

【原著・基礎】

臨床細菌学的立場から

—新しい耐性菌も含めて—

平冨 洋^{1,2)}・松田 淳¹⁾・餅田 親子¹⁾・中野 路子¹⁾・平山 三国¹⁾・伊折 文秋¹⁾
 青木 志保^{1,2)}・上平 憲¹⁾・柳原 克紀²⁾・宮崎 義継²⁾・朝野 和典²⁾・河野 茂²⁾

¹⁾長崎大学医学部附属病院検査部*²⁾同 第二内科

(平成13年6月11日受付・平成13年7月3日受理)

1984年以降に長崎大学医学部附属病院検査部で分離された尿路分離菌について検討を行った。尿路検体からの主な分離菌は、グラム陽性菌では *Enterococcus* 属がもっとも多く、*Staphylococcus aureus* がこれに次いでいた。グラム陰性菌では *Escherichia coli* と *Pseudomonas aeruginosa* が2大分離菌であった。経年的な分離菌の変化では、この数年程度ではあるが、*S. aureus*、*Enterococcus* 属、*P. aeruginosa* の分離頻度が上昇していた。これらはいずれも多剤耐性傾向を示す細菌であり、今後も相対的分離頻度の上昇、あるいは絶対的な分離株数の増加が考えられる。主要な尿からの分離菌についての耐性化傾向について検討した結果、グラム陰性桿菌では、感性化する傾向を示す組み合わせも見られたが、菌種により一定ではなかった。Vancomycin-resistant enterococci (VRE) は VanC タイプを除き分離されなかった。カルバペネマーゼ産生菌では *P. aeruginosa* がもっとも多かったが、抗菌薬投与後に除菌が確認された例の大部分は尿路からの分離例であった。イスの腎細胞である MDCK 細胞に付着した *P. aeruginosa* に対する2時間での短時間殺菌の検討では、gentamicin と異なり ceftazidime、meropenem はまったく殺菌性を呈しなかった。

Key words: 尿路分離菌、薬剤耐性菌、vancomycin-resistant enterococci (VRE)、カルバペネマーゼ産生菌

当院の検査部微生物室に提出される臨床検体では、咯出痰などの気道分泌物がもっとも多く、血液と膿・分泌物がこれに続き、尿は検体数としては第4位を占めている。多くの抗菌薬が腎排泄型であることから、宿主の状態を無視して、細菌と抗菌薬の関係のみで考えた場合、局所に高濃度の抗菌薬が集積しやすい尿路感染症では、呼吸器感染症などと比較し、理論的には治療は容易であるはずである。しかし、単純性膀胱炎やSTDなどを除いて、実際はカテーテル留置に伴うバイオフィーム形成などにより、除菌が困難である。その結果、尿路に定着した細菌は高濃度の抗菌薬に長期間暴露されるため、耐性化しやすい可能性が考えられる。

適切な抗菌薬化学療法を行い、耐性菌の出現を最小限に抑えるためには、尿路からの主要細菌の分離率や薬剤感受性の現状を把握する必要がある。そこでまず、当院における尿からの主要な分離菌についての経年的分離率の変化について検討した。当院では、国内の検査部ではじめて vancomycin-resistant enterococci (VRE) の耐性遺伝子の検出を multiplex-PCR 法で開始した¹⁾。また1996年にカルバペネマーゼ産生遺伝子 *bla_{IMP}* 保有菌についてのスクリーニングを開始し、当時保存されていた1991年以降の全臨床分離株に

ついて解析を行った²⁾。その後のこれらの重要な耐性菌の検出状況についても引き続き検討した。さらに宿主の上皮細胞に付着した状態での *P. aeruginosa* に対する殺菌効果について gentamicin (GM)、ceftazidime (CAZ)、meropenem (MEPM) の効果の比較を行った。

I. 材料と方法

1. 尿路検体からの主要分離菌の年次推移

1984年以降に長崎大学医学部附属病院検査部で尿路検体から分離された微生物のうち、主要菌種として、*Staphylococcus aureus*、*Enterococcus* 属、*Escherichia coli*、*Enterobacter* 属、*Klebsiella* 属、*Pseudomonas aeruginosa*、*Serratia* 属の分離頻度の経年的な変化について検討した。同一患者で同じ薬剤感受性パターンを示した株は統計から除外した。

