

【原著・臨床】

血液およびその他の臨床材料から同時に分離された緑膿菌の薬剤感受性 (2005年~2006年)

金山 明子^{1,2)}・雑賀 威¹⁾・伊与田貴子¹⁾・貴田美寿々¹⁾・渋谷 理恵¹⁾
長谷川美幸¹⁾・池田 文昭¹⁾・小林 寅喆²⁾・辻 明良²⁾

¹⁾ 三菱化学メディエンス化学療法研究室*

²⁾ 東邦大学医学部看護学科感染制御学

(平成20年8月25日受付・平成20年12月2日受理)

2005年2月から2006年10月の1年9カ月間に当センターに提出された血液培養ボトル49,998本(24,999症例)のうち207本(148症例)より *Pseudomonas aeruginosa* が検出された。これらの菌株の CLSI のブレイクポイントに基づく各種抗菌薬に対する耐性率は amikacin に対して3.4%と最も低かった。Piperacillin, tazobactam/piperacillin, meropenem, ceftazidime, ciprofloxacin に対する耐性率は10.8~20.3%, imipenem に対しては31.1%の株が耐性を示した。多剤耐性株は6症例より検出され、このうち4例からの株はメタロ β -lactamase 産生株であった。血液から *P. aeruginosa* が検出された症例のうち55例は血液以外の臨床材料からも *P. aeruginosa* が検出された。このうち喀痰から検出された症例が28例と最も多く、次いで尿からの14例であった。血液以外の材料由来株の薬剤感受性は血液由来株よりも各種抗菌薬に対する耐性率が高い傾向が認められた。

血液より *P. aeruginosa* が検出された場合には、同時に他の臨床材料についても培養および感受性検査を実施する必要があると考えられた。

Key words: blood culture, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, metallo β -lactamase

Pseudomonas aeruginosa は日和見感染の原因菌であり病院内感染例から多く分離され、院内感染対策上重要な病原体である¹⁾。本菌による感染症は予後不良で、特に、敗血症などを引き起こした場合の致死率は高い^{2,3)}。また、本菌は元来各種抗菌薬に抵抗性を示し、さらに、近年では多剤耐性株やメタロ β -lactamase 産生株が出現し、本菌による院内感染事故などの社会的問題となっている⁴⁾。

今回われわれは、全国の医療機関より提出された血液培養ボトルから *P. aeruginosa* の検出頻度を調査し、抗緑膿菌薬に対する薬剤感受性を測定した。また、血液から *P. aeruginosa* が分離された患者については血液以外の部位での感染・保菌状態を把握するため、血液以外の臨床材料から分離された *P. aeruginosa* 株についても同様に調査を行った。

I. 材料と方法

1. 対象材料

2005年2月から2006年10月の1年9カ月間に全国の医療機関より提出された24,999症例より採取された血液培養ボトル49,998本、および血液培養ボトルより *P. aeruginosa* が検出された症例の血液の採取日から前後2週間以内に提出された血液以外の臨床材料を対象とした。なお血液培養ボトルは1症例より BACTEC ボトル 92F 好気用レズンボトル、93F 嫌気用レズンボトル(日本

ベクトン・ディッキンソン)の両者に採取したペアボトルを対象とした。分離株は同定後、各種測定までスキムミルクにて-70℃以下に保存した。

2. 薬剤感受性測定

薬剤感受性は CLSI M100-S16 に準じた微量液体希釈法にて測定した。測定薬剤は piperacillin (PIPC), tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), meropenem (MEPM), imipenem (IPM), ceftazidime (CAZ), cefepime (CFPM), cefpirome (CPR), amikacin (AMK), gentamicin (GM), ciprofloxacin (CPFX) を使用した。各測定薬剤における耐性率は CLSI M100-S16 の基準に従い判定した。多剤耐性緑膿菌の判定は、感染症法における薬剤耐性緑膿菌感染症の届出基準に従い、IPM の MIC 値が $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 、AMK が $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ 、CPFX が $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ の MIC 値を示す菌株とした。なお同一症例の同種材料より複数回にわたり *P. aeruginosa* が検出された場合、初回検出菌株の MIC 値と比較し2管以内の MIC を示す株は同一株とみなし、初回に分離された菌株の値のみを採用し、薬剤感受性結果の集計を行った。

