

【原著・基礎】

小児急性中耳炎症例の鼻咽腔から検出された *Haemophilus influenzae* 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 10 月 28 日受付・平成 16 年 2 月 12 日受理)

2001 年 10 月から 12 月までの 3 か月間に当院で治療した小児急性中耳炎症例 190 例から鼻咽腔から検出された *Haemophilus influenzae* 267 株について polymerase chain reaction (以下 PCR) 法を用いて penicillin binding protein (以下 pbp) の変異および TEM-1 型不活性化酵素を支配する遺伝子の部分について検討を行った。検討を行った遺伝子は、①TEM-1 型遺伝子、②pbp 3-1 遺伝子、③pbp 3-2 遺伝子である。検出された *H. influenzae* の内訳は、 β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible *Haemophilus influenzae* (以下 BLNAS) 162 株 (60.8%)、 β -lactamase-nonproducing and low-level ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (以下 low-BLNAR) 27 株 (10.1%)、 β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (以下 BLNAR) 39 株 (14.6%)、 β -lactamase-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (以下 BLPAR) 23 株 (8.6%)、 β -lactamase-producing and low-level amoxicillin-clavulanate resistant *Haemophilus influenzae*, possessing TEM-1 and low-BLNAR resistant genes (以下 BLPACR-I) 10 株 (3.7%)、 β -lactamase-producing amoxicillin-clavulanate resistant *Haemophilus influenzae*, possessing TEM-1 and BLNAR resistant genes (以下 BLPACR-II) 6 株 (2.2%)、年齢との関係では、各年齢とも感受性株である BLNAS が検出株の過半数を占めていた。耐性株において BLNAR は、1 歳代、4 歳代、5 歳代で検出数が多く、low-BLNAR は 2 歳代をピークに 1 峰性の分布を認めた。BLPAR は 2 歳代および 1 歳代をピークに 1 峰性の分布を認めた。BLPACR-I および BLPACR-II は 3 歳代以下に多く認められ、BLPACR-I は 1 歳代に BLPACR-II は 2 歳代にピークを認めた。しかしながら、7 歳以上の症例では、TEM-1 型遺伝子および pbp 遺伝子の変異を認めた症例は見られなかった。また検出株に対する耐性株の割合は 1 歳と 4 歳にピークをもつ 2 峰性の分布を示していた。*Streptococcus pneumoniae* と異なり低年齢においても、感受性株の割合がまだ 50% 以上を占めていたが、今後耐性株の割合が *S. pneumoniae* のように増加することも考えられるため、注意深く観察を要するものと考えられた。また、従来 MIC 値の測定よりより短時間で結果が得られるため、耐性株の検出においては、PCR 法を用いた検討は有効であると考えられた。

Key words: *Haemophilus influenzae*, infantile acute otitis media, PBP mutation, TEM-1 type β -lactamase gene

Haemophilus influenzae は、*Streptococcus pneumoniae* 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¹⁻⁴⁾、また、一方、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⁵⁾。しかしながら、近年 *S. pneumoniae* と同様、penicillin を含む β -ラクタム系抗菌薬に対する感受性が低下した *H. influenzae* が急速に増加してきている。

従来本邦において問題となっていた *H. influenzae* の耐性菌は β -lactamase 産生によるものであり、 β -lactamase-producing ampicillin-resistance *H. influenzae*、(以下

BLPAR)⁶⁻¹⁰⁾であったが、最近それとは別の耐性機構をもつ *H. influenzae* (β -lactamase-negative ampicillin-resistance *H. influenzae*, 以下 BLNAR) の分離検出頻度の増加がいられている¹¹⁻¹⁴⁾。

従来、*H. influenzae* 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米国臨床検査標準委員会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 以下 NCCLS) の勧告にしたがい、感受性、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

