

## 【原著・臨床】

小児の髄液・血液から分離された *Streptococcus pneumoniae* の penicillin 結合蛋白遺伝子変異と薬剤感受性

坂 田 宏

旭川厚生病院小児科\*

(平成 13 年 11 月 8 日受付・平成 13 年 12 月 13 日受理)

1999 年 9 月から 2001 年 8 月までの 2 年間に髄液・血液から分離された *Streptococcus pneumoniae* 11 株を用いて、菌型別、薬剤感受性、penicillin-binding protein (PBP) 耐性遺伝子を検討した。患者は肺炎 7 名、髄膜炎 2 名、肺炎と中耳炎 1 名、関節炎 1 名の計 11 名であった。年齢は生後 5 か月から 4 歳であった。型別で複数検出されたのは 6 型が 5 名と最も多く、23 型が 2 名であった。Penicillin G に対する最小発育阻止濃度 (MIC) 分布は 0.06 µg/mL から 2.0 µg/mL の範囲であり、penicillin susceptible *S. pneumoniae* が 2 株 (MIC < 0.1 µg/mL), penicillin intermediate *S. pneumoniae* が 8 株 (MIC 0.1 ~ 2.0 µg/mL), penicillin resistant *S. pneumoniae* (MIC 2.0 µg/mL) が 1 株であった。PBP 遺伝子の変異では、*pbp 1 a*・*pbp 2 x*・*pbp 2 b* の 3 種類とも認められた例は 3 株、*pbp 2 x*・*pbp 2 b* の 2 種類の変異は 2 株、*pbp 2 x* の 1 種類の変異は 6 株であり、すべての株で PBP 遺伝子の変異が存在した。薬剤感受性試験では ampicillin, cefotaxime, ceftriaxone, panipenem, vancomycin それぞれの MIC<sub>90</sub> は 1.0 µg/mL, 1.0 µg/mL, 1.0 µg/mL, 0.06 µg/mL, 0.5 µg/mL であった。

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, susceptibility, bacteremia, meningitis, penicillin-binding protein

本邦で最初の penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) の髄膜炎<sup>1)</sup>が報告されてから、10 年余が経過した。この間、遺伝子解析や薬剤感受性など、PRSP に関する多くの研究がなされた<sup>2)</sup>。そのなかの疫学的研究で、PRSP は年々増加し耐性も高度化していると考えられている。著者の報告を含めて、上咽頭などの上気道から検出された *S. pneumoniae* を対象とする研究<sup>3,4)</sup>が多いが、下気道炎において上気道分離菌が真の病原菌かどうかの判断は難しい。今回、株数は少ないが、病原菌であることが明らかな血液・髄液から分離された *S. pneumoniae* を用いて薬剤感受性と penicillin 結合蛋白 (penicillin binding protein, PBP) 遺伝子の変異を測定したので報告する。

## I. 対象と方法

1999 年 9 月から 2001 年 8 月までの 2 年間に小児の感染症患者の髄液・血液から分離された *S. pneumoniae* 11 株を用いて、菌型別、薬剤感受性、耐性遺伝子を検討した。11 株中 8 株は旭川厚生病院小児科の入院患者から検出、残り 3 株は千歳市立病院、函館赤十字病院、札幌徳洲会病院の各小児科の入院患者から検出された。分離された菌株は検査するまで凍結乾燥のうえ保存した。

患者の概要を Table 1 に示した。患者は肺炎 7 名、髄膜炎 2 名、肺炎と中耳炎 1 名、関節炎 1 名の計 11 名で

あった。年齢は生後 5 か月から 4 歳の範囲であった。呼吸器感染症 8 名の重症度は、小児科領域抗菌薬臨床試験における判定基準<sup>5)</sup>で判定すると重症 2 名、中等症 3 名、軽症 3 名であった。

凍結乾燥した菌株を(株)三菱化学ビーシーエルに輸送し、同社にて薬剤感受性を測定した。Penicillin G (PCG) 以外に ampicillin (ABPC), cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CTRX), panipenem (PAPM), vancomycin (VCM) の 5 薬剤を選択し、National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) の寒天平板希釈法<sup>6)</sup>に準じて、最小発育阻止濃度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) を測定した。Penicillin 耐性の判定は 0.1 から 1.0 µg/mL を中等度耐性 *S. pneumoniae* (penicillin intermediately resistant *S. pneumoniae*, PISP), 2.0 µg/mL 以上を PRSP, 0.1 µg/mL 未満をペニシリン感受性 *S. pneumoniae* (penicillin susceptible *S. pneumoniae*, PSSP) とした。

