



Title	日本における基質拡張型 β -lactamase産生菌の発生動向調査と抗菌化学療法に関する研究
Author(s)	中村, 竜也
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54701
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

日本における基質拡張型 β -lactamase 産生菌の
発生動向調査と抗菌化学療法に関する研究

大阪大学大学院

医学系研究科保健学専攻

中村 竜也

2012 年 12 月

日本における基質拡張型 β -lactamase 産生菌の
発生動向調査と抗菌化学療法に関する研究

指導教員 松浦 成昭 教授

大阪大学大学院

医学系研究科保健学専攻

中村 竜也

2012 年 12 月

目次

緒言	1
第1章 β -ラクタマーゼに関する概説	2
1.1 β -ラクタマーゼの分類とその特徴	2
1.1.1 β -lactamase とは.....	2
1.1.2 ClassA β -lactamase (penicillinase)	3
1.1.3 ESBL とは.....	3
1.1.4 ClassB β -lactamase (metallo β -lactamase)	3
1.1.5 ClassC β -lactamase (cephalosporinase)	4
1.1.6 ClassD β -lactamase.....	4
1.2 ESBL 検出法	4
1.2.1 CLSI 検出法.....	4
1.2.2 その他の検出法1：栄研ディスク法.....	5
1.2.3 その他の検出法2：Double Disk Synergy Test (DDST)	5
1.3 ESBL 産生菌の世界的な検出と問題点.....	6
第2章 日本における SHV 型 ESBL 産生 <i>Escherichia coli</i> による感染症例の発見.....	8
2.1 目的	8
2.2 対象と方法	8
2.2.1 対象.....	8
2.2.2 細菌学的検査	10
2.2.3 PCR 解析の方法	10
2.2.4 シーケンス解析の方法.....	10
2.3 結果	11
2.3.1 細菌学的検査	11
2.3.2 PCR 解析結果	12
2.3.3 シーケンス解析結果	12
2.4 考察	13

第3章 血液から分離された腸内細菌科グラム陰性桿菌の β -ラクタム薬耐性に関する解析	16
3.1 目的	16
3.2 対象と方法	16
3.2.1 対象	16
3.2.2 薬剤感受性試験	17
3.2.3 ESBL および MBL 産生菌の検出および遺伝子型	17
3.2.4 Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) による疫学解析	17
3.2.5 ESBL および MBL 産生菌検出患者の臨床背景	18
3.3 結果	18
3.3.1 各菌種の年次ごとの検出率	18
3.3.2 薬剤感受性検査成績	18
3.3.3 ESBL および MBL 産生菌の検出および遺伝子型	20
3.3.4 疫学解析結果	23
3.3.5 臨床背景調査成績	23
3.4 考察	24
第4章 モンテカルロシミュレーションを使用した ESBL 産生 <i>E. coli</i> に対する カルバペネム系薬およびニューキノロン系薬の有効性評価	28
4.1 目的	28
4.2 対象および方法	28
4.2.1 Pharmacodynamics model	28
4.2.2 Pharmacokinetics	29
4.2.3 使用菌株	29
4.2.4 Monte carlo simulation 法	29
4.3 結果	30
4.3.1 各薬剤の感受性成績	30
4.3.2 モンテカルロシミュレーションによるカルバペネム系薬剤の達成率	30
4.4 考察	31

第5章 日本における臨床材料からのESBL産生 *Escherichia coli*,

Klebsiella spp. および *Proteus mirabilis* の疫学解析 ...32

5.1 目的	32
5.2 対象と方法	33
5.2.1 対象	33
5.2.2 ESBL 判定基準	33
5.2.3 PCR 法による ESBL 遺伝子型の決定	33
5.2.4 <i>E. coli</i> CTX-M15 O25:H4 ST131 型の検出	33
5.2.5 プラスミドレプリコン型	34
5.2.6 経口抗菌薬に対する薬剤感受性	34
5.3 結果	34
5.3.1 ESBL 検出率	34
5.3.2 ESBL 遺伝子型	35
5.3.3 プラスミドレプリコン型	36
5.3.4 経口抗菌薬感受性	37
3.4 考察	37
総括	41
引用文献	44
謝辞	54
関連発表	55

緒言

アレクサンダー・フレミングが 1929 年にアオカビからペニシリンを最初に発見して以来、感染症に対する多くの「抗生物質」が開発され、感染症治療は飛躍的に向上した。一方で、その使用がもたらした耐性菌の出現は、今日の感染症治療において最も重要な問題となっている。また、耐性菌の問題は主に病院内において日和見感染の原因となる菌種であったが、近年は市中感染を発症する菌種においても問題となりつつある。

市中・院内で最も汎用される抗菌薬に β ラクタム系薬があり、現在問題となっている耐性菌の多くが β ラクタム系薬に対するものである。特に、分解酵素である β -lactamase はこれらの薬剤を高度耐性化するために、その拡散は治療を難渋化するケースを増加させると考えられる。よって、 β -lactamase 産生菌に対する疫学的な調査は今後の動向を把握するためにも重要であると考えられる。

β -ラクタム系抗菌薬に対する耐性機序には、細菌の細胞壁合成に関与する酵素であるペニシリン結合蛋白 (PBP) の変異や外膜透過性の変異による耐性が知られているが、多くの菌種、特に腸内細菌における β -ラクタム系薬高度耐性の機序は β -ラクタム系薬を加水分解する酵素である β -ラクタマーゼが大きなウェイトを占める。中でも、古典的なペニシリナーゼ (TEM、SHV 遺伝子) 遺伝子の一部に変異を起こした extended-spectrum β -lactamases (ESBL) 産生菌は、広域 β -ラクタム系薬を加水分解することが可能となった classA β -ラクタマーゼであり、その増加とともに世界的にも問題となる多剤耐性株 (*E. coli* CTX-M15 O25:H4 b2 ST131) の出現も報告されている。また、その遺伝子は伝達可能なプラスミド遺伝子上にあるため、耐性遺伝子の伝達力も早いと考えられている。各菌種のプラスミドタイピングを実施することは、ESBL 産生遺伝子の拡散動向を知り得ると考えられる。それ故、ESBL 産生菌の疫学調査を検討した。

また、ESBL 産生菌による感染症に対して有効な抗菌薬の基礎的検討を実施することは、感染症治療に有用であると考えられる。交差耐性を示さないとされている抗菌薬の有用性や市中感染の増加による経口抗菌薬の抗菌力を検討することは、適正な抗菌薬治療に貢献できると考えられる。

本論文では、第一章に β -ラクタマーゼに関する概説、第二章に SHV 型 ESBL 産生 *E. coli* における症例報告、第三章に血液からの ESBL 産生腸内細菌の検出動向、第四章に ESBL 産生菌に対する各種抗菌薬の抗菌力比較、第 V 章に ESBL 産生菌の疫学調査研究について述べる。

第1章

β-ラクタマーゼに関する概説

1.1 β-ラクタマーゼの分類とその特徴

1.1.1 β-lactamase とは

βラクタム系薬剤がもつβラクタム環を加水分解して失活させる酵素である。β-lactamase は分子構造により大きく2つに分かれ、セリンβ-lactamase と metalloβ-lactamase に分類される。現在では遺伝子の塩基配列の相同性に基づき詳細に分類されている。Ambler の分類¹⁾でセリンβ-lactamase は ClassA、C、D に metalloβ-lactamase は ClassB に分類される。また、Bush ら²⁾機能的に分類しさらに詳細に分けられている。表1にその分類と特徴を示した。

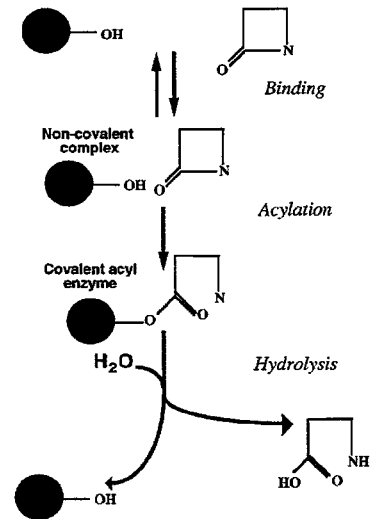


表1 βラクタマーゼの種類

βラクタマーゼの種類	Amblerの分類	Bushの分類	代表的な酵素名		分解される薬剤	阻害剤		
						CVA	2-MP	BA
セリンβラクタマーゼ 酵素の活性中心にセリン残基をもち、βラクタム環を分解する過程でアシル中間体を作成したあと加水分解する。	A	2a	PC1	B	ペニシリン系薬>セファロスポリン系薬	+		
	A	2b	TEM-1,TEM-2,SHV-1(B)	P	ペニシリン系薬=セファロスポリン系薬	+		
	A	2be	TEM-3,SHV-2,CTX-M-15,PER-1,VEB-1*** 『ESBL』	P	オキシミノ/セファロスポリン系薬の分解促進 (CTX,CAZ,CTX,CFPM,AZT)	+		
	A	2br	TEM-30,SHV-10	P	クラバン酸(CVA)、スルバクタム(SBT)、タゾバクタム(TAZ)に耐性	-		
	A	2ber	TEM-50	P	オキシミノ/セファロスポリン系薬の分解促進およびCVA、SBT、TAZIに耐性	-	-	-
	A	2c	PSE-1,CARB-3	P	カルベニシリンの加水分解促進	+		
	A	2ce	RTG-4	P	カルベニシリン、CFPM、CPRの加水分解促進	+		
	A	2c	CepA	P	セファロスポリン系を分解、CVAによる阻害を受けるがAZTによる阻害は受けない	+		
	A	2f	KPC-2(P),IMI-1(C),SME-1(C)	B	カルバペネム系薬、オキシミノ/セファロスポリン系薬、セファマイシン系薬の加水分解促進	不定		
	C	1	E.coli AmpC(B),P99(C),ACT-1(P),CMY-2(P),FOX-1(P),MIR-1(P)	B	ベンジルペニシリン<セファロスポリン系薬。セファマイシン系薬も分解	-	-	+
	C	1c	GC1,CMY-37	C	CAZおよび他のオキシミノ/セファロスポリンの分解促進	-	-	
	D	2d	OXA-1,OXA-10	P	クロキサシリン、オキサシリンの加水分解促進	不定	-	-
	D	2de	OXA-11,OXA-15	P	クロキサシリン、オキサシリン、オキシミノ/セファロスポリン系薬の加水分解促進	不定	-	-
メタロβラクタマーゼ 酵素の活性中心に亜鉛を持ち、亜鉛に結合した不安定状態の水分子がβラクタム環を加水分解する	B(サブクラスB1,B3)	3a	IMP-1,VIM-1,CerA,IND-1,Li,CAU-1,NDM-1	P	カルバペネム系薬を含む広い基質特異性を有するが、モノバクタム系薬は分解せず	-	+	-
	B(サブクラスB2)	3b	CphA,Sfh-1	C	カルバペネム系薬をよく加水分解	-	+	-

※B:Both chromosomal and plasmid C:chromosomal P:plasmid

1.1.2 ClassA β -lactamase (penicilinase)

ペニシリナーゼと呼ばれ、ペニシリン系を分解する特徴を示す。クラブラン酸やスルバクタムといった β -lactamase 阻害剤で酵素活性が阻害される。産生遺伝子は染色体性とプラスミド性がある。前者は LEN-1 や KOXY といったものであり、*Klebsiella* spp.はこの遺伝子を持っておりペニシリン系には自然耐性である。後者は TEM や SHV といったタイプのものであり、この遺伝子の変異してできたのが ESBL である。³⁾

1.1.3 ESBL とは

広い範囲の β -ラクタム薬を分解するという意味から「Extended-spectrum β -lactamase」と表記され、「ESBL」と略記されるようになった。その後の研究から、これらは、主にプラスミド依存性の TEM-1 や TEM-2、あるいは SHV-1 と呼ばれるペニシリナーゼのアミノ酸配列の一部が変異した新型の β -lactamase を産生していることが明らかとなった³⁾。ESBL は Ambler の分類では classA または classD の属する酵素群であり classB や classC に属するものは含まない。その特徴はオキシイミノ系やモノバクタム系の β ラクタム剤を効率よく分解し、その酵素活性は β -lactamase 阻害剤によって阻害を受ける。また、classC との違いは ESBL の場合セファマイシン系の β ラクタム薬を分解できないという点である。欧米では SHV 型、TEM 型といった遺伝子タイプの報告が多いのに対し、本邦では CTX-M 型といったタイプの報告が多く、検出される ESBL の分離状況が欧米とは大きく異なると考えられる⁴⁾。SHV 型、TEM 型は CTX の MIC が比較的低いが CAZ に対しては高いのに対し、CTX-M 型は CTX の MIC が高く、CAZ に対しては低く欧米で見られるタイプとは異なる。また、プラスミド性であるために全てのグラム陰性菌 (*E. coli* や *Klebsiella* spp.以外にも) に伝播することを忘れてはならない。

1.1.4 ClassB β -lactamase (metallo β -lactamase)

カルバペネマーゼと呼ばれ、モノバクタム系薬を除く β ラクタム薬を分解する特徴を示す。他の β -lactamase と違い活性中心に亜鉛を持つ。クラブラン酸やスルバクタムといった β -lactamase 阻害剤では酵素活性が阻害されず、EDTA やメルカプト化合物で阻害される⁵⁾。産生遺伝子は染色体性とプラスミド性があり、染色体性に獲得している菌種は、カルバペネム系薬剤に自然耐性となる。プラスミド性には IMP-1⁶⁾ や VIM-2⁷⁾ といった遺伝子タイプのものがあるが、耐性パターンはほぼ同様と考えられる。

1.1.5 ClassC β-lactamase (cephalosporinase)

セファロスポリナーゼと呼ばれ、ペニシリン系およびセフェム系を分解する。AmpC と呼ばれる遺伝子により制御されている。セフェム系薬剤は酵素の産生量によって MIC 値が左右されるが、第 4 世代セフェム（CFPM や CZOP）は分解されにくい。クラバン酸では阻害されないが、スルバクタムやタゾバクタムでは阻害される。産生遺伝子は染色体性とプラスミド性があり、*Klebsiella spp.*や *P.mirabilis* 以外の腸内細菌や緑膿菌は染色体上に遺伝子を持っている。プラスミド上に存在するものも確認されており⁸⁾、特に *Klebsiella spp.*では ESBL が確認されずセフェム系薬剤に耐性を示した場合には疑う必要がある。

1.1.6 ClassD β-lactamase

プラスミド上に存在し Class A と類似しているが、オキサシリンを分解する点が大きく異なる。OXA-2、10、11 などが ESBL に含まれる。また、カルバペネム系を分解する OXA23、OXA24 などが報告されている。

1.2 ESBL 検出法

1.2.1 CLSI 検出法

①方法

ディスク拡散法と微量液体希釈法を用いた検出法がある。*E. coli*、*Klebsiella spp.*、*P. milabilis* についてのみ適応される。下記表に従い判定基準を満たせば ESBL ということになる。しかし、cephalosporinase を同時に産生している株では陰性となるため注意が必要である。CLSI に準拠したディスクが栄研化学から発売されている。E-test にも同様の試薬が存在する。

表2 CLSIにおけるESBL産生菌の検出方法

培地	MHA	CAMHB
培養条件、時間	35±2℃、16-18時間、好気培養	35±2℃、16-20時間、好気培養
スクリーニング基準	<i>E.coli, K. pneumoniae, K. oxytoca</i> CPDX(10μg) : ≤17mm あるいは CAZ(30μg) : ≤22mm あるいは AZT(30μg) : ≤27mm あるいは CTX(30μg) : ≤27mm あるいは CTRX(30μg) : ≤25mm	<i>E.coli, K. pneumoniae, K. oxytoca</i> CPDX : ≥8μg/mlあるいは CAZ : ≥2μg/mlあるいは AZT : ≥2μg/mlあるいは CTX : ≥2μg/mlあるいは CTRX : ≥2μg/ml
	<i>P. mirabilis</i> CPDX(10μg) : ≤22mm あるいは CAZ(30μg) : ≤22mm あるいは CTX(30μg) : ≤27mm あるいは	<i>P. mirabilis</i> CPDX : ≥2μg/mlあるいは CAZ : ≥2μg/mlあるいは CTX : ≥2μg/ml
	CAZ(30μg)とCAZ/CVA(30/10μg) CTX(30μg)とCTX/CVA(30/10μg)	CAZ(0.25-128μg/ml)とCAZ/CVA(0.25/4-128/4μg/ml) CTX(0.25-64μg/ml)とCTX/CVA(0.25/4-64/4μg/ml)
	上記薬剤の阻止円径を測定し、CAZまたはCTX単独の阻止円径と比較してクラバン酸(CVA)の添加で5mm以上の阻止円径拡大が認められればESBLと判定する。	上記薬剤のMIC値より、CAZまたはCTX単独のMIC値と比較してクラバン酸(CVA)の添加で3管以上のMIC値の低下が認められればESBLと判定する。
精度管理株	E. coli ATCC25922 K. pneumoniae ATCC700603	
脚注(一部省略)	・P. mirabilisは臨床的に関連性がある場合に実施(例:菌血症など) ・クラバン酸含有Diskは、クラバン酸1000μg/mlを作成し、その10μlをCAZおよびCTXIに塗布することで作成可能。	

【結果解釈】

判定結果は表 2 に示した通りで、基準を満たせば ESBL となる。ESBL と判定された場合には、ペニシリン系、セファロスポリン系、モノバクタム系は耐性として報告する。オキサセフェム系やセファマイシン系は感受性がある場合は臨床効果が期待できる。

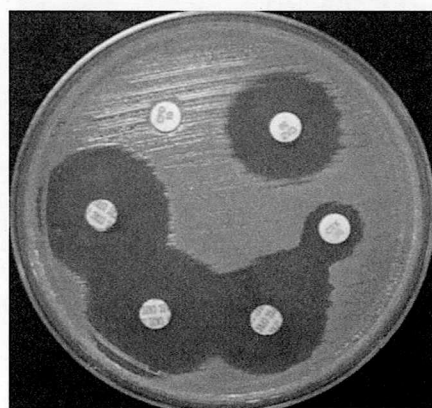
1.2.2 その他の検出法 1：栄研ディスク法

厚さ 4mm のミューラーヒントン寒天培地に Mf0.5 菌液を塗布後、それぞれのディスクを置き 35℃16-18 時間後に判定する。黒地をバックに反射光を用いて測定し、阻止円が 5mm 以上拡大すれば ESBL と判定する。

ESBL 産生 *E. coli*

CTX および CPDX で、CVA 添加で阻止円が 5mm 以上拡大していることが確認できる。1 薬剤でも阻止円が拡大すれば ESBL 産生株と判定する

CVA clavulanic acid ; CPDX, cefpodoxime

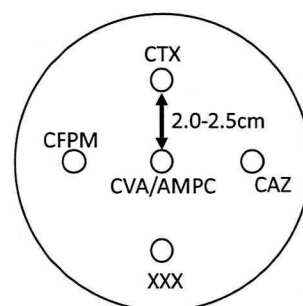


1.2.3 その他の検出法 2：Double Disk Synergy Test (DDST) 法⁹⁾

CLSI 法で使用されている薬剤に、cephalosporinase に比較的安定な第 4 世代セフェム (cefepime, cefpirome, ceftazidime) と CVA との Double Disk 法を実施し、阻止帯の形成を確認する試験である。*E. coli*、*Klebsiella* spp.、*P. mirabilis* 以外の腸内細菌からも ESBL 産生の有無を確認することが可能である。

① 方法

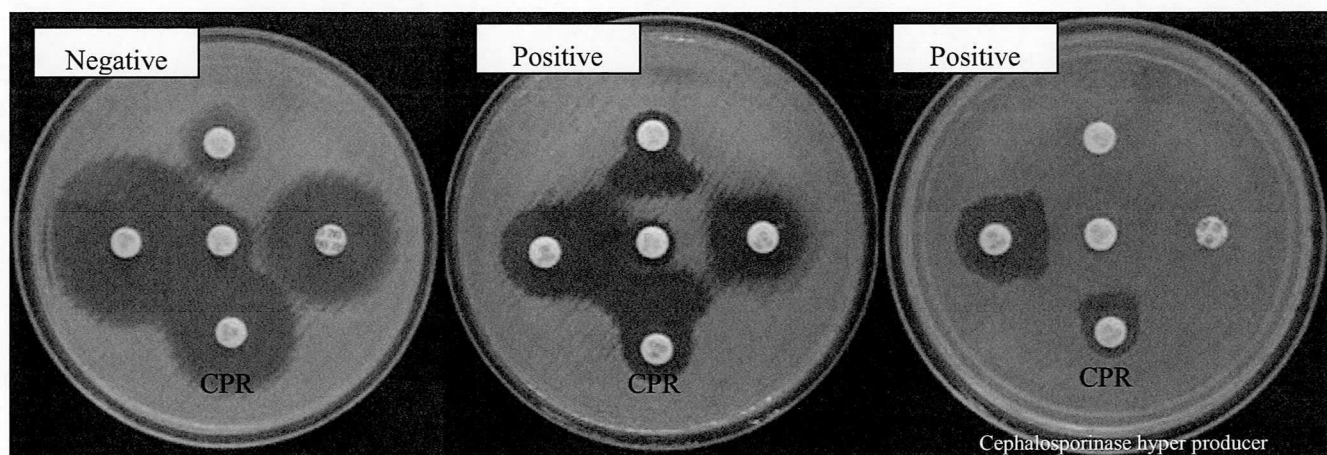
- 1) CLSI の Disk 法に準じて菌液を塗布し、右の図のように Disk を配置する。XXX の部分は *E. coli*、*Klebsiella* spp. *P. mirabilis* は cefpodoxime (CPDX) を、その他の腸内細菌は cefpirome (CPR) を置く。
- 2) Disk の距離は 2.0～2.5cm
- 3) 37℃、16-18 時間培養



