

【短 報】

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 産生グラム陰性桿菌に
対する isepamicin の抗菌力

黒川 博史・山田 大輔・若松 篤・永田 明義・勝又 一成・山田 光男

保健科学研究所第三検査部耐性菌研究室*

(平成 13 年 8 月 7 日受付・平成 13 年 9 月 10 日受理)

今回、われわれが保管する臨床分離 ESBL 産生グラム陰性桿菌の CTX-M-1 系 β -ラクタマーゼ産生菌 5 株、CTX-M-2 系 β -ラクタマーゼ産生菌 23 株、SHV-12 型 ESBL 産生菌 19 株、SHV-2 型 ESBL、SHV-24 型 ESBL、TEM-26 型 ESBL 産生菌がそれぞれ 1 株の計 50 株を対象として、iseipamicin (ISP) をはじめとしたアミノグリコシド系薬および β -ラクタム系薬の MIC を測定した。ISP の MIC range は $0.12 \sim 32 \mu\text{g/mL}$ であり、 MIC_{50} 、 MIC_{90} はそれぞれ $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $2 \mu\text{g/mL}$ であり、各種 ESBL 産生菌に対する有用性が示唆された。

Key words: isepamicin, ESBL 産生菌, 薬剤感受性

ESBL (extended-spectrum β -lactamase) は、Bush ら¹⁾の機能分類により、グループ 2 be に属する拡張型基質特異性を示す一群の β -ラクタマーゼをいう。これらは、酵素の活性中心部分のアミノ酸の置換により、ceftazidime (CAZ) や cefotaxime (CTX) などのオキシミノセフェム系薬を分解するという性質をもち、欧米諸国では、十数年前から注目されており²⁾、院内感染などの問題も報告されている。しかし、国内の状況はほとんど調査報告がなく、ESBL の検出状況調査は、筆者らが行ったもの³⁾がおそらくはじめてである。また著者らは、国内における TEM-、SHV-由来 ESBL 産生菌の存在を、分子遺伝学的レベルで明らかにした。その後、さまざまな報告が行われるようになり⁴⁾、CTX-M-タイプ β -ラクタマーゼ産生菌や TEM-、SHV-由来 ESBL 産生菌など、さまざまなタイプの拡張型 β -ラクタマーゼが確認されるようになった。現在、その実情が明らかになりつつあり、メタロ β -ラクタマーゼ産生菌⁵⁾などととも、注目すべき耐性菌のひとつであるといえよう。

このように ESBL などの拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌は、日常的に広く使用されているペニシリン系およびセフェム系抗菌薬に耐性化を示す。さらに、プラスミドなどを介し、広い菌種間において、その耐性遺伝子が拡散する可能性をもち、アミノグリコシド系薬などの他系列抗菌薬の感受性の動向を調査することは、臨床的のみならず疫学的な分離状況調査などにも有用な情報となる。

われわれは、本学会誌に、「メタロ β -ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の ISP の薬剤感受性」を報告⁶⁾したが、今回、臨床分離 ESBL 産生グラム陰性桿菌に対す

る、アミノグリコシド系薬の isepamicin (ISP: 旭化成工業株式会社) を中心とした薬剤感受性の評価を行ったので報告する。

被検菌株は、われわれが保管する 1995 年から 2000 年の期間に収集した、臨床分離 CTX-M-タイプ β -ラクタマーゼ産生菌 (CTX-M-タイプ β -ラクタマーゼは、CTX-M-1 (MEN-1) 型と CTX-M-3 型を含む CTX-M-1 系と、CTX-M-2 型、4 型、5 型、7 型、Toho-1 型を含む CTX-M-2 系に大別して論じる) 28 株、その内訳は CTX-M-1 系 β -ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* 5 株、CTX-M-2 系 β -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* 8 株、*K. pneumoniae* 12 株、*Proteus mirabilis* 3 株、および TEM-、SHV-由来 ESBL 産生菌 22 株、その内訳は SHV-12 型 ESBL 産生 *E. coli* 4 株、*K. pneumoniae* 10 株、*Serratia marcescens* 5 株、SHV-2 型 ESBL 産生 *K. pneumoniae*、SHV-24 型 ESBL 産生 *E. coli*、TEM-26 型 ESBL 産生 *E. coli* がそれぞれ 1 株ずつの計 50 株とした。

