

## 【市販後調査報告】

多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* に対する併用薬スクリーニングのための  
ブレイクポイント・チェッカーボード法の有用性西尾 久明<sup>1)</sup>・小松 方<sup>2)</sup>・末吉 範行<sup>3)</sup>・木田 兼以<sup>4)</sup>・木下 承皓<sup>5)</sup><sup>1)</sup> 滋賀県立成人病センター臨床検査部\*<sup>2)</sup> ファルコバイオシステムズ総合研究所検査三課<sup>3)</sup> 社会保険滋賀病院検査部<sup>4)</sup> 大津赤十字病院検査部<sup>5)</sup> 神戸大学医学部附属病院検査部

(平成 22 年 3 月 12 日受付・平成 22 年 9 月 8 日受理)

ブレイクポイント・チェッカーボード法を用いた多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* の併用効果の有用性について検討を行った。2000 年 10 月から 2007 年 4 月にかけて、近畿地区の医療施設において収集された多剤耐性 *P. aeruginosa* 54 株について、BC プレート‘栄研’<sup>®</sup>(栄研化学)を用いて単剤による抗菌薬の MIC の測定(測定範囲は 2 濃度)と 2 薬剤を用いた相乗効果の有無を確認した。単剤の MIC が BC 法では測定濃度以下である場合やスキップ現象の出現により併用効果の判定ができなかった場合は今回の解析対象から除外した。相乗効果が多く認められた薬剤の組み合わせは colistin と rifampicin の 32 株、次いで amikacin と aztreonam の 31 株、colistin と aztreonam の 29 株であった。本法は一度に多くの薬剤の併用効果を予測できることから、併用効果のスクリーニング法として有用であると考えられた。

**Key words:** multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, synergy, breakpoint, checkerboard titration method

*Pseudomonas aeruginosa* の薬剤耐性機構は、AmpC セファロsporinase の過剰産生、メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)産生、アミノグリコシド修飾酵素による不活化、DNA ジャイレースの変異、D2 ポーリンの減少、さらには薬剤排出ポンプの機能亢進などが判明している<sup>1)</sup>。近年、これらの耐性機序を同時に獲得した多剤耐性緑膿菌(Multidrug-resistant *P. aeruginosa*, MDRP)による感染症例が少なからず報告されている。MDRP に対して、単剤で有効な抗菌薬はほとんどなく、治療法としては抗菌薬の併用療法を行うケースがほとんどであった。その *in vitro* 評価法としてチェッカーボード法が検討されてきた<sup>2)</sup>。しかし、チェッカーボード法は併用効果がある抗菌薬を探索するために、数種類のパネルを準備する必要があるため、臨床検査室レベルでは実施しづらい方法であった。

近年、複数の抗菌薬の組み合わせを 1 枚のマイクロプレートで判定可能なブレイクポイント・チェッカーボード法(BC 法)が Tateda ら<sup>3)</sup>により考案され、BC プレート‘栄研’<sup>®</sup>(栄研化学)として 2007 年に上市された。BC 法は MDRP や多剤耐性 *Acinetobacter* spp. に対して、臨床検査室において検査実施可能な方法として期待されている。今回われわれは、多剤耐性 *P. aeruginosa* 臨床分離株を BC プレート‘栄研’<sup>®</sup>で検査を行

い、併用効果のスクリーニング法としての有用性について検討したので報告する。

## I. 対象と方法

## 1. 対象菌株

2000 年 10 月から 2007 年 4 月にかけて、近畿地区の基幹病院で収集された多剤耐性 *P. aeruginosa* のうち、同一の由来株を取り除くため Random amplified polymorphic DNA pattern analysis<sup>4)</sup>を実施し、異なるクローンと判断した 54 株を対象菌株とした。薬剤耐性の内訳は MBL 産生 MDRP (MBL+MDRP) が 35 株、MBL 非産生 MDRP (MBL-MDRP) が 19 株であった。MDRP の定義は imipenem (IPM)、amikacin (AMK) および levofloxacin (LVFX) の MIC がそれぞれ 16 μg/mL 以上、32 μg/mL 以上、8 μg/mL 以上とした。MBL は著者がすでに報告した方法<sup>5)</sup>で MBL 遺伝子 (IMP-1 型および VIM-2 型)を確認した。

## 2. BC 法を用いた薬剤感受性試験

BC 法は BC プレート‘栄研’<sup>®</sup>を用いて添付文書に従い実施した。抗菌薬と測定濃度および併用効果に用いた抗菌薬の組み合わせを Fig. 1 に示した。

