

【原著・基礎】

血液から分離された腸内細菌科グラム陰性桿菌の
β-ラクタム薬耐性に関する解析中村 竜也¹⁾・松尾 信昭²⁾・高橋 伯夫¹⁾¹⁾関西医科大学附属病院中央検査部*²⁾同 高度救命救急センター

(平成 14 年 7 月 17 日受付・平成 14 年 9 月 3 日受理)

1991 年から 2000 年の 10 年間に血液培養から検出された腸内細菌科 329 株について、β-ラクタム薬耐性機序に関する解析を行った。薬剤感受性試験の結果は *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* では第 3 世代以降のセフェム系薬剤やカルバペネム系薬剤の MIC₉₀ が 0.5 μg/mL 以下と良好な感受性を示した。*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* では第 3 世代セフェムはやや劣るものの、第 4 世代薬やカルバペネム系薬は比較的良好であった。腸内細菌すべてでは meropenem の MIC₉₀ がもっとも低値で 0.12 μg/mL 以下であった。菌種別の耐性率では ceftazidime で比較すると *E. cloacae* がもっとも高く 50.5% であった。Double-disk synergy test (DDST) 試験陽性は 19 株、2-mercapto propionic acid test (2-MP) 陽性は 5 株存在し、耐性遺伝子は extended spectrum β-lactamase (ESBL) 産生遺伝子 CTX-M 1/3 型が 19 株中 18 株検出され、metallo-β-lactamase (MBL) 産生菌は 5 株すべて IMP-1 型であった。また、1991 年に検出された *K. pneumoniae* では SHV 型 ESBL 産生菌の存在が確認された。臨床背景調査では基礎疾患として悪性腫瘍や脳血管障害などの比較的重症例が多く、全例で IVH カテーテルが挿入されていた。ESBL 産生菌検出患者ではカルバペネム系やアミノ配糖体薬の投与で、MBL 産生菌検出患者では aztreonam の投与で臨床症状が改善され、治療効果が期待される結果であった。

Key words: blood culture, ESBL, metallo-β-lactamase, Enterobacteriaceae, PCR

近年、欧米においてグラム陰性桿菌が extended spectrum β-lactamase (ESBL) や metallo-β-lactamase (MBL) など各種 β-ラクタマーゼを産生し、広域 β-ラクタム薬による治療で難渋するケースが問題となっている。また、それらの耐性菌による院内感染の報告も後を絶たない¹⁻³⁾。本邦においてもさまざまな耐性菌による感染症の報告例が増加し^{4,5)}、それらによる院内感染の増加が懸念されている^{6,7)}。また、腸内細菌科の薬剤耐性化は術後感染症や敗血症の治療に大きな影響をおよぼすと考えられる。*Escherichia coli* や *Klebsiella* spp. に関する報告は National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) が提案した ESBL 検出方法⁸⁾を採用し検出が比較的容易なために本邦での報告も増え、実態も明らかになりつつある。ESBL 産生遺伝子はプラスミド上に存在するため他の腸内細菌が獲得している可能性も多い。しかし、*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* 以外の腸内細菌については報告も少なく⁹⁾、分離状況や背景の調査が急がれるところである。また、MBL 産生菌については、日本では欧米に比較してカルバペネム系薬の使用ケースが多いためか耐性菌検出の報告も多い^{10,11)}。今回、1991 年から 2000 年の 10 年間に血液培養から分離された腸内細菌について薬剤感受性、ESBL および MBL 産生菌の検出状況、耐性

遺伝子の有無や染色体 DNA の遺伝学的疫学解析、臨床背景の調査を行ったので報告する。

I. 対象と方法

1. 対象

1991 年～2000 年の 10 年間に血液培養から分離された腸内細菌科 329 株を試験対象菌株として用い、年次ごとの検出率などを解析した。同定は VITEK GNI カード (バイオメリュー) を用いた。

2. 薬剤感受性試験

分離された 329 株について、NCCLS 標準法⁸⁾に準拠した微量液体希釈法 (フローズプレート栄研) にて最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、薬剤ごとに MIC₅₀, MIC₈₀ および MIC₉₀ を算出した。また、各菌種ごとに各薬剤の耐性率も算出した。測定薬剤は piperacillin (PIPC), aztreonam (AZT), cefpodoxime (CPDX), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (CFPM), ceftazidime (CAZ), cefepime (CFPM), ceftazidime (CAZ), meropenem (MEPM), imipenem (IPM), panipenem (PAPM), sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ), amikacin (AMK), ciprofloxacin (CPFX) である。

3. ESBL および MBL 産生菌の検出および遺伝子型

*大阪府守口市文園町 10-15

薬剤感受性試験にて *E. coli* および *Klebsiella* spp. については NCCLS の検出指針の基準を満たしたものを、その他の腸内細菌については CAZ または CTX の MIC が 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示した株について、double-disk synergy test (DDST)¹²⁾ を用いて ESBLs 産生菌の検出を行った。DDST は NCCLS の方法⁹⁾ にしたがってミューラーヒントン培地に MacFarland 0.5 の菌液を 0.1 mL 綿棒で塗布し amoxicillin/clavulanic acid (AMPC/CVA) disk と CPDX, CTX, CAZ, CPR, CFPM それぞれの間が 25 mm になるようにディスク (センシディスク: BBL) を配置し、35°C、一夜培養後にいずれかの薬剤でクラブラン酸による阻害効果の認められたものを陽性とした。陽性株は PCR 法により TEM, SHV 型および CTX-M group (CTX-M 1/3, CTX-M 2, CTX-M 9) に型別した¹³⁾。MBL 産生菌の検出は、荒川ら¹⁴⁾ が考案したメルカプト化合物を用いた阻害試験を使用した。検査法は NCCLS の方法にしたがいミューラーヒントン培地に MacFarland 0.5 の菌液を 0.1 mL 綿棒で塗布し、メタロ- β -ラクタマーゼ SMA ディスク “栄研” を用いて、おのおの CAZ または IPM ディスク周辺の発育阻止帯の変化を観察し、MBL の産生性の有無を識別した。陽性株は PCR 法により IMP-1 型について遺伝子の検出を行った¹⁵⁾。

4. Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) による疫学解析

分離された ESBL 産生菌の遺伝的疫学解析を AP-PCR 法を用いて行った。*Enterobacter cloacae* に関しては 9 症例 10 株 (複数回検出患者では 2 株を解析) を対象とした。使用プライマーは *K. pneumoniae*, *E. cloacae* は ERIC 2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGTGA-GCG-3')¹⁶⁾ を、*Serratia marcescens* は Hejajy らの方法¹⁷⁾ にしたがって、HLWL-74 (5'-CGTCTATGCA-3') および 1254 (5'-AACCCACGCC-3') の混合プライマーを使用した。テンプレート DNA は LB プロスにて 24 時間培養した菌液を 12,000 rpm 5 分間遠心した沈渣から

抽出した。DNA の抽出は定法にしたがい、エタノール・クロロホルム処理法で行った。反応試薬は Takara Taq を使用し、 Mg^{2+} 濃度は 3 mM で増幅を行った。増幅産物は、12.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用い銀染色により確認した。同一パターン株の因果関係解析は、カルテ調査により入院歴、主治医、前医などで患者間もしくは病院スタッフによる接触の有無について検討を行った。

5. ESBL および MBL 産生菌検出患者の臨床背景

ESBL 産生菌および MBL 産生菌が検出された患者について、患者情報 (年齢, 性, 基礎疾患, デバイスの有無), 投与薬剤, 予後などについてカルテ調査を行った。

II. 結 果

1. 各菌種の年次ごとの検出率

1991 年から 2000 年の 10 年間に分離された腸内細菌は総検出株数 3,049 株中、329 株 (10.8%) であった。年次ごとの検出率は 1999 年および 2000 年では 15% を越え近年増加傾向にあった (Table 1)。

2. 薬剤感受性検査成績

腸内細菌主要 5 菌種と合計の MIC₅₀, MIC₈₀ および MIC₉₀ の成績を Table 2 に示した。*E. coli*, *K. pneumoniae* では第 3 世代以降のセフェムやカルバペネムの MIC₉₀ が 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下と良好な感受性を示した。*E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *S. marcescens* では第 3 世代セフェムはやや劣るものの第 4 世代薬やカルバペネム系薬は比較的良好であった。*S. marcescens* に関してはカルバペネム系薬で MIC₉₀ が 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と高い値を示したが、これは MBL 産生菌が存在したためである。全体では MEPM がもっとも低い MIC₉₀ を示し、0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であった。菌種ごとの各薬剤に対する耐性率を Table 3 に示した。ESBL 検出における基準的薬剤である CAZ の耐性率を比較するともっとも高値であったのが *E. cloacae* で 51.5% であった。次いで *C. freundii* の 50.0% であった。*E. coli*, *K. oxytoca* および *Proteus mirabilis* については耐性菌は存在しなかつ

Table 1. Detection of Enterobacteriaceae isolated from blood cultures (1991–2000)

Year	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	Total
Total no. of strains	193	266	282	326	323	405	384	222	313	335	3,049
Enterobacteriaceae no. of strains (%)	13	22	23	53	24	34	34	22	49	55	329 (10.8)
<i>E. coli</i>	5	6	3	13	6	5	11	3	14	19	85
<i>K. pneumoniae</i>	1	3	5	9	8	13	7	8	8	14	76
<i>K. oxytoca</i>	0	1	3	2	1	1	2	0	4	0	14
<i>E. cloacae</i>	3	4	4	12	3	8	5	1	14	12	66
<i>E. aerogenes</i>	1	2	3	4	0	1	3	1	1	2	18
<i>C. freundii</i>	0	1	1	7	0	0	0	1	0	2	12
<i>P. mirabilis</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	4
<i>M. morgani</i>	0	0	0	2	2	2	1	1	0	3	11
<i>S. marcescens</i>	3	5	4	4	3	3	4	6	8	3	43

Table 2. Antimicrobial activity of agents in 329 strains of Enterobacteriaceae detected in blood cultures between 1991 and 2000

