

岐阜県及び愛知県下において分離された基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生株に対する各種抗菌薬の 抗菌活性サーベイランス

富山化学工業株式会社総合研究所
東海アンチバイオグラム研究会ワーキンググループ

中川哲志・久田晴美・野村伸彦・満山順一
富山化学工業株式会社総合研究所

松原茂規
松原耳鼻いんこう科医院

山岡一清
岐阜医療科学大学衛生技術学科

渡邊邦友
岐阜大学生命科学総合研究支援センター
嫌気性菌研究分野

浅野裕子
大垣市民病院医療技術部

橋渡彦典
高山赤十字病院検査部

末松寛之・澤村治樹
愛知医科大学病院感染制御部

松川洋子
岐阜県立多治見病院臨床検査部

山岸由佳・三嶋廣繁
愛知医科大学臨床感染症学

(2013年7月31日受付)

岐阜県及び愛知県下の医療施設において、2007年から2011年にかけて分離された基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (extended-spectrum β -lactamase: ESBL) 産生株131株に対する各種抗菌薬の抗菌活性を測定した。今回評価した抗菌薬の中でmeropenem (MEPM) 及びdoripenem (DRPM) のMIC₅₀並びにMIC₉₀が0.0313~0.125 μ g/mLであり、最も低かった。Clinical and Laboratory Standards Instituteのブレイクポイントを用いた感性率は、MEPM, DRPM, imipenem (IPM), tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) 及びcefmetazole (CMZ) がそれぞれ98.5%, 98.5%, 94.7%, 94.7%及び92.4%であり、良好な活性を示した。

ESBL産生株の遺伝子型別ではCTX-M-9型単独保有株が72株 (55.0%) と最も多く分離され、これらに対するTAZ/PIPC, IPM, MEPM及びDRPMの感性率はいずれも100%であった。

以上のように本地域にて分離されたESBL産生株に対して、カルバペネム系抗菌薬に加えて、TAZ/PIPC及びCMZが良好な抗菌活性を示した。

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (extended-spectrum β -lactamase: ESBL) は一般に、ペニシリン系抗菌薬及び第一世代セファロスポリン系抗菌薬のみならず、第二世代以降のセファロスポリン系抗菌薬及びモノバクタム系抗菌薬を分解可能な β -ラクタマーゼと定義されている。ESBLは広範な β -ラクタム系抗菌薬を分解することから、その産生菌による感染症に対して有効な抗菌薬は限られており、また、ESBL非産生菌による感染症と比べて死亡率が高いことが報告されている¹⁾。

KNOTHEら²⁾が1983年にSHV型のESBL産生 *Klebsiella pneumoniae* 及び *Serratia marcescens* を世界で初めて報告し、日本においてはISHIIら³⁾が1995年にToho-1型のESBL産生 *Escherichia coli* を報告した。それ以降も数多くの遺伝子型のESBL産生菌が分離され、海外並びに国内においてESBL産生菌に対する各種抗菌薬の抗菌活性及び遺伝子型の解析を含む多くのサーベイランスが行われている⁴⁻¹⁰⁾。

ESBL産生菌で主流となっている遺伝子型はCTX-M-1型、CTX-M-2型、CTX-M-9型及びSHV型であり、菌種により保有する遺伝子型が異なることが報告されている⁹⁾。*Proteus mirabilis*ではCTX-M-2型保有株がほぼ全てを占める一方⁹⁾、*E. coli*ではCTX-M-9型保有株の分離頻度が高いことが知られている⁴⁾。また、ESBLの遺伝子型により各種抗菌薬の抗菌活性が異なることも示されている。村谷ら⁴⁾によるとcefotaxime (CTX) はCTX-M型保有株よりもSHV-12型保有株に対して抗菌活性が強く、一方ceftazidime (CAZ) はSHV-12型保有株よりもCTX-M型保有株に対して抗菌活性が強い。

以上のようにESBL産生菌は、その保有する遺

伝子型によって抗菌薬に対する感受性が異なるため、当該地域での遺伝子型あるいは感受性の調査を行うことは、ESBL産生菌に対する適切な抗菌薬の使用を行うためには重要である。今回、我々はClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のESBL一次スクリーニング基準であるCTXあるいはCAZの最小発育阻止濃度 (MIC) が $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の条件を満たす *E. coli*, *K. pneumoniae* 及び *P. mirabilis*¹¹⁾ を岐阜県及び愛知県下の医療施設にて収集し、ESBL産生株について各種抗菌薬の抗菌活性並びに遺伝子型の決定を行い、菌種別及び遺伝子型別等での各種解析を行ったので報告する。

I. 材料及び方法

1. 使用菌株

2007年から2011年にかけて、岐阜地区より岐阜大学医学部附属病院、公立学校共済組合東海中央病院、中濃地区より岐阜県厚生農業協同組合連合会中濃厚生病院、東濃地区より岐阜県立多治見病院、西濃地区より大垣市民病院、飛騨地区より高山赤十字病院、愛知地区より愛知医科大学病院で分離された *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* のうちCLSIによるESBL一次スクリーニングの基準であるCAZあるいはCTXのMICが $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の157株を用いた。

各施設でマイクロバンクに保存された菌株は、ミュラーヒントン寒天平板上で増菌し、2継代以内の単一コロニーを各測定に使用した。

2. ESBL産生株の検出

ESBL産生株の検出はCLSIのESBL産生株確

認試験¹¹⁾に基づき実施した。収集した一次スクリーニング陽性株に対し、CAZ, CTX, CAZ/clavulanic acid (CVA) 及びCTX/CVA ディスク (栄研化学) を用いて、CAZ 単独ディスクと比較してCAZ/CVA ディスクによる阻止円径が5mm 以上拡大した株あるいはCTX 単独ディスクと比較してCTX/CVA ディスクによる阻止円径が5mm 以上拡大した株をESBL 産生株とした。