最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は、日本化学療法学会標準法⁷⁾にもとづき微量液体希釈法で、 β -ラクタム系の piperacillin (PIPC)、cefoperazone (CPZ)、CAZ、CTX、cefminox (CMNX)、cefpirome (CPR)、imipenem (IPM)、sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ)、aztreonam (AZT) の 9 薬剤、およびアミノグリコシド系の ISP、gentamicin (GM)、amikacin (AMK)、tobramycin (TOB)、dibekacin (DKB) の 5 薬剤、計 14 剤について実施した。

測定用マイクロプレートは栄研化学株式会社において、フローズンプレート栄研[®]をオーダーメイドにて作成したものを使用した。プレートの精度管理用として、

E. coli ATCC 25922 および *P. aeruginosa* ATCC 27853 について測定し、各標準株の MIC が範囲内¹²⁾であることを確認した。

菌量の調整は約 10^5 cfu/well になるように接種し、35°C で約 18 時間培養後、各ウェルの発育を肉眼的に確認した。

MIC の測定結果を Table 1 に示す。ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系薬では、CTX-M-タイプおよび TEM-, SHV-型ともに、PIPC, CPZ, CPR, CTX では MIC₉₀ が ≥ 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、IPM では MIC₉₀ が ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、CMNX では TEM-, SHV-型に対する MIC₉₀ が 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と高値である。これは *S. marcescens* の染色体性クラス C 型 β -ラクタマーゼにより起因するものである。CTX-M タイプでは、CMNX の MIC range が 0.5~ ≥ 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と広範囲であり、一部の株で高度耐性を示す株が存在した。この耐性は ESBL によって担われているのではなく、染色体性のクラス C 型 β -ラクタマーゼや膜の透過性¹³⁾などによって担われていると考えられる。CAZ については、TEM-, SHV-型では高度耐性であったが、CTX-M-タイプでは MIC range が 0.25~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、MIC₉₀ が 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と軽度耐性傾向であり、 β -ラクタマーゼのタイプによる、基質特異性が反映されたといえる。

また、データは示さないが、ISP の MIC を中心に、他のアミノグリコシド薬の関連性をみたところ、ISP の MIC が ≤ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のとき、AMK の MIC は 0.25~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に分布し、GM, TOB, DKB では、順に 0.12~32, 0.12~32, 0.25~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、ISP の MIC が ≥ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す株はなく、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の株が 2 株のみ存在し、その場合の AMK, GM, TOB, DKB の MIC は、順に 16~32, 0.5, 16~32, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

臨床分離アミノグリコシド系薬耐性菌の耐性機構の多くは、アミノグリコシド修飾酵素¹⁴⁾によるといわれるが、本調査で確認されたアミノグリコシド系薬耐性株の耐性パターンにおいても、ISP+AMK 耐性型や GM 耐性型に大別され、ISP+AMK タイプは、AAC (aminoglycoside acetyltransferase) (6') や AAD (aminoglycoside adenyltransferase) (4') など、GM 耐性タイプでは、AAC (3) や APH (aminoglycoside phosphotransferase) (2'') などによるものと考えられる¹⁶⁾。しかし、耐性株のアミノグリコシド薬の MIC をみると、 ≥ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示すような高度耐性株が存在しておらず、これらが酵素の産生量などにより起因しているのかなどは興味深い。耐性機構の解明とともに、今後の分子レベルの解析を待たねばならない。

