

腸内細菌の抗菌薬感受性検査において、Imipenem をカルバペネムの、Levofloxacin をフルオロキノロンの代表薬剤とすることの妥当性の検討

高橋奈々子・五味一英・山口史博・福地邦彦
昭和大学医学部臨床病理学

和久田梨香
昭和大学病院臨床検査部

(2010年11月29日受付)

抗菌薬感受性検査において、同系の薬剤については代表薬剤の感受性検査の結果を参照して耐性・感受性の推測を行っている¹⁾。カルバペネム系抗菌薬では抗菌薬感受性テストのルーチン検査においてブドウ糖発酵の腸内細菌用の Microscan Neg Combo Panel 6.11J とブドウ球菌用の Pos Combo Panel 3.1J では Imipenem (IPM) のみの最小発育阻止濃度 (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) を測定し、ブドウ糖非発酵菌用の Microscan Neg Combo Panel 3.12J では IPM と Meropenem (MEPM) の MIC 測定を行い、カルバペネム系抗菌薬に対する感受性の指標としている。フルオロキノロン系抗菌薬では、Pos Combo Panel 3.1J と Neg Combo Panel 6.11J では Levofloxacin (LVFX) のみを、Neg Combo Panel 3.12J では LVFX と Ciprofloxacin (CPFX) の MIC 値を指標としている。

今回我々は、臨床分離された第三世代セファロスポリン耐性を示す腸内細菌である *Esherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* を対象とし、カルバペネム系抗菌薬として IPM, MEPM, Panipenem (PAPM), Doripenem (DRPM) の4剤とフルオロキノロン系抗菌薬 CPFX, LVFX, Tosufloxacin (TFLX), Pazufloxacin (PZFX) の4剤の MIC 比較検討し、代表薬剤による抗菌効果予測の妥当性を検討した。

対象と方法

2008年5月～6月までの約1ヶ月間に、昭和大学病院で分離された第三世代セファロスポリン耐性グラム陰性桿菌79株 (*Esherichia coli* 27株, *Klebsiella pneumoniae* 17株, *Serratia marcescens*

10株, *Klebsiella oxytoca* 9株, *Enterobacter cloacae* 9株, *Citrobacter freundii* 7株) を対象として、カルバペネム系抗菌薬 Imipenem (IPM), Meropenem (MEPM), Panipenem (PAPM), および Doripenem (DRPM) の4剤, およびフルオロキノロン系抗菌薬 Ciprofloxacin (CPFX), Levo-

Table 1. 検討対象株の由来検体

	respiratory system	urine	blood	pus	others	total
<i>E. coli</i>	6	17	2	0	2	27
<i>K. pneumoniae</i>	10	4	2	0	1	17
<i>K. oxytoca</i>	3	3	2	0	1	9
<i>S. marcescens</i>	7	0	1	1	1	10
<i>E. cloacae</i>	3	1	2	3	0	9
<i>C. freundii</i>	2	2	0	2	1	7
total	31	27	9	6	6	79

floxacin (LVFX), Tosufloxacin (TFLX) および Pazufloxacin (PZFX) の4剤に対する薬剤感受性測定を行った。第三世代セファロスポリン耐性グラム陰性桿菌とは、Cefotaxime (CTX) あるいはCeftazidime (CAZ) のいずれかのMIC値が $>8 \mu\text{g/ml}$ を示した株とした。抗菌薬感受性検査はClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁾に準じた微量液体希釈法を、Microscan Walkaway 96 (Siemens Healthcare, USA) により施行した。

抗菌薬濃度は $0.03\sim 32 \mu\text{g/ml}$ の12穴をIPM, MEPM, PAPM, DRPM, CPFEX, PZFX, LVFXに、TFLXのみ $0.03\sim 16 \mu\text{g/ml}$ とした。

結果

1. 対象とした株の由来

対象とした分離株の由来検体をTable 1に示す。呼吸器31株、尿27株、血液9株、膿6株、その他6株の総数79株であった。

2. カルバペネム系抗菌薬4剤のMIC分布

カルバペネム系抗菌薬4剤のそれぞれの菌種におけるMIC分布をTable 2Aに示す。すべての菌種において、MEPMとDRPMがIPMとPAPMより低濃度で有効性を示す傾向にあった。*E. coli*で

