

【原著・基礎】

Tebipenem pivoxil の小児臨床試験における肺炎球菌の PCR 法による
耐性遺伝子解析と抗菌薬感受性

生方 公子・千葉菜穂子・諸角美由紀・濱野（長谷川）恵子

北里大学大学院感染制御科学府病原微生物分子疫学研究室*

(平成 20 年 9 月 26 日受付・平成 20 年 12 月 15 日受理)

小児を対象とした tebipenem pivoxil (TBPM-PI) の臨床第 II 相試験および臨床第 III 相試験時に分離され、原因菌とされた肺炎球菌は、急性中耳炎由来が 117 株、急性副鼻腔炎由来が 13 株、肺炎由来が 21 株、合計 151 株であった。これらの菌株について、① *pbp* 遺伝子とマクロライド耐性遺伝子、② TBPM を含む各種抗菌薬感受性、および③病原性にかかわる莢膜型について解析した。全体として最も多かったのは gPISP (*pbp2x*) の 41.1%、次いで gPRSP (*pbp1a+2x+2b*) の 34.4%、gPISP (*pbp1a+2x*) の 12.6% であり、何らかの遺伝子変異を有する株は 94.0% を占めた。これらの株は *mef* (A)、あるいは *erm* (B) のいずれかのマクロライド系抗菌薬耐性遺伝子を保持していた。

TBPM の MIC 値は、gPISP (*pbp2x*) に対し 0.001~0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、gPISP (*pbp1a+2x*) には 0.004~0.031 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、gPRSP にも 0.008~0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、既存の経口抗菌薬に比べ明らかに優れていた。その抗菌力は panipenem と同等であった。

急性中耳炎由来株の莢膜型は 3 型の gPISP (*pbp2x*) 株が 23.1% を占め、次いで gPRSP の多い 19F, 6B, 14, 23F の順であった。これらの分離株に対する 7 価 conjugate vaccine (7PCV) のカバー率は 48.8% にすぎなかった。

以上の成績から、TBPM-PI は小児における急性中耳炎や肺炎を含むさまざまな耐性肺炎球菌感染症に対し、その細菌学的効果が期待される。

Key words: tebipenem, *Streptococcus pneumoniae*, *pbp* gene, PRSP, serotype, oral carbapenem

先の網羅的検索法で述べたように、*Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) は小児、特に乳幼児における急性中耳炎、急性副鼻腔炎、あるいは肺炎等の最も主要な原因菌である¹⁻³⁾。本菌の病原性は、菌によって産生される多様なビルレンスファクターとともに、本菌に対する宿主側の免疫学的未熟性もかかわっていることはよく知られたことである^{1,2,4)}。

加えて、本邦においては 1990 年代の半ばから penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) が経年的に急速に増加し、臨床上の大きな問題となっている^{5,6)}。特に小児においては、以前は経口抗菌薬の投与により外来診療のみで治癒せしめえた急性中耳炎等において、入院加療が必要となる難治例が増加している^{7,8)}。

PRSP における耐性機構は、肺炎球菌に見いだされる β -ラクタム系抗菌薬の作用標的である細胞壁合成酵素 (penicillin-binding protein: PBP) のうち、PBP1A, PBP2X, PBP2B をそれぞれコードする *pbp1a*, *pbp2x*, および *pbp2b* 遺伝子の変異による各 PBP への薬剤の結合能低下による感受性低下である⁹⁻¹¹⁾。このような菌の生存にとって必須酵素の変化による耐性化は、一つの遺伝子上に生ずる変異に起因する微妙な感

受性低下から始まっている^{6,12)}。その後さらに別の遺伝子上への変異が重なることにより、次第に感受性低下が明瞭になってくる。つまり、遺伝子変異に基づく感受性のわずかな違いを生物学的手法で識別することはきわめて難しい⁴⁾。

そのようなことから、著者らは、遺伝子レベルで正確に被験菌を識別することを目的に、「ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) 遺伝子検出試薬」を開発し、肺炎や化膿性髄膜炎由来の肺炎球菌に対する疫学解析に応用することにより、その有用性を報告してきている^{13,14)}。

本稿においては、tebipenem pivoxil (TBPM-PI) の小児に対する臨床第 II 相試験および臨床第 III 相試験において分離され、原因菌と確定された肺炎球菌について、①上記のキットを用いた *pbp* 遺伝子とマクロライド耐性遺伝子の解析、② TBPM を含む各種抗菌薬感受性、および③菌の病原性にかかわる莢膜型について報告する。

I. 材料と方法

1. 対象菌株

0 歳以上 15 歳以下の小児を対象として、平成 17 年 10 月から平成 20 年 3 月までに延べ 150 施設で実施された

*東京都港区白金 5-9-1

Table 1. Breakdown of the resistant types of *Streptococcus pneumoniae* for each disease

Genotype	No. of strains	AOM	Sinusitis	Pneumonia
gPSSP	9 (6.0%)	9 (7.7%)	0	0
gPISP (<i>pbp2x</i>)	62 (41.1%)	49 (41.9%)	6 (46.2%)	7 (33.3%)
gPISP (<i>pbp2b</i>)	2 (1.3%)	1 (0.9%)	0	1 (4.8%)
gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	19 (12.6%)	14 (12.0%)	1 (7.7%)	4 (19.0%)
gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	7 (4.6%)	4 (3.4%)	1 (7.7%)	2 (9.5%)
gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	52 (34.4%)	40 (34.2%)	5 (38.5%)	7 (33.3%)
Total	151	117	13	21

