

【原著・基礎】

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

—肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ—

生方 公子^{1)a)}・千葉菜穂子^{2)a)}・小林 玲子^{2)a)}・長谷川恵子^{3)a)}・紺野 昌俊^{4)b)}¹⁾北里大学・北里生命科学研究所*²⁾明治製菓株式会社薬品総合研究所³⁾北里大学大学院感染制御科学府・感染免疫専攻⁴⁾帝京大学名誉教授肺炎球菌等による市中感染症研究会 ^{a)}疫学解析担当, ^{b)}代表世話人

(平成 14 年 8 月 29 日受付・平成 14 年 9 月 30 日受理)

日本において 1998 年から 2000 年の 3 年間に、「市中感染症研究会」に参加した 187 施設より当研究室へ送られてきた総計 6,692 検査材料が本研究の対象とされた。重複例を除く 4,030 例のなかで多かった疾患は、急性中耳炎 (n=1,425), 急性上気道炎 (n=961), 急性気管支炎 (n=390) であった。肺炎例も 175 例認められた。これらの症例からのインフルエンザ菌の分離率は 30% 台であった。患者からのインフルエンザ菌分離率のピークは 1 歳にあり、学童期に至るまで暫時減少した。それに対し、成人におけるインフルエンザ菌の分離率は平均 10% 程度であった。臨床分離の 1,408 株に対する分子解析にもとづく疫学研究は、われわれによるインフルエンザ菌における耐性遺伝子解析によって構築された PCR 法によって実施された。使用された 4 セットの primer は次の通りである。すなわち、(i) P 6 膜タンパクの遺伝子、(ii) TEM-1 type β -lactamase 遺伝子 (*bla*), (iii) 感性菌に見いだされる PBP 3 遺伝子 (*ftsI*), (iv) β -lactamase 非産生 ampicillin (ABPC) 耐性インフルエンザ菌 (BLNAR) に見出される *ftsI* 遺伝子である。インフルエンザ菌は PCR 解析の結果にもとづき、次の 6 type に識別された。①いずれの耐性遺伝子をももたない β -lactamase 非産生 ABPC 感性菌 (BLNAS, n=826), ②TEM-1 type β -lactamase 産生 ABPC 耐性菌 (BLPAR, n=81), ③*ftsI* 遺伝子に Lys-526 変異をもつ β -lactamase 非産生で低レベルの ABPC 耐性菌 (Low-BLNAR, n=352), ④Lys-526 とさらに保存性アミノ酸配列の Ser-Ser-Asn 周囲に 3 つのアミノ酸変異をもつ BLNAR (n=109), ⑤TEM-1 と Low-BLNAR 耐性遺伝子を保持する β -lactamase 産生で amoxicillin/clavulanate 耐性菌 (BLPACR-I, n=36), ⑥TEM-1 と BLNAR の耐性遺伝子を保持する β -lactamase 産生で amoxicillin/clavulanate 耐性菌 (BLPACR-II, n=4) である。Low-BLNAR と BLNAR に対する ABPC の MIC₉₀ はそれぞれ 2 μ g/mL と 4 μ g/mL であった。これら耐性株では ABPC や meropenem のそれよりも、経口および注射用セフェム系薬の感受性が明らかに低下していた。経口セフェム系薬のなかでは cefditoren の MIC₉₀ が BLNAR に対して 1 μ g/mL 以下と優れていた。BLNAR 株は 1998 年に 3.2%, 1999 年に 6.6%, 2000 年に 13.5% へと有意に増加していた。免疫学的に未熟な小児例に対する経口セフェム系薬投与後の不十分な薬剤濃度は BLNAR 株の増加の大きな要因であろうと推察された。迅速で正確な細菌検査にもとづいた適切な抗菌薬の選択とインフルエンザ菌に対する Hib ワクチン接種が耐性菌の増加防止の上で必須である。

Key words: *Haemophilus influenzae*, surveillance, susceptibility of β -lactam antibiotics, β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistance

肺炎球菌とともに、呼吸器感染症の起炎菌として重要なインフルエンザ菌においても、 β -ラクタム系薬に対する感受性の低下したインフルエンザ菌が急速に増加している¹⁾。

本邦において、長い間問題となってきたインフルエンザ菌

の耐性は β -lactamase 産生 ampicillin (ABPC) 耐性菌 (BLPAR: β -lactamase-producing ABPC resistance) で、1970 年代の中ごろから分離されはじめ、その後 15~20% 前後の分離率で推移してきた^{2,3)}。この耐性遺伝子は比較的

大きなプラスミド上に存在し、大腸菌の TEM-1 型不活化酵素と高い相同性を有する *bla* 遺伝子によって支配されているものである⁴⁾。

近年増加している β -ラクタム系薬耐性菌は、1980 年代のはじめに欧米で報告のみられた β -lactamase を産生しない ABPC 耐性インフルエンザ菌 (BLNAR: β -lactamase-nonproducing ABPC resistance) である⁵⁻⁷⁾。これらの耐性株では ABPC を含む β -ラクタム系薬の感受性低下はわずかであるが、ABPC 感受性菌 (BLNAS: β -lactamase-nonproducing ampicillin susceptible) に較べると、MIC 以上の β -ラクタム薬を作用させても殺菌され難いことが特徴である (Ubukata K, et al., 37 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Canada, 1997)。

われわれは、これらの耐性菌について遺伝子解析を行い、 β -ラクタム系薬の感受性低下はペプチドグリカン架橋酵素、すなわちペニシリン結合蛋白 (PBP)-3 をコードする *ftsI* 遺伝子上に生じた変異が主たる原因で、その結果として PBP-3 に対する薬剤の親和性が低下していることを明らかにした⁸⁾。*ftsI* 遺伝子上には β -ラクタム系薬の感受性低下に影響を与える変異が何か所かに見出され、Arg-517→His-517、あるいは Asn-526→Lys-526 へのいずれかの変異を有している株においては、ABPC に対する感受性は BLNAS のそれに較べて試験管で 1~2 本低下している。それらの変異に加え、保存性アミノ酸配列の Ser-Ser-Asn (SSN) 近位に見出された 3 個のアミノ酸変異が挿入された株では、ペニシリン系薬よりもむしろセフェム系薬に対する感受性が明らかに低下していた。

一方、欧米においては、BLNAR はまれな耐性菌である⁹⁻¹⁴⁾ ため、BLNAS と BLNAR を正確に識別する方法は定まっていない。また、耐性レベルが微妙なこのような耐性菌をルーチンの感受性試験のみで正確に識別することはかなり困難なことである。このような経緯から、われわれは *ftsI* 遺伝子変異にもとづいて上述した遺伝子変異を検出する 2 種類の primer を設計し、さらに *bla* 遺伝子と菌種同定のための P 6 蛋白遺伝子¹⁵⁾ を検出する primer を加えて、「インフルエンザ菌遺伝子検出試薬[®] (湧永製薬株)」を構築した (Hasegawa K, et al., Microbial Drug Resistance)。

