

【短報】

ブレイクポイント・チェッカーボードプレートによる多剤耐性緑膿菌感染症に対する
治療薬選択のためのスコア化による評価

小栗 豊子¹⁾・石井 良和²⁾・三澤 成毅³⁾・舘田 一博²⁾・奥住 捷子⁴⁾
 吉田 敦⁴⁾・塚原みゆき⁵⁾・大石 毅⁵⁾・馬場 勝⁶⁾・米山 彰子⁶⁾
 住友みどり⁷⁾・満田 年宏⁷⁾・森 慎一郎⁸⁾・柴山 明義⁹⁾・中森 祥隆⁹⁾
 後藤美江子¹⁰⁾・森屋 恭爾¹⁰⁾・佐藤 智明¹¹⁾・大曲 貴夫¹²⁾・山口 恵三²⁾
 抗菌薬併用療法研究会

¹⁾ 医療法人 鉄蕉会亀田総合病院*

²⁾ 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

³⁾ 順天堂大学医学部附属順天堂医院

⁴⁾ 獨協医科大学病院

⁵⁾ 東京医科大学茨城医療センター

⁶⁾ 国家公務員共済組合連合会虎の門病院

⁷⁾ 公立大学法人 横浜市立大学附属病院

⁸⁾ 独立行政法人 国立がん研究センター中央病院

⁹⁾ 国家公務員共済組合連合会三宿病院

¹⁰⁾ 東京大学医学部附属病院

¹¹⁾ 静岡県立静岡がんセンター (現 山形大学医学部附属病院)

¹²⁾ 静岡県立静岡がんセンター

(平成 22 年 11 月 10 日受付・平成 23 年 1 月 5 日受理)

国内 8 施設において 2003~2006 年に各種臨床材料から分離された 63 株の multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) を用いて、ブレイクポイント・チェッカーボード (B・C) プレートによる抗菌薬の併用効果判定に対してスコア化の検討を行った。今回用いた MDRP は、ceftazidime と meropenem に対して 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) を示す菌株はそれぞれ 90% および 73% であった。さらに、供試菌株の 86% が aztreonam に、100% が ciprofloxacin に、89% が amikacin に対して Clinical and Laboratory Standards Institute のドキュメントに記載された耐性のクライテリアに属していた。本検討におけるスコア化に際しては、菌の発育阻止を認めたウェルが (1) 1 カ所あればスコア 1, (2) 2 カ所あればスコア 2, (3) 3 カ所あればスコア 3, (4) 全 4 ウェルにおいて菌の発育阻止が認められた場合をスコア 4 とした。なお、4 ウェルすべてに菌の発育を認めた場合はスコア 0 とした。合計スコアは (1) それぞれのスコア \times 当該菌株数値, (2) 同一の抗菌薬組み合わせ時のスコアを合計して算出した。Colistin と他薬剤との組み合わせ時のスコアはいずれも高かった (平均スコア : ≥ 2.84) が、組み合わせによる効果を示すものではなかった。Amikacin は、piperacillin (平均スコア : 0.6) および aztreonam (平均スコア : 0.56) との組み合わせ時の平均スコアが高値を示した。したがって、今回の収集した菌株に対しては、amikacin と piperacillin あるいは amikacin と aztreonam が有用である可能性が示された。B・C プレートを用いて得られた薬剤感受性結果をスコア化して集計・解析することで、同一施設における経年的な比較や複数の施設における比較が客観的且つ簡便に行えることが期待される。

Key words: B・C plate, multidrug-resistant *P. aeruginosa*, susceptibility testing, scoring analysis

緑膿菌は、免疫不全患者において重篤な感染症をひき起こしやすい病原体である。抗緑膿菌活性を有する

imipenem, amikacin および ciprofloxacin のすべてに耐性を示す緑膿菌を多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant

Score 0		Antibiotics A concentration		Score 1		Score 2	
		intermediate	susceptible				
Antibiotics B concentration	intermediate	+	+	-	+	-	- or +
	susceptible	+	+	+	+	- or +	+

Score 3		Score 4	
-	-	-	-
-	+	-	-

Fig. 1. Break-point checkerboard plate antibiotic combination scoring.

