

## 【短報】

IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ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・永田 明義・勝又 一成・山田 光男

保健科学研究所第四検査部 耐性菌研究室\*

(平成12年10月25日受付・平成12年11月28日受理)

IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌に対し、アミノグリコシド系の isepamicin (ISP) を中心とする薬剤感受性の調査を行った。調査は、われわれが保管する、臨床分離 IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の *Pseudomonas aeruginosa* 19株, *Serratia marcescens* 20株, *Escherichia coli* 2株, *Klebsiella pneumoniae* 5株, *Enterobacter aerogenes* 2株, *Enterobacter cloacae* 2株の計50株に対し、ISP, gentamicin, amikacin, tobramycin, dibekacin, および piperacillin, cefoperazone, ceftazidime, cefotaxime, cefminox, cefpirome, imipenem, sulbactam/cefoperazone, aztreonam の計14薬剤のMICを測定した。ISPのMICは、0.25~ $\geq 256 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲に広く分布したが、50株中の28株(56%)に対して、 $\leq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。よってISPは、IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生菌に対する有効な抗菌薬の1つであることが示唆された。

**Key words:** isepamicin, IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生菌, 薬剤感受性

メタロβ-ラクタマーゼはペニシリン、セフェム、カルバペネムや、クラブラン酸、スルバクタムなどのβ-ラクタマーゼ阻害薬との合剤など、ほぼすべてのβ-ラクタム薬を分解する強力なβ-ラクタマーゼである<sup>1)</sup>。その産生菌はもっとも憂慮すべき耐性菌の1つであるといえ、現在、国内のみならず世界的な規模で、拡散する傾向にあり<sup>2-4)</sup>、薬剤感受性検査などを含めた多角的な分析が必要となるであろう<sup>5)</sup>。

メタロβ-ラクタマーゼは、Ambler<sup>6)</sup>の分子分類ではクラスBに、Bush<sup>7)</sup>らの機能分類ではグループ3に分類され、他のESBLやampC型β-ラクタマーゼなどのセリン型β-ラクタマーゼとは異なり、酵素の活性中心にセリン残基ではなく亜鉛をもつことが特徴である。

1991年Osano<sup>8)</sup>らは、愛知県内から検出された *Serratia marcescens* TN 9106株からメタロβ-ラクタマーゼを確認し、IMP-1と名づけられた。1995年には、Arakawa<sup>9)</sup>らにより、*S. marcescens* AK 9373株から、はじめてIMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生遺伝子(*bla<sub>IMP</sub>*)を担う、新しいインテグロンが発見された。

本邦における最近の検出状況は、*S. marcescens* や *Pseudomonas aeruginosa* から比較的多く検出されるとともに、*Escherichia coli* や *Klebsiella pneumoniae* などの広い菌種から確認され、このような拡散の危険性については、筆者らもかねてから警戒していた<sup>10)</sup>。

このように、日常的に広く使用されているほぼすべてのβ-ラクタム系抗菌薬に耐性化を示し、菌種間においてその耐性遺伝子が広く拡散するような、IMP-1型メ

タロβ-ラクタマーゼ産生菌の場合、他系列の広い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ろう。今回、臨床分離IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生菌に対する、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薬剤耐性菌のなかから、1994年から1998年の期間に収集した、臨床分離IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の *P. aeruginosa* 19株(検出部位内訳: 咽頭液1株, 膿など4株, 喀痰2株, 尿11株, 便1株), *S. marcescens* 20株(検出部位内訳: 20株すべてが尿), *E. coli* 2株(検出部位内訳: 2株ともに尿), *K. pneumoniae* 5株(検出部位内訳: 尿4株, 喀痰1株), *Enterobacter aerogenes* 2株(検出部位内訳: 2株ともに尿), *Enterobacter cloacae* 2株(検出部位内訳: 2株ともに尿)の計6菌種50株を対象とした。

最小発育阻止濃度(MIC)の測定は、日本化学療法学会標準法<sup>11)</sup>にもとづき微量液体希釈法で実施した。測定抗菌薬は、β-ラクタム系の piperacillin (PIPC), cefoperazone (CPZ), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (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は、ATCC® (American Type Culture Collection) の ATCC 25922 *E. coli* および ATCC 27853 *P. aeruginosa* について測定し、各標準株の MIC が範囲内<sup>12)</sup>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℃で約 18 時間培養後、各ウェルの発育を肉眼的に確認した。