この論文においては、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP: penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*) や BLNAR の臨床的意義とその疫学研究を目的として組織され、1997 年 12 月から約 3 年間にわたって全国規模で活動した「肺炎球菌等による市中感染症研究会 (市中感染症研究会)」によって収集されたインフルエンザ菌について、遺伝子レベルで解析した疫学成績を中心に報告する。

I. 材料と方法

1. 収集菌株と菌種同定

市中感染症研究会参加施設のうち、187 施設から 3 年間にのべ 6,692 検体の送付を受けた。栄研シードスワ

ブ 2 号[®]にて各症例より採取された検査材料は、当研究室へ到着後、2 mL の Mueller Hinton broth (MH broth: Difco) にて混積、その 5 μ L をチョコレート寒天培地 (Chocolate II agar: 日本ベクトンディッキンソン株 (BD 社)) および血液寒天培地 (Sheep Blood agar (T): BD 社)、マンニト食塩培地、ドリガルスキー改良培地にそれぞれ塗布、培養を行った。チョコレート寒天培地と血液寒天培地は CO₂ 培養を施行し、20 時間後にチョコレート寒天培地上からインフルエンザ菌と思われるコロニーを釣菌、型どおり XV 因子利用能を調べて菌種の同定を行った。その他に、菌種同定を目的とした PCR による P 6 蛋白遺伝子の検索も加えた。

P 6 蛋白遺伝子と XV 因子要求性の両者を満たす株を *Haemophilus influenzae* (インフルエンザ菌) とした。分離されたインフルエンザ菌は、再度単離培養を行った後、感受性測定時までスキムミルク培地で -80°C に保存した。

また、インフルエンザ菌と同定された株については、ディスクによる β -lactamase チェック (BD 社) をあわせて実施した。

2. PCR

われわれはすでに、インフルエンザ菌の *ftsI* 遺伝子の解析結果と β -ラクタム系薬に対する感受性成績の関係、ならびに当該遺伝子の感性株への transformation 実験から、耐性にかかわる *ftsI* 遺伝子上の変異を特定している⁸⁾。それらの成績にもとづき、*ftsI* 遺伝子上に ①遺伝子変異をもたない株、②感受性に影響を与える Asn-526→Lys-526 へのアミノ酸変異を有する株、③ Lys-526 と SSN 周囲のアミノ酸 3 個に変異 (Met-377→Ile-377, Ser-385→Thr-385, Leu-389→Phe-389) を有する株、④TEM-1 型 β -lactamase を産生する株、のそれぞれを識別する primer を設計した。同時に、*H. influenzae* と *H. parainfluenzae* を識別するための外膜蛋白の P 6 遺伝子¹⁵⁾ もあわせて検索した。

PCR の 1 cycle は 94°C: 15 sec, 53°C: 15 sec, 72°C: 15 sec の温度設定とし、30 cycle 実行した。この条件下における primer の感度はいずれも 10² CFU/tube 前後であった。

なお、本来は Arg-517→His-517 の変異を有する株も識別しなければならないが、このタイプは 5% 以下の分離率であること、 β -ラクタム系薬に対する感受性変化がわずかであること、さらに上記の PCR 条件で特異的な primer 設計が困難なことから省略した。

3. 耐性菌の識別

H. influenzae に使用できる薬剤に対するブレイクポイント (BP) は、すでに National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) によって設定されている¹⁶⁾。しかし、欧米においては、 β -lactamase 産生菌の分離率が高いが、不活化酵素を産生しない BLNAR

はきわめてまれである¹⁴⁾。また、BP そのものが個々の薬剤を臨床で使用した際の効果にもとづいて設定されているため、本邦で急速に増加している BLNAR の識別に適した BP となっていないのが実態である。

この論文においては、そのような経緯から β -lactamase 遺伝子 (*bla*) と *ftsI* 遺伝子変異の有無にもとづいて、次の 6 つのタイプに識別することとした。

すなわち、①解析された耐性遺伝子のいずれをも有しない株は感性菌 (BLNAS)、②TEM-1 型 β -lactamase 産生菌 (BLPAR)、③ β -lactamase を産生せず、*ftsI* 上に Lys-526 変異のみを有する軽度耐性菌 (Low-BLNAR)、④ β -lactamase を産生せず、Lys-526 変異と SSN 周囲に 3 個のアミノ酸変異を有する耐性菌 (BLNAR)、⑤ β -lactamase 産生で *ftsI* 上にも Lys-526 変異を有する菌 (BLPACR-I: β -lactamase-producing and amoxicillin/clavulanic acid resistance)、⑥ β -lactamase 産生で④の *ftsI* 遺伝子変異を有する耐性菌 (BLPACR-II) である。

4. 薬剤感受性測定

各種抗菌薬に対する感受性は寒天平板希釈法によって測定した。NCCLS の勧告¹⁶⁾にしたがって MH broth を基礎培地として yeast extract (0.5%) と Bact Agar (1.5%; Difco) を加えて滅菌後、53°C に保温しながら後述する馬溶血液 (2%) と β -nicotinamide-adenine-dinucleotide (β -NAD: 15 μ g/mL) を加え、薬剤をあらかじめ分注しておいたシャーレ内へ 10 mL ずつ分注、よく混合後固化させた。

馬溶血液は馬脱繊維血液 (株日本バイオテスト研究所) を 65°C で 2 時間加熱処理、続いて 40,000 rpm、1 時間の超遠心操作を 2 回繰り返した後、ミリポア濾過して用いた。

被験薬剤は ABPC, amoxicillin (AMPC), piperacillin (PIPC), cefotiam (CTM), cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CTRX), ceftazidime (CZOP), imipenem (IPM), panipenem (PAPM), meropenem (MEPM),

cefclor (CCL), cefdinir (CFDN), cefpodoxime (CPDX), cefditoren (CDTR), cefcapene (CFPN), faropenem (FRPM), levofloxacin (LVFX) の 17 種類とした。それぞれの薬剤は当該企業から分与を受けたものか、あるいは国立感染症研究所から購入して力価の明らかなものを使用した。

感受性測定用の菌株はチョコレート寒天培地にて 20 時間培養、翌日 MacFarland が 0.5 となるように 2 mL の MH broth に釣菌、さらに 10 倍に希釈した後、マイクロプランターを用いて薬剤含有培地上へスポットした。最終的な接種菌液は $1\sim 3\times 10^5$ CFU/spot である。MIC の判定は、37°C、18 時間の 5% CO₂ 培養後に行った。