3. メタロ β -lactamase の検出

メタロ β -lactamase 産生性はメタロ- β -ラクタマーゼ SMA (栄研化学) を用いスクリーニングを実施し、産生

Table 1. Age of patients with *P. aeruginosa* isolated from blood

Age (y.o.)	No. (%)** of cases			Total (%)**
	Male	Female	Unknown	
0	0	1	0	1 (1.0)
1-39	0	0	0	0
40-49	2	0	0	2 (1.9)
50-59	3	1	1	5 (4.8)
60-69	7	8	0	15 (14.3)
70-79	33	8	0	41 (39.0)
≥ 80	20	20	1	41 (39.0)
Unknown	26	15	2	43
Total	91 (63.2)	53 (36.8)	4	148

* The percentage was calculated from the total number except for unknown cases.

Table 2. Isolation frequency of *P. aeruginosa* from blood and other specimens

Specimens	No. (%) of cases (n = 148)
Blood ^{a)}	93 (62.8)
Blood + other ^{b)}	55 (37.2)

Details of other specimens ^{c)}	
Sputum	28 (42.4)
Urine	14 (21.2)
IVH catheter	13 (19.7)
Pus/decubitus	4 (6.1)
Bile	4 (6.1)
Other	3 (4.5)
Total	66

^{a)}No. of cases with *P. aeruginosa* isolated from blood specimens.

^{b)}No. of cases with *P. aeruginosa* isolated from blood and other specimens.

^{c)}More than 1 specimen was obtained from each case.

株については, Senda らの方法により *bla*IMP 遺伝子の保有の有無を確認した⁵⁾。

4. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析

同一患者より *P. aeruginosa* が複数株検出された症例について PFGE にて分離株の同一性を検討した。PFGE は制限酵素 *speI* を用い, CHEF-DRIII にて 1% アガロースにて 6V/cm で 20 時間泳動を行い, PFGE により得られたバンドパターンから分類した。

II. 結 果

対象ボトル 49,998 本より, *P. aeruginosa* が検出されたボトルは 207 本, 対象ボトルの 0.4% で, 症例数は 148 例であった。これらのペアボトルのうち, 好気ボトルのみから検出されたのは 113 例 (76.4%), 嫌気ボトルのみは 4 例 (2.7%), ペアボトルの両方から検出されたのは 31 例 (20.9%) であった。148 例のうち男性は 91 例 (63.2%), 女性は 53 例 (36.8%), 不明 4 名と, 男性に多く認められた。年齢は, 148 例のうち 43 例は未記入であったが, 記入のあった 105 症例のうち, 70 歳代および 80 歳以上が

各 41 例 (39.0%), 60 歳代が 15 例 (14.3%), その他 50 歳代が 5 例, 40 歳代が 2 例, 0 歳が 1 例であり, *P. aeruginosa* は高齢者より高頻度に分離された (Table 1)。血液からのみ *P. aeruginosa* が検出されたのは 148 例中 93 例 (62.8%) であった。血液に加えて血液以外の材料からも *P. aeruginosa* が検出された症例は 55 例 (37.2%, 66 材料) で, 喀痰で 28 材料 (42.4%), ついで尿から 14 材料 (21.2%) から本菌が検出された (Table 2)。

