

【原著・基礎】

血液由来 *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤感受性の年次変化日暮 芳己¹⁾・岩井 友美¹⁾・奥住 捷子¹⁾・米山 彰子²⁾・中原 一彦²⁾・木村 哲¹⁾¹⁾東京大学医学部附属病院感染制御部*, ²⁾同 検査部

(平成 14 年 12 月 16 日受付・平成 15 年 3 月 3 日受理)

血液培養検査より分離・同定された *Pseudomonas aeruginosa* 165 株に対する各種抗菌薬の抗菌力をⅠ期 (1987 年以前) Ⅱ期 (1989~1993 年), Ⅲ期 (1995~1999 年) と経年的に比較した。対象とした薬剤は piperacillin (PIPC), ceftazidime (CAZ), cefepime (CFPM), ceftazidime (CZOP), amikacin (AMK), tobramycin (TOB), meropenem (MEPM), imipenem/cilastatin (IPM/CS), panipenem/betamipron (PAPM/BP), levofloxacin (LVFX), ciprofloxacin (CPFX), sparfloxacin (SPFX), norfloxacin (NFLX) の計 13 薬剤で, MIC の測定は日本化学療法学会標準法にしたがい, Intermediate-Resistant rate (IR 率) は NCCLS ドキュメントに記載された S・I・R のカテゴリーを用いた。MIC₅₀ および MIC₉₀ の比較では, β -ラクタム系薬はⅠ期, Ⅱ期およびⅢ期を通して同等または 1 管差以内であった。また, 他の抗菌薬は, Ⅰ期とⅡ期では同等または 2 管差以内であったが, Ⅱ期とⅢ期では MIC₅₀, MIC₉₀ ともに著しい耐性を示した。IR 率の比較では, Ⅰ期とⅡ期では CAZ, CFPM, CZOP, LVFX, AMK, TOB が低下し, PIPC, IPM/CS, MEPM, CPFX, NFLX は上昇した。同様にⅡ期とⅢ期の比較では, PIPC のみが低下し, 他の薬剤は上昇した。特に, IPM/CS, MEPM, CPFX, NFLX は経年的に IR 率が上昇した。今後, 感受性サーベイランスを行う際は, MIC のみの比較ではなく, IR 率も含めてサーベイランスを行い, 耐性菌出現の有無を監視する必要がある。また, empiric therapy での抗菌薬の選択は, 各施設での感受性サーベイランスの結果をもとに, 選択を行う必要がある。

Key words: MIC, IMP-1 metallo- β -lactamase, blood culture

Pseudomonas aeruginosa は自然界に広く分布し, 健常者では問題となることは少ない。しかし, compromised host における opportunistic infection の起炎菌として臨床的に問題となることが多い。特に, 敗血症などを引き起こした場合, エンドトキシンショックから多臓器不全に進展し, 致命的な結果をもたらすことが多く¹⁾に臨床的に重要な菌のひとつである。吉田ら²⁾は *P. aeruginosa* の多剤耐性化傾向が進んでいるとの成績を報告している。われわれは致命的な結果を招く敗血症を疑い検査依頼のあった血液培養検査において分離・同定された *P. aeruginosa* を対象に, empiric therapy における抗菌薬選択の一助を目的に年代別の各種抗菌薬に対する感受性成績を検討し, また, NCCLS ドキュメントにしたがい耐性率の変化について調査を行った。

I. 対象および方法

1) 対象菌株および最小発育阻止濃度

血液培養から分離・同定し, カジトン培地 (栄研) に室温保存された *P. aeruginosa* 165 株 (Ⅰ期: 1981 年~87 年: 44 株, Ⅱ期: 1989~93 年: 51 株, Ⅲ期: 1995~99 年: 70 株) を用いた。同じ患者より時期を経て複数回分離・同定された場合は, それぞれが菌血症のエピソードとして本研究の対象とした。本調査にあたり, 羊血液液

