

当院で分離された緑膿菌分離株の疫学的評価

—抗緑膿菌用 β -lactam 系薬剤の MIC 測定—

中埜 茂子¹⁾・福田さえ子¹⁾・田沢 節子¹⁾・丸茂 健治²⁾・中村 良子²⁾

¹⁾昭和大学藤が丘病院中央臨床検査部*, ²⁾同 臨床病理科

(平成6年12月6日受付・平成7年3月2日受理)

昭和大学藤が丘病院における臨床分離株(1992年4月~1993年11月, 188株)に対するO抗原血清型別と抗緑膿菌 β -lactam 系薬剤の MIC 分布を疫学的に解析し, 以下の成績を得た。

1. 全分離株中79株(42%)は呼吸器由来検体, 55株(29%)は尿由来検体, 38株(20%)は膿由来検体であった。これらのほとんどは, 救命救急センター, 泌尿器, 外科, 消化器および呼吸器内科の病棟で分離された。

2. 全分離株中55株(29%)はE型で, 34株(18%)はG型, 19株(10%)はA型であった。これらの値は, 分離された他の血清型よりも高かった。なお, 血清型JとLはまったく分離されなかった。

3. Carbapenem系薬剤の imipenem, panipenem, meropenem, biapenem の MIC₅₀ は 0.39 から 1.56 μ g/ml であった。cefclidin の MIC₅₀ と MIC₉₀ はそれぞれ 0.39 と 25 μ g/ml, ceftazidime のそれは 1.56 と 12.5 μ g/ml であった。これらの抗菌剤は, 検討した分離株に対して cefotaxime, latamoxef, cefoperazone, cefsulodin, aztreonam, piperacillin, ticarcillin の値よりもより高い抗菌活性を示していた。

4. 全分離株中, 10株(5%)のみが carbapenem 系薬剤耐性で, そのうち6株(60%)は呼吸器由来検体から分離された。

5. Cefclidin 耐性の28株(全体の14%)中18株(64%)は尿由来検体, 3株(11%)は呼吸器由来検体から分離された。

6. Carbapenem または cefclidin 耐性の37株中, 交差耐性はわずか1株(3%)であった。

7. Cefclidin 耐性株はE型(21株, 38%)で, carbapenem系薬剤耐性株はA型(2株, 11%)でもっとも多く分離された。

8. 分離頻度が2番目に高いG型では, cefclidin 耐性株はまったく分離されなかった。

9. Cefclidin と ceftazidime の MIC 相関図で cefclidin 耐性群は回帰直線上から解離していた。したがって cefclidin 耐性株と ceftazidime 耐性株では, 緑膿菌の耐性機構が異なることが示唆された。

Key words: 緑膿菌, O 抗原血清型別, cefclidin, carbapenem, ceftazidim

近年, 医学の急速な進歩に伴い免疫不完全患者に対する難治性の院内感染症が問題となっており, その起因菌の一つとして緑膿菌が知られている¹⁾。緑膿菌は多くの抗生物質に対して耐性獲得が容易であることから, 優れた抗菌力をもつ薬剤が次々と開発されたにもかかわらず, 耐性菌が臨床材料より検出されている^{2,3)}。このことは, 薬剤耐性菌がどの程度増加しているのかを各病院ごとに把握することの重要性を示している。今回, 本院で分離された緑膿菌に対する各種抗緑膿菌 β -lactam 系薬剤の MIC を測定し, O 抗原血清型別の結果とともに疫学的に抗菌力の解析を行ったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 菌 株

当院において, 1992年4月から1993年11月までに

各種臨床材料から分離された新鮮分離株(188株)を用いた。なお, 同一患者, 同一検体からの重複は避けた。

2. 同 定

緑膿菌の同定には, Micro Scan system (W/A system, Baxter 社) を使用した。

3. 血清型別

O 抗原血清型別には, モノクロナール抗体を用いたメイアッセイ緑膿菌キット(明治製菓)を用い, スライド凝集法で被検菌の型別を行った。

4. MIC の測定

MIC 測定は, 日本化学療法学会標準法(寒天平坂希釈法)に準じ⁴⁾, 以下の条件で行った。MIC 測定用培地には感性ディスク用培地-N「ニッスイ」を用い, 被検

