

【原著・基礎】

Tebipenem pivoxil の小児臨床試験におけるインフルエンザ菌の PCR 法による耐性遺伝子解析と抗菌薬感受性

岸井こずゑ・千葉菜穂子・諸角美由紀・濱野（長谷川）恵子・生方 公子

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 19 日受理)

Tebipenem pivoxil (TBPM-PI) の小児を対象とした臨床第 II 相試験と第 III 相試験において分離され、原因菌と判定されたインフルエンザ菌は、急性中耳炎由来が 112 株、急性副鼻腔炎由来が 16 株、肺炎由来が 30 株、計 158 株であった。全株について β -ラクタム系抗菌薬耐性化にかかわる PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子解析を行い、それらを遺伝子レベルで識別した。最も多かったのは gBLNAR の 51.9% であり、gLow-BLNAR が 8.2%、gBLPACR-I と gBLPACR-II がそれぞれ 0.6% と 1.9% の割合で認められた。gBLNAS は 36.7% にすぎなかった。分離されたインフルエンザ菌の 94.9% は、莢膜を保持しない型別不能株であった。

TBPM の gBLNAR に対する MIC₉₀ は 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、経口抗菌薬のなかでは cefditoren (MIC₉₀ : 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に次いで優れていた。他の経口抗菌薬の gBLNAR に対する MIC₉₀ は、ampicillin と faropenem が 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、amoxicillin と cefdinir が 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

ftsI 遺伝子の塩基解析では、次第にアミノ酸の置換数が増え始めていることが示された。また、無作為抽出した gBLNAR の全 DNA を *SmaI* で切断後に Pulsed-field gel electrophoresis によってその切断パターンを比較した結果、著しい多様性が認められた。

これらの成績から、TBPM-PI は小児の gBLNAR による急性中耳炎やその他の呼吸器感染症に対して、優れた細菌学的効果を有していると結論された。

Key words: tebipenem, *Haemophilus influenzae*, PBP-3, child, drug susceptibility

Haemophilus influenzae (インフルエンザ菌) は、*Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) と同様に小児の急性中耳炎、急性副鼻腔炎や肺炎の主要な原因菌である。一般的に呼吸器感染症や急性中耳炎由来のインフルエンザ菌は、その 9 割が莢膜を保持しない型別不能株 (NT 株) であると報告されている¹⁾。NT 株の病原性については諸説あるが、ヒトの気道表面がウイルスなどの感染によりダメージを受けた際、そこにコロナイゼーションしている NT 株が病原性を発揮するというのが定説の一つとして挙げられる²⁾。

一方、本邦において臨床問題となってきた耐性インフルエンザ菌は、長い間 β -lactamase 産生菌のみで、1980 年代には分離菌の 25~30% を占めていた³⁾。それらの耐性菌には、一部のセフェム系抗菌薬が優れた抗菌力を発揮していたが、1998 年以降、 β -lactamase を産生しないインフルエンザ菌 (β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae*: BLNAR) が経年的に急速に増加し、その傾向は今でも持続している^{3,4)}。

そして、臨床では本菌の耐性化による急性中耳炎の難治例や反復例の増加が特に小児において問題となっている⁴⁾。

BLNAR における耐性化は、 β -ラクタム系抗菌薬の作用標的である隔壁合成酵素-3 (penicillin-binding protein 3 : PBP 3) をコードする *ftsI* 遺伝子上に生じた変異に起因するもので、耐性菌では酵素活性上重要ないくつかのアミノ酸が他のアミノ酸へ置換している⁵⁾。なかでも、① Asn₃₂₆Lys、② Arg₅₁₇His、③ Ser₃₈₅Thr の 3 カ所の置換が特に重要であることが明らかにされている。①あるいは②のどちらかのアミノ酸置換を有する株は、耐性度がやや低いことから genotype の g を付して gLow-BLNAR、①と③、あるいは②と③のアミノ酸置換を有する株は gBLNAR として区別されている。gBLNAR の薬剤感受性の特徴は、ペニシリン系抗菌薬に対する感受性も低下するが、PBP3 に親和性の高いセフェム系抗菌薬に対する感受性も大きく低下することである。