TBPM-PI の小児臨床第 II 相試験 3 試験, および臨床第 III 相試験 3 試験において対象となった疾患の内訳は, 肺炎が 66 例, 急性中耳炎が 399 例, 急性副鼻腔炎が 31 例であり, 分離された肺炎球菌は合計 151 株であった。

これらの肺炎球菌は, 肺炎例では喀痰あるいは上咽頭ぬぐい液, 急性副鼻腔炎例では中鼻道分泌物から分離され, 効果判定委員会において最終的に原因菌と判定されたものである。急性中耳炎例では中耳貯留液から分離された肺炎球菌が原因菌と確定された。最終的には急性中耳炎由来が 117 株 (6B 型と NT 型が同時に検出された 1 例を含む), 副鼻腔炎由来が 13 株, 肺炎由来が 21 株となった。

2. 薬剤耐性遺伝子解析

肺炎球菌の薬剤耐性遺伝子解析には, 「肺炎球菌耐性遺伝子検出試薬キット ver. 2.0 (湧永製薬(株))」を用いた。溶菌方法, DNA の増幅, その後の電気泳動などは既報^{6,15)}に準じて実施した。

なお, *pbp1a* 検索用 primer は, 判定精度を高めるため, 2006 年に

sense primer : 5'-AAACCGCGACTGGGATCAAC-3',
reverse primer : GGTGAGTCCGACCTTGTTT-3'

へと変更されている。各 *pbp* 遺伝子検索用 primer は, β -ラクタム系抗菌薬の感受性低下に影響するアミノ酸置換に対する感性菌の遺伝子領域を増幅するように設計されている。ちなみに, *pbp1a* 遺伝子の primer によって増幅される DNA 断片は 238bp, *pbp2x* 遺伝子のそれは 197 bp, *pbp2b* 遺伝子のそれは 147bp である。DNA の増幅がみられた場合には感受性低下に影響するアミノ酸置換を有しておらず, 増幅がみられなかった場合には感受性低下に影響するアミノ酸置換を有している株と判定する。また, 菌種確認用の自己融解酵素遺伝子の *lytA* (319bp) もあわせて検索した。

マクロライド系抗菌薬耐性遺伝子については, 細胞質膜上の薬剤排出にかかわるタンパクをコードする *mef* (A) 遺伝子 (402bp) と, 23S rRNA のジメチル化酵素をコードする *erm* (B) 遺伝子 (224bp) を検索した¹⁶⁾。

これらの遺伝子解析に基づく表記は, MIC に基づく判定結果と区別するため, genotype を表す g を付し, gPSSP, gPISP (*pbp2x*), gPISP (*pbp2b*), gPISP (*pbp*

1a+2x), gPISP (*pbp2x+2b*), gPRSP (*pbp1a+2x+2b*) とした。

3. 薬剤感受性の測定

被験菌株の感受性測定は, 寒天平板希釈法により測定した。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の勧告する微量液体希釈法を用いなかった理由は, 血液寒天培地上でムコイドのコロニーを呈する株, あるいは発育が遅く非常に小さいコロニーを形成する菌株では, 前培養時間や接種菌液の濁度を勧告されたとおりに調整しても, 生菌数が規定量に達しない株が散見され, MIC がばらつくためである。そのため, 寒天平板希釈法では接種菌量をチェックしながら測定した。

感受性測定は, TBPM, penicillin G (PCG), ampicillin (ABPC), amoxicillin (AMPC), cefdinir (CFDN), cefditoren (CDTR), faropenem (FRPM), clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM) の経口薬 9 薬剤と, cefotaxime (CTX), panipenem (PAPM), meropenem (MEPM) の注射薬 3 薬剤の計 12 薬剤とした。それぞれの薬剤は, 当該企業から力価の明らかな原末の提供を受けた。MIC 測定時には, コントロール株として標準菌株の *S. pneumoniae* ATCC49619 株を用いた。

4. 莢膜型別

被験菌株の莢膜型は, 培養菌と抗血清との反応による莢膜膨化の有無を光学顕微鏡下に観察する莢膜膨化試験によって判定した。

抗血清は, Statens Serum Institute (Copenhagen, Denmark) より購入した。

II. 結 果

1. 症例の年齢と肺炎球菌の耐性型との関係

Table 1 には, 急性中耳炎由来 117 株 (症例数 116 例), 副鼻腔炎由来 13 株, 肺炎由来 21 株の計 151 株について, *pbp* 遺伝子解析に基づく耐性型を示した。

急性中耳炎由来で最も多かったのは gPISP (*pbp2x*) の 41.9% であり, 次いで gPRSP (*pbp1a+2x+2b*) の 34.2%, gPISP (*pbp1a+pbp2x*) の 12.0% であった。gPSSP は 7.7% にすぎなかった。肺炎例や副鼻腔炎例でも gPISP (*pbp2x*) と gPRSP (*pbp1a+2x+2b*) とが多く, gPSSP は 1 株も分離されなかった。