CVA/AMPC: clavulanic acid/amoxicillin
CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime
CFPM: cefepime,
XXX: cefpirome or cefpodoxime

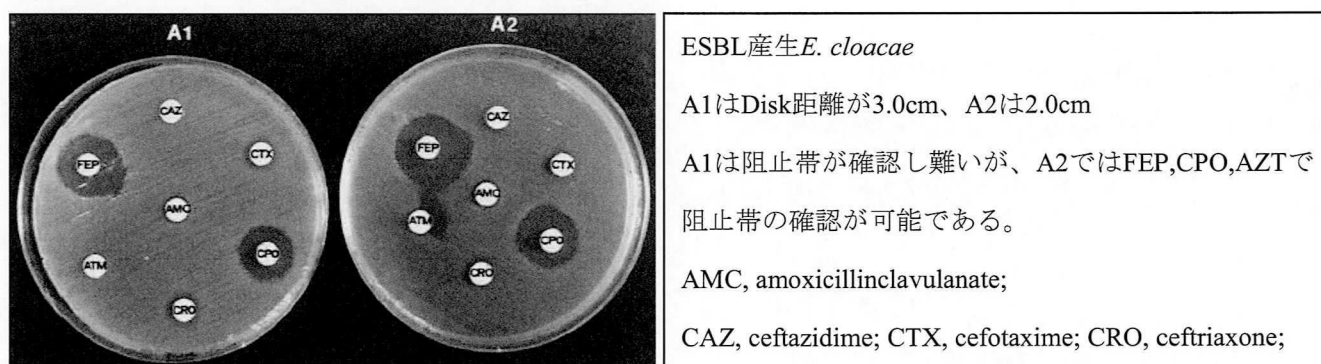
② 結果解釈

いずれかに阻止帯が形成されれば ESBL 産生株と判定。矢印の部分が阻止帯の形成された部分であり(XXX は CPR)、ESBL 産生株と判定する。一番右のプレートは CTX、CAZ では阻止帯が形成されていないため、CLSI 法では陰性と判定される株である。



③ Disk 距離による阻止帯の違い

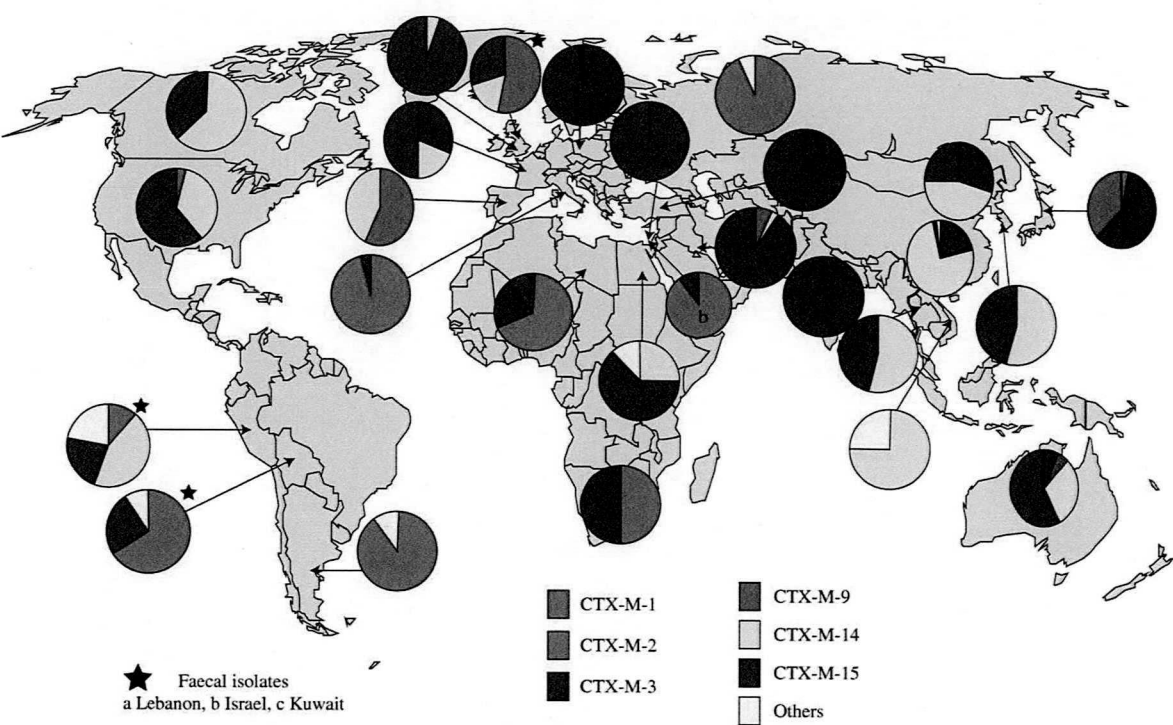
TZELEPI らの報告¹⁰⁾では、Disk 距離を 2.0cm と 3.0cm で比較している。距離が長いと検出できないケースがあるため注意が必要である。



1.3 ESBL 産生菌の世界的な検出と問題

ESBL 産生菌が発見された当初は、欧米を中心に高い検出率が見られ、特 *K. pneumoniae* による重症院内肺炎が問題であった。その遺伝子型も TEM や SHV といったいわゆる欧米型といわれる型の報告例が多く存在した。一方、日本では TOHO 型（現在の CTX-M 型）といわれる ESBL 産生菌が報告され、遺伝子型の分布においても欧米と日本では相違があった。現

在では、欧米においても外来患者由来 *E. coli* を中心に CTX-M 型が多く報告されるようになっていいる。近年、ESBL 産生菌による感染症は世界的にも増加傾向にあり、大規模サーベランスの結果から、*E. coli* の 10%、*K. pneumoniae* の 17%が ESBL 産生菌であったと報告されている。日本における ESBL 産生菌の検出率は *E. coli* や *P.mirabilis* は高いが、*K. pneumoniae* は現状では低く、世界的な動向とは若干異なると考えられる。一方で、特定のクローン CTX-M-15 O25:H4 ST131 型 *E. coli* が世界的に拡散しているという報告もあり ¹¹⁾、これらの動向を日本においても調査する必要があると考えられる。



Hawkey P M , Jones A M J. *Antimicrob. Chemother.* 2009;64:i3-i10

© The Author 2009. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

第2章

日本における SHV 型 ESBL 産生 *Escherichia coli* による 感染症例の発見

2.1 目的

Escherichia coli や *Klebsiella pneumoniae* は従来よりセフトキシム (CTX) やセフトジジム (CAZ) などのオキシイミノ系セフェム薬 (いわゆる第三世代セフェム薬) に高い感受性を示す。しかし、1980 年代から欧米を中心にこれらの薬剤に耐性を獲得した *E. coli* や *K. pneumoniae* などが出現し¹⁾、これらによる院内感染症や術後感染症が大きな問題となっている^{2,3,4)}。これらの耐性株の産生する β -ラクタマーゼは、広い範囲の β -ラクタム薬を分解するという意味から「Extended-spectrum β -lactamase」と表記され、「ESBL」と略記されるようになった⁵⁾。その後の研究から、これらは、主にプラスミド依存性の TEM-1 や TEM-2、あるいは SHV-1 と呼ばれるペニシリナーゼのアミノ酸配列の一部が変異した新型の β -ラクタマーゼを産生していることが明らかとなった⁶⁾。近年、我が国においても「ESBL 産生菌」の分離が報告されるようになった^{7,8)}。しかし、日本で検出される β -ラクタマーゼは Toho-1 型^{9,10)}が主であり、欧米で見られる TEM-由来や SHV-由来 ESBL 産生菌による感染症は、これまで報告されていない。今回、直腸腫瘍切除術後に SHV-由来 ESBL 産生 *E. coli* が関与したと考えられる術後腹腔内感染症の症例を経験、細菌学的及び遺伝子学的解析を行った。

2.2 対象と方法

2.2.1 対象

以下の症例より検出された CAZ 耐性 *E. coli* について細菌学的及び遺伝子学的解析を行った。

症例：62 歳 女性

既往歴：虫垂炎、高血圧、左白内障

現病歴：平成 10 年 12 月頃から下血を自覚するも放置。平成 11 年 3 月検診にて便潜血陽性となり近医受診後、当院受診となり、直腸腫瘍と診断される。3 月 25 日腫瘍切除術施行。全身状態もよく歩行も可能ではあった。感染症予防として CTM が投与されたが、発熱、CRP 増

加等の炎症反応が出現し、その後、術創部の縫合不全が発生し炎症反応も改善されなかったため CZOP に変更されたが、著明な感染症状の改善は認められなかった。また同時にドレナージも施行され、悪臭を伴った排膿があった。3 月 28 日には腹膜炎を併発し、3 月 29 日、術創部に膿瘍形成がみられたため、膿培養検査を行った。グラム染色像は多数のグラム陰性桿菌及びグラム陽性球菌と白血球による貪食像が認められ、培養では *E. coli*、*Bacteroides fragilis* 及び *Peptostreptococcus spp.* が検出された。また、便培養からも CAZ 耐性 *E. coli* が分離された。

術後検査所見：CRP 23.0 mg/ml と著明に上昇し、白血球数は 11,300 / μ l と高値を示した。凝固系検査及び生化学検査はいずれも基準値範囲内であった。以上の検査結果より細菌性の術後腹腔内膿瘍及び腹膜炎が考えられた。

治療経過：ドレナージによる排膿により炎症症状も改善されたため、CZOP は投与 5 日目で中止された。その後、強酸性水による数回のドレナージ洗浄を行い、白血球数、CRP も減少した。炎症症状も改善したため 4 月 15 日には人工肛門造設術が施行された。その際白血球数、CRP が増加したため CZOP が投与されたが、感染症を疑うような症状はなく経過は良好であった。経口摂取も良好で全身状態も良く、5 月 24 日退院となり現在は外来通院中である。

(Fig.1)

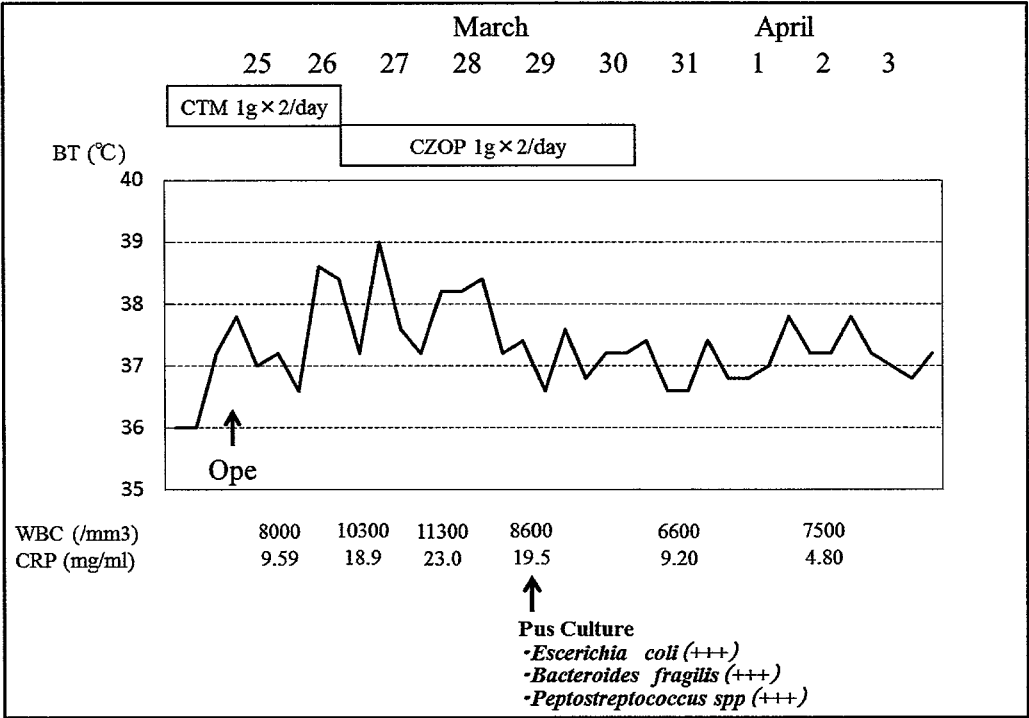


Fig 1 Clinical course

2.2.2 細菌学的検査

腹腔内の膿瘍から、定法により菌の分離・培養と同定を行った。また薬剤感受性試験はセンシディスク法（BBL）を使用し、ESBL が疑われたため、微量液体希釈法（Microscan パネル: DADE BEHRING 社を使用）を行った。さらに、CAZ 耐性の分離菌について、β-ラクタマーゼ阻害剤（クラブラン酸: CVA）を含む ACV-KB disk と CAZ-KB disk を用いた Double-Disk 試験を行った。一方、*E. coli* CSH2 を受容菌として、定法により CAZ 耐性の親株からプラスミドの接合伝達試験を行った。

2.2.3 PCR 解析の方法

CVA による阻害現象が観察されるクラス Aβ-ラクタマーゼは数種類に分けられるため、本分離菌が産生する β-ラクタマーゼの遺伝子型を特定するため、TEM-由来 ESBL 遺伝子、SHV-由来 ESBL 遺伝子、MEN-1 型 β-ラクタマーゼ遺伝子、Toho-1 型 β-ラクタマーゼ遺伝子に特異的な PCR プライマーを用いて PCR 解析を実施した。用いた PCR プライマーと PCR 反応条件を Table.1 に示す。

Table1 PCR primers and cycling parameter used for amplification		
primer	Sequence	cycling parameter
TEM	5'-CCCTGTCGCCCTTATTCC-3'	94°C 2min
	5'-AGGCACCTATCTCAGCGA-3'	↓
SHV	5'-ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC-3'	94°C 1min
	5'-TTTATGGCGTTACCTTTTGACC-3'	55°C 1min
Toho-1	5'-ACGCTACCCCTGCTATTT-3'	72°C 1.5min
	5'-CCTTTCCGCCTTCTGCTC-3'	(30 cycle)
MEN-1	5'-CGGTGCTGAAGAAAAAGTG-3'	↓
	5'-TACCCAGCGTCAGATTAC-3'	70°C 5min

2.2.4 シークエンス解析の方法

blaSHV 遺伝子の開始コドン(ATG)の上流と終始コドン(TAA)の下流に 1 対の PCR プライマーを設定し、構造遺伝子全体を含む領域を PCR 法により増幅した。増幅された DNA フラグメントに対し、6 本のシーケンス解析用 PCR プライマーを用いて dye-terminator 法により塩基配列を決定した。シーケンス解析は ABI 社の PRISMTM 377XL DNA Sequencing System を用いた。使用したプライマーセットは S1 : 5'-ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC-3'、

S2 : 5'-TTTATGGCGTTACCTTTGACC-3'、S3 : 5'-GCGGGTGGATGCCGGGTG-3'、S4 :

5'-CGGCGGGCTGGTTTATCG-3'、S5 : 5'-GTCGGCAAGGTGTTTTTC-3'、S6 : 5'-GTCGGCAAGGTGTTTTTC-3'を使用した。

2.3 結果

2.3.1 細菌学的検査

膿瘍内容物から *E. coli* などが検出された。*E. coli* のセンチディスク法での阻止円は CAZ 15mm (I), CTX 22mm (I), AZT 15mm (R), CZOP 20mm (S) であり、ESBL が疑われた。微量液体希釈法での MIC 値は ABPC >16, CEZ >16, CTM 16, CTX 32, CAZ >16, CMZ <4, AZT >16, IPM <1, CPZ/SBT <16, CPR <8, CZOP <8 であった (Table2)。Double-Disk 法の結果、CAZ-disk と ACV-disk との間に発育阻止帯の拡大が観察された (Fig.2)。以上の結果より NCCLS の ESBL 産生菌の判定基準を満たしたため、ESBL 産生菌であることが強く示唆された。また、同一患者の便からも同様の耐性パターンを示す *E. coli* が検出された。一方、接合伝達試験ではドナーと同じ CAZ に対する耐性度を示す接合体が得られたため、耐性遺伝子は伝達性プラスミド依存性であることが確認された (Table2、Fig3)。

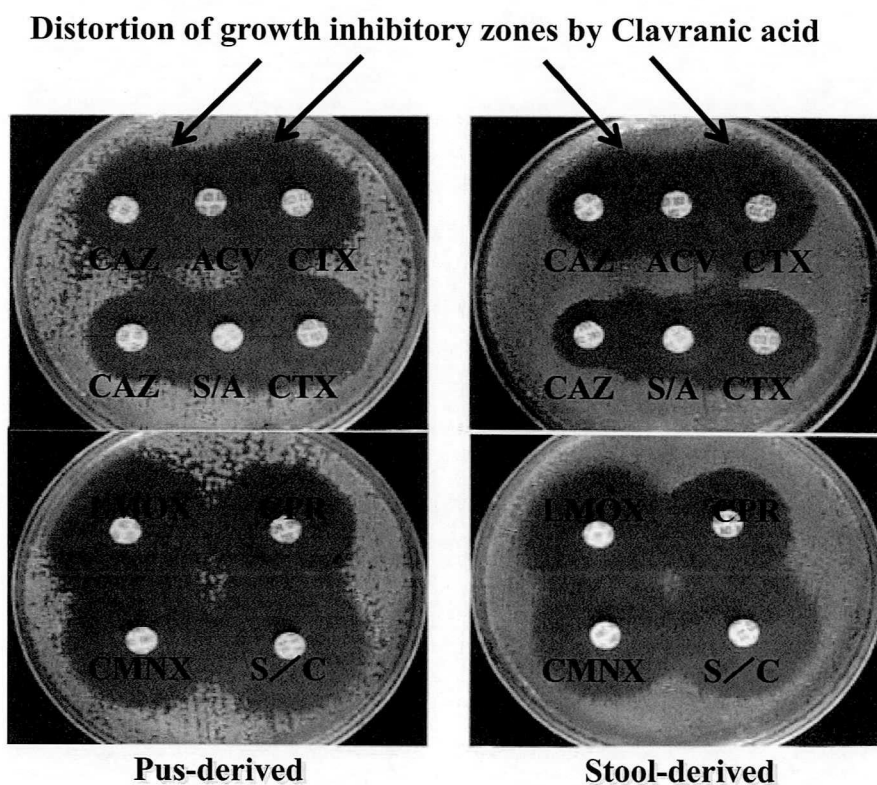


Fig2 Double-disk test of CAZ-resistant *E. coli* strains, CAZ: ceftazidime, ACV: clavulanic acid/ amoxicillin, CTX: cefotaxime, S/A: sulbactam / ampicillin LMOX: latamoxef, CPR: ceftipime, CMNX: cefminox, S/C: sulbactam / cefoperazone

Table2 Antibiotic susceptibilities of *Escherichia coli* clinical isolate and transconjugant

antibiotic	MIC(μ g/ml)		
	<i>E. coli</i> clinical isolate	<i>E. coli</i> CSH-2	transconjugant
Ampicilin	>16	≤ 2	>16
Cefazolin	>16	≤ 4	>16
Cefotiam	16	≤ 8	16
Cefotaxime	32	≤ 8	>32
Ceftazidime	>16	≤ 2	>16
Cefpirome	≤ 8	≤ 8	≤ 8
Cefmetazole	≤ 4	≤ 4	≤ 4
Aztreonam	>16	≤ 8	>16
Imipenem	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SBT/Cefoperazone	≤ 16	≤ 16	≤ 16
Cefozopran	≤ 8		

2.3.2 PCR 解析結果

SHV-由来 ESBL に特異的なプライマーを用いた場合にのみ陽性結果が得られた (Fig.5)。

2.3.3 シークエンス解析結果

両方向のシークエンス解析の結果、 β -ラクタマーゼ遺伝子のコーディング領域は、スイスで分離された *K. pneumoniae* から発見された SHV-5-2a (=SHV-12) の遺伝子 (EMBL accession No. X98105) と全く同一の塩基配列を示し、今回分離された CAZ 耐性の *E. coli* は、SHV-型 ESBL 産生菌であることが確定した (Fig.6)。

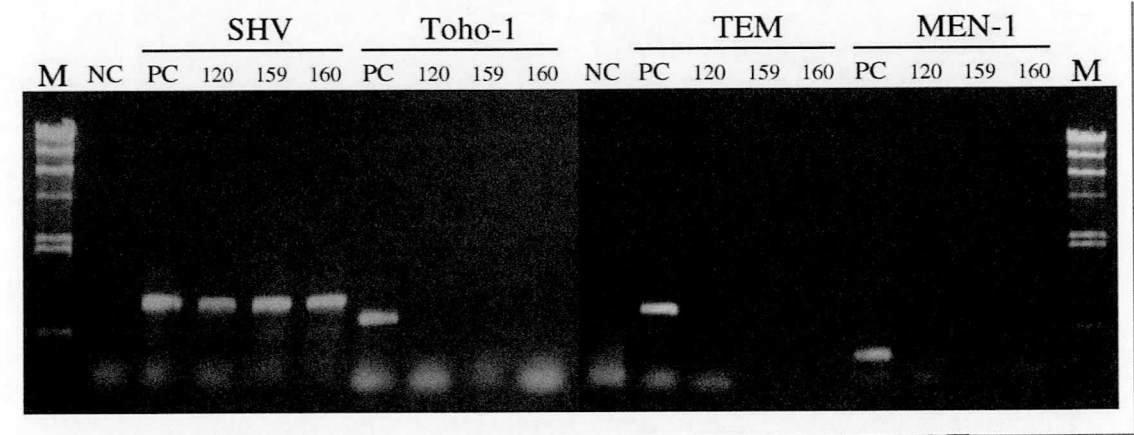


Fig 6 PCR analysis of ESBL produced gene .M, λ DNA digested with *Hind* III
PC,each positive control strain 120,159,160, CAZ-resistant *E.coli* clinical isolates.