なお、調査において、MIC を評価するにあたり、

NCCLS の Break Point<sup>12)</sup>を基本に論じていきたいが、ISP は設定がされていないため、便宜的に  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  および  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  に大別し、検討することとした。

MIC の測定結果から、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の MIC は、CPZ, SBT/CPZ, CAZ, CTX, CMNX では、すべての株が  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  であったが、PIPC は  $4 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$ , CPR は  $16 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$ , AZT は  $\leq 0.06 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$ , IPM では  $2 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$  に広く分布した (Table 1)。

AZT では、 $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  が 22 株 (44%) であったが、PIPC では、MIC が  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  が 40 株 (80%) であ

Table 1. Antibacterial activity for IMP-1 metallo  $\beta$ -lactamase produced clinical isolates

Organism (No. of isolates)	Antibacterial agents	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		range	50%	90%
<i>Serratia marcescens</i> (20)	isepamicin	2- $\geq 256$	4	64
	amikacin	2- $\geq 256$	16	128
	gentamicin	0.5-128	2	8
	tobramycin	2- $\geq 256$	16	128
	dibekacin	4- $\geq 256$	64	$\geq 256$
	piperacillin	32- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefoperazone	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	sulbactam/cefoperazone	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	ceftazidime	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefotaxime	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefpirome	64- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefminox	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	aztreonam	2- $\geq 256$	8	32
imipenem	16- $\geq 256$	128	$\geq 256$	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (19)	isepamicin	4- $\geq 256$	32	$\geq 256$
	amikacin	4- $\geq 256$	32	$\geq 256$
	gentamicin	1- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	tobramycin	0.5- $\geq 256$	128	$\geq 256$
	dibekacin	0.5- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	piperacillin	16- $\geq 256$	128	$\geq 256$
	cefoperazone	128- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	sulbactam/cefoperazone	128- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	ceftazidime	64- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefotaxime	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefpirome	128- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefminox	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	aztreonam	4-64	16	64
imipenem	8- $\geq 256$	128	$\geq 256$	
other organisms* (11)	isepamicin	0.25-16	0.5	4
	amikacin	0.25-32	1	16
	gentamicin	0.25-4	0.5	1
	tobramycin	0.25-64	4	16
	dibekacin	0.25-64	16	32
	piperacillin	4- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefoperazone	128- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	sulbactam/cefoperazone	128- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	ceftazidime	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefotaxime	128- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	cefpirome	16- $\geq 256$	128	$\geq 256$
	cefminox	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	aztreonam	$\leq 0.06$ -64	16	64
imipenem	2-32	8	32	

\*5 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 2 strains of *Escherichia coli*, 2 strains of *Enterobacter aerogenes* and 2 strains of *Enterobacter cloacae*.

り, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* では MIC が  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$  を示す株もあった。

IPM に対する MIC が  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$  の株が 5 株 (*E. coli* 2 株, *K. pneumoniae* 1 株, *E. aerogenes* 1 株, *E. cloacae* 1 株) 存在し, CPR では *K. pneumoniae* で  $16 \mu\text{g/mL}$  が 1 株, *E. cloacae* で  $32 \mu\text{g/mL}$  が 1 株 存在した。

すべてのアミノグリコシド系抗菌薬は, MIC が  $0.25 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$  に広く分布しており, ISP においては  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  が 50 株中 28 株 (56%) であり,  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  は 13 株 (26%) であった。IMP-1 型メタロβ-ラクタマーゼ産生菌の検出頻度が高いといわれる, *S. marcescens* 20 株と *P. aeruginosa* 19 株に対する, ISP の MIC の動向は Fig. 1 に示すように, *S. marcescens* で  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  が 14 株 (70%),  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  が 5 株 (25%) であり, *P. aeruginosa* では,  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  が 4 株 (21%),  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  が 8 株 (42%) であった。他の *E. coli* や *K. pneumoniae* などでは, *E. coli* 1 株 ( $16 \mu\text{g/mL}$ ) 以外のすべての株について, MIC は  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  であった。データには示さないが, ISP の MIC を中心とした他のアミノグリコシド系抗菌薬の MIC 分布は, ISP の MIC が  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  のとき, AMK は  $0.25 \sim$