本稿においては、TBPM-PI の小児を対象とした臨床第 II 相試験 3 試験および臨床第 III 相試験 3 試験において原因菌と判定されたインフルエンザ菌について、i) PCR による耐性遺伝子解析、ii) TBPM-PI の活性本体である TBPM とその他の抗菌薬感受性の比較、および iii) *ftsI* 遺伝子の塩基解析を行い、本菌に対する TBPM の抗菌力について総合的に評価を

*東京都港区白金 5-9-1

行ったので報告する。

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、2005年10月～2008年3月の間に延べ150施設で実施されたTBPM-PIの臨床第II相試験3試験および臨床第III相試験3試験において分離され、原因菌であると判定されたインフルエンザ菌、合計158株を対象とした。対象疾患の内訳は急性中耳炎が112株、急性副鼻腔炎が16株、肺炎が30株であった。

2. PCRによる耐性遺伝子解析

PCRによる菌種同定と耐性遺伝子検索は、すでに報告した方法に準じて行った⁶⁾。

インフルエンザ菌の解析には、①インフルエンザ菌に特異的なP6膜蛋白をコードする*p6*遺伝子の検索用⁷⁾、②TEM型β-lactamaseをコードする*bla_{TEM-1}*遺伝子の検索用⁸⁾、③ROB型β-lactamaseをコードする*bla_{ROB-1}*遺伝子の検索用⁹⁾、④PBP3をコードする*ftsI*遺伝子上のAsn₅₂₆のLysへのアミノ酸置換の検索用(PBP3-S)¹⁰⁾、⑤Asn₅₂₆LysとSer₃₈₅Thrの2カ所のアミノ酸置換の検索用(PBP3-BLN)⁵⁾、そして⑥type bインフルエンザ菌識別用¹¹⁾の計6組のプライマーを使用した。

これらの遺伝子解析により、それぞれの耐性にかかわる遺伝子を保持する場合は、genotypeのgを付した。

すなわち、遺伝子学的変異の見いだされなかった株はgBLNAS、②あるいは③を保持するβ-lactamase産生株はgBLPAR、④の変異を有するβ-lactamase非産生ampicillin (ABPC)軽度耐性株はgLow-BLNAR、⑤の変異を保持するβ-lactamase非産生ABPC耐性株はgBLNAR、gLow-BLNAR株のβ-lactamase産生株はgBLPACR-I、gBLNAR株のそれはgBLPACR-IIと表記した。

3. 薬剤感受性測定

薬剤感受性の測定は、Muller-Hinton agar (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD)を基礎培地とし、馬血液(最終濃度:2%)およびβ-NAD(最終濃度:15 μg/mL)を加えた寒天平板希釈法によって実施した¹²⁾。微量液体希釈法を用いなかった理由は、broth法では発育の劣る菌がしばしば認められることによる。

感受性測定の対象薬剤は、TBPM, penicillin G(PCG), 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、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測定時には標準株の*H. influenzae* ATCC49247および*H. influenzae* ATCC 49766をコントロール株として用いた。

Table 1. Resistant types of *Haemophilus influenzae* for each infection

Genotype	No. of strains	AOM	Sinusitis	Pneumonia
gBLNAS	58 (36.7)	46 (41.1)	5 (31.3)	7 (23.3)
gBLPAR	1 (0.6)	0	0	1 (3.3)
gLow-BLNAR	13 (8.2)	9 (8.0)	0	4 (13.3)
gBLNAR	82 (51.9)	55 (49.1)	10 (62.5)	17 (56.7)
gBLPACR-I	1 (0.6)	0	1 (6.3)	0
gBLPACR-II	3 (1.9)	2 (1.8)	0	1 (3.3)
Total	158	112	16	30