耐性型と症例の年齢との関係を Fig. 1 に示した。

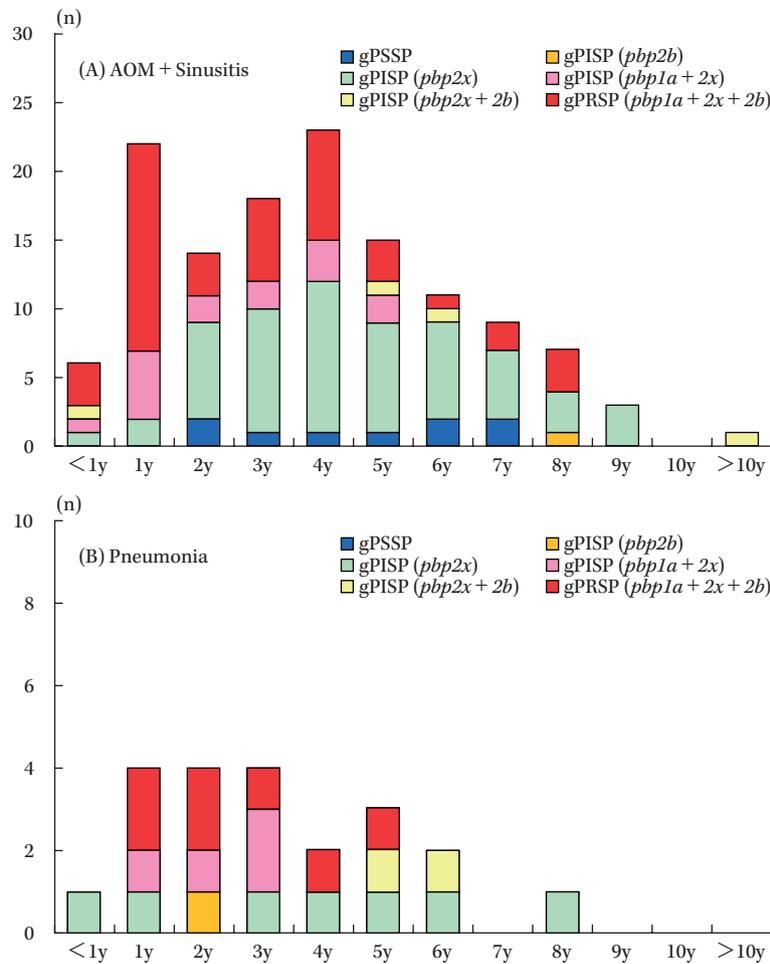


Fig. 1. Relationship between the resistance gene type and patient age.

1歳以下の急性中耳炎例から分離された肺炎球菌ではgPRSP (*pbp1a* + 2*x* + 2*b*) が63%を占め、gPSSPは認められず、他の年齢に比して耐性菌が明らかに多かった。それに対し、6歳以上ではgPRSP (*pbp1a* + 2*x* + 2*b*) の割合は少なく、gPISP (*pbp2x*) の比率が相対的に高かった。急性中耳炎例について、1歳以下、2~5歳、6歳以上に分けて耐性型を比較すると、1歳以下ではgPISP (*pbp1a* + 2*x*) とgPRSP (*pbp1a* + 2*x* + 2*b*) の割合が有意に高かった ($\chi^2 = 32.6458$, $df = 10$, $P = 0.0003$ (**))。肺炎例では例数が少なく統計学的解析は行えなかった。

2. 遺伝子解析された肺炎球菌の耐性型と各薬剤感受性

遺伝子型ごとに分類された肺炎球菌に対するTBPMと経口抗菌薬9薬剤、および注射薬3薬剤のMIC₅₀, MIC₉₀, ならびにMIC rangeはTable 2に示した。

また、Fig. 2にはTBPM、Fig. 3にはその他のβ-ラクタム系抗菌薬のMIC分布に遺伝子の成績を重ね合わせて示した。

それぞれの*pbp* 遺伝子変異の薬剤感受性への影響の程度から、β-ラクタム系抗菌薬は2つのタイプに分けることができた。一つは、*pbp2x* 遺伝子の影響を強く受ける薬

剤でCFDN, CDTR, CTXのセフェム系抗菌薬がこのタイプに該当した。もう一つはその影響が少ないPCG, ABPC, AMPC, FRPMのペニシリン系抗菌薬と、注射用カルバペネム系抗菌薬であった。TBPMは後者のタイプであった。

pbp2x 変異の影響を強く受ける薬剤では、gPISP (*pbp2x*) 株に対するMICはgPSSPに比して明らかに耐性側へシフトし、4~16倍低下していた。つまり、90%のgPISP (*pbp2x*) に対するCFDN, CDTR, およびCTXのMICはいずれも0.125~0.5 μg/mLであった。gPISP (*pbp1a* + 2*x*) 株に対するMICも*pbp2x* の影響を強く受け、gPRSPに対するMICとはほぼ同程度まで低下していた。90%のgPRSPに対するCFDNのMICは4~16 μg/mL, CDTRとCTXのそれは0.5~2 μg/mLであった。

一方、*pbp2x* 変異の影響が少ない薬剤では、gPISP (*pbp2x*) 株に対するMICはgPSSPと同等か、あるいは2倍程度の低下にすぎなかった。すなわち、90%のgPISP (*pbp2x*) 株に対するPCG, ABPC, AMPCのMICは0.031~0.125 μg/mL, FRPMのそれは0.008~0.031 μg/mLであった。gPRSPに対するPCG, ABPCのMICは0.5~2

Table 2. Sensitivity of *Streptococcus pneumoniae* to each kind of antimicrobial agent