3. 使用抗菌薬

Ampicillin (ABPC), amoxicillin (AMPC), piperacillin (PIPC), sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC), CVA/AMPC, tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ), CPZ, cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), CTX, CAZ, cefmetazole (CMZ), flomoxef (FMOX), latamoxef (LMOX), imipenem (IPM), meropenem (MEPM), doripenem (DRPM),

aztreonam (AZT), levofloxacin (LVFX), pazufloxacin (PZFX), ciprofloxacin (CPFX), tosufloxacin (TFLX) の計23薬剤を用いた。なお、SBT/ABPC, CVA/AMPC 及びSBT/CPZはそれぞれ、ABPC, AMPC 及びCPZ 換算として、TAZ/PIPCはTAZ 4 μ g/mL 存在下にてPIPC 換算としてMICを測定した。

4. 抗菌活性測定

MICは、CLSI法¹²⁾に準じてオーダーメイドのドライプレート (栄研化学) を用いて行った。感性, 中等度耐性及び耐性の分類は、CLSIの定めるMIC interpretive standard¹¹⁾を参考とした。PZFXのブレイクポイントは類薬であるLVFXを参考に2 μ g/mLに定めた。

5. ESBL 遺伝子型の決定

ESBL 産生株に対して表1に示すプライマーを

表1. 検出用プライマー

遺伝子型	検出用プライマー	塩基配列(5'→3')
TEM	TEM-F	GTGCGCGGAACCCCTATT
	TEM-R	ATATGAGTAAACTTGGTCTGACAG
SHV	SHV-F	GGGTTATTCTTATTTGTCGC
	SHV-R	TTACCGACCGGCATCTTTCC
CTX-M-1	CTX-M-1-F	GGTAAAAAATCACTGCGTC
	CTX-M-1-R	TTGGTGACGATTTTAGCCGC
CTX-M-2	CTX-M-2-F	ATGATGACTCAGAGCATTCG
	CTX-M-2-R	TGGGTTACGATTTTCGCCGC
CTX-M-8	CTX-M-8-F	TGATGAGACATCGCGTTAAG
	CTX-M-8-R	TAACCGTCGGTGACGATTTT
CTX-M-9	CTX-M-9-F	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA
	CTX-M-9-R	CCCTTCGGCGATGATTCTC
CTX-M-25	CTX-M-25-F	CCGTCGGTGACAATTCTGGC
	CTX-M-25-R	AGAAAAAGCGTAAGGCGGGC

用いたPCRを行い特異的増幅の有無により保有している β -ラクタマーゼ遺伝子型を決定した¹³⁻¹⁵⁾。TEM及びSHVについては、表1のプライマーを用いてdirect sequence法により塩基配列を確定し、既報の分類に従い遺伝子型を決定した¹³⁻¹⁵⁾。

II. 結果

1. ESBL産生株の検出と検体の背景

収集した157株に対し、CLSIのESBL産生株確認試験¹¹⁾を実施した結果、131株(83.4%)が陽性であった。以降はこの131株をESBL産生株と

して試験に供した。

ESBL産生株131株の菌種の内訳は*E. coli*が109株で最も多く、次いで*K. pneumoniae*が16株、*P. mirabilis*が6株であった(図1)。地区別分離株数は、岐阜地区で56株、東濃地区で46株、西濃地区で15株、愛知地区で7株、中濃地区で5株、飛騨地区で2株であった(図2)。材料別分離株数は、尿62株、喀痰27株、血液13株、膿6株、便6株、ドレーン3株、膣分泌液2株、その他12株であった(図3)。

