

日本財団補助金による

1999 年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

2000 年 3 月 1 日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 馬 靈
研究機関 東邦大学大学院医学研究科 研究指導者 山口 恵三 職名 教授
所在地 〒1438540 東京都大田区大森西 5-21-16 電話 03-3762-4151 内線 2391

研究テーマ 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼの分子生物学的解析

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

第 114 回東邦医学会総会

老人病院で発生した院内感染の原因菌であるセフトキシム耐性大腸菌の性質

第 114 回東邦医学会総会

各種 β -ラクタマーゼ遺伝子の迅速検出法の確立

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

雑誌名 感染症

論文名 ESBL 産生菌
(総説)

雑誌名 日本化学療法学雑誌

論文名 各種 β -ラクタマーゼ遺伝子の
迅速検出法の確立
(原著)

雑誌名 ル デパール

論文名 VitekII による薬剤感受性試験成績
およびそのコメントに関する検討
(原著)

雑誌名 日本化学療法学雑誌

論文名 塩酸セフェピムと各種 β -ラクタム系
抗菌薬に対する感受性および耐性菌
出現状況に関する Etest を用いた検討
(原著)

3. 今後の研究計画

現在、大学院の最終学年であり、大学院終了後もこのテーマに関する研究を続けていくことが可能かどうかは分からない。ただ、可能であれば4年間続けてきたテーマでもあり、さらに臨床に役立つような研究にかかわって行きたいと思っている。

4. 研究指導者の意見

馬 靈氏は、1996年4月に東邦大学大学院医学研究科に入学し、一貫して薬剤耐性菌の耐性機構の解明、特に β -ラクタマーゼによる耐性菌に関する研究を続けてきました。その主な成果は、1998年にアメリカ細菌学会が出版している Antimicrobial Agents and Chemotherapy に発表し、さらに、英国の細菌学会が出版している Journal of Antimicrobial and Chemotherapy に投稿中の論文もあります。日本語での論文も6報、1997年から今までに発表しています。また、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼに関する総説も2報共著ではありますが掲載されております。一方では、彼女の有している分子生物学的手技を生かして、感染症の遺伝子診断や院内感染の分子疫学的検討など公表はしていないものの、数多くの病院から寄せられた臨床材料を対象に検査を行ってきました。馬氏がこの4年間に日本で果たしてきた臨床微生物学に対する貢献度は極めて高いものと考えられます。したがって、大学院を修了した後も母国でこれまでの研究を継続できるような職種に就く事を希望しております。

今回の報告書を書くに当たり、数ある彼女の業績の中でも、今後の臨床細菌学の分野で汎用される可能性が極めて高い喀痰中の β -ラクタマーゼ活性の測定方法に関する検討を報告することにいたしました。この報告は、共著ではあるものの極めて独創性の高い論文であるとの評価も得ております。

1年間、馬氏に対してご援助下さいました財団法人日中医学協会に深謝申し上げます。

研究指導者氏名 山本 隆三 

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ

喀痰中 β -ラクタマーゼ活性の測定方法の確立に関する検討

研究者氏名

馬 壘

中国での所属・役職

日本での指導者氏名・所属・役職

山口 恵三・東邦大学大学院医学研究科・教授

要旨

喀痰から直接 β -ラクタマーゼを検出することを目的に、*Pseudomonas aeruginosa*が分離された喀痰を対象とした β -ラクタマーゼ活性の測定方法を確立した。喀痰からの抽出操作は30分以内に終了した。*P. aeruginosa*が 10^6 cfu/mL存在する喀痰からの抽出液を $100\mu\text{M}$ のニトロセフィン溶液に添加して5分間 37°C で経時的に吸光度を測定したところ、きわめて良好な直線関係得ることができた。一方、 10^6 cfu/mLの*Enterococcus faecalis*が存在する検体からは β -ラクタマーゼ活性は認められなかった。次ぎに検出された菌量が異なる複数の検体を用いて検出限界に関する検討を行った。その結果、*P. aeruginosa*が 10^5 cfu/mL以上の菌量が存在する検体からは β -ラクタマーゼ活性が検出された。また、ペニシリナーゼを産生する*Escherichia coli*が 10^7 cfu/mL存在する喀痰の K_m 値は $127\mu\text{M}$ と大きな値を示し、セファロsporリナーゼを産生する*P. aeruginosa*の値とは大きく異なった。以上の結果から、今回検討した方法は迅速、簡便且つ高感度で検体から β -ラクタマーゼを検出することが可能な方法であった。

