

インフルエンザ菌のペニシリン結合蛋白3変異と β ラクタム系薬のクラスタリング

三本木祐美子¹⁾・大崎 有美¹⁾・前田久美子¹⁾・鈴木 貴久¹⁾
片岡 裕史¹⁾・井田 孝志¹⁾・石川みどり²⁾・生方 公子³⁾

¹⁾明治製菓株式会社創薬研究部門*, ²⁾同 薬品東京支店

³⁾北里大学生命科学研究所感染情報学

(平成16年9月17日受付・平成17年1月5日受理)

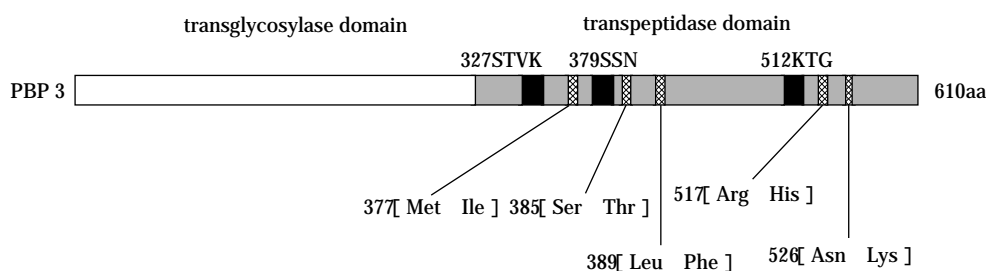
インフルエンザ菌に対する各 β ラクタム系薬の抗菌力および耐性化の影響に関する特徴とその位置づけを明らかにすることを目的に,その耐性機序に基づいた β ラクタム系薬の抗菌プロファイルをクラスタリングの手法を用いて解析した。2000~2001年に分離された215株を,耐性に関与するpenicillin-binding protein(PBP)3にみられる5箇所のアミノ酸変異(377[Met Ile],385[Ser Thr],389[Leu Phe],517[Arg His],526[Asn Lys])パターンにより6群に分類し,また,それぞれの菌株に対するMICを β ラクタム系薬:24薬剤について測定した。各群におけるMIC幾何平均値によるクラスター分析では,抗菌力の強さが主に反映され,比較的強い抗菌力を有するmeropenem,tazobactam/piperacillin,cefditoren(CDTR)等が同一のクラスターに分類された。また,各群における各薬剤のMIC上昇率によるクラスター分析では,おおむねカルバペネム系,ペニシリン系,セフェム系といった母核ごとに大きなクラスターに分類された。しかしながら,セフェム系薬は7位側鎖の構造の違いがクラスタリングに反映され,cefazolin,ceftazidimeは他の多くのセフェム系薬と異なるクラスターに分類された。また,CDTRは7位にaminothiazole基を有するにもかかわらず,やはり他とは異なるクラスターに分類され,それは本薬がPBP3のアミノ酸変異の影響を受けにくい特性を有しているためと考えられた。今回試みた薬剤のクラスタリングはインフルエンザ菌に対する抗菌力の強さと耐性化の影響の両者が反映されており,さらにその薬剤の類似性を数値距離として示すことができた。

Key words: *Haemophilus influenzae*, penicillin-binding protein 3, β -lactam, clustering

インフルエンザ菌は,市中呼吸器感染症の主要起因菌の一つであり,肺炎のみならず中耳炎や化膿性髄膜炎の起因菌としても重要視されている¹⁻³⁾。本菌は,近年薬剤耐性化が進み,特に小児科領域および耳鼻科領域において治療上大きな問題となっている⁴⁻⁶⁾。インフルエンザ菌の β ラクタム系薬耐性メカニズムは,不活化酵素である β -lactamaseの産生または標的蛋白質の一つであるpenicillin-binding protein(PBP)3の変異による親和性の低下であることが明らかになっている⁷⁻⁹⁾。そのうち本邦では,後者の機序による耐性菌が増加傾向にあり^{6,10,11)},これらは β -lactamase非産生ampicillin耐性(BLNAR)インフルエンザ菌と呼ばれている。インフルエンザ菌のPBP3は,*ftsI*遺伝子によりコードされ,そのトランスペプチダーゼ領域中の保存性アミノ酸配列,Ser-Ser-Asn(SSN)モチーフおよびLys-Thr-Gly(KTG)モチーフ近傍に変異が生じることにより, β ラクタム系薬に耐性を示すことが知られている(Fig.1⁹⁾)。一方,耐性菌の増加に伴い抗菌薬の適正使