図1. 菌種別におけるESBL産生株の分離頻度

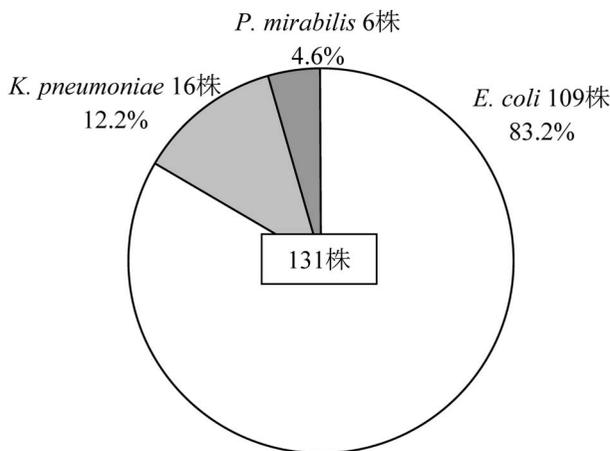


図2. 各地区におけるESBL産生株の分離数

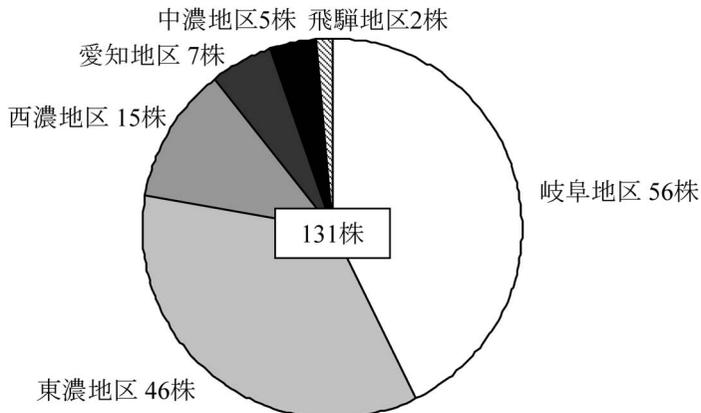
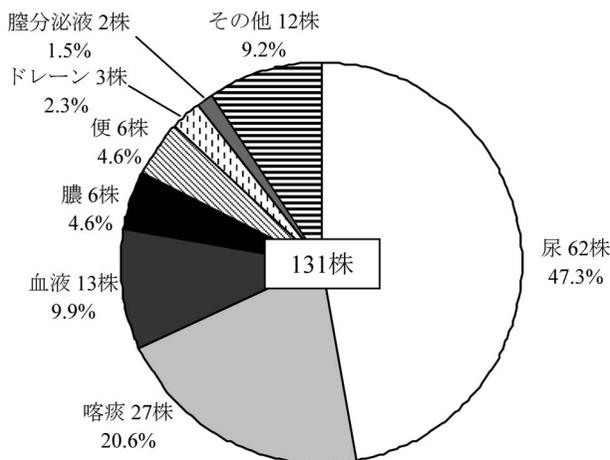


図3. 各分離材料におけるESBL産生株の分離頻度



2. ESBL産生株に対する各種抗菌薬の抗菌活性

ESBL産生株に対して β -ラクタマーゼ阻害剤配合剤を含まないペニシリン系抗菌薬は全てMIC₅₀及びMIC₉₀が>64あるいは>128 μ g/mLであった。ブレイクポイントの設定されているABPC及びPIPCの感性率はいずれも0%であった(表2)。

β -ラクタマーゼ阻害剤配合剤を含まないセファロsporin系抗菌薬もCAZ以外はペニシリン系抗菌薬と同様の傾向であった。

β -ラクタマーゼ阻害剤配合剤はいずれも単剤よりMIC₅₀が1/4以下に低下し、中でもTAZ/PIPCはMIC₅₀及びMIC₉₀が最も低く、2及び8 μ g/mLであり、感性率は94.7%であった。

セファマイシン系及びオキサセフェム系抗菌薬の中ではFMOXのMIC₅₀及びMIC₉₀が最も低く、それぞれ0.125及び2 μ g/mLであった。CMZの感性率は92.4%であった。

カルバペネム系抗菌薬は他系抗菌薬よりも抗菌活性が強く、中でもMEPMとDRPMのMIC₅₀はいずれも0.0313 μ g/mLであり、MIC₉₀はそれぞれ0.0625及び0.125 μ g/mLであった。また両薬剤の感性率も全薬剤中最も高い98.5%であった。全131株中、MEPMあるいはDRPMに耐性を示したのは、2株であった。いずれも尿由来の*E. coli*及

び*K. pneumoniae*であり、IPM, MEPM, DRPMのMICはそれぞれ0.25, 16, 4及び0.5, 8, 4 μ g/mLでIPMには感性であった。

モノバクタム系抗菌薬のAZTのMIC₅₀及びMIC₉₀は16及び128 μ g/mL、感性率は19.8%であった。

キノロン系抗菌薬はPZFXのMIC₅₀及びMIC₉₀が同系抗菌薬の中では最も低く、8及び16 μ g/mLであった。類薬を参考にしたPZFXの感性率は40.5%であった。

3. 菌種別の各種抗菌薬の抗菌活性

E. coli, *K. pneumoniae*及び*P. mirabilis*について各種抗菌薬のMIC₅₀, MIC₉₀及び感性率を比較した。今回収集した131株のESBL産生菌のうち109株が*E. coli*であり全ESBL産生株の83.2%を占めた。

*E. coli*ではMEPM, DRPM, IPM, TAZ/PIPC及びCMZの感性率は、それぞれ99.1%, 99.1%, 98.2%, 95.4%及び93.6%であった(表3)。キノロン系抗菌薬及びTAZ/PIPC以外の β -ラクタマーゼ阻害剤配合剤の感性率は20.2~39.4%であった。

*K. pneumoniae*ではMEPM, DRPM, IPM, TAZ/PIPC及びCMZの感性率は、それぞれ93.8%, 93.8%, 87.5%, 87.5%及び81.3%であり、*E. coli*と

表2. 各種抗菌薬に対するESBL産生菌131株の感受性分布とMIC₅₀, MIC₉₀及び感受率

薬剤	MIC (µg/mL)											MIC ₅₀	MIC ₉₀	感受率 ^{c)} (%)								
	≤0.001	0.002	0.0039	0.0078	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1				2	4	8	16	32(>16)	64	128(>64)	>128
ABPC																		131	>128	>128	0	
AMPC ^{d)}																		131	>64	>64	ND	
PIPC																			114	>128	>128	0
SBT/ABPC													16	30	30	37	14	4		16	64	35.1
CVA/AMPC ^{d)}													12	39	52	20	3	5		16	32	38.9
TAZ/PIPC																						
SBT/CPZ																						
CPZ																						
CEZ																						
CTM																						
CTX																						
CAZ ^{a)}																						
CMZ																						
FMOX																						
LMOX																						
IPM ^{b)}																						
MEPM																						
DRPM ^{d)}																						
AZT																						
LVFX																						
PZFX ^{d)}																						
CPFX ^{a)}																						
TFLX ^{b)}																						

^{a)}AMPC, CVA/AMPC, IPM, CAZ, DRPM, CPFXの測定濃度上限は64 µg/mLである。これらの薬剤は128 µg/mLを>64 µg/mLと読み替える。