$16 \mu\text{g/mL}$ , GM では  $0.25 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$ , TOB では  $0.25 \sim 128 \mu\text{g/mL}$ , DKB では  $0.25 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$  に分布していた。このケースで, GM の MIC がもっとも高い  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$  を示すなかで, ISP の MIC がもっとも低い株は  $4 \mu\text{g/mL}$  であり, TOB の MIC がもっとも高い  $128 \mu\text{g/mL}$  の株, DKB の MIC がもっとも高い  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$  の株のなかでの, ISP の最低 MIC はそれぞれ  $2 \mu\text{g/mL}$  であった。また, ISP の MIC が  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  のとき, AMK では  $64 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$ , GM では  $2 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$ , TOB では  $32 \sim \geq 256 \mu\text{g/mL}$ , DKB では  $\geq 128 \mu\text{g/mL}$  に分布し, GM では MIC が  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  の株が 7 株存在した。アミノグリコシド系抗菌薬が 5 剤ともに MIC が  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  の株は, *E. coli* 1 株, *P. aeruginosa* 3 株, *S. marcescens* 6 株, *E. cloacae* 2 株, *E. aerogenes* 1 株の 13 株であり, 逆にすべて  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  の株は 5 株存在し, すべて *P. aeruginosa* であった。

アミノグリコシド系抗菌薬の耐性パターンは, Table 2 に示すように, 5 剤ともに耐性タイプのほか, ISP+AMK 耐性タイプ, GM 耐性タイプ (TOB と DKB はどのタイプにおいても耐性であった) に分けられた。ISP+AMK 耐性タイプと GM 耐性タイプの分布率はほぼ均等であったが, 耐性株は *P. aeruginosa* において多くみられ,

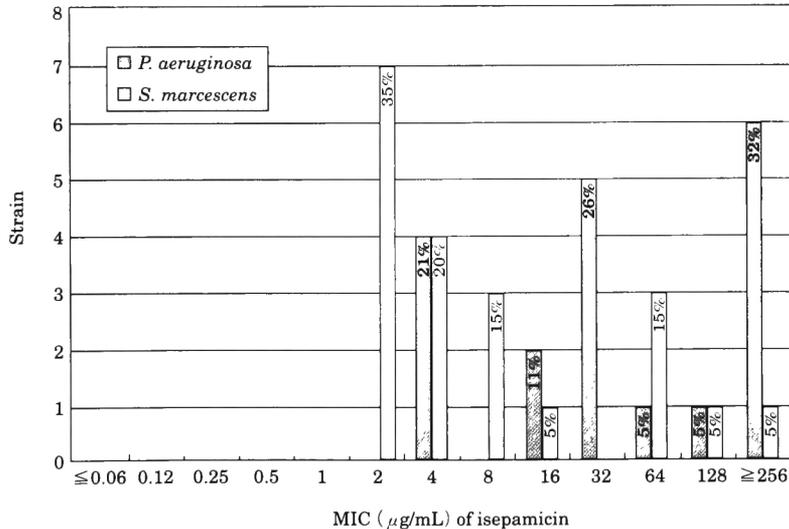


Fig. 1. MICs of isepamicin against IMP-1 producing 20 strains of *Pseudomonas aeruginosa* and 19 strains of *Serratia marcescens*.

Table 2. Resistant (MIC:  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ ) typing of 5 Aminoglycoside agents for IMP-1 metalloβ-lactamase producing clinical isolates

Resistant typing	No. of strain			Total
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>	others*	
ISP + AMK (TOB + DKB)	2	5	0	7 (14%)
ISP + AMK + GM (TOB + DKB)	5	0	0	5 (10%)
GM (TOB + DKB)	8	1	0	9 (18%)

\**Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*.

