

過去 5 年間に柏市周辺地域を中心に分離された肺炎球菌, インフルエンザ菌の遺伝子解析についての検討

高 橋 久美子¹ 和 田 靖 之² 久 保 政 勝²
衛 藤 義 勝¹

¹東京慈恵会医科大学小児科学講座

²東京慈恵会医科大学附属柏病院小児科

(受付 平成 19 年 11 月 1 日)

GENE ANALYSIS OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* AND *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ISOLATED FROM CHILDREN IN KASHIWA CITY IN THE PAST 5 YEARS

Kumiko TAKAHASHI¹, Yasuyuki WADA², Masakatsu KUBO²,
and Yoshikatsu ETO¹

¹Department of Pediatrics, The Jikei University School of Medicine

²Department of Pediatrics, Kashiwa Hospital, The Jikei University School of Medicine

We studied mutations of penicillin-binding protein (PBP) genes and susceptibility to antibiotics in 345 isolates of *Streptococcus pneumoniae* and 334 isolates of *Haemophilus influenzae*. The isolates were obtained from various clinical materials from children treated at Kashiwa Hospital, The Jikei University School of Medicine, from June 2001 through June 2003. Based on the analysis of mutations of PBP genes in *S. pneumoniae*, 47.1% of isolates were penicillin-resistant (3 mutations) and 30.1% were moderately penicillin-resistant (1 or 2 mutations). Although penicillin-susceptible isolates had no mutations, some had high minimal inhibitory concentrations. Consequently, only 23.8% of isolates had no mutation of macrolide-resistance genes. According to an analysis of PBP genes in *H. influenzae*, 66.5% of isolates were non- β -lactamase-producing, ampicillin-resistant or non- β -lactamase-producing, low-level ampicillin-resistant, and a level of minimal inhibitory concentration of ampicillin mostly depended on the number of mutations of PBPs. Both *S. pneumoniae* and *H. influenzae* were detected at high rates in younger patients, and the resistance rate was also high. Because the percentage of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *H. influenzae* isolates is increasing significantly, periodic monitoring in each region is necessary for effective treatment. We should consider a treatment strategy that includes vaccination against *S. pneumoniae* and *H. influenzae* for younger children.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2008 ; 123 : 27-35)

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, penicillin-binding protein genes, minimal inhibitory concentrations

I. 緒 言

肺炎球菌とインフルエンザ菌は、小児期の呼吸

器疾患の主要な起炎菌であり、髄膜炎などの重篤な感染症においても重要な原因菌である。近年これらの菌に対して治療抗菌薬の耐性化が進行して

おり、これらの耐性菌の問題にはそれぞれの地域における抗菌薬の使用状況が反映されていると推測され、治療戦略の面でも耐性菌の出現状況の分析は重要である。今回我々は東京慈恵会医科大学附属柏病院小児科で過去5年間に分離された肺炎球菌、インフルエンザ菌に対して耐性遺伝子の解析を行い、周辺地域の耐性菌検出状況を調査し、最小発育阻止濃度 (MIC: minimal inhibitory concentration) と耐性遺伝子変異の関係について検討を行った。

II. 対象と方法

2001年6月から2006年6月に東京慈恵会医科大学附属柏病院小児科を受診した患児より分離された肺炎球菌 345 株 (対象とした患児の平均年齢 2.17 ± 2.54 歳, 男女比は 1:0.77), インフルエンザ菌 334 株 (対象とした患児の平均年齢 2.33 ± 3.22 歳, 男女比は 1:0.72) を用いて、耐性遺伝子の検出と解析, 同菌の MIC 測定を行った。検体材料は多い順に鼻腔 (76.8%), 咽頭 (21.0%) で、その他は喀痰、胃液、静脈血、髄液であった。

肺炎球菌の遺伝子解析はペニシリン耐性肺炎球菌遺伝子検出試薬 (湧永製薬) を用い、血液寒天培地で培養した colony を検体として、肺炎球菌同定のために肺炎球菌の自己融解酵素をコードする *lytA* 遺伝子、肺炎球菌の β -ラクタム系薬剤耐性を判定するためにペニシリン結合蛋白 (PBPs: penicillin binding proteins) をコードする *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* 遺伝子、さらにマクロライド系薬剤耐性を判定するために薬剤排出機構に関与する *mefA* 遺伝子および薬剤不活化に関与する *ermB* 遺伝子について PCR 法にて検索した¹⁾²⁾。PCR 法は同試薬の添付文書に従い、溶菌させた検体を Tth DNA polymerase (東洋紡績社) を用いて調整した PCRMix に添加し、サーマルサイクラーを用いて 94°C 15 秒, 53°C 15 秒, 72°C 15 秒で 30 サイクルの反応を行った後、3% アガロースゲルで電気泳動を行った。

インフルエンザ菌の遺伝子解析はチョコレート寒天培地で培養した colony を検体として、インフルエンザ菌遺伝子検出試薬 (湧永製薬) を用い、菌種同定のための P6 蛋白遺伝子、 β ラクタマーゼ産生株の識別のために TEM 型 β -ラクタマー