天培地 (日水) に継代したあと, 純培養であることを確認したのち, 使用した。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定を行った薬剤は, piperacillin (PIPC), ceftazidime (CAZ), cefepime (CFPM), ceftazidime (CZOP), amikacin (AMK), tobramycin (TOB), meropenem (MEPM), imipenem/cilastatin (IPM/CS), panipenem/betamipron (PAPM), levofloxacin (LVFX), ciprofloxacin (CPFX), sparfloxacin (SPFX), norfloxacin (NFLX) の計 13 薬剤について日本化学療法学会標準法³⁾による微量液体希釈法において最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。なお, 感受性 (S), 中間値 (I), 耐性 (R) の判定は NCCLS の基準にしたがった⁴⁾

2) 血清型

緑膿菌群別用免疫血清「生研」(デンカ生研) を用い, 説明書にしたがい検索し, 血清型を決定した。

3) IMP-1 metallo- β -lactamase 遺伝子 (*bla*_{IMP-1}) の検索

*bla*_{IMP-1} 遺伝子の検索は IPM/CS の MIC \geq 16 μ g/mL を示した株を対象とした。メルカプト酢酸ナトリウムディスク (栄研: 以下 SMA ディスク) と CAZ ディスクおよび IPM/CS の併用によるスクリーニングとあわせ

て Senda ら⁶⁾の方法により *bla*_{IMP-1} 遺伝子の検索を用い、587 bp の増幅産物の確認を行った。

II. 結 果

1. 各種抗菌薬の抗菌力 (Table 1)

1) β -ラクタム系薬

PIPC の MIC₅₀ は 4 μ g/mL, MIC₉₀ は 64~128 μ g/mL の範囲であった。CAZ の MIC₅₀ の変化は、I 期から III 期を通して 4~8 μ g/mL, MIC₉₀ は 32~64 μ g/mL の範囲であった。CZOP の MIC₅₀ は 2 μ g/mL, MIC₉₀ は 8~16 μ g/mL の範囲であった。CFPM の MIC₅₀ は 4 μ g/mL, MIC₉₀ は 16~32 μ g/mL の範囲であった。

2) カルバペネム系薬

MEPM の MIC₅₀ は I 期から III 期を通して ≤ 1 μ g/mL と変化みられなかった。しかし、MIC₉₀ は I 期から II 期は 2 μ g/mL と変化がみられないが、II 期から III 期は 2 から 16 μ g/mL へと耐性化が認められた。

IPM/CS は I 期から III 期の MIC₅₀ の変化は ≤ 1 ~2 μ g/mL であった。しかし、MIC₉₀ は I 期 2 μ g/mL, II 期 8 μ g/mL, III 期 32 μ g/mL へと耐性化が進んでいた。PAPM/BP は I 期から III 期を通して、MIC₅₀ の変化が 4~8 μ g/mL であった。MIC₉₀ の変化は I 期から II 期が 16 から 32 μ g/mL へ、II 期から III 期では 32 から 64 μ g/mL へと 1 管差ずつ耐性化が進んだ。

3) アミノグリコシド系薬

I 期から II 期の MIC₅₀ および MIC₉₀ は、AMK ではともに 4~8 μ g/mL であった。TOB では、MIC₅₀ は ≤ 1 μ g/

mL と変化がなく、MIC₉₀ は ≤ 1 ~2 μ g/mL であった。しかし、II 期から III 期の変化は AMK で、MIC₅₀ が 8 から 32 μ g/mL, MIC₉₀ が 8 から 128 μ g/mL であった。同様に、TOB では、MIC₅₀ で ≤ 1 から 16 μ g/mL, MIC₉₀ で ≤ 1 から 128 μ g/mL あった。AMK および TOB の両薬剤ともに II 期から III 期で著しい耐性化傾向が認められた。

4) ニューキノロン系薬

LVFX の MIC₅₀ は I 期から III 期を通して ≤ 1 μ g/mL であったが、MIC₉₀ は II 期から III 期で、4 から 64 μ g/mL であった。CPFX の MIC₅₀ は I 期から III 期を通して ≤ 1 μ g/mL であり、I 期から II 期の MIC₉₀ も同様であった。しかし、II 期から III 期での MIC₉₀ 変化は ≤ 1 から 32 μ g/mL であった。SPFX の MIC₅₀ は I 期から III 期を通して ≤ 1 ~2 μ g/mL であった。しかし、MIC₉₀ 変化は I 期 4 μ g/mL, II 期 16 μ g/mL, III 期 64 μ g/mL と耐性化が進んだ。NFLX の MIC₅₀ は I 期から III 期を通して ≤ 1 μ g/mL を示したが、MIC₉₀ 変化は I 期 2 μ g/mL, II 期 4 μ g/mL, III 期 128 μ g/mL と耐性化が進んだ。