Organism (no. of isolates)	MIC	MICs (μg/mL)													
		50/80/90	PIPC	CPDX	S/C	AZT	CTX	CAZ	CFPM	CPR	MEPM	IPM	PAPM	AMK	CPFX
<i>E. coli</i> (85)	50	≤8	≤1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.12	≤0.12	≤0.12	2	≤0.25	
	80	≤8	≤1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.12	≤0.12	≤0.12	4	≤0.25	
	90	16	≤1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.12	≤0.12	≤0.12	4	1	
<i>K. pneumoniae</i> (76)	50	≤8	≤1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.12	≤0.12	≤0.12	2	≤0.25	
	80	≤8	≤1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.12	0.25	0.25	2	≤0.25	
	90	≤8	≤1	1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.12	0.25	0.25	2	≤0.25	
<i>E. cloacae</i> (66)	50	≤8	>4	8	4	32	8	≤0.5	≤0.5	≤0.12	0.5	0.5	1	≤0.25	
	80	>128	>4	32	64	>64	>64	16	32	≤0.12	1	0.5	2	1	
	90	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	>64	0.25	1	1	2	2	
<i>S. marcescens</i> (43)	50	≤8	>4	4	1	4	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.12	1	0.5	8	0.25	
	80	128	>4	>64	32	>64	>64	64	>64	4	2	4	32	16	
	90	>128	>4	>64	64	>64	>64	>64	>64	8	4	8	64	>16	
<i>C. freundii</i> (12)	50	≤8	>4	1	1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.12	0.25	0.25	2	≤0.25	
	80	128	>4	16	64	64	>64	1	2	≤0.12	0.5	0.25	2	≤0.25	
	90	>128	>4	32	64	64	>64	2	4	≤0.12	0.5	0.5	2	1	
All strains (329)	50	≤8	≤1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.12	≤0.12	≤0.12	2	≤0.25	
	80	32	>4	8	4	16	8	≤0.5	≤0.5	≤0.12	0.5	0.5	2	≤0.25	
	90	>128	>4	32	64	>64	>64	8	16	≤0.12	1	1	4	2	

PIPC: piperacillin, CPDX: cefpodoxime, S/C: sulbactam/cefoparazone, AZT: aztreonam, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, CPR: cefpirome, MEPM: meropenem, IPM: imipenem, PAPM: panipenem, AMK: amikacin, CPFX: ciprofloxacin

Table 3. Antibiotic tolerance

Organism (no. of isolates)	No. of strains of intermediate and resistant ^{a)} (%)										
	PIPC	CPDX	AZT	CTX	CAZ	CFPM	MEPM	IPM	AMK	CPFX	
<i>E. coli</i> (85)	5 (5.8)	6 (7.1)	0	0	0	0	0	0	0	6 (7.1)	
<i>K. pneumoniae</i> (76)	3 (3.9)	3 (3.9)	1 (1.3)	2 (2.6)	1 (1.3)	1 (1.3)	0	0	0	0	
<i>K. oxytoca</i> (14)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>E. cloacae</i> (66)	30 (45.4)	46 (69.7)	33 (50.0)	36 (54.5)	34 (51.5)	15 (22.7)	0	0	0	12 (18.2)	
<i>E. aerogenes</i> (18)	7 (38.9)	6 (33.3)	3 (16.7)	4 (22.2)	5 (27.7)	0	0	0	0	0	
<i>C. freundii</i> (12)	6 (50.0)	8 (66.7)	6 (50.0)	6 (50.0)	6 (50.0)	1 (8.3)	0	0	0	2 (16.7)	
<i>P. mirabilis</i> (4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>M. morgani</i> (11)	5 (45.4)	6 (54.5)	0	1 (9.1)	1 (9.1)	0	0	0	0	0	
<i>S. marcescens</i> (43)	17 (39.5)	28 (65.1)	12 (27.9)	21 (48.8)	14 (32.5)	12 (27.9)	5 (11.6)	4 (9.3)	10 (23.3)	19 (44.2)	
All (329)	73 (22.2)	102 (31.0)	55 (16.7)	70 (21.3)	61 (18.5)	28 (8.5)	5 (1.5)	4 (1.2)	10 (3.0)	39 (11.9)	

^{a)}Strains of intermediate and resistant were defined according to NCCLS criteria

PIPC: piperacillin, CPDX: cefpodoxime, CTX: cefotaxime, AZT: aztreonam, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, MEPM: meropenem, AMK: amikacin, CPFX: ciprofloxacin

た。*E. coli* で CPDX 耐性が 7.1% あったが、これはクラス C β-ラクタマーゼの過剰産生によるものであった。全体ではカルバペネム系薬がもっとも低く IPM で 1.2%、MEPM で 1.5% であった。また、β-ラクタム薬以外の薬剤では AMK で 3.0%、CPFX で 11.9% 耐性であった。

3. ESBL および MBL 産生菌の検出および遺伝子型

DDST および 2-MP 法に陽性を示した株数 (%) を Table 4 に、遺伝子型とその MIC 測定結果を Table 5 に示した。NCCLS の ESBL 検出の基準を満たした *E. coli* および *Klebsiella* spp. は 9 株 (2.7%)、その他の腸内細菌で基準を満たした株は 70 株 (21.3%)、合計 79

株 (24.0%) であり、そのうち DDST 陽性が 19 株 (5.7%) であった。菌種別では *E. cloacae* 15 株、*K. pneumoniae* 3 株、*C. freundii* 1 株であった。遺伝子型は CTX-M 1/3 型が 19 株中 18 株で検出された。詳細は *E. cloacae*、*C. freundii* ではすべて CTX-M 1/3 型で、*K. pneumoniae* は TEM 型、SHV 型、CTX-M 1/3 型の 3 種類が検出されたものが 2 株、SHV 型が 1 株であった。ESBL 産生菌ではセフェム系薬剤は全体に MIC 値が高値を示したが、カルバペネム系薬剤は低く、なかでも MEPM がもっとも低値を示した。その他では AMK 耐性が 1 株、CPFX 耐性が 7 株存在した。2-MP 法陽性株は *S. marcescens* で 5 株 (1.5%) 検出された。遺

Table 4. Strains indicated rather than extraction conditions^{a)} for DDST and 2-MP procedures