ゼ、さらに β ラクタマーゼを介さない耐性機構として PBPs をコードする *pbp3-1*, *pbp3-2* 遺伝子について、PCR 法にて検索した³⁾。PCR 法は同試薬の添付文書に従い、溶菌させた検体を肺炎球菌と同様に調整した PCRMix に添加し、サーマルサイクラーを用いて 94°C 15 秒, 53°C 15 秒, 72°C 15 秒で 30 サイクル後、72°C 2 分の反応を行った後、3% アガロースゲルで電気泳動を行った。

肺炎球菌の耐性菌の分類は Ubukata K, et al. の PCR による判定基準を用い¹⁾, *pbp1a*, *2x*, *2b* の 3 種の *pbp* 遺伝子に変異の認められない株を感受性肺炎球菌 (PSSP: penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*), 1~2 遺伝子に変異のある株をペニシリン軽度耐性 (PISP: penicillin intermediately resistant *S. pneumoniae*), 3 遺伝子に変異した株をペニシリン耐性 (PRSP: penicillin-resistant *S. pneumoniae*) と判定した⁴⁾。

インフルエンザ菌の耐性化の分類も同様に Ubukata K, et al. の PCR による判定基準を用い³⁾, 解析された耐性遺伝子変異のいずれも有しない感受性菌 (BLNAS: β -lactamase non-producing ampicillin susceptible *Haemophilus influenzae*), TEM-1 型 β -ラクタマーゼ産生菌 (BLPAR: β -lactamase producing ampicillin resistant *H. influenzae*), β -ラクタマーゼを産生せず *pbp3-2* 変異をもつ耐性菌 (BLNAR: β -lactamase nonproducing and ampicillin resistant *H. influenzae*), β -ラクタマーゼを産生せず *pbp3-1* 単独変異をもつ軽度耐性菌 (low-BLNAR: β -lactamase nonproducing and low-level ampicillin resistant *H. influenzae*), 更に β -ラクタマーゼ産生株で *pbp3-1* 単独変異をもつ耐性菌 (β -lactamase producing and low-level amoxicillin-clavulanate resistant *H. influenzae*, possessing TEM-1 and low-BLNAR resistant genes: BLPACR-I), β -ラクタマーゼ産生株で *pbp3-2* 変異をもつ耐性菌 BLPACR-II と判定した⁵⁾。

分離された菌に対する MIC 測定は、penicillin G (PCG), ampicillin (ABPC), cefditoren (CDTR), cefotaxime (CTX), clarithromycin (CAM), clindamycin (CLDM) を被験薬剤とし、微量液体希釈法 (MIC 2000) を用いて行った。

Clinical and Laboratory Standards Institute (旧 National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS) の耐性判定基準に従うと、肺炎球菌では PCG に対する MIC が $0.06 \mu\text{g/mL}$ 以下を PSSP, $0.12 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$ を PISP, $2.0 \mu\text{g/mL}$ 以上を PRSP とし、またインフルエンザ菌では ABPC に対する MIC が $1.0 \mu\text{g/mL}$ 以下を BLNAS, $2.0 \mu\text{g/mL}$ より高値のものを BLNAR としており、今回の耐性遺伝子による分類と MIC を比較し、両者について比較検討を行った。

III. 結 果

1. 症例背景と菌検出状況

1) 疾患背景

肺炎球菌とインフルエンザ菌を採取した患児の疾患内訳は、肺炎球菌では肺炎 117 例 (33.9%) が最多であり、次いで気管支炎 72 例 (20.9%)、気管支喘息 37 例 (10.7%) であった。重症感染症は化膿性髄膜炎 1 例 (0.3%) であった。インフルエンザ菌で最も多かった疾患は肺炎 99 例 (29.6%) で、次いで気管支炎 79 例 (23.7%)、気管支喘息 36 例 (10.8%) であり、重症感染症は化膿性髄膜炎 2 例 (0.6%) であった。肺炎球菌とインフルエンザ菌は同様な疾患で検出された。

2) 年齢と耐性菌率

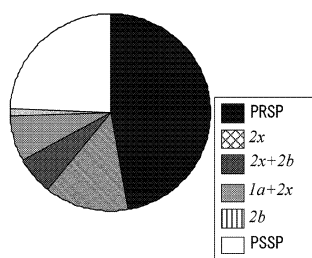
肺炎球菌とインフルエンザ菌の遺伝子解析による耐性菌率を Fig. 1 に示す。肺炎球菌のペニシリン

耐性菌は、PRSP が 160 例 (47.2%)、PISP が 102 例 (30.1%) で、PISP の中では *pbp2x* 変異株が多くみられた。また、マクロライド耐性は *mefA* 変異株 113 例 (32.8%)、*ermB* 変異株 131 例 (38.0%) と *mefA* 変異株と *ermB* 変異株はほぼ同率でみられた。マクロライド系薬剤に対する感受性菌は 82 例 (23.8%) であり β -ラクタム系薬剤に対する感受性菌 PSSP 83 例 (24.4%) とほぼ同程度であった。