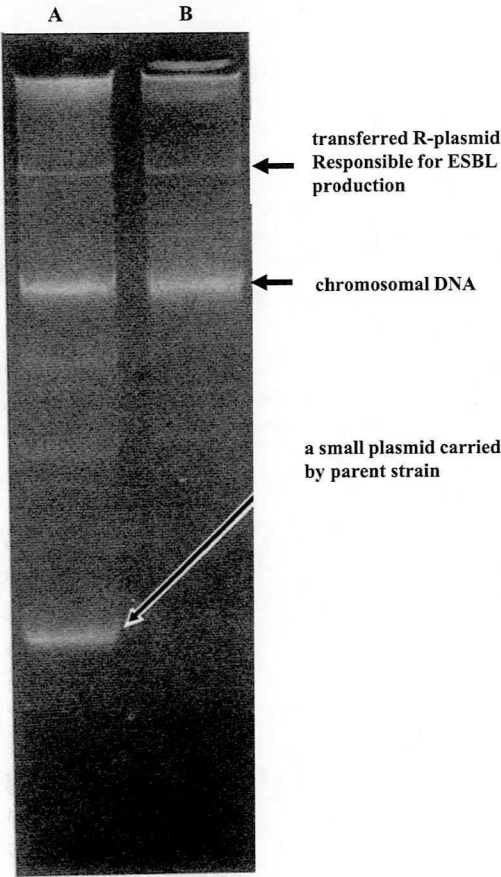


Fig 3 Large plasmid DNA from *E. coli* isolate and transconjugant. A : parent strain B : transconjugant

2.4 考察

1980年代以降、各種の「第3世代セフェム系薬」が発売され臨床で使用されてきた。その結果、腸内細菌科に属する *K. pneumoniae* などのグラム陰性桿菌による感染症が減少したように思われる場面も1980年代の一時期見られた。しかし、ESBL産生菌は1983年のKnotheらの報告¹⁾以後、ESBLを産生する *E. coli* や *K. pneumoniae* による院内感染や術後感染症が欧米各国や発展途上国を含めて世界各地から報告されるようになった。最近では、ESBLを産生する *E. coli* や *K. pneumoniae* などによる施設内の outbreak がしばしば報告され¹¹⁾、特に欧米の医療現場で深刻な問題となっている。また、欧米と類似した抗菌薬治療のプロトコルを採用している台湾、韓国などでも、以前から TEM-型や SHV-型 ESBL 産生菌が報告されている^{12, 13)}が、これらの国々と人や物資の交流の多い我が国においてこのタイプの ESBL がこれまで確認されてこなかった理由は定かではない。しかし、我が国においては、以前からセファマイシンやカルバペネムが第一線薬剤 (first line drugs) として多用されてきたため、これらの薬剤に感受性を示す「ESBL 産生菌」の増加が抑えられてきたとも考えられている。本症例では、腹部膿瘍から SHV-型 ESBL (SHV-5-2a = SHV-12) 産生菌が分離された。このタイプの ESBL 産生菌は黒川らが既に報告している^{14, 15)}が、感染症の症例報告としては今回が国内で最初のものと考えられる。

国内でも数年前から「ESBL 産生菌」の分離報告や院内感染の症例報告がみられるようになっている。しかし、それらは、Toho-1 タイプの β -ラクタマーゼ産生菌であり、欧米で問題となっている TEM 型や SHV 型の ESBL 産生菌は1998年まで確認されておらず、また、なぜ国内では CTX により高い耐性を示す Toho-1 型 β -ラクタマーゼ産生菌が主流なのか不明である。MRSA や IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の増加を防ぐため、一部の医療機関ではカルバペネムなどの使用を慎重にする動きも見られるため、今後、国内でも Toho-1 型 β -ラクタマーゼに加え TEM 型、SHV 型の ESBL 産生菌の増加が懸念されるため、細菌検査の現場では一層の注意を払う事が求められている。

今回の症例では患者の便からも同一の ESBL 産生菌が分離されたため院内感染の危険性があり、同室患者の便、尿、その他外部との接触があるような処置部の検体を用いて調査した。その結果、*E. coli* と *K. pneumoniae* については ESBL 産生を疑うような菌は幸いにも検出されなかった。今回、ESBL 産生菌による感染症であることが早期に判定され、直ちに感染対策を講じることができたために蔓延を防ぐことが可能であったと考えられる。ESBL 産生菌は、腸内細菌であり、便から検出されるケースも多いが、そのような場合、常在菌として扱われ、

感受性試験が行われないことが多い。その結果、院内感染対策が遅れ、院内環境の広範な汚染を許してしまう恐れがあり、特に ICU や血液疾患治療ユニット、移植ユニットなどではこれらを見過ごす事なく早期検出に心がける事が重要となっている。欧米では長期入院患者や ICU の患者で分離率が高く、1994 年の ICU 由来肺炎桿菌のヨーロッパでのサーベランスでは全体で 28.6% が ESBL 産生菌であったと報告されており¹⁶⁾、今後、我が国でも ESBL 産生菌の早期検出に加え抗菌薬の選択や投与方法に細心の注意が求められる事になろう。

薬剤感受性試験の結果については Toho-1 型は CTX に対して比較的耐性が高い^{8,9)}が、本菌は CTX よりもむしろ CAZ に対して高度耐性を示した。CTX-1 (=TEM-3) 産生菌は Toho-1 産生菌と同様に CTX に対しより高い耐性を示すが、CAZ-1 (=TEM-5) 産生菌は逆に CAZ に対し高い耐性を示すなど、同じ ESBL 産生菌でも種類によっては耐性パターンにかなりの相違が見られる。また NCCLS による ESBL のスクリーニングの新しい基準 (M100-S9, Vol 19 (1): 75, 1999) でも、CTX や CAZ などの MIC 値が $\geq 2\mu\text{g}$ の菌は「ESBL 産生菌」を疑う必要があるとしている。このことは β -ラクタマーゼ産生遺伝子型の種類やその発現量の違いにより薬剤に対する耐性度や耐性パターンがかなり異なるため、「ESBL 産生菌」を一元的に選択する基準が未だ確定されていないことを意味している。したがって、スクリーニング検査の段階でわずかな MIC 値の上昇や阻止円の縮小を無視したり見逃すことなく細心の注意を払うことが ESBL 産生菌の検出や分離に重要と考えられる。一方、 β -ラクタマーゼ産生の検出方法として P/C アーゼテスト (昭和薬品加工) があるが、本菌では非常に反応が弱く判定が困難であった。これは β -ラクタマーゼの基質特異性や産生量に起因すると考えられ、ESBL 産生菌の検出や判定には様々な視点からの総合的な判断が必要となっている。

本症例では術後に CTM 及び CZOP の投与により感染症症状があまり改善されなかった。このことは本感染症に ESBL 産生 *E. coli* が起炎菌の 1 つとして関与していたことを強く示唆している。また、*B. fragilis* も同時に検出されており典型的な腹腔内感染症であった。腹腔内感染症に関する発症論について中山らは二相性感染という概念を提唱している¹⁷⁾。これはまず好気性菌による感染があり感染組織内あるいは感染巣の酸化還元電位が低下することにより、嫌気性菌の感染が加わり二相性感染が成立するという考えである。このような場合、ESBL 産生菌の混合感染により産生される基質拡張型 β -ラクタマーゼにより感染巣において「第三世代セフェム薬」が分解され、ESBL 産生菌のみならず嫌気性菌など混在する感受性菌に対し十分な抗菌力が得られなくなる恐れがあると言われている。したがって、今後このような耐性菌が増加した場合、それらを念頭においた抗生剤の選択と使用が重要になってくるであろう。

う。事実、本症例で使用された CTM や CZOP がこのような理由で嫌気性菌に対し抗菌活性が十分に発揮されなかった可能性がある

本症例で検出された *E. coli* は SHV-12 産生菌であり、欧米で問題となっているのと同じ、SHV-型 ESBL 産生菌による感染症例の報告としては、今回が国内で最初のものである。これまで、国内では Toho-1 型の β -ラクタマーゼを産生する *E. coli* や *K. pneumoniae* が各地から分離されているが、今回の症例により関西地区にも SHV 型 ESBL を産生する CAZ 耐性 *E. coli* が存在することが確認された。また、隣国の韓国でも、SHV-12 が分離されている¹⁸⁾。これらの事実は、今後、我が国においても欧米と同様に TEM-型や SHV-型 ESBL 産生菌の動向に注意を払って行く必要があることを示している。しかし、ESBL 産生菌における、セファマイシンやカルバペネムの MIC は通常 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、十分抗菌活性が期待できると考えられる。したがって、ESBL 産生菌による感染症であることに早く気が着けば、適切な治療が可能な症例が多いと考えられる。しかし、ESBL 産生菌以外に AmpC 過剰産生菌、さらに IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌など様々な耐性菌が国内に混在しており、それらに対しては、セファマイシンやカルバペネム薬の効果が期待できない場合も多く、これらの耐性菌をも念頭においた、薬剤感受性試験の実施と判定、さらに抗菌薬の選択が今後ますます重要となってくるであろう。

第3章

血液から分離された腸内細菌科グラム陰性桿菌の β-ラクタム薬耐性に関する解析

3.1 目的

近年、欧米においてグラム陰性桿菌が extended spectrum β-lactamase (ESBL) や metallo-β-lactamase (MBL) など各種 β-ラクタマーゼを産生し、広域 β-ラクタム薬による治療で難渋するケースが問題となっている。また、それらの耐性菌による院内感染の報告も後を絶たない¹²³⁾。本邦においてもさまざまな耐性菌による感染症の報告例が増加し^{4,5)}、それらによる院内感染の増加が懸念されている^{6,7)}。また、腸内細菌科の薬剤耐性化は術後感染症や敗血症の治療に大きな影響をおよぼすと考えられる。*Escherichia coli* や *Klebsiella spp.* に関する報告は National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) が提案した ESBL 検出方法⁸⁾を採用し検出が比較的容易なために本邦での報告も増え、実態も明らかになりつつある。ESBL 産生遺伝子はプラスミド上に存在するため他の腸内細菌が獲得している可能性も多い。しかし、*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* 以外の腸内細菌については報告も少なく⁹⁾、分離状況や背景の調査が急がれるところである。また、MBL 産生菌については、日本では欧米に比較してカルバペネム系薬の使用ケースが多いためか耐性菌検出の報告も多い^{10,11)}。今回、1991 年から 2000 年の 10 年間に血液培養から分離された腸内細菌について薬剤感受性、ESBL および MBL 産生菌の検出状況、耐性遺伝子の有無や染色体 DNA の遺伝学的疫学解析、臨床背景の調査を行った。

3.2 対象と方法

3.2.1 対象

1991 年～2000 年の 10 年間に血液培養から分離された腸内細菌科 329 株を試験対象菌株として用い、年次ごとの検出率などを解析した。同定は VITEK GNI カード（バイオメリュー）を用いた。

3.2.2 薬剤感受性試験

分離された 329 株について、NCCLS 標準法⁸⁾に準拠した微量液体希釈法（フローズンプレート栄研）にて最小発育阻止濃度（MIC）を測定し、薬剤ごとに MIC50, MIC80 および MIC90 を算出した。また、各菌種ごとに各薬剤の耐性率も算出した。測定薬剤は piperacillin (PIPC), aztreonam (AZT), cefpodoxime (CPDX), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (CFPM), cefpirome (CPR), meropenem (MEPM), imipenem (IPM), panipenem (PAPM), sulbactam/cefoperazone (SBT / CPZ), amikacin (AMK), ciprofloxacin (CPFX) である。

3.2.3 ESBL および MBL 産生菌の検出および遺伝子型

薬剤感受性試験にて *E. coli* および *Klebsiella* spp. については NCCLS の検出指針の基準を満たしたものを、その他の腸内細菌については CAZ または CTX の MIC が 16 μ g/mL 以上を示した株について、double-disk synergy test (DDST)¹²⁾を用いて ESBLs 産生菌の検出を行った。DDST は NCCLS の方法⁸⁾にしたがいミューラーヒントン培地に MacFarland 0.5 の菌液を 0.1mL 綿棒で塗布し amoxicillin/clavulanic acid (AMPC/CVA) disk と CPDX, CTX, CAZ, CPR, CFPM それぞれの間が 25 mm になるようにディスク（センシディスク: BBL）を配置し、35℃、一夜培養後にいずれかの薬剤でクラブラン酸による阻害効果の認められたものを陽性とした。陽性株は PCR 法により TEM, SHV 型および CTX-M group (CTX-M 1/3, CTX-M 2, CTX-M 9) に型別した 13)。MBL 産生菌の検出は、荒川ら¹⁴⁾が考案したメルカプト化合物を用いた阻害試験を使用した。検査法は NCCLS の方法にしたがいミューラーヒントン培地に MacFarland 0.5 の菌液を 0.1 mL 綿棒で塗布し、メタロ- β -ラクタマーゼ SMA ディスク“栄研”を用いて、おのおの CAZ または IPM ディスク周辺の発育阻止帯の変化を観察し、MBL の産生性の有無を識別した。陽性株は PCR 法により IMP-1 型について遺伝子の検出を行った¹⁵⁾。

3.2.4 Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) による疫学解析

分離された ESBL 産生菌の遺伝的疫学解析を AP-PCR 法を用いて行った。*Enterobacter cloacae* に関しては 9 症例 10 株（複数回検出患者では 2 株を解析）を対象とした。使用プライマーは *K. pneumoniae*, *E. cloacae* は ERIC 2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')¹⁶⁾を、*Serratia marcescens* は Hejajy らの方法¹⁷⁾にしたがい、HLWL-74 (5'-CGTCTATGCA-3')

および 1254 (5'-AACCCACGCC-3') の混合プライマーを使用した。テンプレート DNA は LB ブロスにて 24 時間培養した菌液を 12, 000 rpm 5 分間遠心した沈渣から抽出した。DNA の抽出は定法にしたがい、エタノール

・クロロホルム処理法で行った。反応試薬は TakaraTaq を使用し、Mg2+濃度は 3 mM で増幅を行った。増幅産物は、12.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用い銀染色により確認した。同一パターン株の因果関係解析は、カルテ調査により入院歴、主治医、前医などで患者間もしくは病院スタッフによる接触の有無について検討を行った。

3.2.5 ESBL および MBL 産生菌検出患者の臨床背景

ESBL 産生菌および MBL 産生菌が検出された患者について、患者情報（年齢、性、基礎疾患、デバイスの有無）、投与薬剤、予後などについてカルテ調査を行った。

3.3 結果

3.3.1 各菌種の年次ごとの検出率

1991 年から 2000 年の 10 年間に分離された腸内細菌は総検出株数 3, 049 株中、329 株（10.8%）であった。年次ごとの検出率は 1999 年および 2000 年では 15%を越え近年増加傾向にあった（Table 1）。

Table 1. Detection of Enterobacteriaceae isolated from blood cultures (1991–2000)											
Year	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	Total
Total no. of strains	193	266	282	326	323	405	384	222	313	335	3,049
Enterobacteriaceae no. of strains (%)	13	22	23	53	24	34	34	22	49	55	329 (10.8)
<i>E. coli</i>	5	6	3	13	6	5	11	3	14	19	85
<i>K. pneumoniae</i>	1	3	5	9	8	13	7	8	8	14	76
<i>K. oxytoca</i>	0	1	3	2	1	1	2	0	4	0	14
<i>E. cloacae</i>	3	4	4	12	3	8	5	1	14	12	66
<i>E. aerogenes</i>	1	2	3	4	0	1	3	1	1	2	18
<i>C. freundii</i>	0	1	1	7	0	0	0	1	0	2	12
<i>P. mirabilis</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	4
<i>M. morganii</i>	0	0	0	2	2	2	1	1	0	3	11
<i>S. marcescens</i>	3	5	4	4	3	3	4	6	8	3	43

3.3.2 薬剤感受性検査成績

腸内細菌主要 5 菌種と合計の MIC50, MIC80 および MIC90 の成績を Table 2 に示した。*E. coli*, *K. pneumoniae* では第 3 世代以降のセフェムやカルバペネムの MIC90 が 0.5μg/mL 以下と良好な感受性を示した。*E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *S. marcescens* では第 3 世代セフェムはやや劣るものの第 4 世代薬やカルバペネム系薬は比較的良好であった。*S.*

marcescens に関してはカルバペネム系薬で MIC90 が 8 μ g/mL と高い値を示したが、これは MBL 産生菌が存在したためである。全体では MEPM がもっとも低い MIC90 を示し、0.12 μ g/mL 以下であった。菌種ごとの各薬剤に対する耐性率を Table 3 に示した。ESBL 検出における基準的薬剤である CAZ の耐性率を比較するともっとも高値であったのが *E. cloacae* で 51.5% であった。次いで *C. freundii* の 50.0% であった。*E. coli*, *K. oxytoca* および *Proteus mirabilis* については耐性菌は存在しなかった。*E. coli* で CPDX 耐性が 7.1% あったが、これはクラス C β -ラクタマーゼの過剰産生によるものであった。全体ではカルバペネム系薬がもっとも低く IPM で 1.2%, MEPM で 1.5% であった。また、 β -ラクタム薬以外の薬剤では AMK で 3.0%, CPFX で 11.9% 耐性であった。

Table 2. Antimicrobial activity of agents in 329 strains of Enterobacteriaceae detected in blood cultures between 1991 and 2000

Organism (no. of isolates)	MIC 50/80/90	MICs (μ g/mL)												
		PIPC	CPDX	S/C	AZT	CTX	CAZ	CFPM	CPR	MEPM	IPM	PAPM	AMK	CPFX
<i>E. coli</i> (85)	50	≤ 8	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	2	≤ 0.25
	80	≤ 8	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	4	≤ 0.25
	90	16	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	4	1
<i>K. pneumoniae</i> (76)	50	≤ 8	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	2	≤ 0.25
	80	≤ 8	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	0.25	0.25	2	≤ 0.25
	90	≤ 8	≤ 1	1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	0.25	0.25	2	≤ 0.25
<i>E. cloacae</i> (66)	50	≤ 8	>4	8	4	32	8	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	0.5	0.5	1	≤ 0.25
	80	>128	>4	32	64	>64	>64	16	32	≤ 0.12	1	0.5	2	1
	90	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	>64	0.25	1	1	2	2
<i>S. marcescens</i> (43)	50	≤ 8	>4	4	1	4	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	1	0.5	8	0.25
	80	128	>4	>64	32	>64	>64	64	>64	4	2	4	32	16
	90	>128	>4	>64	64	>64	>64	>64	>64	8	4	8	64	>16
<i>C. freundii</i> (12)	50	≤ 8	>4	1	1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	0.25	0.25	2	≤ 0.25
	80	128	>4	16	64	64	>64	1	2	≤ 0.12	0.5	0.25	2	≤ 0.25
	90	>128	>4	32	64	64	>64	2	4	≤ 0.12	0.5	0.5	2	1
All strains (329)	50	≤ 8	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	2	≤ 0.25
	80	32	>4	8	4	16	8	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	0.5	0.5	2	≤ 0.25
	90	>128	>4	32	64	>64	>64	8	16	≤ 0.12	1	1	4	2

PIPC: piperacillin, CPDX: cefpodoxime, S/C: sulbactam/cefoperazone, AZT: aztreonam, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, CPR: ceftiofime, MEPM: meropenem, IPM: imipenem, PAPM: panipenem, AMK: amikacin, CPFX: ciprofloxacin

Table 3. Antibiotic tolerance

Organism (no. of isolates)	No. of strains of intermediate and resistant ^a (%)									
	PIPC	CPDX	AZT	CTX	CAZ	CFPM	MEPM	IPM	AMK	CPFX
<i>E. coli</i> (85)	5 (5.8)	6 (7.1)	0	0	0	0	0	0	0	6 (7.1)
<i>K. pneumoniae</i> (76)	3 (3.9)	3 (3.9)	1 (1.3)	2 (2.6)	1 (1.3)	1 (1.3)	0	0	0	0
<i>K. oxytoca</i> (14)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i> (66)	30 (45.4)	46 (69.7)	33 (50.0)	36 (54.5)	34 (51.5)	15 (22.7)	0	0	0	12 (18.2)
<i>E. aerogenes</i> (18)	7 (38.9)	6 (33.3)	3 (16.7)	4 (22.2)	5 (27.7)	0	0	0	0	0
<i>C. freundii</i> (12)	6 (50.0)	8 (66.7)	6 (50.0)	6 (50.0)	6 (50.0)	1 (8.3)	0	0	0	2 (16.7)
<i>P. mirabilis</i> (4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. morgani</i> (11)	5 (45.4)	6 (54.5)	0	1 (9.1)	1 (9.1)	0	0	0	0	0
<i>S. marcescens</i> (43)	17 (39.5)	28 (65.1)	12 (27.9)	21 (48.8)	14 (32.5)	12 (27.9)	5 (11.6)	4 (9.3)	10 (23.3)	19 (44.2)
All (329)	73 (22.2)	102 (31.0)	55 (16.7)	70 (21.3)	61 (18.5)	28 (8.5)	5 (1.5)	4 (1.2)	10 (3.0)	39 (11.9)