	Total no. strains (%)	No. of DDST ^{b)} -positive (%)	No. of 2-MP-positive (%)
<i>E. coli</i> (85)	6 (7.1)	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (76)	3 (3.9)	3 (3.9)	0
<i>K. oxytoca</i> (14)	0	0	0
<i>E. cloacae</i> (66)	36 (54.5)	15 (22.7)	0
<i>E. aerogenes</i> (18)	6 (33.3)	0	0
<i>C. freundii</i> (12)	6 (50.0)	1 (8.3)	0
<i>P. mirabilis</i> (4)	0	0	0
<i>M. morgani</i> (11)	1 (9.1)	0	0
<i>S. marcescens</i> (43)	21 (48.8)	0	5 (11.6)
All (329)	79 (24.0)	19 (5.7)	5 (1.5)

^{a)}*E. coli* and *Klebsiella* spp.: rather than 2 µg/mL of MIC of cefpodoxime, others Enterobacteriaceae: rather than 16 µg/mL of MIC of ceftadime and/or cefotaxime

^{b)}DDST: double-disk synergy test

^{c)}2-MP: Inhibitory effects of 2-mercaptopyruvic acid

伝子型は5株すべてIMP-1型であった。セフェム系薬剤はAZT以外のMIC値は高値を示した。また、IPMに感受性を示した株が1株存在した。検出年次はESBL産生菌およびMBL産生菌ともに1996年以降に多く、24株中22株が検出された。また、1991年検出の*K. pneumoniae*でSHV型ESBL産生菌の存在が確認された。

4. 疫学解析結果

AP-PCR法を用いた疫学解析結果をFig. 1に示した。ESBL産生*E. cloacae*ではNo.207, 208, 226とNo.230, 236がそれぞれ同一パターンを示した以外は異なるパターンを示した。No.207, 208は同一患者由来株であった。しかし、No.207, 208とNo.226については患者間もしくはスタッフによる接触の関連性は認められなかった。また、No.230とNo.236の関連性も同様に認められな

かった。ESBL産生*K. pneumoniae*では3株ともに違うパターンであった。MBL産生*S. marcescens*では1996年から1998年にかけて検出されたNo.318, 320, 327が同一の電気泳動パターンを示し、1999年, 2000年分離株のNo.336, 339が同一のパターンを示した。No.318, 320, 327, 336が同一の病棟から検出され、院内感染を示唆する結果であった。

5. 臨床背景調査結果

臨床背景調査が可能であったESBL産生菌検出患者13例およびMBL産生菌検出患者5例についての結果をTable 6に示した。ESBL検出患者では全例入院患者で、年齢は小児が2例, 60歳以上は8例であった。基礎疾患は悪性腫瘍や脳血管障害といった比較的重症例が多く、全例でIVHカテーテルが挿入されていた。患者に対する処置では導尿が8例, 手術5例, 抗癌剤5例,

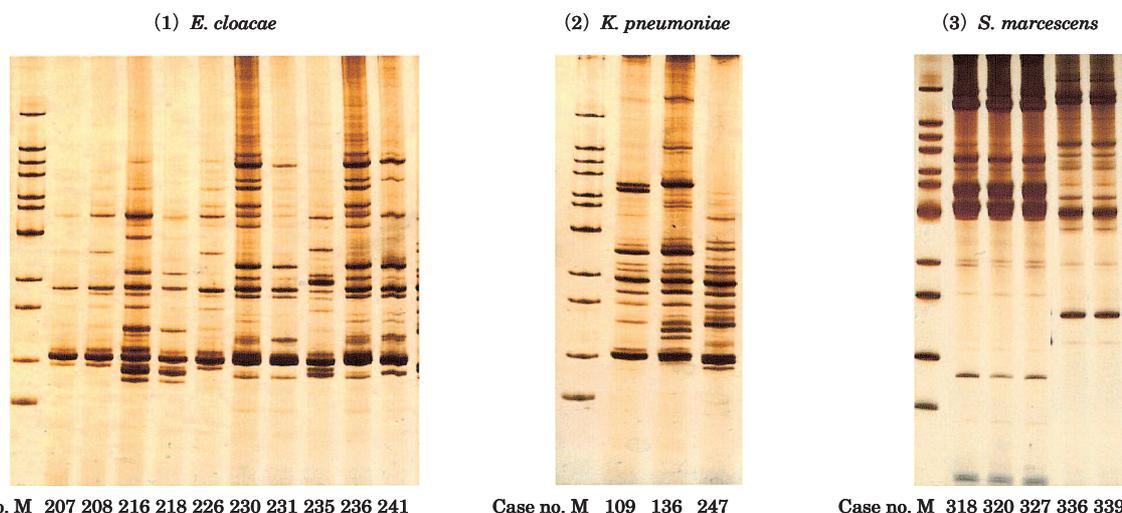


Fig. 1. AP-PCR patterns of ESBL producing *Enterobacter cloacae* (1), *Klebsiella pneumoniae* (2) and MBL producing *Serratia marcescens* (3). Lane: M, 100 bp ladder molecular weight marker. Others lanes: Correspond to strain number listed in Table 6.