Antimicrobial agent and resistance class	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Antimicrobial agent and resistance class	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀		Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Tebipenem	0.001-0.125	0.008	0.063	Faropenem	0.008-2	0.031	0.5
gPSSP	0.001-0.002	0.002	0.002	gPSSP	0.008-0.016	0.016	0.016
gPISP (<i>pbp2b</i>)	0.002-0.004	0.002	0.004	gPISP (<i>pbp2b</i>)	0.031	0.031	0.031
gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.001-0.008	0.004	0.004	gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.008-0.031	0.016	0.031
gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.004-0.031	0.008	0.031	gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.031-0.25	0.125	0.25
gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.002-0.016	0.008	0.016	gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.016-0.125	0.063	0.125
gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.008-0.125	0.063	0.063	gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.063-2	0.5	0.5
Penicillin G	0.016-4	0.125	2	Cefotaxime	0.016-16	0.5	1
gPSSP	0.016-0.031	0.016	0.031	gPSSP	0.016-0.063	0.016	0.063
gPISP (<i>pbp2b</i>)	0.125	0.125	0.125	gPISP (<i>pbp2b</i>)	0.063	0.063	0.063
gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.031-0.125	0.063	0.063	gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.063-0.5	0.25	0.25
gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.125-0.5	0.25	0.25	gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.5-2	1	1
gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.063-0.5	0.25	0.5	gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.125-0.58	0.125	0.5
gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.25-4	2	2	gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.25-16	1	1
Ampicillin	0.016-8	0.125	2	Panipenem	0.001-0.25	0.008	0.063
gPSSP	0.016-0.031	0.031	0.031	gPSSP	0.002-0.004	0.004	0.004
gPISP (<i>pbp2b</i>)	0.031	0.031	0.031	gPISP (<i>pbp2b</i>)	0.008	0.008	0.008
gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.031-0.25	0.063	0.125	gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.001-0.008	0.004	0.008
gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.063-1	0.25	0.5	gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.008-0.031	0.016	0.016
gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.031-0.5	0.25	0.5	gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.002-0.031	0.008	0.031
gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.5-8	2	2	gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.008-0.25	0.063	0.063
Amoxicillin	0.016-8	0.063	1	Meropenem	0.008-1	0.031	0.5
gPSSP	0.016-0.031	0.016	0.031	gPSSP	0.008-0.016	0.008	0.016
gPISP (<i>pbp2b</i>)	0.016	0.016	0.016	gPISP (<i>pbp2b</i>)	0.031	0.031	0.031
gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.031-0.125	0.031	0.063	gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.008-0.063	0.016	0.031
gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.031-0.5	0.125	0.25	gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.031-0.125	0.063	0.125
gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.031-0.25	0.25	0.25	gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.016-0.125	0.063	0.125
gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.25-8	1	1	gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.063-1	0.5	0.5
Cefdinir	0.031->64	0.5	16	Clarithromycin	0.063->64	>64	>64
gPSSP	0.031-0.25	0.063	0.25	gPSSP	0.063->64	0.063	>64
gPISP (<i>pbp2b</i>)	0.063	0.063	0.063	gPISP (<i>pbp2b</i>)	>64	>64	>64
gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.125-2	0.25	0.5	gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.063->64	>64	>64
gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	1-4	2	4	gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.063->64	>64	>64
gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.25-2	0.5	2	gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.063->64	32	>64
gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.5->64	8	8	gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.063->64	>64	>64
Cefditoren	0.008-8	0.25	1	Azithromycin	0.5->64	>64	>64
gPSSP	0.008-0.031	0.016	0.031	gPSSP	0.5->64	1	>64
gPISP (<i>pbp2b</i>)	0.031	0.031	0.031	gPISP (<i>pbp2b</i>)	>64	>64	>64
gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.063-0.5	0.125	0.25	gPISP (<i>pbp2x</i>)	0.5->64	>64	>64
gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.25-1	0.5	1	gPISP (<i>pbp1a+2x</i>)	0.5->64	>64	>64
gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.125-0.25	0.125	0.25	gPISP (<i>pbp2x+2b</i>)	0.5->64	>64	>64
gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.125-8	0.5	1	gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	0.5->64	>64	>64

$\mu\text{g/mL}$, AMPC のそれは $0.25\sim 1\ \mu\text{g/mL}$, FRPM は $0.25\sim 0.5\ \mu\text{g/mL}$ であった。

TBPM は、さまざまな遺伝子変異を有する肺炎球菌に対し、PAPM と同等のきわめて優れた感受性を示した。すなわち、最も分離頻度の高かった大多数の gPISP (*pbp2x*) 株に対しては $0.002\sim 0.008\ \mu\text{g/mL}$, gPISP (*pbp1a+2x*) 株には $0.008\sim 0.031\ \mu\text{g/mL}$, そして gPRSP (*pbp1a+2x+2b*) 株には $0.016\sim 0.063\ \mu\text{g/mL}$ の MIC を示した。

注目すべきことに、対象菌株中にセフェム系抗菌薬に対してさらに耐性レベルが上昇した菌株が 2 株認められた。これらの株は ABPC に $4\sim 8\ \mu\text{g/mL}$, AMPC に $2\sim$

$8\ \mu\text{g/mL}$, CFDN に $16\sim >64\ \mu\text{g/mL}$, CDTR に $2\sim 8\ \mu\text{g/mL}$, CTX に $4\sim 16\ \mu\text{g/mL}$ の MIC を示したが、これらの株に対する TBPM の MIC は $0.063\ \mu\text{g/mL}$ および $0.125\ \mu\text{g/mL}$ と優れていた。

