

【原著・基礎】

Tebipenem pivoxil の小児臨床第 III 相試験における
real-time PCR 法による急性中耳炎の原因微生物の検索

生方 公子・諸角美由紀・千葉菜穂子・濱野（長谷川）恵子

北里大学大学院感染制御科学府・北里生命科学研究所病原微生物分子疫学研究室*

(平成 20 年 9 月 26 日受付・平成 21 年 1 月 24 日受理)

著者らは経口カルバペネム系薬、tebipenem pivoxil (TBPM-PI) の小児急性中耳炎例に対する臨床第 III 相試験において、原因微生物の検索精度を高める目的で、従来の培養による細菌検索と並行し、細菌とウイルスを網羅的に検索できる real-time PCR の応用を試みた。

対象とされた 399 例のうち、原因菌が培養と real-time PCR の両方で陽性であったのは 224 例 (56.1%) であった。41 例 (10.3%) は培養陰性であったが、real-time PCR に続いて実施された PCR により耐性遺伝子型まで判明した。47 例 (11.8%) は real-time PCR で陽性であったものの耐性遺伝子型は明らかにできなかった。その他にウイルス陽性例が 8 例 (2.0%) 認められた。

原因菌と判定された分離菌の内訳は、*Streptococcus pneumoniae* が延べ 117 株 (症例数 116 例)、*Haemophilus influenzae* が 112 株、*Streptococcus pyogenes* が 8 株、*Moraxella catarrhalis* が 7 株、*Staphylococcus aureus* が 2 株であった。PCR のみ陽性であった細菌は、ほとんどが *S. pneumoniae* と *H. influenzae* であった。培養での菌数と PCR での陽性反応 (Ct 値) との間には高い相関性 ($\gamma=0.9369\sim0.9710$) が認められた。

また、原因菌分離例は、小児急性中耳炎診療ガイドライン (2006 年版) に照らし合わせると、重症例が有意に多かった ($P<0.0001$)。

Real-time PCR の臨床試験への応用は、原因菌の検索精度を高めるうえできわめて有用であると結論された。

Key words: real-time PCR, acute otitis media, tebipenem pivoxil, child, causative organism

Streptococcus pneumoniae (肺炎球菌) および *Haemophilus influenzae* (インフルエンザ菌) は、小児の急性中耳炎、急性副鼻腔炎、あるいは肺炎等の原因菌として最も重要な細菌である¹⁻⁴⁾。

新規抗菌薬の臨床試験時におけるこれらの感染症に対する原因菌の検索は、従来、感染症が疑われる症例より採取された検査材料 (検体) に対する培養検査によって実施されてきた。しかし、小児においては検体が微量であること、さらには低年齢の患児ではその採取が難しいといった問題があり、成人由来の検体のようにさまざまな菌検索を行うことは困難であった。

そのようなことから、著者らは小児における原因微生物の検索精度を高める目的で、real-time PCR 法によって検体中の菌種とその菌量をあらかじめ推定しておき、並行して行われた培養後の培地より目的の菌を効率良く釣菌する方法を確立した⁵⁾。さらに、real-time PCR 法による原因微生物の検索を呼吸器系ウイルスにまで拡大し、急性中耳炎等の原因と推定される微生物の確定精度を高める方法を構築した⁶⁾。

そして、このような細菌とウイルスを網羅的に検索する real-time PCR 法を新規経口カルバペネム系抗菌薬、tebipenem pivoxil (TBPM-PI) の小児に対する臨床試験に応用した。

この論文においては、急性中耳炎例に対する小児臨床第 III 相試験として実施した一般臨床試験と比較試験の 2 試験において、培養法と併行して実施された real-time PCR 法による成績と培養成績との関係について報告する。

I. 材料と方法

1. 対象症例

対象とした急性中耳炎の症例数は、一般臨床試験の 186 例および比較試験の 213 例、合計 399 例である。年齢は 1 歳未満が 14 例 (3.5%)、1 歳が 57 例 (14.3%)、2 歳が 54 例 (13.5%)、3 歳が 58 例 (14.5%)、4 歳以上が 216 例 (54.1%) という内訳であった。