^{b)}TFLXの測定濃度上限は16 µg/mLである。TFLXは32 µg/mLを>16 µg/mLと読み替える。

^{c)}NDはCLSIによりブレイクポイントが設定されていない薬剤である。

^{d)}PZFXのブレイクポイントは親薬であるLVFXを参考に2 µg/mLに設定した。

表3. 菌種別の各種抗菌薬の抗菌活性

薬剤	<i>E. coli</i> (109株)			<i>K. pneumoniae</i> (16株)			<i>P. mirabilis</i> (6株)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}
ABPC	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0/6
AMPC	>64	>64	ND	>64	>64	ND	>64	>64	ND
PIPC	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0/6
SBT/ABPC	16	64	34.9	16	128	25.0	8	32	4/6
CVA/AMPC	16	32	39.4	16	64	25.0	4	16	4/6
TAZ/PIPC	2	8	95.4	4	32	87.5	0.5	4	6/6
SBT/CPZ	4	16	ND	8	32	ND	2	16	ND
CPZ	>128	>128	0.9	128	>128	6.3	>128	>128	0/6
CEZ	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0/6
CTM	128	>128	ND	128	>128	ND	>128	>128	ND
CTX	64	>128	0.9	16	128	0	32	>128	0/6
CAZ	4	32	50.5	4	>64	50.0	0.25	4	6/6
CMZ	2	16	93.6	1	128	81.3	4	8	6/6
FMOX	0.125	2	ND	0.0625	64	ND	0.25	8	ND
LMOX	0.5	4	ND	0.5	16	ND	0.25	1	ND
IPM	0.125	0.5	98.2	0.125	2	87.5	1	2	3/6
MEPM	0.0313	0.0625	99.1	0.0313	0.125	93.8	0.0625	0.0625	6/6
DRPM	0.0313	0.0625	99.1	0.0625	0.5	93.8	0.125	0.25	6/6
AZT	16	128	15.6	16	>128	37.5	1	128	3/6
LVFX	16	32	22.0	0.25	4	81.3	4	64	2/6
PZFX ^{b)}	8	16	31.2	0.25	4	87.5	1	16	5/6
CPFEX	32	>64	20.2	0.25	8	75.0	2	>64	1/6
TFLX	>16	>16	ND	0.125	8	ND	2	>16	ND

MIC, µg/mL

感性率, %

^{a)}NDはCLSIによりブレイクポイントが設定されていない薬剤である。^{b)}PZFXのブレイクポイントは類薬であるLVFXを参考に2 µg/mLに設定した。

比べ低い傾向が見られた。一方、キノロン系抗菌薬の感性率は高く、中でもPZFXの感性率は87.5%であった。

*P. mirabilis*の分離株数は6株ではあったが、MEPM, DRPM, TAZ/PIPC, CAZ, CMZ及びPZFXが良好な活性を示した。

4. 分離材料別の各種抗菌薬の抗菌活性

分離材料別分離株数が10株以上であった尿由来株、喀痰由来株及び血液由来株について、各種

抗菌薬のMIC₅₀, MIC₉₀及び感性率を比較した(表4)。最も多く分離された尿由来株ではTAZ/PIPC, IPM, MEPM, DRPM及びCMZの感性率は、それぞれ98.4%, 96.8%, 96.8%, 96.8%及び95.2%であり、いずれも良好な感性を示した。

喀痰由来株に対する感性率は、MEPM及びDRPMが、いずれも100%であり、次いでTAZ/PIPC, IPM, CMZがいずれも85.2%であった。喀痰由来株のMIC₉₀は尿由来株のMIC₉₀と比較して、TAZ/PIPC, LMOX, IPMが4倍、DRPMが8

表4. 分離材料別の各種抗菌薬の抗菌活性

薬剤	尿由来株(62株)			喀痰由来株(27株)			血液由来株(13株)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}
ABPC	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0
AMPC	>64	>64	ND	>64	>64	ND	>64	>64	ND
PIPC	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0
SBT/ABPC	16	64	43.5	16	64	33.3	32	64	15.4
CVA/AMPC	8	32	50.0	16	64	33.3	16	32	15.4
TAZ/PIPC	2	8	98.4	2	32	85.2	4	8	100
SBT/CPZ	4	16	ND	8	16	ND	8	16	ND
CPZ	>128	>128	0	128	>128	0	>128	>128	7.7
CEZ	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0
CTM	128	>128	ND	>128	>128	ND	>128	>128	ND
CTX	64	>128	0	64	>128	0	128	>128	0
CAZ	4	32	51.6	4	>64	55.6	8	16	46.2
CMZ	2	8	95.2	2	128	85.2	2	8	100
FMOX	0.125	1	ND	0.25	128	ND	0.125	0.5	ND
LMOX	0.5	2	ND	1	8	ND	0.5	2	ND
IPM	0.125	0.5	96.8	0.125	2	85.2	0.125	0.25	100
MEPM	0.0313	0.0625	96.8	0.0313	0.125	100	0.0313	0.0625	100
DRPM	0.0313	0.0625	96.8	0.0313	0.5	100	0.0313	0.0625	100
AZT	16	128	22.6	16	>128	18.5	16	128	7.7
LVFX	16	32	30.6	16	16	22.2	16	64	23.1
PZFX ^{b)}	8	16	33.9	8	8	37.0	4	16	38.5
CPFEX	32	>64	24.2	32	>64	22.2	32	>64	23.1
TFLX	>16	>16	ND	>16	>16	ND	>16	>16	ND

