

CRE に対する併用療法の検討

—多剤耐性菌に対する治療戦略ワーキング委員会報告—

CPE および non-CPE に対するコリスチン およびチゲサイクリンを用いない 併用療法の *in vitro* 併用効果

大神田 敬¹⁾, 松本 哲哉^{1,2)}

¹⁾東京医科大学微生物学分野

²⁾国際医療福祉大学医学部感染症学講座

Key words: carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, carbapenemase-non-producing *Enterobacteriaceae*, combination effect, break-point checkerboard plate method, killing curve

要旨

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) による感染症は難治性に陥りやすいにもかかわらず、現在、単独で有効な抗菌薬はコリスチン (CL) とチゲサイクリン (TGC) などに限定されている。そこで、今回、CL および TGC 以外の抗菌薬を用いて *in vitro* における併用効果の検証を行った。

各種カルバペネマーゼ (IMP-1, IMP-6, NDM, KPC, および OXA-48-like) を産生する腸内細菌科細菌 (CPE) 65 株、およびカルバペネマーゼ非産生ではあるが CRE の基準を満たす non-CPE 7 株の合計 72 株を用いて、抗菌薬感受性試験、ブレイクポイント・チェッカーボード (BC) プレート法、および killing curve 実験を実施した。

抗菌薬感受性試験の結果、NDM, KPC, および OXA-48-like 産生菌は IMP-1/6 産生菌および non-CPE に比べて、カルバペネム系抗菌薬およびアミノグリコシド系抗菌薬の MIC は高値であったが、ミノサイクリン (MINO), CL, および TGC の MIC は逆に低値であった。BC プレート法では、有効な薬剤の組合せはカルバペネマーゼの種類によりパターンが異なっていた。また、killing curve の検討の結果、有効な薬剤の組合せを用いることで、sub-MIC でも殺菌または静菌作用を示すことが明らかとなった。これらの結果より、各カルバペネマーゼに対して最も有効性が期待される抗菌薬の組合せは、IMP-1 (トブラマイシン+タゾバクタム/ピペラシリン), IMP-6 (ゲンタマイシン+メロペネム), NDM (MINO+ピアペネム), KPC (アルベカシン+ドリペネム), および OXA-48-like (MINO+イミペネム) であった。

今回の結果は、CL と TGC 以外の抗菌薬であっても、併用によって CPE 感染症を治療できる可能性を示唆しているが、カルバペネマーゼの種類によって効果が期待される抗菌薬の組合せは

¹⁾東京都新宿区新宿 6-1-1, ²⁾千葉県成田市公津の杜 4-3

異なっており、さらに今後、*in vivo* や臨床における評価が重要な課題になるものと思われる。

1. 序文

カルバペネム耐性腸内細菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* : CRE) やカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* : CPE) の世界的な広がり、薬剤耐性菌に対する抗菌薬治療をますます困難にしている。CRE 感染症における治療薬の選択肢は限られており、その死亡率は通常の3倍にも上がることが報告されている¹⁾。また、2050年には薬剤耐性菌が起因で推定1,000万人が死亡すると試算されており、CRE 感染症は人類が早急に対処すべき脅威であるといえる。CRE のカルバペネム系抗菌薬に対する薬剤感受性はさまざまであり、イミペネム (IPM) もしくはメロペネム (MEPM) の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) が $\leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ の菌株に対しては、カルバペネム系抗菌薬を大量に投与すれば、有効な基準とされる % T>MIC が40~50%を超えるため、有効性を示唆する報告もある²⁾。しかし、通常、CRE 感染症にカルバペネム系抗菌薬が用いられることはなく、一般的にコリスチン (CL) あるいはチゲサイクリン (TGC) が選択肢に挙げられる。ただし、CL や TGC は有害事象の発現頻度が高いなどの理由から、使用に関するハードルが高い。そこで現在、CRE 感染症の治療効果をどのようにして高めることができるかが重要な課題となっている。

従来、多剤耐性菌による感染症の治療において、抗菌薬の併用療法が1つの選択肢となってきた。ただし、併用療法の候補となる抗菌薬は多数あるため、FIC index に基づく選択³⁾や、ブレイクポイント・チェッカーボード (BC) プレート法の活用⁴⁾などが報告されてきた。CRE に対しても、主に KPC 型産生菌を対象とした併用療法の検討が報告されているが、その他のカルバペネマーゼやカルバペネマーゼ非産生腸内細菌科細菌 (non-CPE) に関する報告は少ないのが現状である⁵⁾。そこで本研究では、各種の CPE を主な対象として、CL や TGC 以外の抗菌薬による併用療法の可能性を *in vitro* で検証するとともに、有効性が期待される抗菌薬の組合せについても検討を行った。

2. 材料と方法

2.1. 試験菌株

本研究では CPE 65 株および non-CPE 7 株の合計 72 株を使用した。菌種の内訳は *Escherichia coli* が 30 株 (non-CPE 4 株, IMP-1 4 株, IMP-6 5 株, NDM 型 6 株, KPC 型 5 株, OXA-48-like 6 株), *Klebsiella pneumoniae* が 28 株 (non-CPE 2 株, IMP-1 5 株, IMP-6 5 株, NDM 型 6 株, KPC 型 5 株, OXA-48-like 5 株), および *Enterobacter cloacae* が 14 株 (non-CPE 1 株, IMP-1 5 株, IMP-6 1 株, NDM 型 5 株, KPC 型 2 株) であった。これらのうち 68 株が日本で、4 株がバングラデシュで分離された菌株であった。