KEY WORDS

喀痰、 β -ラクタマーゼ、ニトロセフィン、UV法

はじめに

臨床では感染症の原因菌が同定される以前に経験的な抗菌薬の投与がなされる場合が多いのが現実である。感染症の原因菌と考えられる微生物の耐性因子を検体から直接検出することが可能になれば、菌の分離、同定あるいは薬剤感受性検査の結果が出る以前に、よりの確な抗菌薬の投与が可能になると考えられる。これまでも喀痰からの β -ラクタマーゼ活性の測定に関しては、高速液体クロマトグラフィーを用いる方法が報告されているが(1)、操作が煩雑なことと結果が出るまでに時間を要することなどの理由から一般的な方法とはなっていない。

今回は検体から直接、簡便且つ迅速に β -ラクタマーゼを酵素学的方法で検出することを目的として、現在最も高感度な β -ラクタマーゼ検出試薬として知られているニトロセフィンを基質として用いる検出方法の確立を試みた。

材料および方法

1. 対象とした喀痰

呼吸器疾患の患者由来の喀痰で*Pseudomonas aeruginosa*が分離された9検体を対象とした。さらに、典型的なペニシリナーゼを産生する*Escherichia coli*が分離された喀痰も使用した。なお、喀痰から分離された菌種はVitek(日本ビオメリュー、東京)を用いて同定した。

2. 喀痰からのβ-ラクタマーゼの抽出方法

検体の処理は、喀痰200μLを1.5 mLのマイクロチューブに移し、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0) 200μLを加えてホモジナイザーでホモジネート後、1000,000 G、4°Cにて15分間超遠心機を用いて遠心し、その上清を酵素液とした(図1)。

3. 分離された菌体からのβ-ラクタマーゼの抽出方法

各菌株をL-brothで一夜培養した5mLの菌液を3,500 rpm、4°C、15分間遠心して集菌した。その沈査を50mMのリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄し、100μLの同緩衝液に再浮遊した後凍結融解を5回繰り返した。その後、1000,000 G、4°C、30分間の超遠心を行い、得られた上清を粗酵素液とした(図2)。

4. β-ラクタマーゼ活性の測定方法

酵素反応はBeckman自記吸光度計DU640恒温槽付きを用いて3mLの基質となるニトロセフィン溶液に試料となる酵素液50μLを添加して、波長482nm、反応温度37°Cの条件(2)でUV法(3)により行った(表1)。

実験に先立ち100μMの濃度のニトロセフィン溶液に*P. aeruginosa*が 10^6 cfu/mL検出された喀痰からの抽出液、*E. faecalis*が 10^6 cfu/mL検出された喀痰からの抽出液を50μL添加して5分間のタイムスキャンを実施し、酵素との反応性を確認した。

基質となるニトロセフィンは10μM、25μMおよび100μMの濃度の溶液を使用した。酵素活性の算出は、反応開始後1分間に生じるOD値の変化をもとに次式から行った。

$Activity = y / 1.59 \times 0.3 \times v$ ($v = 3.05 / 0.05 \times 2$, $y = \Delta OD / \text{min}$) さらに、酵素学的パラメータは、Michaelis-Menten plotを行い、その座標をから算出した(4)。なお、実験で得られた値は、Lineweaver-Burk plot、Eadie-Hofstee plot、Hanes-Woolf plotの各プロットも同時に行い、実験値の信頼性を確認した(4)。

5. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は日本化学療法学会が定めた微量液体希釈法に準じて測定した。力価が明らかなpiperacillin(富山科学工業株式会社、東京)、imipenem(萬有製薬株式会社、東京)、cefsulodine(武田薬品工業株式会社、大阪)、cefoperazone(ファイザー製薬株式会社、東京)、ceftazidime(日本グラクソ株式会社、東京)、ceftiprome(ブリストル・マイヤーズ・スクイブ株式会社、東京)およびaztreonam(エーザイ株式会社、東京)の各抗菌薬を対象薬剤とした。なお、培地はMuller-Hinton broth(Difco、USA)を使用し、接種菌量は約 5×10^5 となるように設定した。

結 果

1. ニトロセフィンと喀痰からの抽出液との反応性

*P. aeruginosa*が 10^6 cfu/mL検出された喀痰からの抽出液50μLを用い、ニトロセフィン溶液と5分間、30秒毎に吸光度を測定しながら反応させた場合、きわめて良好な直線関係が得られた。同様に*E. faecalis*が喀痰から抽出された溶液のβ-ラクタマーゼ活性 10^6 cfu/mL検出された喀痰からの抽出液を用いて5分間、経時的に吸光度を測定したが吸光度の変化は認められなかった(図3)。

2. 喀痰中β-ラクタマーゼの活性測定

喀痰中からの抽出操作は30分以内に終了した。今回は*P. aeruginosa*が $10^4 \sim 10^7$ cfu/mL分離された喀痰を対象に検討を加えた。*P. aeruginosa*が分離された喀痰からは 10^4 cfu/mLの菌量

でも十分に β -ラクタマーゼ活性の測定が可能であり、喀痰中に存在する β -ラクタマーゼの酵素学的パラメータをMichaelis-Menten plotから算出することが可能であった(表2)。さらに、そのデータをLineweaver-Burk plot、Eadie-Hofstee plot、Hanes-Woolf plotの各plotでも検討したが、いずれのplotにもよくフィットした。

3. 喀痰から分離された菌株の薬剤感受性成績

表3に各喀痰から分離された*P. aeruginosa*の各抗菌薬に対する薬剤感受性試験の成績を示した。I株を除く菌株のimipenemに対するMICは $4\mu\text{g/mL}$ 以上の値を示した。B株、C株およびF株のaztreonamに対するMIC値はそれぞれ、 $4\mu\text{g/mL}$ 、 $8\mu\text{g/mL}$ 、 $2\mu\text{g/mL}$ であったが他の菌株は $16\mu\text{g/mL}$ 以上の値を示した。

4. 喀痰から分離された菌株の β -ラクタマーゼ活性

喀痰から分離された菌株の β -ラクタマーゼ活性を表4に示した。C株およびE株の V_{max} 値が各々 $0.495\mu\text{M/sec}$ 、 $0.673\mu\text{M/sec}$ と高い値を示した。一方、A株およびF株から抽出した β -ラクタマーゼ活性は各々 $0.012\mu\text{M/sec}$ 、 $0.011\mu\text{M/sec}$ と低い値を示した。

考 察

現在まで、喀痰中 β -ラクタマーゼ活性の測定は、あらかじめ酵素と基質を反応させその分解産物を高速液体クロマトグラフィーで定量して求める方法が報告されている(1)。しかし、この方法は検体の処理が極めて煩雑であること、迅速に検査が行えないこと、酵素学的パラメータを算出することが困難なことなどの理由から一般的な方法とはなり得ないと考えられる。

今回検討した β -ラクタマーゼを検出する方法は、簡便、迅速且つ高感度な方法であった。さらに、酵素学的パラメータを算出することも可能であり、 V_{max} および K_m 値に対する解析を加えれば β -ラクタマーゼの型の推定も可能であるものと考えられた。しかし、現在問題となっている基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(5)や複数の型の β -ラクタマーゼが一つの菌体内に存在する場合(6)などのデータの解析は今後の課題である。しかし、阻害剤との併用とその時の酵素学的パラメータの詳細な解析を加えれば、喀痰中に存在する β -ラクタマーゼの型もある程度判別することが可能となるものと思われた。

