

## 【原著・基礎】

## 血液由来のβ-ラクタム薬耐性グラム陰性桿菌に対する isepamicin の抗菌力

黒川 博史・若松 篤・山田 大輔・永田 明義・勝又 一成

保健科学研究所第三検査部耐性菌研究室\*

(平成14年7月18日受付・平成14年9月3日受理)

われわれは、血液培養から検出されたβ-ラクタム薬耐性の、*Escherichia coli* 9株、*Proteus mirabilis* 10株、*Providencia stuartii* 3株、*Enterobacter aerogenes* 3株、*Enterobacter cloacae* 9株、*Serratia marcescens* 10株、*Pseudomonas aeruginosa* 3株、*Klebsiella oxytoca*、*Morganella morganii*、*Citrobacter freundii* がそれぞれ1株ずつの計50株を対象として、isepamicin (ISP) をはじめとしたアミノグリコシド薬およびβ-ラクタム薬のMICを測定した。ISPのMIC rangeは1~≥256 μg/mLであり、MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>はそれぞれ4 μg/mL、16 μg/mLであり、血液培養由来の各種β-ラクタム薬耐性菌に対する有用性が示唆された。

**Key words:** isepamicin, 血液分離菌, β-ラクタム薬耐性, 薬剤感受性

近年、本邦においても、ESBL (extended spectrum β-lactamase) 産生菌やメタロβ-ラクタマーゼ産生菌などのβ-ラクタム薬耐性菌の報告が散見されるようになり<sup>1)</sup>、ますます院内感染対策などの重要性が見直されようとしている。

われわれは、本学会誌に、「IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌のisepamicin (ISP) の抗菌力<sup>2)</sup>および「Extended Spectrum β-lactamase (ESBL) 産生グラム陰性桿菌のISPの抗菌力<sup>3)</sup>を報告した。これらの耐性菌は、日常的に広く使用されているβ-ラクタム薬に耐性化を示す。また、プラスミドなどを介し、広い菌種間において、その耐性遺伝子が拡散する可能性がある。よって、これらの調査は、臨床的のみならず疫学的な分離状況調査などにも有用な情報となる。

しかし、耐性菌の感染症における起因性については、論議される場所であるが、少なくとも敗血症などの全身性感染症から検出される場合は、臨床的にも重要な意義をもつと考えられる。よって、血液培養から検出されるβ-ラクタム薬耐性のグラム陰性桿菌に着目し、その薬剤感受性の動向などを調査することは、臨床的にも有用な情報になると思われた。

今回、血液培養由来のβ-ラクタム薬耐性のグラム陰性桿菌に対する、アミノグリコシド薬のisepamicin (ISP: 旭化成工業株式会社) を中心とした薬剤感受性の評価を行ったので報告する。

## I. 材料と方法

## 1. 被検菌株

1999年12月から2000年3月の期間に、血液培養由来のグラム陰性桿菌*Escherichia coli* 29株、*Klebsiella pneumoniae* 20株、*Proteus mirabilis* 16株、*Providencia stuartii* 5株、*Enterobacter aerogenes* 3株、*Enterobacter cloacae* 11株、*Serratia marcescens* 10株、

*Pseudomonas aeruginosa* 3株、*Morganella morganii* 2株、*Klebsiella oxytoca* および*Citrobacter freundii* 各1株ずつの計101株を収集した。そのなかから、β-ラクタム薬耐性菌として、ampicillin (ABPC) のMICが≥64 μg/mL (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca* を除く) もしくはcefpodoxime (CPDX) が≥2 μg/mLを示す株を選出した。その内訳は、*E. coli* 9株、*P. mirabilis* 10株、*P. stuartii* 3株、*E. aerogenes* 3株、*E. cloacae* 9株、*S. marcescens* 10株、*P. aeruginosa* 3株、*K. oxytoca*、*M. morganii*、*C. freundii* がそれぞれ1株ずつの計50株である。