2. 検査材料の採取と送付方法

検体は、投与開始前、投与 3 日後、投与終了 (中止) 時、投与終了 1~2 週間後の最大 4 回採取され、後述する

*東京都港区白金 5-9-1

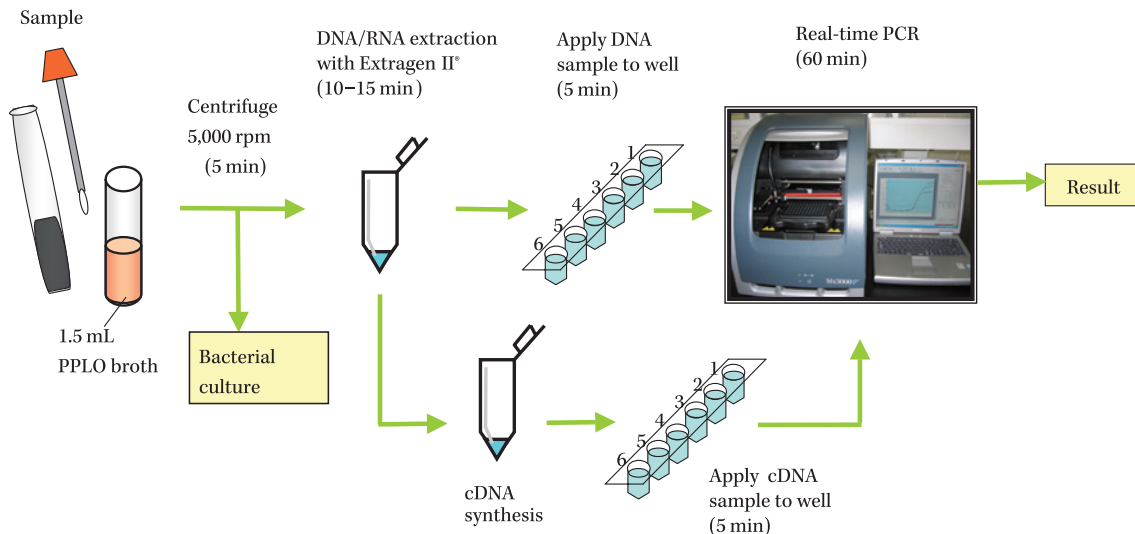


Fig. 1. Causative pathogen detection protocols from clinical samples using real-time PCR.

real-time PCR法、ならびに培養法によって微生物検索が行われた。本論文においては、このうち投与開始前に採取された検体についての検査を対象とした。

鼓膜非穿孔例からの検体採取は、十分な消毒後に鼓膜穿刺もしくは鼓膜切開術を施行し、シードスワブ[®]γ2号(栄研化学(株))を用いて中耳貯留液が採取された。すでに鼓膜穿孔がみられる患者では耳漏が採取されたが、それらの症例に対しては、外耳道に流出している耳漏を清拭あるいは吸引除去して外耳道を消毒後、鼓室内分泌物をシードスワブ[®]γ2号に吸い取らせるように採取された。399例のうち310例の検体は鼓膜切開液、26例は鼓膜穿刺液、63例は耳漏であった。以後、これらの検体は中耳貯留液と表記した。

また、中耳貯留液と同時に上咽頭ぬぐい液も採取された。上咽頭ぬぐい液は、採取前に鼻前庭をイソジン等で消毒した後、経鼻的に上咽頭(鼻咽喉)の粘膜をシードスワブ[®]γ2号で擦過し、採取された。

採取後の検体は、輸送中の不測の事故に備え、CDCの基準⁷⁾に準じた円筒状の衝撃に耐えられる容器(長さ17.5 cm×直径2.5 cm)に収納した後、「細菌学的検査依頼書」とともに指定のジッパーつきビニール袋に入れ、さらに輸送用器材に梱包された後、輸送業者によって原則として検体の発生した日の翌日朝までに著者らの研究室へ届けられた。

3. 検査材料の処理

受領後の検体に対する微生物検査手順の概略を示した(Fig. 1)。

検体は1.5 mLのPPLO培地(日本ベクトンディッキンソン(株):日本BD社)に混釈後、エッペンドルフ・チューブに移して5,000 rpm, 4°C, 5分の遠心(Kubota 1700型冷却遠心機, KUBOTA(株))を行い、検体中に含まれる細菌と線毛上皮細胞等を集めた。次いで150 μL

の沈渣部分を残して上清を捨て去り、軽くミキシングし、これを検査のスタート時サンプルとした。

まず、5 μLずつのサンプルを血液寒天培地(Sheep Blood Agar (T), 日本BD社)、チョコレート寒天培地(Chocolate II Agar, 日本BD社)、マンニト食塩培地(日本BD社)、およびBTB乳糖加寒天培地(ドリガルスキー改良培地, 日本BD社)に塗布した。嫌気性菌が疑われる場合には、ブルセラHK寒天培地RS(極東製薬工業(株))にも塗布し、フラン器にてそれぞれの培地に指定された培養を実施した。

その他に、サンプルの5 μLをプレパラートに広げ、グラム染色を施して光学顕微鏡下に炎症所見を観察した。残りのサンプルのうち、100 μLは次項のDNA/RNA抽出用とした。

4. DNA/RNAの抽出

100 μLのサンプルからは、EXTRAGEN II[®](東ソー(株))を用い、手順書に従ってDNAとRNAとを抽出した。抽出に要する時間は10~15分で、一連の溶菌操作によりサンプル中の細菌やウイルス粒子は溶け、PCRの鋳型となるDNA/RNAを核酸サンプルとして最終的に40 μLに調整した。

5. Real-time PCR法による原因微生物の検索

呼吸器系感染症の原因菌として分離頻度の高い①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③ *Streptococcus pyogenes* (GAS)、④ *Mycoplasma pneumoniae* (マイコプラズマ)、⑤ *Chlamydia pneumoniae* (クラミドフィラ)、⑥ *Legionella pneumophila* (レジオネラ)の検索は、著者らが報告したprimerとprobeを用いるreal-time PCR法によって検索した⁵⁾。これらのprimerとprobeを用いたPCRの感度ならびに特異度は、同論文中に記したとおりである。

一方、呼吸器系ウイルスについては、① adenovirus

Table 1. Classification by the grade of pathogens detected by cultures and real-time PCR for patients with AOM infection