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

*P. aeruginosa* では GM 耐性タイプが *S. marcescens* では ISP+AMK 耐性タイプが多く確認された。

アミノグリコシド耐性のメカニズムは、アミノグリコシド修飾酵素<sup>13-16)</sup>によるものであると考えられ、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、薬剤耐性パターンとインテグロンなどの分子レベルでの関連性<sup>16)</sup>の分析も興味深い点であり、今後の詳細な解析が必要となろう。

他剤耐性傾向が強いといわれる IMP-1 型メタロβ-ラクタマーゼ産生菌に対して、ISP の MIC ≤ 8 μg/mL の株が、50 株中に 28 株 (56%) 存在したことは、興味深い結果であった。今回の調査結果から、アミノグリコシド系抗菌薬の ISP は IMP-1 型メタロβ-ラクタマーゼ産生菌に対し有用な抗菌薬の 1 つであるといえた。

#### 文 献

- 1) 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
- 2) Cornaglia G, Riccio M L, Mazzariol A, et al.: Appearance of IMP-1 metallo-β-lactamase in Europe. Lancet 13: 353 (9156): 899~900, 1999
- 3) Koh T H, Babini G S, Woodford N, et al.: Carbapenem-hydrolysing IMP-1 β lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. Lancet 19: 353 (9170): 2162, 1999
- 4) Lauretti L, Riccio M L, Mazzariol A, et al.: Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrobial Agents and Chemother 43: 1584~1590, 1999
- 5) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al.: Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacteria by using Thiol compounds. Journal of Clinical Microbiology 38: 40~43, 2000
- 6) Ambler R P: The structure of β-lactamase. Philos Trans R Soc Lond (Biol.) 289: 321~331, 1980
- 7) Bush K: Metallo-β-lactamase: a class apart. Clin Infect Dis 27: S 48~S 53, 1998
- 8) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, et al.: Molecular characterization of an enterobacterial metalloβ-lactamase found in clinical isolates of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrobial Agents and Chemother 38: 71~78, 1994
- 9) Arakawa Y, Murakami N, Suzuki K, et al.: A novel integron-like element carrying the metalloβ-lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*. Antimicrobial Agents and Chemother 39: 1612~1615, 1995
- 10) Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, et al.: Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. Lancet 11: 354 (9182): 955, 1999
- 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. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Ninth Informational Supplement. NCCLS document M 100-S 9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1999
- 13) Marine-Paul Mingeot-Leclercq, Glupczynsky Y, et al.: Aminoglycosides: Activity and Resistance. Antimicrobial Agents and chemother 43: 727~737, 1999
- 14) 堀田国元: アミノグリコシド系薬剤。日本臨床 55(5): 219~225 1997
- 15) 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
- 16) Centron D, Roy P A: Characterization of the 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene *aac* (6')-Iq from the integron of a natural multiresistance plasmid. Antimicrobial Agents and chemother 42: 1506~1508, 1999

## Susceptibility testing for IMP-1 metallo $\beta$ -lactamase producing gram-negative rods to isepamicin

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

Health Science Research Institutes, 4 th Diagnostic Division, Bacteriology, Antibacterials Resistances Research,  
56 Godo-cho, Hodogaya-ku, Yokohama 240-0005, Japan

We studied susceptibility testing to isepamicin (ISP) of aminoglycosides and antibacterials for IMP-1 metallo  $\beta$ -lactamase producing gram-negative rods. MICs of 14 antibacterial agents against IMP-1 metallo  $\beta$ -lactamase producing gram-negative rods were studied. Bacterial strains were 50 of 6 microbial species clinically isolated, 19 of *Pseudomonas aeruginosa*, 20 of *Serratia marcescens*, 2 of *Escherichia coli*, 5 of *Klebsiella pneumoniae*, 2 of *Enterobacter aerogenes* and 2 of *Enterobacter cloacae*. The 14 antibacterial agents used were ISP, gentamicin, amikacin, tobramycin, dibekacin, piperacillin, cefoperazone, ceftazidime, cefotaxime, cefminox, cefpirome, imipenem, sulbactam/cefoperazone and aztreonam. Microbroth dilution was used. MIC values of ISP against IMP-1 producers were widely distributed between 0.25 and  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ , but 28 of 50 strains (56%) were  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ . Our results suggest that ISP is an effective antibacterial against IMP-1 metallo  $\beta$ -lactamase producing bacteria.