

Streptococcus pneumoniae の clarithromycin 接触による耐性化の検討

雑賀 威¹⁾・松崎 薫¹⁾・長谷川美幸¹⁾・金山 明子¹⁾
池田 文昭¹⁾・小林 寅詰²⁾・辻 明良²⁾・山中 昇³⁾

¹⁾ 三菱化学メディエンス化学療法研究室*

²⁾ 東邦大学医学部看護学科感染制御学

³⁾ 和歌山県立医科大学医学部耳鼻咽喉科

(平成 20 年 8 月 12 日受付・平成 21 年 3 月 10 日受理)

Streptococcus pneumoniae のマクロライド系抗菌薬耐性化に関する基礎的な検討を行うため、clarithromycin (CAM) 感性 8 株 (MIC : 0.03~0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *mefA*, *ermB* 遺伝子保有株各 1 株, 非保有株 6 株) を用い、本抗菌薬との接触による感受性の変化および遺伝子学的解析を行った。

1/32~1/2 MIC の各 sub-MIC の CAM を含有する 5% ウマ血液添加 Mueller Hinton agar (MHA) に試験菌株 8 株を塗抹し、10 代継代培養した。また、MIC 以上の高濃度の CAM を含有する 5% ウマ血液添加 MHA に同試験菌株を塗抹し、段階的に高い濃度の CAM を含む培地で 15 代継代培養し、さらに CAM 不含有培地で 10 代継代培養した。継代培養後の菌株に対する CAM の MIC を微量液体希釈法で測定し、耐性遺伝子 *mefA* および *ermB* の有無を調べるとともに、23S rRNA 遺伝子変異、L4 および L22 タンパク遺伝子変異を検索した。

mefA および *ermB* 遺伝子保有株は、sub-MIC での接触により CAM の MIC は 4~64 倍高値化した。MIC 以上の高濃度の CAM に連続接触させた株に対する MIC は 8 株中 6 株が $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$ となり、そのうち 1 株は *ermB* 保有株、4 株は 23S rRNA domain V に変異を認めた。しかし、残り 1 株は今回検討したいずれの遺伝子にも変異は認められなかった。高濃度の CAM との連続接触後、CAM 不含有培地で継代培養した 8 株のうち、*ermB* 遺伝子を保有する 1 株において CAM の MIC が $>64 \mu\text{g}/\text{mL}$ から $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ と 1/16 以下の低値となった。*mefA* あるいは *ermB* を有する菌株は、低濃度での CAM の曝露により抗菌薬排出機能の発現や修飾酵素産生が亢進され、MIC が高値化することが示唆された。

今回の検討結果より、耐性遺伝子保有株のなかに表現型では感性和判定される臨床分離株が存在し、不十分な抗菌治療によりマクロライド系抗菌薬に抵抗性を示すようになる可能性が示唆された。*S. pneumoniae* 感染症治療にマクロライド系抗菌薬を使用する場合は、分離菌の *mefA*, *ermB* などの耐性遺伝子の有無を調べる必要があると考えられた。

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, clarithromycin, *mefA*, *ermB*, point mutation

Streptococcus pneumoniae は髄膜炎、敗血症、肺炎等の重症感染症を惹起する菌であり、1990 年代以降、penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) が急速に増加し問題視されている。さらに近年では本菌のマクロライド系抗菌薬耐性化についても多く報告され^{1,2)}、これらの耐性株による感染症では治療に難渋する場合も多い。国内で頻繁に実施されるマクロライド系抗菌薬少量長期投与がマクロライド系抗菌薬耐性菌の増加に関与しているとする報告³⁾もあるが十分な検証は行われていない。

今回われわれは、*S. pneumoniae* の clarithromycin (CAM) 耐性化に関する検討として、*mefA* または *ermB* 遺伝子保有株を含む CAM 感性 *S. pneumoniae* を sub-MIC の CAM と接触

させた場合、また MIC 以上の高濃度の CAM と接触させて得られたコロニーについて、CAM に対する感受性の変化およびマクロライド系抗菌薬耐性機構の解析を行った。

I. 材料と方法

1. 試験菌株

2005 年、わが国において分離された喀痰由来 CAM 感性 *S. pneumoniae* 8 株を用いた。すなわち送付された喀痰をコロンビア CNA 5% ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) に画線塗抹し、35°C、24~48 時間大気中で好気培養した。*S. pneumoniae* を疑うコロニーを釣菌し、ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) 上で純培養した菌体を用い、溶血性：