Table 5. MICs and β-lactamase gene types of DDST and 2-MP positive strains

Case no.	Organism	β-lactamase gene	MICs (μg/mL)													
			PIPC	CPDX	S/C	AZT	CTX	CAZ	CFPM	CPR	MEPM	IPM	PAPM	AMK	CPFX	
207	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	64	≤0.12	0.5	0.5	2	1	
208	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	32	>64	>64	>64	32	>64	≤0.12	0.5	1	1	2	
209	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	32	>64	>64	>64	32	64	0.25	1	0.5	1	1	
210	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	32	>64	>64	>64	64	>64	0.25	0.5	0.5	1	1	
212	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	64	>64	0.5	1	1	1	2	
216	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	64	>64	0.25	0.5	1	≤0.5	>16	
218	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	>64	>64	0.25	≤0.12	≤0.12	≤0.5	>16	
226	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	>64	≤0.12	0.5	0.5	1	2	
230	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	>64	≤0.12	0.5	0.5	1	4	
231	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	64	≤0.12	0.5	0.5	1	4	
232	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	>64	≤0.12	0.25	0.25	1	4	
233	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	64	>64	≤0.12	0.5	0.5	1	4	
235	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	32	>64	>64	>64	16	32	≤0.12	1	0.25	1	2	
236	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	64	>64	0.5	1	1	2	4	
241	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	16	>64	>64	64	8	16	≤0.12	0.5	0.25	1	≤0.25	
109	<i>K. pneumoniae</i>	TEM, SHV, CTX-M 1/3	128	>4	16	>64	>64	8	4	16	≤0.12	≤0.12	≤0.12	1	≤0.25	
136	<i>K. pneumoniae</i>	TEM, SHV, CTX-M 1/3	>128	>4	64	32	32	8	16	32	≤0.12	≤0.12	≤0.12	1	≤0.25	
247	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	128	2	1	≤0.5	16	2	2	4	≤0.12	≤0.12	≤0.12	1	≤0.25	
280	<i>C. freundii</i>	TEM, CTX-M 1/3	>128	>4	32	32	64	8	16	64	≤0.12	1	1	32	2	
318	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	128	>4	>64	8	>64	>64	>64	>64	16	16	16	8	>16	
320	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	>128	>4	>64	8	>64	>64	64	>64	16	8	>16	8	>16	
327	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	128	>4	>64	8	>64	>64	64	64	8	4	8	4	>16	
336	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	≤8	>4	>64	8	>64	>64	>64	>64	16	8	8	8	4	
339	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	≤8	>4	>64	8	>64	>64	>64	>64	16	16	>16	8	2	

PIPC: piperacillin, CPDX: cefpodoxime, S/C: sulbactam/cefoparazone, AZT: aztreonam, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, CFPM: ceftipime, CPR: ceftioime, MEPM: meropenem, IPM: imipenem, PAPM: pampipenem, AMK: amikacin, CPFX: ciprofloxacin

Table 6. Information on patients infected by ESBL and MBL producing organisms

Case no.	Organism	β -lactamase gene	Detected year	Age	Underlined disease ^{a)}	Antibiotics		Clinical effect	Simultaneous detection	Prognosis
						before	after			
207	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1996	74	Stevens-Johnson syndrome	CAZ, IPM	IPM→PAPM→S/C→LMOX →PIPC→CFPM	unknown	MRSA, <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	poor (septic shock)
216	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1997	33	acute lymphocytic leukemia	CPFX, FLCZ	AZT, CLDM→AMK, CLDM	good	—	good
218	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1997	69	hypoplastic leukemia	CPFX, FLCZ	PAPM→CPR	good	MSSA	good
226	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1999	83	acute cholecystitis	no therapy	CFPM→PAPM	good	—	good
230	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1999	5	acute myelocytic leukemia	CAZ, TEIC	CAZ, TEIC	poor	MRSA, <i>C. albicans</i>	poor (septic shock)
231	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1999	63	myocardial infarction	no therapy	PIPC→GM	good	—	good
235	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	2000	79	renal failure	CPR, MINO	MINO→PAPM	poor	—	poor (septic shock)
236	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	2000	71	aortic dissection	TEIC	TEIC	unknown	MRSA	good
241	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	2000	77	gastric cancer	CTM, PAPM	PAPM	good	—	good
109	<i>K. pneumoniae</i>	TEM, SHV, CTX-M 1/3	1995	70	intracerebral bleeding	CAZ, AMPC	CAZ	good	—	poor (septic shock)
136	<i>K. pneumoniae</i>	TEM, SHV, CTX-M 1/3	1998	47	neck tumor	no therapy	IPM→CAZ	good	—	good
247	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	1991	0	ARDS	ABPC, TOB	CTX, TOB	good	—	good
280	<i>C. freundii</i>	TEM, CTX-M 1/3	2000	49	brain tumor	no therapy	AMPC→CAZ	poor	—	poor (septic shock)
318	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	1996	66	hepatic cirrhosis polycythemia	CFPM	PAPM→AZT	good	—	good
320	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	1997	71	acute renal failure	PIPC	PIPC	unknown	—	poor (heart failure)
327	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	1998	2	head injury	CTM	CAZ→AZT	good	—	good
336	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	1999	52	spinal cord injury	CTM	FMOX	poor	—	poor (septic shock)
339	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	2000	51	chronic renal failure (renal transplantation)	CMZ	GM	good	—	poor (renal failure)

^{a)}ARDS: acute respiratory distress syndrome

CAZ: ceftazidime, IPM: imipenem, PAPM: panipenem, S/C: sulbactam/cefoparazone, LMOX: latamoxef, PIPC: piperacillin, CFPM: cefepime, CPFX: ciprofloxacin, FLCZ: fluconazole, AZT: aztreonam, CLDM: clindamycin, AMK: amikacin, CPR: ceftriaxone, TEIC: teicoplanin, MINO: minocycline, CTM: cefotiam, AMPC: ampicillin, ABPC: ampicillin, TOB: tobramycin, CTX: cefotaxime, FMOX: flomoxel, CMZ: cefmetazole