The number in () indicates the % in each disease

4. *ftsI* 遺伝子の塩基解析

PCRによる耐性遺伝子解析の結果、gLow-BLNAR, gBLNAR, gBLPACR-I, gBLPACR-IIと判定された99株を対象に、*ftsI* 遺伝子の塩基解析を行った。まず、*ftsI* 遺伝子の約1.0 kbpを sense-primer 5'-GTTGCACATATCTCCGATGAG-3'と reverse-primer 5'-CAGCTGCTTCAGCATCTTGC-3'を用いて増幅した。得られたPCR産物はQIA quick PCR purification kit (Qiagen, Tokyo, Japan)にて精製後、BigDye Terminator cycle sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いてシーケンス反応を行った。DNAシーケンスにはApplied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を使用した。

5. PFGE解析

インフルエンザ菌に対するPFGE解析は、すでに報告された方法に若干の変更を加えて実施した¹³⁾。

被験菌を混合した寒天ブロックを作成後、30 Uの制限酵素 *Sma*Iにて30℃、16時間の酵素反応を行い、DNAを切断した。電気泳動はCHEF MAPPER (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を使用し、14℃、6 V/cmの条件で20時間行った。

II. 結果

1. PCRによる耐性遺伝子型

急性中耳炎由来112株、急性副鼻腔炎由来16株、肺炎由来30株、計158株の耐性遺伝子型はTable 1に示す。

急性中耳炎由来株ではgBLNARが55株(49.1%)、gLow-BLNARが9株(8.0%)、gBLPACR-IIが2株(1.8%)であり、合計すると耐性菌の占める割合は58.9%となった。急性副鼻腔炎由来株ではgBLNARが10株(62.5%)、gBLPACR-Iが1株(6.3%)で、耐性菌の占める割合は68.8%であった。

一方、肺炎由来株で最も多かったのはgBLNARの17株(56.7%)、次いでgLow-BLNARの4株(13.3%)、gBLPACR-IIの1株(3.3%)、gBLPARの1株(3.3%)であり、耐性菌が全体の76.6%を占めた。

