

[原 著]

多剤耐性緑膿菌の迅速簡易検出法の開発とその評価

横山 覚¹⁾・川村久美子¹⁾・八木哲也²⁾・荒川宜親^{3,4)}¹⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術学専攻 病態解析学講座²⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科 臨床感染統御学³⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学／耐性菌制御学⁴⁾ 国立感染症研究所 細菌第二部

(平成23年11月25日受付, 平成24年5月1日受理)

われわれは既存の緑膿菌選択培地 CHROMagar™ *Pseudomonas* に3種類の抗菌薬 amikacin (AMK), imipenem/cilastatin (IPM), ciprofloxacin (CPF) を添加することにより作製した「multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) スクリーニング培地」を本学会誌に報告した。本研究では、臨床検査における本スクリーニング培地の有用性を確認するため、さまざまなβ-ラクタマーゼ耐性機構を有する7菌種138株を用いて、薬剤添加濃度2条件(条件1; AMK 1 μg/ml, IPM 4 μg/ml, CPF 1 μg/ml および条件2; AMK 1 μg/ml, IPM 6 μg/ml, CPF 1 μg/ml)における培地性能を再評価した。MDRP 47株における本培地の感度は、条件1が80.9%であったのに対し、条件2ではメタロ-β-ラクタマーゼ非産生株の半数近くが偽陰性を示したため70.2%と低くなった。本培地には、MDRP以外に3剤耐性 *Serratia marcescens* (IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株) と KPC型 β-ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* が発育したが、コロニーの色調から MDRP とは容易に判別でき、特異度は両条件とも96%以上と良好であった。感度、特異度に加えて、培地作製後4週間の安定性を確保し、少量菌(約100 CFU/ml)の検出も可能であったことから、条件1で作製したスクリーニング培地のほうが、より有用性が高いと判断した。MDRP スクリーニング培地は、簡便性と迅速性を併せ持つ安価な検出法であり、本法の導入は日常検査のみならず、病院感染対策の効率化にも貢献できるものと考えられる。

Key words: 多剤耐性緑膿菌, 迅速検出法, スクリーニング培地, 病院感染対策

序 文

多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP) は、カルバペネム系、フルオロキノロン系ならびに抗緑膿菌活性を有するアミノグリコシド系の3系統の抗菌薬に対し、広範な耐性を獲得した緑膿菌であり^{1,2)}、本菌による感染症は「薬剤耐性緑膿菌感染症」として五類感染症定点把握疾患に指定されている。国内における本菌の分離状況について

は、厚生労働省の院内感染サーベイランス事業の成績があり³⁾、それによると医療施設で分離される全緑膿菌に占める MDRP の割合は2%以下であり、他の薬剤耐性菌に比べると低い水準にある。しかしながら、一部の医療機関では、大規模なアウトブレイクや死亡事例が発生していることから^{4,5)}、病院感染対策上重要な菌種である。

MDRP が臨床問題となる理由としては、(1) 国内で認可されているほぼすべての抗菌薬の効果が期待できない場合があること、(2) 内毒素エンドトキシンを産生するため、敗血症や肺炎などを引き起こすと死亡する危険性が高いことなどが挙げられ⁶⁾、これらは methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) や vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) とは明らかに異なる点である。また、MDRP はその起源が緑膿菌であるため、湿潤環境に定着しやすい性質を有して

著者連絡先: (〒461-8673) 名古屋市東区大幸南1-1-20

名古屋大学大学院医学系研究科

医療技術学専攻 病態解析学講座

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

おり、抗菌薬や消毒薬を多用する病院環境にいったん定着・蔓延すると完全に排除することは容易ではなく、それを達成するためには多大な労力と経費の浪費を強いられることになる。したがって、各医療機関ではサーベイランスを通じて常にMDRPの分離状況を把握し、アウトブレイクの早期発見に努めるとともに標準予防策や接触感染予防策など適切な蔓延防止対策を講じることが重要となる。

病院感染対策における微生物検査室の役割は、日常検査におけるMDRPの同定、検出状況の把握やアクティブサーベイランスに携わることである。さらにアウトブレイク発生の際には環境調査にも参画するわけであるが、現行の培養検査のみで対応するには、労力およびコスト面での負担が大きく、また迅速性に欠けるなどの問題点がある。われわれはこの問題を解決すべく、既存の選択培地に3種類の抗菌薬を添加することで簡単に作製できる「MDRPスクリーニング培地」を提唱し、薬剤添加濃度2条件（AMK 1 µg/ml, IPM 4もしくは6 µg/ml, CPEX 1 µg/ml）を報告した⁷⁾。今回は、臨床検査における本スクリーニング培地の有用性を確認するため、臨床材料から分離されるさまざまな薬剤耐性菌7菌種138株を用いて、先の2条件の培地性能の再評価を行ったので報告する。

