

## 【原著・基礎】

小児急性中耳炎症例の鼻咽腔から検出された *Streptococcus pneumoniae*  
の分子遺伝学的検討

宇野芳史

宇野耳鼻咽喉科クリニック\*

(平成15年9月29日受付・平成16年1月22日受理)

2001年4月から12月までの9か月間に当院で治療した小児急性中耳炎症例300例の鼻咽腔から検出された *Streptococcus pneumoniae* 418株についてPCRを用いて penicillin binding protein の変異およびマクロライド耐性遺伝子の出現について検討を行った。検討を行った遺伝子は、1) *LytA* 遺伝子、2) *pbp 1 a* 遺伝子、3) *pbp 2 b* 遺伝子、4) *pbp 2 x* 遺伝子、5) *ermB* 遺伝子、6) *mefA* 遺伝子である。検出された *S. pneumoniae* の内訳は、PSSP 34株 (8.1%)、PISP 147株 (35.2%)、うち、*pbp 1 a* 単独変異1株、*pbp 2 b* 単独変異4株、*pbp 2 x* 単独変異73株、*pbp 1 a*+*pbp 2 b* 変異0株、*pbp 1 a*+*pbp 2 x* 変異44株、*pbp 2 b*+*pbp 2 x* 変異25株、PRSP 237株 (56.7%)であった。マクロライド耐性遺伝子については、*ermB* 遺伝子単独保持株は143株 (35%)、*mefA* 遺伝子単独保持株は131株 (31%)、両者保持株は13株 (3%)、いずれの遺伝子も保持していない株は131株 (31%)であった。また、*pbp* 遺伝子変異とマクロライド耐性遺伝子の出現については、PSSPではマクロライド耐性遺伝子を保持している株は14.4%、PISPでは61.2%、PRSPでは81.0%と *pbp* 遺伝子の変異が多くなり耐性度が増すにつれてマクロライド耐性遺伝子の検出率も増加していた。年齢との関係では、PISPとPRSPを合わせたものは、いずれの年齢においても80%以上の耐性化率であった。また、わが国で問題となっている *pbp 2 x* 単独変異株は、PISP 147株中73株 (49.7%)、全体では418株中73株 (17.5%)であった。

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, infantile acute otitis media, PBP mutation, macrolide-resistant gene

*Streptococcus pneumoniae* は、*Haemophilus influenzae* および *Moraxella catarrhalis* とともに、上気道常在菌のひとつである一方、小児科領域では化膿性髄膜炎および肺炎、気管支炎などの呼吸器疾患の主な起炎菌として<sup>1,2)</sup>、また、耳鼻咽喉科領域では急性中耳炎、急性副鼻腔炎の主な起炎菌として非常に重要なものと考えられている<sup>3-5)</sup>。従来 *S. pneumoniae* は、penicillin に対する感受性が良好で、*S. pneumoniae* が起炎菌と考えられる症例においては、penicillin 系抗菌薬を投与することで良好な治療成績が得られ、臨床では、ほとんど問題となることはなかった。しかし、1967年に南アフリカでペニシリン耐性肺炎球菌 (penicillin-resistant *S. pneumoniae*, 以下 PRSP) が検出されて以来<sup>6)</sup>、徐々に臨床 PRSP が起炎菌となる疾患が問題となってきた。わが国でも、1980年代から PRSP の検出が増加しており<sup>7)</sup>、耳鼻咽喉科領域においても1989年の小児の難治性中耳炎の報告以来<sup>8)</sup>、PRSP による難治性、反復性中耳炎の報告が急増し、抗菌薬の使用法および治療方法についてさまざまな検討および報告がなされてきた<sup>9-11)</sup>。従来、*S. pneumoniae* に対する細菌検査および薬剤感受性検査は塗抹培養により菌の検出を行い penicillin G の感受性によ

り米国臨床検査標準委員会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 以下 NCCLS) の判定基準<sup>12)</sup>にしたがい、感受性および耐性の判定を行い、その結果にしたがい、抗菌薬を投与し治療を行ってきた。しかしながら、このように薬剤感受性検査の結果にしたがい抗菌薬の投与を行っても、治療に難渋したり、一次治療に失敗し、難治性、反復性中耳炎に移行し、鼓膜切開術あるいは鼓膜換気チューブ留置術を施行したりしなければならぬ症例が増加してきている<sup>13,14)</sup>。

近年、遺伝子工学の進歩により、polymerase chain reaction (以下 PCR) 法を用いて、*S. pneumoniae* を含むさまざまな細菌の遺伝子解析が行われ、その結果にしたがい、検出菌の感受性、耐性の判定が行われるようになってきた<sup>15)</sup>。今回、PCR 法を用い当院で治療が行われた小児急性中耳炎症例の鼻咽腔から検出された *S. pneumoniae* の遺伝子解析を行い、その耐性化について検討を行ったので報告する。