^aStrains of intermediate and resistant were defined according to NCCLS criteria

PIPC: piperacillin, CPDX: cefpodoxime, CTX: cefotaxime, AZT: aztreonam, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, MEPM: meropenem, AMK: amikacin, CPFX: ciprofloxacin

3.3.3 ESBL および MBL 産生菌の検出および遺伝子型

DDST および 2-MP 法に陽性を示した株数 (%) を Table 4 に、遺伝子型とその MIC 測定結果を Table 5 に示した。NCCLS の ESBL 検出の基準を満たした *E. coli* および *Klebsiella* spp. は 9 株 (2.7%), その他の腸内細菌で基準を満たした株は 70 株 (21.3%), 合計 79 株 (24.0%) であり, そのうち DDST 陽性が 19 株 (5.7%) であった。菌種別では *E. cloacae* 15 株, *K. pneumoniae* 3 株, *C. freundii* 1 株であった。遺伝子型は CTX-M 1/3 型が 19 株中 18 株で検出された。詳細は *E. cloacae*, *C. freundii* ではすべて CTX-M 1/3 型で, *K. pneumoniae* は TEM 型, SHV 型, CTX-M 1/3 型の 3 種類が検出されたものが 2 株, SHV 型が 1 株であった。ESBL 産生菌ではセフェム系薬剤は全体に MIC 値が高値を示したが, カルバペネム系薬剤は低く, なかでも MEPM がもっとも低値を示した。その他では AMK 耐性が 1 株, CPFX 耐性が 7 株存在した。2-MP 法陽性株は *S. marcescens* で 5 株 (1.5%) 検出された。遺伝子型は 5 株すべて IMP-1 型であった。セフェム系薬剤は AZT 以外の MIC 値は高値を示した。また, IPM に感受性を示した株が 1 株存在した。検出年次は ESBL 産生菌および MBL 産生菌ともに 1996 年以降に多く, 24 株中 22 株が検出された。また, 1991 年検出の *K. pneumoniae* で SHV 型 ESBL 産生菌の存在が確認された。

Table 4. Strains indicated rather than extraction conditions^{a)} for DDST and 2-MP procedures

	Total no. strains (%)	No. of DDST ^{b)} -positive (%)	No. of 2-MP-positive (%)
<i>E. coli</i> (85)	6 (7.1)	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (76)	3 (3.9)	3 (3.9)	0
<i>K. oxytoca</i> (14)	0	0	0
<i>E. cloacae</i> (66)	36 (54.5)	15 (22.7)	0
<i>E. aerogenes</i> (18)	6 (33.3)	0	0
<i>C. freundii</i> (12)	6 (50.0)	1 (8.3)	0
<i>P. mirabilis</i> (4)	0	0	0
<i>M. morganii</i> (11)	1 (9.1)	0	0
<i>S. marcescens</i> (43)	21 (48.8)	0	5 (11.6)
All (329)	79 (24.0)	19 (5.7)	5 (1.5)

^{a)} *E. coli* and *Klebsiella* spp.: rather than 2 µg/mL of MIC of cefpodoxime, others Enterobacteriaceae: rather than 16 µg/mL of MIC of ceftadime and/or cefotaxime

^{b)} DDST: double-disk synergy test

^{c)} 2-MP: Inhibitory effects of 2-mercaptopropionic acid

Table 5. MICs and β -lactamase gene types of DDST and 2-MP positive strains

Case no.	Organism	β -lactamase gene	MICs ($\mu\text{g/mL}$)												
			PIPC	CPDX	S/C	AZT	CTX	CAZ	CFPM	CPR	MEPM	IPM	PAPM	AMK	CPFX
207	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	64	≤ 0.12	0.5	0.5	2	1
208	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	32	>64	>64	>64	32	>64	≤ 0.12	0.5	1	1	2
209	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	32	>64	>64	>64	32	64	0.25	1	0.5	1	1
210	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	32	64	>64	>64	64	>64	0.25	0.5	0.5	1	1
212	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	64	>64	0.5	1	1	1	2
216	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	64	>64	64	64	>64	0.25	0.5	1	≤ 0.5	>16
218	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	>64	>64	0.25	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.5	>16
226	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	>64	≤ 0.12	0.5	0.5	1	2
230	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	>64	≤ 0.12	0.5	0.5	1	4
231	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	64	>64	>64	32	64	≤ 0.12	0.5	0.5	1	4
232	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	32	>64	≤ 0.12	0.25	0.25	1	4
233	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	>64	>64	>64	64	>64	≤ 0.12	0.5	0.5	1	4
235	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	32	>64	>64	>64	16	32	≤ 0.12	1	0.25	1	2
236	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	64	64	>64	>64	64	>64	0.5	1	1	2	4
241	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	>128	>4	16	32	>64	64	8	16	≤ 0.12	0.5	0.25	1	≤ 0.25
109	<i>K. pneumoniae</i>	TEM, SHV, CTX-M 1/3	128	>4	16	8	>64	8	4	16	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	1	≤ 0.25
136	<i>K. pneumoniae</i>	TEM, SHV, CTX-M 1/3	>128	>4	64	64	32	8	16	32	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	1	≤ 0.25
247	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	128	2	1	1	≤ 0.5	16	2	4	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	1	≤ 0.25
280	<i>C. freundii</i>	TEM, CTX-M 1/3	>128	>4	32	32	64	8	16	64	≤ 0.12	1	1	32	2
318	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	128	>4	>64	8	>64	>64	>64	>64	16	16	16	8	>16
320	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	>128	>4	>64	8	>64	>64	64	>64	16	8	>16	8	>16
327	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	128	>4	>64	8	>64	>64	64	64	8	4	8	4	>16
336	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	≤ 8	>4	>64	8	>64	>64	>64	>64	16	8	8	8	4
339	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	≤ 8	>4	>64	8	>64	>64	>64	>64	16	16	>16	8	2

PIPC: piperacillin, CPDX: cefpodoxime, S/C: sulbactam/cefoparazone, AZT: aztreonam, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, CPR: cefpirome, MEPM: meropenem, IPM: imipenem, PAPM: panipenem, AMK: amikacin, CPFX: ciprofloxacin

Table 6. Information on patients infected by ESBL and MBL producing organisms

Case no.	Organism	β -lactamase gene	Detected year	Age	Underlined disease ^a	Antibiotics		Clinical effect	Simultaneous detection	Prognosis
						before	after			
207	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1996	74	Stevens-Johnson syndrome	CAZ, IPM	IPM→PAPM→S/C→LMOX →PIPC→CFPM	unknown	MRSA, <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	poor (septic shock)
216	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1997	33	acute lymphocytic leukemia	CPFX, FLCZ	AZT, CLDM→AMK, CLDM	good	—	good
218	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1997	69	hypoplastic leukemia	CPFX, FLCZ	PAPM→CPR	good	MSSA	good
226	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1999	83	acute cholecystitis	no therapy	CFPM→PAPM	good	—	good
230	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1999	5	acute myelocytic leukemia	CAZ, TEIC	CAZ, TEIC	poor	MRSA, <i>C. albicans</i>	poor (septic shock)
231	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	1999	63	myocardial infarction	no therapy	PIPC→GM	good	—	good
235	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	2000	79	renal failure	CPR, MINO	MINO→PAPM	poor	—	poor (septic shock)
236	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	2000	71	aortic dissection	TEIC	TEIC	unknown	MRSA	good
241	<i>E. cloacae</i>	CTX-M 1/3	2000	77	gastric cancer	CTM, PAPM	PAPM	good	—	good
109	<i>K. pneumoniae</i>	TEM, SHV, CTX-M 1/3	1995	70	intracerebral bleeding	CAZ, AMPC	CAZ	good	—	poor (septic shock)
136	<i>K. pneumoniae</i>	TEM, SHV, CTX-M 1/3	1998	47	neck tumor	no therapy	IPM→CAZ	good	—	good
247	<i>K. pneumoniae</i>	SHV	1991	0	ARDS	ABPC, TOB	CTX, TOB	good	—	good
280	<i>C. freundii</i>	TEM, CTX-M 1/3	2000	49	brain tumor	no therapy	AMPC→CAZ	poor	—	poor (septic shock)
318	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	1996	66	hepatic cirrhosis polycythemia	CFPM	PAPM→AZT	good	—	good
320	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	1997	71	acute renal failure	PIPC	PIPC	unknown	—	poor (heart failure)
327	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	1998	2	head injury	CTM	CAZ→AZT	good	—	good
336	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	1999	52	spinal cord injury	CTM	FMOX	poor	—	poor (septic shock)
339	<i>S. marcescens</i>	IMP-1	2000	51	chronic renal failure (renal transplantation)	CMZ	GM	good	—	poor (renal failure)

^aARDS: acute respiratory distress syndrome

CAZ: ceftazidime, IPM: imipenem, PAPM: panipenem, S/C: sulbactam/cefoparazone, LMOX: latamoxef, PIPC: piperacillin, CFPM: cefepime, CPFX: ciprofloxacin, FLCZ: fluconazole, AZT: aztreonam, CLDM: clindamycin, AMK: amikacin, CPR: cefpirome, TEIC: teicoplanin, GM: gentamicin, MINO: minocycline, CTM: cefotiam, AMPC: amoxicillin, ABPC: ampicillin, TOB: tobramycin, CTX: cefotaxime, FMOX: flomoxel, CMZ: cefmetazole

3.3.4 疫学解析結果

AP-PCR 法を用いた疫学解析結果を Fig. 1 に示した。ESBL 産生 *E. cloacae* では No.207, 208, 226 と No.230, 236 がそれぞれ同一パターンを示した以外は異なるパターンを示した。No.207, 208 は同一患者由来株であった。しかし、No.207, 208 と No.226 については患者間もしくはスタッフによる接触の関連性は認められなかった。また、No.230 と No.236 の関連性も同様に認められなかった。ESBL 産生 *K. pneumoniae* では 3 株ともに違うパターンであった。MBL 産生 *S. marcescens* では 1996 年から 1998 年にかけて検出された No.318, 320, 327 が同一の電気泳動パターンを示し、1999 年、2000 年分離株の No.336, 339 が同一のパターンを示した。No.318, 320, 327, 336 が同一の病棟から検出され、院内感染を示唆する結果であった。

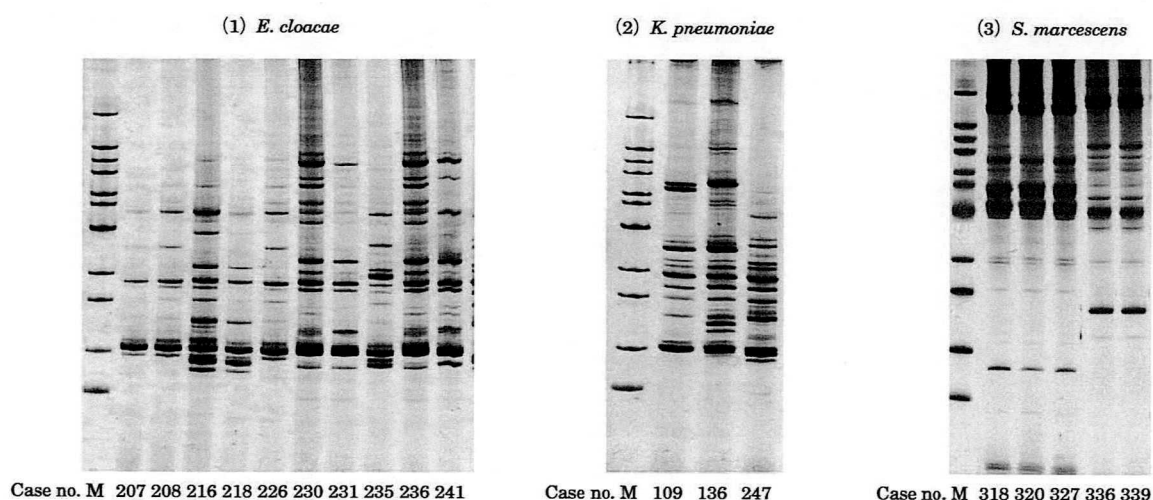


Fig. 1. AP-PCR patterns of ESBL producing *Enterobacter cloacae* (1), *Klebsiella pneumoniae* (2) and MBL producing *Serratia marcescens* (3). Lane: M, 100 bp ladder molecular weight marker. Others lanes: Correspond to strain number listed in Table 6.

3.3.5 臨床背景調査結果

臨床背景調査が可能であった ESBL 産生菌検出患者 13 例および MBL 産生菌検出患者 5 例についての結果を Table 6 に示した。ESBL 検出患者では全例入院患者で、年齢は小児が 2 例、60 歳以上は 8 例であった。基礎疾患は悪性腫瘍や脳血管障害といった比較的重症例が多く、全例で IVH カテーテルが挿入されていた。患者に対する処置では導尿が 8 例、手術 5 例、抗癌剤 5 例、気管挿管 6 例、輸血 7 例であった。血液培養にて検出された菌に対して積極的に治療されたのは 12 例で 1 例は未治療であった。敗血症発症以前に何らかの抗菌薬が投与されていたのは 9 例で、血液疾患治療での予防投与や他の菌種に対する治療がほとんどであった。発症後はグラム陰性菌に対して有効性の高いと考えられる薬剤が選択的に投与され

ているが、全例で抗生剤の変更や追加がなされていた。13 例中治療効果が認められたものが 8 例であった。治療効果が認められた薬剤はカルバペネム系薬 3 例 (PAPM 3 例)、アミノ配糖体 3 例 (AMK, gentamicin, tobramycin)、第 3 世代セフェム 2 例 (CAZ2 例) であった。第 3 世代セフェムが有効であった 2 例 (No.109, No.136) は CTX-M 1/3 型の *K. pneumoniae* で、CAZ の MIC が 8 μ g/mL であった。2 例では治療に失敗しているが、1 症例 (No.235) は minocycline が使用されたものの耐性であり、もう 1 症例 (No.280) は CAZ に対する MIC 値が 8 μ g/mL であったものの治療効果が認められなかった症例であった。血液疾患の 2 例 (No.216, No.218) では骨髄移植後の感染予防に CPFX が投与されていたが、検出された菌の CPFX の感受性は耐性であり、腸管からの translocation によるものと考えられた。MBL が検出された患者の臨床背景は 4 例が高度救命救急センター/ICU より分離されたものであり、基礎疾患は外傷や脳血管障害など高度の重症例であった。また、もう 1 例は中国での腎移植後患者で GVHD が出現し当院にて治療を行った患者であった。導尿カテーテルなどのメディカルデバイスは 5 例ともに使用されていた。使用薬剤は菌検出前に全例とも β -ラクタム薬が投与されていた。使用薬剤の有効性については、AZT が投与された 2 例では菌が消失しており、本剤の MBL 産生株に対する有効性が示唆された。PIPC 投与例についても菌が陰性化しているが抗生剤が長期投与され血液培養も長期間提出されず効果の判定には至らなかった。腎移植患者ではアミノ配糖体 (GM) が単剤で投与され菌の陰性化が認められた。Cefotiam および flomoxef 投与例ではエンドトキシンショックにより死亡しており治療効果が認められなかった。

3.4 考察

近年、広域スペクトラムセフェム系薬剤やカルバペネム系薬剤の使用増加に伴い、耐性菌の蔓延が問題視されている。グラム陰性菌の薬剤耐性化は敗血症や下部消化管術後感染症に対する治療や予後に大きな影響をおよぼすため、耐性化の状況を正確に把握しておく必要があると考えられる。今回の調査で *E. coli*, *K. pneumoniae* ではセフェム系薬剤やカルバペネム系薬剤は良好な感受性を示した一方で、*E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens* ではセフェム系薬剤に関しては MIC₉₀ が 64 μ g/mL 以上を示す薬剤も存在した。本来、この種の腸内細菌は染色体性のクラス C β -ラクタマーゼを産生するため、セフェム系薬剤には耐性を示す場合が多い。しかし、第 3 世代以降の薬剤に関して本来はクラス C β -ラクタマーゼに比較的安定に作られているが、産生量の増加や ESBL 産生菌に対しては効果が期待できない可能性が高

い。今回の調査では、*E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens* でクラス C β -ラクタマーゼ産生量増加や ESBL 産生菌が存在し、今後セフェム系薬剤のさらなる耐性化が懸念される結果であった。そのなかで、耐性率が低かったのはカルバペネム系やアミノ配糖体であった。特に MEPM に関しては MIC₉₀ も 0.12 μ g/mL 以下と低値であり、グラム陰性桿菌の感染症ではもっとも治療効果が期待できる薬剤のひとつであると考えられる。ただし、MBL 産生菌には効果が期待できないために、アミノ配糖体系薬やニューキノロン系薬、またはモノバクタム系の薬剤を選択することになる。各種 β -ラクタマーゼの検出には、ESBL 産生菌には Jarlier ら¹²⁾が報告した DDST を、MBL 産生菌には Arakawa ら¹⁴⁾が報告した 2-メルカプトプロピオン酸を用いた検出法を行ったが、両方法ともに PCR を用いた遺伝子検出を必要とせず、日常検査において各種耐性機序を判断する上で有用であると考えられた。このような検出方法を各検査室が確立しておくことは、治療薬剤の適正な選択のみならず院内での耐性菌の動向などの疫学情報や、早期の院内感染対策にも役立つと思われる。ESBL 産生菌の分離率は 329 株中 19 株 (5.7%) であった。ESBL 産生菌の検出率に関する調査は多く報告されており、その検出率はさまざまであるが^{19,20,21)}血液培養からの報告はない。われわれの調査では血液培養のみの調査で 5.7% と比較的高率であり、腸内細菌科全般に遺伝子が拡散され、それが血液からも分離されることが明らかとなった。遺伝子型は 19 株中 18 株が CTX-M

タイプを保有しており、他の報告⁹⁾同様に本邦でもっとも多く検出されているタイプが多かった。MBL 産生菌では *S. marcescens* のみで分離され、5 株 1.4% であった。すべて IMP-1 タイプを保有している結果であった。他の菌種では検出されなかったが、腸内細菌科全般に広がっていることが確認されており注意が必要であると考えられる。ESBL の存在は 1983 年に Knoche らの報告²²⁾以後、世界各地から検出の報告があるが、当院においても 1991 年には *K. pneumoniae* で SHV 型の ESBL 産生遺伝子を獲得している菌が検出され、本邦においてもこのころには ESBL 産生菌が存在した結果であった。当院において 1996 年以降には ESBL および MBL 産生菌の検出が多くなったが、このころから本邦においても検出の報告が増え、この時期を境に増加に転じた可能性が示唆された。疫学的解析においては ESBL 産生 *E. cloacae* では同一パターンを示す株も存在したが関連性は解明できなかった。しかし、尿から分離された菌について行った調査²³⁾では同一病棟で同一のパターンを示した株が存在し、病棟での蔓延が示唆される結果を報告している。今回の調査では関連性は確定できなかったが、病院内で拡散している可能性も示唆されるため院内感染には注意が必要である。また、MBL 産生 *S. marcescens* では 1996, 1997, 1998 年の 3 株と 1999, 2000 年の 2 株がそれぞれ同一

パターンを示した。1996, 1997, 1998 年の 3 株は同一病棟であり、病棟に長期にわたり定着していた可能性が示唆された。1999, 2000 年の 2 株は病棟も異なるため、このころより院内全体に広がっていった可能性を示唆した。検出後の対応がその後の耐性菌の蔓延を左右すると考えられたため、やはり早期の対策を行うことが重要である。この種の耐性菌に対する疫学解析の報告においてはさまざまな方法を用いて調査されているが、R プラスミドによるものと院内感染によるもの両方の報告があり、両伝播形式を通じて臨床材料からの検出率が上昇する可能性が高いと考えられる。Pulsed field gel electrophoresis では結果が判明するまでに 3~4 日かかるためアウトブレイクに対する迅速な対応ができないが、今回用いた AP-PCR 法では約 1 日で結果が判明するため迅速対応が可能であり、日常でのアウトブレイクの対応には有用であると思われる。菌種によっては識別が困難であるという報告^{24,25)}もあるが、PCR 用試薬や反応プログラム、増幅装置の違いにより結果が左右されるため、自施設で由来の違う菌株にてコントロールをとってさえいれば使用可能で問題がないと考えられる。臨床背景調査では、ESBL および MBL 産生菌検出患者において、基礎疾患は悪性腫瘍や脳血管障害などの比較的重症例が多く、全例で IVH カテーテルが挿入されていた。このことは長期に入院することで、さまざまな治療や抗菌薬の使用により、MRSA や緑膿菌と同様に耐性菌の定着が起こることが示唆される結果であった。実際、敗血症発症以前に何らかの抗菌薬が投与されており、ほとんどが予防投与やこの種の耐性菌に無効な薬剤であり、抗菌薬投与により耐性株が残存した結果であると考えられる。ESBL 感染症に関する治療薬剤は ESBL の基質特異性からカルバペネム系やセファマイシン系の薬剤もしくは β -ラクタム系以外の薬剤が第 1 選択剤と考えられるが、今回の調査ではカルバペネム系やアミノ配糖体の投与で改善されていた。しかし、2 例で CAZ が投与され改善している。このときの CAZ の MIC 値は $8\mu\text{g}/\text{mL}$ であり遺伝子型は CTX-M 3 と比較的 CAZ に感受性を示すタイプであった。NCCLS では ESBL に関してセファロsporin 系薬剤は臨床的に効果が認められないとしているが、 β -ラクタマーゼの基質特異性の違いから同じセフェム系でも有効であるケースも存在する可能性があることを示唆する結果であった。しかし、長期投与などで高度耐性化が考えられるため、NCCLS のコメントにしたがい耐性と報告すべきである。MBL 産生菌による感染症では、基本的には β -ラクタム薬による治療は有効性が期待できないと考えられる。しかし、基質特異性からモノバクタムに関しては治療効果が期待できると考えられる。実際に今回の調査で AZT 投与により菌の陰性化が認められた症例が存在した。また、われわれは MBL 産生菌による腎盂腎炎を経験しているが、その症例においても AZT 投与により軽快している。いずれ