気管挿管6例、輸血7例であった。血液培養にて検出された菌に対して積極的に治療されたのは12例で1例は未治療であった。敗血症発症以前に何らかの抗菌薬が投与されていたのは9例で、血液疾患治療での予防投与や他の菌種に対する治療がほとんどであった。発症後はグラム陰性菌に対して有効性の高いと考えられる薬剤が選択的に投与されているが、全例で抗生剤の変更や追加がなされていた。13例中治療効果が認められたものが8例であった。治療効果が認められた薬剤はカルバペネム系薬3例(PAPM3例)、アミノ配糖体3例(AMK, gentamicin, tobramycin)、第3世代セフェム2例(CAZ2例)であった。第3世代セフェムが有効であった2例(No.109, No.136)はCTX-M 1/3型の*K. pneumoniae*で、CAZのMICが8μg/mLであった。2例では治療に失敗しているが、1症例(No.235)はminocyclineが使用されたものの耐性であり、もう1症例(No.280)はCAZに対するMIC値が8μg/mLであったものの治療効果が認められなかった症例であった。血液疾患の2例(No.216, No.218)では骨髄移植後の感染予防にCPFXが投与されていたが、検出された菌のCPFXの感受性は耐性であり、腸管からのtranslocationによるものと考えられた。MBLが検出された患者の臨床背景は4例が高度救命救急センター/ICUより分離されたものであり、基礎疾患は外傷や脳血管障害など高度の重症例であった。また、もう1例は中国での腎移植後患者でGVHDが出現し当院にて治療を行った患者であった。導尿カテーテルなどのメディカルデバイスは5例ともに使用されていた。使用薬剤は菌検出前に全例ともβ-ラクタム薬が投与されていた。使用薬剤の有効性については、AZTが投与された2例では菌が消失しており、本剤のMBL産生株に対する有効性が示唆された。PIPC投与例についても菌が陰性化しているが抗生剤が長期投与され血液培養も長期間提出されず効果の判定には至らなかった。腎移植患者ではアミノ配糖体(GM)が単剤で投与され菌の陰性化が認められた。Cefotiamおよびflomoxef投与例ではエンドトキシンショックにより死亡しており治療効果が認められなかった。

III. 考 察

近年、広域スペクトラムセフェム系薬剤やカルバペネム系薬剤の使用増加に伴い、耐性菌の蔓延が問題視されている。グラム陰性菌の薬剤耐性化は敗血症や下部消化管術後感染症に対する治療や予後に大きな影響をおよぼすため、耐性化の状況を正確に把握しておく必要があると考えられる。今回の調査で*E. coli*、*K. pneumoniae*ではセフェム系薬剤やカルバペネム系薬剤は良好な感受性を示した一方で、*E. cloacae*、*C. freundii*、*S. marcescens*ではセフェム系薬剤に関してはMIC₉₀が64μg/mL以上を示す薬剤も存在した。本来、この種の腸内細菌は染色体性のクラスCβ-ラクタマーゼを産生するた

め、セフェム系薬剤には耐性を示す場合が多い。しかし、第3世代以降の薬剤に関して本来はクラスCβ-ラクタマーゼに比較的安定に作られているが、産生量の増加やESBL産生菌に対しては効果が期待できない可能性が高い。今回の調査では、*E. cloacae*、*C. freundii*、*S. marcescens*でクラスCβ-ラクタマーゼ産生量増加やESBL産生菌が存在し、今後セフェム系薬剤のさらなる耐性化が懸念される結果であった。そのなかで、耐性率が低かったのはカルバペネム系やアミノ配糖体であった。特にMEPMに関してはMIC₉₀も0.12μg/mL以下と低値であり、グラム陰性桿菌の感染症ではもっとも治療効果が期待できる薬剤のひとつであると考えられる。ただし、MBL産生菌には効果が期待できないために、アミノ配糖体系薬やニューキノロン系薬、またはモノバクタム系の薬剤を選択することになる。各種β-ラクタマーゼの検出には、ESBL産生菌にはJarlierら¹²⁾が報告したDDSTを、MBL産生菌にはArakawaら¹⁴⁾が報告した2-メルカプトプロピオン酸を用いた検出法を行ったが、両方法ともにPCRを用いた遺伝子検出を必要とせず、日常検査において各種耐性機序を判断する上で有用であると考えられた。このような検出方法を各検査室が確立しておくことは、治療薬剤の適正な選択のみならず院内での耐性菌の動向などの疫学情報や、早期の院内感染対策にも役立つと思われる。

ESBL産生菌の分離率は329株中19株(5.7%)であった。ESBL産生菌の検出率に関する調査は多く報告されており、その検出率はさまざまであるが¹⁹⁻²¹⁾血液培養からの報告はない。われわれの調査では血液培養のみの調査で5.7%と比較的高率であり、腸内細菌科全般に遺伝子が拡散され、それが血液からも分離されることが明らかとなった。遺伝子型は19株中18株がCTX-Mタイプを保有しており、他の報告⁹⁾同様に本邦でもっとも多く検出されているタイプが多かった。MBL産生菌では*S. marcescens*のみで分離され、5株1.4%であった。すべてIMP-1タイプを保有している結果であった。他の菌種では検出されなかったが、腸内細菌科全般に広がっていることが確認されており注意が必要であると考えられる。ESBLの存在は1983年にKnocheらの報告²²⁾以後、世界各地から検出の報告があるが、当院においても1991年には*K. pneumoniae*でSHV型のESBL産生遺伝子を獲得している菌が検出され、本邦においてもこのころにはESBL産生菌が存在した結果であった。当院において1996年以降にはESBLおよびMBL産生菌の検出が多くなったが、このころから本邦においても検出の報告が増え、この時期を境に増加に転じた可能性が示唆された。