材料と方法

1. 使用菌株

菌株は、*Pseudomonas aeruginosa* 67株、*Stenotrophomonas maltophilia* 25株、*Acinetobacter baumannii* complex 9株、*Burkholderia cepacia* 3株、*Escherichia coli* 13株、*Klebsiella pneumoniae* 5株、*Serratia marcescens* 16株の合計7菌種138株を使用した。なお、今回は臨床材料から分離されるさまざまな薬剤耐性グラム陰性桿菌が本培地の特異性に与える影響を検討することを目的としたため、菌株収集の際にはメタロ-β-ラクタマーゼ（MBL）産生菌、NDM-1型MBL産生菌、CMY型β-ラクタマーゼ産生菌、KPC型β-ラクタマーゼ産生菌、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）産生菌などの薬剤耐性菌が含まれるよう考慮した。収集した菌株については、各施設にて各種β-ラクタマーゼ遺伝子の保有ならびに遺伝子型別が精査されており、その詳細については表1に示す。また、薬剤感受性試験の標準菌株としては、*P. aeruginosa* ATCC 27853株（エアブラウン社）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⁸⁾に準拠し、Mueller-Hinton (M-H) 寒天培地（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にて行った。薬剤は、amikacin (AMK) (Sigma-Aldrich), imipenem/cilastatin (IPM) (万有製薬(株)), ciprofloxacin (CPEX) (第

表1. 使用菌株138株の内訳

菌名(株数)	保有するβ-ラクタマーゼ遺伝子の種類 ^{a)}	株数
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (67)	—	36
	IMP-1 or -2	28
	VIM-1 or -2	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (25)	—	25
	—	3
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (9)	IMP-1	6
	—	3
<i>Burkholderia cepacia</i> (3)	—	3
<i>Escherichia coli</i> (13)	IMP-1	3
	NDM-1	1
	CMY-9	1
	CTX-M (group1, 9)	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)	IMP-1	2
	NDM-1	1
	CMY-9	1
	KPC	1
<i>Serratia marcescens</i> (16)	—	5
	IMP-1	11

a) —はβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有していないことを示す。

一三共(株))の3剤を使用した。

3. MDRPスクリーニング培地の評価

(1) MDRPスクリーニング培地の作製

以前の報告⁷⁾と同様、MDRPスクリーニング培地の基礎培地はCHROMagar™ *Pseudomonas* (以下CHROM agar) (関東化学(株))を使用し、抗菌薬はAMK 1 µg/ml, CPFX 1 µg/ml, IPM 4もしくは6 µg/ml (終濃度)となるよう各々添加した。抗菌薬は毎回用時調整し、培地は作製当日に使用した。なお、判定は培地上に菌が発育し、かつコロニー全体の色調が青色を呈している場合をMDRPとした。

(2) 感度および特異度

菌株は一夜培養したM-H寒天培地上のコロニーを用いてMcFarland No. 0.5 ($1-9 \times 10^8$ CFU/ml)の菌液を調整し、滅菌生食水にて正確に10倍希釈した ($1-9 \times 10^7$ CFU/ml)。その後、調整後の菌液をMDRPスクリーニング培地にマイクロプランター(佐久間製作所)を用いて5 µlずつ接種し、35℃にて一夜培養した。翌日、培地上での菌の発育の有無およびコロニーの色調よりMDRPを判別し、得られた結果から感度および特異度を算出した。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およびコロニーの色の変化を確認し、変化が認められた場合には48時間後の結果を採用した。これらの実験は異なる日に3回実施した。

(3) 最少検出感度の検討

一夜培養したM-H寒天培地上のコロニーを用いてMcFarland No. 0.5の菌液を調整したのち、滅菌生食水にて正確に10倍希釈し、 10^2-10^6 CFU/mlの5段階希釈系列を作成した。これらをMDRPスクリーニング培地および基礎培地CHROM agarに50 µlずつ接種し、コンラージ棒にて培地全体に塗抹後35℃にて一夜培養した。翌日培地上に発育したコロニー数から各培地の最少検出感度を算出した。なお、検出感度の比較については、IMP-1型MBL遺伝子保有株および非保有株の各々2株ずつを使用し、表4にはその平均値を示した。また、培地上での菌の発育の有無およびコロニー数については、48時間後まで観察を続け、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3回ずつ実施した。