2. 腸球菌の薬剤感受性と VRE 遺伝子の検出

1995年および1996年に分離された(尿以外の検体からの分離菌を含む)、*Enterococcus faecalis* 49株、*Enterococcus faecium* 80株について、ampicillin (ABPC)、erythromycin (EM)、minocycline (MINO)、GM、vancomycin (VCM)、teicoplanin (TEIC)、quinupristin

/dalfopristin (RP 59500) の MIC を化学療法学会の標準法にもとづいた微量液体希釈法で測定した。VRE 遺伝子の検出は、コロニーを PCR チューブに懸濁しサーマルサイクラー内で加熱溶菌させ DNA を抽出する方法と multiplex-PCR 法を組み合わせで行った¹⁾。

3. *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* の薬剤感受性の変化

尿路から分離された, *P. aeruginosa* について 1985/1986 年 (171 株), 1990/1991 年 (141 株), 1998/1999 年 (147 株) の 3 期, *E. cloacae*, *S. marcescens* について, 1985/1986 年 (58 および 112 株), 1998/1999 年 (29 株および 33 株) の 2 期に分けて薬剤感受性の変化について検討した。測定年により, 抗菌薬の希釈系列が異なっているため, MIC が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下, 2~16 (または 25), および 32 以上 (または >25) の 3 段階に分けた。対象抗菌薬は piperacillin (PIPC), CAZ, imipenem (IPM), GM, ofloxacin (OFLX) の 5 薬剤としたが, 一部の抗菌薬については 1985/1986 年には測定されていない。

4. カルバペネマーゼ産生遺伝子 *bla_{IMP}* 保有菌についてのスクリーニングおよび抗菌薬投与後に除菌された症例の検討

1991 年以降にすべての検体から分離されたグラム陰性桿菌のうち, CAZ の MIC が 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の菌株を対象とした。上述の DNA の簡易抽出法に enzymatic-detection PCR 法を組み合わせ *bla_{IMP}* の検出を行った。すべての分離菌について, 当該患者のカルテ調査を行い, 臨床情報を得た²⁾。

5. 上皮細胞に付着した *P. aeruginosa* に対する抗菌薬の短時間殺菌効果についての検討

イヌの腎臓の上皮細胞である MDCK 細胞のモノレイヤー³⁾に *P. aeruginosa* 2020 株 (呼吸器分離菌) を 2 時間感染させた。これを抗菌薬処理群と非処理群に分け, 種々の濃度の GM, CAZ, MEPM で 2 時間処理を行った後に, triton-X 100 で MDCK 細胞を破壊し, 残存菌数を計数した。抗菌薬非処理群を対照として各抗菌

薬の短時間殺菌作用を比較した。

II. 結 果

1. 尿路検体からの主要分離菌の年次推移

Fig. 1 に示したように, *Enterococcus* 属および *E. coli* は検討開始時点でもっとも分離頻度が高かった。いずれもその分離頻度は 1980 年代後半に低下したものの, その後再び上昇していた。これらに加えて, *S. aureus* および *P. aeruginosa* の分離頻度が近年上昇しており, 最近では *P. aeruginosa*, *Enterococcus* 属, *E. coli*, *S. aureus* の 4 菌種 (属) が主要な尿路分離菌であった。

2. 腸球菌の薬剤感受性と VRE 遺伝子の検出

Table 1 に当院で分離された *E. faecalis* と, *E. faecium* の薬剤感受性のデータのまとめを示した。*E. faecalis* に対しては, TEIC がもっとも強い抗菌力を有しており, 続いて ABPC がすべての菌株に対する MIC が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下と優れていた。*E. faecium* では, VCM, TEIC, RP 59500 が強い抗菌力を示した。*E. faecalis* と, *E. faecium* の各 1 株で VCM の MIC が 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったが, VCM 耐性遺伝子は検出されなかった。本検討時には *vanC 1* 保有株 (*Enterococcus gallinarum*) が 2 株, *vanC 23* 保有株 (*Enterococcus casseliflavus/flavescens*) 4 株が検出されたのみであった¹⁾。以後も VanC タイプの中等度耐性株が散発的に検出されるのみで, 2001 年 6 月の時点まで VanA あるいは VanB タイプの VRE は検出されていない。

3. *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *S. marcescens* の薬剤感受性の変化