Table 1. Antibacterial activity for extended-spectrum β -lactamase producing clinical isolates

| Bacterial strains (No. of isolates) | Antibacterial agents | MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
|---|------------------------|---------------------------------|------------|------------|
| | | range | 50% | 90% |
| CTX-M-type β -lactamase producers (28) | iseipamicin | 0.12-32 | 0.5 | 4 |
| | amikacin | 0.25-32 | 1 | 16 |
| | gentamicin | 0.12-32 | 0.25 | 4 |
| | tobramycin | 0.12-32 | 0.5 | 16 |
| | dibekacin | 0.25-32 | 1 | 32 |
| | piperacillin | 128- ≥ 256 | ≥ 256 | ≤ 256 |
| | cefoperazone | 64- ≥ 256 | ≥ 256 | ≥ 256 |
| | sulbactam/cefoperazone | 4-64 | 16 | 64 |
| | ceftazidime | 0.25-16 | 4 | 16 |
| | cefotaxime | 16- ≥ 256 | ≤ 256 | ≤ 256 |
| | cefpirome | 16- ≥ 256 | 128 | ≥ 256 |
| | cefminox | 0.5- ≥ 256 | 1 | 2 |
| | aztreonam | 0.25- ≥ 256 | 32 | 128 |
| | imipenem | ≤ 0.06 -2 | 0.12 | 2 |
| TEM- and SHV-derived ESBL producers (22) | iseipamicin | 0.25-4 | 0.5 | 2 |
| | amikacin | 0.5-32 | 1 | 16 |
| | gentamicin | 0.25-16 | 0.25 | 2 |
| | tobramycin | 0.25-32 | 1 | 16 |
| | dibekacin | 0.25-64 | 1 | 32 |
| | piperacillin | 128- ≥ 256 | ≥ 256 | ≤ 256 |
| | cefoperazone | 32- ≥ 256 | ≤ 256 | ≤ 256 |
| | sulbactam/cefoperazone | 1-32 | 16 | 32 |
| | ceftazidime | 32- ≥ 256 | ≥ 256 | ≥ 256 |
| | cefotaxime | 4- ≥ 256 | 64 | ≤ 256 |
| | cefpirome | 4- ≥ 256 | 64 | ≤ 256 |
| | cefminox | 0.5-32 | 1 | 16 |
| | aztreonam | 4- ≥ 256 | ≥ 256 | ≥ 256 |
| | imipenem | ≤ 0.06 -1 | 0.12 | 1 |

さらに、臨床的な観点から、耐性判定の指標は NCCLS 基準を用い、耐性率を求めた。ただし、ISP, DKB, SBT/CPZ, CPR, CMNX の 5 薬剤については、NCCLS 基準に設定がないため、便宜的に以下のようにした。ISP は Barry らの報告¹⁴⁾にもとづき、 $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ を耐性とし、DKB は本学会の定める呼吸器感染症におけるブレイクポイントが GM と同一であることから GM と同値とし、SBT/CPZ は CPZ と、CPR は CFPM と、CMNX は NCCLS 基準の CTT と同値とした。その結果を Table 2 に示す。もっとも耐性率の低かったのは CTX-M-型 β -ラクタマーゼ産生菌では、CAZ, IPM, AMK が 0% で、次いで GM が 3.6%、CMNX, ISP がともに 7.1% の順であり、TEM-, SHV-型 ESBL 産生菌では、SBT/CPZ, CMNX, IPM, ISP, AMK が 0% でもっとも低く、次いで GM が 4.5% と続いた。まとめると、ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系薬においては IPM がもっとも耐性率が低く、CAZ や SBT/CPZ は β -ラクタマーゼのタイプによってバラツキがあり、アミノグリコシド系薬については全体的に同様な傾向を示し、ISP, AMK, GM の耐性率が低かった。また、アミノグリコシド系薬に対し、少なくとも 1 薬剤以上耐

性を示す株は 13 株存在し、その MIC 一覧表を Table 3 に示す。CTX-M-タイプ β -ラクタマーゼ産生菌で 6 株、TEM-, SHV-型 ESBL 産生菌で 7 株確認された。菌種別では、13 株中で *E. coli* が 6 株と約半数を占めたが、*K. pneumoniae* で 4 株、*P. mirabilis* で 2 株、*S. marcescens* で 1 株と、調査対象とした 4 菌種すべてから確認された。由来別では、尿が 6 株と約半数を占めたが、その他に膿や喀痰、血液などからも確認された。ISP の MIC が $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ を示す株は 50 株中 48 株 (96%) であり、アミノグリコシド系薬耐性株 13 株のうち ISP 耐性株は 2 株であったことは、ESBL 産生菌に対する有用性を示す結果といえよう。