(4) MDRPスクリーニング培地の安定性の検討

培地の安定性の検討には、臨床分離株138株の中から耐性機序や菌種の異なる菌株33株(MDRP 10株, non-MDRP 2株(うちMBL産生菌1株)、腸内細菌科菌種13株、ブドウ糖非発酵菌8株(うちMBL産生菌5

株))を使用した。作製したスクリーニング培地を1日、1, 2, 3, 4, 5週間、4℃にて保存し、各保存期間の最終日に $1-9 \times 10^7$ CFU/mlに濃度調整した菌液を、マイクロプランターを用いて5 µlずつ接種した。35℃で18時間培養後、培地上での菌の発育の有無およびコロニーの色調を観察し、得られた結果から各保存期間における感度および特異度を算出し、それぞれの変動を比較した。これらの実験は、すべて異なる日に3回ずつ実施した。

結 果

1. 薬剤感受性傾向による菌株の分類

はじめに、収集した138株すべてを対象にIPM, AMKおよびCPFXのMICを測定し、3剤に対する感受性結果から(1)3剤のうち、いずれか1薬剤に耐性を示す株、(2)いずれか2薬剤に耐性を示す株、(3)3薬剤すべてに耐性を示す株の3種類に分類した。*P. aeruginosa*では、67株中47株が3剤すべてに耐性を示しており、そのMICはMDRPの判定基準(AMK ≥ 32 µg/ml, IMP ≥ 16 µg/mlおよびCPFX ≥ 4 µg/ml)を満たしていた。以下これら47株をMDRP(positive control)、それ以外の20株をnon-MDRP(negative control)として検討に用いた。

2. MDRPスクリーニング培地の感度と特異度

以前のわれわれの検討⁷⁾では、基礎培地(CHROM-agar)に添加する至適薬剤濃度をAMK 1 µg/ml, IPM 4もしくは6 µg/ml, CPFX 1 µg/mlと決定したが、その際、IPMの添加濃度が培地の精度に最も影響していた。今回、これら二つの条件で作製したスクリーニング培地にMDRP 47株を接種すると、条件1(AMK 1 µg/ml, IPM 4 µg/ml, CPFX 1 µg/ml)では38株、条件2(AMK 1 µg/ml, IPM 6 µg/ml, CPFX 1 µg/ml)では33株の発育が認められ(表2)、それらのコロニーの色調は*Pseudomonas*属菌であることを示す青色を呈していた。これらの結果から、条件1における感度は80.9%(38/47)、条件2は70.2%(33/47)となり、IPMの添加濃度が高い条件で感度の低下傾向が認められた。一方、non-MDRP 20株においては、1薬剤のみに耐性を示す4株の中で本培地(条件1, 2)に発育するものは1株も認められなかったが、2薬剤に耐性を示す*P. aeruginosa*の一部で発育が認められた(表2)。また、*P. aeruginosa*以外の菌種については、3剤耐性の*K. pneumoniae*と*S. marcescens*が本培地に発育したが、このときのコロニーの色調はともに白色を呈していたため、MDRPとは容易に判別することができた(図1)。これらの結果から、本培地の特異度は条件1で

表2. MDRPスクリーニング培地2条件における各種薬剤耐性グラム陰性桿菌の検出頻度

菌株名 (株数)	IPM, CPFY, AMK に対する感受性	株数	スクリーニング培地上に 発育が認められた菌株数		
			抗菌薬 無添加	条件1 (4 µg/ml) ^{a)}	条件2 (6 µg/ml) ^{b)}
<i>P. aeruginosa</i> (67)	1剤耐性	4	4	0	0
	2剤耐性	16	16	3	2
	3剤耐性 (MDRP)	47	47	38	33
<i>S. maltophilia</i> (25)	1剤耐性	2	0	0	0
	2剤耐性	20	0	0	0
	3剤耐性	3	0	0	0
<i>A. baumannii</i> complex (9)	1剤耐性	0	0	0	0
	2剤耐性	7	0	0	0
	3剤耐性	2	0	0	0
<i>B. cepacia</i> (3)	1剤耐性	2	2	0	0
	2剤耐性	1	1	0	0
	3剤耐性	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (13)	1剤耐性	9	9	0	0
	2剤耐性	3	3	0	0
	3剤耐性	1	1	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (5)	1剤耐性	2	2	0	0
	2剤耐性	2	2	0	0
	3剤耐性	1	1	1 ^{c)}	1 ^{c)}
<i>S. marcescens</i> (16)	1剤耐性	4	4	0	0
	2剤耐性	1	1	0	0
	3剤耐性	11	11	11 ^{c)}	10 ^{c)}