## I. 対象と方法

## 1. 対象

今回検討した症例および検出株は、2001年4月から12月までの9か月間に当院で治療した小児急性中耳炎

\*岡山県岡山市富原3702-4

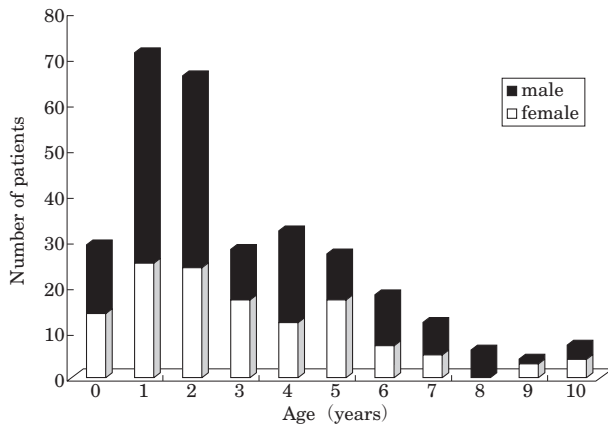


Fig. 1. Age and gender distribution of patients with acute otitis media due to *Streptococcus pneumoniae*.

症例 300 例の鼻咽腔から検出された *S. pneumoniae* 418 株である。いずれの症例も 1 経過中の検体の採取は 1 回とし、2 回反復した症例が 52 例、3 回反復した症例が 33 例であった。今回は、多くの症例および検出株を検討するため、大多数の症例で中耳貯留液と一致するといわれている鼻咽腔からの検出株を検討の対象とした。年齢は、6 か月から 10 歳、平均は 3.4 歳、性別は男児 172 例、女児 128 例であり、1 歳代にそのピークがその次に 2 歳代の症例が多く認められた (Fig. 1)。

## 2. 方法

小児急性中耳炎症例の鼻咽腔からシードスワブ 2 号 (栄研) を用い採取した検体を用いて行った。*S. pneumoniae* のスクリーニングは、岡山医学検査センターにて行った。分離培養は、血液寒天培地およびチョコレート寒天培地で、35°C 5% 炭酸ガス培養で 2 日間行った。検出された *S. pneumoniae* は、明治製菓中央研究所にて、Ubukata らの報告した 4 つのプライマーセットおよび polymerase chain reaction (以下 PCR) 法を用いて検討を行った<sup>15)</sup>。すなわち *S. pneumoniae* の確認には、自己融解酵素を支配する *lytA* 遺伝子の部分を検出するプライマーを用い、ペニシリン結合蛋白 (以下 PBP) 遺伝子の検出には、*pbp 1 a* 遺伝子、*pbp 2 b* 遺伝子、*pbp 2 x* 遺伝子の部分を増幅するプライマーを用い検討を行った。マクロライド耐性遺伝子の検出には、rRNA メチラーゼをコードする *ermB* 遺伝子と薬剤排泄機構である *efflux* システムの膜蛋白をコードする *mefA* 遺伝子を増幅するプライマーを用い検討を行った。また、今回は、*S. pneumoniae* の薬剤感受性については、K-B 法を用いて行い、MIC 測定を行っていないため、検討を行わなかった。

## 3. PBP 遺伝子と耐性化の分類

以上の 3 種の *pbp* 遺伝子解析結果にもとづき、3 つの *pbp* 遺伝子ともに変異の認められない株をペニシリン感受性肺炎球菌 (penicillin-susceptible *S. pneumoniae*, 以下 PSSP)、1-2 遺伝子に変異のある株をペニシ

リン中等度耐性肺炎球菌 (penicillin intermediate-resistant, *S. pneumoniae*, 以下 PISP)、3 遺伝子に変異した株を PRSP と判定した。

## II. 結 果

### 1. 症例全体での遺伝子解析の結果

今回検討した株 418 株全体では、PSSP 34 株 (8.1%)、PISP 147 株 (35.2%)、PRSP 237 株 (56.7%) であった (Fig. 2)。マクロライド耐性遺伝子の発現遺伝子変異については、*ermB* が検出された株は 143 株 (35%)、*mefA* が検出された株は 131 株 (31%)、*ermB* と *mefA* がともに検出された株は 13 株 (3%)、いずれの耐性遺伝子も検出されなかった株は 131 株 (31%) であった (Fig. 3)。PISP 147 株中、*pbp* 遺伝子の変異としては、*pbp 2 x* 遺伝子の変異が単独あるいは *pbp 1 a* 遺伝子、*pbp 2 b* 遺伝子の変異との組み合わせで関与した株が 142 株 (96.6%) ともっとも多く、*pbp 1 a* 遺伝子の変異が関与した株は 45 株 (30.6%)、*pbp 2 b* 遺伝子の変異が関与した株は 29 株 (19.7%) であった。しかし、*pbp 1 a* 遺伝子と *pbp 2 b* 遺伝子は、単独に変異した株は少なく、*pbp 2 x* 遺伝子ともに変異した株が大半であった (Table 1)。*S. pneumoniae* のペニシリンに対する耐性化とマクロライド系抗菌薬に対する耐性化の関係について検討してみると、PSSP 34 株中マクロライド耐性遺伝子については、*ermB* 遺伝子が検出された株は 2 株 (5.9%)、*mefA* A 遺伝子が検出された株は 3 株 (8.8%) であり、29 株 (85.3%) では、いずれの耐性遺伝子も検出されなかった。PISP 147 株中、マクロライド耐性遺伝子については、*ermB* 遺伝子が検出された株は