2.2. 抗菌薬感受性試験

各菌株に対する単剤での MIC は、ドライプレート“栄研”のオーダープレートを用いた。各抗菌薬に対する MIC が測定上限を超えたものに対しては、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準拠した微量液体希釈法で測定した。その際の基準菌株には、*E. coli* ATCC25922 株を用いた。抗菌薬は、カルバペネム系 : IPM, MEPM, doripenem (DRPM), biapenem (BIPM), アミノグリコシド系 : gentamicin (GM), tobramycin (TOB), arbekacin (ABK), amikacin (AMK), モノバクタム系 : aztreonam (AZT), β -ラクタマーゼ阻害薬配合薬 : tazo-

Score 4		Antimicrobial 1	
		non-susceptible	Susceptible
Antimicrobial 2	non-susceptible	-	-
	Susceptible	-	-

Score 3		Antimicrobial 1	
		non-susceptible	Susceptible
Antimicrobial 2	non-susceptible	-	-
	Susceptible	-	+

Score 2		Antimicrobial 1	
		non-susceptible	Susceptible
Antimicrobial 2	non-susceptible	-	-
	Susceptible	+	+

Score 2		Antimicrobial 1	
		non-susceptible	Susceptible
Antimicrobial 2	non-susceptible	-	+
	Susceptible	-	+

Score 1		Antimicrobial 1	
		non-susceptible	Susceptible
Antimicrobial 2	non-susceptible	-	+
	Susceptible	+	+

Score 0		Antimicrobial 1	
		non-susceptible	Susceptible
Antimicrobial 2	non-susceptible	+	+
	Susceptible	+	+

図 1. ブレイクポイント・チェッカーボードプレート法における発育阻止のスコア化。発育を (+), 発育阻止を (-) として表記。

bactam/piperacilline (TAZ/PIPC), フルオロキノロン系: ciprofloxacin (CPF), levofloxacin (LVFX), テトラサイクリン系: minocycline (MINO), ホスホン酸系: fosfomycin (FOM), 合剤: sulfamethoxazole-trimethoprim (ST), ポリペプチド系: CL, およびグリシルサイクリン系: TGC の合計 17 薬剤を使用した。抗菌薬感受性は, CLSI および European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) のブレイクポイント^{6,7)}に基づき判定し, 感性および非感性 (中間および耐性) に分類した。

2.3. 2 剤併用における抗菌薬感受性試験

CRE に対する 2 剤併用効果は, BC プレート法にて検討した。上記の 17 薬剤を組み合わせた合計 136 通りのプレートを作製し, 微量液体希釈法にて発育の有無を確認した。各抗菌薬の終濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) は, CLSI および EUCAST のブレイクポイント^{6,7)}に基づき調整した。使用抗菌薬の精密度管理は, *E. coli* ATCC25922 株を使用して確認した。また, 各使用菌株に対して調整薬液にお

ける単剤での MIC 測定を毎回実施し、同一の MIC 値を示した結果のみを採用した。結果の判定は以下に述べる方法に従って行った。まず、発育阻止を最小 0～最大 4 でスコア化したのち (図 1)、全対象株のスコア率 (合計スコア÷最大スコア) を算出した。次に、単剤で非感性を示す組合せにおいて、併用により片方または両方の抗菌薬における MIC 値が低下したものを相加相乗効果ありと判定し、その菌株数の割合を併用率として算出した。この際、併用する抗菌薬のうち、1 剤でも MIC 値が BC プレートに搭載されている濃度未満であった場合は適応外 (not applicable: N/A) とした。これは、単一薬剤で感性を示す抗菌薬が使用されている場合、発育阻止が併用によるものかどうかを判断できないためである。最終的に、スコア率および併用率が共に 80.0% 以上を示した組合せを有効と判定した。

2.4. 2 剤併用における killing curve 実験

BC プレート法にて併用効果が高い抗菌薬の組合せを 1 組選択し、それらに単剤で最も高い MIC 値を示す菌株をそれぞれ 1 株ずつ使用した。生菌数を 1×10^6 CFU/mL に調整した菌液を用い、塗抹平板培養法にてブランク (抗菌薬なし)、単剤 (各 2 濃度)、併用 (4 濃度) 時のものを算出した。Time kill curve は、抗菌薬曝露後 0 時間・3 時間・6 時間・24 時間後の生菌数をそれぞれカウントし、3 重測定し中央値を算出した。さらに、各使用菌株に対して単剤での MIC 測定を毎回実施し、同一の MIC 値を示した場合のみ結果を採用した。精度管理には、*E. coli* ATCC25922 株を使用した。