P. aeruginosa では, Fig. 2 に示したように PIPC, CAZ, GM に対しては, 年々感性化する傾向が見られた。逆に OFLX に対しては耐性化傾向が明らかであった。一方, *E. cloacae* では, PIPC, CAZ, GM, OFLX の 4 薬剤に対して耐性化傾向が見られた。グラフには示していないが, IPM に対する感受性は良好で約 80% の菌株で MIC が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下で 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の株は存在しなかった。*S. marcescens* では, 逆に PIPC,

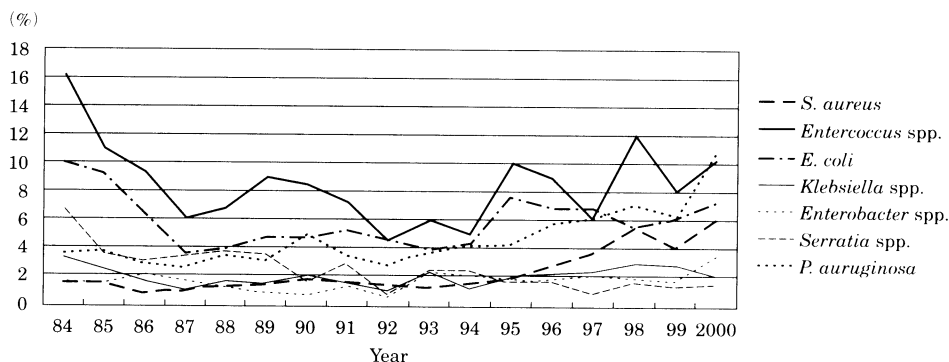
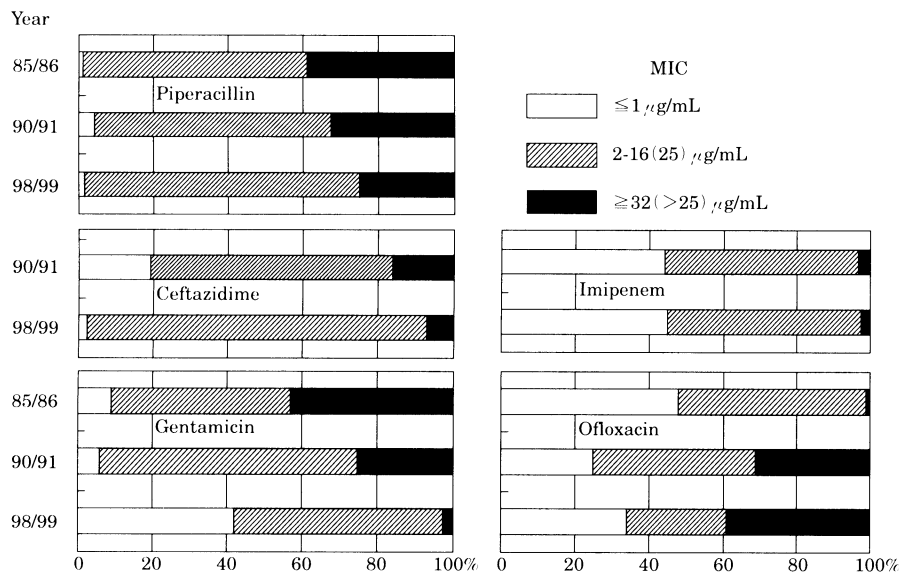


Fig. 1. Annual changes in isolation of major bacteria from urinary specimens at Nagasaki University Hospital.

Table 1. *In vitro* activity of antibiotics against clinical isolates of enterococci

Organism (No. of isolates)	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
		Range	50% MIC	90% MIC
<i>E. faecalis</i> (49)	ampicillin	0.25-1	0.5	1
	erythromycin	0.25->64	>64	>64
	minocycline	0.12-32	16	32
	gentamicin	1->512	>512	>512
	vancomycin	0.5-4	1	2
	teicoplanin	<0.03-0.25	0.12	0.25
	RP 59500	2-8	4	8
<i>E. faecium</i> (80)	ampicillin	0.06->64	32	>64
	erythromycin	<0.03->64	>64	>64
	minocycline	0.06->64	8	32
	gentamicin	0.25->512	8	16
	vancomycin	0.12-4	0.5	1
	teicoplanin	<0.03-1	0.5	0.5
	RP 59500	0.25-4	0.5	2

Cited from reference 1.