*岡山県岡山市富原 3702-4

鼓膜換気チューブ留置術を施行しなければならない症例が増加してきている^{5,15)}。

近年、遺伝子工学の進歩により、polymerase chain reaction (以下 PCR) 法を用いて、*H. influenzae* 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。特に BLNAR においては、ペニシリン結合蛋白(以下 PBP)の PBP-3 をコードする遺伝子の変異により耐性を示すことが明らかになっている¹⁶⁾。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 *H. influenzae* 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10月から12月までの3か月間に当院で治療した小児急性中耳炎症例190例の鼻咽腔から検出された267株である。治療方法は、症例の重症度により、鼓膜切開術などの外科的治療を併用した症例もあるが、多くの症例および検出株を検討するため、急性中耳炎の貯留液と92%で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104例、女児86例であり、全体では2歳代にそのピークがその次に1歳代の症例が多く認められ、男女別では、男児は1歳代から2歳代にかけていちばん大きなピークが認められ、4歳代から5歳代にかけて2番目のピークが認められた。女児では、2歳代にいちばん大きなピークが認められ、5歳代に2番目のピークが認められた (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。*H. influenzae* 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 *H. influenzae* は、明治製菓中央研究所にて、Ubukata ら¹⁶⁾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。すなわち *H. influenzae* の確認には、細胞外膜蛋白である P6 遺伝子の部分を検出するプライマーを用い、PBP 遺伝子の検出には、pbp 3-1 と pbp 3-2 の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。また、従来の耐性機構である β -lactamase 産生については、TEM-1 型不活性化酵素を支配する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。今回は、K-B 法を用いて *H. influenzae* の薬剤感受性を検討し、MIC 測定を行っていないため、薬剤感受性の詳細な検討は行わなかった。

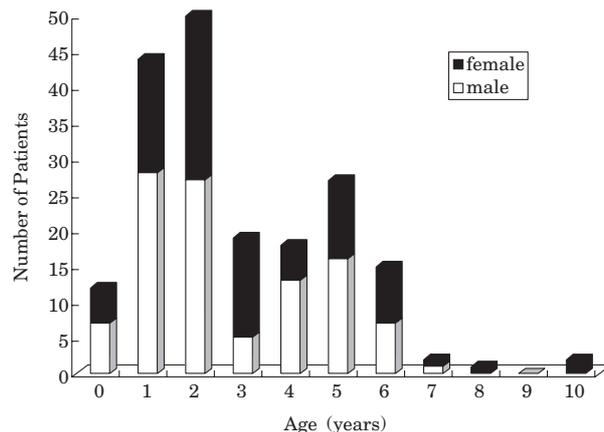


Fig. 1. Age and gender distribution of patients with acute otitis media caused by *Haemophilus influenzae*.

3. TEM-1 型遺伝子および PBP 遺伝子と耐性化の分類

以上の TEM-1 型遺伝子および pbp 遺伝子解析結果にもとづき、検出された *H. influenzae* を以下のように分類した。①いずれの耐性遺伝子も有しない株 (BLNAS), ②TEM-1 型 β -lactamase 産生株 (BLPAR), ③ β -lactamase を産生せず pbp 3-1 遺伝子の変異のみを認める株 (low-BLNAR), ④ β -lactamase を産生せず pbp 3-1 および pbp 3-2 遺伝子の変異を認める株 (BLNAR), ⑤ β -lactamase を産生しかつ pbp 3-1 遺伝子の変異のみを認める株 (BLPACR-I), ⑥ β -lactamase を産生しかつ pbp 3-1 および pbp 3-2 遺伝子の変異を認める株 (BLPACR-II) である。

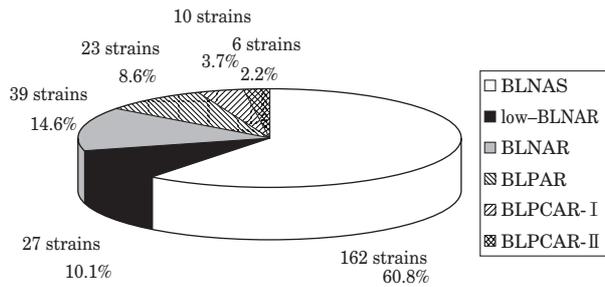
II. 結果

1. 症例全体での遺伝子解析の結果

今回検討した株 267 株全体では、BLNAS 162 株 (60.8%), low-BLNAR 27 株 (10.1%), BLNAR 39 株 (14.6%), BLPAR 23 株 (8.6%), BLPACR-I 10 株 (3.7%), BLPACR-II 6 株 (2.2%) であった (Fig. 2)。