MIC, µg/mL

感性率, %

^{a)}NDはCLSIによりブレイクポイントが設定されていない薬剤である。^{b)}PZFXのブレイクポイントは類薬であるLVFXを参考に2 µg/mLに設定した。

倍, CMZが16倍, FMOXが128倍であった。

血液由来株ではTAZ/PIPC, CMZ, IPM, MEPM及びDRPMが100%の感性率を示した。

5. 地区別の各種抗菌薬の抗菌活性

地区別収集株数が10株以上であった岐阜地区, 東濃地区及び西濃地区について各種抗菌薬のMIC₅₀, MIC₉₀及び感性率を比較した(表5)。全株でのMICに比べ, 岐阜地区ではFMOXのMIC₉₀が4倍, 東濃地区ではCPFEXのMIC₅₀が1/4, CAZのMIC₉₀は2倍以上であった。

同様に, 西濃地区ではFMOXのMIC₉₀が16倍, 全てのキノロン系抗菌薬のMIC₅₀が1/4以下であった。西濃地区ではβ-ラクタマーゼ阻害剤配合剤が他地区よりも高い感性率を示し, 特にTAZ/PIPCは100%の感性率を示した。一方で, 西濃地区ではIPMの感性率が他地区より低く, 感性率は86.7%であった。

6. ESBL各遺伝子型保有株に対する各種抗菌薬の抗菌活性

ESBL産生株に対し, 既報^{13~15)}のプライマーを

表5. 地区別の各種抗菌薬の抗菌活性

薬剤	岐阜地区 (56株)			東濃地区 (46株)			西濃地区 (15株)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}
ABPC	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0
AMPC	>64	>64	ND	>64	>64	ND	>64	>64	ND
PIPC	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0
SBT/ABPC	16	64	37.5	32	64	23.9	8	32	53.3
CVA/AMPC	16	32	42.9	16	32	23.9	8	>64	60.0
TAZ/PIPC	2	8	94.6	4	16	91.3	2	16	100
SBT/CPZ	4	16	ND	8	16	ND	4	16	ND
CPZ	>128	>128	0	>128	>128	4.3	128	>128	0
CEZ	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0
CTM	128	>128	ND	128	>128	ND	128	>128	ND
CTX	64	>128	0	64	>128	2.2	32	128	0
CAZ	4	32	64.3	8	>64	39.1	8	32	46.7
CMZ	2	16	91.1	2	16	93.5	2	32	86.7
FMOX	0.125	8	ND	0.125	1	ND	0.25	32	ND
LMOX	0.5	4	ND	0.5	4	ND	0.5	4	ND
IPM	0.125	0.5	96.4	0.125	0.5	93.5	0.125	2	86.7
MEPM	0.0313	0.0625	96.4	0.0313	0.0625	100	0.0313	0.0625	100
DRPM	0.0313	0.125	96.4	0.0313	0.0625	100	0.0313	0.25	100
AZT	16	64	16.1	32	>128	17.4	16	128	40.0
LVFX	16	32	26.8	8	32	39.1	4	32	40.0
PZFX ^{b)}	8	16	41.1	4	16	45.7	2	16	60.0
CPFEX	32	>64	21.4	8	>64	39.1	4	>64	33.3
TFLX	>16	>16	ND	>16	>16	ND	4	>16	ND

MIC, µg/mL

感性率, %

^{a)}NDはCLSIによりブレイクポイントが設定されていない薬剤である。^{b)}PZFXのブレイクポイントは類薬であるLVFXを参考に2 µg/mLに設定した。

用いて遺伝子型を決定した結果を図4に示した。

菌種別では, *E. coli* (109株) ではCTX-M-9型単独保有株が70株と最も多く分離され, 次いでCTX-M-1型単独保有株, CTX-M-1型及びCTX-M-9型保有株がそれぞれ17, 11株であり, その他の遺伝子型保有株はいずれも2株以下であった。