インフルエンザ菌の耐性菌は、BLNAR が 164 例 (49.1%) と半数を占め、low-BLNAR の 58 例 (17.4%) とあわせて *pbp* 遺伝子変異株が 66.5% を占めていた。 β ラクタマーゼ産生株は BLPAR 7 例 (2.1%)、BLPACR 10 例 (3.0%) と低率であった。感受性菌 BLNAS は 95 例 (28.4%) であり、肺炎球菌の感受性菌の割合と類似していた。

年齢分布と各年齢での耐性菌率を Fig. 2 に示す。肺炎球菌は 1 歳 (34.8%) に症例数のピークがみられ、次いで 1 歳未満 (24.1%)、2 歳 (13.2%) となり、2 歳までで全体の 72.1% を占めていた。PRSP の割合は全年齢でほぼ 4 割以上を占め、1 歳未満、4-5 歳、7 歳以上では半数以上であった。インフルエンザ菌は 1 歳未満 (30.6%) が最多であり、次いで 1 歳 (28.2%)、2 歳 (12.1%) となり、2 歳までで全体の 70.9% を占めていた。BLNAR の割合は 4 歳までは 50-56% と半数以上にみられ、肺炎球菌同様に低年齢での耐性菌が高率にみ

1. *Streptococcus pneumoniae* (n=345)



2. *Haemophilus influenzae* (n=334)

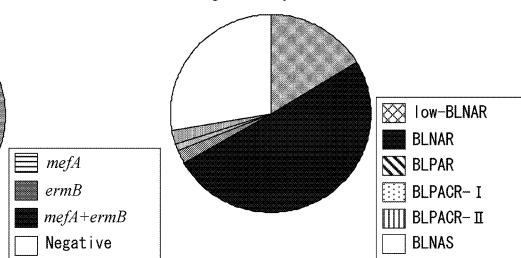


Fig. 1 Isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. These isolates were distributed by PCR results for resistant genes.

PRSP: penicillin-resistant *S. pneumoniae*, PSSP: penicillin-susceptible *S. pneumoniae*, BLNAR: β -lactamase nonproducing and ampicillin resistant *H. influenzae*, BLPAR: β -lactamase producing ampicillin resistant *H. influenzae*, BLPACR-I: β -lactamase producing and low-level amoxicillin-clavulanate resistant *H. influenzae*, possessing TEM-1 and low-BLNAR resistant genes, BLPACR-II: β -lactamase producing and amoxicillin-clavulanate resistant *H. influenzae*, possessing TEM-1 and low-BLNAR resistant genes. BLNAS: β -lactamase nonproducing ampicillin susceptible *H. influenzae*.

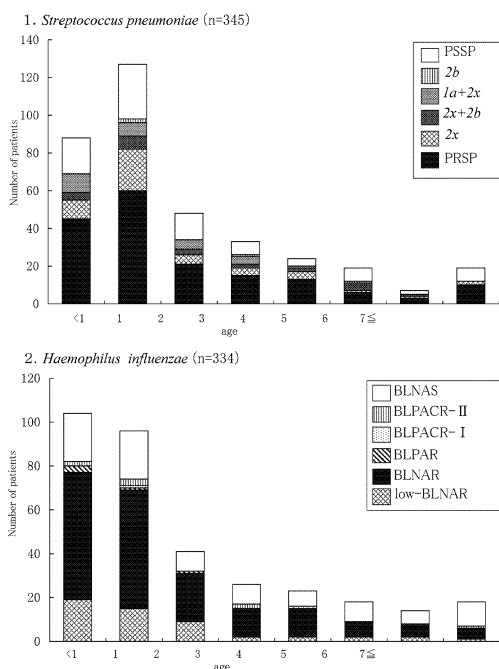


Fig. 2 Isolation frequency of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by patient age. These isolates were distributed by PCR results for resistant genes. PSSP: penicillin-susceptible *S. pneumoniae*, PRSP: penicillin-resistant *S. pneumoniae*, BLNAS: β -lactamase nonproducing ampicillin susceptible *H. influenzae*, BLNAR: β -lactamase nonproducing and ampicillin resistant *H. influenzae*, BLPACR-II: β -lactamase producing and amoxicillin-clavulanate resistant *H. influenzae*, possessing TEM-1 and low-BLNAR resistant genes, BLPACR-I: β -lactamase producing and low-level amoxicillin-clavulanate resistant *H. influenzae*, possessing TEM-1 and low-BLNAR resistant genes, BLPAR: β -lactamase producing ampicillin resistant *H. influenzae*.