疫学的解析においてはESBL産生*E. cloacae*では同一パターンを示す株も存在したが関連性は解明できなかった。しかし、尿から分離された菌について行った調査²³⁾

では同一病棟で同一のパターンを示した株が存在し、病棟での蔓延が示唆される結果を報告している。今回の調査では関連性は確定できなかったが、病院内で拡散している可能性も示唆されるため院内感染には注意が必要である。また、MBL産生 *S. marcescens* では1996, 1997, 1998年の3株と1999, 2000年の2株がそれぞれ同一パターンを示した。1996, 1997, 1998年の3株は同一病棟であり、病棟に長期にわたり定着していた可能性が示唆された。1999, 2000年の2株は病棟も異なるため、このころより院内全体に広がっていった可能性を示唆した。検出後の対応がその後の耐性菌の蔓延を左右すると考えられたため、やはり早期の対策を行うことが重要である。この種の耐性菌に対する疫学解析の報告においてはさまざまな方法を用いて調査されているが、Rプラスミドによるものと院内感染によるもの両方の報告があり、両伝播形式を通じて臨床材料からの検出率が上昇する可能性が高いと考えられる。Pulsed field gel electrophoresisでは結果が判明するまでに3~4日かかるためアウトブレイクに対する迅速な対応ができないが、今回用いたAP-PCR法では約1日で結果が判明するため迅速対応が可能であり、日常でのアウトブレイクの対応には有用であると思われる。菌種によっては識別が困難であるという報告^{24, 25)}もあるが、PCR用試薬や反応プログラム、増幅装置の違いにより結果が左右されるため、自施設で由来の違う菌株にてコントロールをとってさえいれば使用可能で問題がないと考えられる。

臨床背景調査では、ESBLおよびMBL産生菌検出患者において、基礎疾患は悪性腫瘍や脳血管障害などの比較的重症例が多く、全例でIVHカテーテルが挿入されていた。このことは長期に入院することで、さまざまな治療や抗菌薬の使用により、MRSAや緑膿菌と同様に耐性菌の定着が起こることが示唆される結果であった。実際、敗血症発症以前に何らかの抗菌薬が投与されており、ほとんどが予防投与やこの種の耐性菌に無効な薬剤であり、抗菌薬投与により耐性株が残存した結果であると考えられる。ESBL感染症に関する治療薬剤はESBLの基質特異性からカルバペネム系やセファマイシン系の薬剤もしくはβ-ラクタム系以外の薬剤が第1選択剤と考えられるが、今回の調査ではカルバペネム系やアミノ配糖体の投与で改善されていた。しかし、2例でCAZが投与され改善している。このときのCAZのMIC値は8 μg/mLであり遺伝子型はCTX-M3と比較的CAZに感受性を示すタイプであった。NCCLSではESBLに関してセファロスポリン系薬剤は臨床的に効果が認められないとしているが、β-ラクタマーゼの基質特異性の違いから同じセフェム系でも有効であるケースも存在する可能性があることを示唆する結果であった。しかし、長期投与などで高度耐性化が考えられるため、NCCLSのコメントにしたがい耐性と報告すべきである。MBL

産生菌による感染症では、基本的にはβ-ラクタム薬による治療は有効性が期待できないと考えられる。しかし、基質特異性からモノバクタムに関しては治療効果が期待できると考えられる。実際に今回の調査でAZT投与により菌の陰性化が認められた症例が存在した。また、われわれはMBL産生菌による腎盂腎炎を経験しているが、その症例においてもAZT投与により軽快している。いずれもAZTのMIC値は8 μg/mLであった。通常投与量におけるAZTの血中濃度や臓器移行性から考えると、感染部位によってはAZTが有効であると考えられる症例も多いと思われる。しかし、セファロスポリナーゼの過剰産生や外膜の変化など他の耐性機構を同時に獲得した場合、AZTのMIC値が上昇し、抗菌力が減少する場合も想定されるので注意が必要である。また、腎移植後の患者では、アミノ配糖体系抗生物質が投与され、菌は陰性化した。しかし、通常 *bla_{IMP}* 遺伝子は *aac* や *aad* などのアミノ配糖体耐性遺伝子などの近傍に存在し、関連して伝達、発現するケースが多いので、アミノ配糖体の長期投与は慎重にする必要があると考えられる。

本邦においてもさまざまな薬剤耐性菌が出現し蔓延しつつある。今回、血液培養から分離された腸内細菌に関する調査を行ったが、実際にさまざまな耐性菌が検出された。今後も耐性菌に関する動向には注意が必要であると思われた。

文 献

- 1) Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, et al.: Concurrent outbreaks of extended-spectrum β-lactamase-producing of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. *J Antimicrob Chemother* 44: 489~499, 1999
- 2) Rebuck J A, Olsen K M, Fey P D, et al.: Characterization of an outbreak due to extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. *Clin Infect Dis* 31: 1368~1372, 2000
- 3) Livermore D M, Yuan M: Antibiotic resistance and production of extended spectrum β-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care unit in Europe. *J Antimicrob Chemother* 38: 409~424, 1996
- 4) 中村竜也, 内田幸子, 平城 均, 他: 直腸腫瘍の術後に腹腔内膿瘍より分離された *Escherichia coli* が産生するSHV-由来extended-spectrum β-lactamase (SHV-12)。感染症誌 74: 112~119, 2000
- 5) 安達桂子, 櫻田政子, 安中めぐみ, 他: メタロβラクタマーゼ産生性 *Serratia marcescens* 検出例の検討。日臨徴誌 9: 244~250, 1999
- 6) Komatsu M, Ikeda N, Aihara M, et al.: Hospital outbreak of MEN-1-derived extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Chemother* 7: 94~101, 2001
- 7) 中村竜也, 柴田尚宏, 土井洋平, 他: 1991年から2000年の間に血液培養より分離された *Serratia marcescens* におけるIMP-1型メタロβ-ラクタマー