3. 結果

3.1. 抗菌薬感受性成績

各種抗菌薬に対する感受性成績を表 1 および表 2 に示した。さまざまなタイプの CRE に対して抗菌薬感受性試験を実施した結果、各抗菌薬に対する感受性は CRE のタイプによって異なることが確認された。カルバペネム系抗菌薬に対する MIC 値は、non-CPE および IMP-1/6 産生株では低値であったが、NDM, KPC, および OXA-48-like 型産生株では高値であった。アミノグリコシド系抗菌薬に対する感受性は、non-CPE および IMP-1/6 産生株が感性であったのに対し、NDM, KPC, および OXA-48-like 産生菌は耐性傾向であった。また、IMP-1 産生株の感性率は AZT に対し高値、MINO に対しては低値であった。一方、IMP-6 産生株の感性率は、AZT に対し低値で、TAZ/PIPC および ST には高値であった。NDM 産生株はアミノグリコシドに高度耐性であったが、FOM に対しては高い感性率を示した。KPC 産生株は、MINO および FOM に高い感性率を示した。OXA-48-like 産生株は多くの抗菌薬に高い感性率を示したが、TAZ/PIPC の感性率は低かった。さらに、IMP-1 産生株の 28.6%、OXA-48-like 産生株の 27.3% は、すべてのカルバペネムに感性を示した。

3.2. BC プレート法における 2 剤併用効果

各 CRE に対するスコア率および併用率を図 2 および図 3 に記した。Non-CPE 株に対して、105 通りのうち 29 通りの組合せが 80.0% 以上のスコア率を示した (図 2-A)。これらは ABK ベース、AMK ベース、BIPM+MINO、および TOB+FOM の組合せであり、ABK および AMK ベースの併用はすべてスコア率 100% であった。相加相乗効果については、単一薬剤ですべての菌株が感性を示す抗菌薬が使用されている組合せは判定不可となった。全体で 105 通りのうち評価が行えたのは 90 通りで、うち 20 通りの組合せが 80.0% 以上の併用率を示した (図 3-A)。これらのうち、DRPM ベースの併用 (IPM, TOB, フルオロキノロン, FOM, ST) および TOB+TAZ/PIPC は、複数の耐性菌株に高い併用率を示していた。したがって、non-CPE 株に対して併用効

表 1. Non-CPE および IMP-1/-6 産生菌の抗菌薬単独に対する感受性成績

	Breakpoint*			non-CPE (n = 7)			IMP-1-producers (n = 14)			IMP-6-producers (n = 11)			
	Susceptible	MIC ^a range	MIC80 ^b	% ^c	MIC range	MIC80	%S	MIC range	MIC80	%S	MIC range	MIC80	%S
IPM	≤ 1	2 to 16	8	0.0	0.5 to 4	4	35.7	0.25 to 0.5	0.5	100	0.25 to 0.5	0.5	100
MEPM	≤ 1	2 to 16	4	0.0	0.25 to 8	8	28.6	4 to 32	16	0.0	4 to 32	16	0.0
DRPM	≤ 1	2 to 8	4	0.0	0.25 to 16	16	28.6	2 to 32	16	0.0	2 to 32	16	0.0
BIPM	≤ 1	1 to 8	8	14.3	≤ 0.06 to 4	2	64.3	≤ 0.06 to 2	0.5	90.9	≤ 0.06 to 2	0.5	90.9
GM	≤ 4	≤ 1 to 128	64	42.9	≤ 1 to 128	2	85.7	≤ 1 to 8	4	81.8	≤ 1 to 8	4	81.8
TOB	≤ 4	≤ 1 to ≥ 64	32	28.6	2 to 64	16	57.1	≤ 1 to 32	16	9.1	≤ 1 to 32	16	9.1
ABK	≤ 4	≤ 1 to ≥ 16	2	85.7	≤ 1 to 4	≤ 1	100	≤ 1 to 4	2	100	≤ 1 to 4	2	100
AMK	≤ 16	≤ 2 to 16	4	100	≤ 2 to 4	≤ 2	100	≤ 2 to 8	4	100	≤ 2 to 8	4	100
AZT	≤ 4	4 to ≥ 2,048	2,048	14.3	≤ 0.25 to 512	16	71.4	≤ 0.25 to 1,024	1,024	9.1	≤ 0.25 to 1,024	1,024	9.1
TAZ/PIPC	≤ 4/32	≤ 4/16 to ≥ 4/8,192	4/2,048	14.3	≤ 4/16 to 4/4,096	4/2,048	35.7	≤ 4/16 to 4/4,096	≤ 4/16	81.8	≤ 4/16 to 4/4,096	≤ 4/16	81.8
CPEX	≤ 0.5	≤ 0.5 to 1,024	256	28.6	≤ 0.5 to 256	64	28.6	≤ 0.5 to 256	128	27.3	≤ 0.5 to 256	128	27.3
LVFX	≤ 1	≤ 1 to 64	32	28.6	≤ 1 to 128	32	28.6	≤ 1 to 128	32	27.3	≤ 1 to 128	32	27.3
MINO	≤ 4	≤ 2 to ≥ 16	16	57.1	4 to 64	32	7.1	≤ 2 to 32	8	54.5	≤ 2 to 32	8	54.5
FOM	≤ 64	≤ 64 to ≥ 256	256	85.7	≤ 64 to 1,024	128	71.4	≤ 64 to 512	≤ 64	81.8	≤ 64 to 512	≤ 64	81.8
ST	≤ 19/1	≤ 19/1 to 19,456/1,024	19,456/1,024	42.9	≤ 19/1 to 19,456/1,024	19,456/1,024	35.7	≤ 19/1 to 19,456/1,024	152/8	72.7	≤ 19/1 to 19,456/1,024	152/8	72.7
CL	≤ 2	≤ 1 to ≥ 8	≤ 1	85.7	≤ 1 to 64	≤ 1	78.6	≤ 1	≤ 1	100	≤ 1	≤ 1	100
TGC	≤ 1	≤ 1 to ≥ 8	2	71.4	≤ 1 to 4	2	64.3	≤ 1 to 4	≤ 1	90.9	≤ 1 to 4	≤ 1	90.9