^{a)} 条件1; AMK 1 µg/ml, IPM 4 µg/ml, CPFY 1 µg/mlを添加

^{b)} 条件2; AMK 1 µg/ml, IPM 6 µg/ml, CPFY 1 µg/mlを添加

^{c)} 発育したコロニーは白色を呈しており, *Pseudomonas*属菌でないと判定した。

96.7% (88/91), 条件2では97.8% (89/91) となり, いずれも良好な特異性となった。

3. カルバペネム耐性機序の検出感度への関与

MDRP 47株で観察されたIPM濃度に伴う感度低下の原因を検討するため, MDRP 47株のMIC分布と本培地におけるMDRP陽性率(発育した株数/47株)との関係を調べた。図2には条件2 (AMK 1 µg/ml, IPM 6 µg/ml, CPFY 1 µg/ml) における陽性率の分布を示す。CPFYおよびAMKの2薬剤においては, CPFYに一部陽性率の偏りが認められるものの, MIC分布と陽性率との間に関連性は認められなかった(図2a, b)。一方, IPMのMICが16および32 µg/mlの株は, 定義上MDRPであるにもかかわらず, 培地上に発育が認められた株は1株もなく, MICが64 µg/ml以上の株で発育陽性となった(図2c)。

次に, 本スクリーニング培地に発育が認められた *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* および *S. marcescens* につい

て, β-ラクタマーゼ産生遺伝子の保有状況と本培地での発育の有無について調べた。表3に示すように, 2剤耐性 *P. aeruginosa* および MDRP のいずれの場合でも, IMP型もしくはVIM型MBL遺伝子保有株は高頻度に発育陽性を示した。一方, MDRPであってもMBL遺伝子を保有しない株では約半数が発育陰性となっており, その傾向はIPM濃度が高い条件2で強く現れていた。また, 同様の傾向は, 3剤耐性 *S. marcescens* についても認められた。

4. MDRPスクリーニング培地の最少検出感度と安定性

先の結果から, カルバペネムの耐性機序が本スクリーニング培地の感度へ関与する可能性が示唆されたので, 次にIMP型MBL遺伝子保有株と非保有株の最少検出感度を比較した。表4に示すように, 本培地では約100 CFU/ml程度の少量菌の検出も可能であったが, 添加するIPMの濃度が高くなる条件2 (AMK 1