Pseudomonas aeruginosa, MDRP) と呼んでいる。本邦で認可されている抗菌薬のなかで、MDRP の感染症治療に単剤で有効な抗菌薬は存在しない。したがって、MDRP による感染症の治療には、FIC index に基づく抗菌薬の併用や経験的併用療法が行われてきた^{1,2)}。しかし、FIC index を算出するのは煩雑であり、医療施設で実施することは困難である。そこで Tateda らは、MDRP に有効な併用薬選択の一助とするため、ブレイクポイント・チェッカーボードプレート (B・Cプレート) を考案した³⁾。

B・Cプレートは、96穴マイクロタイタープレートに主として Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のドキュメントに記載されている中等度耐性および感性濃度の複数の抗菌薬の組み合わせが搭載されている。したがって、B・Cプレートを用いると、約20種類の抗菌薬の組み合わせのなかから、*in vitro* で有効性が予測される抗菌薬の組み合わせが1枚のプレートで判別可能となる。しかし、B・Cプレートを用いて得られたデータは、その集計や他施設のデータと直接比較することは容易ではなかった。今回は、B・Cプレートを用いて得られたデータの集計を簡便にし、且つ他施設のデータの比較を容易にすることを目的に検討を行った。すなわち、B・Cプレートで得られた試験結果をスコア化し、2種類の抗菌薬の組み合わせの効果を数値化することを試みた。

供試菌株は当研究会参加8施設において2003~2006年に各種臨床材料から分離された63株のMDRPを用いた。これらの菌株のうち、metallo- β -lactamase (MBL)

産生株が47株、MBL非産生株が16株であった。MBLの内訳は、DNA塩基配列決定の結果、IMP-1が20株、IMP-7とIMP-10がそれぞれ13株およびVIM-2が1株であった。なお、本研究におけるMDRPの定義は、meropenem に $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、amikacin に $\geq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、ciprofloxacin に $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ の最小発育阻止濃度 (MIC) を示す菌株とした。

B・Cプレート (栄研化学株式会社、東京) による感受性試験は、CLSI が定める方法に準じて行った⁴⁾。供試菌株のB・Cプレートに搭載された単独の抗菌薬に対するMICはCLSIが定める微量液体希釈法に従って測定し⁴⁾、耐性 (resistance : R)、中等度耐性 (intermediate : I) および感性 (sensitive : S) のカテゴリー分類もCLSIのドキュメントに従った⁵⁾。8種類の抗菌薬のうち今回対象としたMDRPに対する抗菌力は colistin (MICレンジ : $0.5 \sim 4 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₅₀ : $2 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₉₀ : $2 \mu\text{g}/\text{mL}$) が最も優れており、Rと判定された1株 (1.6%) とIの5株 (7.9%) を除き90.5%のMDRPがSであった。次いで piperacillin (MICレンジ : $16 \sim >128 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₅₀ : $128 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₉₀ : $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$) の抗菌力が優れており、Rのカテゴリーの菌株は70%であり、30%の菌株がSであった。供試菌株は、meropenem (MICレンジ : $16 \sim >128 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₅₀ : $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₉₀ : $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$) と ciprofloxacin (MICレンジ : $16 \sim >128 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₅₀ : $64 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₉₀ : $128 \mu\text{g}/\text{mL}$) に対して100%、ceftazidime (MICレンジ : $4 \sim >128 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₅₀ : $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₉₀ : $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$) に97%、aztreonam (MICレンジ : $8 \sim >128 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC₅₀ : 32

Table 1. Growth inhibition distribution potentiated by combination for 63 multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates

Combination	Score					Total
	4	3	2	1	0	
Colistin + Ciprofloxacin	35	9	12	7	0	198
Colistin + Aztreonam	32	23	4	4	0	209
Colistin + Ceftazidime	26	10	21	6	0	182
Colistin + Meropenem	16	22	19	6	0	174
Rifampicin + Colistin	35	3	24	1	0	198
Rifampicin + Ciprofloxacin	0	0	0	0	63	0
Rifampicin + Aztreonam	2	1	9	7	44	36
Rifampicin + Ceftazidime	2	0	0	0	61	8
Rifampicin + Meropenem	0	0	0	1	62	1
Amikacin + Rifampicin	0	0	1	1	61	3
Amikacin + Aztreonam	7	6	12	14	24	84
Amikacin + Piperacillin	11	7	4	2	39	75
Amikacin + Ceftazidime	2	2	1	0	58	16
Amikacin + Meropenem	0	1	1	3	58	8
Ciprofloxacin + Meropenem	0	0	3	0	60	6
Ciprofloxacin + Ceftazidime	2	0	0	1	60	9
Ciprofloxacin + Piperacillin	5	4	2	2	50	38
Ciprofloxacin + Aztreonam	1	1	5	18	38	35
Ciprofloxacin + Amikacin	0	0	1	0	62	2

