できれば、新規検出法と基準法が異なる検出基準を用いていることが望ましい。しかしながら、MDRP の場合には、その耐性機序が複雑であることから、検出すべき特定の耐性遺伝子は定められておらず、AMK, IPM および CPFY の MIC による判定を基準法としなければならなかった。今回検討した MDRP スクリーニング培地も基準法と同じ薬剤を用いていることから、双方の比較は系統誤差などによる影響も受けやすく、慎重に結果を評価しなければならない。本年 7 月、多剤耐性 *A. baumannii* 検出用 CHROMagar の検討結果が報告され²¹⁾、OXA-23, -24, -51-like, -58-like 遺伝子との比較が示された。MDRP スクリーニング培地においても、さまざまな耐性機序を有する MDRP 株を用いて、培地の性能およびその有用性についてさらに検証する必要がある。

二つめの課題は、ROC 解析が対象とする集団の population に影響されやすいことである。本研究では、実際の臨床分離株における薬剤耐性パターンを意

識した population の選択を心がけたつもりであるが、さらに正確な評価を行うためには、病院感染起因菌として高頻度に検出される薬剤耐性 *S. marcescens* や多剤耐性 *Pseudomonas* 属菌も含めた大規模 population における感度および特異度を検討する必要がある。

本研究では MDRP 迅速検出法として、微生物検査室でも作製可能な「MDRP スクリーニング培地」の条件を示した。本培地は、active surveillance として糞便からの MDRP 検出や環境調査において有用性が高く、従来法と比べ検査コストの削減にも貢献できるものと思われる。平成 18 年 10 月の厚生労働省の院内感染対策サーベイランス事業による集計では、緑膿菌分離総数あたり MDRP は 2.7% 分離されており、今後 MDRP が増加することが懸念されている。その予防のためにも医療現場における一刻も早い MDRP スクリーニング培地の完成と導入が望まれる。

謝 辞 本研究を遂行するにあたり、検査法の解析についてご指導賜りました名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻 基礎検査学講座 (環境病因解析学部門) 准教授・近藤高明先生に感謝申し上げます。また、菌株の分与を賜りました国立感染症研究所細菌第二部部长・荒川宜親先生、安城更生病院・犬塚和久先生、亀井純子先生、一宮市立市民病・土屋洋子先生、岡崎市民病院・堀 光弘先生、笹野正明先生、公立陶生病院・大塚由美子先生、国立長寿医療センター・柘植 仁先生、豊橋市民病院・山口育男先生、名古屋液済会病院・青木隆恵先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Gomez, M. I., A. Prince. 2007. Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7: 244-251.
- 2) Kikuchi, T., G. Nagashima, K. Taguchi, et al. 2007. Contaminated oral incubation equipment associated with an outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas* in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 65: 54-57.
- 3) Sekiguchi, J., T. Asagi, T. Miyoshi-Akiyama, et al. 2007. Outbreaks of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 45: 979-989.
- 4) Galanos, C., M. A. Freudenberg, W. Reutter. 1979. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 5939-5943.
- 5) 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.
- 6) Livermore, D. M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* 34: 634–640.
 - 7) Sekiguchi, J., T. Asagi, T. Miyoshi-Akiyama, et al. 2005. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain that caused an outbreak in a neurosurgery ward and its *aac(6′)-Iae* gene cassette encoding a novel aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3734–3742.
 - 8) Kirikae, T., Y. Mizuguchi, Y. Arakawa. 2008. Investigation of isolation rates of *Pseudomonas aeruginosa* with and without multidrug resistance in medical facilities and clinical laboratories in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 612–615.
 - 9) Ohara, M., S. Kouda, M. Onodera, et al. 2007. Molecular characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Hiroshima, Japan. *Microbiol. Immunol.* 51: 271–277.
 - 10) Shibata, N., Y. Doi, K. Yamane, et al. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5407–5413.
 - 11) Kluytmans, J., A. van Griethuysen, P. Willems, et al. 2002. Performance of CHROM agar selective medium and oxacillin resistance screening agar base for identifying *Staphylococcus aureus* and detecting methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2480–2482.
 - 12) Nahimana, I., P. Francioli, D. S. Blanc. 2006. Evaluation of three chromogenic media (MRSA-ID, MRSA-Select and CHROM agar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 1168–1174.
 - 13) Flayhart, D., J. F. Hindler, D. A. Bruckner, et al. 2005. Multicenter evaluation of BBL CHROM agar MRSA medium for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surveillance cultures of the anterior nares. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5536–5540.
 - 14) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance and standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeen informational supplement. Document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 - 15) Tateda, K., Y. Ishii, T. Matsumoto. 2006. 'Breakpoint Checkerboard Plate' for screening of appropriate antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scand. J. Infect. Dis.* 38: 268–272.
 - 16) Ike, Y., Y. Arakawa, X. Ma, et al. 2001. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4445–4451.
 - 17) 正井栄一. 2007. 条件付き確率. p. 56–58, 医学・保健学のためのやさしい統計学 (改訂第2版), 金原出版, 東京.
 - 18) 白石順二. 2001. 初学者のための失敗しないROC解析法入門 (Vol. 1). 医用画像情報学会雑誌 18: 93–103.
 - 19) 白石順二. 2001. 初学者のための失敗しないROC解析法入門 (Vol. 2). 医用画像情報学会雑誌 18: 154–167.
 - 20) Cappelletty, D. M., M. J. Rybak. 1996. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 677–683.
 - 21) Gordon, N. C., D. W. Wareham. 2009. Evaluation of CHROMagar *Acinetobacter* for the detection of enteric carriage of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in critically III patients. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2249–2251.

New Screening Medium Developed for Detecting Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Kumiko Kawamura

Department of Medical Technology, Nagoya University School of Health Science

Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) is responsible for severe nosocomial infections, and rapid and accurate methods to detect such strains are needed. We developed a new MDRP screening medium by incorporation of three antimicrobial agents, amikacin (AMK), imipenem/cilastatin (IPM) and ciprofloxacin (CPFX), into selective mediums for the detection of *Pseudomonas* species such as CHROMagar™ *Pseudomonas* (CHROMagar) and NAC agar. The optimal concentrations of the three antimicrobial agents added to the selective mediums were determined using a receiver operating characteristic (ROC) curve. As the result, three kinds of CHROMagar with 1 µg/ml of AMK, 4, 6 or 8 µg/ml of IPM and 1 µg/ml of CPFX (sensitivity of 88.9% and specificity of 96.3–100%, respectively), and two kinds of NAC agar with 12 µg/ml of AMK, 12 or 24 µg/ml of IPM and 1 µg/ml of CPFX (sensitivity of 96.3–100%, respectively, and specificity of 92.6%), were selected as the optimal conditions for the detection of clinical MDRP isolates. The MDRP screening mediums based on the five conditions selected by ROC analysis were evaluated, and CHROMagar with 1 µg/ml of AMK, 4 and 6 µg/ml of IPM and 1 µg/ml of CPFX showed the best detection limit (10^3 cfu/ml), sensitivity and specificity among the five conditions. Additionally, the stability of the medium was confirmed until four weeks at 4°C. The MDRP screening medium is a simple, rapid and cost-effective method compared to the conventional methods described in the literature. Thus, the use of the MDRP screening medium would make it possible to detect efficiently MDRP isolates in clinical material.