Grade	Culture	Real-time PCR (species)	Conventional PCR (resistance gene)	Cases (%)
Grade 1				202 224 (56.1)
Grade 1 ^{a)}	Positive	Positive	Positive	4
Grade 1 ^{b)}				18
Grade 2				38 41 (10.3)
Grade 2 ^{c)}	Negative	Positive	Positive	3
Grade 3	Negative	Positive	Negative	47 47 (11.8)
Grade 4 ^{d)}	ND	Positive	ND	8 8 (2.0)
Grade 5	Negative	Negative	ND	79 79 (19.8)
Total				399 (100.0)

^{a)} Including Grade 2 bacteria positive cases

^{b)} Including Grade 3 bacteria positive cases

^{c)} Including Grade 3 bacteria positive cases

^{d)} Viral positive cases

(AdV), ② influenza virus A (FluA), ③ influenza virus B (FluB), ④ RSV subgroup A (RSV-A), ⑤ RSV subgroup B (RSV-B), ⑥ parainfluenza virus 1 (PIV1), ⑦ parainfluenza virus 2 (PIV2), ⑧ parainfluenza virus 3 (PIV3), ⑨ human metapneumovirus (hMPV), ⑩ human bocavirus (HBoV), ⑪ enterovirus (EV), ⑫ rhinovirus (RV), ⑬ corona virus (CoV) の 13 種類を検索した。方法の詳細は、すでに中山ら⁸⁾および長谷川ら⁶⁾が報告したとおりである。

6. 薬剤耐性遺伝子の解析

肺炎球菌、あるいはインフルエンザ菌と推定された培地上のコロニーは、Manual of Clinical Microbiology^{9,10)} に準じた菌種同定検査と併行して、PCRによって遺伝子学的レベルの感性/耐性の識別と菌種確認用の *lytA* 遺伝子検索がただちに実施された。これらの PCR には、「耐性遺伝子検出試薬」キット (湧永製薬 (株)) を使用した。増幅された DNA 断片の有無に基づく遺伝子変異の判定、溶菌操作、DNA の増幅条件、および電気泳動条件等は、既報¹¹⁻¹⁴⁾ とキットに添付された手順書に従った。

なお、肺炎球菌については、遺伝子型に基づく本論文中における記載は、PBP1A をコードする *pbp1a* 遺伝子、PBP2X をコードする *pbp2x* 遺伝子、PBP2B をコードする *pbp2b* 遺伝子上に感受性低下に影響するアミノ酸置換に結びつく変異が認められた際、「変異あり」とした。すでに報告^{15,16)} しているように、いずれの *pbp* 遺伝子にも変異が認められなかった株は gPSSP、変異が認められた株は gPISP (*pbp2x*), gPISP (*pbp2b*), gPISP (*pbp1a+2x*), gPISP (*pbp2x+2b*) と表記した。3 遺伝子とも変異した株を gPRSP (*pbp1a+2x+2b*) または gPRSP とした。

インフルエンザ菌においても同様に、PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子上に認められる変異のうち、耐性に影響する変異の認められない株は gBLNAS, Lysine (Lys)-

526 の Asparagine (Asn) への変異のみが認められる株は gLow-BLNAR, Lys 変異と Serine (Ser)-385 の Threonine (Thr) への変異が同時に認められる株は gBLNAR と表記した。また、gLow-BLNAR 株が β -ラクタマーゼ産生株の場合は gBLPACR-I, gBLNAR のそれは gBLPACR-II と表記した。

II. 結 果

1. 急性中耳炎例の原因微生物のグレード分類

Table 1 には急性中耳炎例 399 例に対して実施された原因微生物の検索結果に基づくグレード分類を示す。「グレード 1」は採取された中耳貯留液から培養で原因菌が分離できた場合で、肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラクセラ菌、GAS が中耳貯留液から培養で分離された場合、黄色ブドウ球菌に関しては中耳貯留液から白血球浸潤像を伴って培養で分離され、同一時点の上咽頭ぬぐい液からも培養で分離された場合である。「グレード 2」と「グレード 3」は培養では中耳貯留液から原因菌が分離できなかったが、PCR によって精度高く推定できたと判断したケースである。具体的には、「グレード 2」は中耳貯留液が real-time PCR で陽性、さらに PCR によって耐性遺伝子型まで明らかにでき、かつ上咽頭から同じ耐性型の菌が培養で分離できた場合である。「グレード 3」は中耳貯留液の real-time PCR では陽性で、耐性遺伝子型の特異はできなかったものの、上咽頭からも同一菌種が培養で分離できた場合とした。以下、「グレード 4」は real-time PCR によってウイルスのみが陽性であった場合、そして「グレード 5」はいずれの方法によっても原因微生物が推定できなかった場合とした。

同一の症例において、「グレード 1」の菌と「グレード 2」あるいは「グレード 3」の菌が重複して証明された例もわずかながら認められた。

グレード分類に従って集計すると、「グレード 1」は 224

Table 2. Causative bacterial pathogens identified by culture and real-time PCR from AOM patient middle-ear fluid