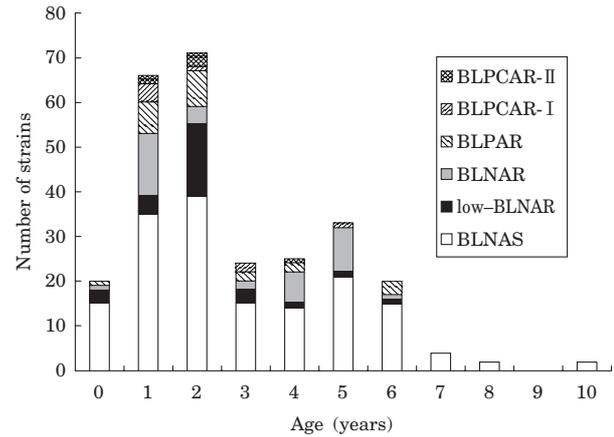
2. 各年齢における遺伝子解析の結果

各年齢の TEM-1 型遺伝子および pbp 遺伝子解析結果について Fig. 3 に示す。各年齢とも、以前に報告した penicillin-intermediate resistant *S. pneumoniae* (以下 PISP), penicillin-resistant *S. pneumoniae* (以下 PRSP) が過半数を占めていた *S. pneumoniae* と異なり感受性株である BLNAS が検出株の過半数を占めていた。年齢ごとに TEM-1 型遺伝子および pbp 遺伝子の変異を見てみると、BLNAR は、1 歳代、4 歳代、5 歳代で検出数が多く、low-BLNAR は 2 歳代をピークに 1 峰性の分布を認めた。BLPAR は 2 歳代および 1 歳代をピークに 1 峰性の分布を認めた。BLPACR-I および BLPACR-II は 3 歳代以下に多く認められ、BLPACR-I は 1 歳代に BLPACR-II は 2 歳代にピークを認めた。しかしながら、7 歳以上の症例では、TEM-1 型遺伝子および pbp 遺伝子の変異を認めた症例は見られなかつ



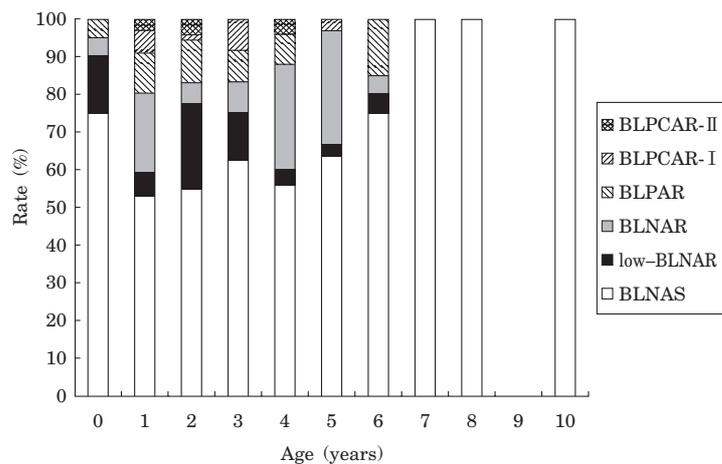
BLNAS: β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible *Haemophilus influenzae*
 low-BLNAR: β -lactamase-nonproducing and low-level ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*
 BLNAR: β -lactamase-nonproducing and ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*
 BLPAR: TEM-1 type β -lactamase-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*
 BLPCAR-I: β -lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*
 (possessing TEM-1 and low-BLNAR resistance genes)
 BLPCAR-II: β -lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*
 (possessing TEM-1 and BLNAR resistant genes)

Fig. 2. Distribution of *Haemophilus influenzae* according to penicillin binding protein gene mutations and TEM-1 type β -lactamase gene.



BLNAS: β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible *Haemophilus influenzae*
 low-BLNAR: β -lactamase-nonproducing and low-level ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*
 BLNAR: β -lactamase-nonproducing and ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*
 BLPAR: TEM-1 type β -lactamase-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*
 BLPCAR-I: β -lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*
 (possessing TEM-1 and low-BLNAR resistance genes)
 BLPCAR-II: β -lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*
 (possessing TEM-1 and BLNAR resistant genes)

Fig. 3. Frequency of isolation of *Haemophilus influenzae* according patient age. The isolates were classified into 6 types based on the PCR results for pbp 3-1, pbp 3-2, and TEM-1 type β -lactamase gene.