2. 中間値および耐性値率 (IR 率) (Fig. 1)

NCCLS の基準⁴⁾に記載された薬剤について、中間値および耐性の判定を得た割合を求めた。

PIPC の IR 率は I 期 9.1%, II 期 11.8%, III 期 8.6% であった。セフェム系薬 3 薬剤 (CAZ, CFPM, CZOP) は I 期から II 期で IR 率は平均 9.8% (7.1~11.3%) 低下したが、II 期から III 期では平均 8.5% (3.7~15.4%)

Table 1. Annual change in MIC range, MIC₅₀ and MIC₉₀ against *Pseudomonas aeruginosa*

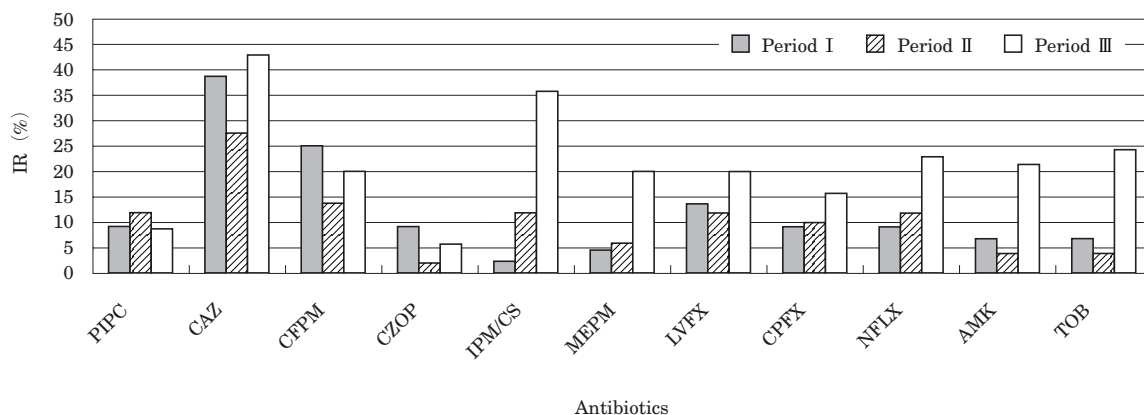
Period	I			II			III		
	range (μ g/mL)	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)	range (μ g/mL)	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)	range (μ g/mL)	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)
β -lactams									
PIPC	≤ 1 - >128	4	64	2 - >128	4	128	2 - >128	4	64
CAZ	≤ 1 - 128	8	64	2 - 64	4	32	≤ 1 - 128	8	32
CZOP	≤ 1 - 64	2	16	≤ 1 - 32	2	16	≤ 1 - 32	2	8
CFPM	≤ 1 - >128	4	32	≤ 1 - 64	4	16	≤ 1 - 64	4	16
Carbapenems									
MEPM	≤ 1 - 8	≤ 1	2	≤ 1 - 16	≤ 1	2	≤ 1 - 32	≤ 1	16
IPM/CS	≤ 1 - 8	≤ 1	2	≤ 1 - 32	2	8	≤ 1 - 32	2	32
PAPM/BP	≤ 1 - 64	4	16	2 - 32	8	32	≤ 1 - 128	8	64
Aminoglycosides									
AMK	≤ 1 - 32	4	4	≤ 1 - 64	8	8	≤ 1 - >128	32	128
TOB	≤ 1 - >128	≤ 1	2	≤ 1 - 128	≤ 1	≤ 1	≤ 1 - >128	16	128
Quinolones									
LVFX	≤ 1 - 64	≤ 1	4	≤ 1 - 128	≤ 1	4	≤ 1 - 64	≤ 1	64
CPFX	≤ 1 - 64	≤ 1	≤ 1	≤ 1 - 128	≤ 1	≤ 1	≤ 1 - 32	≤ 1	32
SPFX	≤ 1 - 64	≤ 1	4	≤ 1 - >64	2	16	≤ 1 - >64	≤ 1	64
NFLX	≤ 1 - >128	≤ 1	2	≤ 1 - 128	≤ 1	4	≤ 1 - 128	≤ 1	128

These organisms were isolated before 1987 (Period I), 1989-1993 (Period II), 1995-1999 (Period III) for each clinical specimen.