菌は Trypticase Soy Agar (BBL) において純培養し、37°C、一夜培養後、BSG (buffered saline with gelatin) で Mc. Farland No. 0.5~1.0 に菌液を調製し、それを 100 倍希釈して接種菌液とした。寒天平板への接種には、マイクロプランター (佐久間製作所) を使用した。接種菌量は、 $1.1\sim 1.5 \times 10^3$ CFU/SPOT で、対照菌株には *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 を用いた。使用した抗菌剤は、以下に示すごとくである。

Cefclidin (CFCL, エーザイ), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ), cefotaxime (CTX, ヘキストジャパン), latamoxef (LMOX, 塩野義製薬), cefoperazone (CPZ, 富山化学), cefsulodin (CFS, 武田製薬), aztreonam (AZT, エーザイ), imipenem (IPM, 萬有製薬), panipenem (PAPM, 三共), meropenem (MEPM, 住友製薬), biapenem (BIPM, 日本レダグリー), piperacillin (PIPC, 富山化学), ticarcillin (TIPC, 藤沢薬品)。なお、耐性限界値の判定は NCCLS 法に従った⁵⁾。

5. 統計処理

得られた成績に関する統計学的評価は、 χ^2 検定法、および Willcoxon の順位和検定法により行った。また、薬剤の MIC に関する相関図には 1 次回帰式と相関係数を用いて評価した。

II. 成績

1. 薬剤感受性について

被検菌に対する種々の抗緑膿菌 β -lactam 系薬剤の MIC 値を Table 1 に示す。MIC₅₀ 値で比較すると、cephem 系薬剤では CFCL (0.39 μ g/ml) が他の薬剤より被検菌に対して感受性であった。同様に carbapenem 系薬剤の IPM (0.78 μ g/ml), PAPM (1.56 μ g/ml),

MEPM (0.39 μ g/ml), BIPM (0.39 μ g/ml) は同程度の成績で被検菌に対して感受性であった。また、MIC₉₀ 値においても carbapenem 系薬剤は他剤より被検菌に対して感受性であったが、CFCL (25 μ g/ml) は CAZ, CFS より 1 管、さらに carbapenem 系薬剤のものよりも 3~4 管耐性傾向にあった。

Cephem 系薬剤では CFCL 耐性株は 28 株 (全体の 14%) で、このうち尿由来検体から分離されたものが 18 株 (64%) と多かった。また、CAZ 耐性株は 10 株と少なかったが、そのうち呼吸器由来検体から分離されたものが 7 株と多かった。Carbapenem 系薬剤の耐性頻度は全て 10% 以下と低く、呼吸器由来検体で耐性株が多く分離された。

2. 検体別分離頻度

被検菌の分離頻度は呼吸器由来のものが 79 株 (42%) ともっとも多く (上気道由来 56 株, 下気道由来 23 株), 次いで尿由来のもので 55 株 (29%), 膿由来で 38 株 (20%), 耳漏 6 株 (3%), 穿刺液 3 株 (2%), その他のものが 7 株 (4%) であった。

3. O 抗原血清型別分離頻度

被検菌を O 抗原血清型別したときの分離株数は、E 型が 55 株 (29%) でもっとも多く、次いで G 型 34 株 (18%), A 型 19 株 (10%) と続き、以下 F, B, H, I, M, D, C, N, K 型 (各 10% 以下) の順であった。一方、J, L 型および判定不能株はまったく分離されなかった。なお、検体別でみると呼吸器由来検体では G 型 (20 株), E 型 (17 株), 尿および膿由来検体からは E 型が多く分離された。次に O 抗原血清型の分離頻度が高かった A, E, G 型の CFCL と IPM に対するそれぞれの耐性率を他型と比較したものを Fig. 1 に示した。A 型では CFCL 耐性は 16% であったが、他型と比べて有意な差は認められなかった。E 型では CFCL 耐性率が 38% (21/55 株) で、他型と比較して有意に高かった

Table 1. Antibacterial activities of various β -lactam antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates

β -lactam antibiotic ^{a)}		MIC (μ g/ml)		
		range	50%	90%
Cephems	CFCL	0.20 - 100	0.39	25
	CAZ	0.39 - 200	1.56	12.5
	CPZ	1.56 - >200	3.13	25
	LMOX	1.56 - >200	12.5	50
	CTX	0.78 - >200	25	100
	CFS	0.78 - >200	1.56	12.5
Monobactam	AZT	0.20 - >200	3.13	25
Carbapenems	IPM	0.10 - 25.0	0.78	3.13
	PAPM	0.10 - 25.0	1.56	6.25
	MEPM	≤ 0.025 - 25.0	0.39	3.13
	BIPM	0.10 - 25.0	0.39	3.13
Penicillins	PIPC	0.78 - >200	3.13	100
	TIPC	0.20 - >200	12.5	200

CFCL: cefclidin, CAZ: ceftazidime, CPZ: cefoperazone, LMOX: latamoxef, CTX: cefotaxime, CFS: cefsulodin, AZT: aztreonam, IPM: imipenem, PAPM: panipenem, MEPM: meropenem, BIPM: biapenem, PIPC: piperacillin, TIPC: ticarcillin

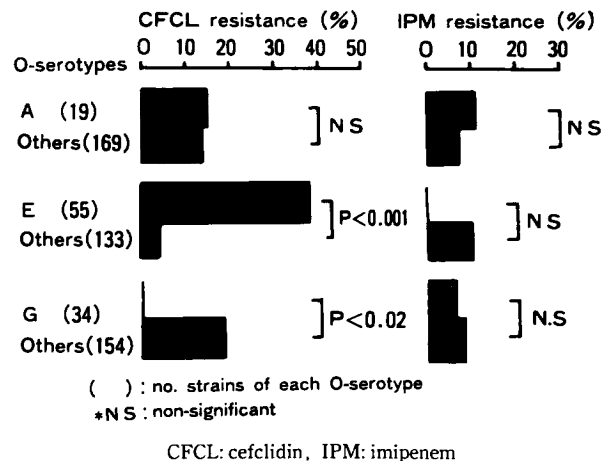


Fig. 1. Evaluation of cefclidin and imipenem resistance rates of *Pseudomonas aeruginosa* isolates classified by O-serotypes A, E, and G by χ^2 -test.

Table 2. Distribution of O-serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates according to hospital ward

Floor	ward	O-serotypes														Total (%)
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
9	Neurology Ophthalmology	2			1	1		4								8 (4)
8	8 Internal Medicine Gastroenterology Respiratory organ	2	3			9		4		1				1	1	21 (11)
7	7 Internal Medicine Hematology Kidney center	1	1			4	1	3	1			1				12 (6)
6	Orthopedic surgery Darmatology	1				3		1		1						6 (3)
5	General surgery		4	2		7	1	6	2	1				2		26 (14)
4	Urology Obstetrics & gynecology Pediatrics	5	2		1	8	4	3	2	2				4		31 (16)
3	Emergency ICU & CCU Neurosurgery	1	1		1	12	6	5	2	2				1	1	32 (17)
	Rehabilitation center	1	1		1	7	2	1	2					1		16 (9)
	Total inpatients	14	12	2	4	51	14	27	9	7		1		9	2	152 (81)
	Outpatients ^{a)}	5	5	2	4	4	3	7	1	3		1		1		36 (19)

^{a)}11 of 35 outpatients were from the urology ward.

($p < 0.001$)。G型ではCFCL耐性率が0%であり感受性であった ($p < 0.02$)。また、IPMでは耐性率が低かったためA型では高かったものの血清型による有意差は認められなかった。

4. 病棟別分離頻度

O抗原血清型別から *P. aeruginosa* の病棟別分布を Table 2 に示した。分離株数が多かったのは、3, 4, 5, 8階病棟であった。外来からの分離株は35株 (19%)であり、このうち11株は泌尿器科からの尿検体であった。分離株数をもっとも多かったE型は3, 4, 8, 5階病棟とリハビリテーションセンターで、より多く分布していた。他の血清型には、特徴的な分布は認められなかった。

5. 薬剤の交差耐性

Carbapenem系薬剤間のMICをIPMを対照として相関図で示したものを Fig. 2 に示した。相関係数は γ は0.777~0.998の範囲にあり、これらの相関図はほぼ対角線上に分布していた。

またCFCLのMICと、CAZ, IPM, CTX, PIPCのそれぞれのMICの相関図を Fig. 3 に示した。CFCLとCAZ間の相関係数 γ は0.513で、交差耐性株はまったくなく、CFCL耐性側に28株の解離群が認められた。この解離群を除いた相関係数 γ は0.676で相関性が高くなった。CFCLとIPM間の相関係数 γ は0.116