疾患により耐性菌の占める割合にはばらつきが認めら

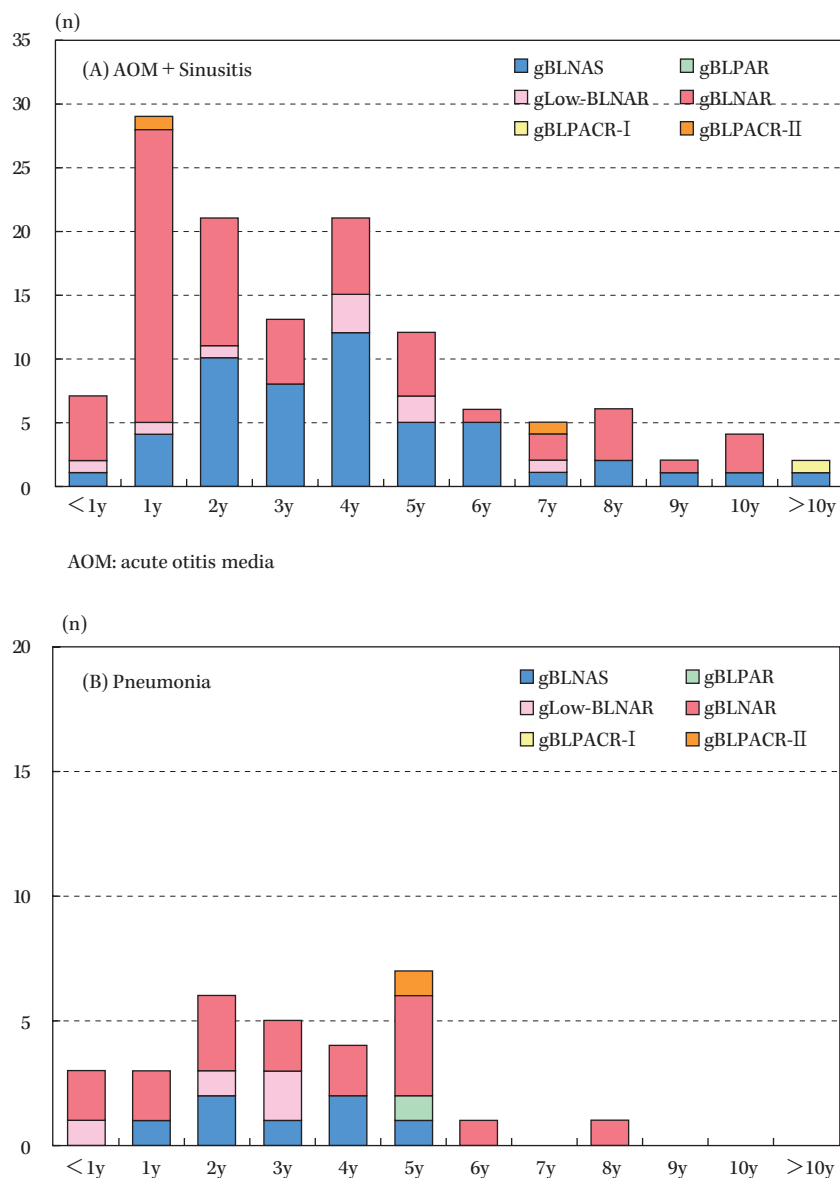


Fig. 1. Relation between patients' age and the resistance gene type.

れたが、いずれの疾患においてもその割合は50%以上と
きわめて高頻度であった。

なお、これらの原因菌のうち150株(94.9%)は莢膜を
保持しない型別不能株であり、残りの7株が莢膜b型、
1株が莢膜f型であった。

2. 症例の年齢と耐性遺伝子型との関係

Fig. 1 (A)には急性中耳炎例と急性副鼻腔炎例、Fig.
1 (B)には肺炎例の年齢分布と原因となったインフルエ
ンザ菌の耐性遺伝子型との関係を示す。

急性中耳炎例と急性副鼻腔炎例における発症年齢を1
歳以下、2~5歳、および6歳以上に区別して耐性菌の割
合をみると、1歳以下で耐性菌による発症例が有意に多
かった($\chi^2=14.5930$, $P=0.0007$ (**))。肺炎例では症例
数が少なく統計学的解析はできなかった。

3. 耐性遺伝子型と薬剤感受性

耐性型ごとに分類されたインフルエンザ菌に対する
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をTable 2に示す。

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分布に耐性遺伝子の成績を重ね合
わせて示した。菌株全体の耐性型の内訳は、gBLNAS
が58株(36.7%)、gBLPARが1株(0.6%)、gLow-BLNAR
が13株(8.2%)、gBLNARが82株(51.9%)、gBLPACR-
Iが1株(0.6%)、そしてgBLPACR-IIが3株(1.9%)で
あった(Table 1)。

ftsI 遺伝子変異の影響を強く受けるセフェム系抗菌薬
の、感受性分布は2峰性を呈し、gBLNARは耐性側に1
つのピークを形成しており、gBLNASとは比較的明瞭に
区別されていた。ペニシリン系抗菌薬やカルバペネム系

Table 2. MIC distributions and resistance genes identified by PCR in *Haemophilus influenzae*