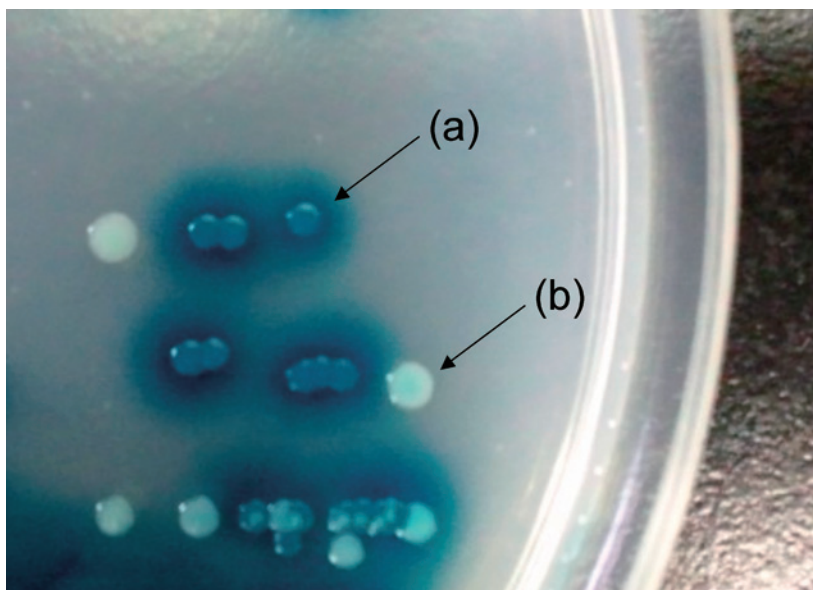


図1. MDRP スクリーニング培地上のコロニー
(a) *Pseudomonas aeruginosa*, (b) *Serratia marcescens*

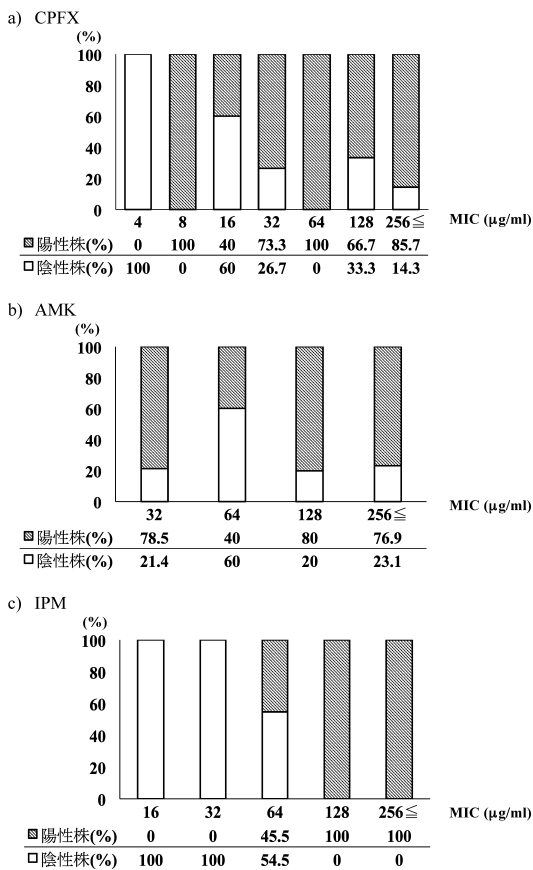


図2. MDRP 47株のMIC分布とMDRPスクリーニング培地における陽性率

μg/ml, IPM 6 μg/ml, CPFX 1 μg/ml) では, 最少検出感度がやや低下する傾向が認められた。しかし, MBL産生株と非産生株の間で有意な差は認められなかった。

最後に培地の安定性について検討した。培地作製後, 1日, 1, 2, 3, 4, 5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の変化を比較すると, 2条件とも4週間までは安定していたが, その後は特異度が低下する傾向が認められた(図3)。

考 察

MDRPは, 主要な抗緑膿菌性抗菌薬に対して広く耐性を獲得していることから, 敗血症や腹膜炎などの感染症を発症した場合, 患者の予後や死亡率を悪化させる危険性が非常に高い⁶⁾。そのため, 医療現場では, 抗菌薬の適正使用を行い患者の感染リスクを低くするとともに, 耐性菌の検出状況の把握やサーベイランスなど日常的な監視が必要である。さらに, アウトブレイクの徴候がある場合には, 同じ病棟の患者すべてを対象にスクリーニング培養を実施するとともに器具や環境を対象とした原因調査も行われる。このようなスクリーニング培養や環境調査が実施される場合, 微生物検査室では一度に大量の検査を行わねばならず, 材料から直接目的菌のみを検出することができるスクリーニング培地の使用が有用となる。以前の報告で, われわれはMDRPスクリーニング培地を提案し

表3. MDRPスクリーニング培地2条件における各種β-ラクタマーゼ遺伝子保有菌の検出頻度

菌株 (株数)	β-ラクタマーゼ遺伝子 ^{a)}	株数	培地上に発育が認められた株数	
			条件1 (4 μg/ml) ^{b)}	条件2 (6 μg/ml) ^{c)}
<i>P. aeruginosa</i> (67)				
1剤耐性 (4)	—	4	0	0
	—	12	1	0
2剤耐性 (16)	IMP-1	3	1	1
	VIM-2	1	1	1
3剤耐性 (47) (MDRP)	—	20	12	8
	IMP-1 (24), -2 (1)	25	24	23
	VIM-1 (1), -2 (1)	2	2	2
<i>K. pneumoniae</i> (5)				
1剤耐性 (2)	IMP-1	1	0	0
	CMY-9	1	0	0
2剤耐性 (2)	IMP-1	1	0	0
	NDM-1	1	0	0
3剤耐性 (1)	KPC	1	1 ^{d)}	1 ^{d)}
<i>S. marcescens</i> (16)				
1剤耐性 (4)	—	4	0	0
2剤耐性 (1)	—	1	0	0
3剤耐性 (11)	IMP-1	11	11 ^{d)}	10 ^{d)}

^{a)} —はβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有していないことを表す。

^{b)} 条件1; AMK 1 μg/ml, IPM 4 μg/ml, CPEX 1 μg/mlを添加

^{c)} 条件2; AMK 1 μg/ml, IPM 6 μg/ml, CPEX 1 μg/mlを添加

^{d)} 発育したコロニーは白色を呈しており、*Pseudomonas*属菌でない判定した。

表4. IMP型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子保有株と非保有株における最少検出感度の比較