られた。

3) 耐性菌率の年次推移

肺炎球菌の耐性菌率の変化は、2002年ではPRSPが51.1%、PSSPが17.0%であり、2005年ではPRSPが46.5%、PSSPが21.6%を占めており、今回の調査期間ではPRSPは5割前後で著明な変動はみられなかった。

一方、インフルエンザ菌の耐性菌率の変化は、2002年ではBLNASが33.3%、BLNARが35.9%、2005年ではBLNASが20.0%、BLNAR

が58.0%を占めており、BLNARの急増がみられた。また、2002年までは認められなかったBLPACR-IIが、2005年には4.5%に認められた。

2. 遺伝子変異と薬剤感受性の比較

1) 肺炎球菌における遺伝子変異と薬剤感受性の比較

肺炎球菌における抗菌薬感受性と耐性遺伝子との関係をFig. 3に示す。*pbp* 遺伝子変異と抗菌薬感受性との関係をみると、PCGでは遺伝子変異数が多くなるに従い耐性レベルが高く、広範囲をしめるPRSPはMIC値が高い傾向にあった。一方で感受性菌であるPSSPでもMIC値1 μ g/mL以上が31.6%にみられ、耐性遺伝子による分類と実際の耐性度に一部乖離がみられた。またPSSPのMIC値ピークは0.25 μ g/mLと低値であったが、MIC値1 μ g/mL以上が25例(7.3%)にみられ、PISPと比べるとMIC値が高い傾向にあった。セフェム系抗菌薬であるCDTRに関しては、PRSPにおいてもPCGと比較するとMIC値は低値で、感受性菌PSSPではほぼMIC値1 μ g/mL以下に保たれていた。セフェム系注射製剤であるCTXもCDTRと同様に、MIC値1 μ g/mL以下が多数であった。

さらに耐性遺伝子によるPRSPの薬剤感受性を詳細に検討する目的で、PRSPのみを描出し薬剤感受性を検討した(Fig. 4)。PRSPにおけるPCGのMIC値は1-2 μ g/mLにピークがあり、MIC値4 μ g/mL以上の高度耐性は4.4%のみであった。CDTRのMIC値のピークは0.5 μ g/mL、CTXのMIC値のピークは0.5-1 μ g/mLであった。我が国における肺炎でのbreakpoint MICは日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会によりCDTRが1 μ g/mL、CTXが2 μ g/mLと定められており⁶⁾、当科におけるPRSPのCDTRに対するMIC値はbreakpoint値以下を占めるものが95.0%を占め、またPRSPのCTXに対するMIC値はbreakpoint値以下を示すものが98.0%を占めており、遺伝子解析によるPRSPはCDTRとCTXについては感受性を保っていると考えられた。

マクロライド系耐性遺伝子変異と抗菌薬感受性の比較では、CAMではMIC値4 μ g/mL以上が59.6%を占めており、*ermB* 遺伝子変異株ではほ

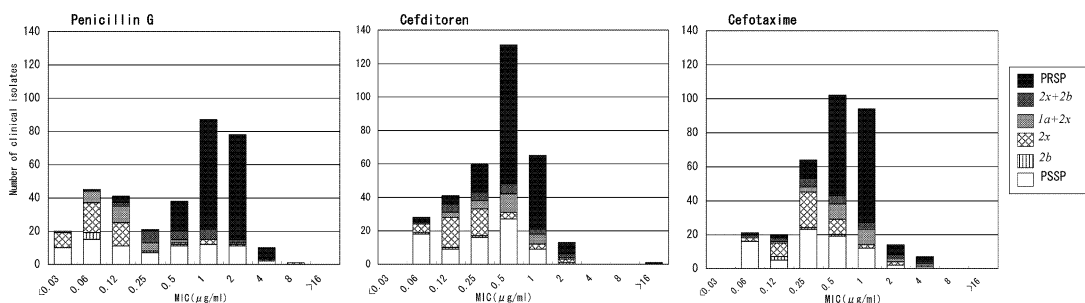


Fig. 3 Susceptibility distributions of Penicillin G, Cefditoren and Cefotaxime to 345 clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. These isolates were classified into 6 types following PCR results for *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b* genes.

PRSP: penicillin-resistant *S. pneumoniae*, PSSP: penicillin-susceptible *S. pneumoniae*.

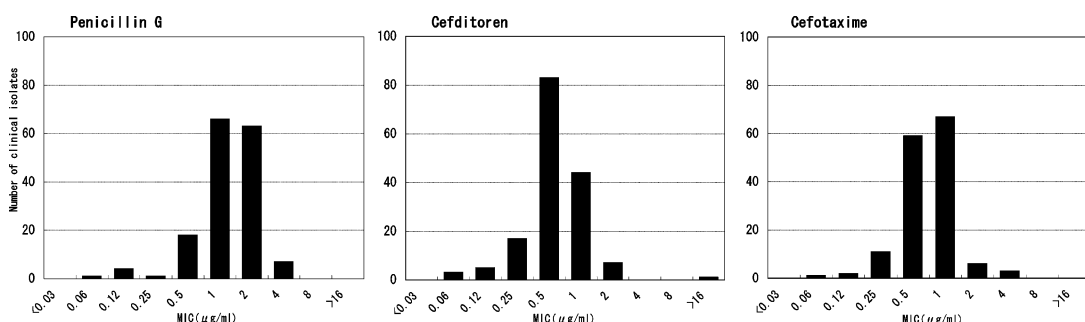


Fig. 4 Susceptibility distributions of Penicillin G, Cefditre to 160 clinical isolates of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*.

