

## 小規模医療施設から分離された肺炎球菌の疫学的研究

明石 敏<sup>1,2</sup> 河野 緑<sup>1</sup> 保科 定頼<sup>1</sup>  
金田 佳枝<sup>2</sup> 河内 弘行<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座

<sup>2</sup> 大正製薬 (株) 医薬研究所  
(指導: 町田勝彦教授)

(受付 平成 16 年 10 月 14 日)

### EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLATED FROM SMALL HOSPITALS

Toshi AKASHI<sup>1,2</sup>, Midori KONO<sup>1</sup>, Sadayori HOSHINA<sup>1</sup>,  
Yoshie KANEDA<sup>2</sup>, and Hiroyuki KAWAUCHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, The Jikei University School of Medicine

<sup>2</sup>Medicinal Research Laboratories, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.

We examined the epidemiological study of 100 strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated in hospitals of less than 100 beds in 1999. We found that the incidence of macrolide-resistant *S. pneumoniae* (ERSP) was high (71%), whereas that of penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) was low (14%). The incidence of characteristics of both PRSP and ERSP was 12%. Ketolide antibiotics (thethromycin and telithromycin) showed excellent antibacterial activities, with the minimum inhibitory concentration of 90% (MIC<sub>90</sub>) of 0.06 and 0.12 µg/mL, respectively. Moreover, these ketolide antibiotics were equally effective against ERSP and PRSP. No strains were resistant to the ketolide antibiotics, levofloxacin, or vancomycin. The incidence of strains with macrolide-resistance genes was 76%: that of *erm* (B)-positive strains was 44%, that of *mef* (A)-positive strains was 29%, and that of strains positive for both *erm* (B) and *mef* (A) was 3%. In contrast the MIC was greater than 64 µg/mL for most *erm* (B)-positive strains and showed an extremely very wide range of 0.06 µg/mL to greater than 64 µg/mL. In contrast, the MIC for most *mef* (A)-positive strains was 0.5 to 4 µg/mL. The antibacterial activity of the macrolide antibiotics generally followed the order of PRSP > penicillin-intermediate *S. pneumoniae* (PISP) > penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (PSSP), perhaps because many PRSP strains were positive for the *mef* (A) gene. Furthermore, many PSSP strains were positive for the *erm* (B) gene. Most capsular serum types were type 19 (27%). Types 19, 3, 6, and 23 accounted for almost 80% of the strains. Most PRSP strains were type 19 (11 of 14 strains). Types 3, 6, 19, and 23 were often seen in ERSP. Although all type 3 strains were PSSP, most (22 of 24 strains) were ERSP. All mucoid strains were highly susceptible to penicillin, but none were positive for only the *mef* (A) gene. Our results document the features of *S. pneumoniae* in hospitals of less than 100 beds and confirm the utility of an epidemiological investigation limited to small hospitals.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2005 ; 120 : 19-33)

Key words : *Streptococcus pneumoniae*, penicillin, macrolide, ketolide, resistance, serotype

## I. 緒 言

細菌性市中肺炎の原因菌として最も多く分離される肺炎球菌 (*S. pneumoniae*) はペニシリン系あるいはセフェム系抗菌薬に耐性を示す Penicillin resistant *S. pneumoniae* (PRSP) またはマクロライド系抗菌薬に耐性を示す Erythromycin resistant *S. pneumoniae* (ERSP) などであり、これらの急増が国内外で大きな問題となっている。今回、小規模医療施設における肺炎球菌の薬剤感受性等の状況を把握する目的で、1999年に100床未満の医療施設における呼吸器疾患由来の *S. pneumoniae* を全国から100株収集し、① 薬剤感受性、② 莢膜血清型、③ ムコイド・非ムコイド分類および④ マクロライド耐性遺伝子の保有状況についての疫学的研究を行った。

## II. 対象と方法

### 1. 対象

1999年の2月～4月および10月～12月に日本全国の100床未満の医療施設において呼吸器患者由来の臨床検体から分離された臨床分離の *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)、小児患者(満16歳未満)由来36株、成人患者(満16歳以上)由来52株、年齢不明患者由来12株の合計100株を使用した(2月～4月:70株、10月～12月:30株)。菌株は分離地域、年齢および性別から重複をさけた。分離地域および株数(施設数)は、東北地方18株(6施設)、関東地方40株(25施設)、東海地方5株(4施設)、甲信越・北陸地方7株(4施設)、近畿地方7株(6施設)、中国地方9株(6施設)、四国地方7株(5施設)および九州・沖縄地方7株(5施設)であった。また、県別では、東京都23株(13施設)、青森県12株(3施設)、群馬県7株(3施設)、愛知県5株(4施設)、高知県5株(3施設)が多く、他の24県からの分離は4株以下であった。*S. pneumoniae* はグラム染色でグラム陽性双球菌、カタラーゼ陰性、羊血液寒天培地で $\alpha$ 溶血を示すコロニーでオプトヒンテストを行い決定した。

### 2. 薬剤感受性試験

最小発育阻止濃度(MIC)は米国臨床検査標準化委員会(National Committee for Clinical

Laboratory Standards: NCCLS) に準拠した微量液体希釈法<sup>1)</sup>で測定した。抗菌薬はペニシリン系のベンジルペニシリン(以下ペニシリン、PCG)、セフェム系のセフジニル(CFDN)、マクロライド系のエリスロマイシン(EM)、クラリスロマイシン(CAM)、アジスロマイシン(AZM)、ケトライド系のテリスロマイシン(TEL)、セスロマイシン(治験薬ABT-773、以下ABT)、キノロン系のレボフロキサシン(LVFX)およびグリコペプチド系のバンコマイシン(VCM)を使用した。抗菌力測定には、おもに市販プレート(フローゼンプレート、栄研化学、東京)を用いたが、一部の抗菌薬については力価の保証されたものを用時調製して使用した。培地は2%ウマ溶血液を含むCation調整のMueller Hinton Brothを用いた。接種菌量は約 $10^4$  CFU/wellとした。培養は35°Cで20～24時間好気培養を行った。最小発育阻止濃度(MIC:  $\mu\text{g/mL}$ )は薬剤不含有培地における菌の発育を対照に、菌の発育が認められない最小の濃度とした。MICの精度管理は *S. pneumoniae* ATCC49619を用いて行った。各薬剤の感性(S: Susceptible)、中間(I: Intermediate)、耐性(R: Resistant)の基準値はNCCLS<sup>2)</sup>を用いた。なお、TELはNCCLSの暫定値を用い、ABTは基準値が未設定であるため、類似抗菌薬のTELの値を参考とした。

### 3. 莢膜血清型分類

莢膜多糖体の血清型分類は市販の肺炎球菌莢膜型別用免疫血清(デンカ生研(株)、東京)を用いて検討した。菌はコロンビア5%羊寒天培地(BBL, NJ USA)に画線、37°Cで18～24時間好気培養した。スライドガラスに各莢膜型別用血清および生理食塩液1滴を滴下の後、血液寒天培地上の発育菌をエーゼで掻き取り、これと血清および生理食塩液と良く混和した。スライドガラスを1分間、前後に傾斜させながら肉眼で凝集の有無を判定、1分以内に強い凝集が観察されたものを陽性とした。抗血清は39種(1型～47型、ただし、13型、26型、30型、37型、42型、43型、44型、45型を除く)を用いた。使用した39種全ての抗血清に対して凝集を示さない *S. pneumoniae* は型別不能(N.T.)とした。

#### 4. ムコイド・非ムコイド型コロニー分類

菌をコロムビア 5% 羊寒天培地に画線, 37°C で 18~24 時間好気培養を行い, 発育した *S. pneumoniae* のコロニー性状により, ムコイド型または非ムコイド型を区別した. なお, ムコイド型の陽性対照株として *S. pneumoniae* ATCC6303 を用いた.