- ゼ産生株の解析。感染症誌 76: 246~253, 2002
- 8) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Eleventh informational supplement M 100-S 11: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 2001
 - 9) 小松 方, 木下承皓, 佐藤かおり, 他: 近畿地区における *Escherichia coli* および *Klebsiella* spp. 以外の腸内細菌科からの extended-spectrum β-lactamase 産生菌の分離調査。日化療会誌 50: 135~142, 2002
 - 10) 角田光子, 佐竹幸子, 伊豫部志津子: 腸内細菌科菌種におけるメタロβラクタマーゼ遺伝子の検出。日化療会誌 47: 147~151, 2002
 - 11) 柴田尚宏, 土井洋平, 荒川宜親: メタロβラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌。臨床検査 45: 840~850, 2001
 - 12) Jarlier V, Nicolas M H, Fournier G, et al.: Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 10: 867~878, 1988
 - 13) 小松 方, 相原雅典, 島川宏一, 他: 糞便中からの Extended spectrum β-lactamase 産生性腸内細菌の検出。感染症誌 74: 250~258, 2000
 - 14) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al.: Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol 38: 40~43, 2000
 - 15) Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, et al.: Multifocal outbreaks of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 40: 349~353, 1996
 - 16) Versalovic J, Koeth T, Lupski J R: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 19: 6823~6831, 1991
 - 17) Hejazi A, Keane C T, Falkiner F R, et al.: The use of RAPD-PCR as a typing method for *Serratia marcescens*. J Med Microbiol 46: 913~919, 1997
 - 18) Balis E, Vatopoulos A C, Kanelopoulou M, et al.: Indications of in vivo transfer of an epidemic R plasmid from *Salmonella enteritidis* to *Escherichia coli* of the normal human gut flora. J Clin Microbiol 34: 977~979, 1996
 - 19) Leblebicioglu H, Gunaydin M, Esen S, et al.: Surveillance of antimicrobial resistance in gram negative isolates from intensive care units in Turkey: analysis of data from the last 5 years. J Chemother 14: 140~146, 2002
 - 20) Perilli M, Amico E D, Segatore B, et al.: Molecular characterization of extended-spectrum β-lactamases produced by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from an Italian nationwide survey. J Clin Microbiol 40: 611~614, 2002
 - 21) Bell J M, Turnidge J D, Gales A C, et al.: Prevalence of extended spectrum β-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY antimicrobial surveillance program (1998-99). Diag Micro Infect Dis 42: 193~198, 2002
 - 22) Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al.: Transferable resistance to cefotaxime, ceftaxime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 11: 315~317, 1983
 - 23) 中村竜也, 松尾信昭: 臨床材料から分離された腸内細菌科のβラクタム薬に対する耐性機序の解析。第50回日本化学療法学会総会, 神戸, 2002
 - 24) Patton T G, Katz S, Sobieski R J, et al.: Genotyping of clinical *Serratia marcescens* isolates: a comparison of PCR-based methods. FEMS microbial Lett 194: 19~25, 2001
 - 25) Liu P Y, Lau Y, Hu B, et al.: Use of PCR to study epidemiology of *Serratia marcescens* isolates in nosocomial infection. J Clin Microbiol 32: 1935~1938, 1994

Susceptibility and analysis of resistance to β -lactum agents of Enterobacteriaceae detected in blood cultures

Tatsuya Nakamura¹⁾, Nobuaki Matsuo²⁾ and Hakuo Takahashi¹⁾

¹⁾Clinical Central Laboratory, Kansai Medical University Hospital, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi, Osaka 570-8507, Japan

²⁾Department of Emergency and Critical Care Medicine, Kansai Medical University Hospital

We studied resistance to β -lactum agents in 329 strains of Enterobacteriaceae detected in blood cultures in the 10 years between 1991 and 2000. Drug sensitivity tests showed good sensitivity ($\text{MIC}_{90} \leq 0.5 \text{ g/mL}$) in third-generation cephem and in carbapenem to *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. We found relatively good sensitivity of fourth-generation cephem (the sensitivity of third-generation cephem was slightly lower) and carbapenem to *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. For all Enterobacteriaceae, meropenem was the lowest ($\text{MIC}_{90} \leq 0.12 \mu\text{g/mL}$). Resistance among bacterial species using ceftazidime was the highest in *E. cloacae* (50.5%). Double-disk synergy tests (DDST) were positive in 19 strains and 2-mercapto propionic acid tests (2-MP) were positive in 5 strains. As resistance genes, the extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing gene, CTX-M 1/3, was detected in 18 of 19 strains. The metallo β -lactamase (MBL)-producing gene was detected in 5 strains which were IMP-1. In *K. pneumoniae* detected in 1991, the presence of SHV ESBL-producing bacteria was confirmed. A clinical background survey showed a high incidence of serious conditions such as malignant tumors and cerebrovascular diseases as underlying diseases, and IVH catheters had been inserted in all patients. Clinical symptoms were improved after administration of carbapenem and aminoglycosides in patients with ESBL-producing bacteria infection, and by administration of aztreonam in patients with MBL-producing bacteria infection.