α 溶血, グラム染色: グラム陽性双球菌, カタラーゼ: 陰性, オプトヒン感受性: 感性を確認することにより, *S. pneumoniae* と同定した。

2. 抗菌薬感受性測定法

CAM の MIC は CLSI M100-S17⁴⁾ に準じた微量液体希釈法にて測定した。

3. 耐性コロニー選択法

金子ら⁵⁾の方法に準じ行った。

1) Sub-MIC の CAM での選択

ヒツジ血液寒天培地上で培養した試験菌株 8 株を滅菌綿棒でかきとり, $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL となるように調製した菌液を 1/32~1/2 MIC の 2 倍希釈系列の CAM 含有 5% ウマ血液添加 Mueller Hinton agar (MHA) に塗抹, 35°C で 18~48 時間好気培養した。各濃度段階の CAM 含有培地に発育した株を同様に $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL となるように調製し, 同濃度の CAM 含有培地に塗抹・培養し, この操作を 10 代繰り返した。

2) CAM の増量継代での選択

試験菌株 8 株を 1 MIC および 1/2 MIC の CAM 含有 5% ウマ血液添加 MHA に 1) と同様に塗抹・培養し, 発育した菌体をかきとり, 発育した培地中の CAM 濃度の 1, 2 および 4 倍高濃度の CAM 含有培地に塗抹・培養した。本操作を 15 代繰り返し, 段階的に高濃度の CAM と接触させた。なお, 15 代継代までに 128 μ g/mL 含有培地に発育した場合は, 15 代まで同じ濃度で継代した。

3) CAM 不含有培地での継代培養

上記 2) の MIC 以上の CAM 含有培地上で 15 代増量継代した株を, CAM 不含有 5% ウマ血液添加 MHA 上で 10 代継代培養を行った。

4. 遺伝子学的検討

1) *mefA*, *ermB* 遺伝子の検出

ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) 遺伝子検出試薬[®] (湧永製薬) を用いて添付文書に従い, マクロライド系抗菌薬に対する耐性遺伝子である *mefA* および *ermB* 遺伝子の検出を行った。

2) 23S rRNA および L4, L22 タンパク遺伝子変異解析

Canu ら⁶⁾の報告に準じ, マクロライド系抗菌薬耐性に関与する 23S rRNA domain II および domain V 領域を PCR により増幅した後, PCR 産物のダイレクトシーケンスを行い, 野生株の塩基配列と比較した。またリボソームを構成する L4 タンパクをコードする *rplD* 遺伝子および L22 タンパクをコードする *rplV* 遺伝子を PCR により増幅し, ダイレクトシーケンスを行い, 野生株の塩基配列と比較した。

II. 結 果

1. Sub-MIC の CAM との接触

対象の 8 株について, sub-MIC の CAM 含有培地上で 10 代継代培養した直後の CAM の MIC を Table 1 に示

した。*ermB* 遺伝子保有株である No. 6 は, 1/4~1/2 MIC の CAM との接触により, 親株に対する MIC に比較し 32~64 倍高値化した。一方, *mefA* 遺伝子保有株である No. 10 は, 1/16~1/2 MIC での接触により親株の 8 倍に上昇したが, MIC 値は 1 μ g/mL と, No. 6 に比べ低値であった。No. 6 および No. 10 を除く 6 株では sub-MIC での 10 代の継代培養による MIC 値の変化はほとんど認められなかった。

2. CAM の増量継代での選択と遺伝子変異

対象の 8 株について, 15 代増量継代後の株に対する CAM の MIC とマクロライド系抗菌薬耐性に関与する遺伝子の検出結果および遺伝子変異を Table 2 に示した。No. 10 株の 15 代継代株に対する CAM の MIC は 8 μ g/mL, No. 1, 2, 4, 6, 8, 9 株の 15 代継代株に対しては 64 μ g/mL 以上と顕著に高値化した。CAM の MIC が ≥ 64 μ g/mL を示した 6 株中 4 株において, 23S rRNA 遺伝子変異が認められ, そのうち 3 株は domain V の A2058T 変異, 1 株は A2059G 変異を有していた。一方, No. 8 株の 15 代継代株に対する CAM の MIC は >64 μ g/mL であったが, *mefA*, *ermB* および 23S rRNA 遺伝子変異が認められず, さらに L4 タンパクや L22 タンパクの変異も認められなかった。結果には示さなかったが, 5 株 (No. 1, 2, 4, 6 および 9) はおのおの, 14, 14, 15, 11 および 13 代目に CAM 128 μ g/mL 含有培地で発育が認められた。残り 3 株のうち, No. 8 および 10 は 15 代目におのおの 64 および 8 μ g/mL 含有培地で発育が認められたが, No. 3 は 15 代継代しても MIC 以上の高濃度での発育は認められなかった。