ほとんどの菌株で高度耐性を示し、更に感受性菌でも MIC 高値の株が半数以上にみられた。CLDM では CAM よりも耐性度が低く、MIC 値 $0.12 \mu\text{g/mL}$ 未満が 42.3% であり、MIC 値 $2 \mu\text{g/mL}$ 以上が 50.3% と 2 峰性のピークがみられた。 *mefA* 遺伝子変異株は MIC 低値を占めていたが、 *ermB* 遺伝子変異株ではほぼ全例で高度耐性を示していた。 PRSP と同様に定められた我が国における肺炎での breakpoint MIC と比較すると、CAM が $1 \mu\text{g/mL}$ 、CLDM が $0.5 \mu\text{g/mL}$ であり⁶⁾⁷⁾、当科における肺炎球菌の CAM に対する MIC 値は breakpoint 値を上回るものが 65.8% を占めており、また CLDM に対する MIC 値は breakpoint 値を上回るものが 53.0% を占めていた。

2) インフルエンザ菌における遺伝子変異と薬剤感受性の比較

インフルエンザ菌での抗菌薬感受性と耐性遺伝子との関係を Fig. 5 に示す。 ABPC での耐性度

は、BLNAR の占める範囲が多くそれを反映して MIC 値 $1 \mu\text{g/mL}$ 以上が 68.7% と多かった。肺炎球菌と比べると感受性菌 BLNAS の MIC 値は低値に留まっており、耐性遺伝子による評価と実際の MIC 値の間には大きな乖離はないものと考えられた。 CDTR では BLNAR や耐性遺伝子の多い BLPACR-II においても感受性は保たれ、また感受性菌 BLNAS は MIC 値 $0.03 \mu\text{g/mL}$ 未満のものが多くみられた。 CTX では CDTR と比較すると MIC 値が高めであったが類似した結果であり、肺炎球菌に比して MIC は低値に保たれていた。

PRSP と同様に詳細な検討を行うため、耐性遺伝子変異による BLNAR の薬剤感受性を検討した (Fig. 6)。 BLNAR における ABPC に対する MIC 値は、 $2 \mu\text{g/mL}$ 以上が 71.4% と高値を占めており、PRSP と比べて MIC 値からみても耐性度が高かった。一方で CDTR と CTX については

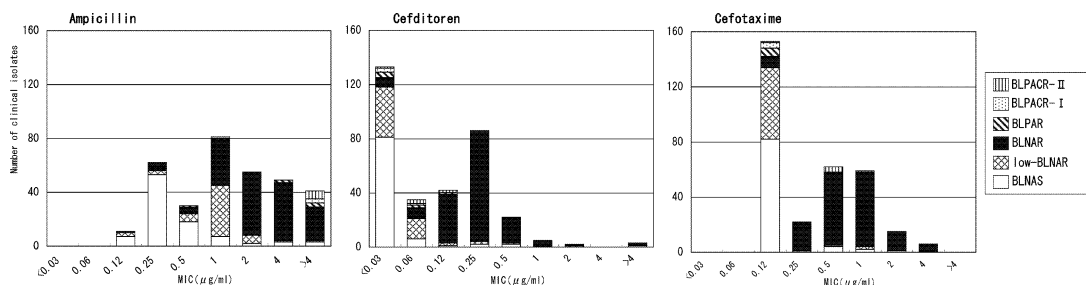


Fig. 5 Susceptibility distributions of Ampicillin, Cefditoren and Cefotaxime to 334 clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. These isolates were classified into 6 types following PCR results for *pbb3-1*, *pbb3-2* and *ftsI* genes.

BLNAS: β -lactamase nonproducing ampicillin susceptible *H. influenzae*, BLPAR: β -lactamase producing ampicillin resistant *H. influenzae*, BLNAR: β -lactamase nonproducing and ampicillin resistant *H. influenzae*, BLPACR-I: β -lactamase producing and low-level amoxicillin-clavulanate resistant *H. influenzae*, possessing TEM-1 and low-BLNAR resistant genes, BLPACR-II: β -lactamase producing and amoxicillin-clavulanate resistant *H. influenzae*, possessing TEM-1 and low-BLNAR resistant genes.