^a MIC range, 試験した菌株集団の MIC 値の範囲；^b MIC80, 試験した菌株集団の 80.0% の菌株が发育を阻止される MIC 値；^c %S, 感受性率
*ブレイクポイントは CLSI M100-28th (ABK は GM, CL および TGC は EUCAST 2017) に準じた。

表 2. NDM, KPC, および OXA-48-like 産生菌の抗菌薬単独に対する感受性成績

	Breakpoint*			NDM-producers (n = 17)			KPC-producers (n = 12)			OXA-48-like-producers (n = 11)			
	Susceptible	MIC ^a range	MIC80 ^b	% ^c	MIC range	MIC80	%S	MIC range	MIC80	%S	MIC range	MIC80	%S
IPM	≤ 1	2 to 64	16	0.0	4 to 128	64	0.0	0.5 to 128	2	27.3			
MEPM	≤ 1	2 to 64	64	0.0	4 to 128	128	0.0	0.12 to ≥ 256	0.5	81.8			
DRPM	≤ 1	8 to 128	128	0.0	2 to 64	64	0.0	0.12 to 128	1	81.8			
BIPM	≤ 1	0.5 to 16	4	11.8	8 to 256	64	0.0	0.5 to 128	1	81.8			
GM	≤ 4	≤ 1 to ≥ 32,768	16,384	47.1	≤ 1 to ≥ 32,768	64	58.3	≤ 1 to 64	4	81.8			
TOB	≤ 4	≤ 1 to ≥ 32,768	8,192	47.1	≤ 1 to ≥ 32,768	32	25.0	≤ 1 to ≥ 64	16	54.5			
ABK	≤ 4	≤ 1 to ≥ 32,768	8,192	70.6	≤ 1 to ≥ 32,768	8	58.3	≤ 1 to ≥ 1,024	8	72.7			
AMK	≤ 16	≤ 2 to ≥ 32,768	16,384	70.6	≤ 2 to ≥ 32,768	32	75.0	≤ 2 to ≥ 64	8	90.9			
AZT	≤ 4	≤ 0.25 to 16,384	1,024	29.4	2,048 to 8,192	8,192	0.0	≤ 0.25 to 4,096	512	27.3			
TAZ/PIPC	≤ 4/32	4/1,024 to 4/8,192	4/8,192	0.0	4/2,048 to 4/8,192	4/8,192	0.0	4/64 to 4/8,192	4/8,192	0.0			
CPFX	≤ 0.5	≤ 0.5 to 512	256	5.9	≤ 0.5 to 256	128	16.7	≤ 0.5 to 512	128	45.5			
LVFX	≤ 1	≤ 1 to 256	32	23.5	≤ 1 to 128	64	25.0	≤ 1 to 128	128	54.5			
MINO	≤ 4	≤ 2 to 64	16	47.1	≤ 2 to 32	4	83.3	≤ 2 to 32	8	63.6			
FOM	≤ 64	≤ 64 to 256	≤ 64	88.2	≤ 64 to 512	≤ 64	83.3	≤ 64 to ≥ 512	≤ 64	81.8			
ST	≤ 19/1	≤ 19/1 to 19,456/1,024	19,456/1,024	23.5	≤ 19/1 to 19,456/1,024	19,456/1,024	25.0	≤ 19/1 to 19,456/1,024	19,456/1,024	36.4			
CL	≤ 2	≤ 1 to 4	2	94.1	≤ 1 to 64	≤ 1	91.7	≤ 1 to 2	≤ 1	100			
TGC	≤ 1	≤ 1 to 2	≤ 1	94.1	≤ 1	≤ 1	100	≤ 1	≤ 1	100			

^a MIC range, 試験した菌株集団の MIC 値の範囲；^b MIC80, 試験した菌株集団の 80.0% の菌株が発育を阻止される MIC 値；^c %S, 感受性率

*ブレイクポイントは CLSI M100-28th (ABK は GM, CL および TGC は EUCAST 2017) に準じた。

りて、うち 27 通りの組合せが 80.0%以上の併用率を示した (図 3-C)。これらのうち、TOB ベースの併用 (MEPM, DRPM, AZT, ST) は、複数の耐性菌株に高い併用率を示していた。したがって、IMP-6 産生株に対して併用効果が期待できる組合せは、BIPM ベースの併用 (IPM, GM, ABK, AMK, FOM を除く)、GM ベースの併用 (MEPM, DRPM, TOB, AZT, フルオロキノロン, FOM)、FOM ベースの併用 (TOB, TAZ/PIPC) および ST ベースの併用 (TOB, フルオロキノロン) であった。