Table 2. Antibiotic combination average

Antibiotic	amikacin	ciprofloxacin	rifampicin	colistin
piperacillin	1.19	0.6		
ceftazidime	0.25	0.14	0.13	2.89
aztreonam	1.33	0.56	0.57	3.32
meropenem	0.13	0.1	0.02	2.84
amikacin		0.03	0.05	
ciprofloxacin			0	3.14
rifampicin				3.14

$\mu\text{g}/\text{mL}$, MIC_{90} : $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$) に 86%, amikacin (MIC レンジ: $32 \sim >128 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC_{50} : $128 \mu\text{g}/\text{mL}$, MIC_{90} : $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$) に 89% がそれぞれ R のカテゴリーであった。今回用いた MDRP の piperacillin および aztreonam に対する MIC 値が ceftazidime や meropenem のものより良好だった理由は, MBL 産生株が供試菌株の約 75% を占めていたことに起因すると考えられる。すなわち, 今回対象とした MDRP が産生する MBL である IMP-型酵素および VIM-型酵素はいずれも piperacillin および aztreonam に対する親和性が弱く, これらの MBL による分解を受けにくいことがその理由である^{6,7)}。緑膿菌は, rifampicin に対する感受性ブレイクポイントは設定されていないが, MIC レンジは $16 \sim 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。もちろん, 緑膿菌は rifampicin と接触すると容易に耐性化することは事実である。しかし, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* による感染症

に対して rifampicin は併用薬として使用される⁸⁾。さらに高い組織移行性という本薬剤の特徴を加味し, MDRP の治療に際する併用薬として検討も行われつつある⁹⁾。今後, 本邦でも併用薬として注意深く検討することも必要になる可能性もあると考えている。

B・C プレートは, 2 種の異なる抗菌薬の I および S の 2 濃度の 4 ウェルを 1 組とし, この 1 組 4 ウェルにおいて菌の発育が阻止されたことを基に抗菌薬併用の有効性を判定する (Fig. 1)。今回のスコア化に際しては, 菌の発育阻止を認めたウェルが 1 カ所あればスコア 1, 2 カ所あればスコア 2, 3 カ所あればスコア 3, 全 4 ウェルにおいて菌の発育阻止が認められた場合をスコア 4 とした。なお, 4 ウェルすべてに菌の発育を認めた場合はスコア 0 とした。そのうえで, それぞれのスコアと当該菌株数を乗じた値を合計し, 2 種類の抗菌薬組み合わせ時のスコアとした。少なくとも供試菌株は MDRP であることか

ら、 β ラクタム系薬、amikacin および ciprofloxacin は無効である。したがって、これらの抗菌薬の組み合わせ時のスコアの期待値は0であり、それ以上のスコアが算出された場合は、併用効果が期待されると考えられる。Table 1 および Table 2 には、今回使用した 63 株の MDRP に対する各種抗菌薬の組み合わせごとのスコア分布および平均スコアをそれぞれ示した。Colistin と他薬剤との組み合わせ時のスコア合計はいずれも 179 以上、平均スコア 2.84 以上の高いスコアを示した。この結果は、colistin の単独での高い効果が影響したものであり、組み合わせによる効果を示すものではなかった。Colistin はその毒性から使用されなくなった経緯があるが、*Serratia* 属菌や *Proteaeae* を除くと抗菌力が優れていることから、現在は多剤耐性菌に対する治療薬として見直されつつある¹⁰⁾。Rifampicin は、aztreonam との組み合わせ時のスコア合計が 36 (平均スコア 0.57) であったが、他の抗菌薬との組み合わせでは 10 未満の合計スコア (平均スコア 0.13 以下) であった。Ciprofloxacin は、piperacillin および aztreonam との組み合わせで平均スコアが 0.6 および 0.56 であったが、それ以外の抗菌薬との組み合わせの平均スコアは 0.14 未満であった。一方、amikacin は、piperacillin および aztreonam との組み合わせ時の平均スコアが、それぞれ 1.19 および 1.33 と高値を示した。したがって、今回の収集した菌株に対しては、amikacin と piperacillin あるいは amikacin と aztreonam が有用である可能性が示された。