## 2. MIC値測定薬剤

β-ラクタム薬のpiperacillin (PIPC)、cefoperazone (CPZ)、ceftazidime (CAZ)、cefotaxime (CTX)、cefminox (CMNX)、cefpime (CPR)、imipenem (IPM)、sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ)、aztreonam (AZT) の9薬剤、およびアミノグリコシド薬のISP、gentamicin (GM)、amikacin (AMK)、tobramycin (TOB)、dibekacin (DKB) の5薬剤、計14剤について実施した。

## 3. MIC値の測定

日本化学療法学会標準法<sup>4)</sup>にもとづき微量液体希釈法で測定した。

測定用マイクロプレートは栄研化学株式会社において、フローズンプレート栄研<sup>®</sup>をオーダーメイドにて作成したものを使用し、プレートの精度管理は、ATCC<sup>®</sup> (American Type Culture Collection) のATCC 25922 *E. coli* およびATCC 27853 *P. aeruginosa* について測定し、各標準株のMICが範囲内<sup>5)</sup>であることを確認した。

\*神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町563F

菌量の調整は約  $10^5$  cfu/well になるように接種し、35°C で約 18 時間培養後、各ウェルの発育を肉眼的に確認した。

### 3. ディスク拡散法による各種耐性菌の確認

ESBL 産生菌の確認は、NCCLS<sup>5)</sup>の推奨するクラブラン酸添加ディスクによるディスク拡散法の阻止円拡大を観察するため、栄研化学 KB ディスクのクラブラン酸添加 CAZ ディスク、クラブラン酸添加 CTX ディスク、およびクラブラン酸添加 CPDX ディスクを使用した。

メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の確認は、荒川らが報告<sup>6)</sup>した 2-メルカプトプロピオン酸法により確認するため、栄研化学のメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ SMA 栄研を使用した。

### 4. 分子遺伝学的解析

PCR 法の反応系は、滅菌精製水を 30  $\mu$ L、10 $\times$ バッファーを 5  $\mu$ L、dNTP を 4  $\mu$ L、プライマーを各 0.5  $\mu$ L、Taq ポリメラーゼを 0.25  $\mu$ L、DNA テンプレート (MacFarland 0.5 の濃度の菌液を 100°C で 10 分ボイリングし、4°C、13,000 rpm で 5 分間遠心した上清を用いる) を 15  $\mu$ L の計 50  $\mu$ L の系で実施した。

反応条件は、94°C 2 分の変性反応後、94°C 1 分、53°C 1 分、72°C 1 分 30 秒を 30 サイクル後、72°C 5 分の延長反応で行った。

使用した各種 PCR プライマーは<sup>7)</sup>、TEM-型 (PCR 産物のサイズは 824 bp)、T 1: 5'-CCGTGTCGCCC-TTATTCC-3', T 2: 5'-AGGCACCTATCTCAGCGA-3', SHV-型 (PCR 産物のサイズは 1,051 bp)、S 1: 5'-ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC-3', S 2: 5'-TTTATGGCGTTACCTTTGACC-3', CTX-M-1 系 (PCR 産物のサイズは 393 bp)、M 1-1: 5'-CGGTGCTGAA-GAAAAGTG-3', M 1-2: 5'-TACCCAGCGTCAGATTAC-3', CTX-M-2 系 (PCR 産物のサイズは 780 bp)、M 2-1: 5'-ACGCTACCCCTGCTATTT-3', M 2-2: 5'-CCTTTCCGCTTCTGCTC-3', Rbi-A 型などの *K. oxytoca* 由来の  $\beta$ -ラクタマーゼ (PCR 産物のサイズは 872 bp)、R 1: 5'-GCTGCGACTTATCACTCTCAA-3', R 2: 5'-GCTGCGGCTAACACCTCTTTG-3', IMP-1 (PCR 産物のサイズは 587 bp)、I 1: 5'-ACCGCAGC-AGAGTCTTTGCC-3', I 2: 5'-ACAACCAGTTTTG-CCTTACC-3', である。

## II. 結 果

### 1. 薬剤感受性の分布

菌種別の MIC 値の測定結果を Table 1 に示す。

*P. aeruginosa* については、ISP の MIC range が  $16 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$ 、AMK では  $16 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$ 、GM では  $4 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$  と、アミノグリコシド薬に対しては幅広い MIC range を示した。