#### 5. マクロライド耐性遺伝子の保有状況

菌株の染色体 DNA を鋳型として, マクロライド耐性遺伝子のメチル化遺伝子<sup>3)4)</sup> (*erm* (B)) および排出ポンプ遺伝子<sup>5)6)</sup> (*mef* (A)) の特異的プライマーを用いた Polymerase Chain Reaction (PCR) を行ないマクロライド耐性遺伝子の保有状況を確認した. 使用した *erm* (B) および *mef* (A) の特異的プライマーの塩基配列<sup>7)8)</sup> を以下に示した.

*erm* (B)

forward 5'-TCAACCAAATAATAAAACAA

reverse 5'-AATCCTTCTTCAACAATCAG

*mef* (A)

forward 5'-AGTATCATTAATCACTAGTGC

reverse 5'-TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG

なお, プライマーは外注 (ライフテックオリエンタル (株), 東京) で合成した.

PCR は, まず菌体を用いて行い (コロニー-PCR 法), 耐性遺伝子陰性と判断された場合, 抽出染色体 DNA (cell lysate PCR 法) を用いて追試験を行った. 両試験のいずれかで耐性遺伝子が検出された場合に耐性遺伝子「陽性」, 検出されなかった場合「陰性」と判定した.

##### 1) コロニー-PCR 法用染色体 DNA の調製

コロムビア 5% 羊血液寒天培地を用いて, *S. pneumoniae* を 37°C で 16 時間培養, 発育した菌を滅菌ツマ楊枝の先端にとり, それを PCR micro-tube plate の底に擦り付け, 菌体を直接, 染色体 DNA として用いた.

##### 2) Cell lysate PCR 法用染色体 DNA の調製

コロムビア 5% 羊血液寒天培地を用いて, *S. pneumoniae* を 37°C で 16 時間培養, 発育した菌体を 1 白金耳釣菌, 100  $\mu$ L の滅菌水に懸濁, これを 95°C で 15 分間熱処理して菌体を破碎した. 12,000 rpm で 10 分間遠心, 上清を crude lysate として回収し, その 1  $\mu$ L を染色体 DNA として

用いた.

##### 3) PCR 反応条件

PCR は, PCR supermix (GIBCO, Rockville, MD USA) を用い, 反応系は 25  $\mu$ L で, 反応条件として *erm* (B) は 94°C 1 分, 40°C 1 分, 72°C 1 分で 30 サイクル, *mef* (A) は 94°C 1 分, 47°C 1 分, 72°C 1 分で 30 サイクル行った. 反応を終了した PCR 反応液 10  $\mu$ L を回収し, これに Loading buffer (0.02% Bromophenol blue, 0.02% Xylen cyanol, 50% Glycerol, 1% SDS) を 2  $\mu$ L 添加し攪拌後, 1.5 w/v% アガロースゲル, TAE Buffer (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA (pH 8.0)) を用いて 100 V, 1 時間電気泳動, エチジウムブロマイド染色を行い, 増幅された DNA を波長 254 nm の UV ランプ照射下で検出 (*erm* (B) : 337 bp, *mef* (A) : 346 bp), ポラロイドカメラで撮影した.

### III. 結 果

#### 1. 薬剤感受性

##### 1) *S. pneumoniae* 100 株の MIC

*S. pneumoniae* 100 株に対する各薬剤の MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>80</sub>, MIC<sub>90</sub> および MIC 分布を Table 1 に示した. MIC が最も低濃度側に分布したのはケトライド系抗菌薬の ABT, ついで TEL であった. ABT の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>80</sub> はいずれも 0.06  $\mu$ g/mL, TEL の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>80</sub> はそれぞれ, 0.06  $\mu$ g/mL, 0.12  $\mu$ g/mL, MIC 範囲は ABT が 0.015~0.25  $\mu$ g/mL, TEL が 0.015~0.5  $\mu$ g/mL と小さく, ケトライド系の抗菌活性は優れていた. これに対して, ペニシリン系の PCG の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>80</sub> はそれぞれ,  $\leq$ 0.06  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL と, MIC<sub>50</sub> は小さいものの MIC<sub>80</sub> は大きかった. セフェム系の CFDN の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>80</sub> はそれぞれ, 0.5  $\mu$ g/mL, 4  $\mu$ g/mL と PCG 同様に MIC<sub>50</sub> は小さいものの, MIC<sub>80</sub> は大きかった. マクロライド系の EM, CAM および AZM の MIC<sub>50</sub> はそれぞれ, 2  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL 及び 2  $\mu$ g/mL, MIC<sub>80</sub> はいずれも >64  $\mu$ g/mL と大きかった. キノロン系の LVFX の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>80</sub> はいずれも 1  $\mu$ g/mL, MIC 範囲は 0.5~2  $\mu$ g/mL であった. グリコペプチド系の VCM の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>80</sub> は 0.25 および 0.5  $\mu$ g/mL,

Table 1. MIC of Antibacterial agents against All *S. pneumoniae* ( $n=100$ )

	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )								
	EM	CAM	AZM	ABT	TEL	PCG	CFDN	LVFX	VCM
MIC <sub>50</sub>	2	1	2	0.06	0.06	$\leq 0.06$	0.5	1	0.25
MIC <sub>80</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	1	4	1	0.5
MIC <sub>90</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	2	8	1	0.5
MIC min	0.03	0.03	0.015	0.015	0.015	$\leq 0.06$	0.03	0.5	0.25
MIC max	>64	>64	>64	0.25	0.5	4	32	2	0.5

EM: Erythromycin, CAM: Clarithromycin, AZM: Azithromycin, ABT: Thethromycin (ABT-773), TEL: Telithromycin, PCG: Penicillin, CFDN: Cefdinir, LVFX: Levofloxacin, VCM: Vancomycin

Table 2. MIC of Antibacterial agents against PSSP ( $n=53$ )

	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )								
	EM	CAM	AZM	ABT	TEL	PCG	CFDN	LVFX	VCM
MIC <sub>50</sub>	64	32	>64	0.06	0.06	$\leq 0.06$	0.25	1	0.25
MIC <sub>80</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	$\leq 0.06$	0.5	1	0.5
MIC <sub>90</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	$\leq 0.06$	0.5	1	0.5
MIC min	0.03	0.03	0.015	0.015	0.015	$\leq 0.06$	0.03	0.5	0.25
MIC max	>64	>64	>64	0.25	0.5	$\leq 0.06$	2	2	0.5

EM: Erythromycin, CAM: Clarithromycin, AZM: Azithromycin, ABT: Thethromycin (ABT-773), TEL: Telithromycin, PCG: Penicillin, CFDN: Cefdinir, LVFX: Levofloxacin, VCM: Vancomycin