上記 15 代継代培養後に CAM 不含有培地で 10 代継代培養した株に対する CAM の MIC を測定した結果, CAM との連続的な接触により MIC 値が高値化した 7 株のうち, *ermB* 遺伝子保有株の No. 6 のみ, CAM 不含有培地での継代培養により >64 μ g/mL から 8 μ g/mL へと 1/16 以下の MIC の低下が認められた。

III. 考 察

S. pneumoniae は髄膜炎, 中耳炎や呼吸器疾患の起炎菌として重要な細菌である。強毒菌ではあるものの, かつては β -lactam 系抗菌薬全般に良好な感受性を示す菌種であった。しかし, 1960 年代後半から penicillin G (PCG) に低感受性を示す菌株の報告⁷⁾があり, その後 1977 年には多剤耐性株が南アフリカから分離されている⁸⁾。

日本においても, 近年の耐性株の著しい増加が抗菌化学療法上の大きな障害となっている。本菌の国内におけるマクロライド系抗菌薬耐性率は非常に高く, Inoue ら⁹⁾は 1999~2002 年に PROTEKT サーベイランスを実施し, 2002 年分離呼吸器由来 *S. pneumoniae* 817 株の erythromycin (EM) 耐性率は 79.9%, 一部の施設においては 90% を超えることを報告している。また, PCG に中等度耐性以上を示す菌株の分離頻度は 63.9% で, EM, PCG

Table 1. MICs of clarithromycin to strains of *Streptococcus pneumoniae* after 10-times exposure to sub-MIC of clarithromycin

Strain no. (macrolide-resistant gene)	CAM MIC of parent strain	Sub-MIC (concentration of CAM included in medium)	($\mu\text{g/mL}$)
			Resulting MIC after 10-times exposure to CAM (magnification ratio)
1 (N.D.)	0.03	1/32 (0.001)	0.03
		1/16 (0.002)	0.03
		1/8 (0.004)	0.03
		1/4 (0.008)	0.03
		1/2 (0.015)	0.06 ($\times 2$)
2 (N.D.)	0.03	1/32 (0.001)	0.03
		1/16 (0.002)	0.03
		1/8 (0.004)	0.03
		1/4 (0.008)	0.03
		1/2 (0.015)	0.06 ($\times 2$)
3 (N.D.)	0.06	1/32 (0.002)	0.03 ($\times 1/2$)
		1/16 (0.004)	0.03 ($\times 1/2$)
		1/8 (0.008)	0.03 ($\times 1/2$)
		1/4 (0.015)	0.03 ($\times 1/2$)
		1/2 (0.03)	0.06
4 (N.D.)	0.03	1/32 (0.001)	0.06 ($\times 2$)
		1/16 (0.002)	0.03
		1/8 (0.004)	0.03
		1/4 (0.008)	0.03
		1/2 (0.015)	0.06 ($\times 2$)
6 (<i>ermB</i>)	0.12	1/32 (0.004)	0.12
		1/16 (0.008)	0.25 ($\times 2$)
		1/8 (0.015)	1 ($\times 8$)
		1/4 (0.03)	8 ($\times 64$)
		1/2 (0.06)	4 ($\times 32$)
8 (N.D.)	0.03	1/32 (0.001)	0.03
		1/16 (0.002)	0.06 ($\times 2$)
		1/8 (0.004)	0.03
		1/4 (0.008)	0.06 ($\times 2$)
		1/2 (0.015)	0.06 ($\times 2$)
9 (N.D.)	0.03	1/32 (0.001)	0.03
		1/16 (0.002)	0.03
		1/8 (0.004)	0.03
		1/4 (0.008)	0.03
		1/2 (0.015)	0.03
10 (<i>mefA</i>)	0.12	1/32 (0.004)	0.5 ($\times 4$)
		1/16 (0.008)	1 ($\times 8$)
		1/8 (0.015)	1 ($\times 8$)
		1/4 (0.03)	1 ($\times 8$)
		1/2 (0.06)	1 ($\times 8$)

CAM: clarithromycin, N.D.: not detected

Strain nos. 1, 2, and 4: penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*Strain nos. 3, 6, 8, and 9: penicillin-intermediate *Streptococcus pneumoniae*Strain no. 10: penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*

両抗菌薬に耐性を示す株は 33.2% にのぼるとしている。

CAM の作用機序はタンパク合成阻害で, 70S リボソームの 50S サブユニットを構成している 23S rRNA に結合しその作用を発揮する。23S rRNA は domain I~VI からなり, CAM は domain V (2058・2059 位のアデニン) に結合する。