血液およびその他の材料から検出された *P. aeruginosa* の各種抗菌薬に対する感受性を Table 3 に示した。最も低い MIC₅₀ を示した薬剤は CPF_X であり, 血液由来株, その他材料由来株とも, 0.25 μg/mL であった。次に低い値を示した薬剤は MEPM で 1 μg/mL, その他の薬剤は 2~8 μg/mL を示し, 血液由来株もその他材料由来株もほぼ同等の値を示した。MIC₉₀ ではいずれの薬剤においても 8~>128 μg/mL の高い MIC 値を示した。PIPC, MEPM, AMK の 3 薬剤のその他材料由来株に対する MIC₉₀ は血液由来株に比較し, 1 管以上高い値を示し, GM および CPF_X では 1 管低い値を示した。その他の薬剤では両材料由来株に対して同値であった。CLSI の耐性基準が設定されている薬剤のなかで最も耐性株の割合が低かった薬剤は AMK であり, その割合は血液由来株で 3.4%, その他材料由来株では 5.6% であった。AMK と同じアミノ配糖体系抗菌薬の GM では血液由来株で 9.5%, その他材料由来株で 9.9% であり, AMK よりも耐性を示す株が多く認められた。CFPM に対する耐性株の割合は血液由来株で 8.1%, その他材料由来株で 8.5% に認められ, 前述の AMK, GM, CFPM 以外の薬剤では血液由来株, その他材料由来株ともに 10% 以上の株が耐性を示し, PIPC, TAZ/PIPC, MEPM, CAZ, CPF_X における耐性率は 10.8~20.3%, IPM では 30% を超える株が耐性を示した。その他材料由来株の薬剤感受性は CPF_X 以外の測定薬剤に対し血液由来株よりも耐性率が高かった。

血液培養から *P. aeruginosa* が検出された 148 症例のう

Table 3. Susceptibilities of *P. aeruginosa* strains isolated from blood and other specimens

Specimens (No. of strains)	Antimicrobials	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	% of resistance
Blood (148)	Piperacillin	2-> 128	8	128	16.9
	Tazobactam/piperacillin	2-> 128	8	128	11.5
	Meropenem	\leq 0.06-> 128	1	16	15.5
	Imipenem	0.5-> 128	2	32	31.1
	Cefozopran	0.25-> 128	2	16	— ^{b)}
	Ceftazidime	0.5-> 128	2	32	10.8
	Cefepime	0.5-> 128	4	16	8.1
	Cefpirome	1-> 128	8	64	—
	Amikacin	0.5-> 128	8	8	3.4
	Gentamicin	0.25-> 64	2	16	9.5
Ciprofloxacin	\leq 0.06-> 128	0.25	32	20.3	
Other specimens ^{a)} (71)	Piperacillin	2-> 128	8	> 128	19.7
	Tazobactam/piperacillin	2-> 128	8	128	16.9
	Meropenem	\leq 0.06-> 128	1	32	18.3
	Imipenem	0.5-> 128	2	32	39.4
	Cefozopran	0.25-64	2	16	—
	Ceftazidime	0.5-> 128	2	32	15.5
	Cefepime	1-> 128	4	16	8.5
	Cefpirome	1-> 128	8	64	—
	Amikacin	1-128	4	16	5.6
	Gentamicin	0.5-> 64	2	8	9.9
	Ciprofloxacin	\leq 0.06-64	0.25	16	16.9

^{a)}Specimens were obtained from clinical sites from patients positive for *P. aeruginosa* in blood culture.

^{b)}The breakpoint of cefozopran and cefpirome has not been established by the CLSI.

Table 4. Susceptibility of multidrug-resistant strains of *P. aeruginosa* isolated from blood specimens

Case no.	MIC ($\mu\text{g/mL}$)											Metallo β -lactamase	
	PIPC	TAZ/PIPC	MEPM	IPM	CZOP	CAZ	CFPM	CPR	AMK	GM	CPFX	SMA	Presence of <i>bla</i> _{IMP}
1	128	64	> 128	64	> 128	> 128	> 128	> 128	128	32	8	+	+
2	128	128	8	16	8	16	8	32	64	> 64	16	-	-
3	> 128	64	> 128	32	> 128	128	> 128	> 128	128	32	32	+	+
4	> 128	32	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	128	16	64	+	+
5	> 128	> 128	16	16	16	2	128	128	32	> 64	> 128	-	-
6	> 128	64	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	32	64	+	+

+, positive; -, negative

*bla*_{IMP}: *bla*_{IMP} gene

SMA: Metallo β -lactamase "SMA Eiken"

PIPC: piperacillin, TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, MEPM: meropenem, IPM: imipenem, CZOP: cefozopran, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, CPR: cefpirome, AMK: amikacin, GM: gentamicin, CPFX: ciprofloxacin