精度管理は Clinical and Laboratory Standards Insti-

\*滋賀県守山市守山 5-4-30

MEPM (8, 4)	CAZ (16, 8)	AZT (16, 8)	PIPC (32, 16)	AMK (16, 8)	MEPM (8, 4)
CPFX (2, 1)	CPFX (2, 1)	CPFX (2, 1)	CPFX (2, 1)	CPFX (2, 1)	CPFX (2, 1)
MEPM (8, 4)	CAZ (16, 8)	AZT (16, 8)	PIPC (32, 16)	RFP (4, 2)	CAZ (16, 8)
AMK (16, 8)	AMK (16, 8)	AMK (16, 8)	AMK (16, 8)	AMK (16, 8)	AMK (16, 8)
MEPM (8, 4)	CAZ (16, 8)	AZT (16, 8)	CPFX (2, 1)	RFP (4, 2)	AZT (16, 8)
CL (2, 1)	CL (2, 1)	CL (2, 1)	CL (2, 1)	CL (2, 1)	CL (2, 1)
MEPM (8, 4)	CAZ (16, 8)	AZT (16, 8)	CPFX (2, 1)	Control	PIPC (32, 16)
RFP (4, 2)	RFP (4, 2)	RFP (4, 2)	RFP (4, 2)		RFP (4, 2)

Fig. 1. Break-point Checkerboard Plate.

Table 1. Break-point Checkerboard Plate category with amikacin plus meropenem

interpretation	MIC for AMK alone	MIC for AMK plus MEPM	MIC for MEPM alone	MIC for MEPM plus AMK
Strong synergism <sup>a)</sup>	> 16	≤ 8	> 8	≤ 4
Moderate synergism <sup>b)</sup>	> 16	16	> 8	8
Invalid <sup>c)</sup>	> 16	> 16	> 8	> 8
unknown <sup>d)</sup>	≤ 8	≤ 8	≤ 4	≤ 4

<sup>a)</sup>Strong synergism: Confirmed by combination when bacteria growth was inhibited completely in all 4 wells

<sup>b)</sup>Moderate synergism: Confirmed by combination when bacteria growth was inhibited in 2 or 3 of 4 wells

<sup>c)</sup>Invalid: Synergy not confirmed by combination

<sup>d)</sup>unknown: Synergy not possible due to single agent MIC less than MIC range

tute (CLSI) の M100-S18<sup>®</sup> に準じて *P. aeruginosa* ATCC 27853 を用いて行った。

### 3. 併用効果の判定

併用効果の判定は Strong synergism (高度相乗効果), Moderate synergism (中等度相乗効果), Invalid (無効), Unknown (判定不能) の 4 つに分類し, 判定例を Table 1 に示した。

高度相乗効果とは, 単剤のそれぞれの MIC と比較して, 測定ウェルの発育が 4 カ所ともすべて阻止された場合とした。中等度相乗効果とは, 単剤のそれぞれの MIC と比較して, 測定ウェルの発育が 3 カ所または 2 カ所阻止された場合とした。無効とは併用しても発育が阻止されない場合, または拮抗作用が認められる場合とした。判定不能とは, 単剤の MIC が BC 法では測定濃度以下である場合やスキップ現象の出現により併用効果の判定ができなかった場合とし, 今回の解析対象から除外した。

## II. 結 果

### 1. 単剤での薬剤感受性成績

BC プレートの単剤の設定濃度は piperacillin (PIPC), AMK および colistin (CL) は CLSI のブレイクポイントより 1 から 2 管低く設定されていた。Rifampicin (RFP) は CLSI のブレイクポイントがないため, これらの薬剤については便宜上低濃度以下の MIC を感性, 高濃度より大きい MIC を耐性, 高濃度の MIC を中間として集計し, その成績を Table 2 に示した。

MBL 産生の MDRP (MBL+MDRP) 35 株は ceftazidime (CAZ), ciprofloxacin (CPFX) および AMK がすべて耐性であり, meropenem (MEPM) も 34 株が耐性であった。MBL 非産生の MDRP (MBL-MDRP) 19 株は AMK, CPFX および MEPM のすべての株が耐性または中間であった。