*E. aerogenes*, *E. cloacae*, *C. freundii* については、 $\beta$ -ラクタム薬やアミノグリコシド薬に低い MIC<sub>90</sub> を示

した。CAZ と CTX に対する MIC<sub>90</sub> を算出すると、128  $\mu\text{g/mL}$  であったが、ISP では 2  $\mu\text{g/mL}$ 、AMK で 4  $\mu\text{g/mL}$ 、GM で 1  $\mu\text{g/mL}$  であった。

*E. coli* については、PIPC 以外の  $\beta$ -ラクタム薬については低い MIC<sub>90</sub> を示した。ISP の MIC<sub>90</sub> は 8  $\mu\text{g/mL}$  であり、AMK では 16  $\mu\text{g/mL}$ 、GM では  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$  であった。GM に対する MIC が  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$  を示す株が 1 株存在したが、その株の ISP の MIC は 4  $\mu\text{g/mL}$  であった。

*S. marcescens* については、アミノグリコシド薬に対する MIC range は、ISP で 1~8  $\mu\text{g/mL}$ 、GM で 0.25~8  $\mu\text{g/mL}$  であったが、AMK では 1~64  $\mu\text{g/mL}$ 、TOB では 4~128  $\mu\text{g/mL}$ 、DKB では  $4 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$  と幅広い値を示した。このなかに、SHV-型 ESBL 産生株と IMP-1 型メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株が 1 株ずつ確認された。この SHV-型 ESBL 産生株は、クラブラン酸添加ディスク拡散法による判定により ESBL と判断され、PCR 法により SHV-型であると確認された。Table 3 にそれらの MIC 値を示すが、SHV-型 ESBL 産生株の CAZ, CTX, CPR, CMNX, AZT, IPM の MIC は、順に  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ , 128  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ , 0.5  $\mu\text{g/mL}$  であったが、ISP, AMK, GM の MIC は、順に 1  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 0.25  $\mu\text{g/mL}$  であった。また、IMP-1 型メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株のそれは、 $\beta$ -ラクタム薬の CAZ が 32  $\mu\text{g/mL}$ 、AZT が 64  $\mu\text{g/mL}$ 、IPM が 4  $\mu\text{g/mL}$ 、それ以外は  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$  であったが、ISP と GM で 8  $\mu\text{g/mL}$ 、AMK は 32  $\mu\text{g/mL}$  であった。

*P. mirabilis*, *M. morgani*, *P. stuartii* については、 $\beta$ -ラクタム薬の CAZ や CMNX, AZT, IPM に対しては、低い MIC<sub>90</sub> を示したが、CTX や CPZ, CPR, PIPC に対しては高い MIC<sub>90</sub> を示した。Table 3 に CTX-M-2 系  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株の MIC 値を示した。これら 10 株に対する MIC<sub>90</sub> を算出すると、CAZ, CTX, CPR, CMNX, AZT, IPM では、順に 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ ,  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ , 2  $\mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$ , 2  $\mu\text{g/mL}$  であり、アミノグリコシド薬の ISP では 16  $\mu\text{g/mL}$ 、AMK で 32  $\mu\text{g/mL}$ 、GM で 16  $\mu\text{g/mL}$  であった。

### 2. 耐性率の分析

臨床的な観点から、耐性判定の指標は NCCLS 基準を用い、耐性率を求め、Table 4 に示した。ただし、ISP, DKB, SBT/CPZ, CPR, CMNX の 5 薬剤については、NCCLS 基準に設定がないため、便宜的に以下のようにした。ISP は Barry らの報告<sup>9)</sup>にもとづき、 $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  を耐性とし、DKB は本学会の定める呼吸器感染症におけるブレイクポイントが GM と同一であることから GM と同値とし、SBT/CPZ は CPZ と、CPR は CFPM と、CMNX は NCCLS 基準の CTT と同値とした。

もっとも耐性率の低かった薬剤は IPM であり、すべ

Table 1-1. Antibacterial activity for gram-negative rods resistance to β-lactams isolated from blood