K. pneumoniae (16株) ではSHV-12型単独保有株が4株と最も多く分離され, その他の遺伝子型はいずれも2株以下であった。

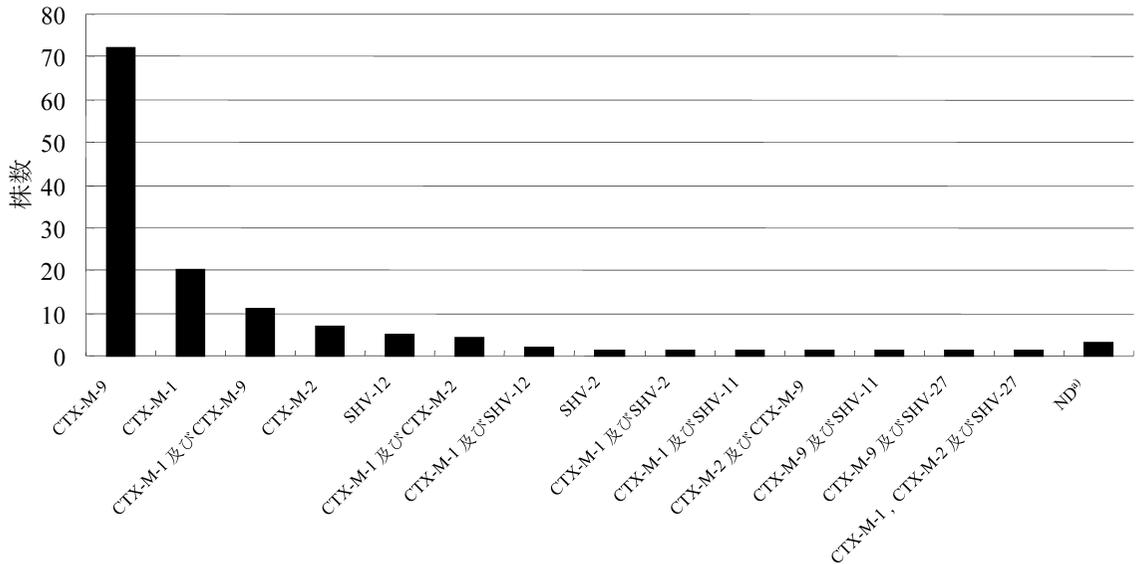
P. mirabilis (6株) ではCTX-M-2型単独保有株

が5株, CTX-M-1型単独保有株が1株分離された。

CTX-M-9型単独保有株, CTX-M-1型単独保有株並びにCTX-M-1型及びCTX-M-9型保有株について各種抗菌薬のMIC₅₀, MIC₉₀及び感性率を比較した(表6)。

最も多く分離されたCTX-M-9型単独保有株では97.2%を*E. coli*が占めた。TAZ/PIPC, IPM, MEPM, DRPM及びCMZの感性率は90%以上であり, 良好な活性を示した。オキサセフェム系抗菌薬FMOXとLMOXはカルバペネム系抗菌薬に次いでMIC₉₀

図4. ESBL各種遺伝子型の分離株数



a);NDの株はいずれのプライマーによっても遺伝子型を決定できなかった

が低く、いずれも $2\mu\text{g/mL}$ であった。モノバクタム系抗菌薬AZT及びキノロン系抗菌薬の感性率は各々25%, 34.7%以下であった。

CTX-M-1型保有株は20株分離され、85%を*E. coli*が占めた。CTX-M-9型保有株と比較するとTAZ/PIPC以外の β -ラクタマーゼ阻害剤配合剤及びCAZの感性率が低い傾向にあり、いずれも感性率は30%以下であった。その他の薬剤もCTX-M-9型保有株と比較すると感性率はわずかに低い傾向にあった。

CTX-M-1型及びCTX-M-9型の両方を保有する株は11株分離され、全てが*E. coli*であった。CAZ及びAZTの感性率が他の遺伝子型保有株より低く、それぞれ9.1%及び0%であった。

CTX-M-2型保有株は7株であり、うち5株が*P. mirabilis*であった。分離株数が少ないものの他の遺伝子型保有株と比べてIPMの感性率が低く42.9%であった。一方、キノロン系抗菌薬の感性率が比較的保たれ、PZFX及びLVFXの感性率はそれぞれ85.7%及び57.1%であり良好であった。

III. 考察

我々はこれまでに岐阜県及び愛知県下で分離された各種病原細菌について継続的な抗菌活性サーベイランスを実施してきた^{16~20)}。今回は2007年から2011年に岐阜県及び愛知県下の医療施設より分離されたESBL産生株に対する各種抗菌薬の抗菌活性を測定し、菌種別、分離材料別、地区別及びESBL遺伝子型別での比較を行った。

ESBL産生株全体に対し、カルバペネム系抗菌薬、TAZ/PIPC、CMZは良好な抗菌活性を有しており、いずれも感性率は90%以上であった。また、CLSIによりブレイクポイントが設定されていないため感性率を算出することができなかったものの、FMOX及びLMOXもMIC₅₀及びMIC₉₀はカルバペネム系抗菌薬に次いで低く、強い抗菌活性を有していたと言える。

今回収集したESBL産生株は菌種や分離材料やESBL遺伝子型といった背景が異なり、その背景

表6. ESBL各遺伝子型保有株に対する各種抗菌薬の抗菌活性

薬剤	CTX-M-9型保有株(72株)			CTX-M-1型保有株(20株)			CTX-M-1型及びCTX-M-9型保有株(11株)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}	MIC ₅₀	MIC ₉₀	感性率 ^{a)}
ABPC	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0
AMPC	>64	>64	ND	>64	>64	ND	>64	>64	ND
PIPC	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0
SBT/ABPC	16	64	47.2	32	32	10.0	32	64	18.2
CVA/AMPC	8	32	51.4	16	32	20.0	16	16	27.3
TAZ/PIPC	2	4	100	4	8	90.0	2	16	90.9
SBT/CPZ	4	16	ND	8	16	ND	8	16	ND
CPZ	128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0
CEZ	>128	>128	0	>128	>128	0	>128	>128	0
CTM	128	>128	ND	128	>128	ND	>128	>128	ND
CTX	64	>128	0	128	>128	0	>128	>128	0
CAZ	4	16	69.4	8	64	30.0	16	>64	9.1
CMZ	2	16	95.8	2	16	95.0	2	8	100
FMOX	0.125	2	ND	0.125	1	ND	0.125	1	ND
LMOX	0.5	2	ND	0.5	2	ND	1	4	ND
IPM	0.125	0.5	100	0.125	1	95.0	0.125	0.25	100
MEPM	0.0313	0.0625	100	0.0313	0.0625	100	0.0313	0.0625	100
DRPM	0.0313	0.0625	100	0.0313	0.125	100	0.0313	0.0625	100
AZT	8	32	25.0	32	128	10.0	64	>128	0
LVFX	16	32	22.2	16	64	20.0	8	32	27.3
PZFX ^{b)}	8	16	34.7	8	16	25.0	8	16	27.3
CPFEX	32	64	20.8	64	>64	15.0	32	64	27.3
TFLX	>16	>16	ND	>16	>16	ND	>16	>16	ND