Fig. 2. Changes in susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary specimens.

CAZ, GM, OFLX のいずれに対しても感性化する傾向が見られた。IPM の MIC は約 60% で $1 \mu\text{g/mL}$ 以下であったが、 $32 \mu\text{g/mL}$ 以上の株が約 7% 存在した。

4. カルバペネマーゼ産生遺伝子 bla_{IMP} 保有菌についてのスクリーニングおよび抗菌薬投与後に除菌された症例の検討

Fig. 4 に 1991 年から 1996 年までに bla_{IMP} 保有菌が分離された患者の院内マッピングの結果を示した。検討期間中に 80 名の患者から bla_{IMP} 保有菌が分離されていた。*P. aeruginosa* がもっとも多く 53 例から検出されており、*S. marcescens* と *P. aeruginosa* 以外のブドウ糖非発酵菌がそれぞれ 13 例、*Citrobacter freundii* が 1 例であった。ほとんどの病棟で bla_{IMP} 保有緑膿菌が分離されており、*S. marcescens* は特定の病棟を中心に分離されていた²⁾。その後の傾向としては、*P.*

aeruginosa は減少傾向で、それ以外のブドウ糖非発酵菌の頻度が上昇し、検出される菌種も拡大傾向にあった。

P. aeruginosa のみを対象とした場合、抗菌薬投与後に除菌された症例を 9 例経験した。カテーテル抜去などの処置を行った例は除外した。9 例中 7 例が尿からの分離例であった。投与されていた薬剤は、フルオロキノロン系 5 例、aztreonam (AZT) 1 例、CAZ 1 例、IPM 2 例であり、これらの抗菌薬に感性を示していたのは、フルオロキノロン系 3 例 (いずれも MIC が $0.5 \mu\text{g/mL}$ 以下)、AZT 1 例 (MIC が $2 \mu\text{g/mL}$) で、その他の例では投与された抗菌薬の MIC は $8 \sim 32 \mu\text{g/mL}$ 以上であった。

5. 上皮細胞に付着した *P. aeruginosa* に対する抗菌薬の短時間殺菌効果についての検討

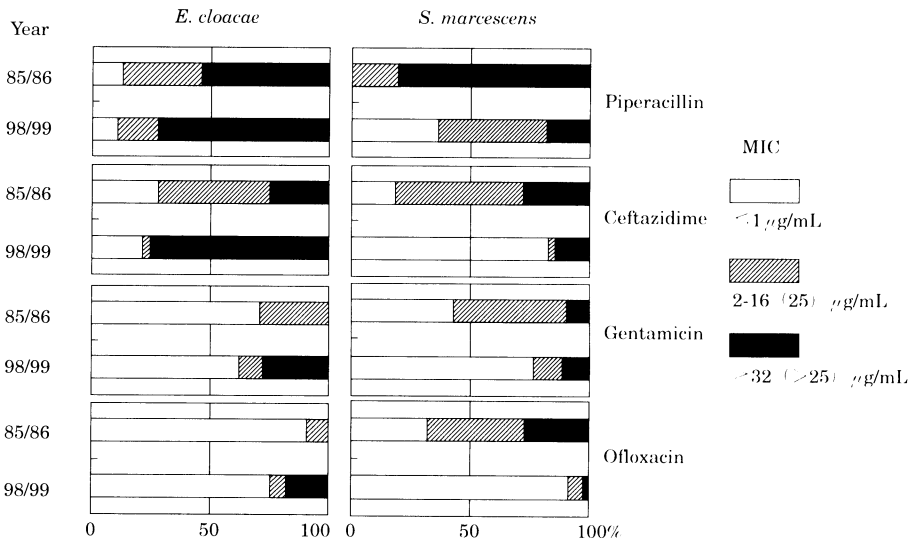


Fig. 3. Changes in susceptibility of *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* isolates from urinary specimens.