Causative pathogen	Cases (%)
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i>	17 (7.6)
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + Virus	3 (1.3)
Subtotal	20 (8.9)
<i>S. pneumoniae</i>	77 (34.4)
<i>S. pneumoniae</i> + <i>M. catarrhalis</i>	1 (0.4)
<i>S. pneumoniae</i> + <i>C. pneumoniae</i>	1 (0.4)
<i>S. pneumoniae</i> + Virus	4 (1.8)
<i>S. pneumoniae</i> + other ^{a)}	13 (5.8)
Subtotal	96 (42.9)
<i>H. influenzae</i>	79 (35.3)
<i>H. influenzae</i> + <i>S. pyogenes</i>	1 (0.4)
<i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i>	1 (0.4)
<i>H. influenzae</i> + <i>C. pneumoniae</i>	3 (1.3)
<i>H. influenzae</i> + <i>C. pneumoniae</i> + other	1 (0.4)
<i>H. influenzae</i> + Virus	4 (1.8)
<i>H. influenzae</i> + other	3 (1.3)
Subtotal	92 (41.1)
<i>S. pyogenes</i>	4 (1.8)
<i>S. pyogenes</i> + Virus	1 (0.4)
<i>S. pyogenes</i> + other	2 (0.9)
Subtotal	7 (3.1)
<i>M. catarrhalis</i>	5 (2.2)
<i>M. catarrhalis</i> + Virus + other	1 (0.4)
<i>M. catarrhalis</i> + other	1 (0.4)
Subtotal	7 (3.1)
MSSA	1 (0.4)
MSSA + other	1 (0.4)
Subtotal	2 (0.9)
Total	224 (100.0)

^{a)} Other includes *S. pneumoniae* (n = 4) or *H. influenzae* (n = 18) classified grade 2 and grade 3.

例 (56.1%), 「グレード2」は41例 (10.3%), 「グレード3」は47例 (11.8%)であった。「グレード4」のウイルス単独陽性例は8例 (2.0%)認められ, 「グレード5」とした原因微生物が推定できなかった症例は79例 (19.8%)であった。

2. 「グレード1」として分離された原因菌の内訳

Table 2には, 中耳貯留液から細菌が分離され, 「グレード1」に分類された224例の原因菌の内訳を示した。

Subtotalとして集計したように, 大きくは6グループに分けることができた。すなわち, ①肺炎球菌+インフルエンザ菌 (n=20), ②肺炎球菌 (n=96), ③インフルエンザ菌 (n=92), ④ *Moraxella catarrhalis* (モラキセラ菌) (n=7), ⑤ GAS (n=7), ⑥ *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) (n=2)である。

これらのなかには, クラミドフィラにも同時に陽性を示した例が5例, ウイルスにも同時に陽性を示した例が13例 (5.8%)認められた。それらのウイルスの内訳はRVが6例, RSVが3例, HBoV, EV, FluB, PIV3がそれ

Table 3. Causative pathogens suspected from real-time PCR from AOM patient middle-ear fluid

Causative pathogen	Cases (%)	
	Grade 2	Grade 3
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i>	2 (4.9)	3 (6.4)
<i>S. pneumoniae</i>	24 (58.5)	6 (12.8)
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> ^{b)}	2 (4.9)	
<i>S. pneumoniae</i> + <i>C. pneumoniae</i>	1 (2.4)	
<i>S. pneumoniae</i> + Virus ^{c)}	3 (7.3)	
Subtotal	30	6
<i>H. influenzae</i>	8 (19.5)	37 (78.7)
<i>H. influenzae</i> + <i>S. pneumoniae</i> ^{b)}	1 (2.4)	
<i>H. influenzae</i> + Virus ^{c)}		1 (2.1)
Subtotal	9	38
Total	41	47

^{b)} Grade 3

^{c)} Rhinovirus

ぞれ1例ずつであった。

培養陽性の原因菌を菌種別にまとめると, 肺炎球菌が117株 (症例数116例) (29.1%), インフルエンザ菌が112株 (28.1%), GASは8株 (2.0%), モラキセラ菌は9株 (2.3%), 黄色ブドウ球菌は2株 (0.5%)となった。

3. 「グレード2と3」として推定された原因菌の内訳

中耳貯留液から菌はできなかったが, PCRにて耐性遺伝子型まで明らかにできた「グレード2」と, PCRで菌の存在は推定できたものの, 耐性遺伝子型までは明らかにできなかった「グレード3」とした症例における推定原因菌の内訳をTable 3に示す。

「グレード2」は41例認められたが, そのうち肺炎球菌が32例, インフルエンザ菌が11例認められた。検出感度がやや優れた肺炎球菌において, 耐性遺伝子まで判明した例が多かった。

一方, 「グレード3」は47例認められたが, インフルエンザ菌推定例が41例と多く, 肺炎球菌推定例は9例であった。

4. 肺炎球菌とインフルエンザ菌のグレード分類の内訳

肺炎球菌とインフルエンザ菌について, 「グレード1」から「グレード3」までの内訳をFig. 2に示す。同一の症例で肺炎球菌が「グレード1」, インフルエンザ菌が「グレード2」で検出された場合には, 両菌種のそれぞれのグレードに加えられ, 延べ例数として算出された。

「グレード1」から「グレード3」までの肺炎球菌検出例は162例 (40.6%)であり, そのうちの71.6%は菌が分離され, PCRにより22.2%は耐性遺伝子型まで判明, 6.2%は菌種が推定されたという結果であった。つまり, real-time PCRにより推定された原因菌を含めると, 急性中耳炎の原因菌としての肺炎球菌検出率は1.4倍高まったことになった。