は、 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で、差が認められ、MEPMとDRPMでは、 $0.03 \mu\text{g/ml}$ ですべての株の生育が抑えられたが、IPMとPAPMは $0.03 \mu\text{g/ml}$ では発育阻止効果は認められず、 $0.12 \mu\text{g/ml}$ で27株中26株(90%以上)の株の生育を抑制した。*K. pneumoniae*では $0.12 \mu\text{g/ml}$ 以下で差が認められ、MEPMとDRPMでは、 $0.06 \mu\text{g/ml}$ で17株中16株(90%以上)の生育が抑えられたが、IPMとPAPMは $0.25 \mu\text{g/ml}$ でそれぞれ16株、15株(90%以上)の株の生育を抑制した。*K. oxytoca*では、 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 以下で差が認められ、MEPMとDRPMでは、 $0.03 \mu\text{g/ml}$ で9株すべて生育が抑えられ、PAPMでは $0.12 \mu\text{g/ml}$ で、IPMでは $0.25 \mu\text{g/ml}$ ですべての株の生育を抑制した。*S. marcescens*では $2 \mu\text{g/ml}$ 以下で差が認められ、MEPMとDRPMでは、 $0.25 \mu\text{g/ml}$ で10株すべての生育が抑えられたが、IPMとPAPMは $4 \mu\text{g/ml}$ ですべての株の生育を抑制した。*E. cloacae*では $2 \mu\text{g/ml}$ 以下で差が認められ、MEPMとDRPMでは、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ で9株すべての生育が抑えられたがIPMは $4 \mu\text{g/ml}$ で、PAPMでは $8 \mu\text{g/ml}$ ですべての株の生育を抑制した。*C. freundii*では $4 \mu\text{g/ml}$ 以下で差が認められ、MEPMとDRPMでは、 $0.25 \mu\text{g/ml}$ で7株すべての生育が抑えられたがIPMは $8 \mu\text{g/ml}$ で、PAPMは $4 \mu\text{g/ml}$ ですべての株の生育を抑制した。

Table 2A. カルバペネム系4薬剤の抗菌力の比較

<i>E. coli</i> 27 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
IPM		12	14	1					
PAPM	1	20	5	1					
MEPM	27								
DRPM	27								
<i>K. pneumoniae</i> 17 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
IPM			12	4		1			
PAPM		4	10	1	1		1		
MEPM	16					1			
DRPM	15	1					1		
<i>K. oxytoca</i> 9 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
IPM	1		3	5					
PAPM	1		8						
MEPM	9								
DRPM	9								
<i>S. marcescens</i> 10 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
IPM			1	2	4	1	1	1	
PAPM			2	4	2		1	1	
MEPM	9		1						
DRPM	4	5		1					
<i>E. cloacae</i> 9 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
IPM			2	2	3		1	1	
PAPM			4		2	1	1		1
MEPM	5	2	1		1				
DRPM	4	3	2						
<i>C. freundii</i> 7 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
IPM			1	1	3			1	1
PAPM			2	1	1	1		2	
MEPM	5	1		1					
DRPM	4	2		1					

Table 2B. フルオロキノロン系4薬剤の抗菌力の比較

<i>E. coli</i> 27 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
CPFX	16	4	5	1		1			
LVFX	15	1	2	8	1				
PZFX	16		8	2		1			
TFLX	16	2	8			1			
<i>K. pneumoniae</i> 17 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
CPFX	11	2	1	2		1			
LVFX	7	5	1	2	1	1			
PZFX	13	1	1	1	1				
TFLX	13	1		2		1			
<i>S. marcescens</i> 10 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
CPFX	4	2		2	1	1			
LVFX	2	2	2		2	2			
PZFX	4	2		1	3				
TFLX	2	3	1		2	2			
<i>E. cloacae</i> 9 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
CPFX	5		2	1			1		
LVFX	5			2	1		1		
PZFX	5			2	1		1		
TFLX	5		1	1	1			1	
<i>C. freundii</i> 7 株									
MIC	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8 (μg/ml)
CPFX	4	1				2			
LVFX	2	2	1			1		1	
PZFX	4	1				2			
TFLX	4		1			2			

MEPMとDRPMのMICに対してIPMあるいはPAPMのMIC値が3管差以上の乖離が認められた株のそれぞれの薬剤のMIC値をTable 3に示す。MEPMとDRPMについては*E. cloacae*の1株以外のすべてが一管差以内のMICであった。IPMと

PAPMについては、*S. marcescens*の1株以外のすべてが一管差以内のMICであった。乖離する株では、IPMとPAPMがともにMICが高値であった。グラム陰性桿菌に対するCLSIによるブレイクポイントは、IPMとMEPMはS: ≤4 μg/ml, I: 8 μg/

Table 3. Bacteria strains those MIC of carbapenems were significantly estranged.