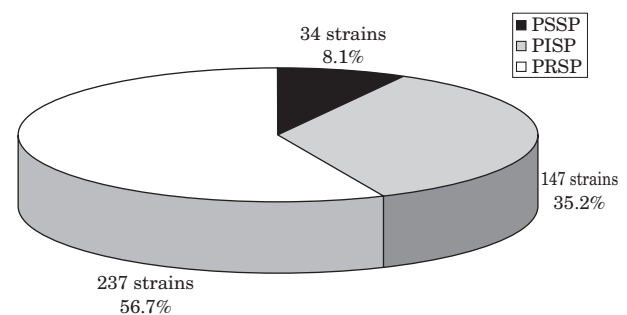


Fig. 2. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* according to penicillin binding protein gene mutation.

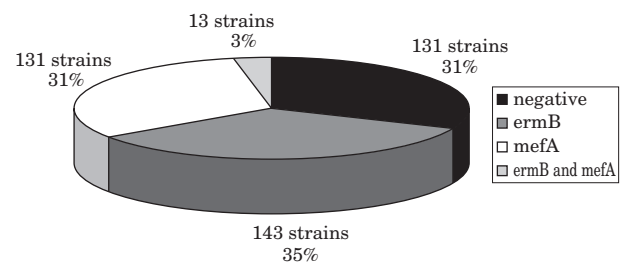


Fig. 3. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* according to the presence of the macrolide resistance gene.

Table 1. Relationship between pbp mutation and the macrolide resistance gene

		non	ermB	mefA	ermB, mefA
PSSP	non	29	2	3	0
PISP	1 a	0	0	1	0
	2 b	2	1	1	0
	2 x	32	27	12	2
	1 a+2 b	0	0	0	0
	1 a+2 x	6	25	12	1
PRSP	2 b+2 x	17	4	4	0
	1 a+2 b+2 x	45	84	98	10

57株 (38.8%), mefA 遺伝子が検出された株は 19 株 (12.9%), ermB, mefA 遺伝子がいずれも検出された株は 3 株 (2.0%) であり, いずれの耐性遺伝子も検出されなかった株は 57 株 (38.8%) であった。PRSP 237 株中マクロライド耐性遺伝子については, ermB 遺伝子が検出された株は 84 株 (35.4%), mefA 遺伝子が検出された株は 98 株 (41.4%), ermB, mefA 遺伝子がいずれも検出された株は 10 株 (4.2%) であり, いずれの耐性遺伝子も検出されなかった株は 45 株 (19.0%) であった。以上のように, PBP 遺伝子の変異とマクロライド耐性遺伝子の関係についてみると, PBP 遺伝子の変異が多くなり耐性が増加するにつれてマクロライド耐性遺伝子の検出率も増加していた (Table 1)。

## 2. 各年齢における遺伝子解析の結果

各年齢の PBP 遺伝子の変異について Fig. 4 に示す。各年齢とも, PISP, PRSP 耐性株が過半数を占めていた。特に 0 歳から 2 歳代の低年齢においては, PRSP がそれぞれの年齢の検出株の 67.5%, 68.5%, 62.1% と 60% 以上を占めていた。また, PISP と PRSP を合わせたものを耐性株として検討を行うと, 7 歳代が唯一 69.2% と 70% を切っていたが, 後の年代はいずれも 70% 以上の耐性株の検出をみた。また, 検出株の多く見られた 5 歳代以下で検討してみると, 3 歳代, 4 歳代が 80% 代の耐性化率であったが, 後はいずれも 90% 以上の耐性化率であった (Fig. 4)。日本で特に問題となっている pbp 2 x 単独変異株について検討してみると, PISP に占める pbp 2 x 単独変異株の割合は 20% 代から 80% であり, 全体でみると PISP 147 株中 73 株 (49.7%) が, pbp 2 x 単独変異株であった。また, 検出株全体でみると, 2% から 66.7%, 全体では 418 株中 73 株 (17.5%) が pbp 2 x 単独変異株であった (Fig. 5)。

次にマクロライド耐性遺伝子の検出状況について Fig. 6 に示す。マクロライド耐性遺伝子の検出については, PBP 遺伝子の変異ほど年齢との明らかな傾向は認めなかった。しかし, ermB, mefA 遺伝子のいずれかあるいは ermB, mefA 遺伝子のいずれも持っているものを耐性株として検討を行うと, いずれの年代においても 50% 以上の耐性化率をみた。また, 検出株の多く見られた 5 歳代以下で検討してみると, 2 歳代が 61.2% の耐性化率であったが, 後はいずれも 70% 以上の耐性化率をみた (Fig. 6)。各年齢の PSSP, PISP, PRSP ごとに