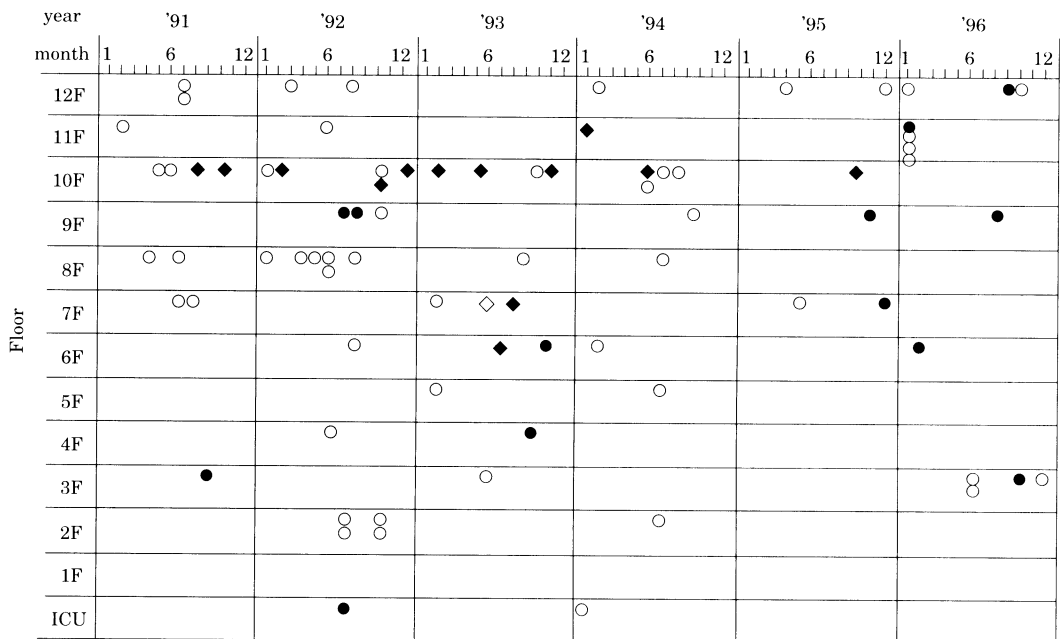


Fig. 4. Distribution of *bla*_{IMP}-positive GNR detected by a combination of heat lysis of bacteria and ED-PCR in Nagasaki University Hospital between 1991 and 1996. ○: *P. aeruginosa*, ●: other GNF bacteria, ◆: *S. marcescens*, ◇: *C. freundii*, ICU: intensive care unit. Cited from reference 2.

P. aeruginosa 2020 株に対する GM, CAZ, MEPM の MIC はそれぞれ 8, 2, 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。液体培地内での短時間殺菌能として菌接種後 2 時間での MBC を測定したところ, GM で 8, CAZ で 64, MEPM で 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。MDCK 細胞に付着した *P. aeruginosa* に対しては, GM は少なくとも 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度で完全に殺菌できたが, CAZ および MEPM はいずれも 1,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで薬剤濃度を上昇させてもまったく殺菌効果が得られなかった⁴⁾。

III. 考 察

当院における尿路検体からの主要分離菌では, *E. coli*

に加えて, *S. aureus*, *Enterococcus* 属, *P. aeruginosa* の分離頻度が高く, 大学病院の特徴を反映しているものと考えられた。特に, 最近では *S. aureus*, *Enterococcus* 属, *P. aeruginosa* の分離頻度が上昇する傾向が見られた。これらはいずれも耐性化傾向が強い菌種であり, さらに近年バンコマイシン低感受性 *S. aureus*, VRE, カルバペネマーゼ産生や薬物排出ポンプによる高度あるいは多剤耐性 *P. aeruginosa* が問題となっており, 今後も十分な注意が必要と考えられる。*E. coli* はこれらと比較して抗菌薬に対する感受性が一般に良好であるが, 基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌が問題となって

いる。今回の検討ではこのような耐性 *E. coli* は確認できなかったが、今後注意すべき耐性菌と思われる。

P. aeruginosa, *E. cloacae*, *S. marcescens* の薬剤感受性の変化の検討では、*P. aeruginosa* と *S. marcescens* では多くの薬剤に対して感性化する傾向が見られたが、OFLX に対しては *P. aeruginosa* は耐性化、*S. marcescens* は逆に感性化していた。これらに対し、*E. cloacae* ではほとんどの抗菌薬に耐性化傾向が見られた。菌種により薬剤感受性の変化のパターンが異なっているため、一概に抗菌薬の使用状況の変化で説明することは困難かもしれない。同一クローンの拡散の有無などの分子疫学的検討が有用と思われる。

