

【抗菌薬感受性報告】

臨床材料から分離された耐性緑膿菌に対するブレイクポイントチェッカーボードプレートを用いた *in vitro* 併用効果の検討榎屋 友幸¹⁾・村木 優一¹⁾・中村 明子²⁾・田辺 正樹³⁾・兼児 敏浩³⁾・奥田 真弘¹⁾¹⁾ 三重大学医学部附属病院薬剤部*²⁾ 同 中央検査部³⁾ 同 医療安全・感染管理部

(平成 27 年 7 月 31 日受付・平成 27 年 10 月 16 日受理)

重症患者の緑膿菌感染症の治療には抗菌薬の 2 剤併用療法が必要である。しかしながら、緑膿菌に対する抗菌薬の併用の有効性は未だ明確ではない。本研究では 2009 年 4 月から 2014 年 12 月に当院で分離された緑膿菌のうち、imipenem (IPM), ciprofloxacin (CPFX), amikacin (AMK) の 3 剤中、3 剤すべてに耐性の緑膿菌を多剤耐性緑膿菌 (MDRP), 2 剤耐性の緑膿菌を pre-MDRP と定義し、抗菌薬による *in vitro* 併用効果を検討した。ブレイクポイントチェッカーボードプレート (BC プレート) を用いてスコア化および併用効果を評価した。BC プレートで単剤の最小発育阻止濃度が測定濃度未満の場合は解析対象から除外した。また、スキップ現象がみられた場合は再度解析をやり直した。pre-MDRP は 16 株、MDRP は 10 株抽出された。pre-MDRP は、colistin (CL)/rifampicin (RFP) の組み合わせにおいて満点に対する合計点の割合 (92% ; 33/36) が最も高く、9 株中 8 株に併用効果が認められた。次に満点に対する合計点の割合が高かったのは piperacillin (PIPC)/AMK の組み合わせであり (90% ; 18/20), 5 株中 5 株に併用効果が認められた。一方、MDRP は、CL/RFP の組み合わせが最も有効であり (85% ; 17/20), 5 株中 4 株において併用効果が認められた。結論として、CL/RFP の併用療法は pre-MDRP および MDRP に対して経験的治療として期待できる併用療法と考えられた。

Key words: break-point checkerboard plate, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

多剤耐性緑膿菌 (MDRP) による院内感染は治療に難渋することから、感染対策上、重要な問題となっている。日本の感染症法では、imipenem (IPM), ciprofloxacin (CPFX), amikacin (AMK) のすべてに耐性である緑膿菌を MDRP と定義し、基幹定点医療機関で検出され届出のために必要な検査所見を満たした場合、五類感染症として届け出ることが義務づけられている。

MDRP の感染症治療には、経験的な併用療法や相乗効果測定 [fractional inhibitory concentration (FIC) index] に基づく抗菌薬併用療法が行われてきた¹⁾。しかしながら、FIC index の算出は煩雑であり、すべての医療施設で実施することは困難である。そこで、2 剤併用効果のある抗菌薬を選択する際の補助とするため、ブレイクポイント・チェッカーボード (BC) プレートが考案された²⁾。BC プレートには、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のドキュメントに記載されている複数の抗菌薬について、緑膿菌の抗菌薬ブレイクポイントに近い 2 濃度の組み合わせが 96 穴マイクロプレートに搭載されている。そのため、BC プレートをを用いることで、19

種類の抗菌薬の組み合わせのなかから、有効性が予測される抗菌薬の組み合わせを *in vitro* 試験により抽出することが可能となった。

一方、IPM, CPFX, AMK のうち 2 種類に耐性をもつ緑膿菌 (以下、pre-MDRP) は、感受性がある抗菌薬を単剤で継続使用することにより、MDRP に誘導される可能性が高いため、臨床上注意が必要な緑膿菌と考えられている³⁾。また、抗菌薬の耐性度にかかわらず重症患者に発症した緑膿菌による敗血症の抗菌薬化学療法として 2 剤併用療法が推奨されており、さらなる耐性化を抑制するためにも緑膿菌感染症には 2 剤併用療法が重要と考えられている⁴⁾。以上のことより、pre-MDRP および MDRP 感染症に対して 2 剤併用療法は重要とされているが、pre-MDRP を対象として 2 剤の抗菌薬の組み合わせによる相加相乗効果を調査した検討は見当たらない。また、本邦において MDRP に対する 2 剤の抗菌薬による相加相乗効果を疫学的に調査した報告は少ない。そこで、本研究では三重大学医学部附属病院 (以下、当院) において臨床分離された pre-MDRP および MDRP に対して 2