喀痰中 β -ラクタマーゼの活性と分離された菌種のMICとの間にいくつか食い違う結果が認められた。この結果が乖離した原因として、MIC測定をされる菌株は、喀痰中に存在する多くの菌株の中に存在する限られた菌株であることが挙げられる。したがって、MICを測定された菌株の値は、全ての菌株の代表値ではありえないと考えられる。

一方、今回報告した方法の問題点としては、検体を採取した時点で抗菌薬が投与されている場合が挙げられる。すなわち、 β -ラクタマーゼと投与された β -ラクタム系抗菌薬が結合している場合、正確な酵素学的パラメータを得ることはできないと考えられる。したがって、この方法を実施する場合に最も重要なことは、患者に対して投与されている抗菌薬に関する情報を得ることであると考えられた。

今後は喀痰以外の検体中に存在する β -ラクタマーゼの活性測定に関する検討を加えるとともに、様々な型の β -ラクタマーゼの酵素学的パラメータに関するデータを収集し、更なる応用の可能性について検討を加える予定である。

文 献

1. 齋藤 厚、草野展周、普久原 浩、副島林造、中浜 力、二木芳人、橋口浩二、山口恵三、館田一博、石井良和、大野 章：呼吸器感染症におけるclindamycinの臨床効果の検討—clindamycinの β -lactamase産生抑制作用を中心に—。1993. *Chemotherapy* 41:1232-1245.
2. O'Callaghan, C. H., A. Morris, S. M. Kirby, and A. H. Shingler. 1973. Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalexin substrate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1:283-288.
3. Waley, S. G. 1974. A spectrophotometric assay of β -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139:789-790.
4. Cleland, W. W. 1977. Determining the mechanism of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol.* 45. 273- 387.
5. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39(6):1211-1233.
6. Ma, L., Y. Ishii, M. Ishiguro, H. Matsuzawa, and K. Yamaguchi. 1998. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(5):1181-1186.

塩酸セフェピムと各種 β -ラクタム系抗菌薬に対する Etest を用いた薬剤感受性および耐性菌の出現状況に関する検討

石井良和、馬 リン、山口恵三
東邦大学医学部 微生物学教室

要 旨

cefepime (CFPM) をはじめとする β -ラクタム系抗菌薬間での感受性および耐性菌の出現状況を把握するために全国レベルでの疫学調査を行った。今回の検討には Etest を使用した。Etest を使用するにあたり、精度管理株を用いて再現性および施設間の誤差に関して調査を行ったが、再現性ならびに施設間の誤差とも少なく、ほぼ満足できる結果が得られた。今回はグラム陽性菌として oxacillin 感性の *Staphylococcus aureus* および oxacillin 感性の coagulase negative staphylococcus を対象としたが、ceftazidime (CAZ) を除いて耐性株の出現は認められなかった。*Escherichia coli* には piperacillin (PIPC) に対する耐性菌が 14.6% 存在したが、そのほかの抗菌薬に対する耐性菌は 0.5% であった。*Klebsiella spp.* および *Citrobacter freundii* に対しては、CFPM および imipenem (IPM) には耐性株が認められなかった。*Enterobacter spp.* には IPM が 0.5%、CFPM が 1.0% の割合で、*Serratia spp.* に対しては IPM が 4.5%、CFPM が 5.0% の割合でそれぞれ耐性株が認められたが他の抗菌薬に対する耐性菌の出現率と比較して小さい値を示していた。Indole-positive *Proteus* の場合、CFPM は CAZ と同様に耐性菌の出現率が低く 0.5% であった。*Pseudomonas aeruginosa* に対しては今回対象とした薬剤の中では CFPM の感受性が最も優れており、耐性率も 9.1% であった。一方、CAZ は 11.4%、IPM は 22.4% の値を示した。以上の結果から、CFPM に対する耐性菌の出現は、今回対象とした他の β -ラクタム系抗菌薬と比較すると低いものと考えられた。