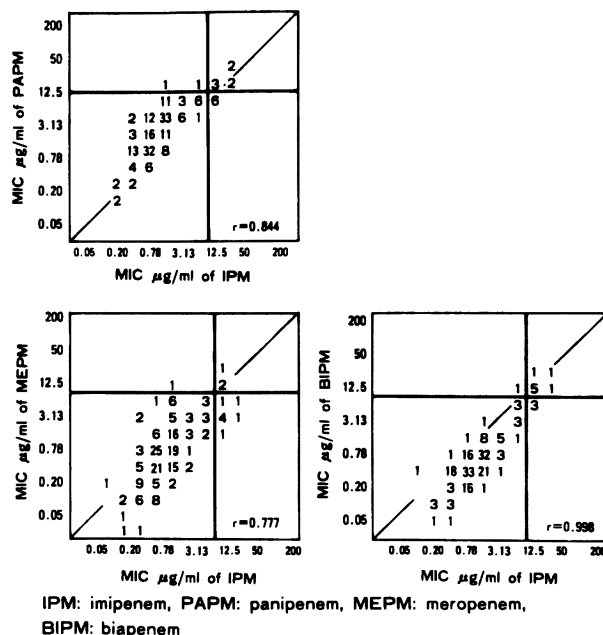


Fig. 2. MIC-correlograms of four carbapenems to 188 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

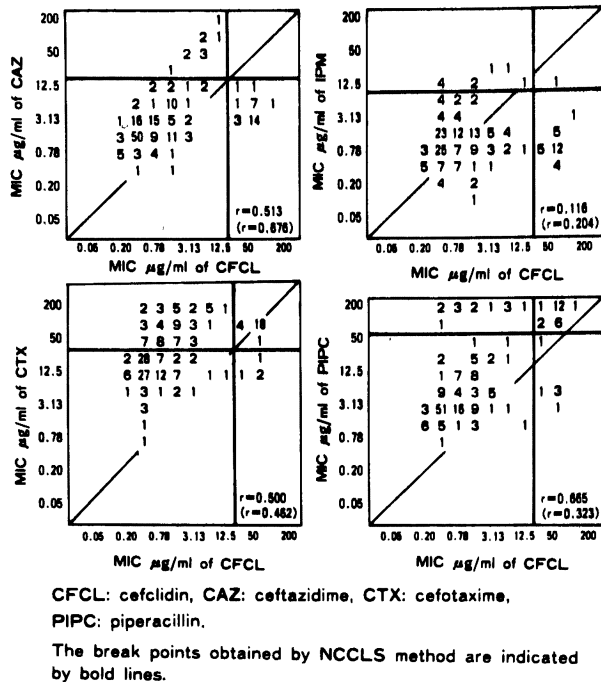


Fig. 3. MIC-correlograms of cefclidin, ceftazidime, imipenem and piperacillin to 188 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

で、さきの解離群を除いたものも0.204と低く、相関が認められなかった。CFCLとIPMの交差耐性率は全体で0.5% (1/188株)、両剤耐性株中では3% (1/37株)であった。CFCLとCTX間の相関係数 γ は0.500であり、解離群を除いても0.462と相関係数が低かった。CFCLとPIPC間の相関係数 γ は0.665でやや高い相関が認められたものの、解離群を除くと0.323と低くなった。これは、両薬剤の交差耐性株が多かったためである。

III. 考 察

本院で分離された *P. aeruginosa* に対する β -lactam系薬剤の抗菌力について疫学的に解析を行った。呼吸器由来検体から分離された *P. aeruginosa* は尿由来検体の約1.5倍であった。O抗原血清型別を行った時の分離頻度はE型がもっとも高く、この傾向は前回 (1986~1988年) 調べた成績と似ていた⁶⁾。また、E型株は尿由来検体から多く分離され、さらにCFCL耐性が多かった。3番目に分離頻度が高かったA型株はcarbapenem系薬剤耐性株の分離頻度が他型株より高かったが、その値は10%前後と低値を示し、統計的有意差が認められなかった。一方、2番目に分離頻度の高かったG型株はCFCLやcarbapenem系薬剤にA型株やE型株よりも感受性であった。このことはO抗原血清型の違いが耐性獲得に関与している可能性が高いことを示唆していた^{1,3)}。なお、O抗原血清型別による耐性菌の違いは、*P. aeruginosa* だけではなく⁷⁾、*Serratia marcescens* でも認められている⁸⁾。CFCLは臨床面では使用されてい