5. 血清型別

インフルエンザ菌の血清型別は、Difco 社製の抗血清を購入し、添付されている能書にしたがって凝集反応を行い判定した。

II. 結 果

1. 症例背景とインフルエンザ菌検出状況

1) 疾患と分離率

外来受診患者より採取された検査材料を各参加施設から受け取る際、同封された送付用紙に疾患名の記載を依頼した。その内訳を Table 1 に示す。同一症例から 2 回以上にわたって検体が採取された場合には、初回のみを集計対象とした。3 年間で 4,030 例が解析対象となったが、もっとも多かったのは急性中耳炎例の 1,425 例 (35.4%)、次いで急性上気道炎の 961 例 (23.8%)、急性気管支炎の 390 例 (9.7%) であった。この他に、肺炎と副鼻腔炎例がそれぞれ 176 例 (4.4%) と 114 例 (2.8%) 含まれていた。なお、送付時にその記載がなかった 869 例 (21.6%) については疾患名不明とした。

これら疾患ごとのインフルエンザ菌の分離率については、いずれの疾患においても 30% 台であった。個々の症例数には大きなバラツキが見られるが、独立性の検定によれば各症例におけるインフルエンザ菌の検出率には有意差がみられるという結果であった ($\chi^2=23.7194$,

Table 1. Diseases of patients from whom clinical samples were collected

Diseases	Patients	(%)	<i>H. influenzae</i> positive	(%)
Acute otitis media	1,425	35.4	526	36.9
Acute upper respiratory tract infection*	961	23.8	312	32.5
Pharyngo laryngitis	10	0.2	1	10.0
Acute bronchitis	390	9.7	133	34.1
Pneumonia	176	4.4	73	41.5
Sepsis	4	0.1	0	0.0
Otitis media with effusion	16	0.4	5	31.3
Sinusitis	114	2.8	43	37.7
Other	65	1.6	13	20.0
Unknown	869	21.6	275	31.6
Total	4,030	100.0	1,381	

*Pharyngitis, tonsillitis, nasopharyngitis, rhinitis, etc, are included.

Table 2. Incidence of *Haemophilus influenzae* isolates by patient age

	Age																	Total	
	<1	1	2	3	4	5	6	7-12	13-19	20-	30-	40-	50-	60-	70-	80-	90-		unknown
Patients	433	975	470	327	320	258	171	327	66	74	66	39	69	89	64	21	3	258	4,030
(%)	10.7	24.2	11.7	8.1	7.9	6.4	4.2	8.1	1.6	1.8	1.6	1.0	1.7	2.2	1.6	0.5	0.1	6.4	
<i>H. influenzae</i> positive	132	393	202	129	126	105	70	91	5	13	10	3	2	8	6	2	0	73	1,369
(%)	30.5	40.2	43.0	39.4	39.4	40.7	40.9	27.8	7.6	17.6	15.2	7.7	2.9	9.0	9.4	9.5	0.0	28.3	
<i>H. influenzae</i> negative	301	583	268	198	194	153	101	236	61	61	56	36	67	81	58	19	3	185	2,661
(%)	69.5	59.8	57.0	60.6	60.6	59.3	59.1	72.2	92.4	82.4	84.8	92.3	97.1	91.0	90.6	90.5	100.0	71.7	

Table 3. Clinical samples

Clinical sample	Sample	(%)	<i>H. influenzae</i> positive	(%)
Epipharynx	2,869	58.9	1,071	37.3
Throat	400	8.2	100	25.0
Ear discharge	646	13.3	92	14.2
Tympanotomy exudate	432	8.9	55	12.7
Nasal discharge	218	4.5	76	34.9
Tonsil	17	0.3	4	23.5
Sputum	74	1.5	3	4.1
Other	84	1.7	24	28.6
Origin unknown	132	2.7	34	25.8
Total	4,872	100	1,459	

$\rho=0.0047$)。その意味では肺炎例で 41.5% とやや検出率の高いことが注目された。

2) 年齢と分離率

Table 2 には症例の年齢分布とインフルエンザ菌の検出状況を示す。これらの成績は各症例の初回検索時のみに限って集計してあるが、上咽頭ぬぐい液と鼓膜切開液とが同時に提出され、そのいずれかから菌が検出された際には陽性として集計した。

症例数のピークは 1 歳に認められ、975 例と全体の 1/4 を占めていた。次いで 1 歳以下が 433 例、2 歳が 470 例とほぼ同数認められた。3 歳を過ぎると、症例数は暫時減少した。20 歳以上の成人は 425 例認められたが、60 歳台にピークを認めるものの各年齢層にわたって広く分布していた。

一方、各年齢層におけるインフルエンザ菌の分離率をみると、1~6 歳までは平均 40% 前後と高率であったのに対し、20 歳以上になると平均 10% 以下と低率であった。

3) 検査材料別分離率

Table 3 に送付を受けた検査材料の割合と、各検体からのインフルエンザ菌の分離率を示した。上述したように、検体送付を受けた症例の大半が 6 歳以下であったこと、疾患として急性中耳炎や急性上気道炎、急性気管支炎などが多くを占めたことから、もっとも多かった検査材料は上咽頭ぬぐい液の 2,869 検体、次いで耳漏の 646 検体、鼓膜切開液の 432 検体、咽頭ぬぐい液の 400

検体の順であった。その他に鼻汁や成人の喀痰がわずかながら含まれていた。検体送付時に同封された用紙に採取部位の記載がなかったものは不明とした。

検査材料別にみたインフルエンザ菌の分離率は上咽頭ぬぐい液が 37.3%、鼻汁が 34.9%、咽頭が 25.0% と高く、耳漏は 14.2%、鼓膜切開液 12.7% であった。喀痰では検索対象 74 例のうち 3 例 (4.1%) のみから本菌が検出されていた。これらの検査材料からのインフルエンザ菌の検出率もまた大きなバラツキがみられるものの、独立性の検定によれば有意の差 ($\chi^2=243.87$, $\rho=0.0000$) がみられるという成績であった。

なお、個々には示していないが、分離されたインフルエンザ菌に占める Low-BLNAR と BLNAR の割合は、検査材料による有意の差は認められていない ($\chi^2=10.10$, $\rho=0.2578$)。

2. 遺伝子変異と薬剤感受性

1) 経口薬感受性

Table 4 には、先述した遺伝子解析法にもとづいて、①BLNAS, ②BLPAR, ③Low-BLNAR, ④BLNAR, ⑤BLPACR-I と II (II の菌株数が少ないため表中には一括して示す) の 5 グループに分けたインフルエンザ菌に対する経口薬 9 剤の感受性成績を示す。表中には、それぞれの薬剤における MIC₅₀ と MIC₉₀ 値も示した。また、各遺伝子変異による MIC の変動幅を明確にするため、Fig. 1 として ABPC, AMPC, CCL, CPDX, CFDN, CDTR, CFPN, および FRPM の感受性と遺伝子変異との関係をグラフで示した。