ち6症例(6株)から多剤耐性株が検出された。これら6株に対する各種抗緑膿菌薬のMICおよびメタロ β -lactamase産生株についてTable 4に示した。症例5の株に対するCAZのMIC(2 $\mu\text{g/mL}$)を除きいずれも \geq 8 $\mu\text{g/mL}$ と高い値を示した。6株のうち4株は*bla*_{IMP}型のメタロ β -lactamase産生株であった(Table 4)。その他の材料からは2症例において多剤耐性株が検出された(Table 5)。症例2では、2005年3月26日から喀痰、血液および褥瘡よりメタロ β -lactamase非産生の多剤耐性株が継続的に分離されていたが、同年4月16日の喀痰および褥瘡からはメタロ β -lactamaseを産生する多剤耐性株が分離された。これら2株のカルバペネム系抗菌薬2

剤およびセフェム系抗菌薬4剤のMICは \geq 128 $\mu\text{g/mL}$ でメタロ β -lactamase非産生株よりも高値を示した。症例2から分離されたこれらの株はすべて同一のPFGEパターンを示した(Fig. 1)。症例7の血液由来株は多剤耐性株ではなくメタロ β -lactamase非産生性であったが、同時期に尿から分離された株は多剤耐性でメタロ β -lactamase産生株であり、カルバペネム系、セフェム系、アミノ配糖体系抗菌薬およびCPFXのMICが血液由来株に比較し高い値を示した。両株は異なるPFGEパターンを示した。また、Tableには示さなかったが、血液とその他材料の両方から*P. aeruginosa*が検出された55例のうち、両部位の分離株で薬剤感受性およびPFGEが異

Table 5. Susceptibility and PFGE patterns of *P. aeruginosa* strains isolated in case no. 2 and no. 7

Case no.	Date of isolation	Specimens	MIC ($\mu\text{g/mL}$)											Metallo β -lactamase		PFGE pattern
			PIPC	TAZ/PIPC	MEPM	IPM	CZOP	CAZ	CFPM	CPR	AMK	GM	CPFX	SMA	Presence of <i>bla</i> _{IMP}	
2	2005/3/26	Sputum	128	128	8	16	8	16	8	32	128	> 64	16	-	-	A
	2005/3/26	Decubitus	> 128	128	8	16	16	16	16	64	128	> 64	16	-	-	A
	2005/3/29	Blood	128	128	8	16	8	16	8	32	64	> 64	16	-	-	A
	2005/4/2	Sputum	128	128	8	16	8	16	8	32	128	> 64	16	-	-	A
	2005/4/2	Decubitus	> 128	128	8	16	16	16	16	64	128	> 64	16	-	-	A
	2005/4/9	Sputum	128	128	8	16	8	16	16	32	128	> 64	16	-	-	A
	2005/4/16	Sputum	> 128	128	> 128	128	> 128	> 128	> 128	> 128	128	> 64	16	+	+	A
	2005/4/16	Decubitus	128	128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	128	> 64	16	+	+	A
7	2006/3/23	Urine	> 128	64	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	128	> 64	32	+	+	B
	2006/3/24	Blood	128	64	2	1	4	8	8	16	16	8	0.5	-	-	C

+, positive; -, negative

*bla*_{IMP}: *bla*_{IMP} gene

SMA: Metallo β -lactamase "SMA Eiken"

PIPC: piperacillin, TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, MEPM: meropenem, IPM: imipenem, CZOP: ceftazopran, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, CPR: ceftiofime, AMK: amikacin, GM: gentamicin, CPFX: ciprofloxacin

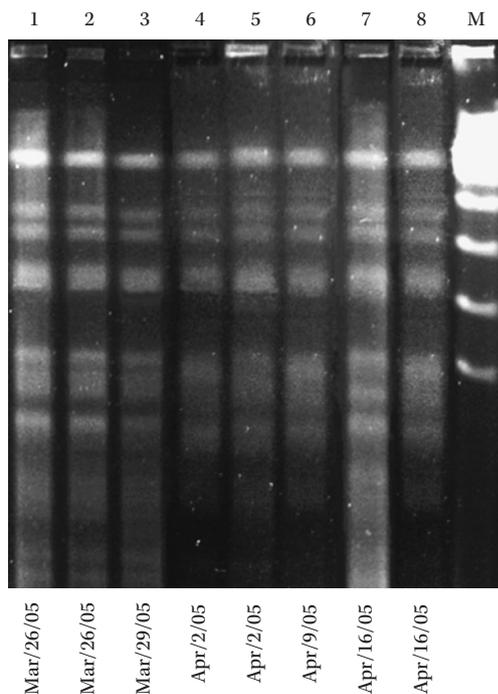


Fig. 1. PFGE profiles of *P. aeruginosa* strains isolated in case no. 2.