NDM 産生株に対しては、105 通りのうち 5 通りの組合せが 80.0%以上のスコア率を示した (図 2-D)。これら ABK ベースの併用 (BIPM, FOM, ST) および MINO ベースの併用 (BIPM, AMK) のスコア率は CL および TGC ベースの併用より低値であった。相加相乗効果については、105 通りのうち 3 通りの組合せが 80.0%以上の併用率を示した (図 3-D)。これらのうち、BIPM ベースの併用 (MINO, FOM) は、複数の耐性菌株に高い併用率を示していた。したがって、NDM 産生株に対して併用効果が期待できる組合せは、BIPM+MINO および ABK+FOM であった。

KPC 産生株に対しては、105 通りのうち 27 通りの組合せが 80.0%以上のスコア率を示した (図 2-E)。これらのうち、ABK をベースとした併用は特に高いスコア率を示した。相加相乗効果については、105 通りのうち評価が行えたのは 103 通りで、うち 16 通りの組合せが 80.0%以上の併用率を示した (図 3-E)。これらのうち、ABK ベースの併用 (GM, AMK, MINO, FOM を除く) は、複数の耐性菌株に高い併用率を示していた。したがって、KPC 産生株に対して併用効果が期待できる組合せは、ABK ベースの併用 (GM, AMK, FOM を除く) および MINO ベースの併用 (AMK, LVFX) であった。

OXA-48-like 産生株に対しては、105 通りのうち 69 通りの組合せが 80.0%以上のスコア率を示した (図 2-F)。これらのうち、ABK, AMK, および MINO をベースとした併用は特に高いスコア率を示した。相加相乗効果については、105 通りのうち 7 通りの組合せが 80.0%以上の併用率を示した (図 3-F)。これらのうち、IPM+MINO, ABK+TAZ/PIPC, TAZ/PIPC+MINO は、複数の耐性菌株に高い併用率を示していた。したがって、OXA-48-like 産生株に対して併用効果が期待できる組合せは、MINO ベースの併用 (カルバペネム, TAZ/PIPC) および ABK+TAZ/PIPC であった。

3.3. 2 剤併用における殺菌効果

BC プレート法の結果に基づき、non-CPE, IMP-1, IMP-6, NDM, KPC, および OXA-48-like 産生株に対してそれぞれ IPM+ABK, TOB+TAZ/PIPC, MEPM+GM, BIPM+MINO, AMK+MINO, および IPM+MINO を使用した (表 3)。各 CRE に対する 2 剤併用の time kill curve を図 4 に示した。すべての組合せに相加相乗効果が認められ、特に non-CPE, IMP-6, OXA-48 産生株に対して強い殺菌作用が認められた。カルバペネマーゼ非産生 *K. pneumoniae* は IPM 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と ABK 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用により最初の 10^6 CFU/mL から 3 時間で 10^4 CFU/mL に減り、24 時間後は 10^1 CFU/mL (検出限界) 以下まで減少した (図 4-A)。IMP-1 産生 *E. cloacae* は TOB 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と TAZ/PIPC 4/32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用により 6 時間後に 10^2 CFU/mL まで減少したが、24 時間後は 10^5 CFU/mL と再増殖がみられた (図 4-B)。IMP-6 産生 *E. coli* は MEPM 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と GM 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用により、3 時間で 10^2 CFU/mL に減り、24 時間後も 10^1 CFU/mL (検出限界) 以下であった (図 4-C)。NDM-5 産生 *E. coli* は BIPM 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と MINO 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用により、6 時間で 10^5 CFU/mL に減り、24 時間後は 10^4 CFU/mL に減少した (図 4-D)。KPC-2 産生 *K. pneumoniae* は AMK 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と MINO 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用により、6 時間後は 10^5 CFU/mL に減少したが、24 時間後でも 10^5 CFU/mL であった (図 4-E)。OXA-48-like 産生 *E. coli* は IPM 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

表 3. Killing curve 実験に使用した菌株の感受性成績

CRE types	Bacterial strains	Single				Combination	
		Drug 1	MIC	Drug 2	MIC	Drug 1 + 2	MIC
non-CPE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IPM	8	ABK	≥16	IPM + ABK	≤1 + 4
IMP-1-producers	<i>Enterobacter cloacae</i>	TOB	16	TAZ/PIPC	4/1,024	TOB + TAZ/PIPC	≤4 + 4/16
IMP-6-producers	<i>Escherichia coli</i>	MEPM	16	GM	8	MEPM + GM	≤1 + 4
NDM-5-producers	<i>Escherichia coli</i>	BIPM	16	MINO	16	BIPM + MINO	1 + 8
KPC-2-producers	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMK	32	MINO	8	AMK + MINO	≤16 + 4
OXA-48-like-producers	<i>Escherichia coli</i>	IPM	2	MINO	8	IPM + MINO	≤1 + 4