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	0.008-1	0.125	0.5	Faropenem	0.125-32	1	8
gBLNAS	0.008-0.25	0.063	0.125	gBLNAS	0.125-1	0.5	1
gBLPAR	0.125	0.125	0.125	gBLPAR	0.5	0.5	0.5
gLow-BLNAR	0.031-0.5	0.25	0.5	gLow-BLNAR	0.25-8	1	4
gBLNAR	0.031-1	0.25	1	gBLNAR	0.25-32	2	8
gBLPACR-I	0.25	0.25	0.25	gBLPACR-I	1	1	1
gBLPACR-II	0.25-0.5	0.5	0.5	gBLPACR-II	2-4	4	4
Penicillin G	0.125->64	2	16	Cefotaxime	0.004-4	0.125	1
gBLNAS	0.125-4	0.5	1	gBLNAS	0.004-0.063	0.016	0.031
gBLPAR	8	8	8	gBLPAR	0.008	0.008	0.008
gLow-BLNAR	0.5-4	2	4	gLow-BLNAR	0.016-0.125	0.031	0.125
gBLNAR	0.5-32	8	32	gBLNAR	0.063-4	0.5	1
gBLPACR-I	16	16	16	gBLPACR-I	0.031	0.031	0.031
gBLPACR-II	8->64	32	>64	gBLPACR-II	0.25-0.5	0.5	0.5
Ampicillin	0.125->64	1	8	Panipenem	0.063-32	1	4
gBLNAS	0.125-1	0.25	0.5	gBLNAS	0.063-2	0.25	1
gBLPAR	4	4	4	gBLPAR	0.5	0.5	0.5
gLow-BLNAR	0.5-2	1	1	gLow-BLNAR	0.5-4	2	4
gBLNAR	0.5-32	2	8	gBLNAR	0.25-32	1	4
gBLPACR-I	8	8	8	gBLPACR-I	0.5	0.5	0.5
gBLPACR-II	2->64	16	>64	gBLPACR-II	0.25-2	0.25	2
Amoxicillin	0.125->64	2	32	Meropenem	0.016-0.5	0.125	0.5
gBLNAS	0.125-1	0.5	0.5	gBLNAS	0.016-0.125	0.063	0.125
gBLPAR	8	8	8	gBLPAR	0.063	0.063	0.063
gLow-BLNAR	0.5-4	2	4	gLow-BLNAR	0.063-0.5	0.125	0.25
gBLNAR	0.25-64	8	32	gBLNAR	0.031-0.5	0.25	0.5
gBLPACR-I	8	8	8	gBLPACR-I	0.125	0.125	0.125
gBLPACR-II	2->64	64	>64	gBLPACR-II	0.063-0.25	0.063	0.25
Cefdinir	0.125-32	2	16	Clarithromycin	4->64	8	16
gBLNAS	0.125-1	0.25	0.5	gBLNAS	4-16	8	16
gBLPAR	0.25	0.25	0.25	gBLPAR	8	8	8
gLow-BLNAR	0.5-4	0.5	2	gLow-BLNAR	4-16	8	16
gBLNAR	2-32	8	32	gBLNAR	4-32	8	16
gBLPACR-I	1	1	1	gBLPACR-I	8	8	8
gBLPACR-II	8-16	16	16	gBLPACR-II	8->64	64	>64
Cefditoren	0.002-1	0.063	0.25	Azithromycin	0.25-64	2	4
gBLNAS	0.002-0.063	0.016	0.031	gBLNAS	0.25-8	2	4
gBLPAR	0.008	0.008	0.008	gBLPAR	1	1	1
gLow-BLNAR	0.016-0.063	0.031	0.063	gLow-BLNAR	0.5-4	2	2
gBLNAR	0.031-1	0.25	0.25	gBLNAR	0.5-8	2	4
gBLPACR-I	0.016	0.016	0.016	gBLPACR-I	2	2	2
gBLPACR-II	0.125	0.125	0.125	gBLPACR-II	2-64	32	64

抗菌薬においては、gBLNARのMICは耐性側に分布したものの、感性株と耐性株とを明確に区別することは難しかった。

gBLNARに対するTBPMのMICは、MEPMと同様に、gBLNASに比してやや高いものの明確には区別できず、0.031~1 $\mu\text{g/mL}$ の狭い濃度域に分布した。

gBLNARに対するMIC₉₀が優れていた抗菌薬を順に示すと、CDTR (0.25 $\mu\text{g/mL}$) > MEPM (0.5 $\mu\text{g/mL}$) > TBPM (1 $\mu\text{g/mL}$) = CTX (1 $\mu\text{g/mL}$) > PAPM (4 $\mu\text{g/mL}$) = AZM (4 $\mu\text{g/mL}$) > ABPC (8 $\mu\text{g/mL}$) = FRPM (8 $\mu\text{g/mL}$) > CAM (16 $\mu\text{g/mL}$) > PCG (32 $\mu\text{g/mL}$) = AMPC (32 $\mu\text{g/mL}$) = CFDN (32 $\mu\text{g/mL}$)であった。