MIC, µg/mL

感性率, %

^{a)}NDはCLSIによりブレイクポイントが設定されていない薬剤である。^{b)}PZFXのブレイクポイントは類薬であるLVFXを参考に2 µg/mLに設定した。

ごとに抗菌薬の抗菌活性に違いがあった。

まず、菌種別の解析からESBL産生*E. coli*においてはカルバペネム系抗菌薬とTAZ/PIPCがほぼ同等の高い感性を示す一方、ESBL産生*K. pneumoniae*においてはTAZ/PIPCはカルバペネム系抗菌薬よりやや感性が低かった。オキサセフェム系抗菌薬であるFMOX及びLMOXのMIC₉₀もそれぞれ64µg/mL及び16µg/mLであった。このように*K. pneumoniae*はβ-ラクタム系抗菌薬に対する感受性が低い一方、キノロン系抗菌薬に対する感受性は総じて高く、PZFXの感性率は87.5%、CPFEXの

感性率は75.0%であった。しかし、2009年カナダにおけるLoweらの報告²²⁾では、ESBL産生*K. pneumoniae*に対するCPFEXの感性率はわずか9.1%であったことや本邦でもLVFX耐性を示すESBL産生*K. pneumoniae*が2009年以降わずかながら増加していることから²³⁾、本地域におけるキノロン系抗菌薬の感受性を継続的に監視していくことが必要であると考えられる。

さらに、遺伝子型別でも各種抗菌薬の抗菌活性は異なる傾向が認められ、最も多く分離されたCTX-M-9型保有株ではカルバペネム系抗菌薬並

びに TAZ/PIPC が 100% の感性を示す一方、他の遺伝子型ではカルバペネム系抗菌薬及び CMZ が TAZ/PIPC よりわずかに高い感性を示した。2006 年の日本全国におけるグラム陰性菌を対象とした SHIBATA らの調査⁹⁾ と今回の我々の調査では、ESBL 遺伝子型の分離頻度が異なり、中でも CTX-M-2 型の分離頻度は大きく異なっていた。SHIBATA らの調査では全 317 株中 161 株 (50.8%) が CTX-M-2 型 ESBL を産生していたが、我々の調査では単独及び他の遺伝子型を保有する CTX-M-2 型 ESBL 産生株は全 131 株中 13 株 (9.9%) であった。SHIBATA らの調査ではいくつかの地域ごとに結果を示しており、岐阜県及び愛知県を含む中部地域でも CTX-M-2 型が最も高い頻度で分離されていた。SHIBATA らは 2001 年から 2003 年にかけて菌株を収集した一方、我々は 2007 年から 2011 年にかけて菌株を収集しており、経年的に主流となる遺伝子型が変化している可能性が考えられた。

分離材料別の解析では、尿由来株においては TAZ/PIPC、CMZ 及びカルバペネム系抗菌薬が同等の感性を示したが、喀痰由来株においては MEPM 及び DRPM の方が IPM、TAZ/PIPC 及び CMZ よりも高い感性を示した。

抗菌薬の適切な選択に臨床検査室における感受性測定は最も重要であると考えられるが、菌種や遺伝子型や分離材料といった情報は、抗菌薬の感受性測定以前に知りうる情報であり、より早い段階で適切な抗菌薬を選択するために今回の検討結果は良い手がかりになると考えられた。実際に RODRÍGUEZ-BAÑO らは ESBL 産生 *E. coli* による血流感染においては β -ラクタマーゼ阻害剤配合剤が *in vitro* で活性を示す場合にはカルバペネム系抗菌薬と比較しても死亡率及び入院日数に差がないと結論付け、起因菌の感受性を確認した上ならば β -ラクタマーゼ阻害剤配合剤がカルバペネム系抗菌薬の代替になるとしている²¹⁾。

本地域にて分離された ESBL 産生株に対して、

カルバペネム系抗菌薬に加えて TAZ/PIPC 及び CMZ が良好な感性を示した。カルバペネム系抗菌薬は ESBL 産生菌に対する第一選択薬であるが、カルバペネム耐性株も検出されており、その増加が危惧される。今回の結果より ESBL 産生菌には遺伝子型の地域差が認められたことから、抗菌薬に対する感性率も地域で異なることが懸念される。ESBL 産生菌による感染症に対して選択される薬剤にはそれら情報を加味して十分な注意を払う必要がある。今後も ESBL 産生株の網羅的な収集を続け、その性状を細かく解析することにより、カルバペネム系抗菌薬と比べ限定的となるにしても、カルバペネム系抗菌薬以外の有効な選択肢を模索することと、その選択肢を適切に活用していくことがカルバペネム耐性株を増加させないために重要であると考えられた。

参考文献

- 1) PEÑA, C.; C. GUDIOL, L. CALATAYUD, *et al.*: Infections due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase among hospitalized patients: factors influencing mortality. *J. Hosp. Infect.* 68: 116~122, 2008
- 2) KNOTHE, H.; P. SHAH, V. KRUMHOLTZ, *et al.*: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11: 315~317, 1983
- 3) ISHII, Y.; A. OHNO, H. TAGUCHI, *et al.*: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 2269~2275, 1995
- 4) 村谷哲郎, 小林とも子, 松本哲朗, 他: 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* に対する各種抗菌薬の抗菌力。日本化学療法学会雑誌 52: 556~567, 2004
- 5) 若松 篤, 黒川博史, 芹沢亜矢子, 他: 臨床分離 CTX-M-2 グループ β -ラクタマーゼ産生 *Proteus mirabilis* の各種抗菌薬に対する感受性。日本化学療法学会雑誌 54: 447~452, 2006

