



## Effect of the inoculum size on carbapenem susceptibilities of $\beta$ -lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宮崎, 洋生 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/781">http://hdl.handle.net/10271/781</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 519号	学位授与年月日	平成21年 1月16日
氏名	宮崎洋生		
論文題目	Effect of the inoculum size on carbapenem susceptibilities of $\beta$ -lactamase-negative, ampicillin-resistant <i>Haemophilus influenzae</i> (接種菌量が $\beta$ -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌のカルバペネム系薬剤感受性に与える効果)		

博士(医学) 宮崎 洋生

## 論文題目

Effect of the inoculum size on carbapenem susceptibilities of  $\beta$ -lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*

(接種菌量が  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌のカルバペネム系薬剤感受性に与える効果)

## 論文内容の要旨

### [はじめに]

インフルエンザ菌は呼吸器感染症や髄膜炎における重要な起炎菌であり、近年、 $\beta$ -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌 ( $\beta$ -lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*: BLNAR)が増加傾向である。その BLNAR に対してカルバペネム系薬剤は高い抗菌活性を有するとされている。一方、薬剤感受性試験において、接種菌量の増加により最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration: MIC)が上昇することが知られており、特に 4 管差以上の MIC 上昇は“inoculum effect”と称される。Inoculum effect により感受性菌を耐性菌と誤判定することにより、本来は有効な薬剤を無効と誤判断する可能性もあるため治療薬剤の決定において重要な問題となり得るが、BLNAR のカルバペネム系薬剤における inoculum effect について検討した報告はない。そこで、BLNAR のカルバペネム系薬剤感受性試験における接種菌量の影響について検討した。

### [材料ならびに方法]

2001 年から 2005 年にかけて呼吸器感染症患者から分離された BLNAR 株のうち、日常診療における薬剤感受性試験でカルバペネム系薬剤に低感受性を示した 9 株について解析した。被検薬剤としてカルバペネム系薬剤 4 剤 (meropenem, panipenem, imipenem, biapenem)、セファロスポリン系薬剤 2 剤 (ceftadizime, ceftriaxone)、ペニシリン系薬剤 1 剤 (ampicillin)、キノロン系薬剤 1 剤 (levofloxacin)を用いた。MIC は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の標準法に従い微量液体希釈法で測定した。つまり、最終接種菌量は生菌数測定にて  $5 \times 10^5$  cfu/ml に調整した (standard method)。また、inoculum effect を評価するために最終接種菌量を生菌数測定にて  $5 \times 10^6$  cfu/ml に調整した。これを modified method として、standard method で測定した MIC と比較した。なお、耐性菌の識別は CLSI の判定基準に準拠した。さらに、BLNAR の薬剤耐性に関与しているとされるペニシリン結合タンパク (penicillin-binding protein: PBP)の遺伝子配列を決定し、アミノ酸変異と MIC 値、inoculum effect の関連性について検討を加えた。

### [結果]

得られた結果を以下にまとめる。

#### 1. 感受性試験

臨床分離した 9 株のうち 2 株がカルバペネム系薬剤に低感受性を示したが、残りの 7 株はカルバペネム系薬剤感受性株であった。

#### 2. 接種菌量の効果

Inoculum effect は meropenem 55%(5/9 株)、panipenem 22%(2/9 株)、imipenem 33%(3/9 株)、biapenem 22%(2/9 株)で見られた。特に、panipenem においては、inoculum effect の強さと MIC 値

には有意な正の相関が見られた。しかし、その他のカルバペネム系薬剤においては、inoculum effect の強さと MIC 値に関連性は見られなかった。

### 3. PBP 遺伝子の解析

臨床分離した 9 株と BLNAR 標準株には Asn-526 Lys が共通してみられたが、PBP3 の変異と inoculum effect の強さ、カルバペネム系薬剤の MIC 値には関連は見られなかった。

#### [考察]

この実験では、BLNAR のカルバペネム系薬剤感受性における接種菌量の影響について検討した。上記の実験結果から、以下の結論を出すことができた。

1. BLNAR についてカルバペネム系薬剤における inoculum effect が認められた。
2. Inoculum effect の強さは MIC 値、PBP 変異の部位や数とは関連しなかった。

日常診療では菌量調整に濁度計が用いられているが、インフルエンザ菌の感受性試験においてはわずかな菌量の増加により inoculum effect が生じ、MIC 値を誤判定する可能性がある。従って、濁度計を用いた MIC 測定において‘耐性’と判定された場合には、真の MIC 値を判定するために生菌数測定などの正確な菌量調整が有用である。