MIC 範囲は狭く 0.25~0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

## 2) 薬剤耐性 *S. pneumoniae* の分離率

抗菌薬感受性別の *S. pneumoniae* 分離率は、PCG の感性 (PSSP), 中間 (PISP) および耐性 (PRSP), それぞれ, 53%, 33% および 14%, PISP と PRSP を含めた耐性率は 47% であった。CFDN の感性 (S), 中間 (I) および耐性 (R) の分離率は, それぞれ, 56%, 4% および 39%, I と R を含めた耐性率は 43% であった。EM の S (ESSP) は 25%, I (EISP) は 4%, R (ERSP) は 71% で, I と R を含めた耐性率は 75% であった。CAM の S は 25%, I は 14%, R は 61%, I と R を含めた耐性率は 75% であった。AZM の S は 31%, I は 4%, R は 65% であり, I と R を含めた耐性率は 69% であった。これに対して, TEL, ABT, LVFX および VCM はすべて S であった。

## 3) PCG と EM の交差耐性率

100 株の PCG 感受性と EM 感受性の関係は, PRSP の 85.7% (12/14 株) が ERSF であり, PISP の 72.7% (24/33 株) が ERSF であった。PRSP または PISP の中での ERSF 分離率は 76.6% (36/

47 株), さらに ERSF と EISP を含めた耐性は 83.0% (39/47 株) の高率を示した。

## 4) PCG 感受性別の抗菌活性

*S. pneumoniae* を PCG 感受性により, PSSP (53 株), PISP (33 株) および PRSP (14 株) に分類, 各薬剤の MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>80</sub>, MIC<sub>90</sub> および MIC 分布を Table 2, 3 および 4 に示した。PSSP, PISP および PRSP のいずれに対してもケトライド系の ABT および TEL の MIC<sub>90</sub> は小さく, 優れた抗菌活性を示した。EM, CAM および AZM のマクロライド系では PSSP, PISP および PRSP に対する MIC 分布に大きな違いはなかったが, PRSP の MIC<sub>50</sub> と MIC<sub>80</sub> を PSSP のそれらと比較すると小さかった。ペニシリン感受性 (PRSP, PISP および PSSP) で菌分類した場合にマクロライド系は PSSP に比して PRSP に対する MIC が小さかった。

## 5) EM 感受性別の抗菌活性

*S. pneumoniae* を EM 感受性により, ESSP (25 株), EISP および ERSF (75 株) に分類, EM 感受性別の抗菌活性を Table 5 および 6 に示した。

Table 3. MIC of Antibacterial agents against PISP ( $n=33$ )

	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )								
	EM	CAM	AZM	ABT	TEL	PCG	CFDN	LVFX	VCM
MIC <sub>50</sub>	2	1	2	0.03	0.06	1	4	1	0.25
MIC <sub>80</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	1	4	1	0.25
MIC <sub>90</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	1	8	1	0.5
MIC min	0.03	0.03	0.03	0.015	0.015	0.12	0.25	0.5	0.25
MIC max	>64	>64	>64	0.12	0.12	1	8	2	0.5

EM : Erythromycin, CAM : Clarithromycin, AZM : Azithromycin, ABT : Thethromycin (ABT-773), TEL : Telithromycin, PCG : Penicillin, CFDN : Cefdinir, LVFX : Levofloxacin, VCM : Vancomycin

Table 4. MIC of Antibacterial agents against PRSP ( $n=14$ )

	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )								
	EM	CAM	AZM	ABT	TEL	PCG	CFDN	LVFX	VCM
MIC <sub>50</sub>	2	1	2	0.03	0.12	2	8	1	0.25
MIC <sub>80</sub>	2	1	2	0.06	0.12	4	8	1	0.5
MIC <sub>90</sub>	>64	32	64	0.06	0.12	4	16	1	0.5
MIC min	0.03	0.03	0.06	0.015	0.03	2	2	0.5	0.25
MIC max	>64	>64	>64	0.06	0.12	4	32	1	0.5

EM : Erythromycin, CAM : Clarithromycin, AZM : Azithromycin, ABT : Thethromycin (ABT-773), TEL : Telithromycin, PCG : Penicillin, CFDN : Cefdinir, LVFX : Levofloxacin, VCM : Vancomycin

Table 5. MIC of Antibacterial agents against EM-Susceptible Stains of *S. pneumoniae* ( $n=25$ )

	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	EM	CAM	AZM	ABT	TEL	PCG	CFDN
MIC <sub>50</sub>	0.06	0.03	0.06	0.015	0.03	$\leq 0.06$	0.25
MIC <sub>80</sub>	0.06	0.06	0.12	0.03	0.06	0.25	0.5
MIC <sub>90</sub>	0.06	0.06	0.12	0.03	0.06	1	4
MIC min	0.03	0.03	0.015	0.015	0.015	$\leq 0.06$	0.03
MIC max	0.12	0.06	0.25	0.03	0.06	4	32

EM : Erythromycin, CAM : Clarithromycin, AZM : Azithromycin, ABT : Thethromycin (ABT-773), TEL : Telithromycin, PCG : Penicillin, CFDN : Cefdinir

Table 6. MIC of Antibacterial agents against EM-Non Susceptible Stains of *S. pneumoniae* ( $n=75$ )

	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	EM	CAM	AZM	ABT	TEL	PCG	CFDN
MIC <sub>50</sub>	64	64	>64	0.06	0.06	0.12	1
MIC <sub>80</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	1	8
MIC <sub>90</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	2	8
MIC min	0.5	0.5	0.5	0.03	0.03	$\leq 0.06$	0.03
MIC max	>64	>64	>64	0.25	0.5	4	16

EM : Erythromycin, CAM : Clarithromycin, AZM : Azithromycin, ABT : Thethromycin (ABT-773), TEL : Telithromycin, PCG : Penicillin, CFDN : Cefdinir

その結果、ケトライド系の ABT および TEL の抗菌力はマクロライド耐性菌に対してもマクロライド感性菌と同等に優れた抗菌活性を示した。

## 2. *S. pneumoniae* の莢膜血清型

### 1) 莢膜血清型

39 種の抗血清を用いて 100 株を検討した結果を Fig. 1 に示した。92 株が 13 種の血清型に分類された。残り 8 株 (8%) は型別不能であった。今回の検討では血清型 19 型 (27%) が最も多く、ついで 3 型 (24%)、6 型 (13%)、23 型 (12%)、15 型 (5%)、14 型 (4%)、35 型 (2%) の順であった。また、4 型、8 型、9 型、16 型、31 型および 33 型はそれぞれ 1% 認められた。

### 2) 莢膜血清型と薬剤感受性

分離率が 10% 以上と高かった、3 型 (24/100 株)、6 型 (13/100 株)、19 型 (27/100 株) および 23 型 (12/100 株) について、PCG または EM 感受性との関係を Table 7 に示した。3 型は PCG に対してすべて感性 (24/24 株) で、PISP および PRSP の菌株はまったく認められなかった。6 型は PISP が 53.8% (7/13 株)、PSSP が 38.5% (5/13 株) を占めていた。19 型では PRSP が多く、PRSP の 14 株の内、75.6% (11/14 株) を占めていた。また、19 型の中での比率は PISP が 44.4% (12/27 株) と PRSP が 40.7% (11/27 株) とほぼ同数見られ、PISP と PRSP で 85.2% を占めてい