序 文

現在まで様々な抗菌薬が開発され、臨床応用されているがそれらの抗菌薬に対する耐性菌が必ず出現してきた。第三世代、第四世代セフェム系抗菌薬あるいはカルバペネム系抗菌薬もその例外ではなかった。第三世代、第四世代セフェム系抗菌薬は腸内細菌科の菌種や *Pseudomonas aeruginosa* をはじめとするグラム陰性菌が産生する β -ラクタマーゼに安定な抗菌薬としてドラッグデザインされている。ところが、これら β -ラクタマーゼに安定な抗菌薬を分解する菌株が 1980 年代に欧米を中心に出現してきた 1)。これらの菌株は基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼと呼ばれ、クラス A に属する β -ラクタマーゼが点変異を起こして、第三世代、第四世代セフェム系抗菌薬まで分解することが可能となったのである 2)。カルバペネム系抗菌薬は、通常はこれら基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼにも安定であるが、BlaIMP と呼ばれているクラス B に属する β -ラクタマーゼに効率良く分解される 3)。

このクラス B β -ラクタマーゼは、モノバクタム系抗菌薬を除く多くの β -ラクタム系抗菌薬を分解することができる。この BlaIMP は、本邦で多く見出されており、欧米での報告は極めて少ないのが現状である。カルバペネム系抗菌薬に対しては当初より、*P. aeruginosa* においてその透過口である D2 ポーリンの欠損による耐性が問題となっていた。この D2 ポーリンの欠損によるイミペネム耐性は第三世代、第四世代セフェム系抗菌薬耐性との交差耐性は一般的に認められない 4)。

塩酸セフェピムは、世界 50 数カ国で承認されている第 4 世代のセフェム系抗菌薬であり、 β -ラクタマーゼに安定で、特に *P. aeruginosa* に対して抗菌力を発揮することがその特徴である。私達は、世界的規模での cefepime をはじめとする主な β -ラクタム系抗菌薬間での感受性および耐性菌出現状況の比較検討の一環として、日本全国 22 施設における *P. aeruginosa* を含む 1996 年 10 月～1997 年 3 月の間に臨床から分離された菌株を対象として、Etest を用いて薬剤感受性試験を実施した。

材料と方法

今回のトライアルには東邦大学、東京医科大学、北里大学、聖マリアンナ医科大学、大阪大学、関西医科大学、川崎医科大学、川崎医科大学附属川崎病院、久留米大学、福岡大学、長崎大学第二内科、長崎大学熱帯医学研究所、済生会宇都宮病院、信楽園病院、国立療養所西新潟中央病院、癌研究会附属病院、社会保険中央総合病院、神奈川県衛生看護専門学校附属病院、神奈川県立循環器呼吸器病センター、大手前病院、済生会吹田病院、天理よろづ相談所病院の 22 病院が参加した。各施設は 1996 年 10 月～1997 年 3 月の間に臨床から分離された、oxacillin 感性 *Staphylococcus aureus*、oxacillin 感性 coagulase-negative *Staphylococci*、*Escherichia coli*、*Klebsiella* spp.、*Citrobacter freundii*、*Enterobacter* spp.、indole-positive *Proteus*、*Serratia* spp.、*Acinetobacter* spp.、*P. aeruginosa* の 10 菌種各 10 株ずつを対象として、各病院において Etest ストリップ (AB バイオディスク社、スウェーデン) を用いて薬剤感受性試験を実施した。対象薬剤は、piperacillin (グラム陰性菌)、oxacillin (グラム陽性菌)、ceftazidime、cefpime、cefoperazone/sulbactam(2:1)、imipenem とした。なお、各施設で分離された菌株は全て薬剤感受性試験成績の結果と共に東邦大学医学部微生物学教室に送付された。