マクロライド系抗菌薬耐性 *S. pneumoniae* の耐性機序

は複数あるが, そのなかでも *ermB* 遺伝子が耐性化に最も関連している。*ermB* 遺伝子からリボソームジメチラーゼが産生され, 23S rRNA domain V の 2058 位アデニン (A2058) のジメチル化が生じ, CAM の結合能は著しく低下し, 結果として高度に耐性化する。*mefA* 遺伝子が関与する耐性機序は抗菌薬排出機能の亢進によるもので, *ermB* に比較し, 耐性度は低いとされる。しかし *mefA*

Table 2. MICs of clarithromycin to strains of *Streptococcus pneumoniae* serially passaged 15-times with gradually higher concentration of clarithromycin and mutations in 23S rRNA genes

Strain no.	Parent strain				15-times passaged strain								
	CAM MIC ($\mu\text{g/mL}$)	<i>mefA</i>	<i>ermB</i>	CAM MIC ($\mu\text{g/mL}$)	<i>mefA</i>	<i>ermB</i>	23S rRNA mutation					ribosomal protein mutation	
							domain II	domain V				L4	L22
								A752 deletion	A2058	A2059	C2610		
1	0.03	-	-	> 64	-	-	-	T	-	-	-	-	-
2	0.03	-	-	> 64	-	-	-	T	-	-	-	-	-
3	0.06	-	-	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0.03	-	-	64	-	-	-	-	G	-	-	-	-
6	0.12	-	+	> 64	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8	0.03	-	-	> 64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0.03	-	-	> 64	-	-	-	T	-	-	-	-	-
10	0.12	+	-	8	+	-	-	-	-	-	-	-	-

CAM: clarithromycin

および *ermB* の両遺伝子を保有する株も多く、これらは CAM に高度耐性化している。さらに domain II や domain V (A2058, A2059) の変異やリボソームタンパクである L4, L22 の変異による耐性化も知られている¹⁰⁾。

今回われわれは、金子らの報告した方法³⁾に準じて *S. pneumoniae* の CAM 耐性化について基礎的な検討を行った。すなわち、CAM の低濃度での継続的な曝露を想定して sub-MIC の CAM を含有する培地で 10 代継代培養した結果、*mefA* 遺伝子保有株および *ermB* 遺伝子保有株においてのみ MIC 値の上昇が認められ、両遺伝子の発現が亢進している可能性が示唆された。これらの耐性化した株をさらに CAM 不含有培地で継代培養することで MIC が低下したが、CAM 接触前のレベルまでは感性感化しなかった。これらのことから、*mefA*, *ermB* 遺伝子保有株では、マクロライド系抗菌薬に感性和判定された株であっても、低濃度の CAM との連続した接触で本抗菌薬に耐性化することが明らかとなった。

一方、*mefA*, *ermB* を保有しない株においては sub-MIC の CAM での 10 代の継代では耐性化はみられなかったため、MIC を基準に段階的に濃度を上げていくいわゆる増量継代法で 15 代継代培養したところ、CAM に高度耐性を示す株が認められた。これらの株では、23S rRNA domain V に A2058T あるいは A2059 G 変異がみられたが、CAM 不含有培地上でさらに継代培養しても MIC は変化しなかった。これらのことより、23S rRNA 遺伝子変異による耐性化は不可逆的であるばかりでなく高度であると考えられた。今回の検討では 15 代継代後株のみについて CAM の MIC を測定しているため、何代目から耐性変異株がどの程度の頻度で出現したのかは不明である。今後は、耐性変異株が出現する継代数や頻度についても詳細に検討する必要があると考えられた。

今回の成績から、表現型ではマクロライド系抗菌薬感性的の菌株においても、耐性遺伝子である *mefA* あるいは

ermB を有する菌株は、低濃度での抗菌薬曝露により MIC が高値化し、抗菌薬排出機構の発現や 23S rRNA の修飾酵素産生が亢進される可能性が示唆された。*mefA*, *ermB* 保有株は日本においては高率に存在することが報告されているが¹⁰⁾, *ermB* 保有株で CAM に感性感を示す株についての報告は限られている¹¹⁾。今回見出された CAM 感性的の *ermB* 保有株の転写レベルでの制御や臨床分離株のなかにこの種の菌株がどの程度存在するのか調査する必要があると考える。

これらのことを考慮に入れ、*S. pneumoniae* 感染症治療にマクロライド系抗菌薬を使用する場合は、漫然と長期間使用しないことが重要であり、分離株の *mefA*, *ermB* などの耐性遺伝子の確認も抗菌薬を選択するうえで有用な情報と成りえるものと考えられた。