集計に際しては、1 症例について 2 回以上の細菌検出がなされ、同一耐性型の菌が繰り返し検出されていた場合には、初回の菌のみを集計対象とし、2 回目以後に初回と耐性型の異なる菌が分離された際にはそれらも集計に加えた。最終的には 1,408 株が対象となった。その内訳は、BLNAS が 826 株 (58.7%)、TEM-1 型 β -lactamase 産生株が 81 株 (5.8%)、Low-BLNAR 株が 352 株 (25.0%)、BLNAR 株が 109 株 (7.7%)、BLPACR-I 株が 36 株 (2.6%)、そして BLPACR-II 株が 4 株 (0.3%) であった。

各耐性グループ別に算出した MIC₅₀ あるいは MIC₉₀ 値は薬剤によって異なり、特に *ftsI* 遺伝子の変異に伴

Table 4. MICs of 8 β -lactam antibiotics and levofloxacin for *Haemophilus influenzae* isolates distributed by PCR results for resistant gene

Antimicrobial agent and assigned group	Isolates for which the MIC (mg/L) was:														MIC (mg/L)		
	≤ 0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ampicillin																	
BLNAS (n=826)				1	11	59	622	129	4							0.25	0.5
TEM-1 (n=81)										3	16	13	6	15	28	32	64
Low-BLNAR (n=352)								57	235	48	12				1	2	
BLNAR (n=109)									17	48	23	12	8	1	2	8	
BLPACR-I & -II (n=40)												5	9	12	14	32	≥ 64
Amoxicillin																	
BLNAS					8	11	102	577	117	9	1	1				0.5	1
TEM-1										4	12	12	12	11	30	32	64
Low-BLNAR							1	18	93	128	53	36	19	4	2	8	
BLNAR									5	16	29	24	15	12	8	32	
BLPACR-I & -II												4	2	7	27	≥ 64	≥ 64
Cefaclor																	
BLNAS								13	49	369	308	71	15	1	2	8	
TEM-1									2	17	27	21	10	4	4	16	
Low-BLNAR											11	35	74	97	135	32	64
BLNAR										2	6	12	11	18	64	64	
BLPACR-I & -II												2	8	12	18	32	≥ 64
Cefpodoxime																	
BLNAS	3	4	20	63	496	223	14	3								0.063	0.125
TEM-1			1	3	34	32	11									0.125	0.25
Low-BLNAR					3	40	180	97	28	2	2					0.25	0.5
BLNAR									15	36	32	20	6		4	8	
BLPACR-I & -II						1	12	10	7	7	2	1				0.5	2
Cefdinir																	
BLNAS			3	12	43	380	352	33	3							0.25	0.5
TEM-1					4	25	40	9	3							0.5	1
Low-BLNAR						4	69	149	69	43	17	1			1	4	
BLNAR								4	12	13	40	33	7		8	16	
BLPACR-I & -II								1	8	9	11	10	1		4	8	
Cefditoren																	
BLNAS	28	275	367	129	26	1										0.016	0.031
TEM-1	2	16	30	24	8	1										0.016	0.063
Low-BLNAR		6	48	182	83	27	5	1								0.031	0.063
BLNAR				2	10	27	61	8	1							0.25	0.25
BLPACR-I & -II			1	22	13	4										0.031	0.063
Cefcapene																	
BLNAS	19	43	458	286	14	6										0.016	0.031
TEM-1		5	33	27	14	2										0.031	0.063
Low-BLNAR			2	22	133	144	41	9	1							0.125	0.25
BLNAR							2	14	39	42	12					1	4
BLPACR-I & -II				1	3	18	6	7	5							0.125	4
Faropenem																	
BLNAS				9	28	229	443	95	20	1	1					0.5	1
TEM-1					2	21	27	30			1					0.5	1
Low-BLNAR					3	4	23	112	93	78	38	1			2	8	
BLNAR						4	2	22	40	23	18				2	8	
BLPACR-I & -II						1	2	8	18	9	2				2	4	
Levofloxacin																	
BLNAS	9	148	546	117	5	1										0.016	0.031
TEM-1		10	48	22	1											0.016	0.031
Low-BLNAR	2	13	231	98	8											0.016	0.031
BLNAR		2	84	23												0.016	0.031
BLPACR-I & -II			27	13												0.016	0.031