Etest ストリップ、Mueller Hinton 寒天培地(BBL、U.S.A.)、精度管理用菌株は全ての施設が同一ロットのものを使用した。対象菌株は、Mueller Hinton 寒天培地を用いて純培養した数個のコロニーを、生理食塩液に Macfaland0.5 の濃度になるように懸濁した。その菌液を Mueller Hinton 寒天培地にシャーレを 90 度ずつ回転させ、菌液を 3 回塗抹した。この菌液を塗抹した寒天培地上に常温に戻した Etest ストリップを放射状に貼付し、*Staphylococci* は 35°C で 24 時間、その他の菌種は 35°C で 16～18 時間ふ卵器で培養した後、その最小発育阻止濃度 (MIC) 値を読み取った(Fig.1)。

各施設で得られたデータは東邦大学医学部微生物学教室で一括集計し、菌株の同定、薬

剤感受性試験結果に関して疑わしいと思われるデータは同教室において同定および薬剤感受性試験を再度行い、誤りが認められた菌株のデータは削除した。

本試験の実施に当たり、事前に参加施設の実施責任者が集まり、その Etest ストリップの使用方法、判定方法など今回の試験に関する全てのプロトコールについて事前確認した。さらに、この試験では実施施設全てに同一クローンの *E. coli* ATCC25922、*S. aureus* ATCC29213、*P. aeruginosa* ATCC27853、*E. coli* ATCC35218(cefoperazone/ sulbactam の場合)および米国アイオワ大学の Ronald Jones 教授から分与された耐性株 *Enterobacter cloacae* SD-AmpC、*Citrobacter diversus* D-11、*E. coli* D-05、*S. aureus* D-05、coagulase-negative Staphylococci の各菌株を配布して精度管理に供した。

結 果

(1)精度管理株の薬剤感受性試験結果

Fig.1 に精度管理株を用いた検討の結果を示す。*S. aureus* ATCC29213 に対しては oxacillin、cefepime、cefoperazone/ sulbactam が全て指定された数値の範囲を示し、その一致率は100%であり、imipenemの一致率は最も低かったものの96.8%であった。*E. coli* ATCC25922 に対しては piperacillin(95.3%)を除き全ての対象薬ストリップが指定された数値の範囲を示し、その一致率は100%であった。*E. coli* ATCC352118 に対しては cefoperazone/ sulbactam のみが対象となったが、これも指定された数値の範囲を示した。*P. aeruginosa* ATCC27853 に対しては ceftazidime および cefpirome の一致率が100%であったが、piperacillin、cefepime、imipenem の一致率は96.9%、は cefoperazone/ sulbactam は指定された数値を示した菌株は全体の95.3%であった。

(2)施設間の測定誤差

Fig.2 に施設間の測定誤差を示す。参加施設間における正確さは100%~93.3%であった。その誤差のほとんどは Minor に属し、Very Major と判定される誤差を生じた施設は3施設であった。

(3)臨床分離株に対する感受性試験結果

219 株の oxacillin 感性 *S. aureus* の薬剤感受性試験成績の結果を TABLE1 に示す。ceftazidime において、感性和判定された菌株が全体の3.7%、耐性と判定されたものが6.4%であった。その他の抗菌薬には耐性と判定される菌株は認められなかった。MIC90 を見てみると imipenem の値が0.064 $\mu\text{g/ml}$ と最も優れており、次いで oxacillin (0.75 $\mu\text{g/ml}$)、cefpirome (2 $\mu\text{g/ml}$)、cefepime および cefoperazone/ sulbactam (4 $\mu\text{g/ml}$)、ceftazidime (24 $\mu\text{g/ml}$)の順であった。