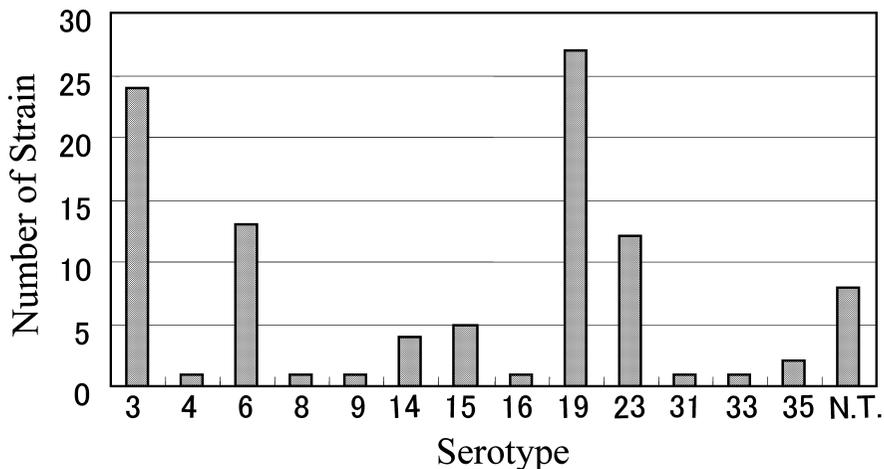


Fig. 1. Capsular serotype of *S. pneumoniae* 100 strains. Most capsular serum type were type 19 (27%) Types 19, 3, 6 and 23 accounted for almost 80% of the strains.

Table 7. Serotype and susceptibility of *S. pneumoniae*

susceptibility \ Serotype	Penicillin			Erythromycin		
	S	I	R	S	I	R
Type 3 <i>n</i> = 24	24 (100)	0	0	2 (8.3)	0	22 (91.7)
Type 6 <i>n</i> = 13	5 (38.5)	7 (53.8)	1 (7.7)	1 (7.7)	0	12 (92.3)
Type 19 <i>n</i> = 27	4 (14.8)	12 (44.4)	11 (40.7)	5 (18.5)	3 (11.1)	19 (70.4)
Type 23 <i>n</i> = 12	1 (8.3)	9 (75.0)	2 (16.7)	2 (16.7)	1 (8.3)	9 (75.0)

- 1) Numerical value means number of strain.
- 2) The strain isolated more than 10% was shown here.
- 3) ( ): %

Table 8. MIC of Antibacterial agents against Mucoïd type *S. pneumoniae* (n=26)

	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )								
	EM	CAM	AZM	ABT	TEL	PCG	CFDN	LVFX	VCM
MIC <sub>50</sub>	>64	64	>64	0.06	0.06	$\leq 0.06$	0.5	1	0.25
MIC <sub>80</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.06	$\leq 0.06$	0.5	1	0.5
MIC <sub>90</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	$\leq 0.06$	0.5	1	0.5
MIC min	0.03	0.03	0.03	0.015	0.03	$\leq 0.06$	0.03	1	0.25
MIC max	>64	>64	>64	0.12	0.12	$\leq 0.06$	1	2	0.5

EM: Erythromycin, CAM: Clarithromycin, AZM: Azithromycin, ABT: Thethromycin (ABT-773), TEL: Telithromycin, PCG: Penicillin, CFDN: Cefdinir, LVFX: Levofloxacin, VCM: Vancomycin

Table 9. MIC of Antibacterial agents against Non Mucoïd type *S. pneumoniae* (n=74)

	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )								
	EM	CAM	AZM	ABT	TEL	PCG	CFDN	LVFX	VCM
MIC <sub>50</sub>	2	0.5	2	0.03	0.06	0.5	2	1	0.25
MIC <sub>80</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	1	8	1	0.5
MIC <sub>90</sub>	>64	>64	>64	0.06	0.12	2	8	1	0.5
MIC min	0.03	0.03	0.015	0.015	0.015	$\leq 0.06$	0.03	0.5	0.25
MIC max	>64	>64	>64	0.25	0.5	4	32	2	0.5

EM: Erythromycin, CAM: Clarithromycin, AZM: Azithromycin, ABT: Thethromycin (ABT-773), TEL: Telithromycin, PCG: Penicillin, CFDN: Cefdinir, LVFX: Levofloxacin, VCM: Vancomycin

た。

マクロライド (EM) 耐性菌は、3 型、6 型、19 型および 23 型のいずれにおいても多く、EM 耐性株は 70.4%~92.3% であった。

### 3. ムコイド型・非ムコイド型コロニー分類

#### 1) 分離状況

100 株を検討した結果、26% (26/100 株) がムコイド型、74% (74/100 株) が非ムコイド型であった。26 株のムコイド型の内、24 株 (92.3%) が莢膜血清型の 3 型、残りの 2 株は型別不能 (N.T.) であった。

#### 2) ムコイド型・非ムコイド型と薬剤感受性の関係 (Table 8, 9)

ムコイド型の 26 株すべてが PCG に高感受性 (MIC $\leq 0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示した。非ムコイド型では PCG の MIC<sub>50</sub> が  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  と耐性を示した。CFDN においても、PCG と同様の傾向が見られ、非ムコイド型に比べてムコイド型の CFDN 感受性は明らかに高かった。これに対して、EM, CAM および AZM のマクロライド系では PCG および CFDN とは逆に、非ムコイド型の感受性が高い傾

Table 10. Prevalence of Macrolide Resistance Genes in All *S. pneumoniae* (n=100)

<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (A) +	<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (A) -	<i>erm</i> (B) - <i>mef</i> (A) +	<i>erm</i> (B) - <i>mef</i> (A) -
3/100 (3%)	44/100 (44%)	29/100 (29%)	24/100 (24%)

向が見られた。ケトライド系ではムコイド型、非ムコイド型にかかわらず *S. pneumoniae* に対する MIC<sub>90</sub> が  $0.06\sim 0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$  と高感受性を示し、LVFX および VCM においても感受性を示した。

### 4. マクロライド耐性遺伝子

#### 1) 保有状況

*S. pneumoniae* のマクロライドの標的分子 23S rRNA のメチル化酵素遺伝子 *erm* (B)、およびマクロライド排出蛋白遺伝子 *mef* (A) の保有結果を Table 10 に示した。100 株を PCR 試験した結果、マクロライド耐性遺伝子は 76 株が陽性、24 株が陰性であった。また、各遺伝子の保有状況は、*erm* (B) 陽性・*mef* (A) 陽性が 3 株 (3%)、*erm*

(B)陽性・*mef*(A)陰性が44株(44%), *erm*(B)陰性・*mef*(A)陽性が29株(29%), *erm*(B)陰性・*mef*(A)陰性が24株(24%)であった。したがって、1999年分離の *S. pneumoniae* では *erm*(B)のみ保有株の分離率が *mef*(A)のみ保有株よりも高かった。

2) マクロライド耐性遺伝子と薬剤感受性の関係

EM, CAM, AZM, ABT, TELおよびPCGのMIC値とマクロライド耐性遺伝子の関係をTable 11に示した。マクロライド感受性菌(26株)の中で1株のみがマクロライド耐性遺伝子の *erm*(B)保有が見られ、MICによる耐性型別と遺伝子型別の分類に違いがあった。しかし、マクロライド中間および耐性菌においては、その全菌株が *erm*(B), *mef*(A)のいずれか、または両方の耐性遺伝子を保有しており、MICを基準とした耐性分類と遺伝子の有無による耐性分類に相違がなかった。