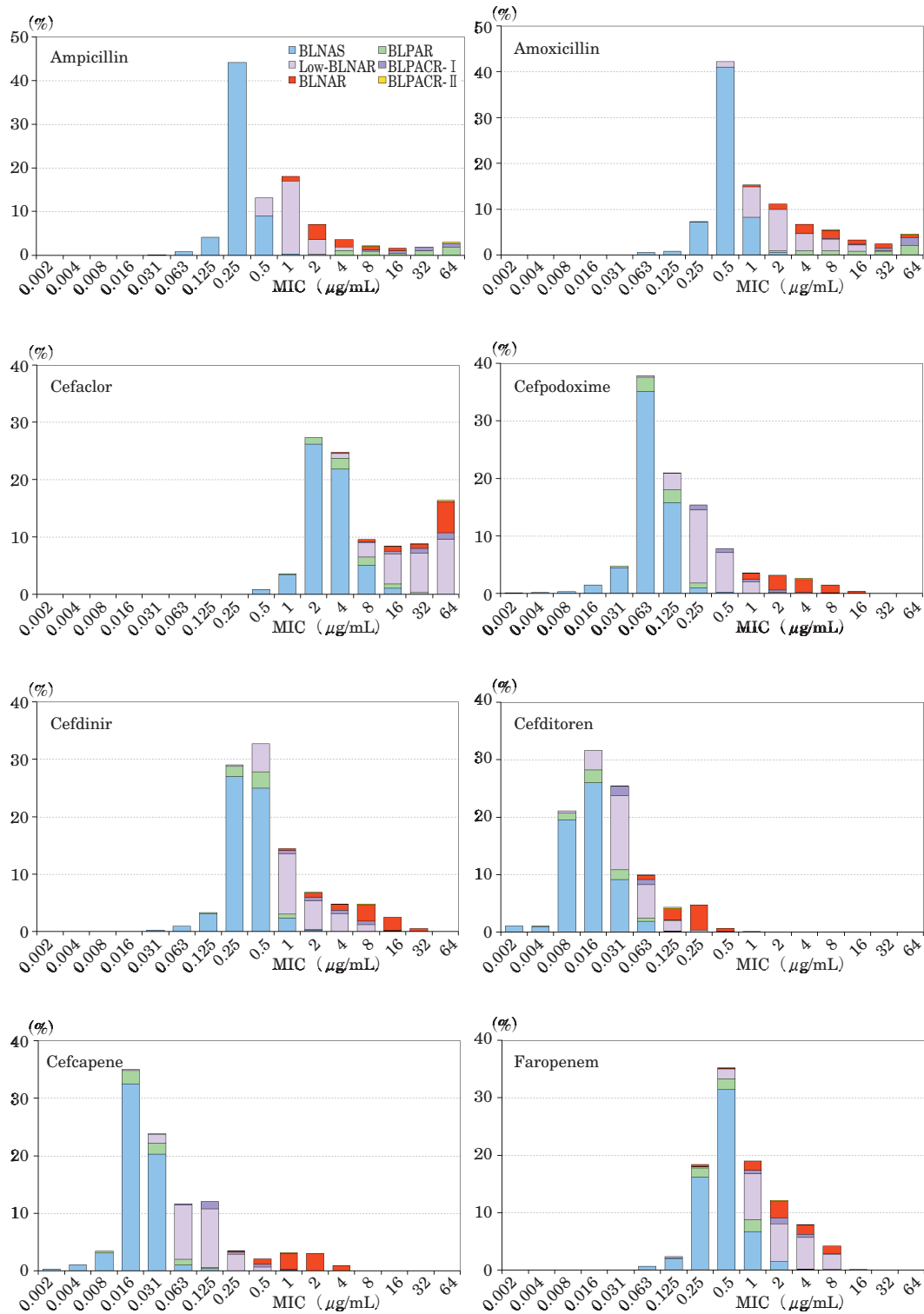


Fig. 1. Susceptibility distributions of oral eight β -lactam antibiotics to 1,408 clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. These isolates were classified into 6 types following PCR results for *bla* and *ftsI* genes.

う感受性の低下はペニシリン系薬よりもセフェム系薬で顕著に認められた。すなわち、インフルエンザ菌の感受性測定時に標準薬としたABPCのLow-BLNARとBLNARに対するMIC₉₀は、BLNASのそれに較べると4倍(2 $\mu\text{g/mL}$) および16倍(8 $\mu\text{g/mL}$) へと低下し

ていたが、Fig. 1にみられるようにそれらのMIC rangeは幅広く、両者は明確に区別し難かった。AMPCも同様で、ABPCに較べるとMICは試験管で1管劣っていたが、Low-BLNARとBLNARに対するMIC rangeはいずれも試験管5~6本と幅広かった。

一方、セフェム系薬の場合には、薬剤によって Low-BLNAR と BLNAR に対する MIC₅₀ と MIC₉₀ に相違が認められた。各薬剤の Low-BLNAR と BLNAR に対する MIC₉₀ は、CDTR が 0.063 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でもっとも優れ、CFPN は 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CPDX は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、FRPM は 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CFDN は 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CCL は 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

薬剤間にみられるこのような相違を MIC 分布上で比較すると、いずれの薬剤においても Low-BLNAR の多くは BLNAS の MIC にやや重なった形で耐性側にシフトしていたが、BLNAR の分布は薬剤によって明らかな相違が見られた。すなわち、BLNAR が Low-BLNAR の耐性側に重なって分布する ABPC、AMPC、CCL、CFDN、FRPM と、明らかな 2 群に識別できるかのような分布を示す CPDX、CDTR、CFPN である。

一方、TEM-1 型 β -lactamase 産生の BLPAR は ABPC、AMPC には通常 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の MIC を示したが、この耐性菌に対するセフェム系薬の抗菌力は BLNAS に対するそれと同じレベルであった。

BLPACR-I と II に対する各薬剤の抗菌力は、ペニシリン系薬には BLPAR と同一レベルであったが、セフェム系薬には Low-BLNAR あるいは BLNAR と同じ傾向を示した。

ニューキノロン系薬の LVFX は、いずれの耐性グループの菌に対しても優れた感受性を示し、MIC₉₀ はすべて 0.031 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

2) BLNAR に対する感受性累積分布

Fig. 2 に BLNAR (n=109) 株に対する経口 β -ラクタム系薬の MIC 累積分布を示す。これらの薬剤のうち、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下ですべての BLNAR の発育を阻止していたのは CDTR のみで、それ以外の薬剤では 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度を必要としていた。

3) 注射薬感受性

Fig. 3 には注射用 β -ラクタム系薬 8 薬剤の感受性成績と耐性遺伝子との関係を示す。ただし、ここに示したのは研究会 3 年目の 2000 年に分離された 438 株である。この 3 年間の間に各耐性型の菌の検出率に大きな変動がみられたためである。遺伝子変異からみた内訳は BLNAS が 241 株 (55.0%)、Low-BLNAR が 113 株 (25.8%)、BLNAR が 59 株 (13.5%)、BLPAR が 14 株 (3.2%)、BLPACR-I が 10 株 (13.5%)、BLPACR-II が 1 株 (0.2%) となっている。

CTX、CTR、CTM、CZOP のセフェム系 4 薬剤において、Low-BLNAR は BLNAS から試験管 1~3 本離れた耐性側に BLNAS に重なるように分布しているのに対し、BLNAR はそれよりさらに耐性側にシフトして明らかに異なる耐性菌群を形成していた。セフェム系薬の BLNAR に対する MIC は、BLNAS のそれに比較すると 32~64 倍低下していることになる。

一方、PIPC と IPM、PAPM、および MEPM のペニシリン、カルバペネム系 4 薬剤においては、*ftsI* 遺伝子変異の影響をセフェム系薬ほどには受けず、Low-BLNAR と BLNAR の順にしたがって BLNAS の MIC 分布の耐性側に重なる形で分布していた。BLNAR に対する MIC がもっとも優れていたのは PIPC の 0.031~0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、次いで MEPM の 0.125~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、IPM と PAPM のそれは 0.5~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

3. 耐性菌の 3 年間の推移

Fig. 4 に遺伝子レベルで識別した BLNAS、Low-BLNAR、BLNAR、BLPAR、BLPACR-I、および BLPACR-II の 6 タイプの 3 年間におけるそれぞれの年次推移を示す。

BLNAR は、1998 年にはわずか 3.2% (n=13/411) の分離率であったが、1999 年には 6.6% (n=37/559)、2000 年には 13.5% (n=59/438) へと急速に増加していた。それとは逆に BLPAR は 9.7%、4.8%、3.2% へと減少していた。BLNAS もまた減少傾向にあった。Low-

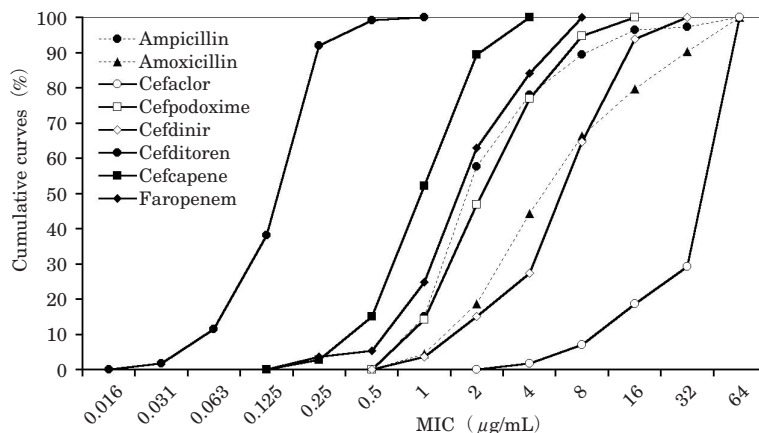


Fig. 2. Cumulative curves of oral β -lactam antibiotics for 109 strains of BLNAR *Haemophilus influenzae*.