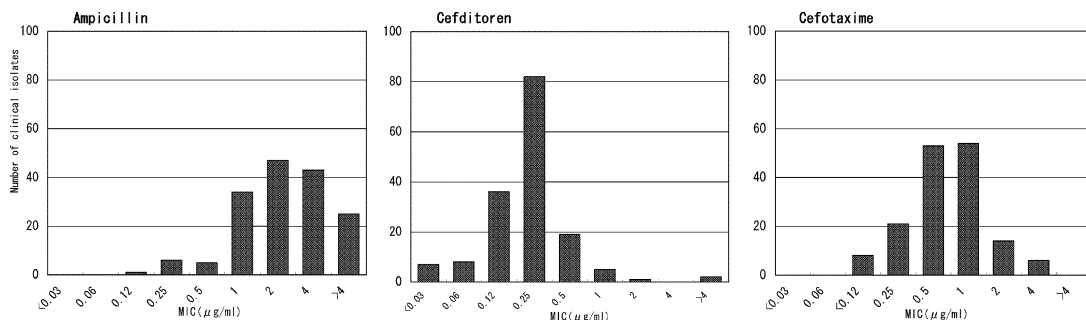


Fig. 6 Susceptibility distributions of Ampicillin, Cefditoren and Cefotaxime to 164 clinical isolates of β -lactamase nonproducing and ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*.

PRSP の同薬剤に対する MIC 値とほぼ同様の傾向であった。また肺炎球菌と同様に我が国における肺炎での breakpoint MIC と比較すると、当科における BLNAR の CDTR に対する MIC 値は breakpoint 値以下を示すものが 98.1% を占め、また BLNAR の CTX に対する MIC 値は breakpoint 値以下を示すものが 96.1% を占めており、遺伝子解析による BLNAR は CDTR と CTX については PRSP と同様に感受性を保っていると考えられた。

3. 肺炎球菌とインフルエンザ菌の同時検出例について

肺炎球菌とインフルエンザ菌が同時に検出された 88 例の遺伝子解析による耐性菌率を Fig. 7 に示す。同時検出菌における肺炎球菌の耐性菌率は

PRSP が 44 例 (51.2%)、PISP が 18 例 (20.9%) であり、 β -ラクタム系薬剤耐性度は肺炎球菌全体の比率とほぼ同様であった。マクロライド耐性度は、*mefA* 変異株 21 例 (24.4%)、*ermB* 変異株 37 例 (43.0%) であり、全体の比率と比較して *mefA* 変異株が少なく、感受性菌が 26 例 (30.2%) となり、全体の感受性菌率 23.8% と比してやや高率であった。

同時検出菌におけるインフルエンザ菌の耐性菌率は、BLNAR が 47 例 (53.4%) と半数以上を占め、low-BLNAR の 15 例 (17.0%) とあわせて *pbb* 遺伝子変異株が 70.4% と大半を占めており、インフルエンザ菌全体の耐性菌率とほぼ同様の結果であった。

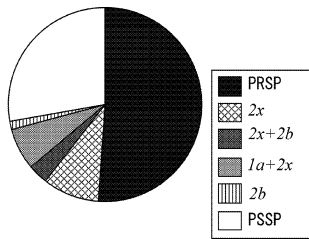
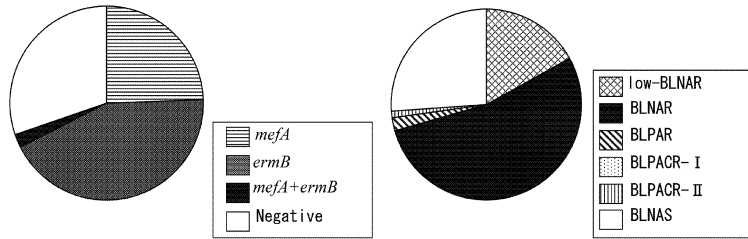
1. *Streptococcus pneumoniae* (n=86)

 2. *Haemophilus influenzae* (n=88)


Fig. 7 Isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* which were detected simultaneously. These isolates distributed by PCR results for resistant genes.

PRSP: penicillin-resistant *S. pneumoniae*, PSSP: penicillin-susceptible *S. pneumoniae*, BLNAR: β -lactamase nonproducing and ampicillin resistant *H. influenzae*, BLPAR: β -lactamase producing ampicillin resistant *H. influenzae*, BLPACR-I: β -lactamase producing and low-level amoxicillin-clavulanate resistant *H. influenzae*, possessing TEM-1 and low-BLNR resistant genes, BLPACR-II: β -lactamase producing and amoxicillin-clavulanate resistant *H. influenzae*, possessing TEM-1 and low-BLNR resistant genes. BLNAS: β -lactamase nonproducing ampicillin susceptible *H. influenzae*.