用の必要性が問われているが,治療薬の選択は抗菌力の強さで判断されることが多く,薬剤の耐性化まで考慮されることはほとんどない。また,抗菌薬は開発時に多くの基礎・臨床試験からそれぞれの位置づけが明確にされているが,近年の急速な耐性菌の増加により,その再評価が必要である。

これまで抗菌薬は,臨床分離株に対する抗菌力の強さをもって評価されることが多く,その場合,薬剤間の順位づけは可能であっても,個々の特性が反映された位置づけをみることは困難であった。多変量解析の一つであるクラスター分析は,ある指標における個々の類似性の高さを樹形図によって表現することが可能であるため,各薬剤の抗菌プロファイルの類似性やそれらの位置づけを評価するのに有効な手段と考えられる。そこで,今回われわれは,PBP3変異の違いによりインフルエンザ菌に対する各種 β ラクタム系薬のMICがどのように変化するのかを調べ,クラスター分析により β ラクタム系薬がどのように分類され,また,それぞれがどのような



Group	Deduced amino acid mutations					No. of isolates	(%)
	377 Met	385 Ser	389 Leu	517 Arg	526 Asn		
I	109	50.7
II	Ile	3	1.4
	.	Thr	.	.	.	2	0.9
III	Lys	42	19.5
	Ile	.	.	.	Lys	1	0.5
IV	.	Thr	.	.	Lys	5	2.3
	Ile	Thr	Phe	.	Lys	18	8.4
V	.	.	.	His	.	28	13.0
	.	Thr	.	His	.	1	0.5
VI	Ile	Thr	.	His	.	5	2.3
	Ile	Thr	Phe	His	.	1	0.5

Fig. 1. Schematic representation of PBP 3 and classification of *H. influenzae* isolates based on deduced amino acid mutations on PBP 3. Black bands represent the conserved amino acid motifs of Ser-Thr-Val-Lys (STVK), Ser-Ser-Asn (SSN), and Lys-Thr-Gly (KTG). Amino acid mutations at position 377, 385, 389, 517 and 526 in the transpeptidase domain are indicated below.

特性をもって位置づけられるのかを考察した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

2000～2001年に日本国内各地の65施設より分離、収集されたBLNARを含む臨床由来インフルエンザ菌のうち、 β -lactamase産生菌を除く215株を使用した。 β -lactamase産生の有無は、日水製薬(東京)のP/C aseテストにて確認した。

2. 使用抗菌薬

感受性測定薬剤は、benzylpenicillin (PCG), ampicillin (ABPC), sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC), amoxicillin (AMPC), clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC), tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC), cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cefotaxime (CTX), cefaclor (CCL), cefpodoxime (CPDX), ceftazidime (CAZ), ceftazidime/ceftiofur (CTZ/CTF), cefdinir (CFDN), cefcapene (CFPN), aztreonam (AZT), flomoxef (FMOX), imipenem (IPM), meropenem (MEPM), panipenem (PAPM), biapenem (BIPM), faropenem (FRPM)を使用した。

3. 最小発育阻止濃度の測定

最小発育阻止濃度 (MIC) は、NCCLSの標準 M7-A5¹²⁾ に準じて微量液体希釈法により測定した。感受性測定培地は栄研化学より受注生産されたフローズプレートを購入した。

4. *ftsI* 遺伝子の DNA 塩基配列の決定

PBP 3 (*ftsI*) 遺伝子の解析は、ゲノム DNA を鋳型に PCR primer set (sense primer: 5'-CTCGTTATCCGTTACA GCAG-3', anti-sense primer: 5'-GCCAAACCGTGTGAT GAAAC-3')を用いて増幅した。この増幅断片をシーケンシングし、各シーケンスをアセンブルすることにより、全長の配列を決定した。PBP 3 上の推定アミノ酸変異は全ゲノム配列が解析されている Rd 株 (ATCC 51907) のそれと比較した¹³⁾。 β ラクタム薬感受性に影響を及ぼすと考えられる5箇所のアミノ酸置換 377 [Met Ile], 385 [Ser Thr], 389 [Leu Phe], 517 [Arg His], 526 [Asn Lys] 以下, M377I, S385T, L389F, R517H, N526K とする)のパターンから菌株を6群に分類した。このうち、5箇所のいずれにもアミノ酸変異が認められない菌群を I 群、変異を有する他の各群を II～VI 群とした。