添加薬剤の条件	IMP型MBL 遺伝子の保有	コロニー数				
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
条件1 (4 μg/ml) ^{a)}	—	+++	+++	+++ (1540)	++ (330)	+ (90)
	+	+++	+++	+++ (1780)	++ (200)	+ (55)
条件2 (6 μg/ml) ^{b)}	—	+++	+++	+++ (1300)	++ (210)	+ (20)
	+	+++	+++	+++ (1610)	++ (190)	+ (15)
Control ^{c)}	—	+++	+++	+++ (3960)	+++ (1000)	++ (110)
	+	+++	+++	+++ (9300)	++ (830)	+ (75)

+, コロニー数99未満; ++, コロニー数100~999個; +++, コロニー数1,000以上

^{a)} 条件1; AMK 1 μg/ml, IPM 4 μg/ml, CPEX 1 μg/mlを添加

^{b)} 条件2; AMK 1 μg/ml, IPM 6 μg/ml, CPEX 1 μg/mlを添加

^{c)} 抗菌薬を添加しないCHROMagar™ *Pseudomonas* における菌数をControlとした。

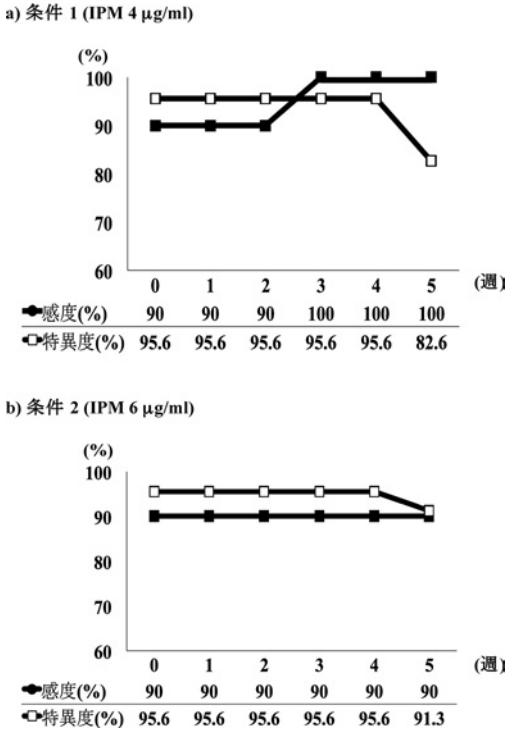


図3. MDRPスクリーニング培地の安定性
 条件 1, AMK 1 $\mu\text{g/ml}$, IPM 4 $\mu\text{g/ml}$, CPFY 1 $\mu\text{g/ml}$
 条件 2, AMK 1 $\mu\text{g/ml}$, IPM 6 $\mu\text{g/ml}$, CPFY 1 $\mu\text{g/ml}$

たが、臨床検査へ導入するには、解決すべき問題点も残した。一つは検査材料および医療環境からはさまざまな耐性機序をもつMDRPが検出される可能性があるため、耐性機序の違いにより検出能に差が生じないか、二つ目として、多種多様な薬剤耐性グラム陰性桿菌が共存する中から、正確にMDRPのみを検出、判定することができるか、である。今回、異なる β -ラクタマーゼ耐性機構を有する7菌種138株を用いて、これらの問題点について再検討し、薬剤濃度AMK 1 $\mu\text{g/ml}$, IPM 4 $\mu\text{g/ml}$, CPFY 1 $\mu\text{g/ml}$ (感度80.9%, 特異度96.7%)の条件で作製したスクリーニング培地のほうがより有用であることを確認した。

MDRPの耐性化には複数の耐性機序が複雑に寄与している⁹⁾。例えば、カルバペネム系抗菌薬耐性には、D2ポーリンの減少、薬剤排出ポンプの亢進、AmpC型セファロスポリナーゼの過剰産生、MBLの産生などが関与している。そして、各遺伝子の発現量も多様である。アミノグリコシド系抗菌薬耐性には、アミノグリコシド修飾酵素による不活性化、メチラーゼによる16S rRNAのメチル化、排出ポンプの亢進などが、また、キノロン系抗菌薬耐性には、DNAジャ