IV. 考 察

我が国で広く用いられてきた米国臨床検査標準化委員会 (National Committee for Clinical Laboratory: NCCLS) による耐性菌の規定は MIC 値を用いての評価であるが⁸⁾, 近年その耐性機構の研究が進み, 原因となる耐性遺伝子の存在が確認され, より正確な評価が試みられている¹⁾⁻³⁾⁹⁾. 今回我々は耐性遺伝子による耐性菌分類を用い MIC 値との比較を行っているが, PISP のうちでも PCG に耐性を与えるとされる *pbp2x+2b* 遺伝子変異株を含む *pbp2x+2b* 遺伝子変異株では, *pbp2b* 遺伝子変異株を含まない *pbp1a+2x* 遺伝子変異株と比較すると PCG に対する MIC 値が高い傾向であった⁸⁾. *pbp* 遺伝子変異株の耐性度分類での PRSP では MIC 値からの評価でも耐性度が高かったが, PSSP, PISP においては PSSP でも PCG に対する MIC 値が高い株が存在し, また PISP でも PSSP に比して MIC 値が低いという結果もみられ, 肺炎球菌に関しては耐性遺伝子の評価と実際の MIC 値での評価に一部で乖離がみられた. 生方らの 1998-2000 年の全国多施設における調査結果では PCG との MIC 値は耐性遺伝子分類とほぼ相関しており⁴⁾, 今回の当院の結果と相違がみられた. PRSP については当院の結果においても MIC 値と耐性遺伝子分類は相関していたが, PSSP については耐性度が高い菌株が一部に存在し臨床的にも注意が必要があると考え

られた.

このような耐性遺伝子と MIC との間で乖離がみられることに関しては野々山も指摘しており¹⁰⁾, MIC 値による NCCLS の分類が基準薬として PCG 一剤のみとしていること, ペニシリン系薬剤が多用されている米国と比べて本邦ではセフェム系が主体となるため, ペニシリン系薬剤による NCCLS の分類を本邦でそのまま適用し耐性菌を評価するのは難しいと考えられる⁹⁾.

また肺炎球菌での耐性遺伝子変異とマクロライド系抗菌薬に対する MIC 値との比較では, 生方らの報告での耐性遺伝子率と今回の調査結果は同様であり, 同報告での 14 員環マクロライド薬 erythromycin の MIC と今回の調査を比較すると, とともに全体の 4 割近くをしめる *ermB* 遺伝子変異株はほぼ全例で強い耐性を示していた⁴⁾. また CLDM に関しては *ermB* 遺伝子変異株は高度耐性であったが, *meqA* 遺伝子変異株は感受性菌と同等の MIC を保っており, 既知の報告と同様であった⁴⁾.

インフルエンザ菌では, *pbp* 遺伝子変異株の耐性度と実際のペニシリン系抗菌薬に対する MIC 値での耐性度の評価において, 今回の結果ではほぼ一致していた. この結果は生方らの 1998-2000 年の全国多施設における調査結果と類似した傾向を示しており⁵⁾, インフルエンザ菌に関しては *pbp* 遺伝子変異株の情報が, 実際の臨床における抗菌薬選択において有効と推測された. 一方で

BLNAR が年々増多している背景があり、BLNAR の MIC ピーク値が既知の報告に比して高値であった⁵⁾。

今回の調査における MIC 値の評価からは、肺炎球菌、インフルエンザ菌ともにペニシリン系抗菌薬における耐性は軽度耐性であるが、インフルエンザ菌ではより高い耐性の株がみられた。セフェム系抗菌薬として今回調査した経口薬である CDTR と注射薬である CTX に関しては PRSP と BLNAR において両薬剤の MIC 値は我が国における肺炎での breakpoint MIC を 95% 以上で下回っており⁶⁾、肺炎球菌、インフルエンザ菌ともにまだ十分に臨床効果が期待できると考えられた。またこれらの結果は 1998 年から 2000 年に生方らが行った市中感染症研究会参加施設での報告と類似した結果であった⁴⁾⁵⁾。またマクロライド系抗菌薬では、肺炎球菌において CAM は 65% 以上が肺炎での breakpoint MIC 値を上回っており⁷⁾、その大部分が MIC 値 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の高度耐性であり、肺炎球菌の半数は CAM による臨床効果が期待できないと考えられた。

今回の調査で肺炎球菌とインフルエンザ菌が同時に検出された例は 88 例であり、肺炎球菌は 25.5%、インフルエンザ菌は 26.3% と、全体のほぼ 1/4 を占めていた。大橋らの小児科入院症例での肺炎球菌検出例におけるインフルエンザ菌同時検出例の報告と類似した結果であり¹¹⁾、2 つの菌が同時に存在することが多いことを示している。同時検出例における耐性菌率は、全体の耐性菌率と比して著明な変化はみられなかった。今回の調査期間中では肺炎球菌とインフルエンザ菌の同時検出菌例数は年次的な変化はみられなかったが、今後耐性菌が増えるに従いどのように変化していくかは大変興味深いと考えられた。

当院での 5 年間の調査においては、肺炎球菌全体の耐性度には大きな年次変化はみられなかったが、インフルエンザ菌では BLNAR が急増しており、今後も菌の耐性状況は変化していくと推測される。砂川は 2002 年から 2003 年での全国 20 施設における肺炎球菌およびインフルエンザ菌の薬剤感受性を調査し、1998 年から 2000 年の生方らによる全国調査と比較して、BLNAR が約 3 倍に急増していると報告しており¹²⁾、同様の報告は他施設