EM, CAMおよびAZMの *S. pneumoniae* に対するMICは、*erm*(B)陽性・*mef*(A)陽性または *erm*(B)陽性・*mef*(A)陰性株において、>64 μg/mLを示す菌株が多く見られた。しかし、*erm*(B)陰性・*mef*(A)陽性株においては、0.5~4 μg/

mLの中程度のMICを示す菌株が多かった。ケトライド系のABTおよびTELに対してはマクロライド系のEM, CAMおよびAZMで見られたような *erm*(B)・*mef*(A)遺伝子の有無でのMICの違いはほとんどなく、*erm*(B)陽性・*mef*(A)陽性株、*erm*(B)陽性・*mef*(A)陰性株、*erm*(B)陰性・*mef*(A)陰性株のいずれにおいても、MIC範囲が0.015~0.5 μg/mLと小さかった。

3) PCG感受性とマクロライド耐性遺伝子の関係 (Table 12)

PRSPにおいては、*erm*(B)陰性・*mef*(A)陽性株が78.6%(11/14株)であった。したがって、PRSPのほとんどが *mef*(A)のみ陽性株で占められていた。PISPにおいては、*erm*(B)陽性・*mef*(A)陰性株または *erm*(B)陰性・*mef*(A)陽性株の分離が高く、それぞれ45.5%(15/33株)、36.4%(12/33株)であった。PSSPにおいては、*erm*(B)陽性・*mef*(A)陰性株が52.8%(28/53株)、*erm*(B)陰性・*mef*(A)陰性株が32.1%(17/53株)であった。

4) 莢膜血清型とマクロライド耐性遺伝子の関係 (Table 13)

3型(24株)では *erm*(B)陽性が22株(91.7%)と大多数を占めた。*mef*(A)のみ陽性株はまった

Table 11. MIC and Macrolide Resistance Genes in *S. pneumoniae* (n=100)

MIC (μg/mL)	EM				CAM				AZM				ABT				TEL				PCG				
	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B+ <i>mef</i> A-	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A+	<i>erm</i> B- <i>mef</i> A-	
>64	3	32	1		1	29	1		2	36	1														
64		4			1	6			1	2															
32		3			1	3				1															
16			1			1	1			2															
8		2								1	1														
4			3							1	1												3	1	
2		1	15			2	2				16										1	1	8		
1			6			1	12				4											10	8	3	
0.5		1	3			1	13				6											1	2		
0.25										1													2	1	2
0.12		1													7		1	1					2	1	1
0.06				12		1		11					13	3	27	17		1	30	5	8	2	28	6	17
0.03				12				13					3		12	11			4		13				
0.015													1		1		15				3				

EM: Erythromycin, CAM: Clarithromycin, AZM: Azithromycin, ABT: Thethromycin (ABT-773), TEL: Telithromycin, PCG: Penicillin

Table 12. Relationship between penicillin susceptibility and macrolide resistance genes of 100 strains

	<i>erm</i> + <i>mef</i> +	<i>erm</i> + <i>mef</i> -	<i>erm</i> - <i>mef</i> +	<i>erm</i> - <i>mef</i> -	Total
PRSP	1	1	11	1	14
PISP	0	15	12	6	33
PSSP	2	28	6	17	53
Total	3	44	29	24	100

- 1) *erm* + : *erm* (B) positive, 2) *erm* - : *erm* (B) negative  
 3) *mef* + : *mef* (A) positive, 4) *mef* - : *mef* (A) negative  
 5) Numerical value means number of strain

Table 13. Relationship between various serotype and macrolide resistance genes of 100 strains

Resistance gene <i>erm</i> (B)/ <i>mef</i> (A)	Serotype													
	3	4	6	8	9	14	15	16	19	23	31	33	35	N.T.
+ / + ( <i>n</i> =3)	1								2					
+ / - ( <i>n</i> =44)	22		9	1			1		3	6				2
- / + ( <i>n</i> =29)			3			1			17	4				4
- / - ( <i>n</i> =24)	1	1	1		1	3	3	1	5	2	1	1	2	2
Total ( <i>n</i> =100)	24	1	13	1	1	4	4	1	27	12	1	1	2	8

く見られなかったが、*erm* (B) と *mef* (A) の両遺伝子陽性が1株 (4.2%) に認められた。19型 (27株) では *mef* (A) 陽性株が17株 (63.0%) と多くを占め、*erm* (B) 陽性株は3株 (11.1%) と少なかった。また、*erm* (B) と *mef* (A) の両遺伝子陽性が2株 (7.4%) に認められた。6型 (13株) および23型 (12株) では *erm* (B) 陽性がそれぞれ9株 (69.2%)、6株 (50.0%) であった。*mef* (A) 陽性は比較的少なく、それぞれ3株 (23.1%)、4株 (33.3%) であった。したがって、莢膜血清型とマクロライド遺伝子の関係は、19型の場合に *mef* (A) 陽性株が優位、3型および6型の場合に *erm* (B) 陽性株が優位であった。

5) ムコイド・非ムコイド型とマクロライド耐性遺伝子 (Table 14)

ムコイド型では *erm* (B)・*mef* (A) 保有が1株、*erm* (B) のみ保有が22株、*mef* (A) のみ保有が0株、マクロライド耐性遺伝子なしが3株であった。

Table 14. Relationship between colony type and macrolide resistance genes of 100 strains

Resistance gene <i>erm</i> (B)/ <i>mef</i> (A)	Colony type	
	Mucoid	Non-Mucoid
+ / + ( <i>n</i> =3)	1	2
+ / - ( <i>n</i> =44)	22	22
- / + ( <i>n</i> =29)	0	29
- / - ( <i>n</i> =24)	3	21
Total ( <i>n</i> =100)	26	74

これに対して、非ムコイド型では *erm* (B)・*mef* (A) 保有が2株、*erm* (B) のみ保有が22株、*mef* (A) のみ保有が29株、マクロライド耐性遺伝子なしが21株であった。したがって、ムコイド型の

中では *erm* (B) のみ保有の菌株が多く、*mef* (A) のみ保有菌株は分離されなかった。非ムコイド型の中では、*erm* (B)・*mef* (A) 保有株を除き、マクロライド耐性遺伝子の有無にかかわらず、ほぼ同率に認められた。

#### IV. 考 察

1967年にオーストラリアにおいてペニシリン耐性肺炎球菌が初めて報告<sup>9)</sup>された。その後1977年には南アフリカで $\beta$ ラクタム、EM、クリンダマイシン、テトラサイクリンおよびクロラムフェニコールに耐性の多剤耐性菌が報告<sup>10)</sup>されてからペニシリン感受性動向に大きな注意が払われてきた。近年は経口セフェム系やマクロライド系のみならずフルオロキノロン系抗菌薬にも耐性を獲得した多剤耐性肺炎球菌も少数ではあるが報告<sup>11)12)</sup>されるようになってきている。また、耐性肺炎球菌は単に臨床での分離率が高くなってきているのみならず、PCGのMIC $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ の高度耐性菌が出現<sup>13)</sup>、さらに、肺炎の治療失敗例の報告<sup>14)</sup>も見られており、問題が深刻化してきている。本邦における1999~2000年の大規模な薬剤感受性試験で、中等度耐性菌を加えた肺炎球菌のPCGに対する耐性化率は64.3% (I: 19.8%, R: 44.5%)と報告<sup>15)</sup>されている。