ESBL 産生菌のコントロールを、ESBL に対し高い感受性を示す、セファマイシン系薬やカルバペネム系薬などの使用に偏ってしまうと、メタロ β -ラクタマーゼ産生菌などの増加が懸念¹⁷⁾される。今後、選択肢のひとつとして、アミノグリコシド系薬などの慎重な選択が期待されよう。

今回の調査結果から、アミノグリコシド系抗菌薬の ISP は各種 ESBL 産生菌に対し、有用な抗菌薬のひとつであるといえた。

Table 2. Rate of resistance by NCCLS standards extended-spectrum β -lactamase producing clinical isolates

| β -lactamase (No. of strains) | No. of strains (rate of resistance) | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------------------------------|-----------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|-------------|---------------|-----------|
| | ISP | AMK | GM | TOB | DKB | PIPC | CPZ | SBT/CPZ | CAZ | CTX | CPR | CMNX | AZT | IPM |
| CTX-M-type β -lactamase producers (28) | 2 (7.1%) | 0 (0%) | 1 (3.6%) | 5 (17.9%) | 6 (21.4%) | 28 (100%) | 28 (100%) | 8 (28.6%) | 0 (0%) | 26 (92.9%) | 26 (92.9%) | 2 (7.1%) | 13 (57.1%) | 0 (0%) |
| TEM/SHV-derived ESBL producers (22) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (4.5%) | 5 (22.7%) | 6 (27.3%) | 22 (100%) | 18 (81.8%) | 0 (0%) | 22 (100%) | 18 (81.8%) | 16 (72.7%) | 0 (0%) | 20 (90.9%) | 0 (0%) |

ISP: isepamicin, AMK: amikacin, GM: gentamicin, TOB: tobramycin, DKB: dibekacin, PIPC: piperacillin, CPZ: cefoperazone, SBT/CPZ: sulbactam/cefoperazone, CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, CPR: ceftiprome, CMNX: cefminox, AZT: aztreonam, IPM: imipenem

Table 3. MICs of aminoglycosides resistant extended-spectrum β -lactamase producing clinical isolates

| Strain no. | Organism ^a | β -lactamase | Materials ^b | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|------------|-----------------------|--------------------|------------------------|--------------------------|-----|------|-----|-----|
| | | | | ISP | AMK | GM | TOB | DKB |
| 6 | Ec | CTX-M-2-related | U | 0.5 | 1 | 32 | 16 | 16 |
| 12 | Ec | CTX-M-2-related | Bi | 4 | 32 | 2 | 16 | 32 |
| 18 | Kp | CTX-M-2-related | P | 0.5 | 1 | 4 | 8 | 32 |
| 22 | Kp | CTX-M-2-related | U | 0.12 | 0.5 | 8 | 16 | 32 |
| 27 | Pm | CTX-M-2-related | Bd | 32 | 32 | 0.5 | 32 | 32 |
| 28 | Pm | CTX-M-2-related | Bd | 32 | 16 | 0.5 | 16 | 32 |
| 29 | Ec | SHV-12 | U | 2 | 8 | 1 | 16 | 32 |
| 30 | Ec | SHV-12 | U | 2 | 16 | 0.5 | 16 | 32 |
| 31 | Ec | SHV-12 | U | 4 | 32 | 2 | 32 | 32 |
| 32 | Ec | SHV-12 | U | 4 | 16 | 0.5 | 32 | 64 |
| 33 | Kp | SHV-12 | Bd | 0.5 | 2 | 0.25 | 4 | 16 |
| 46 | Ser | SHV-12 | S | 1 | 4 | 0.25 | 16 | 32 |
| 48 | Kp | SHV-2 | S | 0.25 | 0.5 | 16 | 2 | 4 |

^a Ec: *Escherichia coli*, Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Pm: *Proteus mirabilis*, Ser: *Serratia marcescens*