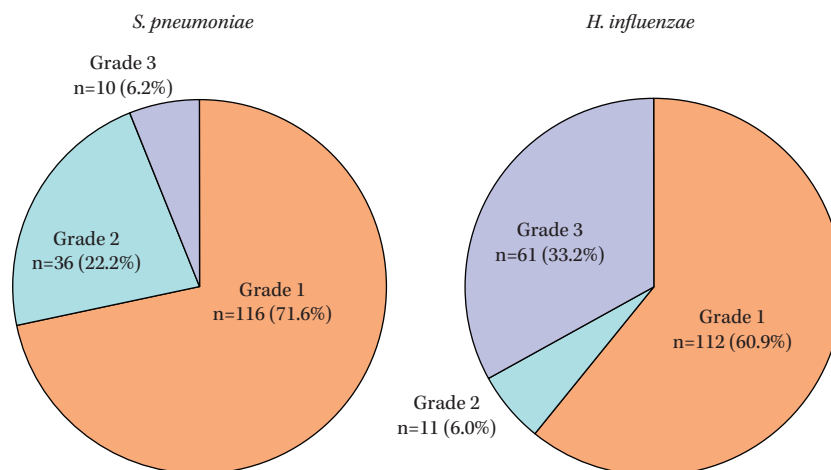


Fig. 2. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* classification based on culture and real-time PCR results.

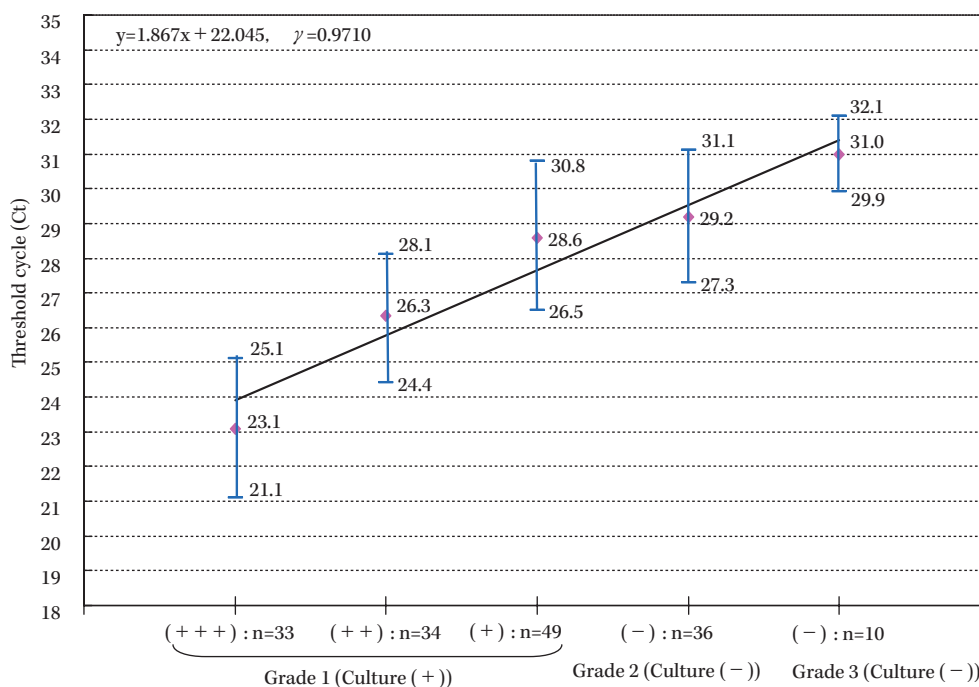


Fig. 3. Correlation between *Streptococcus pneumoniae* real-time PCR and culture results.

一方、インフルエンザ菌検出例は184例(46.1%)と多かったが、菌が分離されたのはそのうちの60.9%、PCRにより耐性型まで判明したのは6.0%、残りの33.2%は菌種の推定のみであった。肺炎球菌と同様に real-time PCR によって1.6倍その検出率が高まった。

5. Real-time PCR と培養成績との関係

Real-time PCRで陽性反応を示したサイクル数(Ct値)と、「グレード1」とした培養での菌量レベル、「グレード2」あるいは「グレード3」との関係について、Fig. 3に肺炎球菌、Fig. 4にインフルエンザ菌の成績をそれぞれ示す。これらは先のFig. 2に示した延べ例数に基づいている。

なお、培養での(+++)は $\geq 1.0 \times 10^4$ CFU/サンプル、(++)は $1.0 \times 10^3 \sim 9.6 \times 10^3$ CFU/サンプル、(+)は $4.0 \times 10^1 \sim 9.6 \times 10^2$ CFU/サンプルに相当している。

肺炎球菌では、培養での菌量とサイクル数との間には明らかな相関が認められ、 $\gamma=0.9710$ と高い相関係数が示された。培地上から釣菌できた116例のうち、平均Ct値は、(+++)で23.1サイクル、(++)で26.3サイクル、(+)で28.6サイクルであった。

「グレード2」の36例における平均Ct値は29.2サイクル、「グレード3」の10例の平均Ct値は31.0サイクルであった。この結果から、肺炎球菌が釣菌できるCt値の上限は30サイクルまでと推定された。ちなみに、サンプル