PBP 遺伝子解析は PCR キットであるペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) 遺伝子検出試薬<sup>®</sup> (湧永製薬株式会社) を用いて行った。血清型は肺炎球菌莢膜型別用免疫血清「生研」<sup>®</sup> (デンカ生研株式会社) を用いて判別した。

## II. 成績

髄膜炎や関節炎などの呼吸器外感染症 3 名はいずれ

\*北海道旭川市 1 条通 24 丁目

も1歳未満の児であった。肺炎の8名のうち重症は1歳4か月と1歳6か月の2名、軽症は4歳、1歳11か月、1歳9か月であり、低年齢ほど重症の傾向が認められた。治療は髄膜炎の2名はCTX+ABPCとCTR、重症肺炎の2名はflomoxefとPAPM/betamipron (PAPM/BP)、関節炎の1名はimipenem/cilastatinで治療した。他の6名のうち5名はCTXで治療しいずれも後遺症なく治癒した。

型別では6型が5名と最も多く、23型が2名、9型、14型、19型、22型がそれぞれ1名ずつであった。重症度と型別をみると、髄膜炎は14型と23型、重症肺炎は6型と19型と一定の傾向は得られなかった。

PCGに対するMIC分布は0.06 µg/mLから2.0 µg/mLの範囲であり、PSSPが2株、PISPが8株、PRSPが1株であった。型別と感受性の関係で、もっとも株数が多い6型は0.06 µg/mLから1.0 µg/mLに幅広く分布していた。

PBP遺伝子の変異では、*pbp 1 a*・*pbp 2 x*・*pbp 2 b*の3種類とも認められた例は3株、*pbp 2 x*・*pbp 2 b*の2種類の変異は2株、*pbp 2 x*の1種類の変異は6株です

すべての株でPBP遺伝子の変異が存在した。Macrolide耐性機構については *mef* 遺伝子変異が4株、*erm* 遺伝子変異が2株に認められた。

PCGに対するMICと型別、遺伝子変異の関係をみると、3種類変異の株では0.5 µg/mLから2.0 µg/mLで、低感受性傾向があり、3株中2株が6型であった。2種類変異の株では0.12 µg/mLと0.25 µg/mLであった。1種類変異株は0.06 µg/mLから0.12 µg/mLに分布し、6株中3株が6型であった。

他の薬剤感受性の分布をTable 2に示した。検討した5剤のなかでは、PAPMの感受性がもっとも優れ、すべての株で0.06 µg/mLであった。CTXとCTRはほぼ同様で、4株が1 µg/mLであった。4株中3株で、3種類のPBP変異が認められた。VCMに対するMICは0.25 µg/mLと0.5 µg/mLに属していた。

### III. 考 案

今回、検討の対象とした症例は呼吸器感染症が8名、髄膜炎と関節炎の呼吸器外感染症が3名であった。いずれも、髄液・血液から *S. pneumoniae* が分離されており、臨床症状や検査成績から混入菌と考えられず、病

Table 1. Patients profiles in *Streptococcus pneumoniae* infection

Case	Age	Gender	Diagnosis	WBC on admission ( /µL )	CRP on admission ( mg/dL )	maximum CRP ( mg/dL )	antimicrobial treatment
1	4 y 11 m	M	pneumonia	15 500	0.3	2.0	cefotaxime
2	1 y 11 m	M	pneumonia	21 600	0.2	1.1	cefotaxime
3	1 y 9 m	F	pneumonia	7 000	0.1	2.3	cefotaxime
4	1 y 7 m	F	pneumonia	26 300	15.0	15.0	panipenem/betamipron
5	1 y 6 m	F	pneumonia	9 500	14.8	14.8	panipenem/betamipron
6	1 y 4 m	F	pneumonia	18 200	28.2	28.2	flomoxef
7	1 y 0 m	F	pneumonia	16 700	0.6	0.6	cefotaxime
8	8 m	M	meningitis	6 200	23.1	23.1	ampicillin + cefotaxime
9	7 m	F	pneumonia + acute otitis media	19 600	3.3	3.3	cefotaxime
10	6 m	M	meningitis	18 020	6.7	6.7	ceftriaxone
11	5 m	M	arthritis	8 700	6.4	6.4	imipenem/cilastatin

Table 2. Serotypes mutation of penicillin-binding protein genes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*

