

# 研究経過報告書

- 研究課題名：現行の minimum inhibitory concentration 判定における濁度評価の妥当性について
- 研究代表者氏名：田村 友梨奈
- 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

## 論文 1

Yurina Tamura, Masato Kawamura, Yuta Hoshino, Takumi Sato, Shigeru Fujimura. Limitations of antimicrobial agent choice based on minimum inhibitory concentration value against *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Medical Microbiology, 2025, In press.

- 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

## 1. 背景と目的

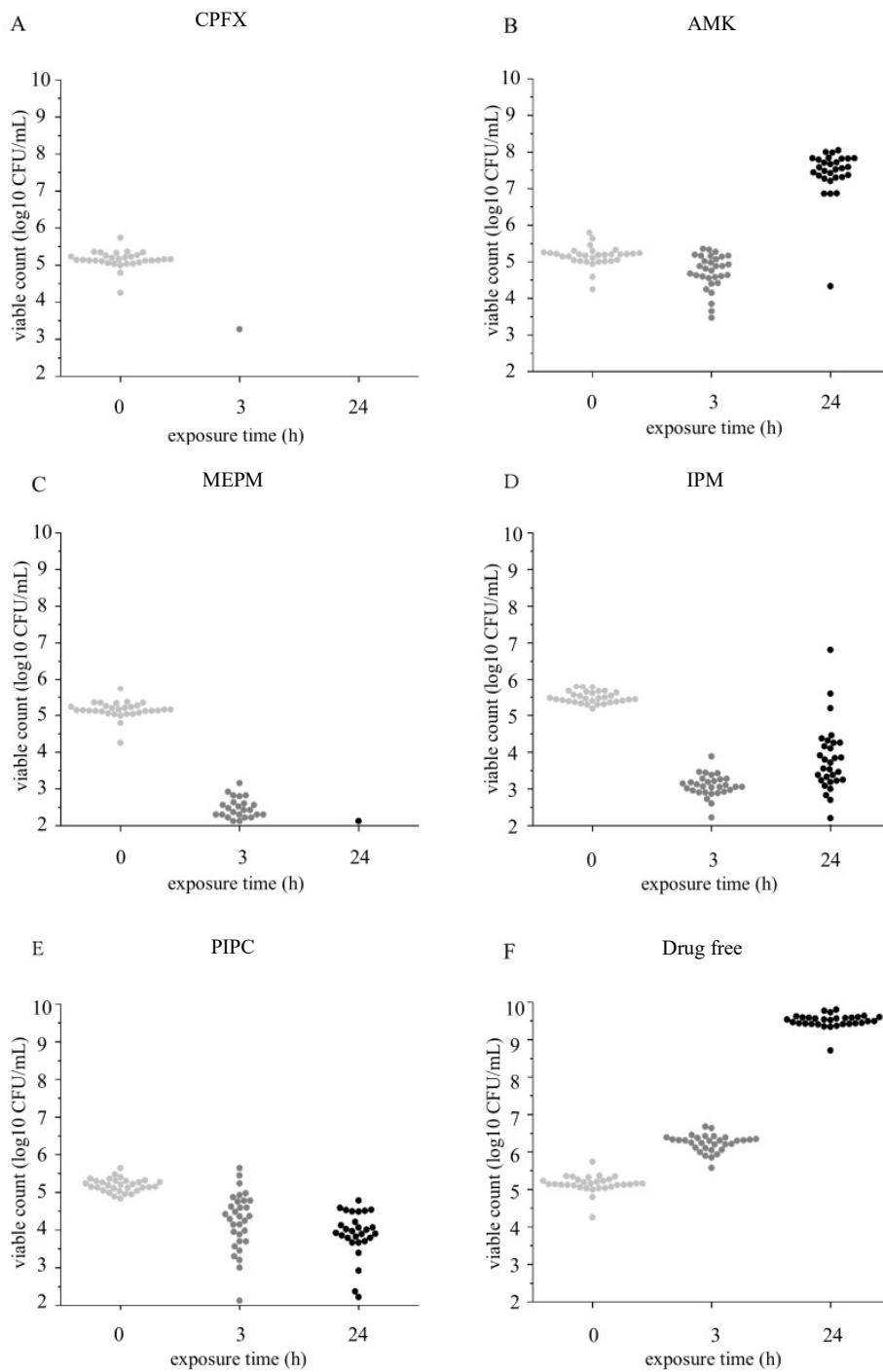
Antimicrobial resistance (AMR) 対策のため、適切な抗菌薬選択および Pharmacokinetics (PK)/Pharmacodynamics (PD) 理論に基づいた投与設計が必要不可欠である。PK/PD パラメータには time above minimum inhibitory concentration (MIC)、maximum plasma concentration (Cmax)/MIC や area under the blood concentration time curve (AUC)/MIC があり、正確な MIC 値の把握は重要である。その MIC 測定は The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) や Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) において、微量液体希釈法が標準法とされている。一般に、自動機器 (e.g. VITEK2<sup>®</sup>) による比濁吸光法あるいは目視により MIC が判定されるが、本研究において我々はこれらの 24 時間培養後の MIC 判定による各種抗菌薬選択の妥当性を検討した。