でも散見される¹³⁾¹⁴⁾。また、肺炎球菌とインフルエンザ菌ともに低年齢層に多く、耐性遺伝子変異も低年齢層で高率にみられており、低年齢での免疫の未熟性から抗生剤による暴露の機会が多く、また集団保育による感染の拡大も考えられ¹⁵⁾¹⁶⁾、今後も耐性菌が増多していくと推察される。砂川らの小児化膿性髄膜炎の全国調査結果では肺炎球菌とインフルエンザ菌ともに耐性菌率がすでに 7 割を超えており¹⁷⁾、耐性菌の増多は小児科領域においてより深刻な問題となっている。耐性遺伝子と実際の MIC 値の双方の評価による、定期的でかつ地域ごとの耐性状況を調査することは、重症感染症を含めた治療の問題、さらに耐性菌の動向を把握する上でも臨床的に重要と考えた。また耐性菌による治療抵抗性の重症感染症に対し、抗生剤による治療のみならず、肺炎球菌、インフルエンザ菌において各年齢層におけるワクチンによる防衛策を視野に入れた治療を検討していく必要があると考えられた。

文 献

- 1) Ubukata K, Muraki T, Igarashi A, Asahi Y, Konno M. Identification of penicillin and other beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. J Infect Chemother 1997; 3: 190-7.
- 2) Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2727-34.
- 3) Ubukata K, Shibuya Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1693-9.
- 4) 生方公子, 小林玲子, 千葉菜穂子, 長谷川恵子, 紺野昌俊. 本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学解析. 日治療会誌 2003; 51: 60-70.
- 5) 生方公子, 小林玲子, 千葉菜穂子, 長谷川恵子, 紺野昌俊. 本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Haemophilus influenzae* の分子疫学解析. 日治療会誌 2002; 50: 794-804.
- 6) 斉藤 厚, 稲松孝忠, 岡田 淳, 小栗豊子, 菅野

- 治重, 草野展周 ほか. 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告; 呼吸器感染症および敗血症におけるブレイクポイント. *Chemotherapy* 1994; 42; 905-14.
- 7) 斉藤 厚, 稲松孝思, 岡田 淳, 小栗豊子, 菅野治重, 草野展周 ほか. 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告; 呼吸器感染症および敗血症におけるブレイクポイント; 新規抗菌薬および既存抗菌薬の追加(1977年: 案). *日治療会誌* 1997; 45; 757-61.
 - 8) 生方公子. 薬剤耐性菌 PRSP(ペニシリン耐性肺炎球菌). *日臨* 2003; 61: 171-5.
 - 9) 千葉菜穂子, 生方公子. インフルエンザ菌と肺炎球菌における β -ラクタム系薬の標的遺伝子変異. *治療の領域* 2005; 21; 39-44.
 - 10) 野々山勝人. 肺炎球菌, インフルエンザ菌の耐性状況. *小児内科* 2004; 36: 46-9.
 - 11) 大橋芳之, 佐々木悟, 一戸明子, 渡辺祐子, 渡辺哲, 大村映子 ほか. 小児科入院症例における肺炎球菌およびインフルエンザ菌の分離状況並びに抗生剤耐性について; 2004-2005年. *小児臨* 2007; 1: 519-22.
 - 12) 砂川啓介. 全国小児科外来初診の呼吸器感染症患児より分離された *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* の検討 (2002~2003年); 耐性株の割合および経口抗菌薬に対する薬剤感受性について. *感染症誌* 2005; 79: 887-94.
 - 13) 石川信泰, 杉岡竜也, 杉本和夫. 洗浄喀痰由来のインフルエンザ菌および肺炎球菌の薬剤感受性成績. *日小児呼吸器会誌* 2000; 11: 138-44.
 - 14) 舟橋恵二, 中根一匡, 柴田康孝, 安田直子, 田中克己, 西村直子 ほか. 小児科領域における *Haemophilus influenzae* の細菌学的検討. *医学検査* 2006; 55: 911-6.
 - 15) 橋田光一, 塩盛輝夫, 實地信夫, 北村拓朗, 宇高毅, 鈴木秀明. 保育施設園児における鼻咽腔インフルエンザ菌と肺炎球菌の検討. *日耳鼻* 2006; 109: 821-9.
 - 16) 大石智洋, 砂川慶介. 全国小児科外来初診の呼吸器感染症患児より分離された *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* の検討 (2002~2003年); 抗菌薬前投与のない児の鼻咽頭培養についての検討. *感染症誌* 2007; 81: 449-55.
 - 17) 砂川慶介, 野々山勝人, 大石智洋, 岩田 敏, 秋田博伸, 佐藤吉壮 ほか. 本邦における小児化膿性髄膜炎の動向 (2003~2004). *感染症誌* 2006; 80: 27-37.