Case	Serotype	PBP gene mutation	Minimal inhibitory concentration ( µg/mL )					
			penicillin G	ampicillin	cefotaxime	ceftriaxone	panipenem	vancomycin
1	6	<i>pbp 2 x, ermB</i>	0.12	0.12	1.0	1.0	0.06	0.5
2	9	<i>pbp 2 x, ermB</i>	0.06	0.06	0.12	0.25	0.06	0.25
3	22	<i>pbp 2 x</i>	0.12	0.12	0.5	0.5	0.06	0.5
4	23	<i>pbp 2 x, pbp 2 b</i>	0.25	0.5	0.5	0.25	0.06	0.5
5	19	<i>pbp 2 x, pbp 2 b</i>	0.12	0.25	0.25	0.25	0.06	0.25
6	6	<i>pbp 1 a, pbp 2 x, pbp 2 b, mefA</i>	0.5	1.0	1.0	1.0	0.06	0.25
7	6	<i>pbp 1 a, pbp 2 x, pbp 2 b, mefA</i>	1.0	1.0	0.5	0.5	0.06	0.5
8	23	<i>pbp 1 a, pbp 2 x, pbp 2 b</i>	2.0	4.0	1.0	1.0	0.06	0.5
9	6	<i>pbp 2 x, mefA</i>	0.06	0.06	0.12	0.25	0.06	0.5
10	14	<i>pbp 2 x, mefA</i>	0.12	0.12	1.0	1.0	0.06	0.25
11	6	<i>pbp 2 x</i>	0.12	0.12	0.25	0.25	0.06	0.5

原菌であることは明らかであった。呼吸器感染症の 8 名を分類すると、重症が 2 名、中等症が 3 名、軽症が 3 名と血液から菌が分離されていても、けっして重篤な症状を呈した例ばかりではなかった。今回の集積した株は少ないが、現在の北海道における *S. pneumoniae* による感染症の動向を反映していると考えられる。また、重篤な症状を呈していない患者の血液から菌が検出されたことは、軽症であっても細菌感染症を疑った時には血液培養が必要であることを意味している。

菌型の分布を検討すると、紺野・生方<sup>2)</sup>の 1993 年から 1998 年までの髄液・血液から分離された *S. pneumoniae* の成績で多かったのは 6, 19, 23 型であり、野々山ら<sup>7)</sup>が 2000 年から行っている髄膜炎の全国サーベイランスで集められた *S. pneumoniae* でも 6, 23, 19 型の順で多かった。著者の成績も 6 型 5 株、19 型 1 株、23 型 2 株とこの 3 型で 72.7% を占めており、全国調査の成績と一致していた。

PRSP の頻度に関しては、PCG 感受性からみると PRSP は 1 株、PISP は 8 株で、PSSP は 2 株であった。紺野・生方<sup>2)</sup>が提唱する遺伝子変異からみると PRSP は 3 株、PISP は 8 株で、そのうち 2 遺伝子変異が 2 株、1 遺伝子変異が 6 株認められ、PSSP は認められなかった。大楠ら<sup>8)</sup>は 1988 年からの 10 年間で、*S. pneumoniae* 全身感染症の小児 23 名を報告している。疾患は髄膜炎と肺炎が 8 名ずつ、敗血症 3 名、関節炎 3 名、腹膜炎 1 名となっている。61% が 2 歳未満の小児で、菌型は 19 型と 6 型が多く、MIC からみた PISP と PRSP が 57% を占めていた。1994 年から 1998 年までに紺野・生方<sup>2)</sup>が全国の施設から集積した髄液から分離された *S. pneumoniae* 75 株のうち遺伝子解析からみた PISP と PRSP が 60%、同じく血液から分離された 95 株では PISP と PRSP が 68% を占めていた。前述の野々山らの報告<sup>7)</sup>では遺伝子変異で PRSP を判定しており、その成績では PISP と PRSP が 81% であった。このように検討方法は異なるが、病原性を有する *S. pneumoniae* の penicillin 耐性化が年々進んでおり、著者の成績では MIC からみると 82% であったが、遺伝子変異でみると PISP と PRSP が 100% に達していた。

PCG 以外に MIC を検討した抗菌薬として重症感染症、特に髄膜炎の治療薬に使用される可能性が高い 5 剤を選んで測定した。現在、小児の細菌性髄膜炎に第一選択として用いられる抗菌薬は ABPC と CTX、または CTRX の併用である。今回の検討で CTX および CTRX には 1 µg/mL の株が 4 株みられ、これらの株は ABPC には 0.12 µg/mL から 4 µg/mL の範囲であった。一方、PAPM はすべての株で 0.06 µg/mL 以下でもっとも優れていた。野々山らの報告<sup>7)</sup>でも PAPM は 0.031 から 0.125 µg/mL、CTX は 0.5 から 4 µg/mL、ABPC は 1 から 8 µg/mL と著者の成績とほぼ一致しており、この