さらに、経口剤として市中呼吸器疾患に対して使用頻度の高いマクロライド系抗菌薬の耐性化も指摘されている。本邦の1980年代後半頃の新薬開発を目的とした薬剤感受性試験における臨床分離株のマクロライド耐性は約10%未満の結果が見られる<sup>16)</sup>ものの、前述の1999~2000年の薬剤感受性試験では、中等度耐性菌を加えた肺炎球菌のEMに対する耐性化率が78.2% (I: 0.3%, R: 77.9%)であり、この10数年間におけるマクロライド耐性肺炎球菌の増加が著しいとする報告が多い。報告の多くは全国規模における感受性試験であり、これらの結果は、本邦における薬剤感受性動向を把握すること、新薬開発等の目的には適しているものの、医療施設の大小の区別無く収集された菌株の結果であることから、市中の小医療施設レベルにおける薬剤感受性等の動向は必ずしも十分に反映していないとも考えられた。

今回、我々は一次医療施設レベルにおける肺炎

球菌の状況を明らかにする目的で、100床未満の小規模の医療施設から分離された肺炎球菌を用いて、疫学的調査ならびに新規経口薬で市中肺炎に有効性が高いとの特徴を有するケトライド系抗菌薬の有用性を検討した。感受性試験には一次医療施設で汎用されている経口抗菌薬のセフェム系のCFDN、マクロライド系CAM、AZMおよびキノロン系のLVFX、ケトライド系抗菌薬は最近上市したTelithromycin (TEL)、臨床治療試験が実施されたThethromycin (治験薬名: ABT-773)、および注射薬ではあるものの本邦でPRSPに適応を有するグリコペプチド系のVCMを用いた。また、PCGおよびEMはペニシリンおよびマクロライド耐性型別の目的で使用した。

感性・耐性を分類する概念には、対象とする菌が抗菌薬に対して感性または耐性を判定する「細菌学的なブレイクポイント」と薬剤を投与して臨床的に有効かどうかの判断するための「臨床的なブレイクポイント」がある。NCCLSの基準は菌ごとに薬剤のブレイクポイントMICが設定されているので、感性・耐性の分類が容易である。しかし、NCCLSの基準値の基礎資料は米国の薬剤投与量、体内動態にもとづいており、米国と本邦との抗菌薬の投与量が必ずしも同一でないこと、体内動態に人種差がある場合があることなどから、そのまま外挿することは不適切であるとの意見も聞かれる<sup>17)</sup>。これらのことから、本邦では日本化学療法学会が設定した疾患ごと(菌ごとではない)のブレイクポイントがあり、「感染症に対して抗菌薬の臨床効果(80%以上の有効率)が期待できるMIC値」と定義されている<sup>17)</sup>。今回検討した抗菌薬の中で日本化学療法学会の基準値があるものはCAM、CFDNおよびLVFXであり、これらの肺炎に対するブレイクポイントMIC値はそれぞれ、1,1および $2 \mu\text{g/mL}$ と設定されている<sup>17)</sup>。NCCLSおよび日本化学療法学会のブレイクポイントには一長一短あるものの、今回の我々の検討では菌の感受性区分にはNCCLSを用い、臨床効果(肺炎)に関する考察には日本化学療法学会のブレイクポイント値を用いた。

1999年に100床未満の小規模医療施設の呼吸器疾患患者由来の臨床検体から分離された*S. pneumoniae*の感受性試験の結果、PRSPの比率

は低いものの、PISP, セフェム (CFDN) 耐性およびマクロライド耐性 (ERSP) の比率が高いことが示された。CFDN の肺炎における臨床ブレイクポイントは  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  であり、今回分離の PRSP の 14 株すべてが耐性であった。マクロライド薬では抗菌活性が、PRSP > PISP > PSSP の順に強い傾向を示し、CAM の PRSP に対する抗菌活性は MIC 分布が  $0.03 \sim 64 \mu\text{g}/\text{mL}$  と広範囲であったが、ほとんどの株に対する MIC は臨床ブレイクポイントの  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  以下の  $0.5 \sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$  であったことが示された。

今回の試験菌では、CAM の *mef* (A) 遺伝子保有株に対する MIC はブレイクポイントの  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  以下の  $0.5 \sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の菌株が 86.2% (25/29 株) を占めていた。このことから、*mef* (A) のみ保有菌株に対しては良好な臨床効果を得られることが示唆された。これに対して、*erm* (B) 保有菌株では MIC 分布が  $0.12 \sim > 64 \mu\text{g}/\text{mL}$  と高感受性の菌株が存在するものの、CAM ブレイクポイントの  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  を明らかに超える、 $> 64 \mu\text{g}/\text{mL}$  の高度耐性を示す菌が多いことから、CAM の *erm* (B) 保有菌株に対する有効性は低いと考えられた。

今回の薬剤感受性と 1999～2000 年の大規模な薬剤感受性結果<sup>15)</sup>を比較すると、中等度耐性菌を加えた *S. pneumoniae* の PCG に対する耐性化率はそれぞれ 47%, 64.3%, セフェム系に対してはそれぞれ 43%, 54.5～81.2%, EM に対してはそれぞれ 75%, 77.9% であり、したがって、今回の 100 床未満の施設分離株はペニシリン感受性が明らかに高かったが、マクロライドは同程度の低感受性～耐性を示した。

ケトライド系 ABT および TEL はペニシリン耐性、マクロライド耐性のいずれの菌に対しても優れた抗菌活性を示した。ABT および TEL の MIC<sub>90</sub> は、それぞれ  $0.03 \sim 0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $0.06 \sim 0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$  と小さかった。これら結果は *S. pneumoniae* に対するケトライド系 (ABT, TEL) の他の報告<sup>18)–20)</sup>と一致したものであった。ケトライド系はマクロライド系抗菌薬と同様、蛋白合成阻害薬である。構造上の特徴として 3 位のクラジノースが無く、そこにケトン基を有する。作用機序の面からも大きな特徴を有しており、ケトラ

イド系では ① 23S rRNA との結合部位がドメイン II およびドメイン V の 2 カ所存在する<sup>21)22)</sup>, ② リボソームとの結合能が強い<sup>23)</sup>, ⑤ 菌体内への薬剤蓄積速度が早い<sup>23)</sup>, ⑥ マクロライド排出蛋白保有 (*mef*) の耐性菌にも薬剤が蓄積する<sup>23)</sup>, ④ マクロライド耐性誘導能が無い<sup>24)</sup>, ③ メチル化リボソームに対する結合能を示す<sup>23)25)</sup>, などの違いがあり、その結果、抗菌力が優れると考えられている。

*S. pneumoniae* は、莢膜抗原性の違いにより、血清学的に 84 型に分類される。今回の分離菌は 13 型に分類され、19 型、3 型、6 型および 23 型の 4 つの莢膜血清型で約 80% を占めていた。PRSP においては特定の血清型に偏り、莢膜血清型は 6 型、19 型および 23 型のみであった。また、19 型が圧倒的に多く、PRSP の 78.6% (11/14 株) を占めていた。PRSP で分離頻度が高いと報告されている 9 型は今回の検討株では PRSP の 7.1% (1/14 株) と少なかった。なお、現在本邦で市販の *S. pneumoniae* のワクチンではカバーされていない 16 型、31 型および 35 型が 4.0% (4/100 株) 分離された。