BLNAS: β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible *Haemophilus influenzae*
 low-BLNAR: β -lactamase-nonproducing and low-level ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*
 BLNAR: β -lactamase-nonproducing and ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*
 BLPAR: TEM-1 type β -lactamase-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*
 BLPCAR-I: β -lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*
 (possessing TEM-1 and low-BLNAR resistance genes)
 BLPCAR-II: β -lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*
 (possessing TEM-1 and BLNAR resistant genes)

Fig. 4. Rate of isolation frequency of *Haemophilus influenzae* according to patient age. The isolates were classified into 6 types based on the PCR results for pbp 3-1, pbp 3-2, and TEM-1 type β -lactamase gene.

た (Fig. 3)。以上の結果を実際の検出の検出株数ではなく、耐性株の割合がわかりやすいように年齢ごとに示したのが Fig. 4 である。耐性株全体でみると、1歳代と4歳代にピークをもつ2峰性の分布を示していた。

TEM-1型遺伝子およびpbp遺伝子の変異ごとに見てみると、BLNARは、1歳代、4歳代および5歳代に多く認められ、その検出頻度はそれぞれ21.2%、28.0%、30.0%であった。low-BLNARは、0歳代、2歳代および3

歳代に多く認められ、その検出頻度はそれぞれ 15.5%、22.5%、12.5% であった。BLPAR は、耐性株が認められた年齢のなかでは、5 歳代以外ではほぼ大差なく認められ、その検出頻度は、5% から 15% であった。BLPACR-I および BLPACR-II は他の耐性株と比較するとその検出頻度は低かったが、BLPACR-I は 1 歳代と 3 歳代に比較的多く認められ、その検出頻度はそれぞれ 6.1% と 8.3% であった。BLPACR-II が検出されたのは、1 歳代、2 歳代と 4 歳代のみであり、その検出頻度はそれぞれ 3.0%、4.2%、4.0% であった (Fig. 4)。

III. 考 察

従来、*H. influenzae* の耐性については、*S. pneumoniae* の耐性が、NCCLS の判定基準にしたがい判定されるのとは異なり、BLNAR の定義は本邦では ampicillin (ABPC) に対する MIC 値が 1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であるのに対し、欧米では ABPC に対する MIC 値が 2~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と差があり、また通常用いられているディスク法による薬剤感受性検査では、ABPC に中等度耐性を示す BLNAR は感受性と判断されるなど問題が多いといわれている。今回検討した PCR 法による遺伝子変異を検討した結果と pbp3 遺伝子に変異を示す *H. influenzae* の ABPC に対する MIC 値は、0.5~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、BLNAR に相当する MIC 値に分布するといわれている¹⁷⁾。

従来の MIC 値にもとづいた分類によると、当院で以前に検討した結果¹⁵⁾では、BLNAS 57.9%、BLNAR 27.2%、BLPAR 14.9% であった。また、渡邊ら¹⁸⁾は、BLNAS 84.3%、BLNAR 2.2%、BLPAR 12.4%、BLPCAR 1.1% と報告している。耳鼻咽喉科領域の全国サーベイランス¹⁹⁾では、急性中耳炎症例では、BLNAS 62.0%、BLNAR 30.0%、BLPAR 8.0%、急性副鼻腔炎では、BLNAS 74.0%、BLNAR 22.0%、BLPAR 4.0% と報告されている。最近では小児科領域で坂田²⁰⁾が、BLNAS 40.0%、BLNAR 56.0%、BLPAR 3.3%、BLPCAR 0.7% と報告している。また、今回検討した PCR 法による方法での結果では、BLNAS 60.8%、low-BLNAR と BLNAR を合わせたものが、24.7%、BLPAR 8.6%、BLPACR-I と BLPACR-II を合わせたものが、5.9% であった。今回の検討と同様の方法で検討した報告では、生方ら²¹⁾が、1998 年から 2000 年の間に分離された株について詳細に報告しているが、BLNAS 58.7%、BLPAR 5.8%、low-BLNAR 25.0%、BLNAR 7.7%、BLPACR-I 2.6%、BLPACR-II 0.3% と報告している。以上のように、*S. pneumoniae* の耐性と異なり、報告によって、耐性の程度にかなり差が見られた。特に、E-test を用いて検討を行った坂田の報告²⁰⁾で耐性の程度が飛び抜けて高かったが、その原因のひとつとして、対象症例の 2/3 以上が入院症例であり、難治症例であったため、また、対象症例が、1 歳をピークとした小児が中心であるため