ない薬剤ではあるが、今回得られた当院の成績においては14%の耐性菌がすでに存在していた。興味あることは、CFCLとCAZのMIC相関図においてCFCL耐性群がCAZ感受性側で解離群を形成していたことである。またこの解離群を除いた場合、両薬剤間の相関係数が高くなり交差耐性は認められなかった。このことは、CFCLとCAZの抗菌力が異なることを示唆するものである。渡辺らは、CFCL耐性がtype II oxyiminocephalosporin-hydrolyzing β -lactamase (group 3) やtype II penicillinase (OXA-1) 類似の β -lactamaseによるものであることを報告している⁹⁾。この解離群におけるCFCLの耐性機序については、現在検討中である。また、Carbapenem系薬剤間では交差性が高かった (Fig. 2)。PAPM, MEPM, BIPMも臨床的には使用されていないが、IPMは従来より使用されている。なお、検討した4種のcarbapenem系薬剤のうちPAPMのMIC値が他の3剤より1~2管高かった。このことは、IPMとPAPMは培地中の遊離塩基性アミノ酸含有の多少により外膜透過性に差異を生じ抗菌力が変化し、IPMよりPAPMの方がその拮抗を受けやすいということが報告されている¹⁰⁾。IPMとCFCLのMIC相関図によると、両薬剤間に相関は認められなかった (Fig. 3)。このことは、両薬剤間の交差性が極めて低いことを示すものであり¹¹⁾、実際の交差耐性率はわずか3%であった。carbapenem系薬剤の耐性機序がporinの変化とは別のtransferableな β -lactamase (metalloenzyme) によることが渡辺らにより報告されており¹²⁾、第三世代cephem系薬剤もこの β -lactamaseにより水解されることが知られている¹³⁾。今回検討した *P. aeruginosa* のうち、carbapenem系薬剤耐性が透過性の低下によるものか、 β -lactamaseによるものか、あるいは両者によるものかについてはさらに詳細な検討が必要である。

当院ではA型とE型で耐性菌が多かったが、このことは他院の報告でも認められるものの^{1,3,14,15)}、実際の分離頻度については個々の施設により化学療法の違いから差があることが考えられる。また、これら耐性菌は当院では泌尿器科、内科病棟でより分離頻度が高く、外科病棟、外来患者からのものでは低かった (Table 2)。科別による耐性菌の分離頻度の差は抗菌剤の使用頻度が一般に高い科でおきていた。