PIPC: piperacillin, CAZ: ceftazidime, CZOP: ceftazopran, CFPM: cefepime, MEPM: meropenem, IPM/CS: imipenem/cilastatin,

PAPM/BP: panipenem/betamipron, AMK: amikacin, TOB: tobramycin, LVFX: levofloxacin, CPFX: ciprofloxacin, SPFX: sparfloxacin,

NFLX: norfloxacin



PIPC: piperacillin, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, CZOP: ceftazidime, IPM/CS: imipenem/cilastatin, MEPM: meropenem, LVFX: levofloxacin, CPFY: ciprofloxacin, NFLX: norfloxacin, AMK: amikacin, TOB: tobramycin

Fig. 1. Annual change in IR rate for each isolated period. The breakpoint of intermediate and resistant was classified based on the NCCLS⁴⁾ guideline.

Period I: isolated before 1987, Period II: isolated 1989–1993, Period III: isolated 1995–1999

上昇した。カルバペネム系薬では IPM/CS では 2.3%, 11.8%, 35.8% と経年的に耐性化傾向を示し, MEPM も同様に 4.5%, 5.9%, 20% と同様の傾向であった。ニューキノロン系薬は I 期から II 期にかけて CPFY と NFLX で IR 率が上昇し, LVFX は低下した。しかし, II 期から III 期の 3 薬剤の IR 率が平均 8.4% (6~11%) 上昇した。アミノグリコシド系薬 (AMK, TOB) は I 期から II 期で低下したが, II 期から III 期で, AMK が 17.6%, TOB が 20.4% 上昇した。

3. 年代別多剤耐性菌の分離頻度 (Table 2)

AMK $\geq 32 \mu\text{g/mL}$, IPM/CS $\geq 16 \mu\text{g/mL}$, CPFY $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ の 3 薬剤に耐性を示す菌株の分離頻度を調査した。AMK のみ耐性は I 期より分離され, CPFY においても同様であった。しかし, IPM/CS のみ耐性は II 期より分離された。また, 近年問題となっている「薬剤耐性緑膿菌」の範疇に入る上記 3 薬剤耐性株は 7 株分離された。

これらの分離菌 7 株は 4 人の患者より分離され, 基礎疾患は血液腫瘍疾患であった。(Table 3) 分離株の血清型は E 型, PFGE パターンは「closely related」⁷⁾であった (データ未掲載)。

Table 2. Multidrug-resistant organisms by isolated period

Resistant to	I	II	III
Only IPM/CS	0	3	23
Only AMK	3	2	10
Only CPFY	1	4	10
IPM/CS + AMK + CPFY	0	0	7

Multidrug-resistant organisms were isolated before 1987 (Period I), 1989–1993 (Period II), and 1995–1999 (Period III) for each clinical specimen.

IPM/CS: imipenem/cilastatin, AMK: amikacin, CPFY: ciprofloxacin

4. *bla*_{IMP-1} 遺伝子の有無

IPM/CS の MIC が $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ を示し, III 期に分離した 23 株について検索を行った。*bla*_{IMP-1} 遺伝子を保有する株は存在しなかった。

III. 考 察

P. aeruginosa の毒力は弱く, 健康人に対する病原性は弱い。しかし, 日和見感染症の起因菌として臨床上問題となる。また, 多剤耐性菌は各種感染症において治療困難となるばかりでなく, 院内感染対策上問題となることがある。吉田ら²⁾が 1998 年に分離された菌株を用いて行った感受性サーベイランスによると, 抗緑膿菌薬でも 10% 以上の耐性化率が認められ, OFLX, CPR, SBT/CPZ で 40% 以上と高率であったと報告し, さらに, 系統の異なる 11 抗緑膿菌薬すべてに耐性を示した株の割合は, 1996 年の 14.1% から 1998 年には 18.3% に上昇し, 7 剤以上に耐性を示す菌株の分離頻度は, 1992 年 22.3%, 1994 年 19.7%, 1996 年 25.0%, 1998 年 28.0% と増加し, 多剤耐性化傾向が進んでいると報告している。