も AZT の MIC 値は 8 μ g/mL であった。通常投与量における AZT の血中濃度や臓器移行性から考えると、感染部位によっては AZT が有効であると考えられる症例も多いと思われる。しかし、セファロsporinaゼの過剰産生や外膜の変化など他の耐性機構を同時に獲得した場合、AZT の MIC 値が上昇し、抗菌力が減少する場合も想定されるので注意が必要である。また、腎移植後の患者では、アミノ配糖体系抗生物質が投与され、菌は陰性化した。しかし、通常 blaIMP 遺伝子は aac や aad などのアミノ配糖体耐性遺伝子などの近傍に存在し、関連して伝達、発現する場合が多いので、アミノ配糖体の長期投与は慎重にする必要があると考えられる。本邦においてもさまざまな薬剤耐性菌が出現し蔓延しつつある。今回、血液培養から分離された腸内細菌に関する調査を行ったが、実際にさまざまな耐性菌が検出された。今後も耐性菌に関する動向には注意が必要であると思われた。

第4章

モンテカルロシミュレーションを使用した ESBL 産生 *E. coli* に対するカルバペネム系薬およびニューキノロン系薬の有効性評価

4.1 目的

ESBL 産生菌はその基質特異性からペニシリン系、セファロスポリン系、モノバクタム系には耐性を示すことが知られている¹⁾。また、その産生遺伝子がプラスミド上に存在するため菌種を越えて伝播することも知られている。近年では、院内感染症^{2,3,4)}からだけでなく、市中感染からの検出されるケースも増加しており^{5,6)}、ESBL 産生菌に対して抗菌力が高いと考えられる薬剤の有効性評価をしておくことは重要であると考えられる。耐性菌感染症治療の際の抗菌薬選択は、その耐性機序に影響の少ない薬剤を選択することが重要である。ESBL 産生菌はその酵素の基質特異性からカルバペネム系やニューキノロン系薬は分解できない。そのため、ESBL 産生菌による感染症治療の際にはカルバペネム系やニューキノロン系薬が使用されるケースが多いと考えられる。抗菌薬の有効性については、MIC 値の高低だけで評価するのではなく、体内動態を加味した評価いわゆる Pharmacodynamics (PK) / Pharmacokinetics(PD)により有効性が評価され⁷⁾、その理論に基づいた臨床治療が実践されつつある。PK/PD パラメータはβラクタム薬では Time above MIC (TAM) で、ニューキノロン系薬では AUC/MIC を用い、それぞれのターゲット値として TAM は >40%、AUC/MIC で >125 (グラム陰性菌の場合) で有効性を保障できるとしている。そこで、関西医科大学附属病院および近畿耐性菌研究会にて検出された ESBL 産生 *Escherichia coli* のカルバペネム系およびニューキノロン系薬剤の MIC 値を用いて、モンテカルロシミュレーションにて PK/PD ターゲット値に対する達成率を求め、有効性の評価を行った。

4.2 対象および方法

4.2.1 Pharmacodynamics model

解析に使用する PK/PD パラメーターは、カルバペネム系薬剤は蛋白結合率を考慮した Time above MIC (TAM) % を、ニューキノロン系は 24-h area-under-the-concentration curve (AUC) と MIC の比、すなわち AUC/MIC を使用した。投与設計はカルバペネム系薬剤では通常投与

量×2 回、倍量×2 回、通常投与量×3 回を、ニューキノロン系薬は通常投与量×2 回とした。TAM の算出式は
$$=(t_0 + \ln((\text{Dose}/t_0 \cdot f - V_d \cdot k_{el} \cdot \text{MIC}) \cdot (1 - \exp(-k_{el} \cdot \tau)) / (V_d \cdot k_{el} \cdot \text{MIC}))) / k_{el} / \tau \cdot 100$$
 の 1-compartment model を用いた。Ln は自然対数、Vd は分布容積、f は非蛋白結合体%、kel は消失速度係数、τ は投与間隔時間を示す。

4.2.2 Pharmacokinetics

薬物動態パラメータは第 1 相臨床試験時の健常人データ^{7,8,9,10,11,12,13,14,15)}を利用した。カルバペネム系薬剤の薬物動態パラメータは解析ソフト WinNonlin を使用し、各薬剤の健康成人男子における点滴静脈内投与後の血漿中濃度推移を 1-compartment model で解析した。重み付け (1/Cp) をして解析を行い、分布容積(Vd)及び消失速度定数 (Kel) の平均値±標準偏差を求めた (Table1)。

Table 1. Pharmacokinetic parameters for the Monte Carlo simulation			
Antibiotic	Antibiotic (L)	Kel (hr ⁻¹)	Protein binding (%)
biapenem	13.4 ± 1.31	0.88 ± 0.11	3.7 ~ 10.2
doripenem	12.1 ± 1.20	1.18 ± 0.15	5.84
meropenem	12.8 ± 1.89	1.24 ± 0.11	12.8
imipenem	12.2 ± 3.90	1.19 ± 0.25	2

Antibiotic	regimen (route)	AUC ¹⁾ ₀₋₂₄ (μg·h/mL)	Protein binding (%)
pazufloxacin	300mg/12h (iv)	26.66 ± 4.90	19.1 ~ 23.8
ciprofloxacin	300mg/12h (iv)	14.98 ± 2.78	35.8 ~ 42.7
	200mg/12h (po)	10.84 ± 0.42	35.8 ~ 42.7
levofloxacin	200mg/12h (po)	39.76 ± 2.30	47 ~ 52
gatifloxacin	200mg/12h (po)	25.4 ± 4.2	16.5 ~ 21.8
prulifloxacin	263mg/12h (po)	12.82 ± 3.50	50.9 ~ 52.1

1) AUC :area under the concentration curve

4.2.3 使用菌株

対象菌株は近畿耐性菌研究会および関西医科大学附属病院にて、臨床材料から検出された ESBL 産生 *Escherichia coli* 50 株を用いた。MIC 値は CLSI 法⁶⁾に準拠した微量液体希釈法（オプトパネル：極東製薬）を使用し、biapenem(BIPM), meropenem(MEPM), imipenem(IPM), doripenem(DRPM), pazufloxacin(PZFX), ciprofloxacin(CPFX), levofloxacin(LVFX), gatifloxacin(GFLX), prulifloxacin(PUFX)について測定した。

4.2.4 Monte Carlo Simulation 法

上記 9 薬剤の第 1 相臨床試験における薬物動態パラメータと、本対象菌株 50 株の MIC 値を用いて、Crystal ball 2000（構造計画研究所）により 10000 回のシミュレーションを実施し、カルバペネム系薬剤では Time above MIC(TAM)%を、ニューキノロン系薬剤では AUC/MIC を使用し、PK/PD ターゲットに対する達成率を求め有効性の評価を行った。

4.3 結果

4.3.1 各薬剤の感受性成績

各薬剤の MIC 測定結果 Table2 に示した。MIC50/90 は BIPM 0.03/0.06μg/ml, MEPM 0.03/0.03μg/ml, IPM 0.125/0.25μg/ml, DRPM 0.03/0.03μg/ml, PZFX 2/16μg/ml, CPFX 1/>32μg/ml, LVFX 2/32μg/ml, GFLX 1/16μg/ml, PUFX 1/32μg/ml であった。

Table 2. *In vitro* activities of carbapenems and the new quinolones against 50 strains of ESBL¹⁾-producing *E. coli*

Antibiotic	MIC50	MIC90	range	MIC (μg/ml)												
				≤0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32
doripenem	0.03	0.03	≤0.015-0.06	22	26	2										
meropenem	0.03	0.03	≤0.015-0.06	23	23	4										
panipenem	0.06	0.25	0.06-0.25			25	19	6								
imipenem	0.125	0.25	0.125-0.25			22	21	7								
biapenem	0.03	0.06	≤0.015-0.25	2	29	15	2	2								
pazufloxacin	1	16	≤0.015->32	7	9	3	2	1	1	2	3	2	10	6	3	1
ciprofloxacin	2	>32	≤0.015->32	12	5	1	3	1	1	1	3		3	3	5	12
levofloxacin	2	32	≤0.015->32	0	11	5	3	3	1	1	3	1	4	9	7	2
gatifloxacin	1	16	≤0.015->32	3	9	6	1	3	2	2	1	5	6	8	3	1
prulifloxacin	1	32	≤0.015->32	15	2	4	1		2	3	3	5	5	4	3	3

1) ESBL : extended spectrum β-lactamase

4.3.2 モンテカルロシミュレーションによるカルバペネム系薬剤の達成率

モンテカルロシミュレーションによるカルバペネム系薬剤の PK/PD ターゲットに対する達成率を表 3 に示した。通常投与量×2 回で BIPM 99.09%, MEPM 99.60%, IPM 68.32%, DRPM 95.03%、倍量×2 回では BIPM 99.92%, MEPM 100.0%, IPM 84.81%, DRPM 99.52%、通常投与量×3 回では BIPM 100.0%, MEPM 100.0%, IPM 99.65%, DRPM 100.0%であった。ニューキノロン系薬剤の PK/PD ターゲットに対する達成率を表 4 に示した。CPFX (iv) 36.10%, CPFX (po) 34.32%, PZFX 41.05%, LVFX 37.68%, GFLX 37.59%, PUFX 35.75%であった。

Table 3. Monte Carlo simulation for carbapenems

Antibiotic	regimen	target Time above MIC (%)						
		20	30	40	50	60	70	80
biapenem	300mg every 12h	100	100.00	99.09	90.76	55.08	17.03	3.21
	600mg every 12h	100	100.00	99.92	97.54	80.39	39.92	12.03
doripenem	300mg every 8h	100	100.00	100	99.97	99.03	96.06	84.17
	250mg every 12h	100	100.00	95.03	45.91	8.70	1.08	0.09
	500mg every 12h	100	100.00	99.52	74.16	23.84	4.11	0.66
	250mg every 8h	100	100.00	100	99.89	91.58	57.21	21.72
meropenem	500mg every 12h	100	100.00	99.60	61.44	6.86	0.06	0.00
	1000mg every 12h	100	100.00	100.00	87.92	25.44	1.22	0.05
	500mg every 8h	100	100.00	100	100.00	99.36	83.05	35.20
imipenem	500mg every 12h	100	97.47	68.32	30.52	11.37	4.64	1.91
	1000mg every 12h	100	99.66	84.81	47.47	20.38	8.95	3.77
	500mg every 8h	100	100.00	99.65	91.78	68.42	42.67	22.74

Table 6. Monte Carlo simulation for new quinolones

Antibiotics	regimen	route	AUC/MIC ¹⁾ >125 %
pazufloxacin	300mg every 12h	iv	41.05
ciprofloxacin	300mg every 12h	iv	36.1
ciprofloxacin	200mg every 12h	po	34.32
levofloxacin	200mg every 12h	po	37.68
gatifloxacin	200mg every 12h	po	37.59
prulifloxacin	263mg every 12h	po	35.75

1) AUC/MIC :24h-area-under-the-concentration curve / MIC

4.4 考察

ESBL 産生菌は通常セファロスポリン系薬剤を分解する酵素であることが知られている ¹⁾。その基質特異性からアミノグリコシド系やニューキノロン系薬には交差耐性は示さないと考えられていた。Paterson ら ¹⁸⁾は、ESBL 産生菌はアミノグリコシド系やニューキノロン系薬を含む他の薬剤に対しても、通常よりも耐性化していると報告している。7 カ国 12 の施設で血液培養より分離された *K. pneumoniae* 85 株では、IPM および MEPM は耐性株が存在しなかったのに対して、gentamicin で 71%、piperacillin-tazobactam で 47%、CPFX で 20%が耐性であったとしている。また、その中で多剤耐性 ESBL (GM,CPFX,ST 同時耐性株) は 1997 年 6 月から 2002 年 12 月までで 12.5%から 26.9%に増加したとしている。本検討においても全てのニューキノロン系薬剤で MIC₉₀ が 16μg/ml 以上と高値であった。このように ESBL 産生菌の増加と多剤耐性化が進むなかで、その治療薬に対する有効性を評価しておくことは重要であると考えられた。今回の検討ではモンテカルロシミュレーション法を使用して、カルバペネム系およびニューキノロン系薬に対して PK/PD ターゲットに対する達成率を求め、臨床治療上の有効性を求めた。モンテカルロシミュレーション法は、抗菌薬の体内動態と感染原因菌に対する MIC 分布の母集団を使用し、解析ソフト上で乱数を発生させて PK/PD ターゲットに対する達成率を算出し、原因菌に対する抗菌薬の治療効果を評価する方法である ¹⁹⁾。また、βラクタム薬やニューキノロン系薬剤などの血中濃度測定が困難な薬剤については、より精度の高い治療効果を血中濃度測定無しで予測することが可能となる。PK/PD ターゲット値はニューキノロン系薬剤では AUC/MIC が>125、カルバペネム系薬剤では TAM が 40%と設定した。ニューキノロン系薬剤では Forrest ら ¹⁷⁾が最初に報告し、グラム陰性菌感染症に対する CPFX の細菌学的効果は AUC/MIC が<125 では 28%であったのに対して、>125 では 82%と有意差が認められたと報告されている。craig ら ¹⁶⁾が β ラクタム薬の PK/PD ターゲット値は TAM% で 40-50%が必要であると報告している。また、グラム陰性菌におけるカルバペネム

系薬剤の TAM%は 30%で静菌的、50%で殺菌的ともしている²⁰⁾。今回行ったモンテカルロシミュレーションの結果から、カルバペネム系薬剤では通常投与量×2 回で IPM 以外は 90%以上の達成率を示した。IPM は MIC 分布でも他の薬剤よりも若干高値であり、その影響により達成率も低くなったと考えられる。現在、βラクタム系薬剤は PK/PD 理論から 1 回投与量よりも投与回数を増加させることで有効率が高くなると考えられ、実践されつつある。しかし、投与回数を増やすことは医療費、人件費等が増えることにもつながると思われる。ESBL 産生菌感染症に対するカルバペネム系薬剤での治療は MEPM, DRPM, BIPM については通常投与量×2 回投与で十分な効果が期待できると考えられる。一方、ニューキノロン系薬剤ではすべての薬剤で達成率は 50%以下であった。その中でも PZFX が最も達成率が高く 41.05%であった。Moczygemba らの報告²¹⁾でも、ESBL 産生菌の>125 の達成率は LVFX, GFLX, CPMX で 2~13%であったとしている。ニューキノロン系の薬剤では 1 回投与量を増加することで有効率が高くなると考えられている。しかし、評価は AUC で行うために 1 日投与量の増加がない場合には有効率を高くすることは難しいと考えられる。ESBL 産生菌に対する治療にニューキノロン系薬剤を使用する場合には、慎重な投与が必要であると考えられる。単に MIC 分布や CLSI のブレイクポイントにての薬剤の評価だけでなく、PK/PD 理論に基づく評価を行うことで治療に即した評価を行うことができると考えられる。今回、ESBL 産生 *E. coli* についてモンテカルロシミュレーション法を用いてカルバペネム系およびニューキノロン系薬剤の PK/PD ターゲット値に対する達成率を求めたが、本手法を用いて様々な薬剤、菌種について行うことで、その感染症に対する最適な投与方法が明らかとなり、PK/PD 理論に基づいた治療を行うことが可能となると思われる。

第5章

日本における臨床材料からの ESBL 産生 *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. および *Proteus mirabilis* の疫学解析

5.1 目的

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing 腸内細菌は 1983 年¹⁾に最初に報告されて以来増加の一途を辿っている。加えて、院内感染のみならず市中感染症においても世界的に問題となっている²⁾。ESBL 産生株は腸内細菌におけるセファロスポリン系抗菌薬耐性の原因の多くを占めている。また、その遺伝子のほとんどがプラスミド上に存在し、近年増加傾向にある原因の一つともなっている。

ESBL は TEM-1、TEM-2、SHV など古典的な ClassA β ラクタマーゼの遺伝子変異が原因である。また、それらの酵素はグラム陰性桿菌特に腸内細菌では一般的に獲得していることが多い³⁾。2000 年以前の ESBL 産生株は、TEM 型や SHV 型の β ラクタマーゼのアミノ酸が 1 か所変異したものが多くを占めていた。1990 年代にはそれら TEM 型や SHV 型の ESBL を産生する *Escherichia coli* や *Klebsiella pneumoniae* による院内感染が多く報告されている³⁾。さらに、1990 年代後半には CTX-M 型と呼ばれる ESBL 産生 *E. coli* が世界中で報告されるようになった^{3,4)}。CTX-M 型は 1988 年に日本で *E. coli* から Toho-1 型 ESBL と呼ばれる遺伝子が検出されたのが最初である⁵⁾。最近、それらの多くは CTX-M 型の *E. coli* で検出され、特に市中感染で増加傾向にある。さらに、CTXM 型 ESBL を生産する *E. coli* は、米国、ヨーロッパ、ホンコン、インドなどでは、若い女性の市中における尿路感染症の原因として増加していると報告されている^{6,7,8,9)}。また、ESBL 産生株の市中での増加は抗菌薬の選択に影響を及ぼしている。

CTX-M 型は 50 種類以上の遺伝子型があり、それらはアミノ酸配列の違いから大きく 5 つのグループ (CTXM-1, CTM-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, and CTX-M-25) に分けられている⁴⁾。中でも、CTX-M15 型 *E. coli* O25: H4-ST131 株は世界的に蔓延し、加えて多剤耐性化の傾向があるため特に注意が必要な株であると考えられている^{2, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16)}。

そこで、この研究では日本の近畿地区における ESBL 産生 *E. coli*, *Klebsiella* spp. *Proteus mirabilis* の検出動向を 1999 年から 2010 年までの 10 年間にわたって調査した。

5.2 対象および方法

5.2.1 対象

対象は、近畿地区における 18 施設（病院：17 施設、検査センター：1 施設）で検出された菌株を用いた。菌株は 2000 年から 2009 年に各種材料から検出された *E. coli* 25,320 株、*K. pneumoniae* 11,582 株、*K. oxytoca* 2,933 株 および *P. mirabilis* 1,187 株の合計 40,522 株を使用した。検査方法はそれぞれの検査室で実施している方法を採用した。対象菌株は 1 患者 1 株とした

5.2.2. ESBL 判定基準

ESBL 産生株のスクリーニング基準は、cefpodoxime (CPDX) の MIC 値が $>2 \mu\text{g/ml}$ を示す株とした。基準を満たした株は、double-disc synergy (DDS) test (amoxicillin clavulanic acid (20 μg per disk/10 μg per disk), cefotaxime (30 μg per disk), ceftazidime (30 μg per disk), cefepime (30 μg per disk)) を実施し、ESBL 産生の確認を行った¹⁷⁾。DDST 陽性株は、PCR 法により遺伝子型を決定した。

5.2.3 PCR 法による ESBL 遺伝子型の決定

DDST 陽性株は PCR 法により SHV 型, TEM 型, CTX-M 型をスクリーニングし、さらに CTX-M 型は 4 グループに分類した^{18,19)}。PCR 法に用いる DNA は、菌液を 100°C15 分間加熱処理後、12500 回転 5 分遠心後の上清を使用した。PCR 法に使用した DNA 濃度は 0.1 ng/ml とした。CTX-M 型のグルーピングは、以下に示す 4 グループを特異的に検出可能なプライマーを使用した (group M1 : CTX-M-1, -3, -10 to -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30; group M2 : CTX-M-2, -4 to -7, -20, Toho-1; group M8 : CTX-M-8; group M9 : CTX-M-9, -13, -14, -16 to -19, -21, -27, Toho-2.)。PCR 産物は、2%アガロースゲル電気泳動を使用し、エチジンプロマイド染色により確認した。

5.2.4 *E. coli* CTX-M15 O25: H4 ST131 型の検出

PCR 法により CTX-M1 グループと決定した *E. coli* について、O 抗原および H 抗原（デンカ生研）の血清型別を実施した。グループ M1 O25: H4 の *E. coli* についてダイレクトシーケンス法を使用し、CTX-M15 の確認を行った。CTX-M15 O25: H4 と確定した *E. coli* は Multi locus sequence typing (MLST) を用いて ST 型を決定した (<http://mlst.ucc.ie/dbs/E.coli>)。

5.2.5 プラスミドレプリコン型

Carattoli らの方法²⁰⁾を用いて検出された 837 株のプラスミドレプリコン型を解析した。方法は 18 種類のプライマーセット (FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Ic, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, FII) を用いて multi prex PCR 法により決定した。

5.2.6 経口抗菌薬に対する薬剤感受性

経口抗菌薬に対する感受性試験は amoxicillin-clavulanic acid (CVA/AMPC), minocycline (MINO), levofloxacin (LVFX), fosfomycin (FOF) , colistin (CL), d trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)の 6 薬剤について実施した。方法は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)²¹⁾に準拠した微量液体希釈法 (栄研化学) を使用した。標準菌株として、*E. coli* ATCC 25922 および *E. coli* ATCC 35218 を使用し精度管理を行った。また、薬剤感受性試験結果は CLSI 基準に基づき判定を行った²²⁾。