イレース、トポイソメラーゼIVにおけるアミノ酸変異が関与している。MDRPではこれら耐性機構が複雑に関与していることから、検査材料および環境から分離される菌株の性質(遺伝子の発現量)も多種多様であり、スクリーニング検査に用いられる検出法にはそれらを漏れなく検出できる性能が要求される。今回MDRP 47株における感度を2条件で比較した結果、IPMの添加濃度が高い条件2 (AMK 1 $\mu\text{g/ml}$, IPM 6 $\mu\text{g/ml}$, CPFY 1 $\mu\text{g/ml}$)では偽陰性が多く認められ、条件1 (AMK 1 $\mu\text{g/ml}$, IPM 4 $\mu\text{g/ml}$, CPFY 1 $\mu\text{g/ml}$)に比べ感度が10%低くなった。その原因を調べるため、MDRPのMIC分布、 β -ラクタマーゼ遺伝子保有の有無と本培地における陽性率との関連性について検討したところ、IMP型もしくはVIM型MBL遺伝子保有株は高い陽性率を示していたが、MBL遺伝子を保有せず、IPMのMICが16または32 $\mu\text{g/ml}$ を示す株では本培地に発育が認められず偽陰性となっていた。これらの結果はカルバペネム耐性機序が本培地の感度に影響する可能性を示唆しており、MDRPを正確に検出するためのIPM濃度として4 $\mu\text{g/ml}$ と6 $\mu\text{g/ml}$ のいずれが適切であるかについての再考が必要となった。

スクリーニング培地の特性として、MDRPを高感度に検出することを優先とすると、80%以上の感度が得られた条件1 (IPM 4 $\mu\text{g/ml}$)が候補となる。この濃度における最少検出感度は、条件2 (IPM 6 $\mu\text{g/ml}$)よりも良好であり、IMP型MBL遺伝子保有株と非保有株の間で差は認められなかった。しかし、添加する抗菌薬の濃度を低く設定すると、抗菌薬添加後の培地の安定性が問題となってくる。特に、IPMの場合、その安定性が低いことから、長期保存による特異性の低下が危惧された。2条件で作製した培地の安定性を感度と特異度から評価すると、やはりIPMの添加濃度が低いほうが特異度の低下が大きかった。しかし、現在販売されている各種スクリーニング培地(生培地)の保証期間や過去の報告^{10,11)}から、作製後3週間を一定の目安とした場合、2条件ともその期間の安定性は確保されていた。

最後に特異性の問題である。近年、グラム陰性桿菌の耐性化が進み、広域 β -ラクタム薬耐性だけでなく多くの耐性機序が報告されている^{12,13)}。また、複数の β -ラクタマーゼを同時に保有するNDM-1型MBL産生菌も出現しており¹⁴⁾、臨床材料を対象としてスクリーニング培養を実施する場合には、これらの多くの耐性菌が混在する中から選択的にMDRPを検出できるかが重要となる。また、MDRPが好む湿潤環境(手洗い場、汚物室、人工呼吸器回路や尿道カテーテ

ル内)には*S. marcescens*や*Pseudomonas*属菌も生息する可能性も高く、これらの菌種が共存する中でも高い選択性を発揮できることが期待される。今回、さまざまな耐性パターンを有する7菌種138株を検討したが、本スクリーニング培地においてMDRP以外に発育が認められた株は、2剤耐性の*P. aeruginosa*、3剤耐性でIMP型MBL遺伝子を保有する*S. marcescens*ならびにKPC型 β -ラクタマーゼ遺伝子を保有する*K. pneumoniae*であった。これらの菌種は、もともと基礎培地にも発育する菌種であること、さらに発育陽性となった2剤耐性*P. aeruginosa*および*S. marcescens*の多くはIMP型MBL遺伝子を保有していたことが発育した要因と考えられた。しかし、*S. marcescens*および*K. pneumoniae*については、コロニーの色調からMDRPとの判別が可能であったので、使用上問題はないものと思われた。

2剤耐性*P. aeruginosa*については、われわれの臨床分離緑膿菌における研究⁷⁾で、以下の知見を得ている。調査した93株中2剤耐性を示した株は18株(19.4%)と最も多く、うち17株はIPMおよびCPEXに対し耐性を示していた。2剤耐性を示す薬剤種とその比率については、今回も同様の傾向を示しており、また全国サーベイランスの報告¹⁵⁾とも一致している。これら2剤耐性株、特にMBL遺伝子保有株については、荒川ら¹⁵⁾がMDRP予備軍として監視の強化が重要であると述べている。したがって、IMP型MBL遺伝子保有の2剤耐性*P. aeruginosa*の偽陽性については容認できるものと考えられる。