Table 1. Antibacterial activity of β -lactam agents for *H. influenzae* isolates with deduced amino acid mutations on PBP 3

Drug *	Geometric mean of MIC ($\mu\text{g/mL}$) for group:					
	I (109)**	II (5)	III (42)	IV (24)	V (28)	VI (7)
PCG	0.41	0.57	3.3	11	1.1	3.0
ABPC	0.24	0.22	1.4	4.6	0.67	1.6
SBT/ABPC	0.31	0.25	1.8	5.7	0.86	2.2
AMPC	0.51	0.50	3.4	16	1.4	3.0
CVA/AMPC	0.50	0.44	3.2	15	1.5	3.3
TAZ/PIPC	0.026	0.041	0.064	0.13	0.082	0.14
CEZ	8.1	4.6	31	290	24	18
CTM	0.91	1.1	5.9	57	2.1	14
CTX	0.016	0.0090	0.072	0.75	0.046	0.25
CTRX	0.0051	0.0030	0.018	0.19	0.014	0.076
CAZ	0.11	0.083	0.13	0.39	0.43	0.82
CZOP	0.14	0.095	0.83	11	0.49	3.6
FMOX	1.0	0.87	5.6	15	1.6	4.0
AZT	0.11	0.062	0.15	1.5	0.51	2.0
CCL	2.7	2.3	20	88	14	32
CFDN	0.32	0.29	1.2	10	1.2	4.9
CPDX	0.081	0.11	0.31	5.7	0.26	1.8
CFPN	0.021	0.020	0.11	2.4	0.059	0.50
CDTR	0.017	0.015	0.043	0.22	0.044	0.084
IPM	0.58	0.38	1.8	2.7	0.50	0.50
PAPM	0.35	0.29	1.5	2.4	0.40	0.45
MEPM	0.054	0.055	0.20	0.30	0.063	0.076
BIPM	0.70	0.58	4.5	9.3	1.3	1.3
FRPM	0.52	0.50	2.7	6.2	1.4	2.2

* PCG, benzylpenicillin; ABPC, ampicillin; SBT/ABPC, sulbactam/ampicillin; AMPC, amoxicillin; CVA/AMPC, clavulanic acid/amoxicillin; TAZ/PIPC, tazobactam/piperacillin; CEZ, cefazolin; CTM, cefotiam; CTX, cefotaxime; CTRX, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; CZOP, ceftazopran; FMOX, flomoxef; AZT, aztreonam; CCL, cefaclor; CFDN, cefdinir; CPDX, cefpodoxime; CFPN, cefcapene; CDTR, cefditoren; IPM, imipenem; PAPM, panipenem; MEPM, meropenem; BIPM, biapenem; FRPM, faropenem.

** No. of strains.

5. クラスタリングの方法

解析方法として、多変量解析の一つであるクラスター分析を用いた¹⁴⁾。クラスター分析は、各個体(薬剤)間の差を定義できるデータをもとに、類似性の高いものは同じまとまり(クラスター)に、低いものは異なるまとまりに分類し、個体全体を樹形図として表現する方法である。解析のアルゴリズムは、クラスター併合時に属するサンプル群の重心を新しい代表点として用いる重心法(UPGMC: unweighted pair group method using centroid average)を用いた¹⁵⁾。今回、各 β ラクタム系薬の差を定義できるデータ(変数)として次の2通りの解析値を採用し、クラスター分析を行った。解析はJAVAで作製したオリジナルのプログラムを用いた。

①それぞれの β ラクタム系薬について上記6群に対するMIC幾何(相乗)平均値を変数とし、クラスター分析を行った。クラスター間の距離はユークリッド距離により算出した。

②上記6群のうち、I群のMIC幾何平均値によりII~VI群のMIC幾何平均値を除算し、それぞれのMIC上昇

率を得た。PBP3変異パターンの異なる各菌株群に対するMIC上昇率は、各薬剤間で大きく異なる場合がある。そのような薬剤をMIC上昇率の大小ではなく、各菌株群に対するMIC上昇パターンに注目してクラスター分析するために、以下のような補正值を用いて、各薬剤のII~VI群におけるMIC上昇率に乗算したものを変数として、クラスター間のユークリッド距離を算出した。

$$\text{補正值} = \sqrt{\frac{K}{\sin\left(\frac{\pi}{n}\right) \times \sum_{i=1}^n \left\{ \log\left(\frac{x_i}{L}\right) \right\}}}$$

n : 菌株群数

x_i : 各MIC上昇率

* $K = 10^7$ ** $L = 10^{-3}$ (定数: MIC上昇率から得られる面積を補正するための任意の値)