カルバペネマーゼ産生遺伝子 *bla_{IMP}* 保有菌については、世界ではじめての単一施設でのスクリーニングを行い、本耐性菌について最大規模の施設内調査となっている²。当院における *bla_{IMP}* 保有菌の主体は、*P. aeruginosa* からその他のブドウ糖非発酵菌に変化しつつある。緑膿菌に限定した場合、抗菌薬投与後に除菌が確認された症例のほとんどが尿路からの分離例であった。カテーテル除去例は除いてあるため、高濃度に抗菌薬が集積する尿路で除菌例が多かった可能性が考えられる。フルオロキノロン投与で除菌された症例がもっとも多く、これは試験管内薬剤感受性の結果と一致する²。フルオロキノロン耐性株では抗菌力が期待できる薬剤がほとんどないために、詳細なスクリーニングにより拡散を防ぐことが重要と思われる。

MDCK 細胞に付着した *P. aeruginosa* に対する短時間殺菌効果の比較では、GM のみが効果を呈し、CAZ および MEPM ではきわめて高い濃度でも効果が見られなかった⁴。これは殺菌的作用を呈するとされる薬剤の

なかでも、アミノグリコシド系が濃度依存的な殺菌性を発揮するのに対し、 β -ラクタム系薬は時間依存性の殺菌作用を示すことに合致するデータと考えられる。実際の尿路感染症にアミノ配糖体を使用する機会は少ないが、逆に β -ラクタム系薬を投与した際、MIC が低いにもかかわらず十分な臨床効果が得られない場合のひとつの原因と考えられる。

臨床細菌学的な立場からは、尿路感染に限らず耐性菌を作らないための抗菌薬の使用法として、1) 抗菌薬投与前の細菌検査を必ず行い、薬剤感受性パターンを把握すること、2) 不必要な抗菌薬は使用しないこと、3) 感染が明らかな場合は、可及的にカテーテルなどの体内挿入物を抜去すること、4) 殺菌性の高い抗菌薬を優先し、ターゲットとする細菌を十分にたたくこと、などが挙げられる。

文 献

- 1) Hirakata Y, Yamaguchi T, Izumikawa K, et al.: In vitro susceptibility studies and detection of vancomycin resistance genes in clinical isolates of enterococci in Nagasaki, Japan. *Epidemiol Infect* 119: 175~181, 1997
- 2) Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, et al.: Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- β -lactamase gene *bla_{IMP}*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2006~2011, 1998.
- 3) Hirakata Y, Finlay B B, Simpson D A, et al.: Penetration of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* through MDCK epithelial cell monolayers. *J Infect Dis* 181: 765~769, 2000
- 4) 平潟洋 二: 抗菌活性からみた抗菌薬の選択と使い方 (耐性菌感染症を含めて)。*Mebio* 17: 30~41, 2000

Proper use of antibiotics in clinical microbiology focusing on the antibiotic-resistant bacteria

Yoichi Hirakata^{1,2)}, Junichi Matsuda¹⁾, Chikako Mochida¹⁾, Michiko Nakano¹⁾,
Mitsukuni Hirayama¹⁾, Fumiaki Iori¹⁾, Shiho Aoki^{1,2)}, Shimeru Kamihira¹⁾,
Katsunori Yanagihara²⁾, Yoshitsugu Miyazaki²⁾, Kazunori Tomono²⁾
and Shigeru Kohno²⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine and ²⁾Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan

We examined clinical isolates from urinary samples obtained at Nagasaki University Hospital between 1984 and 2000. *Enterococcus* species, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* were the predominant pathogens. The incidence of isolation of *Enterococcus* species, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*, which are resistant against several antibiotics in nature, has been gradually increasing. The susceptibility of *P. aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates to several antibiotics has improved from 1985 to 1999, whereas *Enterobacter cloacae* isolates have become more resistant during the same duration. Vancomycin-resistant enterococci, excluding isolates carrying *vanC*, have not been isolated from our hospital to date. In carbapenemase-producing bacteria associated with *bla*_{IMP}, *P. aeruginosa* was the major pathogen. In some patients with *P. aeruginosa* carrying *bla*_{IMP}, resistant bacteria disappeared following antibiotic administration; most such resistant bacteria were isolated from urinary tracts. Although gentamicin completely killed *P. aeruginosa* on the surface of MDCK cells within 2 hours, ceftazidime and meropenem did not kill any bacteria even if at concentrations up to 1,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.