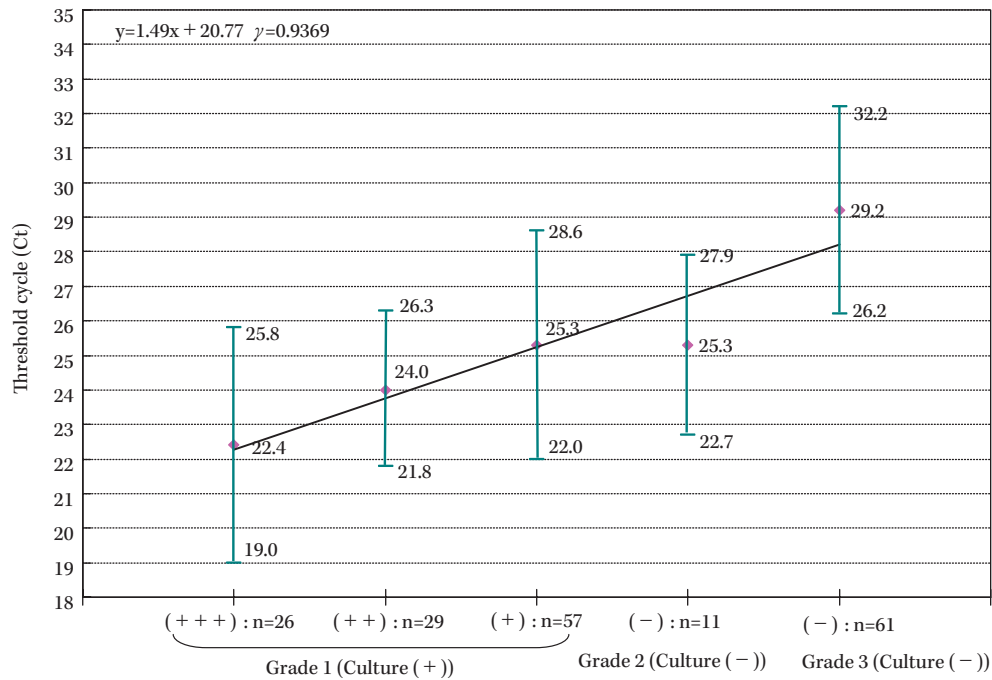


Fig. 4. Correlation between *Haemophilus influenzae* real-time PCR and culture results.

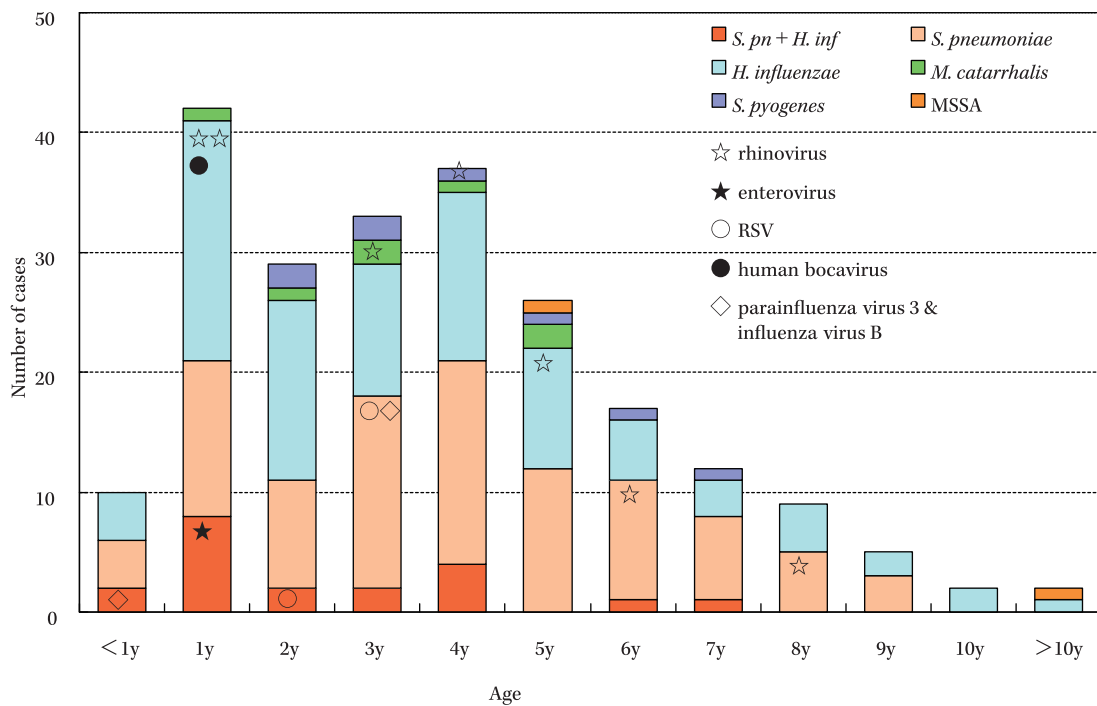


Fig. 5. AOM patient age distribution and causative pathogens.

あたり（綿棒に付着したすべて）の菌数に換算すると、 2.7×10^2 CFU/サンプルであった。

一方、インフルエンザ菌でも $\gamma=0.9369$ と高い相関性が認められたが、SD 値が肺炎球菌に比してやや大きく、ばらつく傾向がみられた。インフルエンザ菌が釣菌できた 112 例の平均 Ct 値は、(+++) で 22.4 サイクル、

(++) で 24.0 サイクル、(+) で 25.3 サイクルであり、釣菌できる Ct 値の限界は 28.6 サイクルであった。「グレード 2」に分類された 11 例の平均 Ct 値は 25.3 サイクルであり、28 サイクル以上の Ct 値では耐性遺伝子を明らかにできない「グレード 3」の例が多かった。

両菌種の成績を比較すると、インフルエンザ菌に比し

Table 4. Clinical severity according to AOM guidelines and grade classification for causative pathogens