## 2. 方法

使用薬剤はイミペネム (IPM)、メロペネム (MEPM)、ピペラシリン (PIPC)、シプロフロキサシン (CPFX) およびアミカシン (AMK) の計 5 剤とした。使用菌株は東北地方の総合病院 16 施設から臨床分離された *Pseudomonas aeruginosa* 236 株のうち、使用した 5 薬剤全てに感受性を示した 30 株 (MIC range: PIPC, 0.5–16 µg/mL; IPM, 0.25–2 µg/mL; MEPM, ≤0.06–1 µg/mL; CPFX, ≤0.06–0.5 µg/mL; and AMK, 0.25–2 µg/mL) および標準株 *P. aeruginosa* PAO1 とした。被検菌株の接種菌数を  $10^5$  CFU/mL に調整した培養液に、各抗菌薬を常用量投与時の最高血漿中濃度になるように添加し 3 および 24 時間培養後、培養液の透過率および目視による混濁の判定と生残菌数の測定を行った。加えて、5 人の微生物学者全員が目視で試験管が混濁していると判断した生残菌数およびその時の透過率 (T) を検討した。T は吸光度 (A; A = -log T/100) から算出した。MHB のみの透過率 ( $T_{MHB}$ ) を 100%としたときの相対透過率 ( $T'$ ) は、 $T' = T/T_{MHB} \times 100$  から求めた。また、24 時間後に生残した菌株の MIC を測定した。