Organism (No. of isolates)	Antibacterial agents	MIC (μg/mL)		
		range	50%	90%
<i>Escherichia coli</i> (9)	iseipamicin	2-8	2	8
	amikacin	2-16	4	16
	gentamicin	1-≥256	2	≥256
	tobramycin	2-64	4	64
	dibekacin	2-128	4	128
	piperacillin	0.25-≥256	≥256	≥256
	cefoperazone	0.5-16	2	16
	sulbactam/cefoperazone	0.5-8	1	8
	ceftazidime	0.25-2	0.5	2
	cefotaxime	≤0.06-2	0.25	2
	cefpime	≤0.06-0.25	0.12	0.25
	cefminox	0.5-16	1	16
	aztreonam	0.12-8	0.25	8
	imipenem	≤0.06-0.12	0.12	0.12
<i>Enterobacter cloacae</i> (9)	iseipamicin	1-32	2	32
	amikacin	2-64	4	64
	gentamicin	0.5-1	1	1
	tobramycin	1-32	2	32
	dibekacin	1-128	2	128
	piperacillin	2-≥256	16	≥256
	cefoperazone	0.5-≥256	8	≥256
	sulbactam/cefoperazone	0.5-32	8	32
	ceftazidime	0.5-128	2	128
	cefotaxime	0.25-≥256	4	≥256
	cefpime	0.12-128	0.25	128
	cefminox	≥256	≥256	≥256
	aztreonam	0.12-64	2	64
	imipenem	0.25-4	1	4
<i>Enterobacter aerogenes</i> (3)	iseipamicin	1-4	2	4
	amikacin	4	4	4
	gentamicin	1	1	1
	tobramycin	2-4	4	4
	dibekacin	2-4	4	4
	piperacillin	4-128	2	128
	cefoperazone	0.12-32	0.5	32
	sulbactam/cefoperazone	0.12-8	0.5	8
	ceftazidime	0.25-32	2	32
	cefotaxime	0.25-32	0.5	32
	cefpime	≤0.06-0.5	0.25	0.5
	cefminox	≥256	≥256	≥256
	aztreonam	≤0.06-16	8	16
	imipenem	1-4	2	4
<i>Serratia marcescens</i> (10)	iseipamicin	1-8	8	8
	amikacin	1-64	16	32
	gentamicin	0.25-8	2	4
	tobramycin	4-128	64	128
	dibekacin	4-≥256	128	≥256
	piperacillin	4-≥256	≥256	≥256
	cefoperazone	2-≥256	≥256	≥256
	sulbactam/cefoperazone	2-≥256	16	128
	ceftazidime	0.25-≥256	1	32
	cefotaxime	0.25-≥256	16	128
	cefpime	≤0.06-≥256	0.5	≥256
	cefminox	8-≥256	32	64
	aztreonam	0.25-≥256	2	64
	imipenem	0.5-4	1	4

Table 1-2. Antibacterial activity for gram-negative rods resistance to  $\beta$ -lactams isolated from blood