*三重県津市江戸橋 2-174

		Antimicrobial 1		Score 0		Score 1		Score 2	
		Intermediate	Susceptible						
		Score 0							
Antimicrobial 2	Intermediate	+	+	-	+	-	-		
	Susceptible	+	+	+	+	+	+		
		Score 2		Score 3		Score 4			
		-	+	-	-	-	-		
		-	+	-	+	-	-		

Fig. 1. Antimicrobial combination scoring with the break-point checkerboard plate method.

+ : Presence of visible bacterial growth, - : Absence of visible bacterial growth

Susceptible: susceptible minimum inhibitory concentration of each antimicrobial, Intermediate: intermediate minimum inhibitory concentration of each antimicrobial

剤の抗菌薬の組み合わせによる相加相乗効果を BC プレートにより検討した。

2009年4月から2014年12月に当院で臨床分離され、抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) が測定された緑膿菌を対象菌とした。IPM, CFX および AMK のうち2種類の抗菌薬に耐性と判定される緑膿菌を pre-MDRP とし、3種類すべての抗菌薬に耐性の緑膿菌を MDRP とした。一晚培養した寒天培地上の被検菌体を釣菌して滅菌生理食塩液に懸濁した。菌液濃度は McFarland 標準濁度 0.5 と同じ濁度に調製した。この調製液をさらに滅菌生理食塩液で10倍希釈し、接種用菌液とした。pre-MDRP および MDRP に対する meropenem (MEPM), CFX, ceftazidime (CAZ), AMK, aztreonam (AZT), CL, piperacillin (PIPC), rifampicin (RFP) の単剤あるいは2剤を組み合わせた時の MIC を検討するため、BC プレート (栄研化学株式会社, 東京) を用いて各ウェルに接種用菌液を 5 μ L ずつ接種した。抗菌薬の各菌株に対する MIC は CLSI (M07-A9) が定める微量液体希釈法に従って測定した。BC プレートの結果は、小栗らの報告⁵⁾ に基づき (Fig. 1), 各抗菌薬の組み合わせにおけるスコアを算出し、満点に対する合計点の割合 (% total score = total score/perfect score \times 100) で評価した。2剤の組み合わせにより片方の抗菌薬または両方の抗菌薬の MIC が低下した場合は相加相乗効果ありと評価し、その菌株数の割合を算出した。なお、2剤のうち1剤の抗菌薬の MIC

が BC プレートに搭載されている濃度未満であった場合は判定不可とした。また、スキップ現象がみられた場合は再度解析をやり直した。

調査期間中に当院で検出された pre-MDRP は 16 株、MDRP は 10 株であった。pre-MDRP の各抗菌薬の感受性を調査した結果、AMK, AZT, CAZ, CFX および PIPC に対する中等度以上の耐性菌株がそれぞれ、16 株中 7 株 (44%), 14 株 (88%), 15 株 (94%), 13 株 (81%) ならびに 14 株 (88%) に認められ、MEPM はすべての株が中等度以上耐性であった。RFP の MIC はすべての菌株において、4.0 μ g/mL を上回っていた。また、CL に対しては MIC = 2.0 μ g/mL が 4 株、MIC = 1.0 μ g/mL が 5 株、MIC < 1.0 μ g/mL が 7 株であり、耐性菌株はみられなかった。メタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) 産生株は 16 株中 3 株であった。pre-MDRP の BC プレートの結果を Table 1 に示した。満点に対する合計点の割合が高く、かつ併用効果が 80% 以上みられた抗菌薬の組み合わせは、PIPC/AMK および CL/RFP であり、PIPC/AMK の組み合わせは評価が行えた 5 株すべてにおいて併用効果が認められ、CL/RFP の組み合わせは 9 株中 8 株 (89%) に併用効果が認められた。MDRP の各抗菌薬の感受性を調査した結果、すべての菌株が CL 以外の抗菌薬に対して中等度以上耐性であった。RFP の MIC はすべての菌株において、4.0 μ g/mL を上回っていた。CL に対しては MIC = 2.0 μ g/mL が 1 株、MIC = 1.0 μ g/mL が 4 株、