### 2. 併用効果の判定結果

併用効果の判定結果を Table 3 に示した。単剤の MIC が BC 法では測定濃度以下である場合やスキップ現象の

Table 2. Antimicrobial susceptibility test results against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Drug	Isolates								
	MBL + MDRP <sup>a)</sup> (n = 35)			MBL - MDRP <sup>b)</sup> (n = 19)			TOTAL (n = 54)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
MEPM	0	1	34	0	7	12	0	8	46
CPFX	0	0	35	0	3	16	0	3	51
CAZ	0	0	35	8	3	8	8	3	43
AMK	0	0	35	0	1	18	0	1	53
AZT	2	11	22	0	7	12	2	18	34
CL	11	21	3	9	10	0	20	31	3
PIPC	2	5	28	3	4	12	5	9	40
RFP	0	0	35	0	0	19	0	0	54

Abbreviations: S, susceptible; I, intermediate; R, resistant

MEPM: meropenem, CPFX: ciprofloxacin, CAZ: ceftazidime, AMK: amikacin, AZT: aztreonam,

CL: colistin, PIPC: piperacillin, RFP: rifampicin

<sup>a)</sup>MBL + MDRP: metallo- $\beta$ -lactamase-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

<sup>b)</sup>MBL - MDRP: non metallo- $\beta$ -lactamase-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Table 3. Antibiotic combination synergism with Break-point Checkerboard Plate

Drug combination	no. of strains	Strong synergism	Moderate synergism	Strong synergism + Moderate synergism
CPFX + MEPM	38	2	0	2
CPFX + CAZ	47	2	3	5
CPFX + AZT	41	2	6	8
CPFX + PIPC	47	4	4	8
CPFX + AMK	51	0	0	0
AMK + MEPM	54	4	9	13
AMK + CAZ	47	4	2	6
AMK + AZT	48	5	26	31
AMK + PIPC	48	10	5	15
AMK + RFP	53	0	0	0
CL + MEPM	29	14	9	23
CL + CAZ	22	13	7	20
CL + AZT	31	20	9	29
CL + CPFX	26	10	7	17
CL + RFP	32	27	5	32
RFP + MEPM	51	2	3	5
RFP + CAZ	47	2	2	4
RFP + AZT	41	2	9	11
RFP + CPFX	53	0	0	0

出現により併用効果の判定ができなかった Unknown (判定不能)を除外したため、抗菌薬の組み合わせ別で解析対象株数は26株から54株となった。

高度相乗効果を認めた抗菌薬の組み合わせは、CLとRFPの27株が最も多く、次いでCLとaztreonam (AZT)の20株であった。中等度相乗効果を認めた抗菌薬の組み合わせは、AMKとAZTの26株が最も多く、次いでAMKとMEPM、CLとMEPM、CLとAZTのそれぞれ9株であった。高度相乗効果と中等度相乗効果(相乗効果)とを加えた成績で最も相乗効果を認めた抗菌薬の組み合わせは、CLとRFPの32株、次いでAMKとAZTの31株、CLとAZTの29株であった。CLとの併用は、いずれの抗菌薬との組み合わせにおいても17株以上の高度相乗効果または中等度相乗効果を認めた。特に

高度相乗効果はどの抗菌薬との組み合わせでも10株以上認めた。CPFXとの併用は、CLとの組み合わせで17株相乗効果を認めたが、その他の抗菌薬との組み合わせではそれぞれ8株以下であった。

今回検討した19通りの抗菌薬の組み合わせのうち、いずれかの組み合わせで相乗効果を認めたのは54株中45株(83%)であった。このうち、わが国で菌種適応の認められていないCLとRFPとの組み合わせを除いた場合では、54株中34株(63%)がいずれかの抗菌薬の組み合わせで相乗効果を認めた。

### III. 考 察

薬剤耐性 *P. aeruginosa*、特にMDRPによる感染症は有効な治療薬が国内には存在しないため、治療が困難な場合が多い<sup>8)</sup>。米国では注射用CL<sup>7)</sup>が使用されているもの

の、本邦においては認可されていないため、有効性に関する報告は少ない。そこで、相乗効果を利用した抗菌薬の併用治療が従来から行われてきた。MDRP やそれに準ずる耐性株の治療は、単剤治療より併用治療を選択することが多くなり、元々感受性のある薬剤と相乗作用がある薬剤を併用するための情報が非常に重要となる。