ムコイド型の 26 株すべてが PCG に高感受性 (MIC  $\leq 0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示したものの、マクロライド薬には耐性を示す株 (22/26 株) が多かった。一般的にムコイド型は厚い莢膜を有するために菌株間で耐性遺伝子の伝達が生じにくいと想像されている。今回の分離菌でもムコイド型・莢膜血清 3 型では PRSP・PISP がまったく認められなかった。しかし、マクロライド耐性遺伝子に関してはムコイド型の 22/26 株が保有していたことから、単に莢膜の厚さだけでは耐性遺伝子の伝達の困難さを説明できないと思われた。ここで、非ムコイド型ではマクロライド耐性遺伝子の保有状況に特徴が無かったが、ムコイド型では *erm* (B) のみ保有の菌株が多く、*mef* (A) のみ保有菌株が全く分離されなかったことは興味深かった。

小規模医療施設で分離された *S. pneumoniae* がムコイド株の場合、PCG および CFDN 感受性が高いこと、また CAM においても、50% のムコイド型が日本化学療法学会の臨床ブレイクポイント値 (肺炎:  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 以下であった。ムコイド型・非ムコイド型が菌分離培養時に最初に判る試験結

果であることから、empiric な薬剤感受性情報として興味深いと考えられた。非ムコイド型では PCG の MIC がムコイド型と対照的に低感受性を示し、MIC<sub>50</sub> においても 0.5 µg/mL であった。CFDN でも PCG と同様の傾向が見られた。マクロライド系の EM, CAM および AZM では非ムコイド型の感受性がムコイド型に比べて高い傾向が示され、PCG および CFDN とは逆であった。ケトライド系の ABT および TEL ではムコイド型・非ムコイド型にかかわらず *S. pneumoniae* に高感受性を示し、MIC<sub>90</sub> が 0.06~0.12 µg/mL と小さかった。

マクロライド系抗菌薬に対するおもな耐性機序として、① 古くから報告のあるメチル化酵素 (*erm* (B) 遺伝子保有株) による 23S rRNA の特定アデニン塩基 (2058, 2059) のメチル化<sup>26)</sup>、② 新しい耐性機序として、マクロライド排出型蛋白質 (*mef* (A) 遺伝子保有株) による薬剤の汲み出し<sup>27)</sup>、23S rRNA の点突然変異及び 50S リボソーム蛋白の変異 (L4, L22) による標的部位の修飾が報告<sup>28)29)</sup> されている。マクロライド薬 (EM, CAM, AZM) の各 MIC が I と R であったすべての菌が *erm* (B) および/または *mef* (A) 遺伝子を保有していた。100 株中の 76 株がマクロライド耐性遺伝子を保有し、マクロライド耐性遺伝子保有株における各遺伝子の比率は、*erm* (B) 陽性・*mef* (A) 陽性が 3.9% (3/76 株)、*erm* (B) 陽性・*mef* (A) 陰性が 57.9% (44/76)、*erm* (B) 陰性・*mef* (A) 陽性が 38.2% (29/76 株) であった。

各マクロライド耐性遺伝子の保有状況には地域差があり、欧州と日本では *erm* (B) 遺伝子保有株、米国においては *mef* (A) 遺伝子保有株の分離頻度が高いことが示されている<sup>30)</sup>。今回の検討では *erm* (B) 保有株 (57.9%) が *mef* (A) 保有株 (38.2%) よりも約 20% 多かったが、1995 年に山梨赤十字病院における 62 株のマクロライド耐性菌の遺伝子型検討では、*erm* B が 27 株 (43.5%)、*mef*E が 25 株 (40.3%)、両遺伝子保有が 10 株 (16.1%) であったと報告<sup>31)</sup> されている。山梨赤十字病院の結果は我々とはやや異なっていたが、これは年代、医療施設規模、地域の違いによるものと考えられた。また、1999~2000 年に本邦で分離のマクロライド耐性菌 239 株では、*erm* (B) が

52.7%、*mef* (A) が 42.7%、*erm* (B) + *mef* (A) が 3.3%、マクロライド耐性遺伝子を持たない耐性菌が 1.3% と報告<sup>30)</sup> されている。*erm* (B)、*mef* (A) の分離頻度に関しては類似していたが、我々が検討したマクロライド耐性菌はすべてマクロライド耐性遺伝子を保有しており、*erm* (B) または *mef* (A) を持たない耐性菌の分離は無かった。

ケトライド系の ABT および TEL は EM 感性・耐性の区別無く優れた抗菌活性が示され、今回の検討ではケトライド耐性株は無かった。しかし、1999~2003 年に全世界で収集された 13,897 株の肺炎球菌において、TEL の MIC が 4~8 µg/mL の TEL 低感受性株が 10 株 (10/13,874 株) 分離、いずれもが *erm* (B) 保有株であったことが報告<sup>32)</sup> されている。0.07% とごく少数ではあるものの、*erm* (B) 保有菌がケトライド低感受性株であったことは留意する必要があると考える。とくに本邦では *erm* (B) 保有株の分離頻度が高いこと、肺炎球菌の *erm* (B) は 23S rRNA のメチル化酵素の誘導遺伝子であること<sup>33)</sup>、ケトライド系抗菌薬の低感受性化が 23S リボソームのメチル化の程度に関連すること<sup>34)</sup>、*in vitro* 耐性獲得試験ではあるものの、*erm* (B) 保有株で L4 変異または *erm* (B) 上流領域の塩基対欠損で TEL の MIC が >32 µg/mL の *S. pneumoniae* が報告<sup>35)</sup> されている等の理由により、ケトライド系抗菌薬の長期投与あるいは少量長期投与は *erm* (B) 保有菌のケトライド低感受性化あるいは高度耐性化の選択圧となる可能性があり、避けるべき投与方法と思われた。

## V. 結 語

我々は、1999 年に 100 床未満の医療施設から呼吸器疾患由来の *S. pneumoniae* を 100 株用い、小規模医療施設における薬剤感受性、莢膜血清型、ムコイド・非ムコイド分類およびマクロライド耐性遺伝子の保有状況についての疫学的調査を行った。その結果、以下の特徴が示された。

① ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) の分離率は 14% と低かったが、マクロライド耐性 (ERSP) は 71% と高かった。PRSP と ERSP の交差耐性は 12% であった。

② ケトライド系の ABT および TEL の

MIC<sub>90</sub> は 0.06 および 0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と優れた抗菌活性を示し、また、ペニシリン・マクロライド耐性菌に対しても感性菌と同等の優れた抗菌活性を示した。

③ ケトライド系 (ABT, TEL), LVFX および VCM 耐性菌は無かった。

④ マクロライド耐性遺伝子保有株は 76% で、*erm* (B) のみ保有が 44%, *mef* (A) のみ保有が 29%, *erm* (B)・*mef* (A) 両方保有が 3% であった。

⑤ マクロライド抗菌薬の *erm* (B) のみ保有株に対する MIC は  $>64\mu\text{g}/\text{mL}$  が多かったが、MIC 範囲は 0.06~ $>64\mu\text{g}/\text{mL}$  と広い範囲であった。これに対して *mef* (A) のみ保有株の MIC は 0.5~4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の中等度の感受性を示す株が多かった。