173 株の oxacillin 感性 coagulase-negative Staphylococci に対する薬剤感受性試験成績を TABLE2 に示す。ceftazidime(感性:45.1%、耐性:15.4%)を除く全ての薬剤に対して全ての菌株が感性を示した。MIC90 を見てみると、imipenem の値が0.125 $\mu\text{g/ml}$ と最も優れており、次いで oxacillin (1.5 $\mu\text{g/ml}$)、cefpirome (2 $\mu\text{g/ml}$)、cefepime (3 $\mu\text{g/ml}$)、

cefoperazone/ sulbactam (4 μ g/ml)、ceftazidime (32 μ g/ml)の順であった。

205 株の *E. coli* に対する薬剤感受性試験成績を TABLE3 に示す。Piperacillin に対しては 14.6%の菌株が耐性を示したが、その他の抗菌薬に対して耐性を示す *E. coli* は 0.5%であった。MIC90 は cefepime (0.125 μ g/ml)が最も優れており、次いで cefpirome (0.25 μ g/ml)、imipenem (0.38 μ g/ml)、ceftazidime (0.75 μ g/ml)、cefoperazone/ sulbactam (1.5 μ g/ml)、piperacillin (>256 μ g/ml)の順であった。

220 株の *Klebsiella spp.*に対する薬剤感受性試験成績を TABLE4 に示す。MIC90 は cefepime (0.19 μ g/ml)、cefpirome (0.38 μ g/ml)の順で優れており、cefepime に対する耐性株は認められなかった。一方、その他の抗菌薬の MIC90 は imipenem (0.5 μ g/ml)、ceftazidime (0.75 μ g/ml)、cefoperazone/ sulbactam (2 μ g/ml)、piperacillin (48 μ g/ml)の順で、それぞれ 0%、1.8%、2.7%、7.2%、の割合で耐性菌が認められた。

180 株の *Citrobacter freundii* に対する薬剤感受性試験成績を TABLE5 に示す。cefepime および imipenem に対する耐性菌は認められず、MIC90 はそれぞれ 2 μ g/ml、1 μ g/ml であった。その他の抗菌薬に対しては、MIC90 の順に cefpirome (4 μ g/ml)に 1.1%、cefoperazone/ sulbactam (48 μ g/ml)に 8.3%、ceftazidime (>256 μ g/ml)に 25.0%、piperacillin (>256 μ g/ml)に 26.1%の割合で耐性菌が認められた。

205 株の *Enterobacter spp.*に対する薬剤感受性試験成績を TABLE6 に示す。MIC90 の順に imipenem (1.5 μ g/ml)には 0.5%、cefepime (3 μ g/ml)には 1.0%、cefpirome (12 μ g/ml)には 3.9%、cefoperazone/ sulbactam (128 μ g/ml)には 15.1%、piperacillin (>256 μ g/ml)には 18.5%、ceftazidime (>256 μ g/ml)には 20.5%の菌株が耐性を示した。

195 株の indole-positive *Proteus* に対する薬剤感受性試験成績を TABLE7 に示す。MIC90 は cefepime (0.19 μ g/ml)が最も優れ、次いで cefpirome (0.5 μ g/ml)であり、それぞれ 0.5%、3.1%の耐性菌がみとめられた。以下、MIC90 の順に ceftazidime (0.75 μ g/ml)には 0.5%、cefoperazone/ sulbactam (3 μ g/ml)には 1.5%、imipenem (4 μ g/ml)には 1.0%、piperacillin (64 μ g/ml)には 8.7%の割合で耐性菌が認められた。

200 株の *Serratia spp.*に対する薬剤感受性試験成績を TABLE8 に示す。MIC90 の優れている順に imipenem (2 μ g/ml)には 4.5%、cefepime (4 μ g/ml)には 5.0%、cefpirome (12 μ g/ml)には 8.5%、ceftazidime (24 μ g/ml)には 9.5%、cefoperazone/ sulbactam (>256 μ g/ml)には 23.5%、piperacillin (>256 μ g/ml)には 25.0%の割合で耐性菌が認められた。