#### [結論]

BLNAR において最終接種菌量の増加によりカルバペネム系薬剤に対する MIC 値が上昇した。日常診療においてしばしば使用されている濁度計を用いた接種菌量の調整では感受性菌を耐性菌と誤って解釈するおそれがあるため、正確な菌量調整に努めるべきである。

### 論文審査の結果の要旨

$\beta$ -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌 ( $\beta$ -lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*: BLNAR) が増加傾向を示している。 $\beta$ -ラクタマーゼを産生せず、ペニシリン結合タンパク (penicillin-binding protein: PBP) の  $\beta$  ラクタムとの親和性の減少が耐性の原因とされる。この BLNAR に対してカルバペネム系薬剤は高い抗菌活性を有する。しかしながら、薬剤感受性試験において、接種菌量の増加により最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration: MIC) が上昇することが知られており、特に 4 管差以上の MIC 上昇は“inoculum effect”と称される。日常菌量を調整するには濁度計がよく用いられるが、的確な菌量が MIC 測定に用いられないことも危惧される。そして、inoculum effect により感受性菌を耐性菌と誤判定することにより、本来は有効な薬剤を無効と誤判断し診療に害を及ぼす危険性もある。しかし、これまでに BLNAR のカルバペネム系薬剤における inoculum effect について検討した報告はない。そこで、BLNAR のカルバペネム系薬剤感受性試験における接種菌量の影響について検討した。

5 年間で呼吸器感染症患者から分離された BLNAR 株のうち、日常診療における薬剤感受性試験でカルバペネム系薬剤に低感受性を示した 9 株を対象とした。被検薬剤としてカルバペネム系薬剤 4 剤、セファロスポリン系薬剤 2 剤、ペニシリン系薬剤 1 剤、キノロン系薬剤 1 剤を用いた。

MIC は、最終接種菌量を生菌数測定にて  $5 \times 10^5$  cfu/ml に調整した標準法と、inoculum effect を評価するために 10 倍の  $5 \times 10^6$  cfu/ml に調整した変法で、微量液体希釈法で測定した。耐性菌の識別は

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の判定基準に準拠した。Inoculum effect の原因解明のために、PBP の遺伝子配列を決定し、アミノ酸変異と MIC 値、inoculum effect の関連性について検討した。

その結果、以下の知見を得た。

#### 1. 感受性試験

臨床分離した9株のうち2株がカルバペネム系薬剤に低感受性を示したが、残りの7株はカルバペネム系薬剤感受性株であった。

#### 2. 接種菌量の効果

Inoculum effect は meropenem 55%(5/9 株)、panipenem 22%(2/9 株)、imipenem 33%(3/9 株)、biapenem 22%(2/9 株)で見られた。特に、panipenem においては、inoculum effect の強さと MIC 値には弱いながらも有意な正の相関が見られたが、その他のカルバペネム系薬剤においては、inoculum effect の強さと MIC 値に関連性は見られなかった。

#### 3. PBP 遺伝子の解析

臨床分離した9株と BLNAR 標準株には Asn-526 Lys が共通してみられたが、PBP3 の変異と inoculum effect の強さ、カルバペネム系薬剤の MIC 値には関連は見られなかった。これは、今までにインフルエンザ菌のカルバペネム耐性が PBP3 のアミノ酸置換によって生じるものではないという既報とも一致する結果である。しかしながら今回、PBP3 以外の他のタイプ5種の遺伝子解析も施行したが、同様に特定のカルバペネム耐性の原因と考えられる変異は見られなかった。

以上の結果から、BLNAR に対するカルバペネム系薬剤の感受性に inoculum effect が認められたこと、inoculum effect の強さは MIC 値、PBP 変異の部位や数とは関連しなかったことが示された。そして、日常診療においてしばしば使用されている濁度計を用いた接種菌量の調整では感受性菌を耐性菌と誤って解釈するおそれがあるため、正確な菌量調整に努めるべきであることが提言された。

審査委員会では、初めて BLNAR のカルバペネム系薬剤における inoculum effect について明らかにし、正しい細菌検査を行うことにより適切な診療に結びつくという重要な提言を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 肺炎の起因菌について
- 2) インフルエンザ菌の細菌学的特徴について
- 3)  $\beta$ -ラクタマーゼのサブタイプについて
- 4) 薬剤耐性のメカニズムについて
- 5) BLNAR が増加傾向を示す理由について
- 6) MIC の測定法について
- 7) MIC に影響を与える因子について
- 8) Inoculum effect について
- 9) PBP3 について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 前川 真人

副査 大西 一功

小川 法良