この補正により、PBP3変異によるMIC上昇率の大小(量的変化)よりもそのパターン(質的变化)を薬剤のクラスタリングに強く反映させることができる。

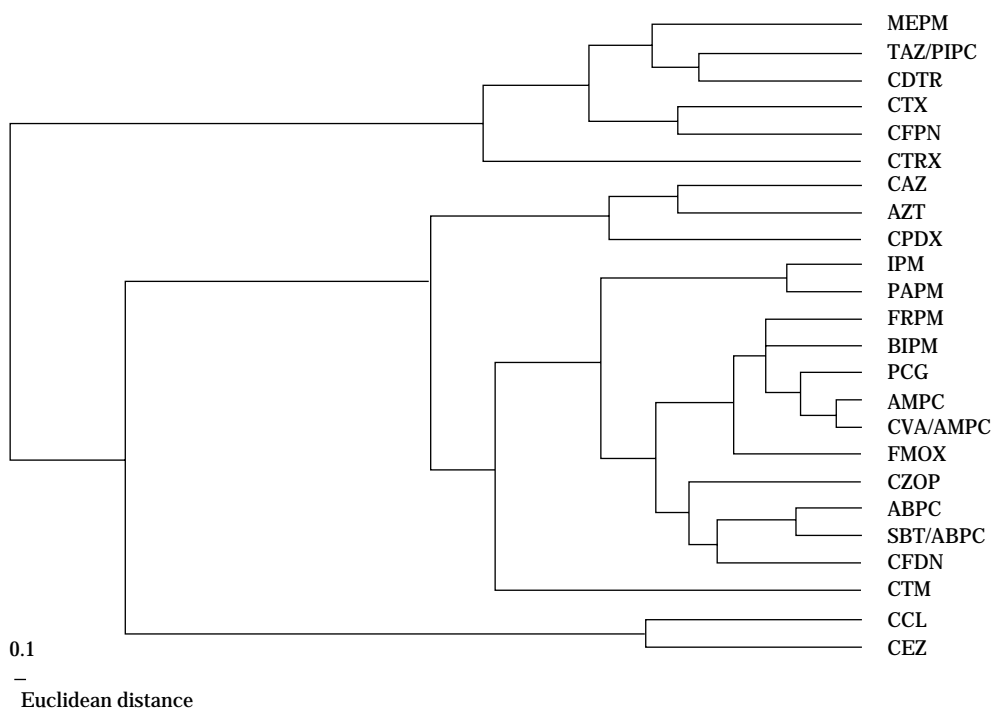


Fig. 2. Dendrogram based on UPGMC (unweighted pair group method using centroid average) cluster analysis of β -lactam agents. Geometric means of MICs for each β -lactam agent for 6 groups of *H. influenzae* isolates classified by amino acid mutations on PBP 3 were used as variables.

MEPM, meropenem; TAZ/PIPC, tazobactam/piperacillin; CDTR, ceftidoren; CTX, cefotaxime; CFPN, cefcapene; CTRX, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; AZT, aztreonam; CPDX, cefpodoxime; IPM, imipenem; PAMP, panipenem; FRPM, faropenem; BIPM, biapenem; PCG, benzylpenicillin; AMPC, amoxicillin; CVA/AMPC, clavulanic acid/amoxicillin; FMOX, flomoxef; CZOP, ceftazopran; ABPC, ampicillin; SBT/ABPC, sulbactam/ampicillin; CFDN, ceftinir; CTM, cefotiam; CCL, cefaclor; CEZ, ceftazolin.

II. 結 果

1. 被験菌株における PBP 3 変異

β ラクタム系薬の感受性に影響を及ぼすと考えられている 5 箇所のアミノ酸置換 (M377I, S385T, L389F, R517H, N526K) の内訳を Fig. 1 に示した。いずれのアミノ酸残基にも変異がみられなかったいわゆる感受性株は 109 株 (50.7%) 認められ、これらを I 群とした。Ser-Ser-Asn (SSN) モチーフ (以下, SSN) 近傍の M377I, S385T, L389F のいずれかに変異が認められ, Lys-Thr-Gly (KTG) モチーフ (以下, KTG) 近傍に変異がみられなかったものは 5 株 (2.3%) であり、これらを II 群とした。KTG 近傍の N526K 変異のみ, ならびに, これに SSN 変異が付加したものは 42 株 (19.5%) および 24 株 (11.2%) であり, それぞれを III 群, IV 群とした。同様に, KTG 近傍の R517H 変異のみ, ならびに, これに SSN 変異が付加したものは 28 株 (13.0%) および 7 株 (3.3%) であり, それぞれを V 群, VI 群とした。