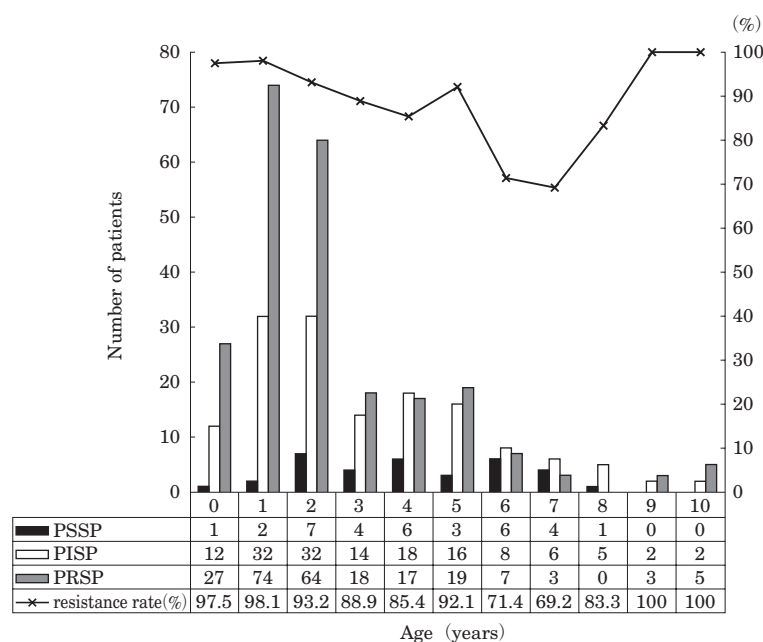


Fig. 4. Isolation frequency of *Streptococcus pneumoniae* by patient age. These isolates were classified into 3 types following PCR results for pbp 1 a, pbp 2 b and pbp 2 x genes mutation. PSSP: penicillin-susceptible *S. pneumoniae*, PISP: penicillin-intermediate-resistant *S. pneumoniae*, PRSP: penicillin-resistant *S. pneumoniae*, Resistance rate: PISP + PRSP

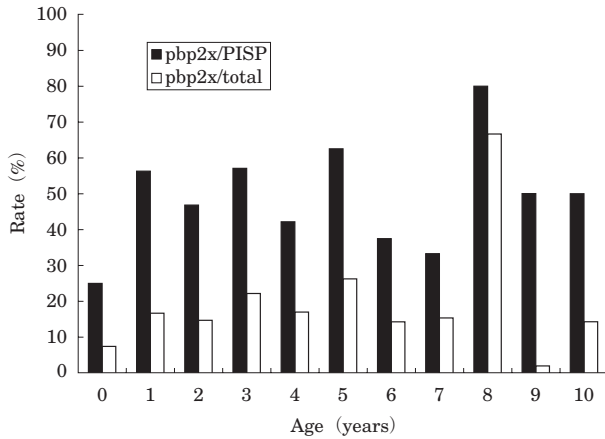


Fig. 5. Rate of pbp 2 x gene mutation in PISP and total *S. pneumoniae*.

マクロライド耐性遺伝子の検出について検討してみると、検出株の少なかった8歳代、9歳代と10歳代を除いて、耐性度が増加するにしたがってマクロライド耐性遺伝子を保持する株の割合も増加していた。また、全体でみると PSSP 株においては、マクロライド耐性遺伝子の保持率は 14.4%、PISP においては 61.2%、PRSP においては 81.0% と耐性度が増加するにしたがってマクロライド耐性遺伝子を保持する株の割合も増加していた (Fig. 7)。

III. 考 察

1. PBP 遺伝子の変異について

従来、*S. pneumoniae* の耐性については、penicillin G の感受性により米国臨床検査標準委員会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 以下

NCCLS) の判定基準<sup>12)</sup>にしたがい、感受性および耐性の判定が行われ、その結果にしたがい、PSSP、PISP、PRSP の判定が行われてきた。現在までに報告されている特に耳鼻咽喉科領域からの *S. pneumoniae* の耐性化率については、PISP と PRSP を合わせた頻度では、1993 年と 1996 年の杉田の報告<sup>16,17)</sup>では、それぞれ 24%、36.2% であり、当院の 1996 年から 1997 年にかけての検出頻度は 61.4% であった<sup>11)</sup>。また、当院では 1998 年から 3 年間年度ごとに PISP と PRSP を合わせた頻度の検討を行ったが、それによると 1998 年には 65.0%、1999 年には 62.4%、2000 年には 68.9% の検出頻度であった<sup>18)</sup>。他の領域からの報告においてもほぼ同様の検出頻度であった<sup>19)</sup>。しかしながら、今回の PBP 遺伝子の耐性をもとに行った *S. pneumoniae* の耐性化率の検討では、PSSP 8.1%、PISP 35.2%、PRSP 56.7% と、PISP と PRSP とを合わせると 91.9% と 9 割を超える *S.*