Lane 1, 4, 6 and 7; strains from sputum, lane 2, 5, and 8; strains from decubitus, lane 3; strain from blood, and lane M; molecular size markers (Bio Rad, *S. cerevisiae* chromosomes)

なっていた症例は6例認められた。

III. 考 察

今回われわれは、全国の医療機関より2005年から2006年に収集した24,999症例の血液材料のうち148症例から*P. aeruginosa*を検出した。これらの症例からの分離株の薬剤感受性は、カルバペネム系抗菌薬であるIPM

に対する耐性率が31.1%と最も高く、同系統のMEPMに対しても15.5%の株が耐性を示し、既報のとおり、カルバペネム系抗菌薬に耐性を示す株が多いことが確認された^{6,7)}。その他の β -lactam系抗菌薬のなかではCFPMに対する耐性率は8.1%と比較的低かった以外は10%以上の耐性率であった。フルオロキノロン系抗菌薬のCPFXに対しても高い耐性率(20.3%)を示した。アミノ配糖体系薬であるAMKに対しては今回測定した薬剤のなかで最も耐性率が低かった(3.4%)が、同系統薬のGMでは9.5%とAMKよりも耐性を示す株の割合が高く、感染症法の届出基準であるAMKのみで薬剤感受性検査を行った場合には、AMKに感受性と判定された株のなかに、GM耐性株が含まれている可能性が示唆された。

血液から*P. aeruginosa*が検出された同時期に血液以外の部位からも*P. aeruginosa*が検出された症例は37.2%存在した。このうち喀痰および尿から検出された例は全体の半数以上を占め、敗血症(または菌血症)の原発巣が下気道または尿路であることが推測された。石原らは尿路性器が侵入門戸となる菌血症の頻度は高く、泌尿器領域において血液培養が陽性となった71例のうち41例が尿路性器感染が原疾患と考えられ、31例で尿培養と血液培養から同一菌種が検出され、*P. aeruginosa*を含むグラム陰性菌は尿路性器敗血症の主要分離菌であることを述べている⁸⁾。血液以外の臨床材料から検出された*P. aeruginosa*はCPFX以外の測定薬剤に対し血液由来株よりも耐性率が高い傾向が認められた。血液以外の部位、特に喀痰などの材料の場合に常在菌や外来菌と接触する機会が多く、他の菌種・菌株からの薬剤耐性遺伝子の伝播が原因となっているかも知れない^{9,10)}。

血液から*P. aeruginosa*が検出された148症例のうち、6例から多剤耐性株が検出された。また、これら6株のう

ち4株(66.7%)がメタロβ-lactamase産生株であった。日暮らによると大学病院における血液由来*P. aeruginosa* 70株において7株の多剤耐性株が検出されたが、織田らの成績では小児科においては多剤耐性株は分離されなかったことが報告されている^{6,11)}。また、37の大学病院を中心としたサーベイランスでは血液および髄液で336株中9株(2.7%)の多剤耐性株が検出されたことが報告されている⁷⁾。このように多剤耐性株の分離状況は施設の様相が大きく影響されることが考えられるため、抗菌薬治療時には各施設の多剤耐性株の検出状況を把握しておくことが必要と考えられる。なお、多剤耐性株が検出された症例2では当初、血液、喀痰などからメタロβ-lactamase非産生の多剤耐性株が継続的に検出されていたが、その後はメタロβ-lactamase産生株が検出されるようになった。これらの菌株はPFGEパターンが同一であることから、オリジナルの株にメタロβ-lactamase産生遺伝子をコードしたプラスミドの伝達があったことが推察される¹²⁾。一方、症例7に代表される例では血液由来株とその他材料由来株とで薬剤感受性およびPFGEパターンが異なっていた。このように薬剤耐性遺伝子の獲得や菌交代現象などにより、材料の採取時期、採取部位によって*P. aeruginosa*の薬剤感受性の異なる可能性がある。血液材料から*P. aeruginosa*が検出された場合には、血液以外の臨床材料についても培養を試み、薬剤感受性も併せて測定すべきであると考えられる。