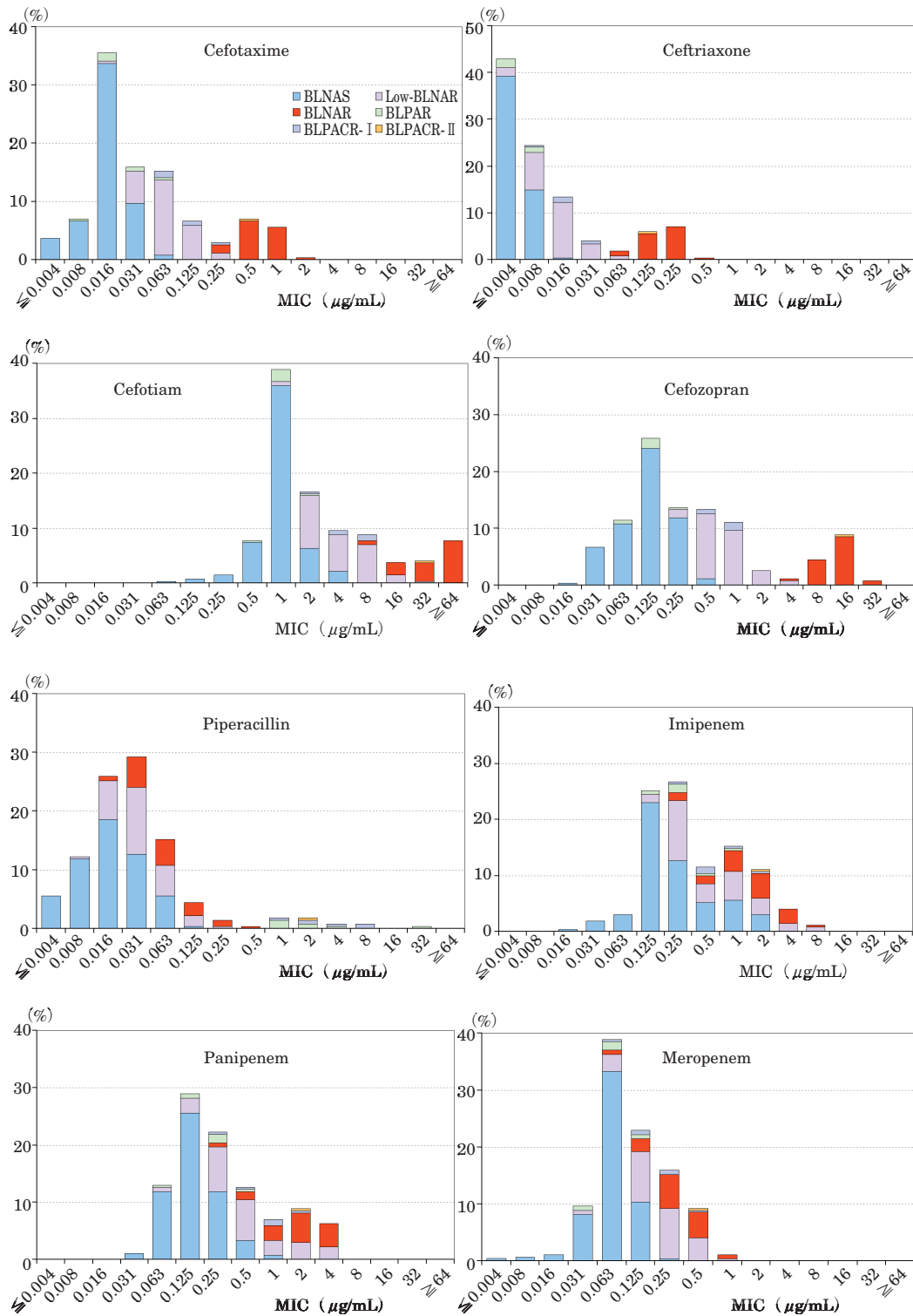


Fig. 3. Susceptibility distributions of intravenous eight β -lactam antibiotics for 438 clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. These isolates were classified into 6 types following PCR results for *bla* and *ftsI* genes.

BLNAR の分離率にはほとんど変動を認めなかった。BLPACR-I と BLPACR-II の期間内における分離率はきわめて低く、それらの動向は不明であった。これらの菌の年次的変動についてその特異性を独立性の検定で行

うと、 $\chi^2=57.12$, $\rho=0.0000$ となり、この変動は有意であるという結果であった。

4. 血清型別

Table 5 に 1,408 株の血清型別の成績を示す。呼吸器

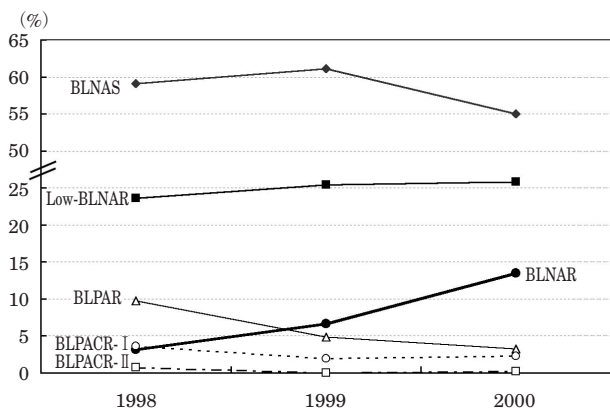


Fig. 4. Yearly changes of incidence of β -lactam-resistant strains classified into 6 types.