	specimen	IPM	PAPM	MEPM	DRPM
<i>E. coli</i>	respiratory system	0.25*	0.25	0.03	0.03
<i>K. pneumoniae</i>	respiratory system	0.25	0.12	0.03	0.03
	urine	0.25	0.25	0.03	0.06
	respiratory system	0.25	0.12	0.03	0.03
	respiratory system	0.25	0.5	0.03	0.03
<i>K. oxytoca</i>	respiratory system	0.25	0.12	0.03	0.03
	blood	0.25	0.12	0.03	0.03
	respiratory system	0.25	0.12	0.03	0.03
	urine	0.25	0.12	0.03	0.03
	respiratory system	0.25	0.12	0.03	0.03
<i>S. marcescens</i>	pus	0.25	0.25	0.03	0.06
	respiratory system	2	2	0.03	0.06
	prostate gland	4	4	0.12	0.25
	respiratory system	0.5	0.25	0.03	0.06
	blood	0.5	0.25	0.03	0.06
	respiratory system	0.5	0.5	0.03	0.03
	respiratory system	1	0.5	0.03	0.03
	respiratory system	0.5	0.12	0.03	0.03
	respiratory system	0.25	0.25	0.03	0.06
<i>E. cloacae</i>	pus	0.25	0.12	0.03	0.03
	respiratory system	0.5	0.5	0.06	0.06
	blood	0.5	1	0.5	0.12
	pus	0.25	0.12	0.03	0.03
	urine	0.5	0.5	0.06	0.12
	pus	4	8	0.12	0.06
	respiratory system	2	2	0.03	0.06
<i>C. freundii</i>	wound	0.25	0.12	0.03	0.03
	respiratory system	0.5	0.25	0.03	0.03
	respiratory system	0.5	1	0.03	0.03
	pus	8	4	0.06	0.06
	urine	4	4	0.03	0.06

* MIC ($\mu\text{g/ml}$)

ml, R: $>8 \mu\text{g/ml}$ で, CLSI 基準にない PAPM と DRPM については, IPM と MEPM の値に準じて設定しており, ほとんどの分離株で, SIR 判定は異ならなかった。

3. フルオロキノロン系抗菌薬

フルオロキノロン系抗菌薬 4 剤のそれぞれの菌

種における MIC 分布を Table 2B に示す。6 種すべての菌種で, 低濃度から高濃度領域においてほぼ同一の MIC 分布を示した。発育抑制効果は菌種によって差があったが, 4 薬剤で MIC 分布はほぼ同じ結果であり, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* は $1 \mu\text{g/ml}$, *E. cloacae* と *C. freundii* は $4 \mu\text{g/ml}$ ですべての株の発育が抑えられた。*K. oxy-*

toca では9株すべてのMIC値が0.03 µg/mlであった。CLSIによるブレイクポイントは、CPFV S: ≤1 µg/ml, I: 2 µg/ml, R: >2 µg/ml, LVFX S: ≤2 µg/ml, I: 4 µg/ml, R: >4 µg/mlである。MIC値はすべての株で4 µg/ml以下であり、SIRの判定に相違は無かった。

考察

カルバペネム系抗菌薬4剤とフルオロキノロン系抗菌薬4剤の6種の腸内細菌について微量液体希釈法によるMIC測定を行い、カルバペネム系抗菌薬ではIPM、フルオロキノロン系抗菌薬ではLVFXを代表薬剤として*in vitro*感受性検査の結果として報告することが妥当であることを検証した。

検討した6種の腸内細菌のすべてで、カルバペネム系抗菌薬では、MIC分布の差が、4 µg/ml以下の領域で認められ、MEPMとDRPMがIPMとPAPMより低い濃度で増殖抑制効果を示した。フルオロキノロン系抗菌薬は6種の腸内細菌のすべてでほぼ同一のMIC分布を示した。各菌種のMIC値の差は4 µg/ml以下で生じており、CLSI基準のIPMのMIC ≤4 µg/mlをSとした場合、ほとんどすべての株でSIR判定には影響は生じない。

今回検討した4種のカルバペネム系抗菌薬の標準株によるMIC値は、*E. coli* (ATCC25922): IPM 0.125 µg/ml, PAPM 0.125 µg/ml, MEPM 0.016 µg/ml, DRPM 0.031 µg/ml, *K. pneumoniae* (ATCC13883): IPM 0.5 µg/ml, PAPM 0.25 µg/ml, MEPM 0.031 µg/ml, DRPM 0.063 µg/ml, *K. oxytoca* (ATCC13182): IPM 1.0 µg/ml, PAPM 0.5 µg/ml, MEPM 0.063 µg/ml, DRPM 0.125 µg/ml, *E. cloacae* (ATCC13047): IPM 0.5 µg/ml, PAPM 0.25 µg/ml, MEPM 0.063 µg/ml, DRPM 0.063 µg/ml, *S. marcescens* (ATCC13880): IPM 1.0 µg/ml, PAPM 0.5 µg/ml, MEPM 0.063 µg/ml, DRPM 0.125 µg/ml, *C. freundii* (ATCC8090): IPM 0.5 µg