本研究ではMDRP迅速検出法として「MDRPスクリーニング培地」の有用性を検討し、至適薬剤添加濃度が、AMK 1 μ g/ml, IPM 4 μ g/ml, CPEX 1 μ g/ml (感度80.9%, 特異度96.7%)であることを確認した。今回の検討でカルバペネム系薬剤の耐性機序が培地の感度に関与することが示唆されたが、本添加濃度は耐性機序にかかわらず、高感度、特異的にMDRPを検出でき、かつ安定性にも優れた条件であった。MDRPスクリーニング培地は、現行の検査法と比べ検査コストも大幅に削減でき、簡便で迅速な検出法であり、本培地の導入は日常検査のみならず病院感染対策の効率化にも大きく貢献できるものと考えられる。

謝 辞 本研究を遂行するにあたり、NDM-1型MBL産生株を分与頂きました、獨協医科大学の菱沼昭教授ならびに(株)ミロクメディカルラボラトリーの柳澤英二社長、KPC型 β -ラクタマーゼ産生*K. pneumoniae*を分与頂きました、九州大学医学部附属

病院検査部の江藤ふじ子先生、ならびにその他の臨床分離株を分与いただきました名古屋大学医学部附属病院微生物検査室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

また、本研究は、平成22年度科学研究費補助金基盤研究(C)課題番号22590523により実施された。

利益相反

特記すべきものはありません。

文 献

- 1) 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.
- 2) 厚生労働省ホームページ. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-42.html>
- 3) JANIS 院内感染対策サーベイランス事業ホームページ. <http://www.nih-janis.jp/>
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Paterson, D. L. 2006. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 43 (Suppl. 2): S43-S48.
- 7) 川村久美子. 2009. 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. *日臨微誌* 19 (4): 220-229.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-Eight Edition. Document M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 9) Bonomo, P. E., D. Szabo. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 43: S49-S56.
- 10) Flayhart, D., J. F. Hindler, D. A. Bruckner, et al. 2005. Multicenter evaluation of BBL CHROMagar MRSA medium for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surveillance cultures of the anterior nares. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5536-5540.
- 11) Nahimana, I., P. Francioli, D. S. Blanc. 2006. Evaluation of three chromogenic media (MRSA-ID,

- MRSA-Select and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. 12: 1168–1174.
- 12) 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(3): 150–161.
- 13) Bush, K. 2010. Alarming β-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Curr. Opin. Microbiol. 13: 558–564.
- 14) Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, et al. 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob. Agents Chemother. 53: 5046–5054.
- 15) 荒川宜親. 2006. 多剤耐性緑膿菌について. <http://idsc.nih.gov.jp/disease/MDRP/MDRP-7a>

Development of New Screening Medium to Detect Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* for Increased Efficiency of Infection Control

Satoru Yokoyama,¹⁾ Kumiko Kawamura,¹⁾ Tetsuya Yagi,²⁾ Yoshichika Arakawa^{3,4)}

¹⁾ Department of Pathophysiological Laboratory Science, Nagoya University Graduate School of Medicine

²⁾ Department of Infectious Diseases, Nagoya University Graduate School of Medicine

³⁾ Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine

⁴⁾ Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) is responsible for severe nosocomial infections, and rapid and accurate methods to detect strains of this bacterium are needed. We developed a new MDRP screening medium by incorporating three antimicrobial agents (amikacin (AMK), imipenem/cilastatin (IPM) and ciprofloxacin (CPFX)) into an existing medium for the detection of *Pseudomonas* species, CHROMagar™ *Pseudomonas* (CHROMagar). A panel of 138 Gram-negative bacteria (mainly *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. and *Serratia* sp.) harboring a variety of β-lactamase genes were assembled. These bacteria were then used for the purpose of evaluating MDRP screening medium with the addition of either 4 or 6 μg/ml IPM, 1 μg/ml AMK and 1 μg/ml of CPFX. Of 47 strains of MDRP, isolates harboring *bla_{IMP}* or *bla_{VIM}* genes grew specifically on MDRP screening medium, while the other non-β-lactamase-producing MDRP isolates did not grow. This suggests the contribution of a carbapenem-resistant mechanism to the system's ability to detect MDRP. *Serratia marcescens* harboring the *bla_{IMP}* gene and *Klebsiella pneumoniae* harboring the *bla_{KPC}* gene grew on the MDRP screening medium, although they were easily distinguishable from *Pseudomonas* sp. (blue colonies) by their typical colony color (white colonies). Based on these results, we determined that CHROMagar with 1 μg/ml of AMK, 4 μg/ml of IPM and 1 μg/ml of CPFX showed the best detection limit (10³ CFU/ml), sensitivity (80.9%), specificity (96.7%), and stability. This MDRP screening medium is a simple, rapid and cost-effective method compared with conventional methods described in the literature. The use of this MDRP screening medium may make it possible to efficiently detect MDRP isolates in clinical material for infection control.