Table 5. Serological typing of 1,408 strains of *Haemophilus influenzae*

Serotype	Strains	%
a	0	0
b	89	6.3
c	21	1.5
d	10	0.7
e	18	1.3
f	7	0.5
Nontypable	1,263	89.7
Total	1,408	100

Serological identification of *H. influenzae* by slide agglutination using Bactoantisera (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

感染症からの分離菌では型別不能株が89.7%と圧倒的に多かった。型別可能であった菌株のなかではb型が89株(6.3%)と多く、その他のc型, e型, d型, f型がわずかに認められた。

III. 考 察

ペニシリン系薬が優位に使用されている欧米においては、呼吸器感染症の主たる起炎菌である肺炎球菌におけるPRSPが早くから注目され、Low-BLNARと推定されるインフルエンザ菌もまた1980年代に報告されている⁵⁻⁷⁾。

それに対し、本邦での同年代における耐性菌の状況は、MRSAや耐性緑膿菌、耐性セラチア菌といった院内感染菌が臨床上で大きな問題となっており、呼吸器感染症における市中感染菌としての肺炎球菌やインフルエンザ菌の耐性化に関する研究はほとんどなされていない。

このような背景には、それぞれの国において優位に使用されている抗菌薬の種類が大きく影響していると考えられる。日本においては1980年代に注射用セフェム系薬、続いて経口セフェム系薬が多数開発されたが、それ以降セフェム系薬の使用量は急速に増加し、外来診療においてもペニシリン系薬はほとんど使用されなくなった。このような状況を顧みると、院内においてはMRSA、10年遅れて市中でのPRSP、さらに約10年遅れてBLNAR

が顕彰化してきたと推定される。

一方、欧米においては抗菌薬の使用は専門家によって推奨されたプロトコールにしたがう傾向にあり、それがかえってVREやESBLs、最近ではニューキノロン系薬に耐性化した肺炎球菌の出現といった別の問題を生じさせている。

われわれが本邦において明らかなPRSPの出現に気づき、「PRSP研究会」を組織して、全国規模での疫学研究を開始したのは1993年のことである。それらの研究を通じ、PRSPは小児と高齢者において問題となる菌であり、しかも耐性菌の急速な増加に伴って重症感染症例が増加してきつつあることに警鐘を鳴らした¹⁷⁾。

その後、耐性菌の臨床的な意義を明らかにする目的で「市中感染症研究会」が組織された。この研究会によって、本論文で述べたインフルエンザ菌、ならびに肺炎球菌(投稿準備中)の耐性化状況の分子疫学解析のみならず、臨床における耐性菌の問題点についても明確にすることができた¹⁸⁾。すなわち、①両菌は免疫学的に未熟な乳幼児と高齢者において特に問題となる菌であること、②血中濃度のピークが1 μ g/mL前後と低い経口セフェム系薬の投与では、小児の上咽頭に棲息しやすい常在細菌の一面をもつPRSPやBLNARの菌数は一時的に減少させることはできても、完全に消失させることは困難であること¹⁹⁾、③社会的な変化に伴う幼弱乳幼児の保育園や幼稚園などにおける集団生活が耐性菌の増加に拍車をかけていることなどである。

一方、3年間の研究会の間にもインフルエンザ菌においては耐性化が進行している。その理由は、 β -ラクタム系薬、ことにセフェム系薬が親和性を有するPBP3をコードする*ftsI*遺伝子に変異が生じ、 β -ラクタム系薬の結合親和性が低下したことによる。遺伝子変異の相違にもとづき、その耐性レベルはLow-BLNARとBLNARの2つの耐性型に識別することが可能である⁸⁾が、これらの遺伝子学的にみた感性和耐性の識別は、NCCLSの勧告¹⁶⁾と必ずしも一致していない²⁰⁾。なぜならばNCCLSの基準は投与量の多い欧米での臨床効果にもとづいて設定されているからである。またさきに述べたように、欧米^{14,21)}においては β -lactamase産生菌は多く分離されるが、BLNARはまれにしか分離されず、10年前より施行されているHibワクチン接種²²⁾がtype bインフルエンザ菌による重症感染症をも激減させていることより、インフルエンザ菌の耐性化には大きな関心が寄せられていない。本邦と欧米におけるインフルエンザ菌についての認識には大きなずれがあることに留意する必要がある。

加えて、本邦でBLNARが急速に増加してきている背景には、小児に対して繁用されている経口セフェム系薬の体内動態の問題があることも考慮に入れなければならない。すなわち、CDTRを除いた薬剤の多くの血中

濃度は BLNAR が示す MIC をはるかに下回った値しか得られていないのである。この系統の薬剤は、もともと PBP 3 に対する結合親和性が優れていることによって優れた MIC を示している薬剤で、殺菌性が優れているわけでない。このため、セフェム系薬がもっとも親和性を示す PBP 3 が変化した BLNAR ではその影響を強く受けていることになる。

また、インフルエンザ菌は BLNAS であっても MIC 以上の薬剤濃度を作用させると、菌はフィラメント化やスフェロプラスト化といった形態変化は呈するものの、容易には溶菌せず、抗菌薬が消失するとフィラメント状の菌からは容易に元の桿菌へ、スフェロプラスト化した細胞からも時間を要するものの小桿菌へと戻り得る特質を有している²³⁾。この再増殖しやすい性質は自己融解を生じやすい肺炎球菌と根本的に異なる性状である。

小児の呼吸器感染症や急性中耳炎例から分離されるインフルエンザ菌における BLNAR の増加は、副現象としてさらに type b BLNAR による化膿性髄膜炎例を増加させている(投稿論文準備中)。そして、注射用セフェム系薬においても示された BLNAR に対する感受性の低下は、PRSP 感染症に対する問題と同じようにインフルエンザ菌による化膿性髄膜炎や心外膜炎など、難治化あるいは再燃といった問題をも生じさせている。

分子疫学的にみた BLNAR の増加は、セフェム系薬を多く使用する本邦の医療実態を強く反映しているものであり、このような耐性菌の増加防止には、全国規模での菌に対する分子疫学解析と、それにもとづく薬剤間の正確な抗菌力の比較が必要である。その上で、臨床においては各薬剤の体内動態を踏まえた適切な抗菌薬の選択と、その使用法とが決定されなければならない。

謝 辞

「肺炎球菌等による市中感染症研究会」にご参加いただき検査材料をお送りいただきました各施設の多くの関係各位に厚く御礼申し上げます。

同時に、研究会の運営に際し、ご協力を賜りました明治製菓(株)学術一部の穂坂賢也氏をはじめとする方々、ならびに解析に携わった小野暁子氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 生方公子: 再検討が迫られる市中感染症。—PRSP, BLNAR を中心に—。J J Antibiotics 52 (Suppl. B): 4~13, 1998
- 2) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊: 本邦で分離された ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の性状について。Chemotherapy 26: 491~498, 1978
- 3) 柳瀬義男, 生方公子, 高橋洋子, 他: *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について。第二篇 最近臨床から分離された *Haemophilus influenzae* に対する各種抗生物質の抗菌作用についての基礎的検討。Chemotherapy 26: 508~516, 1978
- 4) Vega R H, Sadoff L, Pafferson M J: Mechanism of