と考えられた。しかし、他の報告^{15, 18, 19, 22)}では、耐性の程度は、MIC 値、PCR 法とも 25% から 35% の間であり、*S. pneumoniae* の耐性と異なり MIC 値と PCR 法の間で、耐性の程度には大きな乖離は認められなかった。

年齢別の耐性の程度について検討では、*S. pneumoniae* ほど明らかな傾向は認められなかった。しかし、検出の割合いってみると、BLNAR、BLPAR、BLPCAR をまとめた耐性株の検出頻度は、1 歳代をピークとする一峰性の分布を示していた。また、BLNAR に関しては、4 歳代、5 歳代といった比較的年齢の高い部分での検出頻度が高かったが、BLPAR に関しては 1 歳代、2 歳代と 6 歳代で検出頻度が高かった。*S. pneumoniae* と異なり *H. influenzae* においては、年齢別の耐性の頻度について検討を行った報告は少ない。しかし、今回の結果は以前に当院で検討した結果¹⁵⁾と比較すると、BLNAR、BLPAR とも今回の結果と比較的よく似た結果を示していた。また、小児科領域では、坂田の報告^{20, 22)}がある。1998 年 7 月から 2001 年 6 月まで²²⁾と、2002 年 8 月から 2003 年 3 月まで²⁰⁾の 2 回にわたって検討を行っているが、はじめの検討では、低年齢ほど、BLNAR、BLPAR の検出の割合が高かったとしている。しかし、後の検討においては、BLNAS、low-BLNAR、BLNAR と耐性化が進むにつれ、年齢が高くなると報告しており、その原因として、BLNAR が市中に広がる要因のひとつに保育施設での交差感染があり、通園している可能性の低い 0 歳児の割合が、BLNAS、軽度 BLNAR、BLNAR と低くなっており、そのことが逆に耐性化が進むにつれ年齢が高くなった一因と考えられるとしている。このように *H. influenzae* においては、低年齢ほど耐性化が進んでいた *S. pneumoniae* と異なり、ひとつの施設においても検討年度によって耐性化の傾向が異なっており、今後の検討要因のひとつであると考えられた。

今回行った PCR 法を用いた PBP 3-1、PBP 3-2 遺伝子の変異および TEM-1 型遺伝子の検出は、従来の MIC 測定と比較すると短時間で判定可能である。しかし、生方ら²¹⁾によると、*S. pneumoniae* と異なり、*H. influenzae* においては BLNAS、low-BLNAR、BLNAR においては、その MIC range は広く、また、low-BLNAR、BLNAR においては両者を明確に区別することは困難な場合もあるといわれている。そのため、*S. pneumoniae* と異なり、 β -ラクタム系抗菌薬に対する MIC を推測するのはいまのところ難しいのではないかと考えられた。したがって、今後は、PCR 法と従来の MIC 測定とを行い、その相関について症例を増やし検討を行い、将来的には *S. pneumoniae* と同じく PBP 遺伝子の変異状況により、おおよそ β -ラクタム系抗菌薬に対する MIC が推測可能になれば、PCR 法により *H. influenzae* の耐性化を検討することで、従来のエンピリックセ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 *H. influenzae* 感染症の治療が開始できる可能性があると考えられた。