文 献

- 1) Harimaya A, Yokota S, Sato K, Yamazaki N, Himi T, Fujii N: High prevalence of erythromycin resistance and macrolide-resistance genes, *mefA* and *ermB*, in *Streptococcus pneumoniae* isolates from the upper respiratory tracts of children in the Sapporo district, Japan. *J Infect Chemother* 2007; 13: 219-23
- 2) Pérez-Trallero E, García-de-la-Fuente C, García-Rey C, Baquero F, Aguilar L, Dal-Ré R, et al; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens: Geographical and ecological analysis of resistance, core-sistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1965-72
- 3) 富田亜紀子, 篠田陽子, 安原 努, 和久田梨香, 福地邦彦, 五味邦英: ペニシリン耐性肺炎球菌におけるマクロライド耐性遺伝子の保有状況の解析。臨床病理 2006; 54: 792-9
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement, M100-S17. CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2007
- 5) 金子明寛, 中戸川倫子, 森 裕介, 佐々木次郎, 松崎

- 薫, 金山明子, 他: マクロライド耐性口腔連鎖球菌に対する telithromycin の抗菌力の検討。日治療会誌 2002; 50: 11-5
- 6) Canu A, Malbrun B, Coquemont M, Davies T A, Appelbaum P C, Leclercq R: Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 125-31
- 7) Kislak J W, Razavi L M B, Daly A K, Finland M: Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci* 1965; 250: 261-8
- 8) Jacobs M R, Koornhof H J, Robins-Browne R M, Stevenson C M, Vermaak Z A, Freiman I, et al: Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* 1978; 299: 735-40
- 9) Inoue M, Kaneko K, Akizawa K, Fujita S, Kaku M, Igari J, et al: Antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens in Japan during PROTEKT years 1-3 (1999-2002). *J Infect Chemother* 2006; 12: 9-21
- 10) 井上松久, 兼子謙一, 中野竜一, 佐藤義則, 新井 進: マクロライド及びケトライド耐性肺炎球菌の分子解析による評価—Telithromycin の作用機序・耐性機序も含めて—。 *Jpn J Antibiot* 2004; 57: 425-37
- 11) Okamoto H, Miyazaki S, Tateda K, Ishii Y, Yamaguchi K: Comparative in vitro activity of telithromycin (HMR3647), three macrolides, amoxicillin, cefdinir and levofloxacin against Gram-positive clinical isolates in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 797-802

Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to clarithromycin developing by serial exposure

Takeshi Saika¹⁾, Kaoru Matsuzaki¹⁾, Miyuki Hasegawa¹⁾, Akiko Kanayama¹⁾,
Fumiaki Ikeda¹⁾, Intetsu Kobayashi²⁾, Akiyoshi Tsuji²⁾ and Noboru Yamanaka³⁾

¹⁾ Chemotherapy Division, Mitsubishi Chemical Medicine Co., 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Infection Control and Prevention, School of Nursing, Faculty of Medicine, Toho University

³⁾ Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, Wakayama Medical University

We studied changes in susceptibility to clarithromycin (CAM) and in molecular analysis using 8 CAM-susceptible *Streptococcus pneumoniae* (MIC: 0.03–0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) after exposure to CAM.

Test strains were cultured 10 times on Mueller Hinton agar (MHA) with 5% horse blood containing sub-MICs of CAM. Also, strains were cultured 15 times on MHA with 5% horse blood containing CAM at gradually higher concentrations, then cultured 10 times on the same agar without CAM. Using these strains, we determined susceptibility to CAM, detected *mefA* and *ermB* genes, and analyzed mutations of 23S rRNA gene, *rplD* and *rplV* (encoding L4 and L22 protein).

CAM MICs of *mefA*- or *ermB*-positive strains were increased by 10-times exposure to sub-MIC of CAM, so their MICs were 4 to 64 times higher than before. Serial exposure to high CAM concentration made 6 of 8 test strains highly resistant (MIC: $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$). Four had point mutations in 23S rRNA domain V and one had *ermB*. The remaining strain had no mutations. CAM MIC to the *ermB*-positive strain cultured on agar without CAM decreased to less than 1/16, from 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Our results showed that an *mefA*- or *ermB*-positive strain exposed to low-concentration of CAM is made resistant by promoting the production of modification enzymes and efflux. It appears that clinical isolates had resistant genes but susceptible to macrolides in the phenotype will be resistant by inadequate chemotherapy with the antibiotics. Resistant genes such as *mefA* and *ermB* should thus be monitored to ensure appropriate chemotherapy.