文 献

- 1) 荒川宜親：院内感染対策サーベイランスの意義と現状。日本臨牀 2003; 61: 68-80
- 2) Osih R B, McGregor J C, Rich S E, Moore A C, Furuno J P, Perencevich E N, et al: Impact of empiric antibiotic therapy on outcomes in patients with

- Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 839-44
- 3) Marra A R, Pereira C A P, Gales A C, Menezes L C, Cal R G R, Souza J M A, et al: Bloodstream infections with metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 388-90
 - 4) 二本柳伸, 平田泰良, 赤星 透, 内山幸信, 山浦 昇, 砂川慶介, 他: X線撮影による伝播と推測した多剤耐性緑膿菌の院内感染事例。感染症誌 2006; 80: 97-102
 - 5) Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al: PCR detection of metallo-β-lactamase gene (*bla*IMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β-lactams. J Clin Microbiol 1996; 34: 2909-13
 - 6) 日暮芳己, 岩井友美, 奥住捷子, 米山彰子, 中原一彦, 木村 哲: 血液由来 *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤感受性の年次変化。日化療学誌 2003; 51: 127-31
 - 7) Tsuji A, Kobayashi I, Oguri T, Inoue M, Yabuuchi E, Goto S, et al: 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 2005; 11: 64-70
 - 8) 石原 哲, 出口 隆: 尿路性敗血症。日化療会誌 2003; 51: 435-8
 - 9) 平湯洋一: 薬剤耐性菌を中心に。日化療会誌 2003; 51: 431-4
 - 10) 荒川宜親: 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。日臨微生物誌 2003; 13: 12-23
 - 11) 織田慶子, 池永昌昭, 大津 寧, 津村直幹: 最近3年間に大学病院小児科で分離した緑膿菌の基礎的・臨床的検討。日化療会誌 2004; 52: 82-5
 - 12) 伊藤秀郎, 和知野純一, 川村久美子: メタロβ-ラクタマーゼ産生菌の分布調査と臨床的意義。日臨微生物誌 2002; 12: 13-7

Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from blood and other clinical specimens of same patients to antibacterial agents

Akiko Kanayama¹⁾, Takeshi Saika¹⁾, Takako Iyoda¹⁾,
Misuzu Kida¹⁾, Rie Shibuya¹⁾, Miyuki Hasegawa¹⁾,
Fumiaki Ikeda¹⁾, Intetsu Kobayashi²⁾ and Akiyoshi Tsuji²⁾

¹⁾ Chemotherapy Division, Mitsubishi Chemical Medience Corporation, 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

²⁾ School of Medicine, Toho University

Of 49,998 blood specimens (24,999 cases) collected from hospitals in Japan between 2005 and 2006 and cultured, 207 from 148 cases were positive for *Pseudomonas aeruginosa*. The susceptibility of these isolates to antibacterial agents were examined. Resistance calculated based on Clinical and Laboratory Standard Institute break points was as follows: amikacin, 3.4%; piperacillin, tazobactam/piperacillin, meropenem, ceftazidime, and ciprofloxacin, 10.8–20.3%; and imipenem, 31.1%. Multidrug-resistant *P. aeruginosa* (MDRP) was detected in 6 of the 148 cases whose blood specimens were positive for *P. aeruginosa*. The production of metallo β -lactamase was detected in 4 of 6 MDRP isolates. *P. aeruginosa* was isolated in clinical specimens other than blood of 55 cases whose blood specimens were positive for the same species. Isolates from clinical specimens other than blood tended to be more resistant to antibacterial agents than isolates from blood specimens.

Clinical specimens other than blood of patients whose blood were positive for *P. aeruginosa* must thus be cultured so that appropriate treatment is provided and to better understand the microbiological characteristics and epidemiology of *P. aeruginosa* isolates from blood.