今回, われわれは血液培養検査より *P. aeruginosa* が分離され, カジトン培地にて室温保存された菌株を対象

Table 3. Patients with isolated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Patient	Day	WBC (/ μL)	Underlying disease
Y. M.	99. 5. 18	500	Acute lymphocytic leukemia
	99. 5. 25	500	
	99. 5. 28	400	
F. T.	99. 7. 12	200	Malignant lymphoma
A. M.	99. 8. 23	200	Acute myelocytic leukemia
S. E.	99. 10. 16	200	Acute myelomonocytic leukemia
	99. 10. 19	300	

に、再度純培養を行ったのち、MICを測定し、経年的抗菌力の変化について解析を行った。

β -ラクタム系薬のMIC₅₀およびMIC₉₀は、I期・II期・III期を通して同等または1管差であったが、IR率の変化はII期からIII期にかけて、3.7%~15.4%の上昇であり、CAZのIR率の上昇が著しかった。また、この傾向はアミノグリコシド系薬でも同様であった。AMKの耐性率は、1992年9.7%、1994年5.7%、1996年15.2%と報告している⁹⁾。この時期は対象とした成績のII期からIII期への移行期であり、IR率の変化は矛盾しない成績であった。I期からII期にかけてのMIC₅₀およびMIC₉₀の変化は、同等または1管差であったが、II期からIII期はAMKで2~4管差、TOBで4~7管差であり耐性化を裏づける成績となった。

カルバペネム系薬は経年的にMIC₅₀およびMIC₉₀の変化は1~2管差であった。しかし、IR率は経年的に増加し、II期からIII期にかけての増加率は、IPM/CS 24%とMEPMに比べ10%も高い結果となった。*P. aeruginosa*に抗菌活性をもつカルバペネム系薬の耐性化は進んでおり、今後、使用頻度の増加が予測されるbiapemem (BIPM)についても、同様の監視の必要が示唆された。

キノロン系薬は、MIC₅₀の変化は同程度または1管差の変化である。しかし、MIC₉₀の変化はアミノグリコシド系薬と同様にII期からIII期で2~5管耐性側にシフトし、IR率もII期からIII期で6~11%増加し、キノロン系薬の著しい耐性化傾向を示す結果となった。

また、CPFXは注射用としても使用されるキノロン系薬であり、カルバペネム系や第3世代セフェム系注射薬無効肺炎に対して、有効性を期待できる薬剤である⁹⁾ことから、compromised hostの増加傾向のなか、empiricにCPFXの使用機会が増加する可能性があり、監視を強化する必要がある。いわゆる薬剤耐性緑膿菌はIII期(1999年)になり分離されはじめたが、各薬剤単独での耐性獲得はI期またはII期から分離されている。今回分離された薬剤耐性緑膿菌は、血液腫瘍疾患を基礎疾患とする患者より分離され、総白血球数は200~500/ μ Lと極度に低下した易感染状態であった。これら薬剤耐性緑膿菌の血清型はE型であり、PFGEパターンは「closely related」であり、4人の患者は分離された時期が異なっていることから、outbreakではなく、経過中に耐性の獲得および菌交代が行われたと考えられる。

また、これらの多剤耐性菌はSMAディスクとIPM/CSによるclass B β -ラクタマーゼのスクリーニングおよび、IMP-1型 β -ラクタマーゼ産生遺伝子 bla_{IMP-1} 遺伝子の存在は認められなかった。

よって血液由来*P. aeruginosa*に対する各種薬剤の抗

菌活性は、I期~とII期の比較では、MIC₅₀およびMIC₉₀は同等または1管差であった。しかし、II期とIII期の比較ではMIC₅₀およびMIC₉₀はともに著しい耐性化を示した。同様に、IR率は、CAZ, CFPM, CZOP, AMK, TOBがII期で低下し、PIPC, IPM/CS, MEPM, CPFX, NFLXはII期で上昇し、III期では耐性菌の占める割合が上昇した。