4. β -ラクタム系抗菌薬に対する感受性と *ftsI* 遺伝子上のアミノ酸置換との関係

Table 3には、gLow-BLNAR (13株)、gBLNAR (82株)、gBLPACR-I (1株)、およびgBLPACR-II (3株)の計99株における *ftsI* 遺伝子上のアミノ酸置換および主な薬剤のMIC₉₀値を示す。

これらのグループ分類は、Hasegawaら³⁾によって報告された8つのアミノ酸置換、すなわち Val⁻³²⁹、Met⁻³⁷⁷、Ser⁻³⁸⁵、Leu⁻³⁸⁹、Ala⁻⁵⁰²、Val⁻⁵¹¹、Arg⁻⁵¹⁷、Asn⁻⁵²⁶の結果に基づいている。なかでも3カ所のアミノ酸置換、すなわち、① Arg⁵¹⁷His、② Asn⁵²⁶Lys、③ Ser³⁸⁵Thrの置換を中心に分類している。

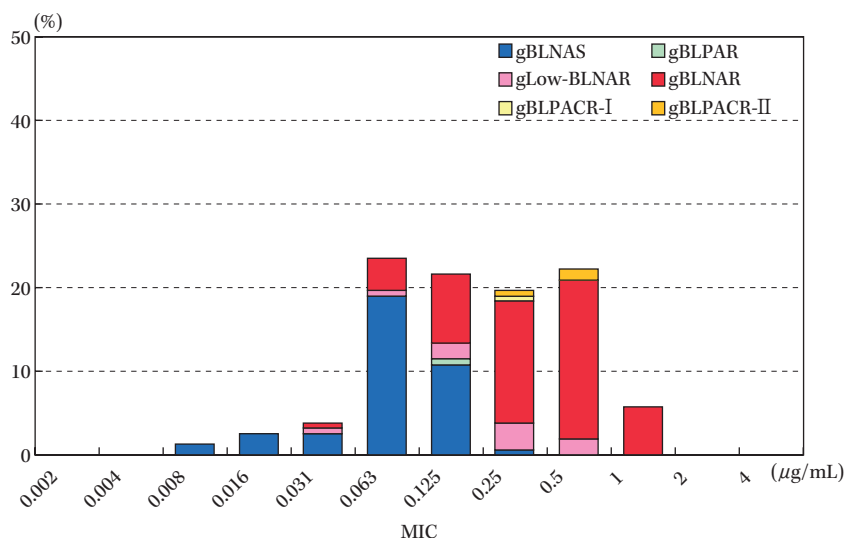


Fig. 2. Distribution of Tebipenem MIC of *Haemophilus influenzae* (n=158).

gLow-BLNAR 株の 13 株 (13.1%) は、初期に比較的多くみられた Asn₅₂₆Lys を有する株であった。

一方、gBLNAR 株および gBLPACR-II では、保存性アミノ酸配列の Ser-Ser-Asn (SSN) 周囲に位置する Met₃₇₇Ile, Ser₃₈₅Thr, および Leu₃₈₉Phe のアミノ酸置換を有する株が 77 株と多く認められ、それらのうち 71 株は Asn₅₂₆Lys を同時に有する株、残りの 6 株は Arg₅₁₇His を有する株であった。それ以外の株は最も重要な Ser₃₈₅Thr を有していたが、Met₃₇₇Ile および Leu₃₈₉Phe を併せて有していなかった。Ser₃₈₅Thr と Arg₅₁₇His, あるいは Ser₃₈₅Thr と Asn₅₂₆Lys を有する耐性菌において、ABPC の MIC₉₀ は 16~64 倍低下し、セフェム系抗菌薬では 32~128 倍低下していた。しかし、gBLNAR に対する TBPM の MIC₉₀ の変動をみると、gBLNAS に比較して 8 倍程度の感受性低下におさまっていた。