3. マクロライド系抗菌薬感受性と耐性遺伝子との関係

肺炎球菌に対する CAM および AZM の MIC 分布に、*mef* (A) 遺伝子と *erm* (B) 遺伝子の保有状況を重ね合わせた成績は Fig. 4 に示した。

mef (A) 遺伝子保持株は、14 員環と 15 員環マクロライド系抗菌薬には耐性を示し、感受性を測定した CAM の MIC は $1\sim 16\ \mu\text{g/mL}$, AZM には $4\sim 64\ \mu\text{g/mL}$ の耐

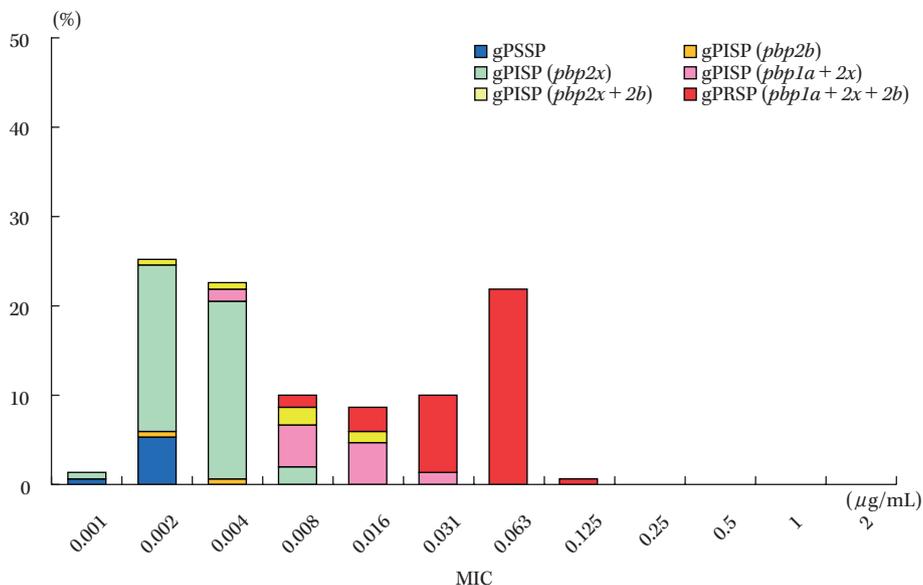


Fig. 2. Drug sensitivity of *Streptococcus pneumoniae* to tebipenem (n = 151).

性レベルを示した。ここには示していないが、16員環マクロライド系抗菌薬と clindamycin には感性であった (M type)。

erm (B) 遺伝子保持株は、マクロライド系抗菌薬による誘導の有無にかかわらず、CAM や AZM を含むすべてのマクロライド系抗菌薬と clindamycin に高度耐性を示し、交叉型の耐性であった (cMLS_B type)。

被験菌株全体では *erm* (B) 遺伝子保持株が 60.3% と最も多く、次いで *mef* (A) 遺伝子保持株が 22.5% 認められた。両方の耐性遺伝子を保持する株も 5.3% 認められた。耐性遺伝子を保持しない株はわずかに 11.9% にすぎず、マクロライド系抗菌薬耐性株が 88.1% と高い割合であった。

4. 遺伝子型と莢膜型との関係

肺炎球菌 151 株のうち、株数の少なかった肺炎由来の 21 株と急性副鼻腔炎由来の 13 株を除き、急性中耳炎由来の 117 株についてのみ、遺伝子型と莢膜型との関係を Fig. 5 に示した。

横軸の莢膜型は 7 価 conjugate vaccine (7PCV : 19F, 6B, 14, 23F, 9, 18, 4 型) から順に示した。4 型は分離されていない。

最も多かったのは 3 型の gPISP (*pbp2x*) 株で、23.1% 認められた。次いで耐性菌の多い 19F (13.7%), 6B (12.0%), 14 (8.5%), 23F (7.7%) 型の順であった。7PCV のカバー率は 48.8% にすぎなかった。

その他に、成人に多い 15 型や 22 型菌が分離されていたことも注目された。

遺伝子型によって莢膜型にも明らかな偏りが認められた。すなわち、gPRSP では 19F (34.6%) が最も多く、次いで 23F (25.0%), 6B (21.2%) の順であり、その他の莢膜型は 19.2% にすぎなかった。gPISP (*pbp2x*) 株では

ムコイドのコロニーを呈する 3 型 (46.8%) が半数を占め、その他に 6A, 6B, 15, 22 型が認められた。gPISP (*pbp1a* + 2*x*) 株では 14 型 (47.4%) が明らかに多く認められた。

III. 考 察

著者らが、わが国における PRSP の臨床的重要性に気づいたのは、1988 年に PRSP による化膿性髄膜炎例に遭遇したことによる¹⁷⁾。当時、すでに欧米においては PRSP は臨床上の問題として注目されていた¹⁸⁾。このような time lag が生じた背景には、経口抗菌薬が比較的容易に処方され、かつセフェム系抗菌薬が優位に用いられてきた日本と、ペニシリン系抗菌薬が圧倒的に多く使用されてきた欧米との違いがある。

1990 年代の半ば以降、PRSP の分離率は急性中耳炎をはじめとして、急性気管支炎、肺炎、化膿性髄膜炎等で急速に増加⁴⁾し、2000 年以降にはそれぞれの分離菌に占める遺伝子学的変異をもった PRSP の割合は 50% 近くに達した^{3,13,14)}。なかでも経口抗菌薬での治療対象であると考えられていた肺炎球菌による急性中耳炎例での再発、再燃例が増加し、経年的に注射薬による治療の必要な難治例が増加したことが明らかにされている⁷⁾。