今後、血液由来の*P. aeruginosa*に対する感受性サーベイランスを行う際は、MICのみでなく、IR率も含めて調査を行い、さらに、class B β -ラクタマーゼ産生の有無も含め、*P. aeruginosa*の監視を強化する必要がある。また、empiric therapyに用いる抗菌薬は各施設における使用抗菌薬、感受性サーベイランスを考慮し選択する必要がある。

文 献

- 1) 荒川宣親: 遺伝子検査法の実際(耐性遺伝子の検出と型別) 3. 多剤耐性緑膿菌。臨床検査 Yearbook 2000—話題の耐性菌とその検出法—臨床病理レビュー p.100~108, 東京, 2000
- 2) 吉田 勇, 東山伊佐夫, 木村美司, 他: 各種抗菌薬に対する臨床分離株の感受性サーベイランス—その2 1998年分離グラム陰性桿菌—。日化療会誌 48: 610~631, 2000
- 3) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告(1999年)微量液体希釈によるMIC測定法(微量液体希釈法)—日本化学療法学会標準法。Chemotherapy 38: 102~105, 1990
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Information Supplement M 100-S 12. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 2002
- 5) D'Agat E, Venkataraman L, De Girolami P, et al.: Molecular Epidemiology of Acquisition of Ceftazidime-Resistant Gram-Negative Bacilli in a Nonoutbreak setting. J. Clin. Microbiol 35: 2602~2605, 1997
- 6) Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, et al.: Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactam, including carbapenems. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 349~353, 1996
- 7) Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, et al.: Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J. Clin. Microbiol 33: 2233~2239, 1995
- 8) 吉田 勇, 長野 馨, 木村美司: 種々の臨床分離株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス—その2 1996年度分離グラム陰性桿菌について—。日化療会誌 46: 343~362, 1998
- 9) 沖本二郎, 栗原武幸, 本多宣裕, 他: カルバペネム系および第3世代セフェム系注射薬無効肺炎に対するciprofloxacin注射薬の臨床効果。日化療会誌 50: 280~282, 2002

Generational change in antibiotic activity against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from blood culture

Yoshimi Higurashi¹⁾, Tomomi Iwai¹⁾, Katsuko Okuzumi¹⁾, Akiko Yoneyama²⁾,
Kazuhiko Nakahara²⁾ and Satoshi Kimura¹⁾

¹⁾Department of Infection Control & Prevention, ²⁾Department of Clinical Laboratory,
The University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

We made a comparative study of antimicrobial activity in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from blood culture. We divided *P. aeruginosa* chronologically into 3 periods: Period I (before 1987), Period II (1989–1993), and Period III (1995–1999). The minimal inhibitory concentration (MIC), MIC₅₀, and MIC₉₀ were measured to 13 antibiotics: piperacillin (PIPC), ceftazidime (CAZ), cefepime (CFPM), ceftazopran (CZOP), amikacin (AMK), tobramycin (TOB), meropenem (MEPM), imipenem/cilastatin (IPM/CS), panipenem/betamipron (PAPM/BP), levofloxacin (LVFX), ciprofloxacin (CPFM), sparfloxacin (SPFX), and norfloxacin (NFLX). In measurement MIC, we followed the Japanese Chemotherapy Association standard method. Intermediate and Resistant (IR) rates (%) were calculated according to NCCLS document (M100-S12) measuring MIC. β -lactam antibiotics, MIC₅₀ and MIC₉₀ were the same or 1-fold difference during Period I to Period III. Other antibiotics, MIC₅₀ and MIC₉₀ were the same or 2-fold difference during Period I to Period II. MIC₅₀ and MIC₉₀ at Period II and Period III marked changed striking resistance. When we compared the IR rate (%) of Period I and Period II, we found increasing PIPC, IPM/CS, MEPM, CPFX, and NFLX, while we found decreasing CAZ, CFPM, CZOP, LVFX, AMK, and TOB. Comparing the IR rate (%) the Period II with Period III, we found a decrease in only PIPC and an increase in all other antibiotics. We concluded that, in addition to MIC (MIC₅₀ and MIC₉₀), the IR rate should be added to antibiotics susceptibility surveys of *P. aeruginosa*. And it is necessity for empiric therapy to choice proper antibiotics, according to antibiotics susceptibility survey's result in each facility.