2. PBP 3 変異と各 β ラクタム系薬の抗菌力

被験菌株に対する各 β ラクタム系薬の MIC を測定し, PBP 3 のアミノ酸変異から分類した 6 群についてそ

の幾何平均値を算出した (Table 1)。PBP 3 に変異のみられなかった I 群に対する抗菌力は CTRX が最も強く (MIC 幾何平均値: $0.0051 \mu\text{g}/\text{mL}$), 以下, CTX, CDTR, CFPN, TAZ/PIPC, MEPM の順であった (MIC 幾何平均値: $0.016 \sim 0.054 \mu\text{g}/\text{mL}$)。一方, CEZ, CCL, FMOX の抗菌力は弱く (MIC 幾何平均値: $1.0 \sim 8.1 \mu\text{g}/\text{mL}$)。他の薬剤の MIC 幾何平均値は $0.081 \sim 0.91 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であった。SSN 変異を有する II 群に対する MIC 幾何平均値は多くの薬剤で I 群と同等もしくは低下していたが, TAZ/PIPC, CTM, CPDX, PCG でわずかに耐性の上昇が観察された。KTG 領域に N526K 変異を有する III 群に対しては, いずれの薬剤においても感受性の低下が認められ, I 群に対し MIC 幾何平均値が 1.2 ~ 8.1 倍上昇していた。N526K 変異に SSN 変異が付加した IV 群に対しては, セフェム系薬を中心に感受性の低下が顕著にみられた。しかしながら, CAZ, CDTR, FMOX はこの変異による感受性の低下は他のセフェム薬に比べて小さく, I 群に対する MIC 幾何平均値の上昇率でみると, CAZ で 3.6 倍, CDTR で 13 倍, FMOX で 15 倍であり, その他のセフェム系薬の 31 ~ 110 倍に比べてその影響は小