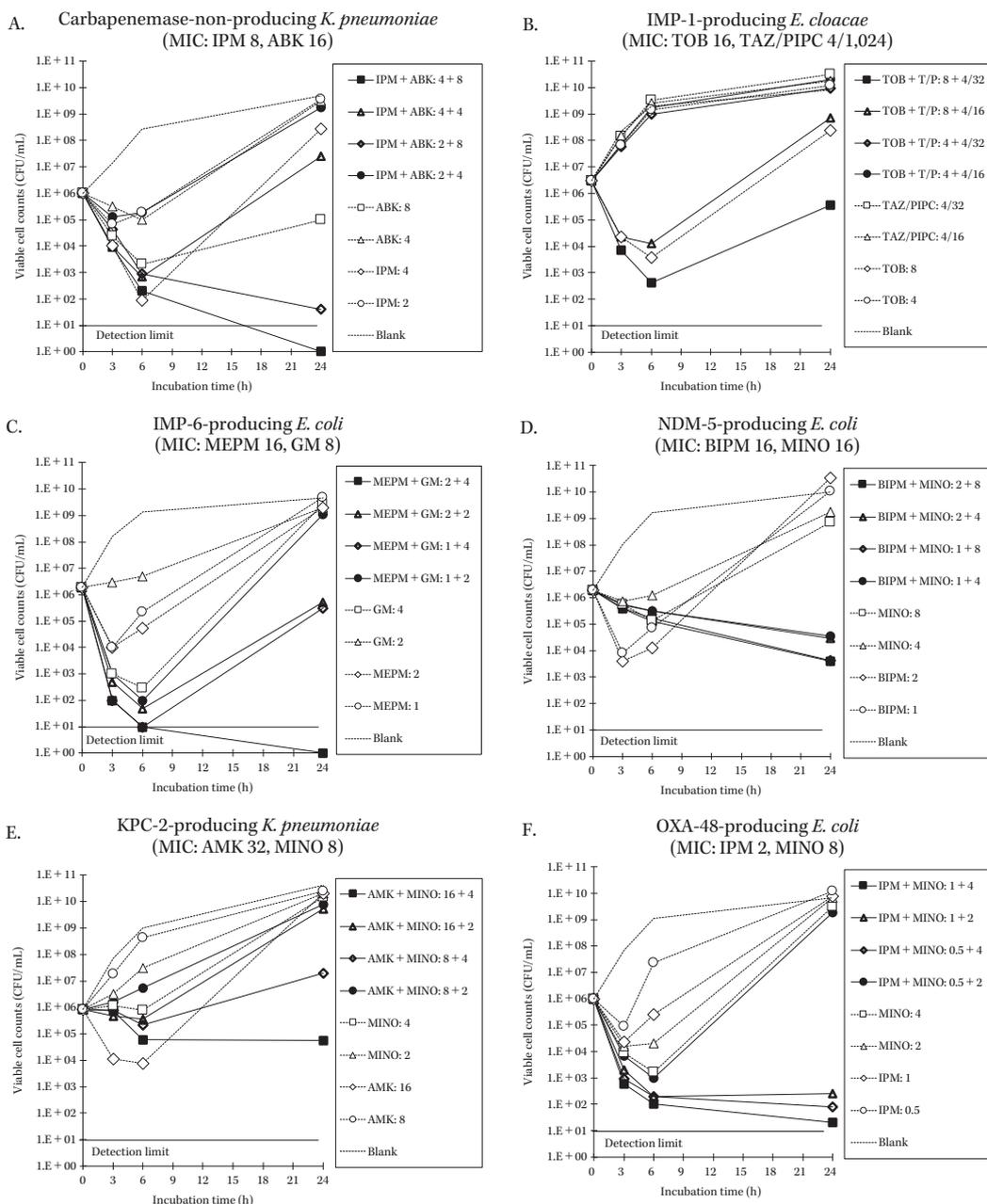


図 4. 各 CRE タイプに対する 2 剤併用による time kill curve。縦軸に生菌数、横軸に培養時間を示している。生菌数が $\leq 1 \times 10^3$ CFU/mL を殺菌効果ありと判定している。検出限界は 1×10^1 CFU/mL である。

と MINO 4 µg/mL の併用により、3 時間後は 10^3 CFU/mL に減少し、24 時間後は 10^1 CFU/mL まで減少した (図 4-F)。

4. 考察

本研究では、CPE 65 株および non-CPE 7 株の計 72 株に対する 15 薬剤の組合せ (105 通り) の *in vitro* 併用効果を検討した。その結果、有効な抗菌薬の組合せはカルバペネマーゼの産生性やそのタイプによって異なることが明らかとなった (表 4)。一部の組合せは、CL または TGC を用いた併用と同等もしくはそれ以上の有効性を示しており、臨床的な有効性が期待される結果となった。一方、non-CPE 株に対しては評価対象となる菌株が 1 株のみであったため、有効な組合せは記載していない。