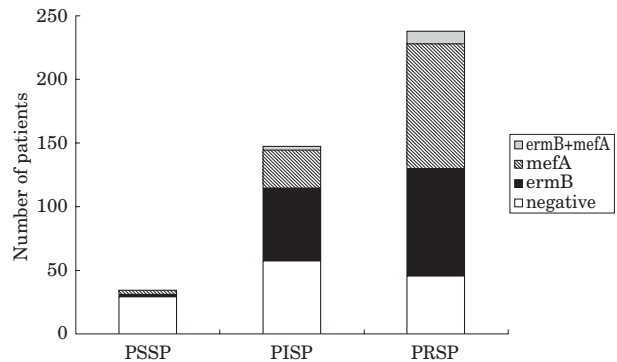


Fig. 7. Incidence of the macrolide-resistance gene in PSSP, PISP and PRSP.

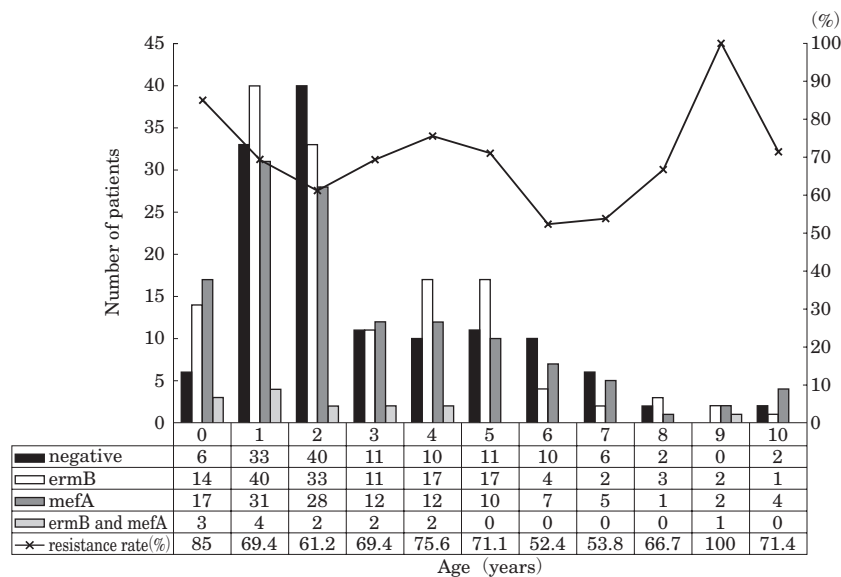


Fig. 6. Isolation frequency of *S. pneumoniae* by patient age. These isolates were classified into 4 types following PCR results for the mefA and ermB genes. Resistance rate: only ermB + only mefA + both ermB and mefA

*pneumoniae* が耐性を示した。特に PRSP が 56.7% と 6 割近い検出頻度を示していた。しかしながら、従来の耐性化の検討方法と異なるため、年を経るごとにますます *S. pneumoniae* が耐性を示すようになったのか、今回検討を行った PBP 遺伝子の変異をもとに行う耐性化の判定方法の方が *S. pneumoniae* の耐性化より鋭敏に示すのかは明らかではない。しかし、2003 年に生方らが、全国から収集した *S. pneumoniae* 1,945 株をもとに詳細に検討を行った結果によると<sup>20)</sup>、PBP の遺伝子変異をもとに耐性化の頻度の検討を行うと、84.4% と従来の NCCLS の判定基準を用いた検出頻度と比較して、今回のわれわれの報告に類似した結果を報告している。これらのことから考えると、PBP 遺伝子の変異をもとに行う耐性化の判定では、従来の NCCLS の判定基準を用いた耐性化の判定よりも、高度の耐性化の頻度を示すものと考えられる。その理由としては、生方らが示しているように<sup>20)</sup>、今回のわれわれの検討でも多く認められた pbp 2x 単独変異株は、同じ  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬でもペニシリン系抗菌薬には感受性（微量液体希釈法で PCG に対する MIC<sub>90</sub> が 0.063  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を示し、セフェム系抗菌薬には耐性（微量液体希釈法で CDTR に対する MIC<sub>90</sub> が 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を示すため、NCCLS の分類では PSSP に、今回用いた耐性遺伝子による分類では PISP に分類されるため、耐性化率がより高値を示したものと考えられた。また、以前当科での検討<sup>21)</sup>あるいは生方ら<sup>20)</sup>が報告しているように、PBP 遺伝子の変異を示す株でも、薬剤感受性では良好な再小発育阻止濃度（minimal inhibitory concentration, 以下 MIC）を示す株もあり、NCCLS の分類ではそのような株は感受性株と分類されることによるためと考えられた。