注目される変異株として、β-ラクタム系抗菌薬の結合サイトである Ser を含む Ser-The-Val-Lys (STVK) 中に Val₃₂₉Ala 置換を有する株が 2 株認められた。

5. gBLNAR の PFGE 解析

Fig. 4 には無作為に抽出された中耳貯留液由来インフルエンザ菌の PFGE の成績を示す。制限酵素として *Sma*I を用いた。DNA 切断パターンには多様性が認められ、gBLNAR はさまざまなクローン由来株であることが示された。

III. 考 察

著者らは、わが国において肺炎球菌の PRSP が問題となり始めた頃から程なく、同じ呼吸器感染症の原因菌の一つであるインフルエンザ菌においても、ABPC や ce-faclor (CCL) の感受性が低下した株が出現し始めたことを報告した¹⁾。それらの株について β-ラクタム系抗菌薬に対する感受性を詳細に比較すると、ABPC よりもセフェム系抗菌薬の感受性低下が著明であった¹⁴⁾。この現

象は、インフルエンザ菌に対してセフェム系抗菌薬が抗菌力を発揮するうえで最も重要な、隔壁合成酵素の PBP 3 に対する薬剤の結合親和性が変化していることを示唆するものであった。この予測に基づいてさまざまな耐性レベルのインフルエンザ菌を解析した結果、PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子上に共通して認められる変異を見いだした。しかもそれらは、保存性アミノ酸配列の近くに位置し、かつ中性アミノ酸から塩基性アミノ酸へと置換していた⁵⁾。その後、それらの変異がインフルエンザ菌の β-ラクタム系抗菌薬耐性化にかかわっていることを形質転換によっても証明している³⁾。PBP3 と β-ラクタム系抗菌薬の結合を考えると、耐性菌では PBP の活性部位における立体構造に著しい歪みが生じ、結果的に PBP への薬剤の結合親和性が低下しているものと推定される。

一方、1998 年以降の耐性化の状況をみると、BLNAR の増加傾向は持続し、2007 年には遂に分離菌の 40% を上回った。そして、臨床的には耐性インフルエンザ菌による肺炎、急性中耳炎、急性副鼻腔炎の難治例や反復例の増加、さらには Hib における耐性化が治療上最も解決されなければならない緊急問題となっている。

このようなわが国特有の急激な耐性化が進行した背景には、耐性インフルエンザ菌に対して経口ペニシリン系抗菌薬の抗菌力が本質的にそれほど優れておらず、しかも経口セフェム系抗菌薬においても CDTR 以外は感受性が非常に低下していたことにある。加えて、インフルエンザ菌は常在細菌の一面も有し、免疫学的に未熟な乳幼児は本菌を保菌しやすく、そのことも耐性菌による感染例を増加させる一因になったと考えられる。