今回の検討結果により、アミノグリコシドをベースとした併用療法が各種の CPE に対して有効性が期待できることを示している。アミノグリコシドは他の抗菌薬と併用することでシナジー効果を示すことから、CRE に対する併用療法に推奨されており、過去の報告では、GM をベースとした併用療法により KPC 産生 *K. pneumoniae* 感染患者の死亡率を 53.3% から 31.2% へ減少させている⁸⁾。また、20 件の臨床研究のレビューにおいて、アミノグリコシドとカルバペネムの組合せが最も死亡率が低いと報告されている⁹⁾。主に日本で分離頻度が高い IMP-1 産生菌については、今回の検討で TOB と β ラクタムの併用が最も有効であることが示唆された。TOB をベースとした併用は、緑膿菌に対する併用効果が報告されており、MEPM との組合せが推奨されている¹⁰⁾。さらに、Oie らは高用量の AZT を用いた 3 剤併用の IMP-1 産生緑膿菌に対する有効性を報告している¹¹⁾。確かに、今回の検討結果でもこれらの組合せは、IMP-1 産生菌に対して高い併用効果を示したが、最も高い有効性を示した組合せは TOB+TAZ/PIPC であった。この組合せは、両薬剤に耐性の株に対しても sub-MIC で短時間殺菌能を示した。したがって、IMP-1 産生菌による感染症では、TOB+TAZ/PIPC の併用療法が最も有効であると考えている。

IMP-6 産生菌の場合、TOB ではなく GM をベースとする組合せで優れた有効率が示された。特に GM と MEPM の併用はすべての IMP-6 産生菌に対して有効であり、両薬剤に耐性の株に対しても sub-MIC で顕著な殺菌効果を示した。したがって、今回の検討結果に基づくと、IMP-6 産生菌による感染症においては GM+MEPM の治療を推奨する。興味深いことに、ベースとなるアミノグリコシドの種類は、IMP-1 産生菌と IMP-6 産生菌で異なっており、TOB および GM に対する感受性の違いによるものと推測する。また、本研究で IMP 産生菌は、AMK と ABK に対して単剤でも 100% 感性であったため、これらを使用した組合せの相加相乗効果を検討することができなかった。これらをベースとした組合せは高いスコア率を示しているため、今後これらの相加相乗効果を検討する必要がある。

多くの場合、主に南アジアで広がっている NDM 産生株は 16S rRNA メチルトランスフェラーゼ (16SRMTase) を同時に産生するため、広範囲のアミノグリコシド系に対して高度耐性を示すことが知られている。本研究でも、バングラデシュで分離された株を含むいくつかの NDM 産生菌は複数の 16SRMTase 産生遺伝子を保有しており、アミノグリコシドに対して超高度耐性を示していた。さらに、アミノグリコシド系を用いた組合せは、NDM 産生菌に対して高い有効性を示さなかった。したがって、NDM 産生菌に対してアミノグリコシドを用いた併用療法は推奨できない。今回の検討結果では、NDM 産生菌に対して BIPM+MINO のみが優れた併用効果を示した。テトラサイクリンは、30S リボソームサブユニットに結合することで蛋白合成を阻害する静菌的抗菌薬であり、一般的に、静菌的抗菌薬を用いた併用には拮抗作用を示すことが知られて

表 4. 各 CPE に有効な抗菌薬の組合せ

Combination patterns	IMP-1-producers (n = 14)			IMP-6-producers (n = 11)			NDM-producers (n = 17)			KPC-producers (n = 12)			OXA-48-like-producers (n = 11)		
	Drug 1	Drug 2	%Score	Drug 1	Drug 2	%Score	Drug 1	Drug 2	%Score	Drug 1	Drug 2	%Score	Drug 1	Drug 2	%Score
TOB	TAZ/PIPC		100	GM	MEPM	100	MINO	BIPM	89.7	ABK	DRPM	91.7	MINO	IPM	95.5
TOB	AZT		92.9	ST	LVFX	100	-	-	-	ABK	ST	91.7	ABK	TAZ/PIPC	95.5
TOB	MEPM		91.1	GM	DRPM	90.9	-	-	-	ABK	LVFX	91.7	MINO	TAZ/PIPC	81.8
TOB	IPM		87.5	GM	CPEX	86.4	-	-	-	ABK	CPEX	91.7	-	-	-
TOB	MINO		80.4	GM	TOB	86.4	-	-	-	ABK	TOB	91.7	-	-	-
No. of combinations	Top 5 out of 6 patterns			Top 5 out of 9 patterns			Only 1 pattern			Top 5 out of 10 patterns			Only 3 patterns		

併用効果の高い順に上から記載されている。スコア率および併用効果が 80.0% 以上の組合せのうち、複数株に相加相乗効果を示したものを記載している。

いる¹²⁾。しかし、高用量の MINO (1日2回 0.2 g) をベースとした併用療法により 67%の患者に治療効果が認められたという報告もある¹³⁾。今回の検討においても、MINO を用いた併用は NDM 産生菌だけでなく、IMP-1 産生菌や OXA-48-like 産生菌に対しても高い併用効果を示したため、高用量の MINO を用いた併用療法の有効性が期待できると考えている。

KPC 産生株に対しては、ABK をベースとした組合せが高い有効性を示した。ABK は、多くの抗菌薬と高い併用効果を示し、いずれも同等に効果的であった。しかし、ABK は諸外国では使用されていないため、本研究では AMK+MINO の組合せで killing curve 実験を実施し優れた併用効果を示したが、その作用は ABK には劣っていた。また Pogue らの報告¹³⁾では、KPC 産生 *K. pneumoniae* に対する AMK と MINO の併用では治療効果は得られておらず、AMK ベースの併用には限界があると考えている。