このような耐性肺炎球菌感染症の増加の背景にはいくつかの要因が挙げられる。すなわち、宿主側の因子としては乳幼児特有の免疫学的未熟性、菌側の因子としては病原性にかかわる莢膜や耐性遺伝子の多様性、そして社会的要因としては保育園児の増加や交通網の発達による人の移動がかかわっている。

一方、抗菌薬の問題としては、日本で多く開発された経口セフェム系抗菌薬の外来診療におけるおびただしい使用量の増加がある。これらの薬剤は、その作用標的が *pbp2x* にあるため、ペニシリン系抗菌薬に比して殺菌性

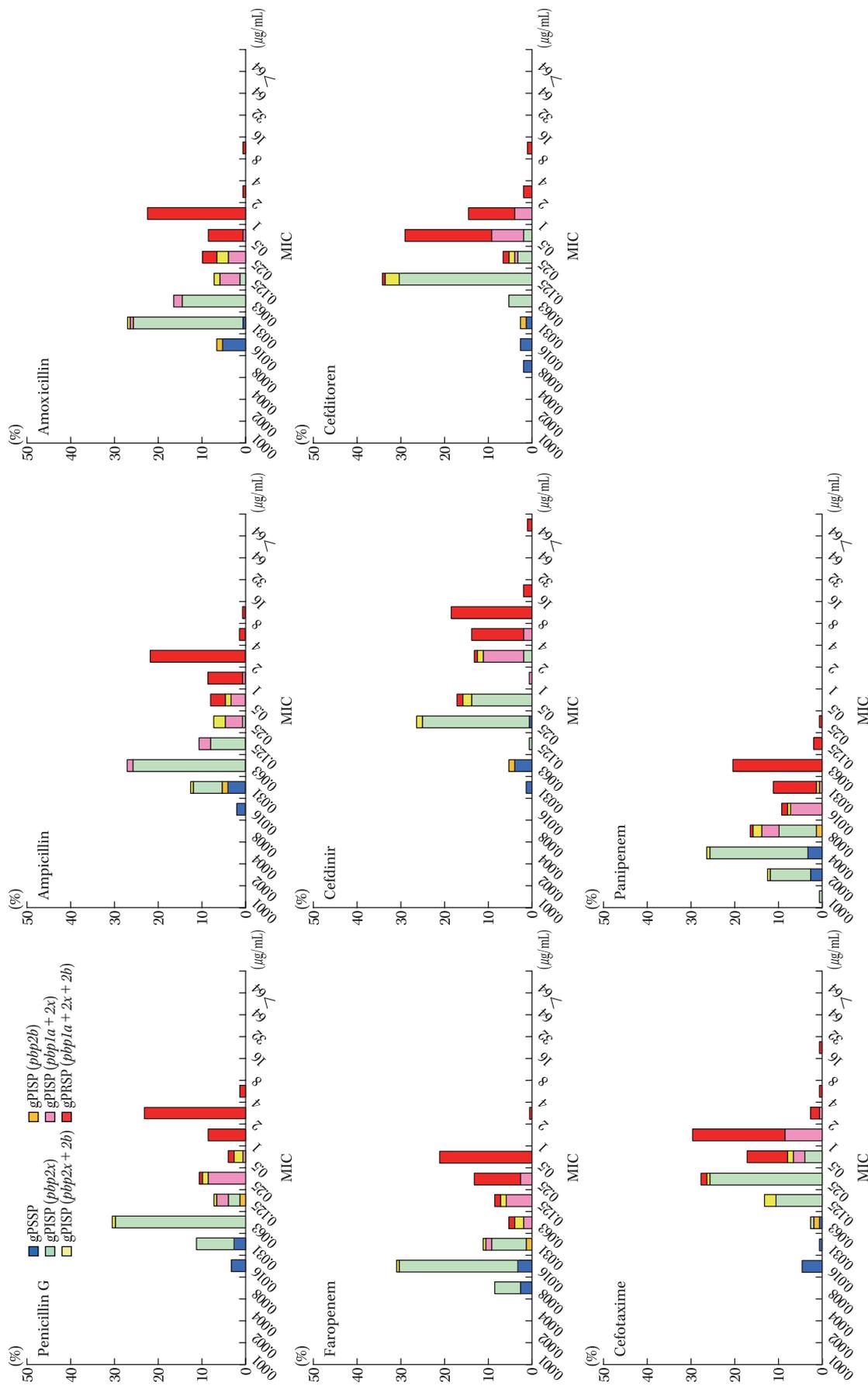


Fig. 3. Relation between PBP gene mutation and β -lactam sensitivity in *Streptococcus pneumoniae*.