- 6) PATERSON, D. L. & R. A. BONOMO: Extended-spectrum β -lactamase: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 657~686, 2005
- 7) CANTÓN, R. & T. M. COQUE: The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 466~475, 2006
- 8) LIVERMORE, D. M.; R. CANTÓN, M. GNIADKOWSKI, *et al.*: CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 165~174, 2007
- 9) SHIBATA, N.; H. KUROKAWA, Y. DOI, *et al.*: PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated Gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 791~795, 2006
- 10) CANTÓN, R.; A. NOVAIS, A. VALVERDE, *et al.*: Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 14: 144~153, 2008
- 11) CLSI: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Third informational supplement. Approved Standard M100-S23 CLSI 33:2013
- 12) CLSI: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Seventh Edition. M07-A8. CLSI 29:2009
- 13) JOUINI, A.; L. VINUÉ, K. B. SLAMA, *et al.*: Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 1137~1141, 2007
- 14) LOPES, A. C.; D. L. VERAS, A. M. LIMA, *et al.*: *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 163~167, 2010
- 15) JONES, H.; M. TUCKMAN, D. KEENEY, *et al.*: Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- β -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 465~475, 2009
- 16) 満山順一, 山岡一清, 浅野裕子, 他: 岐阜県下における肺炎球菌の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス—2004年—. *Jpn. J. Antibiotics* 59: 137~151, 2006
- 17) 田中知暁, 満山順一, 山岡一清, 他: 岐阜県下で分離されたグラム陰性菌に対するフルオロキノロン系の抗菌力 (2005年)。 *Jpn. J. Antibiotics* 60: 141~151, 2007
- 18) 帰山 誠, 水永真吾, 満山順一, 他: 岐阜県下で分離されたインフルエンザ菌の感受性サーベイランス (2006)。 *Jpn. J. Antibiotics* 61: 195~208, 2008
- 19) 河元宏史, 野村伸彦, 満山順一, 他: 岐阜県下より分離された streptococci に対する各種抗菌薬の感受性サーベイランス (2005年~2007年)。 *Jpn. J. Antibiotics* 62: 509~524, 2009
- 20) 藤原将祐, 水永真吾, 野村伸彦, 他: 岐阜県及び愛知県下において分離された緑膿菌の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス (2008年)。 *Jpn. J. Antibiotics* 65: 15~26, 2012
- 21) RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; M. D. NAVARRO, P. RETAMAR, *et al.*: β -Lactam/ β -lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: A post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin. Infect. Dis.* 54: 167~174, 2012
- 22) LOWE, C. F.; A. MCGEER, M. P. MULLER, *et al.*: Decreased susceptibility to noncarbapenem antimicrobials in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Toronto, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 3977~3980, 2012
- 23) 野竹重幸, 三井真由美, 近藤寿恵, 他: 今日的话题の多剤耐性菌の動向と対策 1. わが国の医療機関における臨床分離細菌の多剤耐性化の現状とその対応 (3) 市中病院における多剤耐性菌の現状—当センターの現状—。 *化学療法の領域* 27: 1610~1629, 2011

Antimicrobial activity of several drugs against
extended-spectrum β -lactamase positive Enterobacteriaceae
isolates in Gifu and Aichi prefecture

Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd.,
Working Group of Tokai Anti-biogram Study Group

SATOSHI NAKAGAWA, HARUMI HISADA,
NOBUHIKO NOMURA and
JUNICHI MITSUYAMA
Research Laboratories,
Toyama Chemical Co., Ltd.

KAZUKIYO YAMAOKA
Gifu University of Medical Science

YUKO ASANO
Department of Clinical Laboratory Medicine,
Ogaki Municipal Hospital

HIKONORI HASHIDO
Takayama Red Cross Hospital

YOKO MATSUKAWA
Clinical Laboratories,
Gifu Prefectural Tajimi Hospital

SHIGENORI MATSUBARA
Matsubara Otorhinolaryngology Clinic

KUNITOMO WATANABE
Division of Anaerobe Research, Life Science
Research Center, Gifu University

HIROYUKI SUEMATSU and HARUKI SAWAMURA
Division of Infection Control and Prevention,
Aichi Medical University Hospital

YUKA YAMAGISHI and HIROSHIGE MIKAMO
Department of Clinical Infectious Diseases,
Aichi Medical University Graduate School of
Medicine

We investigated the antimicrobial activity of several drugs against 131 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) positive clinical isolates in Gifu and Aichi prefecture from 2007 to 2011. Meropenem (MEPM) and doripenem (DRPM) gave the lowest MIC₅₀ at 0.0313 μ g/mL. MEPM gave the lowest MIC₉₀ at 0.0625 μ g/mL. According to the Clinical and Laboratory Standards Institute breakpoints, the susceptible rates of carbapenems, tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) and cefmetazole (CMZ) were higher than 90%. The susceptible rates of MEPM, DRPM, imipenem (IPM), TAZ/PIPC and CMZ were 98.5%, 98.5%, 94.7%, 94.7% and 92.4%.

We used the PCR method and identified the molecular types of the ESBL positive isolates. Seventy-two strains had CTX-M-9 group gene and CTX-M-9 group gene is the most frequently detected. Against the CTX-M-9 group gene harboring strains which were the most common in our investigation, the susceptible rates of TAZ/PIPC, MEPM, DRPM and IPM were 100%. It is suggested that not only carbapenems but also TAZ/PIPC and CMZ are useful against infections caused by ESBL positive isolates.