OXA-48-like 産生株は、カルバペネム系やアミノグリコシド系の抗菌薬に対して比較的良好な感受性を示したが、多くの組合せには相加相乗効果が認められず、高い有効性を示した組合せはわずか3通りであった。今回の検討では IPM+MINO が最も優れた併用効果を示したため、OXA-48-like 産生菌による感染症には IPM+MINO の併用療法を推奨する。なお、本研究で使用された菌株のうち、日本で分離された株の感受性は比較的良好であったが、バングラデシュで分離された株の感受性は NDM 産生株と同様の耐性度であった。これらは、OXA-48-like 産生菌の感受性が分離される地域によって異なり、それにより効果的な併用療法も異なる可能性を示唆している。

5. 結論

本研究により、CPE に対して有効な抗菌薬の組合せがカルバペネマーゼのタイプによってそれぞれ異なることが明らかとなった。各 CPE に対して最も有効な抗菌薬の組合せは、IMP-1 産生菌には TOB+TAZ/PIPC, IMP-6 産生菌には GM+MEPM, NDM 産生菌には MINO+BIPM, KPC 産生菌には ABK+DRPM, および OXA-48-like 産生菌には MINO+IPM であることが示唆された。また近年、耐性遺伝子を短時間で検出できる検査法が開発されており、これらを臨床の現場で活用することで、CPE による感染症に対して有効性が期待される組合せを用いた効果的な併用療法が早期から実施できるようになると考えられる。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、菌株の収集に協力いただいた奈良県立医科大学微生物感染症学講座の矢野寿一教授に厚く御礼申し上げます。

7. 利益相反

松本哲哉は、MSD(株)、ファイザー(株)より講演料を受けている。
大神田敬は申告すべきものなし。

8. 引用文献

- 1) Patel G, Huprikar S, Factor S H, Jenkins S G, Calfee D P: Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies.

- Infect Control Hosp Epidemiol 2008; 29: 1099-106
- 2) Karaiskos I, Antoniadou A, Giamarellou H: Combination therapy for extensively-drug resistant gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017; 15: 1123-40
 - 3) Chin N X, Neu H C: Synergy of azlocillin with aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother* 1983; 11 (Suppl B): 33-8
 - 4) 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
 - 5) Morrill H J, Pogue J M, Kaye K S, LaPlante K L: Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. *Open Forum Infect Dis* 2015; 2: ofv050
 - 6) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th Edition. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2018
 - 7) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters: Version 7. 1, 2017
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf
 - 8) Gonzalez-Padilla M, Torre-Cisneros J, Rivera-Espinar F, Pontes-Moreno A, López-Cerero L, Pascual A, et al: Gentamicin therapy for sepsis due to carbapenem-resistant and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 905-13
 - 9) Tzouveleki L S, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos G L: Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 862-72
 - 10) 高橋公毅, 菅野治重: 緑膿菌の薬剤感受性と抗菌薬の併用効果について。日化療会誌 1999; 47: 67-73
 - 11) Oie S, Fukui Y, Yamamoto M, Masuda Y, Kamiya A: *In vitro* antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 123
 - 12) Gunnison J B, Shevsky M C, Bruff J A, Coleman V R, Jawetz E: Studies on antibiotic synergism and antagonism: the effect in vitro of combinations of antibiotics on bacteria of varying resistance to single antibiotics. *J Bacteriol* 1953; 66: 150-8
 - 13) Pogue J M, Neelakanta A, Mynatt R P, Sharma S, Lephart P, Kaye K S: Carbapenem-resistance in gram-negative bacilli and intravenous minocycline: an antimicrobial stewardship approach at the Detroit Medical Center. *Clin Infect Dis* 2014; 59 (Suppl 6): S388-93

Abstract

Introduction: This study aimed to investigate the *in vitro* effects of a combination of antibiotics other than colistin (CL) and tigecycline (TGC) on carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE).

Methods: We used 72 CRE strains including 65 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) that produce IMP-1, IMP-6, NDM, KPC, and OXA-48-like carbapenemases; and 7 carbapenemase-nonproducing *Enterobacteriaceae* (non-CPE) strains. These strains were assessed using antimicrobial susceptibility testing, breakpoint checkerboard (BC) plate method, and kill curve experiment to determine the effect of the combination therapy.

Results: NDM, KPC, and OXA-48-like carbapenemase producers showed higher MICs of carbapenem and aminoglycosides, and lower MICs of minocycline (MINO), compared to non-CPE and IMP-1/-6 producers. The results of the BC plate method suggested that the suitability of combinations of antibiotics differ depending on the type of carbapenemases. Killing curve experiments demonstrated bactericidal or bacteriostatic action of the combination of antibiotics even in sub-MIC concentrations of drugs. Our results suggest that the most effective antibiotic combinations for each carbapenemase producers are as follows; IMP-1 (tobramycin+tazobactam/piperacillin), IMP-6 (gentamicin+meropenem), NDM (MINO+biapenem), KPC (arbakacin+doripenem) and OXA-48-like (MINO+imipenem).

Conclusion: These results suggest that the combination of antibiotics other than CL and TGC may be another candidate for the treatments of CPE infections, even though we have to choose effective antibiotic combinations depending on the type of carbapenemase.