5.3 結果

5.3.1 ESBL 検出

2000 年から 2009 年の 10 年間で、*E. coli* 24856 株、*K. pneumoniae* 11582 株、*K. oxytoca* 2933 株、*P. mirabilis* 1187 株、総数 40587 株が解析対象であった。ESBL の分離頻度を表 1 および図 1 に示した。検出率は、*E. coli* で 2000 年 2 株 (0.24%) であったのに対して、2009 年 224 株 (7.25%) と大幅に増加した。また、*K. pneumoniae* で 0% から 2.44%、*K. oxytoca* で 0% から 1.18% の増加であった。*P. mirabilis* は 2004 年からの調査で、6.97% から 12.85% と増加した。調査期間を 5 年毎の推移で見ると 2000 年から 2004 年の 0.42% から 2005 年から 2009 年の 3.4% と増加した。

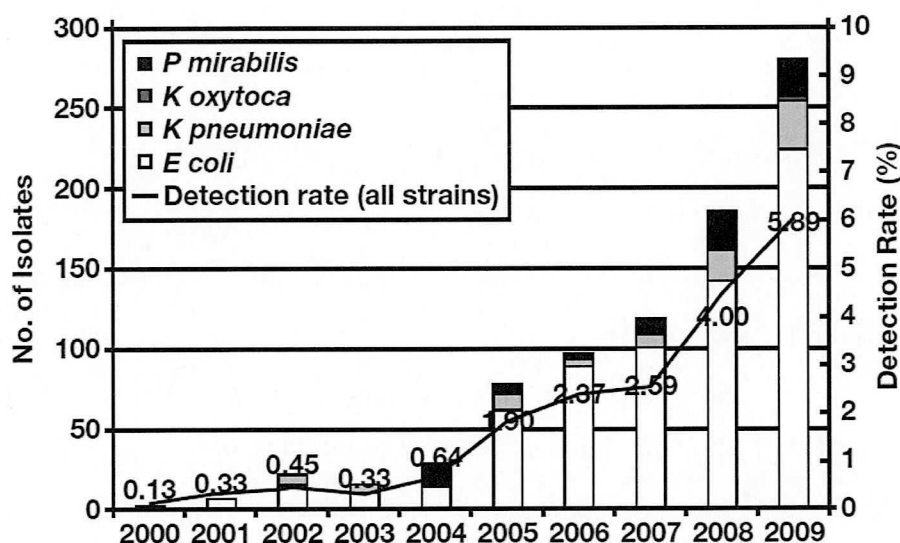


Figure 1 Distribution of detection among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-positive *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* in hospitals and associated health care facilities, 2000-2009

Table 1 Number of isolates of ESBL in each term

Organism		No. of isolates (%)										
		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Total
<i>E.coli</i>	collected strains	820	1297	3013	3095	2813	2429	3062	2806	2897	3088	25320
	ESBL ¹⁾	2 (0.24)	7 (0.54)	15 (0.50)	12 (0.42)	15 (0.53)	62 (2.55)	89 (2.91)	101 (3.60)	142 (4.90)	224 (7.25)	669 (2.64)
<i>K.pneumoniae</i>	collected strains	542	906	1487	1468	1144	1146	718	1205	1237	1229	11082
	ESBL	0 (0.00)	1 (0.11)	7 (0.47)	4 (0.27)	0 (0.00)	10 (0.87)	5 (0.70)	8 (0.66)	20 (1.62)	30 (2.44)	85 (0.77)
<i>K.oxytoca</i>	collected strains	154	228	400	356	383	319	201	341	297	254	2933
	ESBL	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (1.18)	3 (0.10)
<i>P.mirabilis</i>	collected strains	NT	NT	NT	NT	201	214	118	251	224	179	1187
	ESBL	NT	NT	NT	NT	14 (6.97)	6 (2.80)	3 (2.54)	10 (3.98)	24 (10.71)	23 (12.85)	80 (6.74)
<i>Total</i>	collected strains	1516	2431	4900	4919	4541	4108	4099	4603	4175	4750	40522
	ESBL	2 (0.13)	8 (0.33)	22 (0.45)	16 (0.33)	29 (0.64)	75 (1.83)	97 (2.37)	115 (2.59)	186 (4.00)	286 (5.89)	837 (2.07)

1) ESBL: Extended spectrum beta-lactamase

5.3.2 ESBL 遺伝子型

調査期間に検出された遺伝子型の推移を *E. coli* を図 2 に、*K. pneumoniae* を図 3 に示した。10 年間で最も多く検出された遺伝子型は *E. coli* で CTX-M9 型 374 株 (55.9%)、*K. pneumoniae* で CTX-M2 型 38 株 (44.7%)、*P.mirabilis* は CTX-M2 型で 79 株 (98.8%) であった。*E. coli* の CTX-M9 型は 2005 年からは増加傾向 (25 株→144 株) に、CTX-M1 型は 2006 年から増加傾向 (11 株→57 株) にあった。SHV/TEM 型の検出は、*E. coli* で SHV 型 19 株 (0.08%)、TEM 型 6 株 (0.025%)、*K. pneumoniae* で SHV14 株 (0.12%)、TEM 型 2 株 (0.02%) であった。世界的な拡散が問題となっている *E. coli* CTX-M15 O25:H4 ST131 株は 2007 年に初めて検出さ

れ、以後3年間で17株(1.0%)検出された。

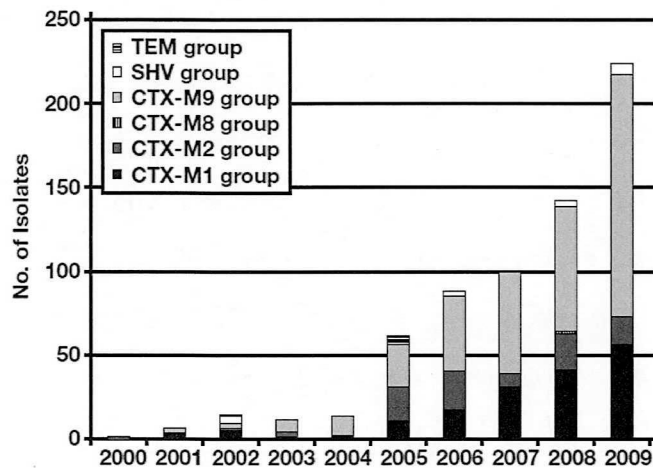


Figure 2 Distribution of different extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes among ESBL-positive *Escherichia coli* isolates detected in hospitals and associated health care facilities, 2000-2009.

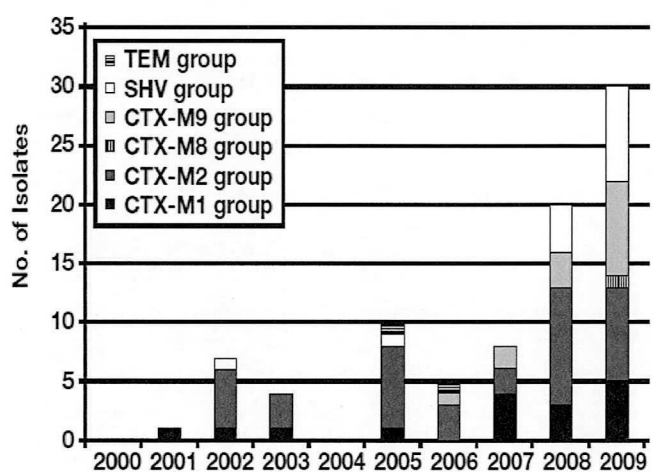


Figure 3 Distribution of different extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes among ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in hospitals and associated health care facilities, 2000-2009.

5.3.3 プラスミドレプリコン型

レプリコンタイプの結果を表2に示した。*E. coli*ではIncF groupが多くを占め、特にFIBが466株(69.7%)で検出された。次いで、FIA3 36株(50.2%)、II-1 83株(12.4%)、N 65株(9.7%)であった。平均のプラスミド取得数は1~1.84%であり、複数のタイプを保有していた。CTX-M15 O25:H4 ST131株は全てInc FIA+FIBであった。*K.pneumoniae*では47株(55.3%)がNタイプであった。平均のプラスミド保有数も1~1.05であり、単一のものがほとんどであった。*P.mirabilis*では77株(96.3%)がInc Tであった。

Table 2 Number of replicons in parental strains of ESBL producing strains.

Strains	Genotype group ¹⁾ (no. of isolates)	Repricon type																All replicon types	
		A/C	FII	FIA	FIB	FIC	H12	HI1	HI2	II-1	K	L/M	N	P	T	Y	nontype	total	mean ²⁾
<i>E. coli</i>	CTX-M1 group (174)	0	0	98	79	0	2	2	2	25	0	3	5	4	0	6	5	231	1.33
	CTX-M2 group (95)	2	0	38	70	2	1	1	0	13	0	0	38	2	1	3	4	175	1.84
	CTX-M9 group (374)	2	1	193	300	1	0	0	0	37	0	2	22	3	1	8	7	577	1.54
	SHV group(19)	1	0	6	13	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	1	1	29	1.53
	TEM group (6)	0	0	1	4	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	7	1.17
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M1 group (16)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	1	0	0	6	16	1
	CTX-M2 group (38)	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	31	0	0	0	6	40	1.05
	CTX-M9 group (14)	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	1	2	14	1
<i>P. mirabilis</i>	CTX-M2 group (79)	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	76	0	0	79	1

1) CTX-M1 group : including CTX-M-1, -3, -10 to -12, -15, -22, -23, -28, -29 and -30 ; CTX-M2 group : including CTX-M-2, -4 to -7 and -20, and Toho-1 ; CTX-M9 group, including CTX-M-9, -13, -14, -16 to -19, -21 and -27, and Toho-2.

2) The average plasmid-carrying rate

5.3.4 経口抗菌薬感受性 (Table 3)

経口抗菌薬の薬剤感受性試験結果を表3に示した。*E. coli* で LVFX 32.2%, MINO 62.6%, ST 44.3%, FOM 93.7%, CVA/AMPC 47.2%, CL 96%であった。遺伝子型別では、CTX-M2 group の LVFX 感受性率が他のタイプよりも高値であった。*K. pneumoniae* では、LVFX 86.9%, MINO 21.4%, ST 46.4%, FOM 83.3%, CVA/AMPC 51.2%, CL 86.9%であった。遺伝子型別では、TEM/SHV group の ST 感受性率が0%と他のタイプよりも低値であった。*E. coli* で LVFX 32.2%, MINO 62.6%, ST 44.3%, FOM 93.7%, CVA/AMPC 47.2%, CL 96%であった。*P. mirabilis* では、LVFX 15.2%, MINO 0%, ST 64.6%, FOM 50.6%, CVA/AMPC 100%, CL 0%であった。

Table 3 Susceptibility of oral antibiotics in each ESBL

Antibiotics	susceptibility % ¹⁾											
	<i>E. coli</i>					<i>K. pneumoniae</i>					<i>P. mirabilis</i>	
	CTX-M1 group ²⁾	CTX-M2 group ³⁾	CTX-M9 group ⁴⁾	SHV/TEM group	Total	CTX-M1 group ²⁾	CTX-M2 group ³⁾	CTX-M9 group ⁴⁾	SHV/TEM group	Total	CTX-M2 group ³⁾	Total (%)
levofloxacin	17.2	50.5	28.3	28	32.2	75	89.5	64.3	100	86.9	15.2	36.1
minocycline	59.8	52.6	76.7	48	62.6	31.3	18.4	0	25	21.4	0	52.5
SXT ⁵⁾	61.5	45.3	31.6	36	44.3	68.8	42.1	64.3	0	46.4	64.6	46.5
fosfomycin	89.1	93.7	96.8	96	93.7	56.3	89.5	100	100	83.3	50.6	88.6
AMC ⁶⁾	42.5	22.1	65	64	47.2	43.8	57.9	35.7	50	51.2	100	52.6
colistin	97.7	93.7	94.9	100	96	87.5	86.8	64.3	100	86.9	0	85.9

1) susceptibility : criteria of CLSI M100-S20 in Enterobacteriaceae

2) CTX-M1 group : including CTX-M-1, -3, -10 to -12, -15, -22, -23, -28, -29 and -30

3) CTX-M2 group : including CTX-M-2, -4 to -7 and -20, and Toho-1

4) CTX-M9 group : including CTX-M-9, -13, -14, -16 to -19, -21 and -27, and Toho-2.

5) SXT : trimethoprim-sulfamethoxazole

6) AMC : amoxicillin-clavulanic acid

5.4 考察

本検討において、2000年から2009年にわたる長期のサーベイランスの結果、10年間でESBL産生*E. coli*が0.24%から7.25%と約30倍増加したことが分かった。Fangら²²⁾の調査ではスウェーデンにおいて2001年から2006年で約10倍増加しており、同時期の調査結果と比較するとほぼ同等の結果であった。近年、KPC²³⁾やNDM-1²⁴⁾といった遺伝子を獲得した腸内細菌の報告が相次いでいる。日本における検出は今だ少数であり、本検討が今後このような耐性菌の増加傾向の予測に役立つと考えられる。

今回の調査で、日本の近畿地域におけるESBL産生*E. coli*、*Klebsiella* spp.、*P. mirabilis*のESBL遺伝子型の動向が明確となった。日本におけるCTX-M型ESBL産生腸内細菌の調査はShibataら²⁵⁾が行っているが、その調査の中では*E. coli*の168株中89株がCTX-M9Groupであったと報告している。特に、CTX-M9は*E. coli*で多く検出され、日本において最も拡散している遺

伝子型と推測される。本調査においても同様に *E. coli* 669 株中 374 株が CTX-M9 型であった。特に 2007 年以降は CTX-M2 の減少に反して増加していることがわかった。CTX-M2 型は家畜などの食料品から多く検出されることがわかっており²⁶⁾、それらに対する調査・対策が行われ始めたことも影響があるのではないかと考えられた。一方、CTX-M1 型は微増であった。CTX-M1 型で世界的にも問題となっている CTX-M15 O25:H4 ST131 *E. coli* の動向は日本ではわかっていない。また、調査された報告の中でも、本株に対する結果がないのが現状である。本検討において日本における動向が明らかとなったと考える。アジアにおける報告は Hawkey らが行っている。また、インドやパキスタンにおける動向も報告されている。問題点は、病院内だけでなく市中における尿路感染症からの検出や多剤耐性株の検出であるとしている。本調査で CTX-M15 O25:H4 ST131 *E. coli* が 2007 年には存在したことが証明され、継続して検出されていることから、日本においても本株が定着していると考えられる。市中における検出が現状では多くないものの、今後の動向に注意が必要である。プラスミドレプリコンタイプの調査は、ESBL 産生菌の拡散や危険性について知ることが可能である。CTX-M 型の ESBL 遺伝子は、狭い宿主域非互換性タイプ(つまり IncFI、IncFII、IncHI2 および IncI)あるいは広い宿主域非互換性タイプ(つまり IncN、IncP-1-a、IncL/M および IncA/C)に属するプラスミドによってコード化されている²⁷⁾。本調査では、*E. coli* では遺伝子型に関わらず、IncF group が多くを占めた。また、2 種類以上のプラスミドを獲得した株も多く、複数保有していることがわかった。他の報告²⁸⁾においても、*E. coli* では IncF group の検出が多く、同様の結果であった。また、II-1 や N といった型も 10%程度には認められ、*E. coli* は多くのクローンが存在することが示唆された。市中における拡散はこれら様々な種類のクローンが違った形で広がっていることが考えられた。一方で、*K. pneumoniae* では N 型が、*P. mirabilis* では T 型がほとんどを占め、単一のクローンもしくはプラスミドが拡散している可能性が示唆された。特にこれら 2 菌種では、院内感染における検出が多く報告されている^{29, 30, 31)}。本調査でも両菌種ともに同一施設、同一病棟での検出も散見されており、*E. coli* とは違った拡散様式を示すと考えられた。菌種により特徴があるため、それらに合わせた対策をとる必要があると思われる。

近年、CTX-M 型 ESBL 産生株の市中への拡散が問題となっている中で、特に女性の尿路感染症からの検出が増加していると報告されている^{6, 7, 8, 9)}。市中への拡散は、外来治療における抗菌薬選択を難渋化させると考えられ、経口抗菌薬で ESBL 産生菌に有効な薬剤は多く存在しない。特に女性には妊娠の問題もあり、そのような患者で尿路感染症を発症した場合には

さらに使用可能な薬剤が限られてくる。近年の報告では、キノロン系薬剤の耐性が特に問題視されている³²⁾。本調査においても、キノロン系薬剤は *E. coli* で耐性率が高く、約 70%は耐性であった。特に CTX-M15 O25:H4 ST131 を含む CTX-M1group は約 85%耐性と最も高く、キノロン系薬剤は治療薬として期待はできない。*E. coli* に対しては FOM の感受性は保たれているため、サンフォードガイドライン³³⁾ にもあるように 3 g/day における治療が推奨される。一方、*K. pneumoniae* では、キノロン系は 80%が感受性であり、肺炎などの場合においても十分に有効性が期待できる結果であった。抗菌薬感受性は、菌種と遺伝子型により相違があるため、疫学的背景調査結果などによりその地域における選択薬剤を決定していく必要があると考えられた。

ESBL 産生 *E. coli* の検出率は、欧米やアジアの他のエリアと比較して低値であった。この理由の 1 つに、各国で汎用される抗菌薬に相違があることが考えられる。日本においては、カルバペネム系やオキサセフェム系が多く使用され、これらは ESBL 産生菌に対して有効性が高いために ESBL 産生株の検出率の増加が他国ほどではないと考察される。しかしながら、近年抗菌薬適正使用の観点から、特にカルバペネム系抗菌薬の使用に関しては抑制される方向にある。これらの影響により今後日本においても ESBL 産生菌の増加が懸念される場所である。

本調査において、日本における ESBL 産生 *E. coli*、*Klebsiella* spp.、*P. mirabilis* の疫学的な背景を示すことができたと考える。腸内細菌における β ラクタム系薬耐性は様々な遺伝子が知られており、世界的にも重要な耐性菌の報告が相次いでいる。今後も、ESBL 産生菌を中心に各種耐性菌に対するサーベランスの強化を行い、その拡散を予防する必要がある。

総括

研究において、日本における ESBL 産生菌感染症の検出、血液からの腸内細菌における各種 β -ラクタマーゼ産生菌の検出動向、ESBL 産生 *E. coli* に対する抗菌力の検討、および ESBL 産生菌の疫学調査を行い、以下の知見を得た。

- SHV-型 ESBL 産生菌による感染症例を検出し、日本における本型の感染症例の報告としては、国内で最初のものであった。国内では CTX-M 型の β -ラクタマーゼを産生する *E. coli* や *K. pneumoniae* が各地から分離されているが、今回の症例により関西地区にも SHV-型 ESBL を産生する CAZ 耐性 *E. coli* が存在することが確認された。また、隣国の韓国でも、同時期に SHV-12 が分離されている。これらの事実は、今後、日本においても欧米と同様に ESBL 産生菌の動向に注意を払って行く必要があることを示している。感染症例としては最も腸内細菌が関与するであろう腹腔内感染症より分離された。このことは今後の動向によっては術後感染などで治療が難渋化する症例が増加することが予想される。したがって、ESBL 産生菌による感染症であることの早期発見が、適切な治療に結びつくと考えられる。
- 1991 年から 2000 年の 10 年間に血液培養から検出された腸内細菌科 329 株について、 β -ラクタム薬耐性機序に関する解析を行った。薬剤感受性試験の結果は *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* では第 3 世代以降のセフェム系薬剤やカルバペネム系薬剤の MIC₉₀ が 0.5 μ g/mL 以下と良好な感受性を示した。一方で、*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* では第 3 世代セフェムはやや劣るものの、第 4 世代薬やカルバペネム系薬は比較的良好であった。菌種別の耐性率では ceftazidime で比較すると *E. cloacae* がもっとも高く 50.5% であった。Double-disk synergy test (DDST) 試験陽性は 19 株、2-mercapto propionic acid test (2-MP) 陽性は 5 株存在し、耐性遺伝子は Extended spectrum β -lactamase (ESBL) 産生遺伝子 CTX-M 1/3 型が 19 株中 18 株検出され、metallo- β -lactamase (MBL) 産生菌は 5 株すべて IMP-1 型であった。また、1991 年に検出された *K. pneumoniae* では SHV 型 ESBL 産生菌の存在が確認された。臨床背景調査では基礎疾患として悪性腫瘍や脳血管障害などの比較的重症例が多く、全例で IVH

カテーテルが挿入されていた。ESBL 産生菌検出患者ではカルバペネム系やアミノ配糖体薬の投与で、MBL 産生菌検出患者では aztreonam の投与で臨床症状が改善され、治療効果が期待される結果であった。本検討では、敗血症患者からも ESBL 産生菌が検出され、重要感染症における関与も確認された。また、1991 年には ESBL 産生株が存在したことも明らかとなった。