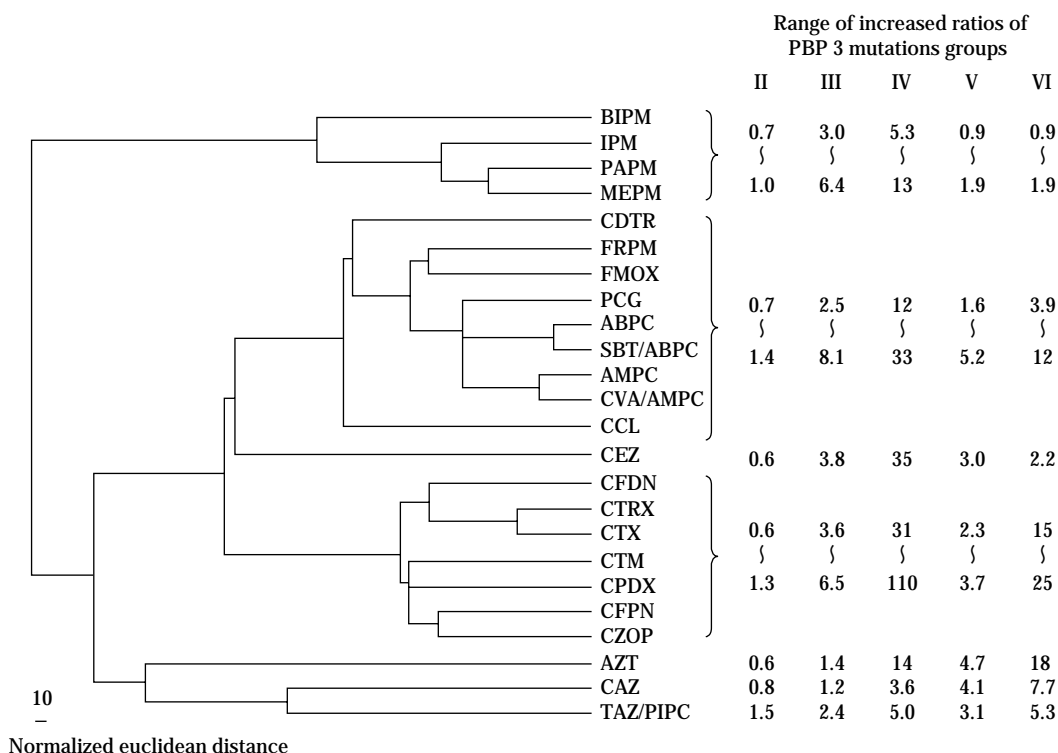


Fig. 3. Dendrogram based on UPGMC cluster analysis of β -lactam agents. Increased ratios of geometric mean MICs involved with PBP 3 mutations were determined and modified as variables for cluster analysis. Numbers indicate the range of increased ratios (geometric mean MICs for group II-VI divided by that of group I) for each cluster.

BIPM, biapenem; IPM, imipenem; PAPM, panipenem; MEPM, meropenem; CDTR, cefditoren; FRPM, faropenem; FMOX, flomoxef; PCG, benzylpenicillin; ABPC, ampicillin; SBT/ABPC, sulbactam/ampicillin; AMPC, amoxicillin; CVA/AMPC, clavulanic acid/amoxicillin; CCL, cefaclor; CEZ, cefazolin; CFDN, cefdinir; CTRX, ceftriaxone; CTX, cefotaxime; CTM, cefotiam; CPDX, cefpodoxime; CFPN, cefcapene; CZOP, ceftazopran; AZT, aztreonam; CAZ, ceftazidime; TAZ/PIPC, tazobactam/piperacillin.

さかった。R517H 変異を有する V 群, VI 群は, N526K 変異を有する III 群, IV 群よりも感受性の低下率は小さかったが, セフェム系, ペニシリン系ではほぼ同様の傾向が認められた。カルバペネム系薬は V 群, VI 群における感受性の低下はほとんど認められず, セフェム系, ペニシリン系薬とは異なる挙動を示した。

3. 薬剤のクラスタリング

方法①により得られた結果を Fig. 2 に示す。この解析で薬剤は大きく 3 つのクラスターに分類された。MEPM, TAZ/PIPC, CDTR 等が含まれる薬剤群の抗菌力は強く (MIC 幾何平均値: $0.0030 \sim 2.4 \mu\text{g}/\text{mL}$), CAZ, IPM, AMPC, CTM 等が含まれる薬剤群ではそれが低下し (MIC 幾何平均値: $0.062 \sim 57 \mu\text{g}/\text{mL}$), CCL, CEZ 群の抗菌力は非常に弱かった (MIC 幾何平均値: $2.3 \sim 290 \mu\text{g}/\text{mL}$)。

方法②により得られた結果を Fig. 3 に示す。この分類は II ~ VI のアミノ酸変異による MIC 上昇率について, 薬剤ごとに PBP 3 変異による影響度を反映させる補正を行っており, MIC 上昇パターンの類似した薬剤が同一ク

ラスターに分類される。その結果, 各薬剤はカルバペネム, ペナム, セフェムといった母核ごとに大きなクラスターを形成し, いくつかの薬剤が特徴的なクラスターに位置づけられた。セフェム系薬では, CAZ, CEZ, CDTR, CCL が他のセフェム系薬とは異なるクラスターに位置づけられ, ペニシリン系薬では TAZ/PIPC が異なるクラスターに位置づけられた。また, FRPM, FMOX はペニシリン系薬と近い位置に, AZT は他と大きく離れた位置に位置づけられた。

III. 考 察

多変量解析の一つであるクラスター分析は, 生物の系統分類などによく用いられる解析法であるが, 今回, われわれは抗菌薬の評価にもこの手法が応用できると考え, インフルエンザ菌をモデルに β ラクタム系薬のクラスタリングを試みた。

クラスター分析に必要なことは, 意味のある客観性の高い指標を変数として扱うことであり, 今回は耐性に影響を及ぼすことが知られている PBP 3 のアミノ酸変異とそれらに対する抗菌力, もしくは耐性上昇率を変数と

することでその妥当性を保証した。インフルエンザ菌の β ラクタム系薬耐性機構には、PBP 3のアミノ酸変異以外に β -lactamaseの産生^{7,8)}も知られており、今回は β -lactamase産生菌は解析対象外とした。また、もう一つのバイアスの可能性となる薬剤排出ポンプ(AcrAB)については未だ議論の余地があるが、 β ラクタム系薬の感受性に及ぼす影響は β -lactamaseよりも小さいものと思われる^{16,17)}。