今回は研究会で収集した複数の施設から分離された MDRP を対象とした検討結果を示した。B・C プレートをを用いて実施した薬剤感受性試験成績を実施しても対象菌株に対して *in vitro* における抗菌薬の組み合わせに関する情報を提供できるにすぎない。しかし、その結果をスコア化して集計・解析することで、最適な抗菌薬の組み合わせの確率を予測して、有効な併用薬に関する情報を提供できる可能性があると考えている。今後さらなる検討が必要であるが、少なくとも同一施設における併用薬についての経年的な比較や複数の施設における比較が客観的且つ簡便に行えることが期待される。

謝 辞

本研究の薬剤感受性試験を実施するに際してご協力い

ただきました池戸正成氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Chin N X, Neu H C: Synergy of azlocillin with aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother* 1983; 11 (Suppl B): 33-8
- 2) Lincopan N, Neves P, Mamizuka E M, Levy C E: Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e344-7
- 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) Clinical and Laboratory Standards Institute.: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition. M07-A8. Wayne, PA: CLSI, 2009
- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. M100-S19. Wayne, PA: CLSI, 2009
- 6) Docquier J D, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frere J M, Rossolini G M: On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 257-66
- 7) Docquier J D, Riccio M L, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, et al: IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1522-8
- 8) Forrest G N, Tamura K: Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 14-34
- 9) Tascini C, Menichetti F, Gemignani G, Palumbo F, Leonildi A, Tedeschi A, et al: Clinical and microbiological efficacy of colistin therapy in combination with rifampin and imipenem in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* diabetic foot infection with osteomyelitis. *Int J Low Extrem Wounds* 2006; 5: 213-6
- 10) Zavascki A P, Goldani L Z, Li J, Nation R L: Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1206-15

Scoring analysis using breakpoint-checker board plates or antibiotic combination therapy in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Toyoko Oguri¹⁾, Yoshikazu Ishii²⁾, Shigeki Misawa³⁾, Kazuhiro Tateda²⁾, Katsuko Okuzumi⁴⁾, Atsushi Yoshida⁴⁾, Miyuki Tsukahara⁵⁾, Tsuyoshi Oishi⁵⁾, Masaru Baba⁶⁾, Akiko Yoneyama⁶⁾, Midori Sumitomo⁷⁾, Toshihiro Mitsuda⁷⁾, Shinichiro Mori⁸⁾, Akiyoshi Shibayama⁹⁾, Yoshitaka Nakamori⁹⁾, Mieko Goto¹⁰⁾, Kyoji Moriya¹⁰⁾, Tomoaki Sato¹¹⁾, Norio Omagari¹²⁾, Keizo Yamaguchi²⁾ and Antibiotic combination therapy study group (ACTs)

¹⁾ Kameda General Hospital, 929 Higashi-cho, Kamogawa, Chiba, Japan

²⁾ Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine

³⁾ Juntendo University Hospital

⁴⁾ Dokkyo Medical University Hospital

⁵⁾ Tokyo Medical University Ibaraki Medical Center

⁶⁾ Toranomon Hospital

⁷⁾ Yokohama City University Hospital

⁸⁾ National Cancer Center Hospital

⁹⁾ Mishuku Hospital

¹⁰⁾ The University of Tokyo, Graduate School of Medicine and Department of Infection Control and Prevention

¹¹⁾ Shizuoka Cancer Center (Current affiliations: Yamagata University, Faculty of Medicine and Yamagata University Hospital)

¹²⁾ Shizuoka Cancer Center

Scoring analysis was used from 2003 to 2006 to evaluate results breakpoint checkerboard plate in antibiotic combination therapy using 63 multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*(MDRP) clinical isolates from 8 hospitals in Japan. Minimum inhibitory ceftazidime and meropenem concentrations were $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$ in 90% and 73% of tested isolates. Based on Clinical and Laboratory Standards Institute criteria, 86% of isolates were resistant to aztreonam, 100% to ciprofloxacin, and 89% to amikacin. Combination effects were scored as follows: 1 for 1 well in 4 wells growth inhibition, 2 for 2 wells, 3 for 3 wells, 4 for 4 wells, and 0 if all wells of growth were observed. We calculated total score for the antibiotic combinations by multiplying each score by the number of isolates and adding all scores for each combination. Scores for the combination of colistin and other antibiotics were high at >179 , but these scores did not reflect the result of combinations. Amikacin scored higher combined with piperacillin at 75 and with aztreonam at 84, suggesting overall that these 2 combinations were most effective against MDRP. The above scoring analysis thus proved useful and objective in comparing the effects of changes in antibiotic combinations in the same hospital or among different hospitals.