Organism (No. of isolates)	Antibacterial agents	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		range	50%	90%
<i>Proteus mirabilis</i> (10)	isepamicin	1-64	4	32
	amikacin	2-64	4	32
	gentamicin	0.5-16	2	8
	tobramycin	2-64	8	64
	dibekacin	2-64	8	64
	piperacillin	4- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefoperazone	1- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	sulbactam/cefoperazone	0.5-32	8	8
	ceftazidime	$\leq 0.06-1$	0.5	0.5
	cefotaxime	$\leq 0.06-\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefpime	$\leq 0.06-\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefminox	0.5-2	1	1
	aztreonam	$\leq 0.06-64$	0.5	8
	imipenem	0.5-2	1	2
<i>Providencia stuartii</i> (3)	isepamicin	4- $\geq 256$	16	$\geq 256$
	amikacin	2- $\geq 256$	4	$\geq 256$
	gentamicin	4- $\geq 256$	16	$\geq 256$
	tobramycin	16- $\geq 256$	32	$\geq 256$
	dibekacin	16- $\geq 256$	64	$\geq 256$
	piperacillin	16-128	128	128
	cefoperazone	8- $\geq 256$	16	$\geq 256$
	sulbactam/cefoperazone	4-16	16	16
	ceftazidime	0.12-1	1	1
	cefotaxime	0.12- $\geq 256$	1	$\geq 256$
	cefpime	0.12- $\geq 256$	1	$\geq 256$
	cefminox	0.25-4	1	4
	aztreonam	$\leq 0.06-0.5$	$\leq 0.06$	0.5
	imipenem	0.25-2	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3)	isepamicin	16- $\geq 256$	16	$\geq 256$
	amikacin	16- $\geq 256$	16	$\geq 256$
	gentamicin	4- $\geq 256$	32	$\geq 256$
	tobramycin	2- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	dibekacin	4- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	piperacillin	8-32	8	32
	cefoperazone	4-32	8	32
	sulbactam/cefoperazone	4-32	8	32
	ceftazidime	2-4	4	4
	cefotaxime	32-128	32	128
	cefpime	4-16	8	16
	cefminox	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	aztreonam	8-32	8	32
	imipenem	2	2	2
Other strains (3)*	isepamicin	1-2	2	2
	amikacin	1-4	2	4
	gentamicin	0.12-1	0.5	1
	tobramycin	0.5-2	1	2
	dibekacin	0.5-2	1	2
	piperacillin	64- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefoperazone	32- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	sulbactam/cefoperazone	2- $\geq 256$	32	$\geq 256$
	ceftazidime	4-128	16	128
	cefotaxime	8-64	64	64
	cefpime	0.25-32	16	32
	cefminox	1- $\geq 256$	2	$\geq 256$
	aztreonam	2- $\geq 256$	64	$\geq 256$
	imipenem	0.5-2	1	2

\**Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*

Table 2. MIC of oxymino type β-lactam-resistant Enterobacteriae isolated from blood

Organism	Strain no.	MIC (μg/mL)						
		ISP	AMK	GM	TOB	DKB	PIPC	CPZ
<i>Citrobacter freundii</i>	IB 40	2	4	1	2	2	≥256	≥256
<i>Enterobacter aerogenes</i>	IB 36	2	4	1	4	4	128	32
<i>Enterobacter cloacae</i>	IB 41	1	2	0.5	1	1	≥256	≥256
<i>Enterobacter cloacae</i>	IB 79	2	2	0.5	1	2	16	32
<i>Enterobacter cloacae</i>	IB 83	2	2	0.5	1	1	≥256	≥256

  

Organism	Strain no.	MIC (μg/mL)						
		SBT/CPZ	CAZ	CTX	CPR	CMNX	AZT	IPM
<i>Citrobacter freundii</i>	IB 40	32	128	64	32	≥256	64	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	IB 36	8	32	32	0.5	≥256	16	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	IB 41	32	128	128	64	≥256	64	0.25
<i>Enterobacter cloacae</i>	IB 79	32	32	64	2	≥256	64	4
<i>Enterobacter cloacae</i>	IB 83	32	128	≥256	128	≥256	64	0.5

ISP: isepamicin, AMK: amikacin, GM: gentamicin, TOB: tobramycin, DKB: dibekacin, PIPC: piperacillin, CPZ: cefoperazone, SBT/CPZ: sulbactam/cefoperazone, CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, CPR: ceftipime, CMNX: cefminox, AZT: aztreonam, IPM: imipenem

Table 3. MIC of ESBL and metallo-β-lactamase producers isolated from blood

β-lactamase	Organism	Strain no.	MIC (μg/mL)						
			ISP	AMK	GM	TOB	DKB	PIPC	CPZ
CTX-M-type β-lactamase producers	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 14	4	4	8	8	16	64	≥256
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 16	4	4	16	8	8	≥256	≥256
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 33	64	64	2	64	64	≥256	≥256
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 52	4	4	8	8	8	≥256	≥256
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 56	32	32	4	64	64	≥256	≥256
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 59	16	32	1	32	32	≥256	≥256
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 66	16	16	0.5	16	32	≥256	≥256
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 89	4	4	2	2	2	≥256	≥256
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 110	1	2	1	4	4	≥256	≥256
	<i>Providencia stuartii</i>	IB 26	4	2	16	32	64	128	≥256
SHV-derived ESBL producers	<i>Serratia marcescens</i>	IB 54	1	1	0.25	4	4	≥256	≥256
IMP-1 metallo β-lactamase producer	<i>Serratia marcescens</i>	IB 49	8	32	8	64	128	≥256	≥256