感受性の範囲が本邦の *S. pneumoniae* の現状と思われた。

今回の症例のうち 8 名は感受性がよい carbapenem 薬を使用しなくても後遺症なく治癒した。Cephem 系注射用薬では常用量で血中濃度は 20 から 100 µg/mL、薬剤によっては 100 µg/mL を超えるため<sup>9)</sup>、MIC が 1.0 µg/mL でも治療可能であったと思われる。しかし、初期治療に効果がみられず、原因菌と感受性試験の成績が判明すれば、より MIC が低い抗菌薬を選択することが望ましい。一方、髄膜炎では MIC より最小殺菌濃度が問題であり、抗菌薬は最小殺菌濃度の 10 以上の高濃度の髄液濃度が必要とされる<sup>10)</sup>。したがって、髄膜炎では PAPM がもっとも適当な抗菌薬と考えられる。また感受性試験では PSSP であっても、遺伝子解析で *pbp 2x* に変異があれば CTX の感受性が低下しているという紺野・生方の報告<sup>2)</sup>もあり、*S. pneumoniae* による髄膜炎と診断された際の第一選択薬は PAPM/BP とすべきである。

本論文の要旨は第 50 回日本感染症学会東日本地方会第 48 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会(2001 年 11 月、東京)で口演した。菌株を送っていただいた千歳市立病院、函館赤十字病院、札幌徳洲会病院の各小児科に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 有益 修, 目黒英典, 白石裕昭, 他: ラクタム剤が無効であった肺炎球菌髄膜炎の 1 例。感染症誌 62: 682~683, 1988
- 2) 紺野昌俊, 生方公子: 改訂ペニシリン耐性肺炎球菌。協和企画通信, 東京, 1999
- 3) 市丸智浩, 宮崎澄雄, 永沢善三, 他: ペニシリン耐性肺炎球菌の分離状況に関する臨床的研究。日児誌 101: 1485~1491, 1997
- 4) 坂田 宏: 小児の呼吸器感染症患者からの *Streptococcus pneumoniae* の分離状況。感染症誌 75: 730, 2001
- 5) 藤井良知, 小林 裕, 西村忠史, 他: 小児科領域抗菌薬臨床試験における判定基準。Jap J Antibiot 51: 709~719, 1998
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: approved standard—5th ed; M7-A5, NCCLS, Wayne, USA, 2000
- 7) 野々山勝人, 長谷川恵子, 千葉菜穂子, 他: 化膿性髄膜炎例から検出された肺炎球菌の細菌学的解析。日治療会誌 49 (S-A): 151, 2001
- 8) Ohkusu K, Nakamura A: Characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from systemic infections in children。感染症 74: 1~5, 2000
- 9) 豊永義清: 抗生剤 b 新しい抗生剤の特徴 a) セフェム系。砂川慶介 編, 小児の感染症と化学療法 最近の話題 p.186~196, 金原出版, 東京, 1993
- 10) Scheld W M: Theoretical and practical considerations of antibiotic therapy for bacterial meningitis. Pediatr Infect Dis 4: 74~83, 1985

Mutation of penicillin-binding protein genes and antimicrobial susceptibility  
of *Streptococcus pneumoniae* isolated from liquor or blood in children

Hiroshi Sakata

Department of Pediatrics , Asahikawa Kosei Hospital , Asahikawa 1-24 , Hokkaido 078-8211 , Japan

Between September 1999 and August 2001 , we studied serotypes , mutation of penicillin-binding protein ( PBP ) genes , and antimicrobial susceptibilities of 11 strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from liquor or blood in children. Diseases were pneumonia in 7 , meningitis in 2 , pneumonia with acute otitis media in 1 , and arthritis in 1. Patients ranged from 5 months to 4 years of age. Prevalent serotypes were 5 strains of type 6 and 2 of type 23. One and 8 strains were penicillin-resistant ( MIC 2.0 µg/mL ) and intermediate ( MIC 0.1-1.0 µg/mL ). The mutation of 3 genes ( *pbp 1 a* , *pbp 2 x* , and *pbp 2 b* ) was seen in 3 isolates , that of 2 genes ( *pbp 2 x* and *pbp 2 b* ) in 2 , and *pbp 2 x* alone in 6. The MIC<sub>90</sub>s of ampicillin was 1.0 µg/mL , cefotaxime 1.0 µg/mL , ceftriaxone 1.0 µg/mL , panipenem 0.06 µg/mL and vancomycin 0.5 µg/mL.