⑥ マクロライド薬の抗菌活性が、PRSP>PISP>PSSP の順に強い傾向を示したが、これは、PRSP に *mef* (A) 遺伝子保有が多く、PISP では *mef* (A) および *erm* (B) 遺伝子株がほぼ半数づつ、PSSP では *erm* (B) 遺伝子保有株が多いことによると考えられた。

⑦ 莢膜血清型は 19 型 (27%)>3 型 (24%)>6 型 (13%)>23 型 (12%)>15 型 (5%)>14 型 (4%)>35 型 (2%) の順であった。19 型, 3 型, 6 型および 23 型の 4 つの莢膜血清型で約 80% を占めていた。

⑧ PRSP はほとんどが 19 型であった (11/14 株)。ERSP は 3, 6, 19 および 23 型が多数を占めていた。

⑨ 分離率が 2 番目に高かった莢膜血清 3 型はすべて PSSP であったが、ほとんど (22/24 株) は ERSP であった。

⑩ ムコイド型株はすべて PCG 高感受性を示した。ムコイド型株には *mef* (A) のみ保有株は分離されなかった。

最後に、抗菌薬の中ではとくにケトライド系の優れた抗菌活性が示された。今後、ケトライド系抗菌薬はマクロライド系抗菌薬と同様に、経口薬として汎用されると考えられる。今回の小規模医療施設で分離の肺炎球菌には、ケトライド耐性菌が無かったものの、過去 10 数年間の市中におけるマクロライド耐性菌の急増現象を考慮した場合、

ケトライドの薬剤感受性動向は、ペニシリン、マクロライド耐性肺炎球菌の情報と同様、十分な調査が必要であると思われる。

稿を終えるにあたり御指導、御高閲を賜った東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座の故 町田勝彦先生に心から深謝いたします。

## 文 献

- 1) National committee for Clinical Laboratory Standards: Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-fifth edition. M-7-A5, M100-S10, Pennsylvania, USA: NCCLS; 2000.
- 2) National committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fourteenth informational supplement. M100-S14, Pennsylvania, USA: NCCLS; 2004.
- 3) Trieu-Guot P. Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene of the conjugative transposon Tn1545. Nucleic Acids Res 1990; 18: 3660.
- 4) Brisson-Noel A, Arthur M, Courvalin P. Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. J Bacteriol 1988; 170: 1739-45.
- 5) Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, Dib-Hajj F, Wondrack L, Yuan W, et al. *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2251-5.
- 6) Santagati M, Iannelli F, Oggioni M R, Stefani S, Pozzi G. Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef* (A) in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2585-7.
- 7) Shortridge VD, Flamm RK, Ramer N, Beyer J, Tanaka SK. Novel mechanism of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 26: 73-8.
- 8) Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2562-6.

- 9) Hansman D, Bulten MM. A resistant pneumococcus. *Lancet* 1967; 290: 264-5.
- 10) Jacob MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, et al. Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* 1978; 299: 735-40.
- 11) 石田雅己, 渡辺英明, 長田昌美, 福井裕子, 上田誠, 古郷 功 ほか. 北九州市立5病院における肺炎球菌の検出状況 PCG とキノロン系抗菌薬の感受性分布. *感染症誌* 1999; 73: 1116-22.
- 12) Weiss K, Restieri C, Gauthier R, Laverdiere M, McGeer A, Davidson RJ, et al. A nosocomial outbreak of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 517-22.
- 13) Schrag SJ, McGee L, Whitney CG, Beall B, Craig AS, Choate ME, et al. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* with very-high level resistance to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3016-23.
- 14) Davidson R, Cavalcanti R, Brunton JL, Bast DJ, Azavedo JCS, Kibsky P, et al. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. *N Engl J Med* 2002; 346: 747-50.
- 15) Felmingham D, Reinert RR, Hirakata T, Rodloff A. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 (Suppl S1): 25-37.
- 16) 第35回日本化学療法学会総会 新薬シンポジウム I, TE-031. 1987.
- 17) 抗菌薬感受性測定法検討委員会報告(1992年). 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.
- 18) Nilius AM, Bui MH, Almer L, Hensley-Rudloff D, Beyer J, Ma Z, et al. Comparative *in vitro* activity of ABT-773, a novel antibacterial ketolide. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2163-8.
- 19) Shortridge VD, Zhong P, Cao Zhensheng, Beyer JM, Almer LS, Ramer NC, et al. Comparison of *in vitro* activities of ABT-773 and Telithromycin against macrolide-susceptible and -resistant Streptococci and Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 783-6.
- 20) 新井 進, 岡本博規, 野口恵子, 牛場 薫, 矢口理史. Telithromycin の *in vitro* 抗菌力. *日化療会誌* 2003; 51 S-1: 7-17.
- 21) Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structure in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol Microbiol* 1999; 31: 623-31.
- 22) Douthwaite S, Hansen LH, Mauvais P. Macrolide-ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domain II of 23S rRNA. *Mol Microbiol* 2000; 36: 183-93.
- 23) Capobianco JO, Cao Zhensheng, Shortridge VD, Ma Z, Flamm RK, Zhong P. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1562-7.
- 24) Bonnefoy A, Girard AM, Agouridas C, Chantot JF. Ketolides lack inducibility properties of MLSB resistance phenotype. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 85-90.
- 25) Lui M, Douthwaite S. Activity of the Ketolide Telithromycin is refractory to Erm monomethylation of bacterial rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1629-33.
- 26) Vester B, Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1-12.
- 27) Tait-Kamardt A, Davies T, Appelbaum PC, Depardieu F, Courvalin P, Petitpas J, et al. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3395-401.
- 28) Tait-Kamardt A, Davies T, Cronan M, Jacobs R, Appelbaum PC, Sutcliffe J. Mutation in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2118-25.
- 29) Farrell DJ, Douthwaite S, Morrissey I, Bakker S, Poehlsgaard J, Jakobsen L, et al. Macrolide resistance by ribosomal mutation in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT 1999-2000 study. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1777-83.
- 30) Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Felmingham D. Molecular characterization of macrolide resistance mechanisms among *Strepto-*

- coccus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated from the PROTEKT 1999-2000 study. J Antimicrob Chemother 2002; 50 (Suppl S1) : 39-47.
- 31) Nishijima T, Saito Y, Aoki A, Toriya M, Toyonaga Y, Fujii R. Distribution of *mefE* and *ermB* genes in macrolide-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* and their variable susceptibility to various antibiotics. J Antimicrob Chemother 1999; 43 : 637-43.
- 32) Farrel DJ, Felmingham D. Activities of telithromycin against 13,874 *Streptococcus pneumoniae* isolates collected between 1999 and 2003. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48 : 1882-4.
- 33) Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Ednie LM, Bozdogan B, Katopoidis GD, Beratis NG, et al. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance inducibility of *Streptococcus pneumoniae* carrying *erm*(A), *erm*(B), or *mef*(A). Antimicrob Agents Chemother 2003; 47 : 2699-702.
- 34) Zong P, Cao Z, Hammond R, Chen Y, Beyer J, Shortridge VD, et al. Induction of ribosome methylation in MLS-resistant *Streptococcus pneumoniae* by macrolides and ketolides. Microb Drug Resist 1999; 5(3) : 183-8.
- 35) Walsh F, Willcock J, Amyes S. High-level telithromycin resistance in laboratory-generated mutants of *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2003; 52 : 345-53.