今回の β ラクタム系薬のクラスター分析で考慮したもう一つの点は、PBP 3変異により各薬剤がどのようなパターンで影響を受けるのかをみるために、方法②で実施したI群に対するII~VI群のMIC上昇率の算出とその補正である。この変数処理により、抗菌薬間の抗菌力の差、耐性上昇度の総和が相殺され、各薬剤のPBP 3変異による影響パターンから薬剤のグループ化が可能となった。このことは、耐性度にかかわらず、同じ種類の耐性菌を選択する可能性がある薬剤と、そうではない薬剤を判別することに有用と考えられる。この方法②による解析結果から、各薬剤の特性とその位置づけを新たに見出すことができた。特にセフェム系薬ではPBP 3変異から受ける影響が薬剤により異なっており、その性質は抗菌力の強弱よりも化学構造との関連が強いことが示唆された(Fig. 3)。7位にaminothiazole基を有する第三世代セフェム系薬のほとんどが一つのクラスターに分類されたのは、R517HとN526Kの変異の影響を同程度に受け、これらにSSN変異が付加すると抗菌力が大きく低下する共通性がみられたためと思われる。また、7位側鎖が上記と異なるCEZ、CCLやcarboxypropoxyimino基を有するCAZは抗菌力やPBP 3変異の影響がそれぞれ異なっていたため、いずれも異なるクラスターに分類されたものと思われる。一方、CDTRは他の第三世代セフェム系薬と同様に7位にaminothiazole基を有するものの、PBP 3のアミノ酸変異の影響を受けにくかったため、他のセフェム系薬とは異なるクラスターに位置づけられた。CDTRがインフルエンザ菌のPBP 3変異の影響を受けにくい理由は未だ明らかではないが^{18,19)}、本薬の3位ethenyl methylthiazole基が何らかの役割を果たしているものと推測している。CDTRが他の経口セフェム系薬と比較して優れた抗BLNAR活性を示すことはすでにいくつかの報告にあるが^{11,19,20)}、今回明らかになった本薬の特性がそれらの差異に深く関与しているものと思われる。TAZ/PIPCを除くペニシリン系薬はR517HよりもN526Kの影響を強く受け、さらにSSN変異が付加すると抗菌力が大きく低下することから、セフェム系薬とは異なるクラスターに分類されたと思われる。また、カルバペネム系薬がペニシリン系薬やセフェム系薬と大きく異なるクラスターに分類されたのは、R517Hの影響をほとんど受けず、さらにSSN変異の影響が小さいことによるものと思われる。

今回実施した薬剤のクラスタリングは、インフルエンザ菌の耐性機構が反映されていることと、抗菌プロファイルの差異がクラスター間の距離として示されていることが従来の抗菌薬評価と大きく異なる。MIC値を指標にクラスタリングした場合(Fig. 2)には、CDTRとCTX、CFPN、CTRは近傍に分類されたが、I群を基準にした上昇率のパターンを指標にすると、CDTRはその他のセフェム系薬とは異なったグループに分類された(Fig. 3)。このような耐性パターンの違いが、おそらく選択する耐性菌の種類に影響すると考えられるが、臨床的な検討が必要であろう。また、検査室における感受性検査において代表薬剤(クラスディスク)を選択する根拠にも応用が期待できる。抗菌薬の適正使用が叫ばれる昨今、科学的妥当性(エビデンス)に基づいた抗菌薬評価が必要であり、耐性機構を踏まえた抗菌薬の系統分類は有用性の高い新しい評価法として今後の活用が期待される。

謝辞

本研究のクラスター分析において、富士通株式会社ライフサイエンスシステム事業部 塩原立也氏、水野貴司氏をはじめとする各氏のご支援を賜りました。厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Rikitomi N, Sow P S, Watanabe K, et al: Rapid increase of pneumococcal resistance to β -lactam and other antibiotics in isolates from the respiratory tract (Nagasaki, Japan: 1975-1994) *Microbial Immunol* 40: 899 ~ 905, 1996
- 2) 西岡きよ, 荻原央子, 大野 勲, 他: 呼吸器感染症起炎菌の動向と *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* の抗生物質感受性: 1994-1995年の検討. *Jap J Antibiotics* 50: 768 ~ 775, 1997
- 3) 池田 徹, 大石和徳, 永武 毅, 他: 呼吸器病原性BLNAR感染症の臨床的検討. *日本臨床* 59: 745 ~ 749, 2001
- 4) Seki H, Kasahara Y, Ohta K, et al: Increasing prevalence of ampicillin-resistant non- β -lactamase-producing strains of *Haemophilus influenzae* in children in Japan. *Chemother* 45: 15 ~ 21, 1999
- 5) 砂川慶介, 野々山勝人, 高山陽子, 他: 本邦における1997年以降3年間の小児化膿性髄膜炎の動向. *感染症学雑誌* 75: 931 ~ 939, 2001
- 6) Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, et al: Rapidly increasing prevalence of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* Type b in patients with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1509 ~ 1514, 2004
- 7) Scriver S R, Walmsley S L, Kau C L, et al: Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1678 ~ 1680, 1994
- 8) Karlowsky J A, Verma G, Zhanel G G, et al: Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influen-*