このたび開発されたBC法は1つのパネルで19通りの抗菌薬の併用効果の有無をスクリーニングすることが可能であり、臨床検査室レベルで簡易に併用薬の探索を実施することが可能なキットである。しかし、BC法はFIC indexを算定するチェッカーボード法とは異なり、1つの抗菌薬についてCLSI判定基準である感性および中間域に相当する2濃度しか測定しないため、単剤で耐性かつBCプレートの2濃度の変動内でMICが低下した場合のみしか、併用効果の有無を求めることができない。例えば本邦におけるCLの*P. aeruginosa*に対するMIC分布は0.25~4 µg/mL、MIC<sub>90</sub>は2 µg/mL<sup>13)</sup>であり、BCプレートの実際の測定濃度(1および2 µg/mL)が含まれる。そのため、CLとの組み合わせにおいてBC法で見かけ上発育阻止が2カ所以上認められれば、他の抗菌薬の併用効果を示す割合より高い割合で算定される可能性がある。さらにチェッカーボード法とは異なり、BCプレートの測定レンジ以外での併用効果についても併用効果を確認することができない。したがって、臨床検査室におけるBCプレートの利用方法はあくまでも併用が可能な薬剤のスクリーニングとして利用する一つの手段であり、見かけ上併用効果が得られなかった組み合わせにおいても、チェッカーボード法では併用効果が確認できる場合があることを認識しておく必要がある。

今回検討した54株では、CLとRFPの組み合わせが最も優れ、次いでAMKとAZTの組み合わせが優れた結果となった。AZTはMBLに対して比較的安定であるため、他のβ-ラクタム薬とは異なりMBL産生菌に対して感受性を残している場合も多い<sup>5)</sup>。さらに、アミノグリコシド系薬は濃度依存性にAZTのMICを下げたとの報告<sup>12)</sup>やAMKとAZTの組み合わせで臨床効果を認めたとの報告もあるため<sup>8)</sup>、BC法で有効性が認められた場合には、第1に併用すべき抗菌薬であると考えられた。今回の検討成績ではAMKとAZTの組み合わせによる相乗効果を認めた31株中26株(84%)が中等度相乗効果、5株(16%)が高度相乗効果であった。今回は中等度相乗効果と高度相乗効果に分けて検討したが、今後はBC法の成績と臨床効果との相関性について引き続き検討する必要がある。

一方、CLは今回検討した菌株において単剤で感性となる頻度が高かった。さらに、高頻度に相乗効果を示したCLとRFPとの組み合わせだけでなく、CLと他の抗菌薬との組み合わせも多く多くの菌株が相乗効果を示した。米国では、CLの単剤使用例<sup>7)</sup>やCLとRFPの併用効果に

おいて評価が高い<sup>9)</sup>。しかし、CLやRFPは国内において適応菌種として認められておらず、これらの単剤使用または併用の是非については、今後慎重に検討する必要があると考えられた。

今回検討した19通りの組み合わせのなかで、相乗効果の低い組み合わせも認められた。CPFXと他の抗菌薬との組み合わせとRFPとCLを除く他の抗菌薬との組み合わせであった。岡<sup>2)</sup>は検討したMDRP 25株のなかではCPFXとAZT、CPFXとgentamicinでそれぞれ64%の相乗または相加作用があったと報告し、われわれの成績とは乖離を認めた。しかし、CPFXとの併用についての臨床の有効性に関する報告はなく、岡の報告との乖離は検討した菌株の地域性または薬剤耐性機構の違いもあると思われた。また、今回の組み合わせには入っていない、piperacillin/tazobactamとAMK、cefoperazone/sulbactamとAZT、cefepime (CFPM)とAMK、CFPMとCPFXの組み合わせで相乗または相加作用を認めた株が多かったとの報告<sup>10)</sup>、またarbekacin (ABK)とAZTを併用することで臨床効果を認めたとの報告<sup>11)</sup>もある。ABKは*P. aeruginosa*に対して適応菌種として認められていない抗菌薬の一つであるが、MDRPに対して併用効果を示す抗菌薬が少ないことも事実であり、今後BCプレートも含め併用効果の確認試験を臨床検査に取り入れるかについて検討していく必要がある。

*P. aeruginosa*の薬剤耐性機構のうち、MBL産生性の違いにより単剤での薬剤感受性パターンは少し異なる成績となった。すなわちMBL-MDRPではCAZの感性率が高く、逆にMBL+MDRPの感性率は低かった。しかし、CAZとの併用効果にMBL産生の有無で差は認めなかった。さらに、CAZ以外の感性率はMBL産生性の違いで差は認めず、また併用効果も差は認めなかった。この成績からBC法ではMDRPに対してMBL産生性を確認しても併用できる抗菌薬の組み合わせを予測することはできないと判断された。