/ml, PAPM 0.125 µg/ml, MEPM 0.031 µg/ml, DRPM 0.016 µg/mlと報告されている²⁾。

検討期間と同時期の臨床分離株での報告では、2007年の調査³⁾では、MIC₉₀が示されており、*E. coli*ではIPM 0.25 µg/ml, PAPM 0.25 µg/ml, *K. pneumoniae*ではIPM 0.5 µg/ml, PAPM 0.25 µg/ml, *Citrobacter spp.*ではIPM 1.0 µg/ml, PAPM 0.5 µg/ml, *Enterobacter spp.*ではIPM 2.0 µg/ml, PAPM 1.0 µg/ml, *S. marcescens*ではIPM 2.0 µg/ml, PAPM 1.0 µg/mlであった。2007年の呼吸器感染症由来の*K. pneumoniae*では⁴⁾IPMとPAPMのMIC₉₀が0.5 µg/mlで、MEPMとDRPMのMIC₉₀が≤0.06 µg/mlであった。また、2008年度外科感染症分離菌の報告⁵⁾ではMIC₉₀が、*E. coli*ではIPM 0.25 µg/ml, MEPM ≤0.06 µg/ml, *K. pneumoniae*ではIPM 0.25 µg/ml, MEPM ≤0.06 µg/ml, *K. oxytoca*ではIPM 0.5 µg/ml, MEPM ≤0.06 µg/ml, *E. cloacae*ではIPM 1.0 µg/ml, MEPM 0.125 µg/ml, *Citrobacter spp.*ではIPM 1.0 µg/ml, MEPM ≤0.06 µg/mlであった。いずれの報告も、MEPMとDRPMがIPMとPAPMと比べ低いMIC値を示しており、我々の今回の結果は、それらを支持した。

フルオロキノロン系抗菌薬のMIC値は、ブレイクポイント以下0.03 µg/mlまで良く一致した。代表薬剤として、LVFXのMIC値の利用が妥当であることが示された。検討期間と同時期の臨床分離株での報告では、2007年の調査³⁾で示されたMIC₉₀は、*E. coli*ではLVFX 16 µg/ml, CPFV 32 µg/ml, TFLX >16 µg/ml, *K. pneumoniae*ではLVFX 0.25 µg/ml, CPFV 0.25 µg/ml, TFLX 0.25 µg/ml, *Citrobacter spp.*ではLVFX 1.0 µg/ml, CPFV 0.5 µg/ml, TFLX 1.0 µg/ml, *Enterobacter spp.*ではLVFX 1.0 µg/ml, CPFV 0.5 µg/ml, TFLX 1.0 µg/ml, *S. marcescens*ではLVFX 2.0 µg/ml, CPFV 2.0 µg/ml, TFLX 2.0 µg/mlであった。2007年の呼吸器感染症由来の*K. pneumoniae*での

MIC₉₀は⁴⁾ LVFX 1.0 µg/ml, CPFEX 0.5 µg/ml, PZFX 0.25 µg/ml, TFLX 0.25 µg/mlであった。また、2008年度外科感染症分離菌は⁵⁾、*E. coli*ではLVFX 8.0 µg/ml, CPFEX 16.0 µg/ml, *K. pneumoniae*ではLVFX 0.06 µg/ml, CPFEX 0.125 µg/ml, *K. oxytoca*ではLVFX 0.5 µg/ml, CPFEX 0.5 µg/ml, *E. cloacae*ではLVFX 0.5 µg/ml, CPFEX 0.25 µg/ml, *Citrobacter* spp.ではLVFX 0.25 µg/ml, CPFEX 0.125 µg/mlであった。いずれも薬剤による相違は1管差にとどまっており、今回の我々の結果もこれを支持した。但し、今回我々が対象とした*E. coli*のMIC₉₀はCPFEX, TFLXが0.125 µg/ml, LVFXとPZFXが0.25 µg/mlと他の報告と比べ低値であった。これは、本院の抗菌薬使用状況と関連しているのかもしれない。