- zae*. J Antimicrob Chemother 45: 871 ~ 875, 2000
- 9) 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
 - 10) 生方公子：市中感染症研究会・3年間のまとめ。肺炎球菌とインフルエンザ菌についての疫学的考察。Jpn J Antibiot 54 (Suppl B) : 72 ~ 79, 2001
 - 11) 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
 - 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. fifth ed, M7-A5, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2000
 - 13) Fleischmann R D, Adams M D, White O, et al: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 269: 496 ~ 512, 1995
 - 14) 山口和範, 高橋淳一, 竹内光悦：クラスタ分析。多変量解析の基本と仕組み p. 106 ~ 115, 秀和システム, 東京, 2004
 - 15) 柳井晴夫：重心法。統計用語辞典(芝 祐順, 渡部洋, 石塚智一 編), p. 107 ~ 108, 新曜社, 東京, 1984
 - 16) Kaczmarek F S, Gootz T D, Dib-Hajj F, et al: Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. Antimicrob Agents Chemother 48: 1630 ~ 1639, 2004
 - 17) Trepod C M, Mott J E: Identification of the *Haemophilus influenzae* *tolC* gene by susceptibility profiles of insertionally inactivated efflux pump mutants. Antimicrob Agents Chemother 48: 1416 ~ 1418, 2004
 - 18) 山本憲太郎, 生方公子： β ラクタマーゼ非産生 ABPC 耐性インフルエンザ菌(BLNAR)。日本臨床 59: 688 ~ 693, 2001
 - 19) 清水敦之, 金子真紀, 石川みどり, 他： β -lactamase 非産生 ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* に対する cefditoren の *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性。日化療会誌 51: 161 ~ 167, 2003
 - 20) Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, et al: Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microbial Drug Resistance 9: 39 ~ 46, 2003

Classification of β -lactam agents based on antibacterial activity for *Haemophilus influenzae* with penicillin-binding protein 3 mutations

Yumiko Sanbongi¹⁾, Yumi Osaki¹⁾, Kumiko Maeda¹⁾, Takahisa Suzuki¹⁾, Hiroshi Kataoka¹⁾, Takashi Ida¹⁾, Midori Ishikawa²⁾ and Kimiko Ubukata³⁾

¹⁾Pharmaceutical Research Department, Meiji Seika Kaisha, Ltd.,

760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan

²⁾Tokyo Branch, Pharmaceutical Marketing Division, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

³⁾Laboratory of Infectious Agents Surveillance, Kitasato Institute for Life Sciences

Haemophilus influenzae numbering 215 clinical isolates were classified into 6 groups based on amino acid mutation in penicillin-binding protein 3, associated with β -lactam resistance. MICs of 24 β -lactam agents were determined for these isolates, and geometric mean MICs were determined for each of six PBP 3 mutation groups. Cluster analysis was conducted for these 24 β -lactam agents using geometric mean MICs and agents were classified into three clusters reflecting antibacterial activity against *H. influenzae* including PBP 3 substituted strains. Agents with strong activity against *H. influenzae*, i. e., meropenem, tazobactam/piperacillin, and cefditoren, were classified into the same cluster. Increased ratios of geometric mean MICs involved with PBP 3 mutations were determined and modified as variables for cluster analysis. From the result of this analysis, many of β -lactam agents were classified into several clusters reflecting their chemical skeletons. Side chains at the C-7 position may be related to the clustering of cephalosporins. Cefditoren was uniquely ranked in this evaluation because its antibacterial activity would be barely affected by PBP 3 mutations. Cluster analysis based on drug resistance mechanisms is thus useful for evaluating β -lactam agents.