文 献

- 1) 小林 裕, 春田恒和, 森川嘉郎, 他: 本邦 27 施設における 1981 年以降 14 年間の小児化膿性髄膜炎の起炎菌の動向。感染症誌 71: 1017~1024, 1997
- 2) 上原すず子, 中村 明, 鈴木 宏, 他: 千葉県における小児インフルエンザ菌感染症の実態 (1985-1991) —罹患率を中心に—。日本小児科学会雑誌 97: 2330~2331, 1993
- 3) 林 泉, 関根今生, 一木昌郎: 最新の化学療法。インフルエンザ菌—内科領域。臨床と微生物 21: 58~60, 1994
- 4) 黒崎知道: 耐性菌感染症とその緊急具体策。インフルエンザ菌。化学療法の領域 16(S-2): 66~73, 2000
- 5) 末武光子: 急性中耳炎。化学療法の領域 16: 1655~1661, 2000
- 6) Thomas W J, McReynolds J W, Mock C R, et al.: Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* meningitis. *Lancet* (i): 313, 1974
- 7) Gunn B A, Woodall J B, Jones J F, et al.: Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Lancet* (ii): 313, 1974
- 8) Tomeh M O, Starr S E, McGowan J E, et al.: Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b infection. *Journal of the American Medical Association* 229: 295~297, 1974
- 9) Khan W, Ross S, Rodriguez W, et al.: *Haemophilus influenzae* type b resistant to ampicillin. *Journal of the American Medical Association* 229: 298~301, 1974
- 10) 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
- 11) 小栗豊子, 三澤成毅, 中村文子, 他: インフルエンザ菌の薬剤感受性—年次推移を中心に—。化学療法の領域 14: 1147~1156, 1998
- 12) Markowitz S M: Isolation of an ampicillin-resistant, non- β -lactamase producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents and Chemother* 17: 302~306, 1980
- 13) Rubin L G, Medeiros A A, Yolken R H, et al.: Ampicillin treatment failure of apparently β -lactamase-negative *Haemophilus influenzae* type b meningitis due to novel β -lactamase. *Lancet* Nov 7: 1008~1010, 1981
- 14) Jones R N, Jacobs M R, Washington J A, et al.: 1994-95 survey of *Haemophilus influenzae* susceptibility to ten orally administered agents. A 187 clinical laboratory center sample in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 27: 75~83, 1997
- 15) 宇野芳史: 小児急性中耳炎症例より検出された *Haemophilus influenzae* の細菌学的, 疫学的, 臨床的検討。日化療会誌 49: 355~362, 2001
- 16) 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
- 17) 山中 昇, 保富宗城: 難治化する急性中耳炎—難治化の要因とその対策—。感染症学雑誌 77: 595~605, 2003
- 18) 渡邊信介, 二木芳人, 玉田貞雄, 他: 臨床分離 *Haemophilus influenzae* の薬剤感受性に関する検討。日化療会誌 48: 333~340, 2000
- 19) 鈴木賢二: 感染症臨床分離菌全国サーベイランス結果報告。Jpn J Antibiotics 54(Suppl.B): 39~41, 2001
- 20) 坂田 宏: 小児の呼吸器感染症患者から分離された *Haemophilus influenzae* の注射用抗菌薬に対する薬剤感受性。日化療会誌 51: 569~573, 2003
- 21) 生方公子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 他: 本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Haemophilus influenzae* の分子疫学的解析—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 50: 794~804, 2002
- 22) 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

Surveillance based on molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx of pediatric acute otitis media patients

Yoshifumi Uno

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

We used PCR to survey 247 clinical *Haemophilus influenzae* isolates from the nasopharynx of 190 infants and children with acute otitis media between October 2001 and December 2001 and reviewed the isolates for transmutation of penicillin-binding proteins and the TEM-1 type β -lactamase gene. The genes that we reviewed were ①the TEM-1 type β -lactamase gene, ②the pbp 3-1 gene, and, ③the pbp 3-2 gene. The *H. influenzae* detected consisted of 162 BLNAS strains (60.0%), 27 low-BLNAR strains (10.0%), 39 BLNAR strains (15.0%), 23 BLPAR strains (9.0%), 10 BLPACR-I strains (4.0%), and 6 BLPACR-II strains (2.0%). The majority of strains isolated showed age-related peaks. BLNAS or sensitive strains were detected in every age group; low-BLNAR peaked at 2 years; and BLNAR yielded multiple peaks, at 1, 4, and 5 years. The BLPAR peak was distributed between 1 and 2 years. BLPACR-I and BLPACR-II were frequently detected in children under than 3 years and peaked at 2 years and 1 year, respectively. However, no TEM-1 type gene or pbp genetic variations were detected in children aged 7 years and older. In addition, the percentage of tolerant strains among those isolated peaked at 2 years, 1 year, and 4 years of age. Findings differed for *Streptococcus pneumoniae*, and at young ages, the ratio of sensitive strains still accounted for more than 50%, but careful monitoring is needed, because the ratio of tolerant *S. pneumoniae* strains seemed to be increasing. The PCR method was used to determine the tolerance of these strain, because the results the provided more information in a shorter time than measurement of conventional MIC values.