PISP と判定された株の pbp 遺伝子の変異について特に注目して検討してみると、PISP 147 株中 142 株で pbp 2x の変異が認められた。特に pbp 2x 単独変異株が、147 株中 73 株（49.7%）と約半数で認められた。これらの株は、遺伝子による判定上では、ペニシリン感受性セフェム耐性株であり、NCCLS の分類では、PSSP と判定される可能性が高い。特にわが国では、*S. pneumoniae* が検出され PSSP と判定された場合には、セフェム系抗菌薬を第一選択薬として選択する傾向にある<sup>22)</sup>。しかしながら、pbp 2x 単独変異株においては、期待した結果が得られず、治療に失敗する可能性がある。また、今回の検討で得られたように、ペニシリン系抗菌薬の耐性に関与する pbp 1a, pbp 2b の変異が、pbp 2x の変異の検出なしに、検出された株は、pbp 1a, pbp 2b それぞれの変異が単独で検出された株は、それぞれ 1 株、4 株であり、pbp 1a, pbp 2b がともに変異し、ペニシリン系抗菌薬に対する耐性が進んでいると考えられる株は 1 株も認めなかった。すなわち、わが国の *S. pneumoniae* のうち、遺伝子による判定上の PISP

においては、セフェム系抗菌薬に対する耐性の方がペニシリン系抗菌薬に対する耐性よりも進んでいるため、一般的に遺伝子による判定上で PISP と判定された *S. pneumoniae* に対しては、セフェム系抗菌薬を用いるよりもペニシリン系抗菌薬を用いた方が予測した通りの良好な治療成績を得られる可能性が高いと考えられる。

## 2. マクロライド耐性遺伝子の検出について

今回検討した株においては、マクロライド耐性遺伝子の検出については、耐性遺伝子を認めないもの、ermB のみ認めるもの、mefA のみ認めるものがそれぞれほぼ 1/3 ずつ検出された。以前当科で検討した際には、mefA を検出した株の方が、ermB を検出した株よりも約 1.5 倍多く認められた<sup>21)</sup>が、今回は、その差を認めなかった。また、生方らの最近の報告<sup>20)</sup>では、逆に ermB を検出した株の方が、mefA を検出した株よりも多く認めたと報告している。また、保富ら<sup>22)</sup>は、われわれと同じく小児急性中耳炎症例の鼻咽腔から検出された *S. pneumoniae* において ermB と mefA がそれぞれ 32% ずつ検出されたと報告している。このように ermB と mefA の検出状況が逆転あるいは同程度に変化した原因については、明らかなことはわからないが、数年前までは、PRSP においては、mefA が多く認められるため 14 員環、15 員環マクロライドに対しては耐性を示し、PRSP に対しては、16 員環マクロライドのみ感受性が保持されているため、その投与が有効であるという報告が見られ<sup>23)</sup>、事実、PRSP と判定され、16 員環マクロライドのみの感受性が残っている場合には 16 員環マクロライドが使用されており、その影響がいまになってみられるようになったとも考えられる。また、今回の結果から明らかのように、PSSP, PISP, PRSP と PBP 遺伝子の変異が多くなり、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対する耐性が増すにしたがって、マクロライド耐性遺伝子の検出率も増加し、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対する耐性菌というよりも、多剤耐性の *S. pneumoniae* の様相を示していたことは従来の報告と一致する。したがって、PRSP と判定された *S. pneumoniae* に対する抗菌化学療法は実際の治療時に、経口抗菌薬のみならず注射用抗菌薬も含めて検討し、その効果を詳細に検討しながら行う必要があると考えられた。また、今後は *S. pneumoniae* においては、薬剤感受性だけでなくこの変異した遺伝子の検出率および耐性遺伝子の検出率がどこまで上昇するのか十分なサーベイランスを要するものと考えられた。

## 3. 年齢と PBP 遺伝子の変異の関係について

従来、NCCLS の判定基準にしたがった分類では、低年齢ほど、特に PRSP は、3 歳以下の乳幼児からの検出が多いと報告されてきた<sup>11,18)</sup>。また、PISP についても、PRSP ほどではないが、低年齢の小児からの検出が多いと報告されてきた<sup>18,24)</sup>。その原因としては、集団保育の場で PRSP, PISP の潜在的な蔓延化<sup>25)</sup>、あるいは、集



団保育の場だけではなく一般市中における PRSP, PISP の潜在的な蔓延化<sup>27)</sup>のために、感染症を発症した症例からも PRSP, PISP が検出される頻度が高いためと考えられてきた。しかし、今回の耐性遺伝子をもとにした分類では、PRSP はいままでの報告と同様 2 歳以下の症例では、検出株の 60% 以上を占めていた。しかし、PRSP と PISP を合わせて検討を行うと、7 歳代で唯一検出率が 70% を切っていたが、後の年齢ではいずれも 70% 以上、また、6 歳代を除くといずれも 80% 以上の検出率を示した。このことはいままでも考えられてきた低年齢のみならず、小学校の低学年から中学年の年齢の範囲にまで PISP および PRSP の耐性菌が蔓延してきているものと考えられた。この年代では、個体の免疫力の関係から、乳幼児のような難治性あるいは重症感染症は少ないものと考えられるが、症例によっては、治療に難渋する症例も今後でてくるものと考えられるため、今後は、乳幼児のみならず年長児においてもより一層の注意を要すると考えられた。また、海外と比較して日本での検出率が高いといわれている pbp 2x の単独変異株について検討してみると、各年齢で、20~80% とその検出率に差が見られた。また、0, 6, 7 歳で検出率がやや低いものの、特に低年齢でその検出率が高いという傾向も認められなかった。また、PISP の 50% 近くが pbp 2x の単独変異株であり、また、S. pneumoniae の検出株全体では、17.5% が pbp 2x の単独変異株であった。最近の保富ら<sup>22)</sup>の報告によると、われわれと同様小児急性中耳炎症例の鼻咽腔から検出された S. pneumoniae 1,014 株において 24% が pbp 2x の単独変異株であったと報告しており、このような pbp 2x の単独変異株の検出はいままでもいわれていたように、われわれの施設のみならず日本における一般的な傾向であろうと考えられた。