219 株の *P. aeruginosa* に対する薬剤感受性試験成績を TABLE9 に示す。MIC90 の優れている順に Cefepime (16 μ g/ml)には 9.1%、ceftazidime (32 μ g/ml)には 11.4%、imipenem (MIC90: >32 μ g/ml)には 22.4%、cefoperazone/ sulbactam (192 μ g/ml)には 13.7%、piperacillin (>256 μ g/ml)には 20.1%、cefpirome (>256 μ g/ml)には 27.9%の割合で耐性菌が認められた。

199 株の *Acinetobacter spp.*に対する薬剤感受性試験成績を TABLE10 に示す。MIC90 の優れている順に imipenem (0.75 μ g/ml)には 2.5%、cefoperazone/ sulbactam (4 μ

活性を測定するとき使用する濃度と比較するときわめて低く、このような濃度で他の抗菌薬のβ-ラクタマーゼに対する安定性と比較すると cefepime は極めて安定なのである。この特徴により、今回のサーベイランスで *C. freundii* に耐性菌が認められなかったと考えている。また、*C. freundii* と同様にセファロスポリナーゼを産生する *Enterobacter spp.* に関しても、cefepime は同様の理由から他のセフェム系抗菌薬と比較して耐性菌の出現率が低いものと考えられた。Indole-positive *Proteus* に対しても cefepime に対する感性菌は 99.5% と他の薬剤に対する感性菌より多く存在した。*Serratia spp.* の中で主要な菌種である *Serratia marcescens* もセファロスポリナーゼを産生する菌種であるので、cefepime は他のセフェム系抗菌薬と比較すると低い耐性率を示したと考えられる。*P. aeruginosa* に対してもっとも耐性率が低かったのが cefepime である。その理由として、セファロスポリナーゼの大量産生、ならびに imipenem 耐性に関与する D2 ポーリンの欠損の両方の影響を受けない cefepime の特性によるものと考えられる。

以上の結果から、グラム陽性菌からグラム陰性菌に至るまで cefepime は幅広い抗菌力を有しており、腸内細菌科における耐性菌の出現はペニシリン系抗菌薬あるいはセフェム系抗菌薬と比較して低いものと考えられる。さらに、*P. aeruginosa* に対してはペニシリン系、セフェム系ならびに imipenem と比較しても耐性菌の占める割合が低いことが確認された。しかし、今後新たな耐性菌が出現してくる可能性も十分考えられることから、さらにこのようなサーベイランスを継続して実施する必要があると考えている。

謝 辞

稿を終えるにあたり、今回のトライアルにご協力頂きました東邦大学、東京医科大学、北里大学、聖マリアンナ医科大学、大阪大学、関西医科大学、川崎医科大学、川崎医科大学附属川崎病院、久留米大学、福岡大学、長崎大学第二内科、長崎大学熱帯医学研究所、済生会宇都宮病院、信楽園病院、国立療養所西新潟中央病院、癌研究会附属病院、社会保険中央総合病院、神奈川県衛生看護専門付属病院、神奈川県立循環器呼吸器病センター、大手前病院、済生会吹田病院、天理よろづ相談所病院の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Knothe H, Shah P, Mitsuhashi S et al.: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 11: 315~317, 1983.
- 2) Knox J R: Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 39: 2593~2601, 1995.

- 3) Ito H, Arakawa Y, Ohta M et al.: Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 39: 824~829, 1995.
- 4) Livermore D M: Bacterial resistance to carbapenems. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 390: 25~47, 1995
- 5) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 39: 1211~1233, 1995.
- 6) Ishii Y, Ohno A, Matsuzawa H et al.: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 39: 2269~2275, 1995.
- 7) Ma L, Ishii Y, Yamaguchi K et al.: Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A beta-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 42: 1181~1186, 1998
- 8) Arakawa Y, Ohta M, Kato N et al.: Chromosomal beta-lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 63~70, 1989.
- 9) Hiraoka M, Inoue M, Mitsuhashi S: Hydrolytic rate at low drug concentration as a limiting factor in resistance to newer cephalosporins. *Reviews of Infectious Diseases*. 10: 746~751, 1988.