- ESBL 産生菌はその基質特異性からペニシリン系、セファロスポリン系、モノバクタム系には耐性を示すことが知られている。そのため、有効薬剤が限られたものに限定される。本検討では ESBL 産生 *E. coli* に対するカルベペネム系およびニューキノロン系薬の有効性について PK/PD 理論に基づくモンテカルロシミュレーションを使用して評価した。PK/PD パラメータは、カルバペネム系は TAM% を使用しそのターゲット値を 40% とした。ニューキノロン系は AUC/MIC を使用し、そのターゲット値を >125 とした。薬剤感受性はカルベペネム系では IPM 以外は MIC₅₀ で 0.03 μ g/ml と低い値を示した。一方、ニューキノロン系薬では MIC₅₀ が 1~2 μ g/ml とカルバペネム系に比べて高値を示した。モンテカルロシミュレーションによるカルバペネム系薬剤の PK/PD ターゲットに対する達成率は、通常投与量 $\times$ 2 回で BIPM 99.09%, MEPM 99.60%, DRPM 95.03% と IPM 以外は良好な達成率であった。ニューキノロン系薬では、最も達成率が高いものでも PZFX 41.05% であった。今回、ESBL 産生 *E. coli* についてモンテカルロシミュレーション法を用いてカルバペネム系およびニューキノロン系薬剤の PK/PD ターゲット値に対する達成率を求めた。ESBL 産生 *E. coli* に対する感染症治療はカルバペネム系薬剤がより有効である結果であった。
- 本調査は、日本の近畿地区における ESBL 産生 *E. coli*、*Klebsiella* spp.、*P.mirabilis* の分子疫学とその背景調査を行った。2000 年から 2009 年の 10 年間で、*E. coli* 669 株 (2.80%) 検出された。検出率は、*E. coli* で 2000 年 0.24% であったのに対して、2009 年 7.25% と大幅に増加した。また、*K. pneumoniae* で 0% から 2.44%、*K. oxytoca* で 0% から 1.18% の増加であった。*P.mirabilis* は 2004 年からの調査で、6.97% から 12.85% と増加した。最も多く検出された遺伝子型は *E. coli* で CTX-M9 型 374 株 (1.57%)、*K. pneumoniae* で CTX-M2 型 38 株 (0.34%)、*P.mirabilis* は CTX-M2 型で 79 株 (0.7%) であった。世界的な拡散が問題となっている *E. coli* CTX-M15 O25:H4 ST131 株は 2007 年に初めて検出され、以後

3年間で16株(1.0%)検出された。レプリコンタイプは、*E. coli*ではIncF groupが多くを占め、特にFIBが466株(69.7%)で検出された。平均のプラスミド取得数は1~1.84%であり、複数のタイプを保有していた。*K.pneumoniae*では47株(55.3%)がNタイプ、*P.mirabilis*では77株(96.3%)がInc Tであった。経口抗菌薬に対する感受性ではLevofloxacinの感受性率が*E. coli*で32.2%、*K. pneumoniae*で86.9%、*P.mirabilis*で15.2%と菌種により差があった。本調査において、日本におけるESBL産生*E. coli*、*Klebsiella* spp.、*P.mirabilis*の疫学的な背景を示すことができたと考える。腸内細菌におけるβラクタム系薬耐性は様々な遺伝子が知られており、世界的にも重要な耐性菌の報告が相次いでいる。今後も、ESBL産生菌を中心に各種耐性菌に対するサーベイランスの強化を行い、その拡散を予防する必要がある。

本研究により、ESBL産生菌に対する感染症例の臨床背景、経口薬および注射薬の各種抗菌薬の抗菌力、日本におけるESBL産生菌の検出動向と遺伝子型が明らかとなった。日本においてESBL産生菌の最初の検出からおおよそ10年後には10%にもおおよぶ検出率となることが明らかとなり、耐性菌の拡散の動向を把握することができた。また、近年様々な耐性菌による感染症例や病院内感染例が報告される中で、新しい遺伝子型の耐性菌も問題となっている。本研究はそれらの新しい遺伝子型の耐性菌の動向予測の参考になると思われる。加えて、ESBL産生菌は病院内感染だけでなく、市中においても広がりを見せており、抗菌薬の選択に難渋することとなっている。本研究では、経口抗菌薬および注射薬の抗菌力を把握することができ、今後の抗菌薬適正使用に貢献できるものと考えられる。

引用文献

第 1 章

- 1) Ambler, R. P. The structure of β -lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1980; 289:321-331.
- 2) Bush, K., and G. A. Jacoby. An updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 2010; 54:969-976.
- 3) Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and ceftazidime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection. 1983;11:315-317
- 4) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H : Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1995 ; 39 :2269-2275.
- 5) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H : Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1995 ; 39 :2269-2275.
- 6) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al: Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that show imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:71-8
- 7) 荒川宜親：広域 β -ラクタム薬耐性に関与する β -ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関。日本臨床微生物学雑誌 2003; 13: 12-23
- 8) Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, R. Wilhelm, and Y. Chong. Comparative characterization of the cephamycinase blaCMY-1 gene and its relationship with other β -lactamase genes. Antimicrob. Agents Chemother. 1996 ; 40:1926-1930.
- 9) Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G., Philippon A.(1988) Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev. Infect. Dis. 10:867-878.
- 10) Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter*

aerogenes. J Clin Microbiol. 2000;38:542-546.

- 11) Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. J Antimicrob Chemother. 2009;64 : i3-10

第 2 章

- 1) Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S : Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983 ; 11: 315-317.
- 2) Bermudes H, Arpin C, Jude F, el-Harrif Z, Bebear C, Quentin C: Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in a French hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997 ;16:523-529.
- 3) Shannon K, Stapleton P, Xiang X, Johnson A, Beattie H, El Bakri F, Cookson B, French G Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. J Clin Microbiol 1998 ; 36 :3105-3110.
- 4) Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, Ariza J, Gudiol F : Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1998 ; 42 :53-58.
- 5) Johnson AP, Weinbren MJ, Ayling-Smith B, Du Bois SK, Amyes SG, George RC : Outbreak of infection in two UK hospitals caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* resistant to cefotaxime and ceftazidime. J Hosp Infect 1992 ; 20:97-103.
- 6) Sougakoff W, Petit A, Goussard S, Sirot D, Bure A, Courvalin P: Characterization of the plasmid genes blaT-4 and blaT-5 which encode the broad-spectrum beta-lactamases TEM-4 and TEM-5 in enterobacteriaceae. Gene 1989 ; 78:339-348.
- 7) 川上小夜子、松村充、斧康雄、宮沢幸久、他：帝京大学病院で検出された *E. coli* および *Klebsiella* spp. の Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)について。第 45 回日本化学療法学会総会抄録 1997 ; 演題番号 34.
- 8) 斧康雄、加藤淳子、伊藤 匡、島本祐子、杉山肇、他：ESBL 産生菌の病原性に関する研究：ヒト食細胞に対する抗食菌性の検討。第 46 回日本化学療法学会総会抄録 1998 ; 演題番号 268.
- 9) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H : Cloning and sequence of the

- gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1995 ; 39 :2269-2275.
- 10) Yagi T, Kurokawa H, Senda K, Ichiyama S, Ito H, Ohsuka S, Shibayama K, Shimokata K, Kato N, Ohta M, Arakawa Y: Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like β -lactamase genes. Antimicrob Agents Chemother 1997 ; 41 :2606-2611.
 - 11) Prodinger WM, Fille M, Bauernfeind A, Stemplinger I, Amann S, Pfausler B : Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. J Clin Microbiol 1996 ; 34 :564-568.
 - 12) Liu PY, Tung JC, Ke SC, Chen SL : Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district hospital in Taiwan. J. Clin. Microbiol. 1998 ; 36:2759-2762.
 - 13) Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim JW, Cho DT : Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. J. Clin. Microbiol. 1998 ; 36:1446-1449.
 - 14) 黒川博史、柴田尚弘、八木哲也、荒川宜親 : 本邦で分離された SHV-型 ESBL を産生する腸内細菌. 第 72 回 日本細菌学会総会抄録 1999, 演題番号 3060.
 - 15) 黒川博史、八木哲也、柴田尚弘、荒川宜親 : 第三世代セフェム薬耐性グラム陰性桿菌の予備調査. 化学療法の領域 1999 ; 15: inpress
 - 16) Livermore DM, Yuan M : Antibiotic resistance and production of extended-spectrum β -lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. J Antimicrob Chemother 1996 ; 38 :409-424.
 - 17) 中山一誠 : 腹腔内感染の発症機構と二相性感染. 臨床と微生物 1998 ; 25 : 595-601
 - 18) Pai H, Lyu S, Lee JH, Kim J, Kwon Y, Kim JW, Choe KW : Survey of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. J Clin Microbiol 1999 ; 37:1758-1763.

第 3 章

- 1) Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, et al.: Concurrent outbreaks of extended-spectrum β -lactamase-producing of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. J Antimicrob

Chemother 44: 489～499, 1999Rebuck J A, Olsen K M, Fey P D, et al.:

- 2) Characterization of an outbreak due to extended- spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. Clin infect Dis 31: 1368～1372, 2000
- 3) Livermore D M, Yuan M: Antibiotic resistance and production of extended spectrum β -lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care unit in Europe. J Antimicrob Chemother 38: 409～424, 1996
- 4) 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)。感染症誌 74: 112～119, 2000
- 5) 安達桂子, 櫻田政子, 安中めぐみ, 他: メタロ β ラクタマーゼ産生性 *Serratia marcescens* 検出例の検討。日臨微誌 9: 244～250, 1999
- 6) Komatsu M, Ikeda N, Aihara M, et al.: Hospital outbreak of MEN-1-derived extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J infect Chemother 7: 94～101, 2001
- 7) 中村竜也, 柴田尚宏, 土井洋平, 他: 1991 年から 2000 年の間に血液培養より分離され *Serratia marcescens* における IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼ産生株の解析。感染症誌 76: 246～253, 2002
- 8) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Eleventh informationalsupplement M 100-S 11: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 2001
- 9) 小松方, 木下承皓, 佐藤かおり, 他: 近畿地区における *Escherichia coli* および *Klebsiella* spp. 以外の腸内細菌科からの extended-spectrum β -lactamase 産生菌の分離調査。日化療会誌 50: 135～142, 2002
- 10) 角田光子, 佐竹幸子, 伊豫部志津子: 腸内細菌科菌種におけるメタロ β ラクタマーゼ遺伝子の検出。日化療会誌 47: 147～151, 2002
- 11) 柴田尚宏, 土井洋平, 荒川宜親: メタロ β ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌。臨床検査 45: 840～850, 2001
- 12) Jarlier V, Nicolas M H, Fournier G, et al.: Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactum agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 10: 867～878, 1988

- 13) 小松方, 相原雅典, 島川宏一, 他: 糞便中からの Extended spectrum β -lactamase 産生性腸内細菌の検出。感染症誌 74: 250~258, 2000
- 14) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al.: Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol 38: 40~43, 2000
- 15) Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, et al.: Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 40: 349~353, 1996
- 16) Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 19: 6823~6831, 1991
- 17) Hejazi A, Keane C T, Falkiner F R, et al.: The use of RAPD-PCR as a typing method for *Serratia marcescens*. J Med Microbiol 46: 913~919, 1997
- 18) Balis E, Vatopoulos A C, Kanelopoulou M, et al.: Indications of in vivo transfer of an epidemic R plasmid from *Salmonella enteritidis* to *Escherichia coli* of the normal human gut flora. J Clin Microbiol 34: 977~979, 1996
- 19) Leblebicioglu H, Gunaydin M, Esen S, et al.: Surveillance of antimicrobial resistance in gram negative isolates from intensive care units in Turkey: analysis of data from the last 5 years. J Chemother 14: 140~146, 2002
- 20) Perilli M, Amico E D, Segatore B, et al.: Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases produced by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from an Italian nationwide survey. J Clin Microbiol 40: 611~614, 2002
- 21) Bell J M, Turnidge J D, Gales A C, et al.: Prevalence of extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY antimicrobial surveillance program (1998-99). Diag Micro Infect Dis 42: 193~198, 2002
- 22) Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al.: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratia marcescens*. Infection 11: 315~317, 1983
- 23) 中村竜也, 松尾信昭: 臨床材料から分離された腸内細菌科の β ラクタム薬に対する耐性機序の解析。第 50 回日本化学療法学会総会, 神戸, 2002

- 24) Patton T G, Katz S, Sobieski R J, et al.: Genotyping of clinical *Serratia marcescens* isolates: a comparison of PCR-based methods. FEMS microbial Lett 194: 19~25, 2001
- 25) Liu P Y, Lau Y, Hu B, et al.: Use of PCR to study epidemiology of *Serratia marcescens* isolates in nosocomial infection. J Clin Microbiol 32: 1935~1938, 1994

第 4 章

- 1) Bush K, G A Jacoby, A A Medeiros. : A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1211-1233. 1995.
- 2) Paterson, DL, Ko, WC, Von Gottberg, A, et al. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial Infections. Ann Intern Med 140:26-32.2004
- 3) Winokur, PL, Canton, R, Casellas, JM, Legakis, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clin Infect Dis 32:94-103.2001
- 4) Wiener, J, Quinn, JP, Bradford, PA, et al. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. Jama 281:517-523. 1999
- 5) Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 23:163-7. 2004
- 6) Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M genes. Clin Infect Dis. 38:1736-41. 2004
- 7) Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men.Clin Infect Dis. 26:1-10. 1998.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 15th informational supplement. M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. Pa. 2005.
- 9) Nakashima M. Phase I study of doripenem, a new carbapenem antibiotic for injection in healthy volunteers. CHEMOTHERAPY 53 (S-1), 104-123,2005
- 10) Saito A. Pharmacokinetic study on biapenem. CHEMOTHERAPY 42 (S-4), 277-284, 1994

- 11) Saito A. Studies on imipenem/cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791). CHEMOTHERAPY 33 (S-4), 379-391, 1985
- 12) Saito A. Pharmacokinetic study on meropenem. CHEMOTHERAPY 40 (S-1), 276-282, 1992
- 13) 安永幸二郎他：基礎と臨床，31（7）：2433-2466，1997
- 14) 中島光好，他：日化療会誌，47，141-174. 1999
- 15) 中島光好，他：日化療会誌，47，175-206. 1999
- 16) Okuyama Y, Momota K, Morino A. Pharmacokinetics of prulifloxacin. 1st communication: absorption, distribution and excretion in rats, dogs and monkeys after a single administration. Arzneimittelforschung. 47: 276-84. 1997
- 17) Okazaki, C Kojima, H Hakusui, and M Nakashima . Enantioselective disposition of ofloxacin in humans. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 2106-2109.1991
- 18) Craig WA. Does the dose matter? Clin Infect Dis. 33: 233-7. 2001
- 19) A Forrest, D E Nix, C H Ballow, T F Goss, M C Birmingham, and J J Schentag Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1073-1081. 1993
- 20) Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. Clin Infect Dis 39:31-7. 2004
- 21) Joseph L. Kuti, Charles H. Nightingale, and David P. Nicolau Optimizing Pharmacodynamic Target Attainment Using the MYSTIC Antibiogram: Data Collected in North America in 2002. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 2464-2470. 2004
- 22) Walker M. R, Andes D, Craig WA et al. Pharmacodynamics activities of meropenem in animal infection model. ICAAC A-91, 1994.
- 23) Moczygemba LR, Frei CR, Burgess DS. Pharmacodynamic modeling of carbapenems and fluoroquinolones against bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases. Clin Ther. 26:1800-7. 2004.

第5章

- 1) Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection.

1983;11:315-317.

- 2) Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol. 2004;42:5715-5721.
- 3) Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001;14:933-951.
- 4) Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:1-14.
- 5) Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, et al. Novel plasmid-mediated β -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 1988;32:1243-1246.
- 6) Doi Y, Adams J, O'Keefe A, et al. Community-acquired extended-spectrum β -lactamase producers, United States. Emerg Infect Dis. 2007;13:1121-1123.
- 7) Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother. 2004;54:735-743.
- 8) Ho PL, Poon WW, Loke SL, et al. Community emergence of CTX-M type extended-spectrum β -lactamases among urinary *Escherichia coli* from women. J Antimicrob Chemother. 2007;60:140-144.
- 9) Freeman JT, McBride SJ, Heffernan H, et al. Community-onset genitourinary tract infection due to CTX-M-15-producing *Escherichia coli* among travelers to the Indian subcontinent in New Zealand. Clin Infect Dis. 2008;47:689-692.
- 10) Hawkey PM. Prevalence and clonality of extended-spectrum β -lactamases in Asia. Clin Microbiol Infect. 2008;14:159-165.
- 11) Lewis JS Jr, Herrera M, Wickes B, et al. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a US health care system. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:4015-4021.
- 12) Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother. 2007;59:165-174.
- 13) Mulvey MR, Bryce E, Boyd E, et al. Ambler class A extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp in Canadian hospitals. Antimicrob Agents Chemother.

2004;48:1204-1214.

- 14) Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:33-41.
- 15) Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, et al. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:154-158.
- 16) Zong Z, Partridge SR, Thomas L, et al. Dominance of blaCTX-M within an Australian extended-spectrum β -lactamase gene pool. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:4198-4202.
- 17) Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, et al. Detection of extended spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:542-546.
- 18) Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett.* 1991;66:19-25.
- 19) Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:159-166.
- 20) Carattoli A, Bertini A, Villa L, et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63:219-228.
- 21) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010. Document M100-S20.
- 22) Fang H, Ataker F, Hedin G, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol.* 2008;46:707-712.
- 23) Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-1161.
- 24) Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:5046-5054.
- 25) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, et al. R classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified

in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:791-795.

- 26) Warren RE, Ensor VM, O'Neill P, et al. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:504-508.
- 27) Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, et al. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:67-71.
- 28) Elhani D, Bakir L, Aouni M, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a university hospital in Tunis, Tunisia, 1999-2005. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:157-164.
- 29) Mena A, Plasencia V, García L, et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2831-2837.
- 30) Nagano N, Shibata N, Saitou Y, et al. Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type β -lactamase. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5530-5536.
- 31) Gruteke P, Goessens W, van Gils J, et al. Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum β -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1161-1166.
- 32) Jones GL, Warren RE, Skidmore SJ, et al. Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:1245-1251.
- 33) David N. Gilbert, Robert C. Moellering, George M. Eliopoulos, et.al. The SANFORD GUIDE to antimicrobial therapy 2011 (41th edition).

謝辞

本論文作成において、種々の御高配、御助言を賜った前大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻生体情報科学講座（現：大阪府公衆衛生研究所 所長） 山本容正教授に深甚なる感謝の意を表します。また、山本容正教授の後、主査をお受けいただきました大阪大学大学院医学系研究科検査技術科学専攻 機能診断科学講座/生体情報科学講座 松浦成昭教授には深く感謝いたします。本研究論文の発表および作成にあたり、ご指導を賜りました大阪大学大学院医学系研究科検査技術科学専攻 機能診断科学講座 三善英知教授、大阪大学大学院医学系研究科検査技術科学専攻 生体情報科学講座講座 戸邊亨教授、前大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻生体情報科学講座 平井到准教授に謝意を表します。

学位を取得するにあたり、社会人枠としての入学およびその後の研究活動を支援していただきました関西医科大学 臨床検査医学講座 高橋伯夫教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究第1章から学術的なご支援をいただき、小生の β ラクタマーゼに関する活動の基礎をご教授いただきました、前国立感染症研究所細菌第二部長 荒川宜親先生に深謝いたします。

また、本研究は、近畿耐性菌研究会の助成によることを記し、ここに深く感謝するとともに、初代研究会代表の天理よろづ相談所病院臨床病理部副技師長（現 ファルコバイオシステムズ東京研究所顧問）相原雅典先生、前代表の神戸大学医学部附属病院検査部技師長（現 神戸大学医学部附属病院医療技術部部長）木下承皓先生、ならびに現代表である兵庫医科大学病院臨床検査部・感染制御部主任技師 和田恭直先生をはじめ、数々の御助言を賜りました近畿耐性菌研究会会員の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

これら研究を実施するに当たり、多大なご理解をいただきました関西医科大学附属枚方病院および滝井病院 臨床検査部のスタッフに厚く御礼申し上げます。

最後に私を支えてくださった全ての人々に感謝するとともに、この場をお借りしてお礼を申しあげたいと思います。誠にありがとうございました。

関連発表

I . 原著論文および総説

- 1) 中村竜也,内田幸子, 平城均, 榊田緑, 高橋伯夫, 小松方, 相原雅典, 黒川博史, 柴田尚宏, 八木哲也, 荒川宜親 : 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 ESBL (SHV-12) , 感染症学雑誌 2000; 74: 112-119
- 2) 中村竜也, 柴田尚宏, 土井洋平, 奥田和之, 中田千代, 平城均, 松尾信昭, 榊田緑, 高橋伯夫, 荒川宜親: 1991 年から 2000 年に血液培養により分離された *Serratia marcescens* における IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼ産生株の解析, 感染症学雑誌 2002; 76: 246-253
- 3) 佐藤かおり, 島川宏一, 小松 方, 浦 敏郎, 木下承皓, 山崎勝利, 西尾久明, 鷺津良道, 山下知成, 中村竜也, 和田恭直, 豊川真弘, 幸福知己, 相原雅典 : 近畿地区で分離された *Streptococcus pneumoniae* の抗菌薬耐性状況と PBP 遺伝子変異について. 感染症学雑誌 76 : 254-262, 2002.
- 4) 中村竜也, 松尾信昭, 高橋伯夫 : 血液から分離された腸内細菌科グラム陰性桿菌の β -ラクタム薬耐性に関する解析, 日本化学療法学会雑誌 2002; 50: 777-785
- 5) 中村 竜也, 高橋 伯夫: 血液培養から分離されたコアグララーゼ陰性ブドウ球菌の薬剤感受性と teicoplanin 耐性について, 感染症学雑誌 2004; 78: 46-53
- 6) 中村竜也, 内田幸子, 田中敬一郎, 佐野みゆき, 中田千代, 平城均, 高橋伯夫: 基礎試薬 HMRZ-86 を用いた β -ラクタマーゼ検出試薬による Extended-spectrum β -Lactamase および Metallo- β -lactamase の検出に関する検討, 臨床微生物迅速診断研究会誌 2004; 15: 15-20
- 7) 中村竜也, 高橋伯夫: 各種臨床分離株の経口セフェム系薬に対する薬剤感受性と Pharmacokinetics / Pharmacodynamics(PK/PD) 理論を用いたその有効性について, The Japanese Journal of Antibiotics, 2004; 57: 465-474
- 8) Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, Satoh K, Toyokawa M, Nakamura T, Wada Y, Orita T, Kofuku T, Yamasaki K, Sakamoto M, Kinoshita S, Aihara M, Arakawa Y. Metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki Region of Japan. Journal of Clinical Microbiology 42, 5256-5263, 2004.
- 9) 中村竜也, 小松方: Extended spectrum beta-lactamase 産生 *Escherichia coli* および *Klebsiella*