- ampicillin resistant in *Haemophilus influenzae* type b. Antimicrob Agents Chemother 9: 164~168, 1976
- 5) Mendelman P M, Chaffin D O, Stull T, et al.: Characterization of non- β -lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 26: 235~244, 1984
- 6) Parr T R Jr, Bryan L E: Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, β -lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus* type b to β -lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 25: 747~753, 1984
- 7) Mendelman P M, Chaffin D O, Musser J M, et al.: Genetic and phenotypic diversity among ampicillin-resistant, non- β -lactamase-producing, nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. Infect Immun 55: 2585~2589, 1987
- 8) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, 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 45: 1693~1699, 2001
- 9) Clairoux N, Picard M, Brochu A, et al.: Molecular basis of the non- β -lactamase-mediated resistance to β -lactam antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada. Antimicrob Agents Chemother 36: 1504~1513, 1992
- 10) Powell M, Yeo S F, Seymour A, et al.: Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* from England and Scotland in 1991. J Antimicrob Chemother 29: 547~554, 1992
- 11) Jorgensen J H: Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Infect Dis 14: 1119~1123, 1992
- 12) Barry A L, Fuchs P C, Pfaller M A: Susceptibilities of β -lactamase-producing and -nonproducing ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* to ceftibuten, cefaclor, cefuroxime, cefixime, cefotaxime, and amoxicillin-clavulanic acid. Antimicrob Agents Chemother 37: 14~18, 1993
- 13) Doern G V, Brueggemann A B, Pierce G, et al.: Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of β -lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multicenter surveillance study. Antimicrob Agents Chemother 41: 292~297, 1997
- 14) Richter S S, Brueggemann A B, Huynh H K, et al.: A 1997-1998 national surveillance study: *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* antimicrobial resistance in 34 US institutions. Int J Antimicrob Agents 13: 99~107, 1999
- 15) Nelson M B, Apicella M A, Murphy T F, et al.: Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P 6. Infect Immun 56: 128~134, 1998
- 16) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifth informational supplement M 100-S 10. Villanova P A: National Commit-

- tee for Clinical Laboratory Standards: 2000
- 17) 紺野昌俊, 生方公子: 改定ペニシリン耐性肺炎球菌。
(株協和企画通信, 1999)
 - 18) 生方公子: 再検討が迫られる市中感染症。—PRSP,
BLNARを中心に—(第2報)。J J Antibiotics 54
(Suppl. B): 72~79, 2001
 - 19) 紺野昌俊, 生方公子, 千葉菜穂子, 他: Cefditoren
pivoxilの市販後の特別調査とその調査精度に関する
検証。日化療会誌 49: 369~396, 2001
 - 20) Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, et al.:
Differentiation of β -lactamase-negative ampicillin
-resistant *Haemophilus influenzae* from other *H.*
influenzae strains by a disc method. J infect
Chemother 8: 50~58, 2002
 - 21) Dabernat H, Delmas C, Seguy M, et al.: Diversity
of β -lactam resistance—conferring amino acid
substitutions in penicillin-binding protein 3 of
Haemophilus influenzae Antimicrob Agents Che-
mother 46: 2208~2218, 2002
 - 22) Schoendorf K C, Adams W G, Kiely J L, et al.:
National trends in *Haemophilus influenzae* menin-
gitis mortality and hospitalization among children,
1980 through 1991. Pediatrics 93: 663~668, 1994
 - 23) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊: *Haemophilus*
influenzae 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質
の意義について。第四篇 Ampicillinにより誘導され
た *Haemophilus influenzae* のスフェロプラストから
の再増殖について。Chemotherapy 26: 666~675,
1978

Surveillance based on molecular epidemiology for *Haemophilus influenzae* isolates between 1998 and 2000 in Japan

—Results of clinical isolates collected by the Community-Acquired Bacterial Infections Working Group—

Kimiko Ubukata¹⁾, Keiko Hasegawa³⁾, Naoko Chiba²⁾, Reiko Kobayashi²⁾, Masatoshi Konno⁴⁾
and Community-Acquired Bacterial Infections Working Group

¹⁾Laboratory of Infectious Agents Surveillance, Kitasato Institute for Life Sciences, 5-9-1 Shirokane,
Minato-ku Tokyo 108-8641, Japan

²⁾Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

³⁾Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University and Kitasato Institute for Life Sciences

⁴⁾Emeritus Professor, Teikyo University

The 6,692 samples used in this study were sent to our laboratory by 187 medical institutions participating in the Community-Acquired Bacterial Infections Working Group between 1998 and 2000 in Japan. Acute otitis media (n=1,425), acute upper respiratory tract infection (n=961), and acute bronchitis (n=390) were prevalent in 4,030 cases, duplicates excluded. We also included 175 pneumonia cases in this study. The proportion of *Haemophilus influenzae* isolates in all cases was about 34%. The prevalence of *H. influenzae* isolates peaked in those aged 1 year and gradually decreased with age until children entered school. In contrast, average prevalence in adults was 10%. We conducted molecular-level epidemiological studies for 1,408 strains using PCR to identify resistant genes in *H. influenzae*. Our 4 sets of primers are as follows: (i) *p6* gene of P6 membrane protein, (ii) TEM-1 type β -lactamase gene (*bla*), (iii) normal PBP3 gene (*ftsI*), and (iv) mutational *ftsI* gene detected in β -lactamase-nonproducing ampicillin (ABPC) resistant *H. influenzae* (BLNAR). *H. influenzae* strains were classified into 6 types based on PCR: (i) β -lactamase-nonproducing ABPC-susceptible strains (BLNAS; n=826) with no any resistant genes, (ii) TEM-1 type β -lactamase-producing ABPC resistant strains (BLPAR; n=81), (iii) β -lactamase-nonproducing and low-level ABPC-resistant strains (Low-BLNAR; n=352) possessing Asn-526→Lys-526 amino acid substitution, (iv) BLNAR strains (n=109) possessing Asn-526→Lys-526 and 3 amino acids substitutions detected around the Ser-Ser-Asn conserved motif, (v) β -lactamase-producing amoxicillin-clavulanate resistant strains (BLPACR-I; n=36) possessing TEM-1 and Low-BLNAR resistant genes, and (vi) β -lactamase-producing amoxicillin-clavulanate resistant strains (BLPACR-II; n=4) possessing TEM-1 and BLNAR resistant genes. ABPC MIC_{90s} in Low-BLNAR was 2 μ g/mL and in BLNAR was 8 μ g/mL. Susceptibility of oral and intravenous cephalosporins MICs to these resistant strains apparently decreased more than that of ABPC and meropenem. In oral cephalosporins, only cefditoren MIC₉₀ was excellent \leq 1 μ g/mL against BLNAR. BLNAR increased significantly from 3.2% in 1998, 6.6% in 1999, and 13.5% in 2000. Insufficient serum concentrations after oral cephalosporins prescribed for immunological immature pediatric patients accelerate the increase of BLNAR strains. Selection of proper antibiotics based on rapid, accurate bacteriological examinations, and Hib vaccination against *H. influenzae* must be taken to prevent resistant microorganisms from increasing.