#### 4. 年齢とマクロライド遺伝子の関係について

マクロライド耐性遺伝子の検出率については、いずれの年齢でも 50% 以上の検出率であった。今回の検討では、検討した株の少ない 0 歳および 9 歳代では 80% 以上の耐性化率であったが、その他の年齢では、6, 7 歳代を除き 60% 以上の耐性化率であった。マクロライド耐性遺伝子についての年齢ごとの検討の報告はほとんど見られないため、他施設との比較は困難であるが、わが国においては、S. pneumoniae がペニシリン耐性のみならず、多剤耐性となっていること<sup>11, 18, 20)</sup>が、このように各年齢においても高い耐性化率を示したのではないかと考えられる。また、わが国においては、成人例のみでなく小児例においても、副鼻腔炎、滲出性中耳炎に対しマクロライド少量長期投与が数多く行われて、またその実施基準もあいまいになっている場合も見受けられる。したがって今後ますますマクロライド耐性遺伝子の検出率が上昇することも考えられるため、注意深くサーベイランスを行う必要があると考えられた。

今回行った PBP 遺伝子の変異およびマクロライド耐性遺伝子の検出による S. pneumoniae の分類の報告は最近多く認められるようになってきている。生方ら<sup>23)</sup>によると、特に PBP 遺伝子の変異状況により、おおよその  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対する MIC が推測可能であるとされている。PCR による PBP 遺伝子の変異およびマクロライド耐性遺伝子の検出は、従来の MIC 測定と比較すると短時間で判定可能であり、今後この方法により、S. pneumoniae の耐性化を検討することで、従来のエンピリックテラピーに頼ることなく迅速に適切な抗菌薬の選択が行える可能性が生まれ、迅速に S. pneumoniae 感染症の治療が開始できる可能性があると考えられる。

#### 文 献

- 1) 西岡きよ, 萩原央子, 大野 勲, 他: 呼吸器感染症起炎菌の動向と *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* 及び *Moraxella catarrhalis* の抗生物質感受性. *Jap J Antibiotics* 50: 768~775, 1997
- 2) 遠藤廣子, 末武光子, 入間田美保子, 他: 入院加療を必要とした乳幼児急性中耳炎, 下気道炎の検討. *日治療会誌* 47: 30~34, 1999
- 3) 杉田麟也, 市川銀一郎, 後藤重雄, 他: 急性中耳炎の起炎菌. *日耳鼻* 82: 568~573, 1979
- 4) 宇田川優子, 工藤典代, 中村 明, 他: 小児鼻, 副鼻腔炎の細菌学的検討. *小児耳* 17: 48~51, 1996
- 5) 杉田麟也: 中耳炎, 副鼻腔炎. *化学療法領域* 14: 1365~1374, 1998
- 6) Hansoman D, Bullen M M: A resistant pneumococcus. *Lancet* 2: 264~265, 1967
- 7) 小栗豊子, 小酒井望: 臨床材料から分離した肺炎球菌の血清型別と抗生物質感受性. *Jap J Antibiotics* 34: 95~105, 1981
- 8) 杉田麟也: ペニシリン中等度耐性肺炎球菌による難治性中耳炎の治療経験. *感染症* 19: 241~243, 1989
- 9) 杉田麟也, 深本克彦, 小栗豊子, 他: 1 歳未満の難治性急性中耳炎. *日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌* 8: 58~63, 1990
- 10) 宇野芳史: Penicillin 耐性肺炎球菌による小児急性中耳炎の臨床的, 細菌学的検討. *日治療会誌* 46: 396~403, 1998
- 11) 宇野芳史, 渡辺信介, 二木芳人, 他: 肺炎球菌による小児急性中耳炎の細菌学的, 疫学的臨床的検討. *日治療会誌* 47: 387~395, 1999
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically Forth edition, Approved standard M 7-A 4, NCCLS., Villanova, Pa., 1997
- 13) 末武光子: 耐性菌に対する対策. 処置. 変貌する急性中耳炎. (山中 昇 編), p. 131~136, 金原出版, 東京, 2000
- 14) 宇野芳史: Penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* による小児急性中耳炎の検討. 第 2 報: 鼓膜換気チューブ留置術による治療成績の検討. *感染症学雑誌* 74: 703~708, 2000
- 15) Ubukata K, Muraki T, Igarashi A, et al.: Identification of penicillin and Other Beta-Lactam Resistance in *Streptococcus pneumoniae* by Polymerase