Table 1. Effect of various combinations against pre-MDRP (n = 16) and MDRP (n = 10)

Antimicrobial combination	Score					% total score*	Combination effect			
	4	3	2	1	0		+	-	Percent	Undecidable
pre-MDRP										
AMK/CPFX	1	0	3	0	0	63	1	3	25	12
AMK/RFP	0	2	2	0	3	36	3	4	43	9
AZT/CPFX	1	3	4	1	4	42	6	7	46	3
AZT/AMK	1	1	1	0	2	45	3	2	60	11
AZT/RFP	1	0	1	0	12	11	3	11	21	2
AZT/CL	3	1	2	0	2	59	5	3	63	8
CAZ/CPFX	6	1	1	1	3	63	9	3	75	4
CAZ/AMK	1	0	2	2	2	36	4	3	57	9
CAZ/RFP	3	1	1	1	9	30	6	9	40	1
CAZ/CL	2	3	1	0	2	59	5	3	63	8
CL/RFP	7	1	1	0	0	92	8	1	89	7
CL/CPFX	1	1	3	0	2	46	3	4	43	9
CPFX/RFP	3	1	4	0	5	44	4	9	31	3
MEPM/CPFX	4	3	1	1	4	54	9	4	69	3
MEPM/AMK	1	1	1	2	2	39	4	3	57	9
MEPM/RFP	0	2	2	1	11	17	5	11	31	0
MEPM/CL	2	3	2	0	2	58	5	4	56	7
PIPC/CPFX	4	3	3	1	2	62	9	4	69	3
PIPC/AMK	4	0	1	0	0	90	5	0	100	11
MDRP										
AMK/CPFX	1	0	1	0	8	15	2	8	20	0
AMK/RFP	2	0	2	0	6	30	4	6	40	1
AZT/CPFX	0	1	1	0	8	13	2	8	20	0
AZT/AMK	0	1	2	0	7	18	3	7	30	0
AZT/RFP	1	0	0	0	9	10	1	9	10	1
AZT/CL	1	0	3	0	1	50	1	4	20	6
CAZ/CPFX	2	0	3	0	5	35	3	7	30	0
CAZ/AMK	1	2	2	0	5	35	5	5	50	0
CAZ/RFP	1	0	3	0	6	25	2	8	20	1
CAZ/CL	1	0	3	0	1	50	1	4	20	6
CL/RFP	3	1	1	0	0	85	4	1	80	5
CL/CPFX	1	0	1	0	3	30	2	3	25	6
CPFX/RFP	3	0	0	0	7	30	4	6	40	1
MEPM/CPFX	1	1	0	0	8	18	2	8	20	0
MEPM/AMK	1	2	0	0	7	25	3	7	30	0
MEPM/RFP	1	0	0	0	9	10	1	9	10	1
MEPM/CL	1	0	2	1	1	45	2	3	40	6
PIPC/CPFX	2	0	2	1	5	33	5	5	50	0
PIPC/AMK	3	1	0	1	5	40	5	5	50	0

* % total score = total score/perfect score × 100

MIC < 1.0 μg/mL が 5 株であり、耐性菌株はみられなかった。MBL 産生株は 10 株中 7 株で認められた。MDRP の BC プレートによる結果を Table 1 に示した。満点に対する合計点の割合が高く、かつ併用効果が 80% 以上みられた組み合わせは、CL/RFP のみであった。

本研究において、80% 以上の pre-MDRP および MDRP に CL/RFP の併用効果が認められた。CL/RFP の併用療法は、MDRP の肺炎モデルマウスを用いた動物実験⁶⁾や症例報告⁷⁾において良好な成績が報告されており、有用な併用療法である可能性が示唆されている。一方、MDRP に対して、AZT とアミノグリコシド系薬⁸⁾または AZT と CPFX⁹⁾による併用効果が報告されている。しかしながら、本研究結果では、MDRP は AZT/AMK

および AZT/CPFX の組み合わせにおいて満点に対するスコア合計点の割合が低く、併用効果が認められたのはそれぞれ 30% および 20% のみであった。したがって、当院においては MDRP 感染症に対する AZT/AMK および AZT/CPFX による併用療法を検討する際は BC プレートによる評価を行ったうえで使用する必要があると考えられた。