以上のことから、病院内での *P. aeruginosa* の耐性菌の動向を把握する上で、疫学的解析結果を加味させて評価することで一層有力な知見が得られた。

本研究は、第42回日本化学療法学会総会 (1994年6月) において発表した。

文 献

- 1) 山下正宜, 森河 淨, 黒田満彦: 緑膿菌の血清型特にE型と抗生物質耐性との関係。臨床病理 39: 541~

- 547, 1993
- 2) 草場耕二, 柿添郁子, 山田尚友, 田辺一郎, 永沢善三, 植田 寛, 田島 裕, 只野壽太郎: 当院における各種薬剤耐性緑膿菌の分離頻度について。Chemotherapy 42: 147~157, 1994
 - 3) 山口恵三: 菌学的諸性質: 分離。緑膿菌—その基礎と臨床—。3~9, 緑膿菌感染症研究会, 1993
 - 4) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~77, 1981
 - 5) National Committee for clinical laboratory standards. 1991: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 3rd Ed. Approved Standard. NCCLS Document M 100-S 3, 10. National Committee for Clinical Laboratory Standards
 - 6) 竹内 隆, 田澤節子, 中村良子: 当院で分離された *Pseudomonas aeruginosa* の血清型別と薬剤感受性。神臨技誌 12: 25~29, 1990
 - 7) 小林寅詰, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 西田 実, 五島 聡智子: 各種の臨床分離菌のコロニーレベルにおける生化学的性状と薬剤感受性 (II) 緑膿菌について。Chemotherapy 39: 753~760, 1991
 - 8) 尾形正裕: 福島県立医科大学付属病院における臨床分離菌の変遷。化学療法の領域 4: 497~507, 1988
 - 9) Watanabe M, Inoue E, Katsu K, Iyobe S, Mitsuhashi S: In Vitro activity of E 1040 against imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. Antimicrob Agent Chemotherapy 36: 684~686, 1992
 - 10) 大屋 哲, 福岡 隆, 増田修久, 竹の内俊, 関根奈津子, 飯島政子, 安田 紘, 桑原章吾: Panipenem/betamipron に関する細菌学的評価 (第5報) 低アミノ酸培地中における panipenem の抗緑膿菌活性の増強について。Chemotherapy 39: 132~139, 1991
 - 11) 菅野治重: 各種臨床分離菌に対する cefclidin の抗菌力について。Chemotherapy 40: 81~87, 1992
 - 12) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agent Chemother 35, 147~151, 1991
 - 13) 井上松久: 基礎の立場から見た耐性菌の諸問題—グラム陰性桿菌のセフェム耐性—。臨床と微生物 13: 193~201, 1986
 - 14) 小林由美子, 他: 本学救命救急センターにおける細菌学的検討第一報, 特に緑膿菌の血清型と薬剤感受性分布について。感染症学雑誌 55: 242~252, 1981
 - 15) 青木富美雄, 他: 当院における緑膿菌の血清型別と薬剤感受性分布について。衛生検査 37: 1216~1221, 1988

Epidemiological evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates:
MIC-determinations of various anti-*Pseudomonas* β -lactam antibiotics

Shigeko Nakano¹⁾, Saeko Fukuda¹⁾, Setuko Tazawa¹⁾,
Kenji Marumo²⁾ and Yoshiko Nakamura²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, and ²⁾Department of Clinical Pathology, Showa University
Fujigaoka Hospital, 1-30 Fujigaoka, Aoba-ku, 227-Yokohama, Japan.

A total of 188 *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical specimens in the Showa University Fujigaoka Hospital during the 20 months from April 1992 to November 1993 were epidemiologically examined, by O-serotyping and determination of MICs of various anti-*Pseudomonas* β -lactam antibiotics. The following results were obtained.

1. Of the total isolates, 79 (42%), 55 (29%), and 38 (20%) were isolated from the respiratory tract, urinary tract, and pus specimens, respectively. Most of them were distributed in the wards of the emergency center, and department of urology, surgery, gastroenterology, and respiratory medicine.

2. Of the total isolates, 55 (29%), 34 (18%), and 19 (10%) were O-serotypes E, G, and A, respectively. These values were higher than those for the other O-serotypes such as B, C, D, F, H, I, K, and M. No serotype J and L strains were isolated.

3. The MIC₅₀ of the carbapenems such as imipenem, panipenem, meropenem, and biapenem ranged from 0.39 to 1.56 μ g/ml. The MIC₅₀ and MIC₉₀ of ceftazidime were 0.39 and 25 μ g/ml, and those of ceftazidime were 1.56 and 12.5 μ g/ml, respectively. These antibiotics had higher antibacterial activities against the isolates tested than cefotaxime, latamoxef, cefsulodin, cefoperazone, aztreonam, piperacillin, and ticarcillin.

4. Only 10 (5%) of the total isolates were resistant to the carbapenems. Six (60%) of these isolates were isolated from respiratory tract specimens.

5. Eighteen (64%) of the 28 strains resistant to ceftazidime (14% of the total isolates) were isolated from the urinary tract specimens, and 3 (11%) were from the respiratory tract specimens.

6. Only 1 (3%) of the 37 strains resistant to the carbapenems or ceftazidime was cross-resistant.

7. Twenty-one (38%) of the serotype E strains had a higher ceftazidime-resistance rate than any other serotype strains. Two (11%) of the serotype A strains had a higher carbapenem-resistance rate.

8. No serotype G strain resistant to ceftazidime was isolated.

9. All the ceftazidime-resistant strains were significantly dissociated from the regression line for the relationship between the MICs of ceftazidime and cefotaxime. The MICs of ceftazidime against these isolates were lower than those of cefotaxime, suggesting that the mechanism of resistance to the two cephalosporins in *P. aeruginosa* was different.