Grade	Classification according to AOM guidelines		Total
	Severe (%)	Moderate (%)	
Grade 1	174 (77.7)	50 (22.3)	224
Grade 2	20 (48.8)	21 (51.2)	41
Grade 3	27 (57.4)	20 (42.6)	47
Grade 4	5 (62.5)	3 (37.5)	8
Grade 5	42 (53.2)	37 (46.8)	79
Total	268	131	399

$$\chi^2 = 26.6251, P < 0.0001 (**)$$

て溶菌しやすい肺炎球菌の感度がやや高いという結果であった。

6. 対象症例の年齢分布

菌が分離できた「グレード1」の224例について、年齢分布と原因菌との関係をFig.5に示す。臨床試験対象症例のためか患児の年齢がやや高かったが、肺炎球菌、インフルエンザ菌は全年齢層から分離されていたのに対し、モラキセラ菌、GAS、そして黄色ブドウ球菌が検出された症例は2歳以上が多かった。

また、ウイルスも同時に陽性であった症例は13例(5.8%)認められた。

7. 小児急性中耳炎診療ガイドラインにおける重症度判定と原因微生物との関係

小児急性中耳炎診療ガイドライン(2006年版)¹⁷⁾の重症度判定に従って判定した重症度と、原因微生物のグレード分類との関係はTable4に示す。

培養で菌が分離された「グレード1」の224例では、174例(77.7%)が重症と判定されていた。また、「グレード2」における重症例は20例(48.8%)、「グレード3」では27例(57.4%)、「グレード5」の原因微生物不明例では42例(53.2%(n=42))であった。重症と判定された症例では培養による菌分離例の多いことが、統計学的にも有意であった($\chi^2=26.6251$, $df=4$, $P<0.0001$ (**))。

一方、菌種と重症度との関係であるが、「グレード1」の肺炎球菌分離例とインフルエンザ菌分離例の重症度には、有意差は認められなかった($\chi^2=0.0001$, $df=1$, $P=0.9908$)。

III. 考 察

急性中耳炎を含む小児の呼吸器感染症における原因微生物の検索に際しては、罹患部位からの検体を必要十分量採取することは成人に比べてかなりの困難を伴う。このため、採取された微量の検体を用いて効率的に原因微生物を検索するには、検索手法の改善が必要となる。

近年、急速に進歩したreal-time PCR法は、従来の電気泳動を伴うPCR法に比べ、①DNA/RNAの抽出以外はほとんど自動化されていること、②原因菌の菌量が推定できること、③特異度と感度が優れていることから高い

確率で病原微生物を推定できること、④抗菌薬の前投与のため培養陰性であっても原因菌が推定できる場合があること、⑤原因菌が2時間程度で推定できること等のメリットから臨床への応用が期待されている。

特に、real-time PCRの有用性があるのは、培養に日数を要するマイコプラズマやクラミドフィラ、そしてウイルス検索等である。また、probeに結合させる蛍光色素をいくつか使うことにより、1つのチューブで複数以上の微生物を検索するmultiplex法も報告され始めた。

一方、real time PCRなどの遺伝子検査の場合には、機器が必要なこと、テクニックを習熟する必要があること、結果の判読にも陽性を示す菌が真の原因菌であるのか否か等、留意すべきこともある。

著者らはこのreal-time PCR法に着目し、まず、小児の市中肺炎例を中心に、その主要原因菌6菌種を網羅的に検索できるキットを開発した⁵⁾。次いで、呼吸器系ウイルスを網羅的に検索する本法を構築した⁶⁾。これらの手法を用いると、呼吸器感染症の多くにウイルスが関与しており、細菌感染の多くはそれに続く二次感染例が多いという成績であった⁸⁾。

一方、従来の報告にみられる小児急性中耳炎例の原因菌の分離率は50%以下であることが多く^{18,19)}、またウイルスの関与も指摘されてはいるが、その関与の割合は明確にはなっていない²⁰⁻²²⁾。そのような経緯から、著者らは新規抗菌薬であるTBPM-PIの臨床試験時における原因微生物の検索に、上述したreal-time PCR法を採用入れることにより、原因微生物の不明例を減らし、試験精度を高めることができるのではないかと考えにいたった。

また、先行して行われたTBPM-PIの小児臨床第II相試験において、原因菌の分離率がやや低かったことから、検査に提供される検体の採取法にも問題があると考え、小児臨床第III相試験においては、まず中耳貯留液の具体的な採取方法をビデオ化して臨床試験担当医師に提示することから始めた。

この論文で述べた成績は、そのように慎重に採取された中耳貯留液が多かったためか、今までの報告に比べると、原因菌の分離率が56.1%と高いことが注目された。また、別の論文で述べるが、これらの症例では上咽頭にも同一タイプの菌が存在していたことが、莢膜型別、あるいはpulsed-field gel electrophoresis (PFGE)解析によって証明されている。

さらに、real-time PCRで肺炎球菌、あるいはインフルエンザ菌が推定され、続けて実施されたPCRによる*pbp*遺伝子解析で耐性型まで明らかにできた割合が10.3%、耐性型までは明らかにできなかったものの菌種は推定できた例が11.8%認められたことが注目された。つまり、最終的には対象症例の78.2%で原因菌が確定、あるいは推定できたことになり、そのなかで細菌とウイルスの混

合感染と思われる例は5.8%であった。これ以外にも原因菌不明例のなかにウイルス陽性例が2.0%認められた。

以上の結果から、細菌とウイルスに対する real-time PCR 法を新規抗菌薬の臨床試験に導入することはきわめて有用であると結論された。

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—。Jpn J Antibiot 1999; 52 (Suppl B): 4-13
- 2) 生方公子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 長谷川恵子, 紺野昌俊：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 2002; 50: 794-804
- 3) 生方公子, 小林玲子, 千葉菜穂子, 長谷川恵子, 紺野昌俊：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 2003; 51: 60-70
- 4) 山中 昇：変貌する急性中耳炎 ペニシリン耐性肺炎球菌性中耳炎の現状と対策, 金原出版, 東京, 2000
- 5) Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, Aoki Y, Hasegawa K, Kobayashi R, et al: Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. J Clin Microbiol 2006; 44: 1440-6
- 6) Hamano-Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, Chiba N, Takayanagi R, Iwata S, et al: Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia. J Infect Chemother 2008; 14: 424-32
- 7) Centers for Disease Control and Prevention (CDC), specimen collection and transport guidelines: <http://www.cdc.gov/index.htm>
- 8) Nakayama E, Hasegawa K, Morozumi M, Kobayashi R, Chiba N, Iitsuka T, et al: Rapid optimization of antimicrobial chemotherapy given to pediatric patients with community-acquired pneumonia using PCR techniques with serology and standard culture. J Infect Chemother 2007; 13: 305-13
- 9) Mogens K: *Haemophilus*. In Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Tenover F C, Tenover P C (eds.), Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2003; p. 623-35
- 10) Ruoff K L, Whitley R A, Beighton D: *Streptococcus*. In Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Tenover F C, Tenover P C (eds.), Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2003; p. 405-21
- 11) Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs M R, et al: Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microb Drug Resist 2003; 9: 39-46
- 12) Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K, Davies T A, Jacobs M R, Ubukata K, et al: Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and β -lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 915-8
- 13) Ubukata K, Muraki T, Igarashi A, Asahi Y, Konno M: Identification of penicillin and other β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. J Infect Chemother 1997; 3: 190-7
- 14) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, 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 2001; 45: 1693-9
- 15) 生方公子：肺炎球菌におけるペニシリン耐性機構。臨床と微生物 1995; 22: 137-44
- 16) 生方公子, 紺野昌俊：ペニシリン耐性肺炎球菌の臨床分離株における薬剤耐性機構について—ペニシリン結合蛋白とPBP2B遺伝子の解析—。Chemother 1994; 42: 1225-35
- 17) 日本耳科学会・日本小児耳鼻咽喉科学会・日本耳鼻咽喉科感染症研究会 編：小児急性中耳炎診療ガイドライン 2006年版, 金原出版, 東京, 2006
- 18) 肺炎球菌等による市中感染症研究会, 1998; 1: 4-5
- 19) Pichichero M E, Pichichero C L: Persistent acute otitis media: I. Causative pathogens. Pediatr Infect Dis J 1995; 14: 178-83
- 20) Sagai S, Suetake M, Yano H, Yoshida M, Ohyama K, Endo H, et al: Relationship between respiratory syncytial virus infection and acute otitis media in children. Auris Nasus Larynx 2004; 31: 341-5
- 21) Soriano F: Microbial etiologies of acute otitis media. Clin Microbiol Infect 1997; Suppl 3: 23-5
- 22) Sung B S, Chonmaitree T, Broemeling L D, Owen M J, Patel J A, Hedgpeth D C, et al: Association of rhinovirus infection with poor bacteriologic outcome of bacterial-viral otitis media. Clin Infect Dis 1993; 17: 38-42

Real-time PCR detection of causative microorganisms in pediatric patients with acute otitis media in clinical phase III tebipenem-pivoxil studies

Kimiko Ubukata, Miyuki Morozumi, Naoko Chiba and Keiko Hamano-Hasegawa

Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents, Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, Japan

We used real-time PCR, together with conventional bacterial culture, to detect bacteria and viruses and heighten the accuracy of detecting causative microorganisms in Phase III clinical trials of tebipenempivoxil (TBPM-PI), an oral carbapenem antibiotic, in pediatric patients with acute otitis media (AOM).

Of 399 subjects, 224 (56.1%) showed positive results in culture and real-time PCR. In 41 (10.3%), *pbp* genes mediating β -lactam resistance of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* were identified by conventional PCR after real-time PCR, but cultivation was negative. In 47 (11.8%), no resistance genes were identified by conventional PCR even though real-time PCR was positive. In addition, 8 subjects (2.0%) were virus-positive.

Isolates determined to be causative microorganisms were *S. pneumoniae*, with 117 isolates in 116 subjects; *H. influenzae* with 112 isolates; *Streptococcus pyogenes* in 8 subjects; *Moraxella catarrhalis* with 7 isolates, and *Staphylococcus aureus* with 2 isolates. Bacteria showing positive results alone in real-time PCR were mostly *S. pneumoniae* and *H. influenzae*. A high correlation ($\gamma = 0.9369$ to 0.9710) between the number of bacteria in culture and Ct value of the positive reaction in real-time PCR was noted in *S. pneumoniae* and *H. influenzae*.

According to AOM guidelines published in 2006, severe cases are significantly more in whom organisms were isolated ($P < 0.0001$).

We concluded that real-time PCR use in clinical studies increases the accuracy of detecting causative microorganisms.