- pneumoniae* の各種抗菌薬に対する薬剤感受性について. The Japanese Journal of Antibiotics 2005;58:1-10
- 10) Nakamura T, Takahashi H : Screening of antibiotics resistance to Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* by an advanced expert system, Journal of Infection and Chemotherapy 2005; 11:288-92
 - 11) 中村 竜也, 清水千裕, 笠原麻友美, 田中 敬一郎, 中田千代, 高橋伯夫:血液培養由来 *Pseudomonas aeruginosa* に対するカルバペネム系、フルオロキノロン系およびアミノグリコシド系抗菌薬の抗菌力, 新薬と臨床 2006; 55: 28-35
 - 12) Nakamura T, Takahashi H : Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. Antifungal agents, features associated with the candidemia, Journal of Infection and Chemotherapy, 2006; 12:132-138
 - 13) 中村 竜也, 小松 方, 島川 宏一, 末吉 範行, 佐藤 かおり, 豊川 真弘, 西尾 久明, 和田 恭直, 折田 環, 幸福 知己, 坂本 雅子, 岡本 貴隆, 赤木 征宏, 木下 承皓: 近畿地区における *Proteus mirabilis* の ESBL 産生菌分離状況と疫学解析, 感染症学雑誌 2006;80:231-237
 - 14) Nakamura T, Shimizu C, Kasahara M, Nakata C, Munakata M, Takahashi H. : Difference in Breakpoints of Antimicrobial Susceptibility Against *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Blood Culture, set by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and Japanese Society of Chemotherapy, Journal of Infection and Chemotherapy, 2007;13:24-29
 - 15) 中村 竜也:一つの発見から得た大きな財産, 臨床病理 2008;56:896-899
 - 16) Nakamura T, Shimizu C, Kasahara M, Okuda K, Nakata C, Fujimoto H, Okura H, Komatsu M, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, Satoh K, Toyokawa M, Wada Y, Orita T, Kofuku T, Yamasaki K, Sakamoto M, Nishio H, Kinoshita S, Takahashi H. Monte Carlo simulation for evaluation of the efficacy of carbapenems and new quinolones against ESBL-producing *Escherichia coli*. Journal of Infection and Chemotherapy 15, 13-7, 2009.
 - 17) 中村 竜也, 清水千裕, 平川 要, 乾 佐知子, 奥田和之, 中田千代, 藤本弘子, 大倉ひろ枝, 植村芳子, 高橋伯夫 : キノロン系抗菌薬の各種臨床分離株に対する抗菌力と PK-PD 理論を用いたその有効性について, The Japanese Journal of Antibiotics 2009;62:194-202
 - 18) 中村 竜也, 清水 千裕, 乾 佐知子, 佐野 一, 奥田 和之, 中田 千代, 藤本 弘子, 大倉 ひろ 枝, 植村 芳子, 高橋 伯夫: 糞便中の ESBL 産生腸内細菌スクリーニングの有用性, 日

本臨床微生物学会 2009 ; 19: 230-235

- 19) Tatsuya Nakamura, Mayumi Sato, Chihiro Shimizu, Kazuyuki Okuda, Chiyo Nakata, Hiroko Fujimoto, Hiroe Ookura, Hakuo Takahashi: Performance of BD Phoenix in Identification and Susceptibility Testing of *Streptococcus pneumoniae*, *Lab Medicine* 2010 41:403-409
- 20) Nakamura T, Komatsu M, Yamasaki K, Fukuda S, Miyamoto Y, Higuchi T, Ono T, Nishio H, Sueyoshi N, Kida K, Satoh K, Toda H, Toyokawa M, Nishi I, Sakamoto M, Akagi M, Nakai I, Kofuku T, Orita T, Wada Y, Zikimoto T, Koike C, Kinoshita S, Hirai I, Takahashi H, Matsuura N, Yamamoto Y. : Epidemiology of *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Proteus mirabilis* strains producing extended-spectrum β -lactamases from clinical samples in the Kinki Region of Japan. *Am J Clin Pathol.* 2012; 137: 620-6.

II. 学会発表

- 1) 中村竜也, 平城均, 中田千代, 小川昇, 高橋伯夫, 黒川博史, 柴田尚弘, 八木哲也, 荒川宜親: SHV 型 ESBL 産生大腸菌が分離された直腸腫瘍切除後感染症の 1 症例, 第 46 回 日本臨床病理学会 (熊本, 1999 年 10 月)
- 2) 中村竜也, 榎原雅美, 内田幸子, 佐野みゆき, 奥田和之, 平城均, 中田千代, 松尾信昭, 高橋伯夫: 当院におけるメタ β ラクターゼ 産生 *Serratia marcescens* の分離状況と疫学的解析, 第 74 回日本感染症学会総会 (福岡, 2000 年 4 月)
- 3) 佐藤かおり, 相原雅典, 島川宏一, 小松 方, 浦 敏郎, 木下承皓, 山崎勝利, 西尾久明, 鷺津良道, 山下知成, 中村竜也, 和田恭直: 近畿地区で分離された肺炎球菌の薬剤耐性状況と遺伝子変異について, 第 12 回日本臨床微生物学会総会 (岐阜, 2001 年 2 月)
- 4) 山下知成, 鷺津良道, 中村竜也, 佐藤かおり, 木下承皓, 浦 敏郎, 西尾久明, 和田恭直, 山崎勝利, 島川宏一, 小松 方, 相原雅典: 近畿地区で分離されたインフルエンザ菌の薬剤耐性状況, 第 12 回日本臨床微生物学会総会 (岐阜, 2001 年 2 月)
- 5) 中村竜也, 奥田和之, 中田千代, 平城均, 高橋伯夫 : KOXY 型 β ラクターゼ 過剰産生 *K. oxytoca* 及びメタ β ラクターゼ 産生 *P. rettgeri* が検出された 1 症例, 第 75 回日本感染症学会総会 (奈良, 2001 年 3 月)
- 6) 中村竜也, 柴田尚宏, 土井洋平, 松尾信昭, 荒川宜親: 当院におけるメタ β ラクターゼ 産生 *S. marcescens* の分離状況と IMP-1 型と IMP-2 型が同時検出された 1 症例, 第 49 回日本化学療法学会総会 (横浜, 2001 年 5 月)

- 7) 中村竜也、樫原雅美、佐野みゆき、中田千代、平城均: *Enterobacter cloacae* および *Citrobacter freundii* における β ラクタム薬耐性に関する解析, 第 13 回日本臨床微生物学会総会 (東京, 2002 年 1 月)
- 8) 中村竜也、奥田和之、中田千代、平城均、松尾信昭、高橋伯夫: 腸内細菌科の β ラクタム薬耐性機序に関する解析とその臨床背景について, 第 76 回日本感染症学会総会 (東京, 2002 年 4 月)
- 9) 相原雅典, 山崎勝利, 和田恭直, 折田 環, 幸福知己, 佐藤かおり, 中村竜也, 豊川真弘, 西尾久明, 小松 方, 島川宏一, 木下承皓, 末吉範行, 山下知成: 近畿地区 13 医療機関において分離した主要病原菌の耐性化に関する調査研究, 第 50 回日本化学療法学会総会 (神戸, 2002 年 5 月)
- 10) 西尾久明, 小松 方, 島川宏一, 木下承皓, 末吉範行, 山崎勝利, 和田恭直, 折田 環, 幸福知己, 佐藤かおり, 中村竜也, 豊川真弘, 相原雅典: 近畿地区におけるメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の分離調査, 第 50 回日本化学療法学会総会 (神戸, 2002 年 5 月)
- 11) 中村竜也、松尾信昭: 臨床材料から分離された腸内細菌科の β ラクタム薬耐性機序に関する解析, 第 50 回日本化学療法学会総会 (神戸, 2002 年 5 月)
- 12) 中村竜也、松尾信昭: 1991 年から 2000 年に血液から分離された腸内細菌の薬剤感受性と β ラクタム薬耐性について, 第 50 回日本化学療法学会総会 (神戸, 2002 年 5 月)
- 13) 中村竜也, 山崎勝利, 木下承皓, 和田恭直, 折田 環, 幸福知己, 西尾久明, 佐藤かおり, 豊川真弘, 末吉範行, 島川宏一, 小松 方, 相原雅典: 近畿地区における *Escherichia coli* および *Klebsiella* spp. から ESBL 産生菌の分離調査, 第 50 回日本化学療法学会総会 (神戸, 2002 年 5 月)
- 14) 佐藤かおり, 浦 敏郎, 木下承皓, 山崎勝利, 西尾久明, 山下知成, 中村竜也, 和田恭直, 豊川真弘, 幸福知己, 折田 環, 末吉範行, 坂本雅子, 相原雅典: 過去 4 年間に近畿地区で分離された肺炎球菌の抗菌薬耐性状況, 第 14 回日本臨床微生物学会総会 (名古屋, 2003 年 1 月)
- 15) 山下知成, 坂本雅子, 相原雅典, 島川宏一, 小松 方, 山崎勝利, 木下承皓, 和田恭直, 折田 環, 幸福知己, 西尾久明, 浦 敏郎, 佐藤かおり, 中村竜也, 豊川真弘, 末吉範行: 近畿地区にて分離されたインフルエンザ菌の薬剤耐性菌調査成績, 第 14 回日本臨床微生物学会総会 (名古屋, 2003 年 1 月)
- 16) 坂本雅子, 小松 方, 中村竜也, 山崎勝利, 西尾久明, 佐藤かおり, 島川宏一, 豊川真

弘, 和田恭直, 末吉範行, 幸福知己, 折田 環, 浦 敏郎, 木下承皓, 相原雅典: 近畿地区における *Escherichia coli* および *Klebsiella spp.* 以外の腸内細菌からの ESBL 産生菌検出に関する調査および耐性遺伝子の検討, 第 14 回日本臨床微生物学会総会 (名古屋, 2003 年 1 月)

- 17) 中村竜也, 山崎勝利, 西尾久明, 佐藤かおり, 小松 方, 島川宏一, 豊川真弘, 和田恭直, 末吉範行, 幸福知己, 折田 環, 坂本雅子, 浦 敏郎, 木下承皓, 相原雅典: 近畿地区における *Escherichia coli* および *Klebsiella spp.* からの ESBL 産生菌の分離調査 (第 3 期調査成績), 第 14 回日本臨床微生物学会総会 (名古屋, 2003 年 1 月)
- 18) 中村竜也, 奥田和之, 中田千代, 平城均, 高橋伯夫: 腸内細菌科、緑膿菌および *Acinetobacter spp.* における VITEK 2 Advanced Expert System の性能について), 第 14 回日本臨床微生物学会総会 (名古屋, 2003 年 1 月)
- 19) 西尾久明, 小松 方, 島川宏一, 木下承皓, 末吉範行, 山崎勝利, 和田恭直, 折田 環, 幸福知己, 浦 敏郎, 佐藤かおり, 中村竜也, 豊川真弘, 坂本雅子, 相原雅典: 過去 2 年間の近畿地区におけるメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の分離調査, 第 14 回日本臨床微生物学会総会 (名古屋, 2003 年 1 月)
- 20) 中村竜也, 榎原雅美, 佐野みゆき, 中田千代, 高橋伯夫 : 1992 から 2001 年に血液から分離されたコアグララーゼ陰性ブドウ球菌の薬剤感受性と teicoplanin 耐性について, 第 77 回日本感染症学会総会 (福岡, 2003 年 4 月)
- 21) 相原雅典, 小松 方, 山崎勝利, 木下承皓, 幸福知己, 西尾久明, 佐藤かおり, 中村竜也, 豊川真弘, 山下知成: 近畿地区における臨床上重要な耐性菌の調査結果と経年的推移, 第 77 回日本感染症学会総会 (福岡, 2003 年 4 月)
- 22) 中村竜也, 高橋伯夫: 過去 10 年間に血液培養から分離された酵母様真菌の薬剤感受性と臨床背景について, 第 51 回日本化学療法学会総会 (横浜, 2003 年 4 月)
- 23) 西尾久明, 小松 方, 島川宏一, 木下承皓, 末吉範行, 山崎勝利, 和田恭直, 折田 環, 幸福知己, 浦 敏郎, 佐藤かおり, 中村竜也, 豊川真弘, 樋口武史, 坂本雅子, 相原雅典: 近畿地区から分離されたメタロ- β -ラクタマーゼ産生 *Pseudomonas aeruginosa* の調査成績と細菌学的検討, 第 43 回近畿医学検査学会 (京都, 2003 年 10 月)
- 24) 山下知成, 小松 方, 山崎勝利, 和田恭直, 折田 環, 幸福知己, 西尾久明, 末吉範行, 佐藤かおり, 中村竜也, 豊川真弘, 坂本雅子, 島川宏一, 木下承皓, 相原雅典: 近畿地区にて分離された *H. influenzae* の薬剤耐性状況, 第 15 回日本臨床微生物学会総会 (つく

ば，2004 年 1 月)

- 25) 幸福知己，木下承皓，折田 環，山下知成，坂本雅子，佐藤かおり，豊川真弘，中村竜也，末吉範行，山崎勝利，西尾久明，浦 敏郎，小松 方，島川宏一，相原雅典：近畿地区で分離された淋菌に関する抗菌薬耐性化第 2 回目調査・検討，第 15 回日本臨床微生物学会総会（つくば，2004 年 1 月）
- 26) 佐藤かおり，小松 方，島川宏一，浦 敏郎，木下承皓，山崎勝利，西尾久明，山下知成，中村竜也，和田恭直，豊川真弘，幸福知己，折田 環，末吉範行，坂本雅子，相原雅典：過去 5 年間に近畿地区で分離された肺炎球菌の抗菌薬耐性状況の推移，第 78 回日本感染症学会総会（東京，2004 年 4 月）
- 27) 中村竜也，山崎勝利，木下承皓，和田恭直，折田 環，幸福知己，西尾久明，末吉範行，島川宏一，小松 方，浦 敏郎，佐藤かおり，豊川真弘，坂本雅子，山下知成，水谷 哲，相原雅典：近畿地区における *Escherichia coli* および *Klebsiella* spp.における ESBL 産生菌の分離調査（第 4 期調査成績），第 78 回日本感染症学会総会（東京，2004 年 4 月）
- 28) 中村竜也、高橋伯夫：ESBL 産生腸内細菌に対する ニューキノロン系薬およびカルバペネム系薬の薬剤感受性について，第 52 回日本化学療法学会総会（沖縄，2004 年 6 月）
- 29) 中村竜也、小松方、島川宏一、末吉範行、佐藤かお、豊川真弘、西尾久明、和田恭直、折田環、幸福知己、坂本雅子、岡本貴隆、赤木征宏、木下承皓：近畿地区における *Proteus mirabilis* の ESBL 産生菌分離状況と疫学解析，第 15 回日本臨床微生物学会総会（京都，2005 年 1 月）
- 30) 中村竜也、高橋伯夫：各種臨床分離株に対する経口セフェム系薬剤の薬剤感受性と PK/PD 理論を用いたその有効性について，第 79 回日本感染症学会総会（東京，2005 年 4 月）
- 31) 中村竜也、高橋伯夫：当院で血液から分離された緑膿菌に対する各種抗菌薬の抗菌力，第 53 回日本化学療法学会総会（東京，2005 年 5 月）
- 32) 中村竜也、山崎勝利、和田恭直、折田環、西尾久明、末吉範行、佐藤かおり、豊川真弘、坂本雅子、水谷哲、小松方、島川宏一、木下承皓：近畿地区における *Escherichia coli* ，*Klebsiella* spp. および *Proteus mirabilis* からの ESBL 産生菌の分離調査 ～第 6 期目調査報告～，第 80 回日本感染症学会総会（東京，2006 年 4 月）
- 33) 中村竜也、高橋伯夫：Monte Carlo Simulation を用いた血液由来緑膿菌に対する カルバペネム薬の有効率について，第 54 回日本化学療法学会総会（京都，2006 年 5 月）
- 34) 中村竜也、山崎勝利、和田恭直、折田環、西尾久明、末吉範行、佐藤かおり、豊川真弘、

坂本雅子、水谷哲、小松方、島川宏一、木下承皓：*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. および *Proteus mirabilis* からの ESBL 産生菌の分離調査 第 7 期目調査報告, 第 16 回日本臨床微生物学会総会（東京, 2007 年 1 月）

- 35) 中村竜也、高橋伯夫：血液培養から検出された MRSA に対する抗 MRSA 薬の有効性評価について, 第 55 回日本化学療法学会総会（仙台, 2007 年 6 月）
- 36) 中村竜也、清水千裕、高橋伯夫：Monte Carlo Simulation を使用した 各種臨床分離株に対するキノロン系薬の有効性評価, 第 56 回日本化学療法学会（岡山, 2008 年 6 月）
- 37) 中村竜也、清水千裕、平川要、乾佐知子、奥田和之、中田千代、藤本弘子、大倉ひろ枝、高橋伯夫：自動細菌同定感受性測定機器における ESBL 産生腸内細菌検出の精度及び迅速同定に関する検討, 日本臨床検査自動化学会第 40 回大会（横浜, 2008 年 10 月）
- 38) 中村竜也、清水千裕、平川要、乾佐知子、奥田和之、中田千代、藤本弘子、大倉ひろ枝、植村芳子、高橋伯夫：OXA 型 Carbapenemase を産生する Multi-Drug Resistant *A. baumannii* の検出について, 第 20 回日本臨床微生物学会総会（仙台, 2009 年 1 月）
- 39) 中村竜也、木下承皓：近畿地区における *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. および *Proteus mirabilis* からの ESBL 産生菌の分離調査（第 9 期調査）, 第 20 回日本臨床微生物学会総会（仙台, 2009 年 1 月）
- 40) 中村竜也、清水千裕、乾佐知子、奥田和之、中田千代、藤本弘子、大倉ひろ枝、高橋伯夫：百日咳感染症の早期診断における real-time PCR 法の有用性, 第 24 回日本感環境感染学会総会（横浜, 2009 年 2 月）
- 41) 中村竜也、清水千裕、奥田和之、中田千代、藤本弘子、宮崎浩彰、松田公志、高橋伯夫：POT 法による MRSA 迅速疫学解析の効果について, 第 83 回日本感染症学会総会（東京, 2009 年 4 月）
- 42) 中村竜也、清水千裕、高橋伯夫：血液由来 MRSA の薬剤感受性と抗 MRSA 薬の治療効果に関する検討, 第 57 回日本化学療法学会総会（東京, 2009 年 6 月）
- 43) 中村竜也、清水千裕、乾佐知子、奥田和之、中田千代、藤本弘子、大倉ひろ枝、高橋伯夫：POT 法による MRSA 迅速疫学解析, 第 59 回日本医学検査学会（神戸, 2010 年 5 月）
- 44) 中村竜也、清水千裕、乾佐知子、高橋伯夫：ESBL 産生菌に対する各種経口抗菌薬の抗菌力, 第 58 回日本化学療法学会（長崎, 2010 年 6 月）
- 45) 中村竜也、小池千裕、木下承皓：近畿地区における *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. および *Proteus mirabilis* からの ESBL 産生菌の分離調査（第 11 期調査）, 第 22 回日本臨床微生物

学会総会（岡山，2011 年 1 月）

- 46) 中村竜也、小池千裕、高橋伯夫：血液由来 MRSA に対する抗 MRSA 薬の抗菌力および PK-PD 解析による有効性評価，第 59 回日本化学療法学会総会（北海道，2011 年 6 月）
- 47) 中村竜也、小池千裕、高橋伯夫：緑膿菌に対するカルバペネム系薬の抗菌力および PK-PD 解析による有効性評価，第 59 回日本化学療法学会総会（北海道，2011 年 6 月）
- 48) 中村竜也、乾佐知子、小池千裕、奥田和之、佐野一、中田千代、大倉ひろ枝、高橋伯夫：血液由来 MRSA の vancomycin および teicoplanin に対する” MIC creep” の検証，第 60 回日本医学検査学会（東京，2011 年 6 月）
- 49) 中村竜也、乾佐知子、奥田和之、小池千裕、佐野一、中田千代、大倉ひろ枝、高橋伯夫：GENECUBE を用いた血液培養からの MRSA 迅速同定法の確立，第 58 回日本臨床検査医学会学術集会（岡山，2011 年 11 月）
- 50) 中村竜也、乾佐知子、奥田和之、小池千裕、佐野一、中田千代、大倉ひろ枝、高橋伯夫：GENECUBE を用いた *Mycoplasma pneumonia* の検出およびマクロライド耐性，第 58 回日本臨床検査医学会学術集会（岡山，2011 年 11 月）