  

β-lactamase	Organism	Strain no.	MIC (μg/mL)						
			SBT/CPZ	CAZ	CTX	CPR	CMNX	AZT	IPM
CTX-M-type β-lactamase producers	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 14	4	0.25	≥256	≥256	1	0.12	1
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 16	8	0.5	≥256	≥256	1	0.25	0.5
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 33	8	0.5	≥256	≥256	2	0.5	2
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 52	8	0.5	≥256	≥256	1	64	2
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 56	8	0.5	≥256	≥256	1	8	2
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 59	8	0.5	128	≥256	1	0.5	2
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 66	16	0.5	≥256	≥256	0.5	1	2
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 89	8	1	≥256	≥256	1	1	1
	<i>Proteus mirabilis</i>	IB 110	4	0.25	≥256	≥256	1	0.25	1
	<i>Providencia stuartii</i>	IB 26	16	1	≥256	≥256	4	0.5	2
SHV-derived ESBL producer	<i>Serratia marcescens</i>	IB 54	8	≥256	128	≥256	8	≥256	0.5
IMP-1 metallo β-lactamase producer	<i>Serratia marcescens</i>	IB 49	≥256	32	≥256	≥256	≥256	64	4

ISP: isepamicin, AMK: amikacin, GM: gentamicin, TOB: tobramycin, DKB: dibekacin, PIPC: piperacillin, CPZ: cefoperazone, SBT/CPZ: sulbactam/cefoperazone, CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, CPR: ceftipime, CMNX: cefminox, AZT: aztreonam, IPM: imipenem

Table 4. Resistance by NCCLS standard gram-negative rod isolated from blood

Organism (No. of strains)	No. of strains (rate of resistance)						
	ISP	AMK	GM	TOB	DKB	PIPC	CPZ
<i>Escherichia coli</i> (9)	0(0%)	0(0%)	1(11.1%)	1(11.1%)	1(11.1%)	6(66.7%)	0(0%)
<i>Enterobacter cloacae</i> (9)	1(11.1%)	1(11.1%)	0(0%)	1(11.1%)	1(11.1%)	3(33.3%)	2(22.2%)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (3)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(33.3%)	0(0%)
<i>Serratia marcescens</i> (10)	0(0%)	1(10%)	0(0%)	6(60%)	8(80%)	6(60%)	7(70%)
<i>Proteus mirabilis</i> (10)	2(2%)	1(10%)	1(10%)	4(40%)	5(50%)	8(80%)	9(90%)
<i>Providencia stuartii</i> (3)	1(33.3%)	1(33.3%)	2(66.7%)	3(100%)	3(100%)	2(66.7%)	1(33.3%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3)	1(33.3%)	1(33.3%)	2(66.7%)	2(66.7%)	2(66.7%)	0(0%)	0(0%)
Other strains* (3)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	2(66.7%)	2(66.7%)

  

Organism (No. of strains)	No. of strains (rate of resistance)						
	SBT/CPZ	CAZ	CTX	CPR	CMNX	AZT	IPM
<i>Escherichia coli</i> (9)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<i>Enterobacter cloacae</i> (9)	0(0%)	2(22.2%)	4(44.4%)	2(22.2%)	9(100%)	4(44.4%)	0(0%)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (3)	0(0%)	1(33.3%)	0(0%)	0(0%)	3(100%)	0(0%)	0(0%)
<i>Serratia marcescens</i> (10)	4(40%)	1(10%)	4(40%)	2(20%)	6(60%)	2(20%)	0(0%)
<i>Proteus mirabilis</i> (10)	0(0%)	0(0%)	9(90%)	9(90%)	0(0%)	1(10%)	0(0%)
<i>Providencia stuartii</i> (3)	0(0%)	0(0%)	1(33.3%)	1(33.3%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3)	0(0%)	0(0%)	1(33.3%)	0(0%)	3(100%)	1(33.3%)	0(0%)
Other strains* (3)	1(33.3%)	1(33.3%)	2(66.7%)	0(0%)	1(33.3%)	2(66.7%)	0(0%)