今回検討した*in vitro*の微量液体希釈法は、投与後の吸収と代謝および組織移行性を考慮していない。したがって、カルバペネム系抗菌薬での低濃度領域でのMIC値の差異が体内での奏功性の差異を直接反映するわけではない。

最近、*K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) 保有菌検出の目的で、CLSI基準が更新され、IPMとMEPMがS: ≤1 µg/ml, I: 2 µg/ml, R: ≥4 µg/ml, DRPMがS: ≤0.25 µg/ml, I: 0.5 µg/ml, R: ≥1 µg/mlが示された⁶⁾。これによりKPCの見逃しが無くなると言われている。しかし、我々は、CAZのMICが>16 µg/mlでCTXのMICが>32 µg/mlであるがIPMのMIC値が<1 µg/mlの株の中に、SMA test陽性でIMP geneを保有する*E. cloacae*を報告し、低MICであってもメタロβ-ラクタマーゼ遺伝子保有株が存在することを示した⁷⁾。カルバペネム系抗菌薬のMIC値が低値の耐性菌は、*Acinetobacter* spp.でのOXA型carbapenemase産生株にも認められ、それらの検出のためには、MIC値測定やSMA testだけでなく、PCRによる

耐性遺伝子の検出が必須となる。各カルバペネム耐性遺伝子の適切なPCR primerとpositive controlの普及が望まれる。

文献

- 1) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement. M100-S20. Vol. 30 CLSI, Wayne, PA, USA, 2010
- 2) 藤村享滋, 木村美司, 吉田 勇, 東山伊佐夫, 地主 豊, 宗 景正, 黒田直美, 土肥正善, 西川 徹, 山野佳則: Doripenemの*in vitro*抗菌力。日本化学療法学会雑誌 53 (Suppl. 1): 57~70, 2005
- 3) 山口恵三, 大野 章, 石井良和, 他: 2007年に全国72施設から分離された臨床分離株12,919株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn. J. Antibiotics 62: 346~370, 2009
- 4) NIKI, Y.; H. HANAKI, T. MATSUMOTO, *et al.*: Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the Japanese Society of Chemotherapy in 2007: general view of the pathogens' antibacterial susceptibility. J. Infect. Chemother. 15: 156~167, 2009
- 5) 品川長夫, 長谷川正光, 平田公一, 他: 外科感染症分離菌とその薬剤感受性—2008年度分離菌を中心に—。Jpn. J. Antibiotics 63: 105~170, 2010
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement (June 2010 Update) M100-S20-U vol. 30 No. 15 CLSI, Wayne, PA, USA, 2010
- 7) 高橋奈々子, 山口史博, 陳 戈林, 他: 昭和大学病院で分離された多剤耐性*Enterobacter cloacae*の耐性遺伝子解析。臨床病理 58: 442~447, 2010

Validity of using imipenem as a representative carbapenems and levofloxacin as a representative fluoroquinolones in antibiotics susceptibility test for enterobacteriaceae

NANAKO TAKAHASHI, KAZUHIDE GOMI, FUMIHIRO YAMAGUCHI and
KUNIHICO FUKUCHI

Department of Clinical Pathology, Showa University, School of Medicine

RIKA WAKUTA

Clinical Laboratory, Showa University Hospital

In antimicrobial susceptibility test for enterobacteriaceae, the efficacies of carbapenems are predicted by the minimum inhibitory concentration (MIC) of imipenem, and that of fluoroquinolones are predicted by the MIC of levofloxacin. To assess its judgement, we compared the MICs of imipenem, meropenem, panipenem, and doripenem for carbapenems, and ciprofloxacin, levofloxacin, tosufloxacin and pazufloxacin for fluoroquinolones of clinically isolated enterobacteria, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*, those resistant to the third generation cephalosporin. MIC distributions in low concentration range are estranged in some strains, conspicuously *S. marcescens*, *E. cloacae* and *C. freundii*: meropenem and doripenem displayed low MIC value than imipenem and panipenem. Since the estrangements are appeared MIC value of less than 8 $\mu\text{g/ml}$, the interpretive results (susceptible, intermediate, resistant) are not affected. In fluoroquinolones, all 4 agents showed almost identical MIC distributions, thus the MIC of levofloxacin is accepted to use the reference for other fluoroquinolones. The existence of the strains harboring carbapenem-resistant gene displaying low MIC value of carbapenems was reported. For the sensitive detection of the candidate of carbapenem-resistant strains, cut-off value of each carbapenem should be reconsidered, and also other phenotype analysis should be applied. Genomic analysis also would be required to detect the carbapenem-resistant gene.