^b U: urine, Bi: bile, P: pus, Bd: blood, S: sputum

ISP: isepamicin, AMK: amikacin, GM: gentamicin, TOB: tobramycin, DKB: dibekacin

文 献

- 1) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemother* 39: 1211~1233, 1995
- 2) Petit A D, Shirot L, Channal C M, et al.: Novel plasmid-mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemother* 32: 626~630, 1988
- 3) Naumovski L, Quinn J P, Miyashiro D, et al.: Outbreak of ceftazidime resistant due to a novel extended-spectrum β -lactamase in isolates from cancer patients. *Antimicrobial Agents and Chemother* 36: 1991~1996, 1992
- 4) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, et al.: A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiology Lett.* 184: 53~56, 2000
- 5) 黒川博史, 八木哲也, 柴田尚宏, 他: SHV-由来 ESBL 産生大腸菌. *臨床検査* 44 (3): 319~322, 2000
- 6) 中村竜也, 内田幸子, 平城 均, 他: 直腸腫瘍の術後に腹腔内膿瘍より分離された *Escherichia coli* が産生する SHV-由来 extended-spectrum β -lactamase (SHV-12). *感染症学雑誌* 72 (2): 112~119, 2000
- 7) Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, et al.: A new SHV-derived extended-spectrum β -lactamase (SHV-24) that hydrolyzes ceftazidime through a single-amino-acid substitution (D 179 G) in the Ω -Loop. *Antimicrobial Agents and Chemother* 44: 1725~1727, 2000
- 8) 川上小夜子, 斧 康雄, 山本美和, 他: 当院で分離された *Escherichia coli* と *Klebsiella pneumoniae* の産生する extended-spectrum β -lactamase (ESBL) に関する基礎的研究. *感染症学雑誌* 74 (7): 24~29, 2000
- 9) 荒川宜親: カルバペネム耐性菌感染症. *日本内科学会雑誌* 86 (11): 78~84, 1997
- 10) 黒川博史, 山田大輔, 永田明義, 他: IMP-1 型メタロ β -ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の isepamicin (ISP) の薬剤感受性. *日治療誌* 49: 103~107, 2001
- 11) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定委員会報告: 微量液体希釈法. *日本化学療法学会標準法*. *Chemotherapy* 38: 102~105, 1990
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference standards for antimicrobial susceptibility testing: Ninth Informational Supplement. NCCLS document M 100-S 9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1999
- 13) Luis M M, Santiago H A, Sebastian A: In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to ceftoxitin and extended-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemother* 40: 342~348, 1996
- 14) Barry A L, Thornsberrry C, Jonens R N, et al.: Interpretive standards for disk susceptibility test with Sch 21420 and amikacin. *Antimicrobial Agents and Chemother* 18: 616~621, 1980
- 15) 堀田司元: アミノグリコシド系薬剤. *日本臨床* 55 (5): 219~225, 1997
- 16) Shaw K J, Rather P N, Hare R S: Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the Aminoglycoside-Modifying-Enzymes. *Microbiological Reviews* 57: 138~163, 1993
- 17) Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, et al.: Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *The Lancet* 11: 354 (9182): 955, 1999

Susceptibility testing for extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing gram-negative rods to isepamicin

Hiroshi Kurokawa, Daisuke Yamada, Atsushi Wakamatsu, Akiyoshi Nagata, Kazunari Katsumata and Mitsuo Yamada

Health Science Research Institutes, 3rd Diagnostic Division, Bacteriology, Antibacterials Resistance Research, 56 Godo-cho, Hodogaya-ku, Yokohama 240-0005, Japan

We studied susceptibility testing to isepamicin (ISP) of aminoglycosides and antibacterials for extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing gram-negative rods in MICs of 14 antibacterial agents, aminoglycosides, and β -lactams against ESBL producing gram-negative rods. Bacterial strains were 50 clinical isolates, 5 CTX-M-1-related and 23 CTX-M-2-related (CTX-M-type) β -lactamase producers, 12 SHV-12, 1 SHV-2, 1 SHV-24, and 1 TEM-26 (TEM- and SHV-derived) ESBL producers. MICs of ISP ranged is from 0.12 to 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MIC_{50} was 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MIC_{90} was 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Our results suggest that ISP is an effective antibacterial agent against extended-spectrum β -lactamases, including TEM- and SHV-derived ESBL and CTX-M-type β -lactamases, producing gram-negative rods.