- Chain Reaction. J infection Chemother 3: 190~197, 1997
- 16) 杉田麟也, 出口浩一, 藤巻 豊, 他: 小児急性化膿性中耳炎に対する Sultamicillin 顆粒の臨床効果と細菌学的検討. Chemotherapy 41: 1018~1026, 1993
- 17) 杉田麟也, 出口浩一, 木村 繁, 他: PC 低感受性肺炎球菌による小児急性中耳炎に対する Cefditoren pivoxil 粒剤の臨床効果と細菌学的検討. Jap J Antibiotics 49: 386~398, 1996
- 18) 宇野芳史: 1998~2000 年に小児急性中耳炎から検出された *Streptococcus pneumoniae* の抗菌薬感受性の変化. 日化療会誌 50: 854~869, 2002
- 19) 坂田 宏: 小児呼吸器感染症患者の上咽頭から分離された *Streptococcus pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* の検討. 小児感染免疫 14: 17~23, 2002
- 20) 生方公子, 小林玲子, 千葉葉穂子, 他: 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—肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ—. 日化療会誌 51: 60~70, 2003
- 21) 宇野芳史, 生方公子: PCR 法による小児急性中耳炎症例の上咽頭からの *Streptococcus pneumoniae* の検出—ペニシリン結合蛋白遺伝子の変異とマクロライド耐性遺伝子の検出について—. 日化療会誌 47: 701~711, 1999
- 22) 保富宗城, 山中 昇: ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) 感染症. 化学療法の領域 19: 1254~1263, 2003
- 23) 生方公子: 細菌検査法と中耳炎からの検出菌. 変貌する急性中耳炎. (山中 昇 編), p.53~68, 金原出版, 東京, 2000
- 24) 末武光子: 急性中耳炎病態の変貌. 変貌する急性中耳炎. (山中 昇 編), p.40~52, 金原出版, 東京, 2000
- 25) 伊藤真人, 白井明子, 巽亜希子, 他: 保育園児の鼻咽腔ペニシリン耐性肺炎球菌. 耳鼻臨床 92: 1071~1079, 1999
- 26) 市丸智浩: ある程度距離の離れた一次医療施設で分離された肺炎球菌の検討. 再検討が迫られる市中感染症—PRSP, BLNAR を中心に—第 2 報. Jap J Antibiotics 54 Suppl.B 110, 2001

### Surveillance based on molecular epidemiology for *Streptococcus pneumoniae* isolated from the nasopharynx in pediatric patients with acute otitis media

Yoshifumi Uno

UNO ENT Clinic, 3702-4 Tomihara, Okayama-shi Okayama, Japan

We surveyed the 418 clinical *Streptococcus pneumoniae* samples isolated from the nasopharynges of 300 infants and children with acute otitis media between April 2001 and December 2001 using PCR. We reviewed these samples for transmutation of penicillin-binding proteins and genetic transmission of macrolides tolerance. The genes reviewed were 1) *LytA* gene, 2) *pbp 1 a* gene, 3) *pbp 2 b* gene, 4) *pbp 2 x* gene, 5) *ermB* gene, and 6) *mefA* gene. The classification of detected *S. pneumoniae* was PSSP 34 strains (8.1%); *pbp 1 a*-independent variation 1 strain of PISP 147 strains (35.2%); *pbp 2 b*-independent transmutation 4 strains; *pbp 2 x*-independent transmutation 73 strains; *pbp 1 a* + *pbp 2 b*-transmutation 0 strains; *pbp 1 a* + *pbp 2 x*-transmutation 44 strains; *pbp 2 b* + *pbp 2 x*-transmutation 25 strains; and PRSP 237 strains (56.7%). According to the macrolides tolerance gene, 143 of (35%) 418 strains (35%) demonstrated the *ermB* gene, 131 strains (31%) demonstrated the *mefA* gene-independent containment stock, both genes were found in 13 strains (3%), and 131 strains (31%) did not maintain a macrolides tolerance gene. With regard to *pbp* gene variation and eruption of a macrolides tolerance gene, the macrolides tolerance genetic detection coefficient increased to 81.0% in PRSP and 61.2% in PISP. However, we could not recognize macrolides tolerance 14.4% in PSSP. In relation to age, the rate of the tolerance, combining PISP and PRSP together, was more than 80% in all age groups. In addition, the only *pbp 2 x* independent variant that has become a problem in Japan consisted of 73 of 147 PISP strains (49.7%), comprising 17.5% of 418 strains. These findings suggested that rapid identification of PSSP, PISP and PRSP, or macrolides-tolerance *S. pneumoniae* is possible and very useful for the survey and treatment of acute otitis media in infants and children.