\**Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*

ての株で耐性率は0%であった。また、ISPの耐性率は、*E. coli*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *M. morganii*において0%であり、測定した14薬剤のなかでもIPMに次ぐ低い耐性率を示した。

### III. 考 察

*E. cloacae*で3株、*E. aerogenes*, *C. freundii*でそれぞれ1株ずつ、拡張型クラスCタイプβ-ラクタマーゼ(CAZやCTXの薬剤耐性がクラブラン酸添加法により阻害されず、2-メルカプトプロピオン酸法により阻害されない場合)の産生が疑われる株が確認され、β-ラクタマーゼに対するMIC rangeに広い幅が生じた。Table 2にこれらの耐性株のMIC値を示す。

*E. coli*について、PIPCのMIC<sub>90</sub>が高値であったのは、すべての株がTEM型ペニシラーゼ産生株であることが明らかとなり、それに起因するものといえた。

*S. marcescens*については、β-ラクタマーゼについては幅広いMIC rangeを示す薬剤が多くみられたが、これは本菌の染色体性のクラスCタイプβ-ラクタマーゼに起因するものと考えられる。また、PCR法でSHV型が確認されたが、これらがSHV-1型のペニシラーゼなのか、もしくはこの耐性を担うSHV型ESBLなのかを判断する必要がある。この場合シーケンスをして確定することが最良であるが、今回、多くのSHV型ESBLのPCR産物が制限酵素*NheI*で切断される方法<sup>8)</sup>を利用した。この方法ではSHV2~SHV12までのESBLのなかで、SHV-6, SHV-8以外のものは区別することができる。その結果、このSHV型がESBLであることが裏づけられた。

*P. mirabilis*, *M. morganii*, *P. stuartii*について、β-ラクタマーゼのCAZやCMNX, AZT, IPMに対しては、低いMIC<sub>90</sub>を示したが、CTXやCPZ, CPR, PIPCに対しては高いMIC<sub>90</sub>を示したのは、*P. mirabilis*の10株中9株が、*P. stuartii*の3株中の1株がCTX-M-2系β-ラクタマーゼ産生株であったことに起因するといえた。

本邦におけるESBLの分離状況は、八木らの報告<sup>1)</sup>では、*K. pneumoniae*および*E. coli*において1%程度といわれている。しかし、今回の調査では、*P. mirabilis*から、9株(*P. mirabilis*の総調査母数が16株なので分離率は56.3%)のCTX-M-2系β-ラクタマーゼ産生株が確認され、本邦においてもESBL産生菌の増加傾向が懸念される。これらESBL産生菌に対するISPの抗菌力は、その有用性を本学会誌に報告<sup>3)</sup>したが、今回もそのデータを裏づける結果となった。

ESBL産生菌と同様に、メタロβ-ラクタマーゼ産生菌の増加傾向も懸念されているが<sup>10)</sup>、今回の調査でも*S. marcescens*から1株(*S. marcescens*の総調査母数が10株なので分離率は10%)のメタロβ-ラクタマーゼ産生株が確認された。メタロβ-ラクタマーゼ産生株に対するISPの抗菌力も、本学会誌にその有用性を報告<sup>2)</sup>した。

臨床分離アミノグリコシド薬耐性菌の耐性機構の多くは、アミノグリコシド修飾酵素<sup>11,12)</sup>によるといわれるが、本調査で確認されたアミノグリコシド薬耐性株の耐性パターンにおいても、ISP+AMK耐性型やGM耐性型に大別され、ISP+AMK耐性タイプは、AAC (amino-

glycoside acetyltransferase) (6') や AAD (aminoglycoside adenyltransferase) (4') など, GM 耐性タイプでは, AAC (3) や APH (aminoglycoside phosphotransferase) (2'') などによるものと考えられる。今回確認されたアミノグリコシド薬耐性株については, 今後の分子遺伝学的な解析をまたねばならない。