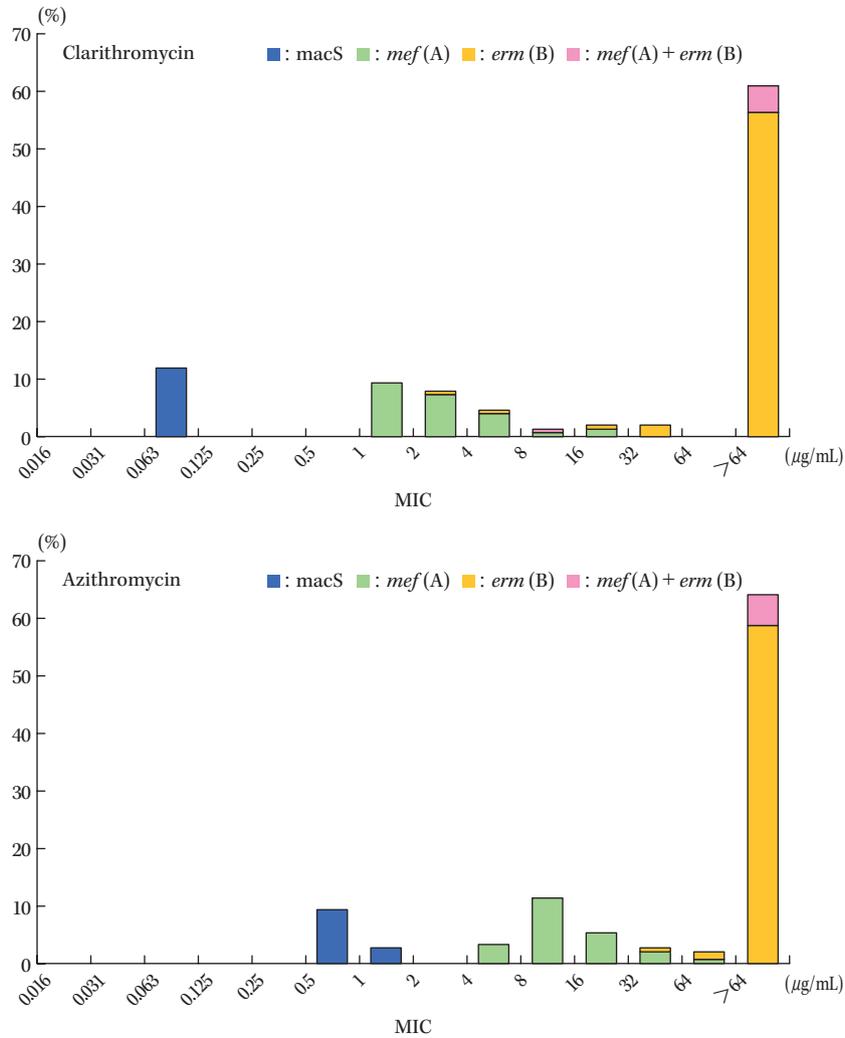


Fig. 4. Relationship between macrolide sensitivity and the resistance gene in *Streptococcus pneumoniae*.

が劣り、かつ常用投与量における血中への移行も優れていない。加えて、生物学的手法による感受性検査、あるいはCLSIの勧告するブレイクポイントではわが国に多い *pbp2x* 遺伝子変異を有する gPRSP を識別できないといった問題点を残している。このようなさまざまな要因が絡み合っ、日本においては上述したような耐性肺炎球菌が急速に増加したものと考えられる。

上述した問題点を考慮したうえで、新規抗菌薬である TBPM の開発にあたっては、原因菌と確定された肺炎球菌について遺伝子学的解析を行い、正確な評価・判定を行う必要があると考えるにいたった。本論文で述べたように、TBPM は gPRSP (*pbp2x*) のみならず、gPRSP に対しても MIC₉₀ が 0.063 µg/mL であり、きわめて優れた抗菌活性を有していた。この優れた活性は、その作用標的が *pbp1a* と *pbp2b* にあるため、短時間殺菌性に優れている点にあることが著者らの *In vitro* 実験によって明らかにされている¹⁹⁾。加えて、将来増加することが懸念されるセフェム系抗菌薬に一段と耐性化した PRSP に対し

ても、TBPM は 0.125 µg/mL 以下の MIC を有し、十分な抗菌力を保持していることが注目された。

なお、小児における臨床試験時に測定された TBPM の最高血中濃度は、4 mg/kg の投与量で平均 3.46 µg/mL、6 mg/kg では平均 5.20 µg/mL であり、T_{1/2} はいずれの投与量でもほぼ 1 時間となっていた。TBPM は 0.125 µg/mL の濃度で PRSP の生菌数を 2 時間以内に 1/1,000 以下に減少させることが、すでに明らかにされている¹⁹⁾。したがって、TBPM の血中濃度およびその維持時間は PRSP に対し殺菌力を発揮するに十分なものであると考えられた。

TBPM-PI の CDTR-PI との小児臨床第 III 相比較試験において証明された肺炎球菌に対する優れた細菌学的効果は、TBPM-PI の優れた経口吸収性とその殺菌性によるものと結論された。