今回の検討により、*P. aeruginosa*に適応菌種がある抗菌薬の組み合わせのうち、相乗効果の認められなかったのは54株中20株(37%)であった。この20株のうち、CLと他の抗菌薬との組み合わせのみで併用効果を認めた株が12株、CLが感性または中間であったため判定不能であった株が8株であった。したがってこれらの株はCL単剤またはCLと他の抗菌薬との併用の実施、もしくはβ-ラクタム系薬とアミノグリコシド系薬等のチェッカーボード法による確認が必要と判断された。一方、54株中34株(63%)に対してはいずれかの組み合わせで高度相乗効果または中等度相乗効果が認められた。特にAMKとAZTの組み合わせは、併用効果を期待できる結果であった。今後、MDRPの治療薬を選択するうえでBCプレートは、一度に多くの薬剤の併用効果を確認できることから、併用効果のスクリーニング法として期待でき

ると考えられた。

本研究は近畿耐性菌研究会の研究助成金によって行われた。

#### 文 献

- 1) 柴田尚宏, 荒川直親: MDRP の耐性機構。臨床と微生物 2007; 34: 83-8
- 2) 岡 陽子: 多剤耐性緑膿菌に対する抗菌薬の併用効果。日化療会誌 2005; 53: 476-82
- 3) Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, Yamaguchi K: 'Break-point Checkerboard Plate' for screening of appropriate antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Scand J Infect Dis 2006; 38: 268-72
- 4) Olive D M, Bean P: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37: 1661-9
- 5) Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, et al: Metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. J Clin Microbiol 2004; 42: 5256-63
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement, CLSI document M100-S18, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008
- 7) Linden P K, Kusne S, Coley K, Fontes P, Kramer D J, Paterson D: Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2003; 37: 154-60
- 8) 荒岡秀樹, 馬場 勝, 辰島啓太, 高木伸介, 松野直史, 和氣 敦, 他: 好中球減少患者の多剤耐性緑膿菌敗血症に対し薬剤併用療法が奏功した1例。感染症学雑誌 2008; 82: 466-70
- 9) Tascini C, Gemignani G, Ferranti S, Tagliaferri E, Leonildi A, Lucarini A, et al: Microbiological activity and clinical efficacy of a colistin and rifampin combination in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Chemother 2004; 16: 282-7
- 10) 前崎繁文, 山口敏行, 橋北儀一, 渡辺正治, 川上小夜子, 鈴木憲康, 他: 臨床分離薬剤耐性緑膿菌における各種抗菌薬の併用効果の検討。Jpn J Antibiot 2006; 59: 11-20
- 11) 樽本憲人, 阿部良伸, 山口敏行, 前崎繁文: 多剤耐性緑膿菌による尿路感染症に Aztreonam と Arbekacin の併用療法が奏功した一例。環境感染誌 2009; 24: 279-82
- 12) 荒岡秀樹, 馬場 勝, 米山彰子: Checkerboard plate を用いた多剤耐性緑膿菌に対する aztreonam とアミノグリコシド系抗菌薬の併用効果の検討。感染症学雑誌 2009; 83: 133-5
- 13) 金山明子, 貴田美寿々, 伊与田貴子, 松崎 薫, 渋谷俊介, 長谷川美幸, 他: 血液およびその他の臨床材料から分離された緑膿菌の薬剤感受性推移 (2007年~2008年)。日化療会誌 2010; 58: 7-13

## Effect of antibiotic combinations by "Break-point Checkerboard Plate" against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Hisaaki Nishio<sup>1)</sup>, Masaru Komatsu<sup>2)</sup>, Noriyuki Sueyoshi<sup>3)</sup>,  
Kaneyuki Kida<sup>4)</sup> and Shohiro Kinoshita<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Clinical Laboratory, Shiga Medical Center for Adults, 5-4-30 Moriyama, Moriyama, Shiga, Japan

<sup>2)</sup> Central Laboratory Technical Section 3, FALCO biosystems Ltd.

<sup>3)</sup> Department of Clinical Laboratory, Social Insurance Shiga Hospital

<sup>4)</sup> Department of Laboratory Medicine, Otsu Red Cross Hospital

<sup>5)</sup> Department of Clinical Laboratory, Kobe University Hospital

We studied antibiotic combination effects by "Break-point Checkerboard Plate" against multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*(MDRP). Fifty-four MDRP strains collected from October 2000 to April 2007 from clinical laboratories in Kinki, Japan were tested using Break-point Checkerboard Plates to evaluate the effect with combined antibiotics. Amikacin plus aztreonam and colistin plus rifampicin showed a synergistic effect of 31/48 and 32/32. We concluded that these plates are useful in screening antibiotic combination effects in the clinical setting.