今回, 臨床的な有意性が高いと考えられる血液培養分離の, β-ラクタム薬耐性のグラム陰性桿菌に着目した調査を行った。その結果, ESBL 産生菌をはじめとして, メタロβ-ラクタマーゼ産生菌や拡張型クラスC型β-ラクタマーゼ産生菌などの, 各種β-ラクタム薬耐性菌が検出され, アミノグリコシド薬のISPは, これらのβ-ラクタム薬耐性菌に対し, 有用な抗菌薬のひとつであるといえた。今後, 選択肢のひとつとして, アミノグリコシド薬などの慎重な選択が期待されよう。

#### 文 献

- 1) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, et al.: A preliminary survey of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiology Lett.* 184: 53~56, 2000
- 2) 黒川博史, 山田大輔, 永田明義, 他: IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の isepamicin (ISP) の抗菌力。日化療会誌 49: 103~107, 2001
- 3) 黒川博史, 山田大輔, 若松 篤, 他: ESBL産生グラム陰性桿菌の isepamicin (ISP) の抗菌力。日化療会誌 49: 611~614, 2001
- 4) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定委員会報告: 微量液体希釈法—日本化学療法学会標準法—。Chemotherapy 38: 102~105, 1990
- 5) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference standards for antimicrobial susceptibility testing: Ninth Informational Supplement. NCCLS document M 100-S 9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1999
- 6) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al.: Convenience test for screening Metallo-β-lactamase-producing Gram-negative bacteria by using Thiol compounds. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 40~43, 2000
- 7) 八木哲也, 黒川博史, 柴田尚宏, 他: ESBLs 遺伝子の検出法。臨床と微生物 26: 145~152, 1999
- 8) Nuesch-Inderbine M T, Hachler H, Kayser F H: Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamase in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 398~402, 1996
- 9) Barry A L, Thornsberry C, Jonens R N, et al.: Interpretive standards for disk susceptibility test with Sch 21420 and amikacin. *Antimicrobial Agents and Chemother* 18: 616~621, 1980
- 10) Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, et al.: Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Lancet* 11: 354 (9182): 955, 1999
- 11) 堀田国元: アミノグリコシド系薬剤。日本臨床 55: 219~225, 1997
- 12) Shaw K J, Rather P N, Hare R S: Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the Aminoglycoside-Modifying-Enzymes. *Microbiological Reviews* 57: 138~163, 1993

## Susceptibility testing isepamicin for gram-negative rod resistance to β-lactams isolated from blood

Hiroshi Kurokawa, Atsushi Wakamatsu, Daisuke Yamada,  
Akiyoshi Nagata and Kazunari Katsumata

Health Science Research Institutes, 3rd Diagnostic Division, Bacteriology, Antibacterials Resistance Research, 56 Godo-cho, Hodogaya-ku, Yokohama 240-0005, Japan

We studied susceptibility testing isepamicin (ISP) of aminoglycosides and antibacterials for gram-negative rod resistance to β-lactams isolated from blood. MICs of 14 antibacterial agents, aminoglycosides, and β-lactams against gram-negative rods. Bacterial strains were 50 clinical isolates, 9 of *Escherichia coli*, 10 of *Proteus mirabilis*, 3 of *Providencia stuartii*, 3 of *Enterobacter aerogenes*, 9 of *Enterobacter cloacae*, 10 of *Serratia marcescens*, 3 of *Pseudomonas aeruginosa*, 1 of *Klebsiella oxytoca*, 1 of *Morganella morganii*, and 1 of *Citrobacter freundii*. MICs of ISP ranged from 1 to ≥256 μg/mL. MIC<sub>50</sub> was 4 μg/mL and MIC<sub>90</sub> was 16 μg/mL. Our results suggest that ISP is an effective antibacterial agent against β-lactam resistance from blood.