乳幼児への TBPM-PI の使用に際しては、耐性レベルの高い新たな耐性肺炎球菌を生じさせないためにも、薬剤の特性を最大限に生かした投与量と投与方法が遵守され

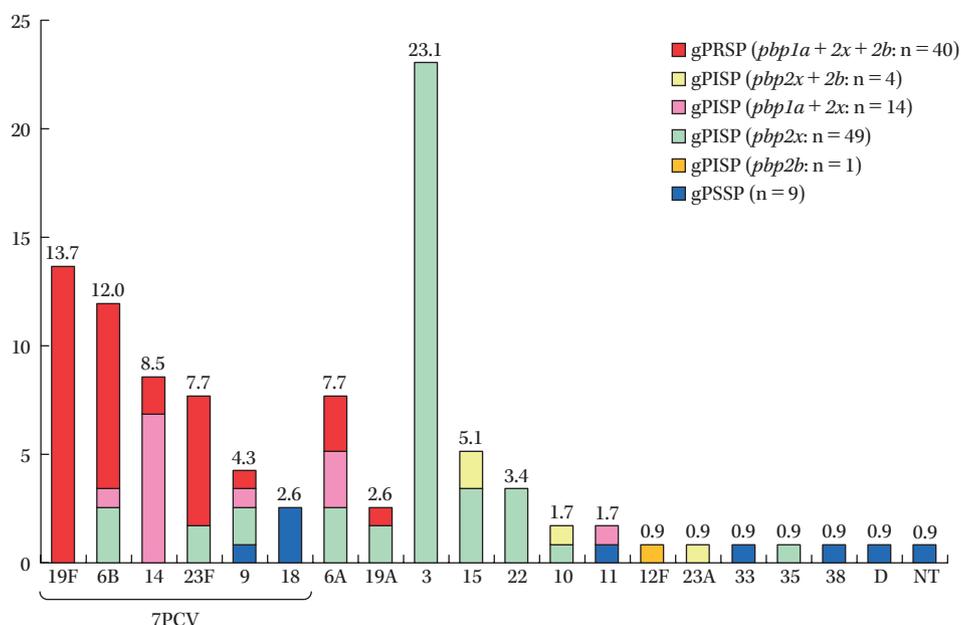


Fig. 5. Serotype of *S. pneumoniae* isolated from middle ear fluid of children with acute otitis media (n = 117).

なければならぬであろう。

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 1998; 52 (Suppl. B): 4-13
- 2) 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)。Jpn J Antibiot 2001; 54 (Suppl. B): 72-9
- 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) 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, 東京, 1999
- 5) Ubukata K, Asahi Y, Okuzumi K, Konno M: Incidence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan, 1993-1995. J Infect Chemother 1996; 2: 77-84
- 6) 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
- 7) 末武光子, 入間田美保子：耐性肺炎球菌と急性中耳炎の難治化。JOHNS 1997; 13: 1147-51
- 8) 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—。感染症誌 2003; 77: 595-605
- 9) Asahi Y, Ubukata K: Association of a Thr-371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1 A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2267-73
- 10) Asahi Y, Takeuchi Y, Ubukata K: Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2 X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1252-5
- 11) Yamane A, Nakano H, Asahi Y, Ubukata K, Konno M: Directly repeated insertion of 9-nucleotide sequence detected in penicillin-binding protein 2 B gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1257-9
- 12) 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—。Chemotherapy 1994; 42: 1225-35
- 13) Chiba N, Kobayashi R, Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, Tajima T, et al: Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein and macrolide resistance genes, and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates from community-acquired pneumonia in children. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 756-60
- 14) Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, Sunakawa K: Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999-2002. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1488-94
- 15) 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
- 16) Ubukata K, Iwata S, Sunakawa K: *In vitro* activities of new ketolide, telithromycin, and eight other macrolide antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* having *mefA* and *ermB* genes that mediate

- macrolide resistance. *J Infect Chemother* 2003; 9: 221-6
- 17) 有益 修, 目黒英典, 白石裕昭, 菅又久美子, 比留間藤昭, 阿部敏明: 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 1988; 62: 682-3
- 18) Klugman K P, Koornhof H J: Drug resistance patterns and serogroup or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979-1986. *J Infect Dis* 1988; 158: 956-64
- 19) Kobayashi R, Konomi M, Hasegawa K, Morozumi M, Sunakawa K, Ubukata K: *In vitro* antibacterial activity of tebipenem, a new oral carbapenem antibiotic, against penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 889-94

Antibiotic susceptibility and resistance gene analysis of *Streptococcus Pneumoniae* in clinical tebipenem-pivoxil studies in pediatric patients using PCR method

Kimiko Ubukata, Naoko Chiba, Miyuki Morozumi 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

Among *Streptococcus pneumoniae* isolates from pediatric patients in Phase II and III clinical studies of tebipenem pivoxil (TBPM-PI) considered to be causative pathogens, 117 isolates were from patients with acute otitis media, 13 from those with acute sinusitis, and 21 from those with pneumonia, among the 151 strains found. We analyzed for i) *pbp* and macrolide-resistant genes, ii) susceptibility to antibiotics including TBPM, and iii) capsular type related to pathogenicity. The gPISP (*pbp2x*) isolate was identified the most at 41.1%, followed by gPRSP (*pbp1a + 2x + 2b*) at 34.4% and gPISP (*pbp1a + 2x*) at 12.6%, 94.0% of all strains had some genetic mutation and a macrolide-resistant *mef* (A) or *erm* (B) gene.

TBPM showed antibacterial activity at 0.001 to 0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against gPISP (*pbp2x*), 0.004 to 0.031 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against gPISP (*pbp1a + 2x*), and 0.008 to 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against gPRSP, making it superior to the activity of most of antibiotics. TBPM antibacterial activity was comparable to that of panipenem.

Concerning the capsular type of strains isolated from AOM patients, gPISP (*pbp2x*) serotype 3 composed 23.1%, followed by serotypes 19F, 6B, 14, and then 23F, among which gPRSP predominated. The coverage of isolates by 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (7PCV) was only 48.8%.

In conclusion, we expected TBPM to be bacteriological by effective against pneumococcal infection caused by gPISP and gPRSP, including AOM and pneumonia in pediatric patients.