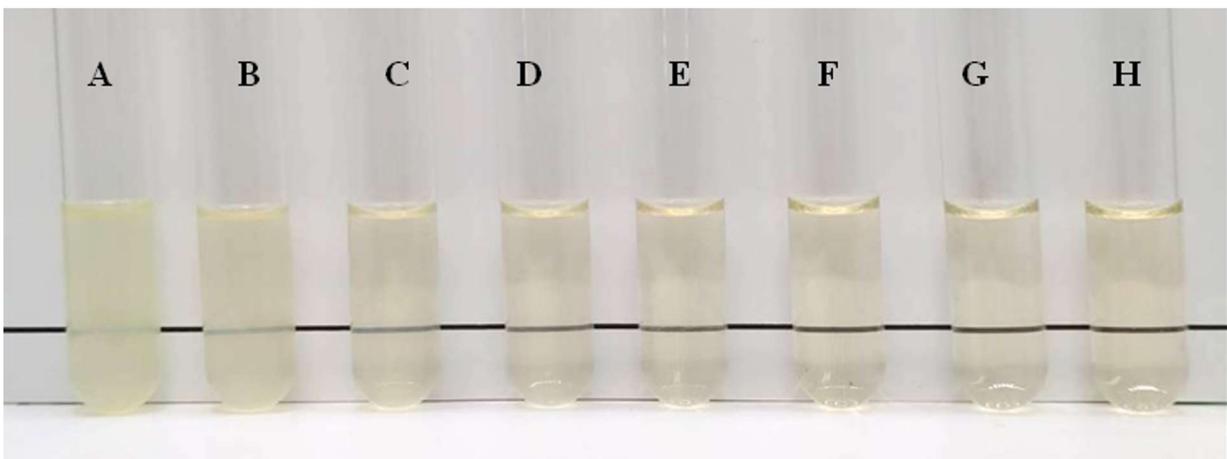
## 3. 研究成果

CPFX 曝露 3 時間後に 31 株中 30 株 (96.8%)、24 時間後には全てが殺菌された (Fig. 1A)。AMK を 24 時間曝露後に 28 株 (90.3%) が  $10^7$ – $10^8$  CFU/mL 生残した (Fig. 1B)。β-ラクタム系薬では、MEPM 曝露 24 時間後に 30 株 (96.8%) が検出限界以下となった (Fig. 1C) が、IPM では 30 株 (96.8%) において  $10^2$ – $10^7$  CFU/mL、PIPC では 28 株 (90.3%) が  $10^2$ – $10^5$  CFU/mL 生残した (Fig. 1D, E)。



**Fig. 1 各抗菌薬曝露後の生残菌数の推移**

本検討で混濁ありと判定された生残菌数の最小値は  $9.15 \times 10^8$  CFU/mL ( $T' : 40.7\%$ ) であった (Fig. 2-B)。一方、濁りがないと判定された最大生菌数は  $3.66 \times 10^7$  CFU/mL ( $T' : 94.8\%$ ) であった (Fig. 2-F)。すなわち、Fig. 2において試験管 B は 5 人の被験者全員が混濁あり、試験管 F は全員が混濁なしの透明と判定した。抗菌薬を含まない MHB で約  $5 \times 10^5$  CFU/mL に調整した培養液の  $T'$  は 99.4% であり、目視で透明と判定された。これを 24 時間培養後、培養液中の生残菌数は  $3.38 \times 10^9$  CFU/mL であり (Fig. 1F)、微生物学者全員が目視で混濁あり ( $T' : 38.1\%$ ) と判定した。



上記写真の PAO1 株数希釈系列

	A ( $\times 1$ )	B ( $\times 1/2$ )	C ( $\times 1/5$ )	D ( $\times 1/10$ )	E ( $\times 1/20$ )	F ( $\times 1/50$ )	G ( $\times 1/100$ )	H
Viable count (CFU/mL)	$1.83 \times 10^9$	$9.15 \times 10^8$	$3.36 \times 10^8$	$1.83 \times 10^8$	$9.15 \times 10^7$	$3.66 \times 10^7$	$1.83 \times 10^7$	0

Fig. 2 目視判定による試験管中の *P. aeruginosa* 含有 MHB の濁りと生残菌数

CPFX や MEPM 曝露 24 時間後の生残菌数は 1 株を除いて検出限界 ( $1.00 \times 10^2$  CFU/mL) 以下となり (Fig. 1A, C)、その T' は 98.3~100% (平均 99.5%) であった。一方、ほか 3 剤では最大  $10^7$ ~ $10^8$  CFU/mL まで増殖したが、いずれも目視では透明であった。その T' 平均は PIPC : 99.5%、IPM : 99.5% および AMK : 97.0% であり、生残菌数が検出限界以下の場合と大きな差はなかった。

このように、PIPC、IPM および AMK の 3 つの抗菌薬では、24 時間曝露後に培養液の混濁が見られないものの *P. aeruginosa* は生残した。この生残菌株のうち、14 株が IPM に中間耐性、6 株が耐性、PIPC では 2 株が中間耐性、1 株が耐性を示した。さらに、AMK の MIC は 1~2 管上昇を示した。

以上の結果から *P. aeruginosa* は、抗菌薬の種類により MIC を超える濃度域において、目視では確認されないものの生残菌が多数認められることが明らかになった。ゲンタマイシン、トブラマイシン、セフタジジム、IPM は *P. aeruginosa* に対し耐性を獲得しやすいためから薬剤耐性ポテンシャルの高い薬剤と報告されている。本研究の結果はこれを支持するものであった。したがって *P. aeruginosa* はアミノグリコシド系薬や一部のβ-ラクタム系薬の mutant selection window に生残することが明らかになり、これらの抗菌薬は耐性菌の出現に十分注意すべきと考えられた。