緑膿菌感染症は易感染状態下にある重症患者に多く、特に ICU 患者では緑膿菌による敗血症の頻度は高いと報告されている¹⁰⁾。重症患者に発症する緑膿菌による敗血症の治療には、抗菌薬の 2 剤併用療法が推奨されている⁵⁾。一方、敗血症に対しては早期に適切な抗菌化学療法を開始が重要であるが、pre-MDRP または MDRP によ

る感染であることが判明した後、BC プレートの結果が得られるまでにはさらに1日の期間が必要となるため、抗菌化学療法の開始が遅れてしまう。また、BC プレートはスキップ現象により解析できないこともある。したがって、起因菌として pre-MDRP や MDRP が想定される敗血症に対して経験的治療を行うための併用療法の有効性を評価した疫学的調査が重要である。本研究の結果は、CL/RFP による併用療法が pre-MDRP や MDRP 感染症に対する経験的治療として有用な抗菌化学療法になる可能性を示唆する重要な知見であると考えられた。

結論として、pre-MDRP および MDRP に対する2剤併用療法として、CL/RFP の併用が有用である可能性が示唆された。また、pre-MDRP に対しては、CL/RFP に加え PIPC/AMK の併用も有用である可能性が示唆された。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) Chin N X, Neu H C: Synergy of azlocillin with aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother* 1983; 11(Suppl B): 33-8
- 2) 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
- 3) 館田一博：話題の耐性菌—MDRP, MDRA, NDM-1 産生菌を含めて—。日集中医誌 2013; 20: 9-14
- 4) Zavascki A P, Bulitta J B, Landersdorfer C B: Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11: 1333-53
- 5) 小栗豊子, 石井良和, 三澤成毅, 館田一博, 奥住捷子, 吉田 敦, 他：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。日化療会誌 2011; 59: 172-6
- 6) Aoki N, Tateda K, Kikuchi Y, Kimura S, Miyazaki C, Ishii Y, et al: Efficacy of colistin combination therapy in a mouse model of pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 534-42
- 7) 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
- 8) 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。感染症誌 2009; 83: 133-5
- 9) 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
- 10) Sligl W, Taylor G, Brindley P G: Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. *Int J Infect Dis* 2006; 10: 320-5

Survey of the combination antimicrobial effect against clinical isolated resistant
Pseudomonas aeruginosa using the break-point checkerboard plate method

Tomoyuki Enokiya¹⁾, Yuichi Muraki¹⁾, Akiko Nakamura²⁾,
Masaki Tanabe³⁾, Toshihiro Kaneko³⁾ and Masahiro Okuda¹⁾

¹⁾ Department of Pharmacy, Mie University Hospital, 2-174 Edobashi, Tsu, Mie, Japan

²⁾ Department of Central Clinical Laboratories, Mie University Hospital

³⁾ Department of Patient Safety and Infection Control, Mie University Hospital

Combination antimicrobial therapy has been required to treat resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in critically ill patients. However, the efficient antimicrobial combination for *Pseudomonas aeruginosa* remains controversial. In the present study, the antimicrobial combination effect on the clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa*, which has resistance two or more drugs [Imipenem (IPM), Ciprofloxacin (CPFX) and Amikacin (AMK)] from April 2009 to December 2014 in Mie University Hospital was investigated. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) was defined as having resistance to all drugs from IPM, CPFX and AMK. Pre-MDRP was defined as having resistance to 2 drugs from IPM, CPFX and AMK. Scoring analysis was used to evaluate the results of the antimicrobial combination effect with the Break-point Checkerboard (BC) plate method. The analysis was challenged again when the skip phenomenon was observed. Sixteen pre-MDRP strains and 10 MDRP strains were extracted. In the pre-MDRP strains, the combination of colistin (CL) and rifampicin (RFP) was most effective (92%; total score 33/perfect score 36) and a combination effect was observed in 8 of 9 strains. In addition, the combination of piperacillin (PIPC) and AMK was the second most effective (90%; total score 18/perfect score 20) and a combination effect was observed in 5 of 5 strains. On the other hand, the combination of CL and RFP was most effective for MDRP (85%; total score 17/perfect score 20) and the combination effect was observed in 4 of 5 strains. In conclusion, the combination of CL and RFP would be considered as one of the useful options for the empiric treatment of resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection.