

【原著・基礎】

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—

生方 公子^{1)a)}・小林 玲子^{2)a)}・千葉菜穂子^{2)a)}・長谷川恵子^{3)a)}・紺野 昌俊^{4)b)}¹⁾北里大学・北里生命科学研究所*²⁾明治製菓株式会社薬品総合研究所³⁾北里大学大学院感染制御科学府・感染免疫専攻⁴⁾帝京大学名誉教授肺炎球菌等による市中感染症研究会: ^{a)}疫学解析担当, ^{b)}代表世話人

(平成 15 年 1 月 14 日受付・平成 15 年 2 月 3 日受理)

1998 年から 2000 年の 3 年間に、「肺炎球菌等による市中感染症研究会」に参加の 187 施設より収集された総計 6,692 検体を解析対象とした。重複例を除く 4,030 例の疾患は、急性中耳炎 (n=1,425)、急性上気道炎 (n=961)、急性気管支炎 (n=390)、肺炎 (n=175) の順であった。肺炎球菌は上咽頭ぬぐい液 (n=2,869) からもっとも高率に分離された (56.6%)。次いで耳漏 (21.4%) と鼓膜切開液 (29.9%) であった。成人由来の喀痰 (n=74) からの分離率は 39.2% であった。すべての分離菌株に対し、菌種の同定と薬剤耐性を識別するための PCR を実施した。すなわち、(i) *LytA* 遺伝子、(ii) *pbp 1a* 遺伝子、(iii) *pbp 2x* 遺伝子、(iv) *pbp 2b* 遺伝子、(v) *ermB* 遺伝子、(vi) *mefA* 遺伝子の各遺伝子である。これらの菌株の莢膜血清型別は抗血清を用いた莢膜膨化試験によって同時に実施した。本菌に対する経口 14 薬剤の感受性測定は寒天平板希釈法によって測定した。解析対象となった 1,945 株の penicillin G に対する MIC₉₀ と耐性遺伝子との関係は、PSSP (304 株, 0.031 µg/mL), *pbp 2x* 変異の PISP (386 株, 0.063 µg/mL), *pbp 2b* 変異の PISP (13 株, 0.25 µg/mL), *pbp 1a + pbp 2x* 変異の PISP (179 株, 0.25 µg/mL), *pbp 1a + pbp 2b* 変異の PISP (3 株), *pbp 2x + pbp 2b* 変異の PISP (106 株, 0.5 µg/mL), *pbp 1a + pbp 2x + pbp 2b* 変異の PRSP (954 株, 4 µg/mL) という内訳であった。マクロライド耐性にかかわる *mefA* 遺伝子保持株は 635 株, *ermB* 遺伝子保持株は 796 株, 両者保持株が 85 株であった。PSSP, PISP, および PRSP の血清型には明らかな偏りがみられた。PSSP にはさまざまな血清型が認められたが, PISP のなかの *pbp 2x* 変異株では 3 型と 6 型が多く, その他の PISP では 14 型, 23 型, 6 型が優位であった。PRSP では 19 型, 6 型, 23 型, 14 型で 94.2 % を占めた。PRSP のなかには, β-ラクタム系薬の抗菌力がさらに低下している株, あるいは新たな血清型の菌株も認められはじめた。このような成績から, 今後とも分子疫学解析にもとづいたサーベイランスが必要であると結論された。

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, PRSP, surveillance, antibiotic susceptibility, serotyping

呼吸器感染症あるいは化膿性髄膜炎の起炎菌として、肺炎球菌はインフルエンザ菌と共に重要な位置を占めている。現在世界的に問題となっているペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) がはじめて報告されたのは 1977 年のことである¹⁾。そして 1980 年代になると、ペニシリンが優位に使用されている国々において次第に臨床上的問題となってきた²⁾。しかし、本邦においては 1980 年代の後半まで PRSP は臨床上でほとんど問題となっていない³⁾。凍結保存株について耐性遺伝子の解析を行った成績でも、1987 年前後に分離されて

いたのはペニシリン軽度耐性肺炎球菌 (PISP) のみである⁴⁾。

わが国において PRSP と思われる化膿性髄膜炎がはじめて報告されたのは 1988 年のことであるが⁵⁾、1990 年代に入ると、基準薬である penicillin G (PCG) に対する MIC が $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ と低下した株が臨床検査材料から急速に分離されはじめた。そのことが全国規模の「PRSP 研究会」を組織し、1993 年から足掛け 4 年にわたって本邦における耐性肺炎球菌の疫学調査を実施するきっかけとなった。これらの研究によって、市中において発症する呼吸器感染症由来の

*東京都港区白金 5-9-1

肺炎球菌において、耐性化が急速に進行していることが明らかにされた^{6,7)}。

しかし、上述した研究会は細菌検査室の協力で組織された性格上、耐性菌の増加が臨床にもたらす問題点を明確にすることはできなかった。そのため、多くの医師が参加した「肺炎球菌等による市中感染症研究会（代表世話人：紺野昌俊）」が1997年末に組織され、1998年から3年間にわたって研究が行われた。各年次の成績についてはすでに報告してあるが^{8,9)}、この論文では、3年間にわたる全体について、対象症例の内訳、分離菌の薬剤耐性遺伝子解析と薬剤感受性との関係、あるいは血清型別との関係について調べた成績を報告する。

I. 材料と方法

1. 収集菌株

市中感染症研究会参加施設のうち、187施設から3年間にのべ6,692検体の送付を受けた。これらの検体の細菌培養は既報¹⁰⁾のとおりである。菌種の同定は、*a*溶血性のコロニーに対し、後述する自己融解酵素遺伝子(*LytA*)の存在がPCRによって確認できたもののみとした。該当する菌は再度単離培養を実施し、血清型別を行った後、薬剤感受性検査を実施するまでの間、10%スキムミルク培地に濃厚に接種して-80℃に保存した。

2. PCR

臨床分離株の肺炎球菌に見出されるペニシリン結合蛋白(PBPs)のうち、PBP 1A, PBP 2X, およびPBP 2Bをコードするそれぞれの遺伝子上には、多数の変異が認められるが、そのなかでも特にβ-ラクタム系薬の耐性化に影響するアミノ酸置換のあることを、われわれは報告している¹¹⁻¹³⁾。すなわち、保存性アミノ酸配列、あるいはその近位に位置する置換が耐性化に重要であることが明らかにされ、耐性菌検索用の各primerはそれらの成績をもとに設計されている¹⁴⁾。

溶菌液の組成、溶菌液への釣菌、PCR反応液などPCR実行上の一連の方法は、すでに報告¹⁴⁾したとおりである。なお、PCRで検索する遺伝子は、(i)菌種同定のための*LytA*遺伝子、(ii)*pbp 1a*遺伝子、(iii)*pbp 2x*遺伝子、(iv)*pbp 2b*遺伝子、(v)*mefA*遺伝子、(vi)*ermB*遺伝子で、反応に際しては2遺伝子ずつのmultiplex検索とした。

3. 耐性菌の識別

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)によって勧告されている肺炎球菌に対する各種抗菌薬のブレイクポイントは、欧米におけるヒトへの投与量にもとづいて設定されており、基準薬のPCGについては、PSSPは $\leq 0.063 \mu\text{g/mL}$ 、PISPは $0.125 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ 、そしてPRSPは $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ となっている。しかし、結果に示すように、NCCLSの勧告にしたがうと、なだらかな2峰性分布の耐性菌側をPISPとPRSPとに2分することとなり、生物学的手法の誤差を

考えると試験管1本の違いを判定することになる。

そのような理由から、この論文においては、上述した3種の*pbp*遺伝子解析にもとづいて、3つの*pbp*遺伝子に変異の認められない株をPSSP、1~2遺伝子に変異のある株をPISP、3遺伝子に変異した株をPRSPとして記述することにした。また、PISPのなかの*pbp 2x*単独変異株はPCGをはじめとする各種β-ラクタム系薬に対する感受性がその他のPISPとやや異なるので分けて記載することにした。

マクロライド薬耐性については、*mefA*遺伝子保持株は軽度耐性、*ermB*保持株は高度耐性とした。

4. 薬剤感受性

各種抗菌薬に対する感受性は既報¹⁴⁾にしたがい、寒天平板希釈法によって測定した。

被験薬剤はPCG, ampicillin (ABPC), amoxicillin (AMPC), cefaclor (CCL), cefdinir (CFDN), cefpodoxime (CPDX), cefditoren (CDTR), cefcapene (CFPN), faropenem (FRPM), levofloxacin (LVFX), erythromycin (EM), azithromycin (AZM), rokitamycin (RKM), clindamycin (CLDM)の14薬剤とした。それぞれの薬剤は当該企業から分与を受けたものか、あるいは国立感染症研究所から購入して力価の明らかなものを使用した。

-80℃に保存した被験菌株は、血液寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン(株)）に塗布し、37℃、5%炭酸ガス濃度の培養条件として前培養を2回繰り返した。

被験菌は、18時間前培養した2回目の培地上より2mLのTodd Hewitt broth (Difco Laboratories)にMcFarland (MF)が0.5となるように釣菌、綿羊脱繊維血液を100 μL 加えた後、37℃で5~6時間培養し、接種菌液とした。

当日あらためて前培養を行ったのは、接種菌量のバラツキによるMICの変動を防ぐためである。最終的な接種菌量は $1 \times 10^5 \text{ CFU/spot}$ 前後である。MICは、37℃、5%炭酸ガス濃度下にて18時間培養後に判定した。

5. 血清型別

肺炎球菌の血清型別は、型別用抗血清(Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark)を入手し、添付された能書にしたがって莢膜膨化試験を行い判定した。

II. 結果

1. 症例の背景と肺炎球菌検出状況

1) 疾患別肺炎球菌の分離率

担当医によって検体送付時に同封される「細菌検索申込み用紙」に記載された疾患の集計成績をTable 1に示す。検体数としては6,692検体が解析されたが、1症例で上咽頭ぬぐい液と耳漏などの2検体がpairとして送付されてきた例、あるいは繰り返し検索が施行された例を相当数認めた。そのため、1症例1検体として集計す

Table 1. Diseases of patients providing clinical samples

Diseases	No. of patients	(%)	<i>S. pneumoniae</i> positive	(%)
Acute otitis media	1,425	35.4	783	54.9
Acute upper respiratory tract infection*	961	23.8	430	44.7
Pharyngo-laryngitis	10	0.2	2	20.0
Acute bronchitis	390	9.7	170	43.6
Pneumonia	175	4.3	85	48.6
Sepsis	4	0.1	4	100.0
Otitis media with effusion	16	0.4	7	43.8
Sinusitis	114	2.8	44	38.6
Other	65	1.6	14	21.5
Unknown	870	21.6	442	50.8
Total	4,030	100.0	1,981	

*Pharyngitis, tonsillitis, nasopharyngitis, rhinitis, etc, were included.

$\chi^2=63.8762$, $n=8$, $p=0.0000$ (**)

ると、急性中耳炎の1,425例(35.4%)がもっとも多く、次いで上気道炎の961例(23.8%)、急性気管支炎の390例(9.7%)で、その他に、肺炎と副鼻腔炎がそれぞれ176例(4.4%)と114例(2.8%)含まれ、症例としては3年間で4,030例が対象となった。なお、送付時に疾患名の記載がなかった場合は疾患名不明とした。

疾患ごとの症例数には偏りがあるものの、それぞれの肺炎球菌分離率は、急性中耳炎、肺炎などで分離率が高く、次いで急性上気道炎、急性気管支炎であり、咽喉頭炎や副鼻腔炎ではやや低いという成績であった($\chi^2=63.8762$, $p=0.0000$ (**))。

2) 年齢別肺炎球菌の分離率

Fig. 1には対象症例の年齢分布と肺炎球菌の検出状況を示す。症例のピークは1歳($n=975$)に認められ、全体の1/4を占めていた。症例数は2歳以降暫時減少した。各年齢層における肺炎球菌の分離率は、1~5歳までは平均50%以上と高率であったが、それ以上の年齢層における分離率は低下した。成人例は少なく、各年

齢層とも10~20%台の分離率であった。

3) 検査材料別の肺炎球菌分離率

Table 2には送付を受けた検査材料別の肺炎球菌の分離率を示す。大多数の症例が6歳以下であったことと、疾患としては急性中耳炎や急性上気道炎、急性気管支炎が多くを占めていたことから、検査材料のほとんどは上咽頭ぬぐい液で、次いで耳漏、鼓膜切開液、咽頭ぬぐい液の順であった。

検査材料別にみた肺炎球菌の分離率は上咽頭ぬぐい液が56.6%と有意に高く、咽頭が27.5%、鼓膜切開液が29.9%、耳漏が21.4%であった。喀痰では検索対象74例のうち29例(39.2%)から本菌が検出されていた。

検査材料からの肺炎球菌の検出率について有意差検定を行うと $\chi^2=405.3641$, $p=0.0000$ (**)となり、検査材料によって検出率に違いがみられるという成績であった。

また、ここではTableとして示さなかったが、分離された肺炎球菌に占めるPRSPとPISPの割合は耳漏、上咽頭ではやや高率であったが、他の検査材料との間に

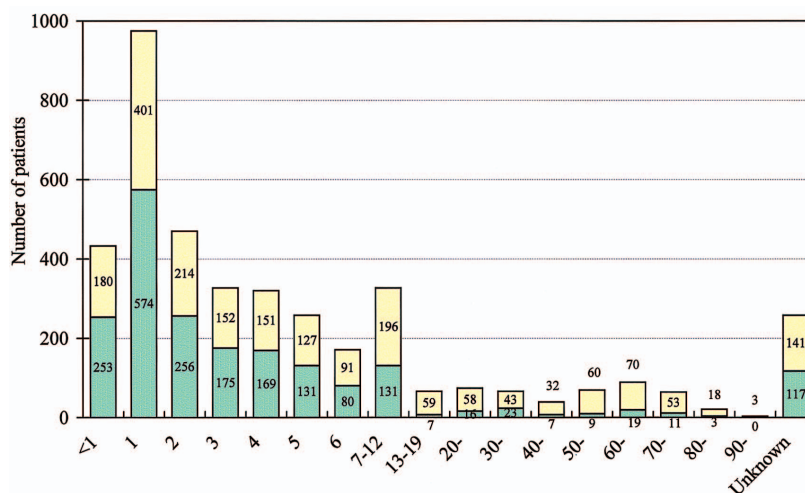


Fig. 1. Isolation frequency of *Streptococcus pneumoniae* by patient age.

Table 2. Clinical samples examined in this study and positive rate of *Streptococcus pneumoniae*

Clinical sample	No. of samples	(%)	<i>S. pneumoniae</i> positive	(%)
Epipharynx	2,869	58.9	1,625	56.6
Throat	400	8.2	110	27.5
Ear discharge	646	13.3	138	21.4
Tympanotomy exudate	432	8.9	129	29.9
Nasal discharge	218	4.5	82	37.6
Tonsil	17	0.3	2	11.8
Sputum	74	1.5	29	39.2
Other	84	1.7	42	50.0
Origin unknown	132	2.7	38	28.8
Total	4,872		2,195	

$$\chi^2 = 405.3641, p = 0.0000 (**)$$

有意差は認めなかった ($\chi^2 = 6.6571$, $p = 0.1552$)。

2. 薬剤耐性遺伝子の有無と各種抗菌薬感受性との関係

1) 経口β-ラクタム系薬およびLVFX

PCR 法によって解析した *pbp* 遺伝子変異と β-ラクタム系薬 9 薬剤、および LVFX の MIC との関係は Table 3 および Fig. 2 に示す。集計に際しては 1 症例で同一の血清型と薬剤耐性型の菌が繰り返し検出されていた場合には、初回分離時の菌のみを集計対象とした。最終的には 1,945 株となった。

遺伝子学的に解析した区分にしたがって被験菌株を分けると、①primer とした塩基配列に遺伝子変異の認められない PSSP が 304 株 (15.6%)、②*pbp 2x* 単独変異の PISP が 386 株 (19.8%)、③*pbp 1a + pbp 2x* 変異の PISP が 179 株 (9.2%)、④*pbp 2x + pbp 2b* 変異の PISP が 106 株 (5.4%)、⑤*pbp 1a + pbp 2x + pbp 2b* 変異の PRSP が 954 株 (49.0%) の割合であった。Table には示さなかったが、それ以外に *pbp 2b* 単独変異株が 13 株 (0.7%)、*pbp 1a + pbp 2b* 変異株が 3 株 (0.2%) 認められた。

Fig. 2 に示した基準薬である PCG の MIC 分布をみると、いぜんとして緩やかな 2 峰性を示しており、PSSP は $\leq 0.063 \mu\text{g/mL}$ 、PISP は $0.125 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ 、および PRSP は $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ とする NCCLS のブレイクポイントでは必ずしも明瞭に識別できないことが示された。それに対し、それぞれの遺伝子変異と MIC との関係を見ると、同一遺伝子変異を有する 95% の菌株の MIC が試験管 3 管以内に収まっていた。特に耐性側に位置する $0.5 \sim 4 \mu\text{g/mL}$ の MIC を示す菌は、対象とした *pbp* 遺伝子がすべて変異している菌株であった。

遺伝子変異のない PSSP の MIC₉₀ は $0.031 \mu\text{g/mL}$ 、*pbp 2x* 単独変異株のそれは $0.063 \mu\text{g/mL}$ 、*pbp 1a + pbp 2x* 変異株は $0.25 \mu\text{g/mL}$ 、*pbp 2x + pbp 2b* 変異株は $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、*pbp 1a + pbp 2x + pbp 2b* 変異株の MIC は $4 \mu\text{g/mL}$ であった。

MIC と *pbp* 遺伝子変異との関係は他の β-ラクタム系薬でも明瞭で、特に AMPC は PCG よりも試験管 0.5 管程度全体的に感性側へ、ABPC では逆に耐性側へややシフトした成績であった。注目すべきは、ペニシリン系薬では後述するセフェム系薬に比べて *pbp 2x* 変異の影響が少なく、*pbp 2x* 単独変異株に対する MIC₉₀ は ABPC、AMPC とともに $0.125 \mu\text{g/mL}$ と優れていた。

一方、経口セフェム系薬の CPDX、CFDN、CDTR、および CFPN では、薬剤によって各 *pbp* 遺伝子変異による影響が微妙に異なるという特徴も見られたが、全体的には *pbp 2x* 変異の影響を強く受け、MIC はいずれも PRSP 側に大きくシフトしていた。ことに *pbp 2x* 単独変異株での MIC₉₀ は、CPDX が $1 \mu\text{g/mL}$ 、CFDN が $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、CDTR が $0.25 \mu\text{g/mL}$ 、CFPN が $0.5 \mu\text{g/mL}$ を示し、PSSP に対する MIC に比べると明らかに低下していた。

しかし、これらの経口セフェム系薬は *pbp 2b* 遺伝子変異の影響はあまり受けず、*pbp 2x + pbp 2b* 株のように 2 遺伝子が変異している株の MIC₉₀ は、*pbp 2x* 単独変異株のそれとほぼ同じレベルであった。*pbp 1a + pbp 2x* 変異株では *pbp 1a* と *pbp 2x* の両方の変異の影響を受け、CPDX の MIC₉₀ は $4 \mu\text{g/mL}$ 、CFDN では $4 \mu\text{g/mL}$ 、CDTR と CFPN では $1 \mu\text{g/mL}$ と 3 遺伝子が変異している PRSP に近い値を示した。

PRSP に対するそれぞれの薬剤の MIC₉₀ は、CPDX が $4 \mu\text{g/mL}$ 、CFDN が $8 \mu\text{g/mL}$ 、CDTR が $1 \mu\text{g/mL}$ 、そして CFPN が $1 \mu\text{g/mL}$ と、PSSP に比べて平均 32 ～ 64 倍低下している成績であった。

FRPM の結果は、ペニシリン系薬ときわめて似通っており、*pbp 2x* 変異の影響よりも *pbp 2b* 遺伝子変異の影響を強く受けていた。本薬剤の PRSP に対する MIC₉₀ は $0.5 \mu\text{g/mL}$ であった。

このような結果から CCL の成績をながめると、全体的な抗菌力は劣っているが、種々の遺伝子変異株に対し、CCL はペニシリン系薬とセフェム系薬のちょうど中間

Table 3. MICs of β -lactam antibiotics and levofloxacin for *Streptococcus pneumoniae* isolates distributed by PCR results for resistant genes

Antimicrobial agent and assigned group	No. of isolates for which the MIC ($\mu\text{g/mL}$) was:														MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	≤ 0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Penicillin G																
PSSP	6	88	186	24											0.031	0.031
<i>pbp 2x</i>		1	110	246	22	5	2								0.063	0.063
<i>pbp 1a + 2x</i>				28	81	53	15	1	1						0.125	0.25
<i>pbp 2x + 2b</i>				4	37	33	31	1							0.25	0.5
<i>pbp 1a + 2x + 2b</i>					1	2	62	155	548	184	2				2	4
Ampicillin																
PSSP	6	57	190	49	2										0.031	0.063
<i>pbp 2x</i>			45	215	110	11	4	1							0.063	0.125
<i>pbp 1a + 2x</i>			1	41	56	55	12	12	2						0.125	0.5
<i>pbp 2x + 2b</i>			4	6	27	36	19	13	1						0.25	1
<i>pbp 1a + 2x + 2b</i>					2	8	50	176	385	315	18				2	4
Amoxicillin																
PSSP	4	26	251	23											0.031	0.031
<i>pbp 2x</i>			58	225	65	36	2								0.063	0.125
<i>pbp 1a + 2x</i>				15	70	73	18	3							0.25	0.5
<i>pbp 2x + 2b</i>				8	23	56	17	2							0.25	0.5
<i>pbp 1a + 2x + 2b</i>						5	67	588	267	20	7				1	2
Cefaclor																
PSSP							178	97	29						0.5	1
<i>pbp 2x</i>							18	229	131	8					1	2
<i>pbp 1a + 2x</i>										103	36	27	7	6	4	16
<i>pbp 2x + 2b</i>								8	39	51	8				4	4
<i>pbp 1a + 2x + 2b</i>												109	311	534	≥ 64	≥ 64
Cefpodoxime																
PSSP		41	116	73	30	32	12								0.031	0.25
<i>pbp 2x</i>				2	23	159	128	43	30	1					0.5	1
<i>pbp 1a + 2x</i>					1	14	9	14	94	40	5	1	1		2	4
<i>pbp 2x + 2b</i>			1	3	18	55	20	4	3	2					0.25	0.5
<i>pbp 1a + 2x + 2b</i>						4	8	99	606	204	15	13	5		2	4
Cefdinir																
PSSP			1	161	73	52	17								0.063	0.25
<i>pbp 2x</i>					15	194	167	7	3						0.25	0.5
<i>pbp 1a + 2x</i>						16	20	39	78	15	11				2	4
<i>pbp 2x + 2b</i>			1	3	15	29	50	2	4	2					0.5	0.5
<i>pbp 1a + 2x + 2b</i>						10	14	92	335	472	22	6	3	8	8	8
Cefditoren																
PSSP	28	183	49	38	5	1									0.016	0.063
<i>pbp 2x</i>		1	3	107	203	67	5								0.125	0.25
<i>pbp 1a + 2x</i>				5	23	20	85	45	1						0.5	1
<i>pbp 2x + 2b</i>		1	4	22	58	16	5								0.125	0.25
<i>pbp 1a + 2x + 2b</i>					8	105	594	225	16	3	3				0.5	1
Cefcapene																
PSSP	37	152	56	39	17	3									0.016	0.063
<i>pbp 2x</i>				70	105	131	72	8							0.25	0.5
<i>pbp 1a + 2x</i>					13	31	85	35	15						0.5	1
<i>pbp 2x + 2b</i>				3	4	49	42	8							0.25	0.5
<i>pbp 1a + 2x + 2b</i>					24	477	424	20	5	4					0.5	1
Faropenem																
PSSP	227	72	5												0.008	0.016
<i>pbp 2x</i>	171	206	5	4											0.016	0.016
<i>pbp 1a + 2x</i>	22	47	72	37		1									0.031	0.063
<i>pbp 2x + 2b</i>		2	37	41	25	1									0.063	0.125
<i>pbp 1a + 2x + 2b</i>			5	40	167	325	377	33	7						0.25	0.5
Levofloxacin																
PSSP							35	110	158	1					2	2
<i>pbp 2x</i>							42	192	143	9					1	2
<i>pbp 1a + 2x</i>							34	100	45						1	2
<i>pbp 2x + 2b</i>							27	71	7	1					1	1
<i>pbp 1a + 2x + 2b</i>							174	588	186	6					1	2

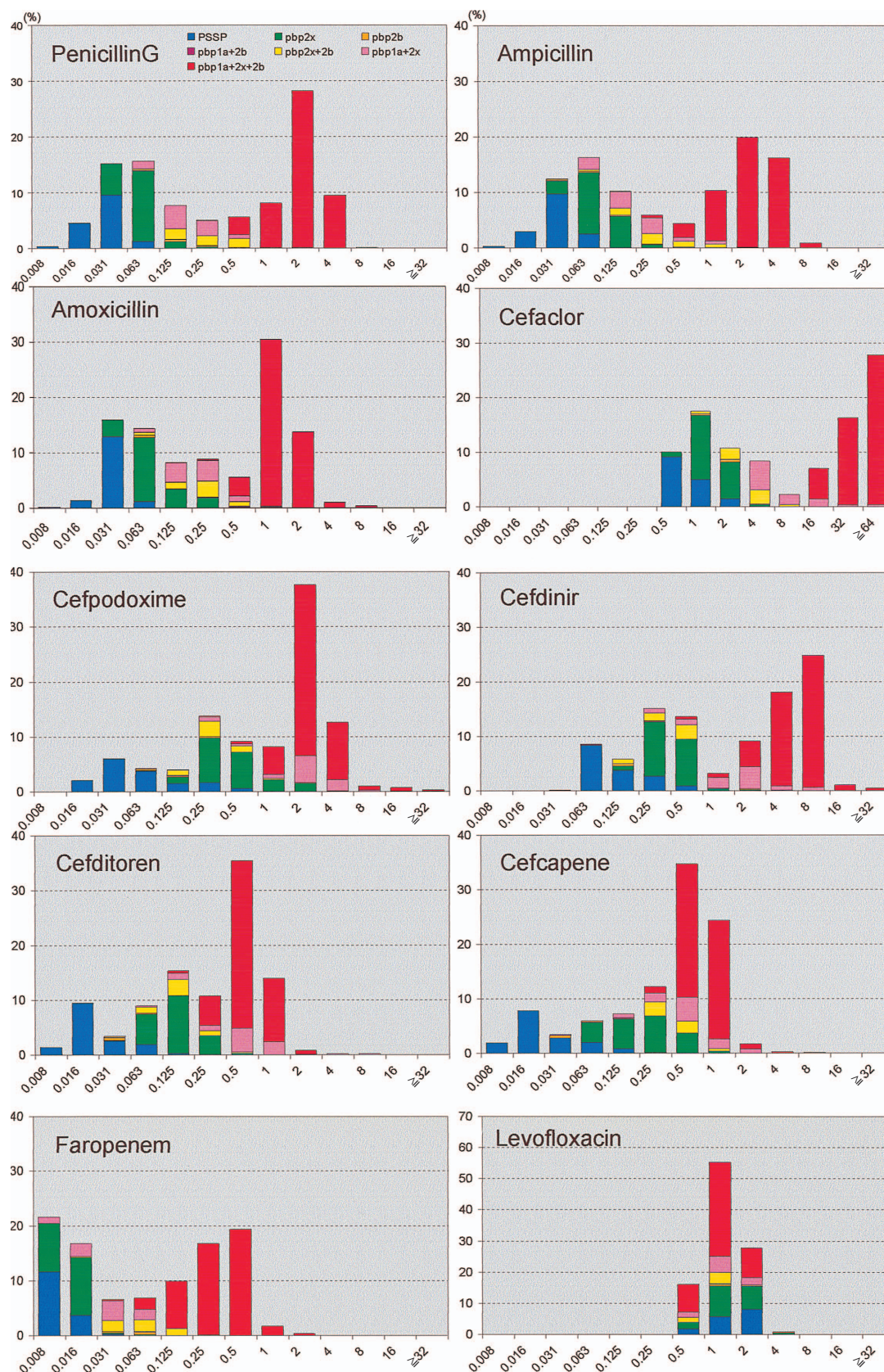


Fig. 2. Susceptibility distributions of oral 9 β -lactam and levofloxacin agents to 1,945 clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. These isolates were classified into 7 types following PCR results for *pbp 1 a*, *pbp 2 x*, and *pbp 2 b* genes.

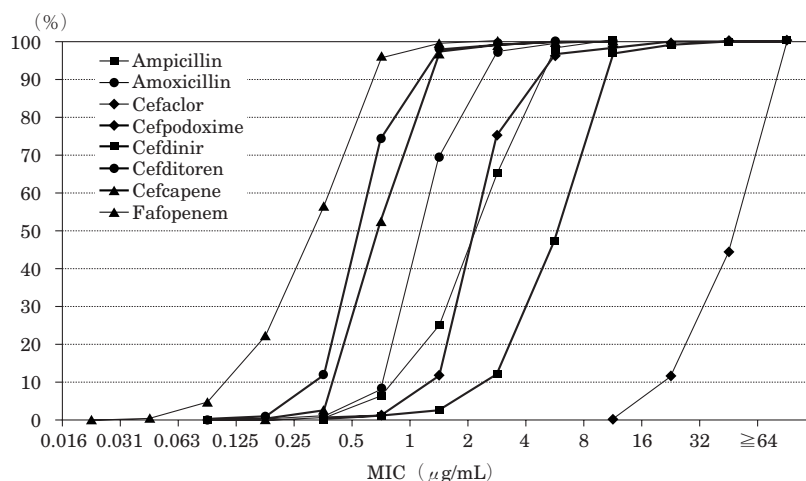


Fig. 3. Cumulative curves of oral β -lactam antibiotics for 954 strains of PRSP possessing abnormal *pbp 1a*, *pbp 2x*, and *pbp 2b* genes.

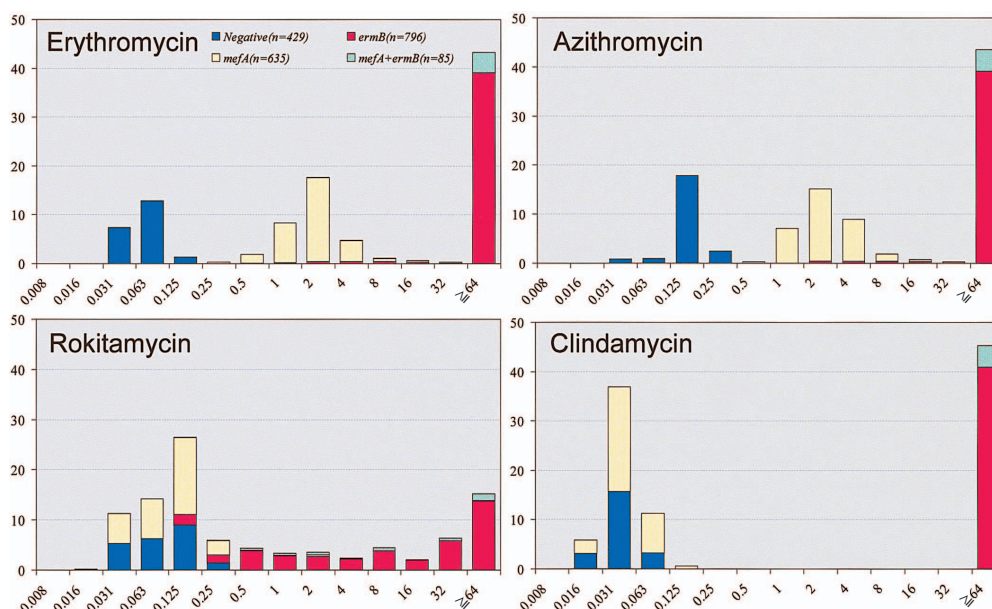


Fig. 4. Susceptibility distributions of erythromycin, azithromycin, rokitamycin, and clindamycin to 1,945 clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. These isolates were classified into 4 types following PCR results for *mefA* and *ermB* genes.

的な挙動を示すことが明らかにされた。すなわち, *pbp 2x* 単独変異株に対する MIC_{90} は $2 \mu\text{g/mL}$, *pbp 1a* + *pbp 2x* 変異株に対するそれは $16 \mu\text{g/mL}$, PRSP には $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ であった。

Table 3 の下段に示した LVFX の MIC は, 大多数の肺炎球菌に対し $0.5 \sim 2 \mu\text{g/mL}$ の値を示し, MIC_{90} は $2 \mu\text{g/mL}$ であった。しかし, 明らかなキノロン耐性を思わせる菌株は認めなかった。

2) PRSP に対する経口 β -ラクタム系薬の感受性累積分布

Fig. 3 には 3 種の *pbp* 遺伝子変異した PRSP 株に対する経口 β -ラクタム系薬 8 薬剤の感受性累積分布を示す。これらの薬剤は累積分布の上からは 3 つのグル

ープに区別できた。すなわち, MIC_{90} が $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ の FRPM, CDTR, および CFPN のグループ, MIC_{90} が $2 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ とやや劣る AMPC, ABPC, CPDX, および CFDN のグループ, そして $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ の CCL である。

3) マクロライド系薬および CLDM 感受性と耐性遺伝子との関係

マクロライド耐性遺伝子の *mefA* 遺伝子および *ermB* 遺伝子の有無と EM, AZM, RKM, および CLDM の抗菌力との関係を Fig. 4 に示す。*mefA* 遺伝子保持株は 635 株 (32.6%), *ermB* 遺伝子保持株は 796 株 (40.9%), 両遺伝子保持株は 85 株 (4.4%), 耐性遺伝子をもたない株は 429 株 (22.0%) に過ぎなかった。

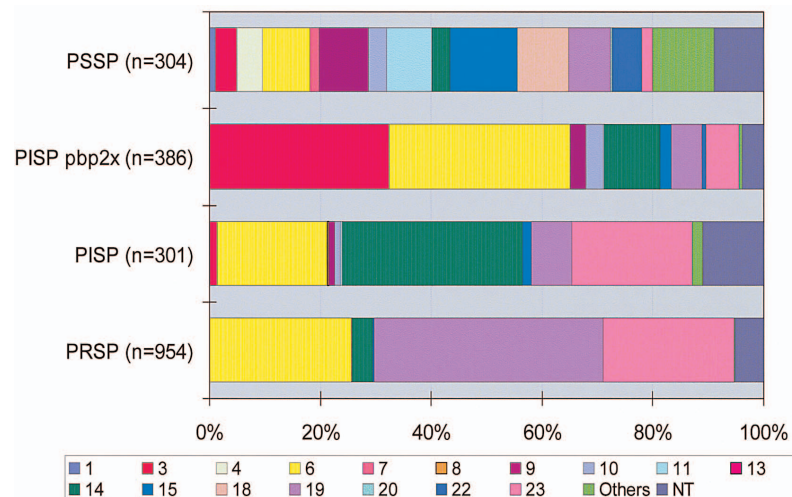


Fig. 5. Characteristics of capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates classified into PSSP, PISP, and PRSP based on PCR results for *pbp* genes. Serotype was determined by quelling reaction with antiserum. $\chi^2 = 1,900.2355$, $n = 51$, $p = 0.0000$ (**)

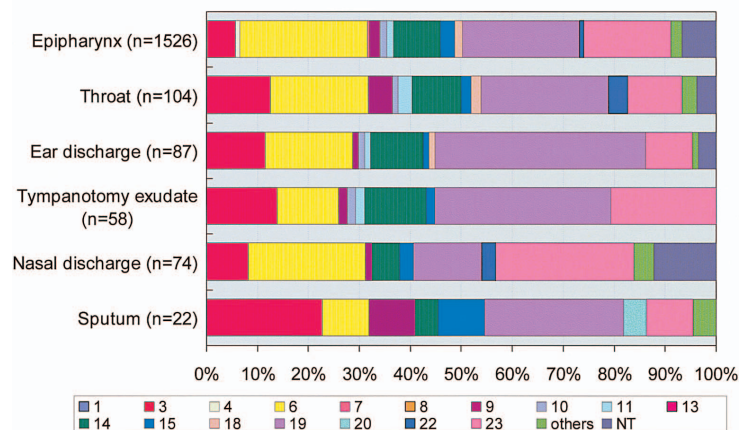


Fig. 6. Characteristics of capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates differentiated among clinical samples. $\chi^2 = 202.5302$, $n = 85$, $p = 0.0000$ (**)

EM と AZM では、*mefA* 遺伝子保持株の MIC₉₀ は感性菌に比べ 10 倍以上低下しており、ともに 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。この傾向は、Fig. には示さなかったが clarithromycin でも同様であった。一方、16 員環マクロライド系薬である RKM およびリンコマイシン系薬の CLDM は *mefA* 遺伝子保持株に対して感性株と同一レベルの MIC₉₀ を示し、それぞれの MIC₉₀ は 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 0.063 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

ermB 遺伝子保持株に対しては、RKM では MIC が軽度耐性から高度耐性まで幅広く分布していたが、その他のマクロライド系薬あるいはリンコマイシン系薬は $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$ の高度耐性を示した。*mefA* と *ermB* 遺伝子の両遺伝子保持株の MIC は *ermB* 遺伝子保持株と同じレベルであった。

なお、ここには示していないが、3 年間の各耐性遺伝子別にみた菌株の分離率には有意な年次的変動は認めら

れなかった。

4) 薬剤感受性と血清型別

Fig. 5 には PSSP, PISP (*pbp 2x* 単独変異), PISP (*pbp 1a + pbp 2x*, *pbp 2x + pbp 2b* など), および PRSP に識別した菌株の血清型別の成績を示す。各耐性型で血清型には有意な差が見られた ($\chi^2 = 1900.2355$, $p = 0.0000$ (**))。

すなわち、PSSP では 9 型, 11 型, 15 型をはじめとするさまざまな血清型の菌が分離されているのに対し、*pbp 2x* 単独変異株では 3 型と 6 型が 65% を占めていた。また、3 型の大多数はムコイド型の菌であった。*pbp 2x* 単独変異株以外の PISP では 14 型 (32.6%) がもっとも多く分離され、次いで 23 型 (22.0%) と 6 型 (20.0%) で、この 3 つの血清型の菌で全体の約 75% を占めていた。残りの 25% は 19 型が 7%, その他に 3 型, 9 型, 10 型, 15 型がわずかずつ認められた。

一方、PRSPでは19型が41.4%と高頻度に認められ、次いで6型と23型がそれぞれ25.5%と23.6%含まれ、この3つのタイプで90.5%を占めた。その他には14型が3.7%、9型が1株、15型が3株認められた。病原性に乏しい莢膜を有しない型別不能株は6.4%であった。

Fig. 6には検査材料別にみた血清型の成績を示す。上咽頭由来株の血清型は6型>19型>23型>14型の順であったが、咽頭ぬぐい液では19型>6型>3型>23型の順となった。一方、耳漏と鼓膜切開液では19型が多く、19型>6型>3型>23型>14型の順となり、なかでも3型の比率がやや高いのが注目された。鼻汁や鼻漏からの菌では、他の材料と異なり型別不能株と23型の割合が明らかに高かった。喀痰由来株は22株と少なかったが、3型、9型、15型が多く、6型は少ないという成績であった($\chi^2=202.5302$, $p=0.0000$ (**))。

III. 考 察

PRSPは経口ペニシリン系薬が第一選択薬として使用されてきた欧米において、1980年代のはじめから注目され、その疫学解析が大規模に行われてきた²⁾。

しかし、本邦においては1980年代の半ばまではPRSPの報告はなく、すでに存在していたとしてもきわめて低い頻度であったと推測される。本邦におけるPRSPによるはじめての症例は、1988年の化膿性髄膜炎例と思われる⁵⁾。

この頃よりディスクによる薬剤感受性試験において、PRSPの識別に推奨されてきたoxacillinディスク周囲に阻止円形成のみられない菌株が散見されるようになったことに気づいた。

そのようなことから、PRSPの疫学調査を目的として組織されたのが「PRSP研究会(代表; 紺野昌俊)」である。この研究会には48施設の細菌検査室が参加し、足掛け4年にわたって4,255株の解析が行われた。このサーベイランスによって、本邦においては急速に、しかも全国的にPRSPが増加しつつあり、その分離率は30~50%と高いことが明らかにされた。また、欧米の分離株とはやや異なっており、PCGには一見感性のようにみえるが、セフェム系薬に軽度耐性を示す菌株が多く分離されていることも明らかにされた。加えて、70%の株に対し、経口薬として使用頻度の高いマクロライド系薬、あるいはminocyclineの抗菌力も低下しており、多剤耐性化傾向にあることも指摘された⁴⁾。

それらの疫学成績、今回の「市中感染症研究会」によって収集された菌株に対する疫学成績、および共同研究による欧米の分離菌株の成績¹⁵⁾とを比較すると、分子遺伝学的レベルではいくつかの特徴がみられている。第一は、ペニシリン系薬が優位に使用されている欧米ではセフェム系薬よりもペニシリン系薬の抗菌力を低下させる*pbp 2b*遺伝子変異の関与するPISPが多いのに対し、本邦ではセフェム系薬の抗菌力を低下させる*pbp 2x*変

異の関与するPISPが多いということである。つまり、欧米では*pbp 2x*単独変異株は5%以下であるのに対し、日本では分離菌の20%が*pbp 2x*単独変異株で占められている。第二に、*mefA*遺伝子と*ermB*遺伝子のいずれかを保持するマクロライド系薬耐性菌は日本でも多いが、これらの分離率はPRSP研究会当時の成績と比較すると5%程度しか上昇しておらず、すでにプラトーに達しているとの印象を受けた。

β -ラクタム系薬の感受性成績については、耐性の主因はいくつかのPBP変異にもとづくものであるから、同じ系統の薬剤であっても、各PBPに対する親和性の相違から、それぞれのMICには微妙な相違が存在する⁴⁾。そして、ヒトにおけるそれぞれの体内動態(PK)から予測すると、いくつかの薬剤はすでにPISPやPRSPに対する細菌学的抗菌力を失っているという結果であった。マクロライド系薬も同様で、特に*ermB*遺伝子保持株に対してはすべてのマクロライド系薬とリンコマイシン系薬が細菌学的には無効であると判断される。

一方、ABPCとAMPCのPRSPに対する抗菌力は、経口セフェム系薬のCDTR、CFPN、あるいはFRPMに比べ劣ってはいたが、それぞれの薬剤の通常投与量時のPKとTime>MICとから各薬剤の有効率を算出すると、ペニシリン系薬の臨床効果は予想以上に優れていることが示された¹⁶⁾。特に、AMPCは*pbp 2x*単独変異株に対してPSSPに対するMICに近いレベルのMICを示すこと、血中濃度が5 $\mu\text{g/mL}$ 前後と高いことがその理由である。

わが国で開発された経口セフェム系薬は一般的に血中への移行が1 $\mu\text{g/mL}$ 前後であり、また、プロドラッグ化されているものも多く、吸収に個人差が大きい。そのような血中濃度や組織移行性の低さ、PRSPに対する殺菌力が必ずしも強いとはいえないことが、薬剤投与により上咽頭における常在細菌叢に選択圧を加え、その結果がPRSPを増加させ、保育園などの乳幼児が集団で生活している場を借りて市中に広がり、今日の急性中耳炎や上気道炎をはじめとする肺炎球菌が関与する感染症の遷延化あるいは難治化につながっていると考えられる。

また、本邦のPRSPはそのほとんどが*mefA*遺伝子か*ermB*遺伝子を保持していると考えた方がよいという結果も示されている。*mefA*遺伝子保持株に対する14員環マクロライド系薬のMICは1~8 $\mu\text{g/mL}$ であることから、一部の14員環マクロライド系薬も臨床的に有効ではないかといわれている。しかし、細菌学的に有効であったという証拠はなく、evidenceの蓄積が必要と考えられる。

キノロン薬に対しては、LVFXのみを対象としたが、キノロン薬の通常投与量におけるPKからみると、半数の菌株のMICはそれを上回っていることになる。欧米におけるニューキノロン薬の常用投与量の多くは本邦の

2 倍量であるが、その血中濃度の高低が DNA gyrase 変異によるキノロン耐性菌の出現につながっていることが指摘されており、PK と MPC との関係が論ぜられている¹⁷⁾。このことを考慮に入ると、本邦において欧米で指摘されるほどのキノロン耐性肺炎球菌が出現していない理由には、上述したように本邦での常用投与量では約半数の菌の MIC が血中濃度を上回っており、耐性菌出現の選択圧がかかっていなかった結果であるとも考えられる。はたして、本邦でキノロン耐性の肺炎球菌が少ないことを強調してよいのかとの疑問も湧いてくるのである。

いずれにしても、多くの経口抗菌薬において、血中濃度は必ずしも高くはならないのが現状であり、今後は変異による耐性菌を選択しないよう血中濃度を十分に高めるなどの工夫が必要であろう。ヒトの上咽頭に定着、増殖した PISP, PRSP を完全に死滅させることのできる抗菌薬はなくなっているということでもある。小児において多くみられる上気道感染症に限らず、PRSP による感染症に対しては、比較的抗菌力の優れた経口薬で許されている十分量を使用し、無効な際には注射薬に頼るしかないのが現状である。

菌の病原性と関係のある莢膜血清型については、「PRSP 研究会」の成績で明らかにしたように、PRSP においては 19 型、6 型、23 型、14 型が 95% を占めていた。今回もほぼ同じ傾向であったが、その他に 9 型、15 型の PRSP が出現しつつあることが示された。世界的には 35 型の PRSP も出現しはじめており、今後とも血清型の動向に注意が必要であろう。

pbp 2x 単独変異の PISP においては 3 型のムコイド株が圧倒的に多かったが、それ以外の PISP の血清型は肺炎例の血液から分離頻度の高い 14 型が優位であった。3 型菌は成人における難治性中耳炎の主たる起炎菌であり、小児が罹患するときわめて重篤な膿胸を惹起する。また、家族内感染菌としての報告もある。その他に 9 型、10 型、15 型などのさまざまなタイプに PISP が出現しつつあることが注目される。

最後に市中における PRSP の広がりとともに、派生的にもたらされている重症感染症について触れておきたい。1990 年代の中頃から、PRSP による小児の急性中耳炎や上気道感染症、あるいは肺炎例の増加と並行し、肺炎球菌性化膿性髄膜炎の増加が認められている¹⁸⁾。われわれが 2000 年より組織している「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究」の成績でもその一端がうかがえる。なかでも、免疫学的にもっとも未熟な時期にある生後 6 か月前後の乳幼児における発症例が圧倒的に多いが、最近では 30~60 歳代の成人において、本菌による化膿性髄膜炎例が増加していることである。2 年間にわたるサーベイランスの成績では、小児と成人の肺炎球菌性髄膜炎発症の比率は 2:1 となってきた（投稿論文準備

中）。そして、小児、成人例ともに、PRSP によって発症した例において予後不良例が多く認められている。症例数としては決して多くはないのかもしれないが、肺炎球菌による重症感染症例についても、起炎菌の分子疫学解析も含めた全国規模で継続性のある疫学調査がぜひとも必要である。

謝 辞

「肺炎球菌等による市中感染症研究会」に参加いただき、検査材料をお送りいただきました各施設の多くの関係各位に厚く御礼申し上げます。

同時に、研究会の運営に際し、ご協力を賜りました明治製菓株式会社・学術一部の穂坂賢也氏をはじめとする方々、ならびに解析に携わった小野暁子さんに深謝いたします。

文 献

- 1) Appelbaum P C, Bhamjee A, Scragg J N, et al. : *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. Lancet ii: 995~997, 1977
- 2) Klugman K P: Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin Microbiol Rev 3: 171~196, 1990
- 3) 柳瀬義男, 生方公子, 紺野昌俊, 他: 最近の小児科領域における肺炎球菌の性状について。小児科臨床 31: 59~65, 1978
- 4) 紺野昌俊, 生方公子: 改訂ペニシリン耐性肺炎球菌。協和企画通信, 東京, 1999
- 5) 有益 修, 目黒英典, 白石裕昭, 他: β -ラクタム剤が無効であった肺炎球菌髄膜炎の 1 例。感染症誌 62: 682~683, 1988
- 6) Ubukata K, Asahi Y, Okuzumi K, et al.: Incidence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan, 1993-1995. J Infect Chemother 2: 77~84, 1996
- 7) Ubukata K, Muraki T, Igarasi A, et al.: Identification of penicillin and other β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. J Infect Chemother 3: 190~197, 1997
- 8) 生方公子: 再検討が迫られる市中感染症。—PRSP, BLNAR を中心に—。J J Antibiotics 52 (Suppl. B): 4~13, 1998
- 9) 生方公子: 再検討が迫られる市中感染症。—PRSP, BLNAR を中心に—(第 2 報)。J J Antibiotics 54 (Suppl. B): 72~79, 2001
- 10) 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
- 11) Asahi Y, Ubukata K: Association of a Thr-371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 42: 2267~2273, 1998
- 12) Asahi Y, Takeuchi Y, Ubukata K: Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae*

- isolates. Antimicrob Agents Chemother 43: 1252~1255, 1999
- 13) Yamane A, Nakano H, Asahi Y, et al.: Directly repeated insertion of 9-nucleotide sequence detected in penicillin-binding protein 2 B gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 40: 1257~1259, 1996
 - 14) 千葉菜穂子, 小林玲子, 長谷川恵子, 他: 肺炎球菌に対するカルバペネム系薬の抗菌作用の比較. 日治療会誌 50: 161~170, 2002
 - 15) Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa 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 48: 915~918, 2001
 - 16) 生方公子: 薬剤耐性菌に対する抗菌薬の選択. 薬剤耐性菌による上気道・下気道感染症に対する治療戦略 (山中 昇, 横田俊平 編) 金原出版, 東京, 2002
 - 17) Blondeau J M, Zhao X, Hansen G, et al.: Mutant prevention concentration of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 45: 433~438, 2001
 - 18) 砂川慶介, 野々山勝人, 高山陽子, 他: 本邦における1997年7月以降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

Surveillance based on molecular epidemiology for *Streptococcus pneumoniae* isolates between 1998 and 2000 in Japan

—Results of clinical isolates collected by the Community-Acquired Bacterial Infections Working Group—

Kimiko Ubukata¹⁾, Reiko Kobayashi²⁾, Naoko Chiba²⁾,
Keiko Hasegawa³⁾ and Masatoshi Konno⁴⁾

¹⁾Laboratory of Infectious Agents Surveillance, Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

²⁾Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

³⁾Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University and Kitasato Institute for Life Sciences

⁴⁾Emeritus Professor, Teikyo University

The 6,692 clinical samples in this study were collected from 187 medical institutions participating in the Community-Acquired Bacterial Infections Working Group between 1998 and 2000 in Japan. Of 4,030 cases, duplicates excluded, acute otitis media (n=1,425), acute upper respiratory tract infection (n=961), acute bronchitis (n=390), and pneumonia (n=175) prevailed. *Streptococcus pneumoniae* was most frequently isolated from the epipharynx (56.6%), followed by ear discharge (21.4%) and tympanotomy exudates (29.9%). The percentage of *S. pneumoniae* isolates from sputum in adults was 39.2%. For all isolates, PCR was conducted to identify *S. pneumoniae* species and to detect resistant genes; (i) *Lyta* gene, (ii) *pbp 1a* gene, (iii) *pbp 2x* gene, (iv) *pbp 2b* gene, (v) *mefA* gene, and (vi) *ermB* gene. Capsular serotypes of these strains were also determined by quelling reactions with antisera. The *in vitro* activity of 14 oral antibiotics against these strains was determined by agar dilution. Correlation between the presence of abnormal *pbp* genes and MIC₉₀ values of penicillin G in these strains (n=1,945) was as follows: PSSP (n=304, 0.031 μ g/mL), PISP with abnormal *pbp 2x* gene (n=386, 0.063 μ g/mL), PISP with abnormal *pbp 2b* gene (n=13, 0.25 μ g/mL), PISP with abnormal *pbp 1a* + *pbp 2x* genes (n=179, 0.25 μ g/mL), PISP with abnormal *pbp 1a* + *pbp 2b* genes (n=3), PISP with abnormal *pbp 2x* + *pbp 2b* genes (n=106, 0.5 μ g/mL), and PRSP with abnormal *pbp 1a* + *pbp 2x* + *pbp 2b* genes (n=954, 4 μ g/mL). Strains having either *mefA* gene or *ermB* gene, mediating macrolide resistances, were 635 and 796. Some 85 strains had both *mefA* and *ermB* genes. Distributions of serotypes showed distinctly different characteristics among PSSP, PISP, and PRSP. Various serotypes were found in PSSP. Serotypes 3 and 6 were predominant in PISP with abnormal *pbp 2x* gene. Serotypes 14, 23, and 6 were most frequent in the other PISP. Serotypes 19, 6, and 23 accounted for 94.2% of PRSP. β -lactam antibiotic resistance appears to be evolving and PRSP having a new serotype was detected. In conclusion, continuous surveillance is required, based on molecular analysis of resistant genes for *S. pneumoniae*.