本来、インフルエンザ菌に対しては、ニューキノロン系抗菌薬がきわめて優れた抗菌力と殺菌力を保持しているが、本薬の小児感染症への適応は承認されていない。

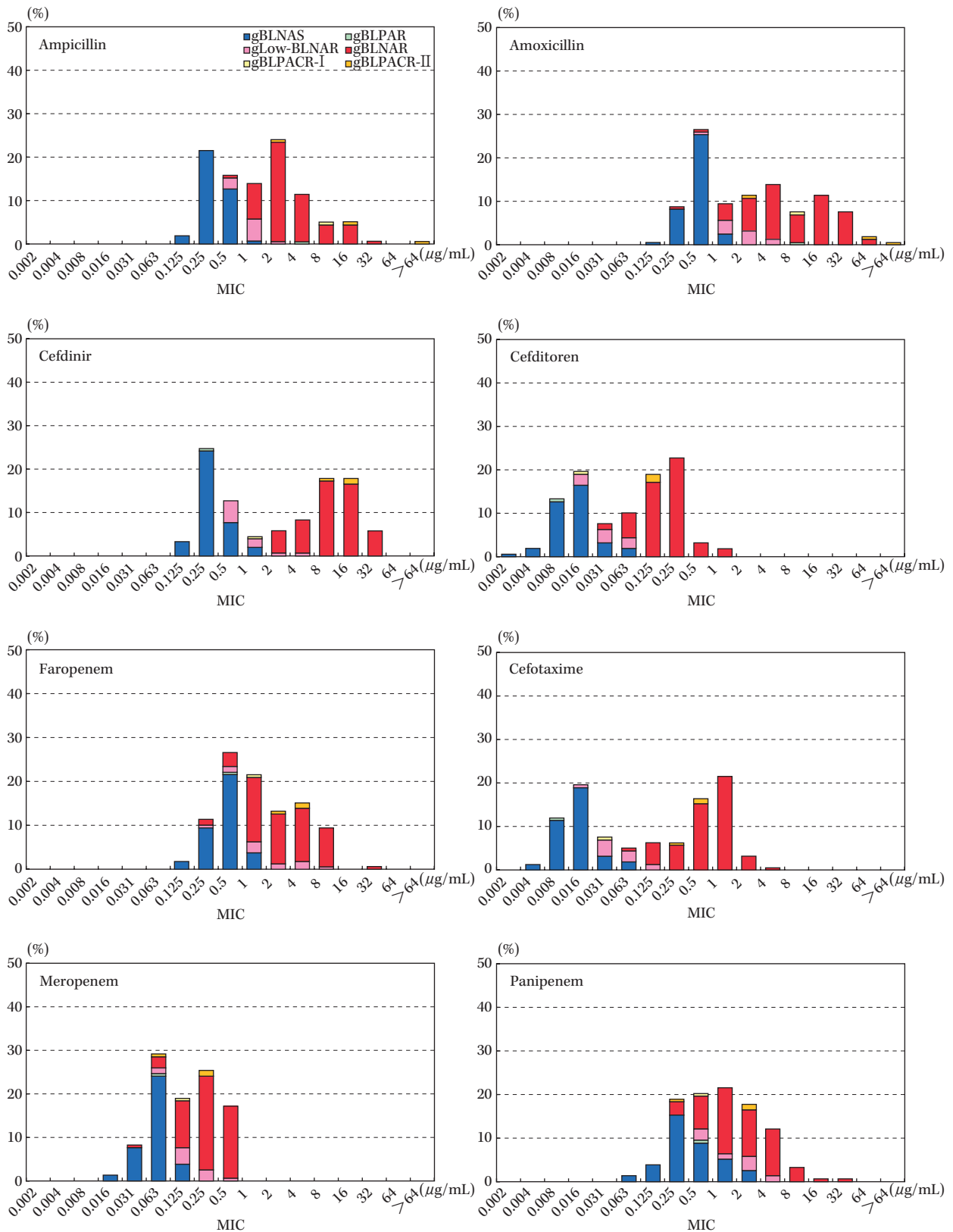


Fig. 3. Relation between PBP3 gene mutation and β -lactam MIC in *Haemophilus influenzae*.

このような現状から、小児のインフルエンザ菌感染症に対して確実に有効性が期待できる β -ラクタム系抗菌薬の開発が望まれていた。

本編で述べたインフルエンザ菌に対するTBPMの抗菌活性は、CDTRほどではないものの比較的優れていることが示された。特に、経口吸収性に優れているTBPM-

Table 3. Analysis of the *fliJ* gene encoding PBP3 of resistant *Haemophilus influenzae* identified as causative pathogen

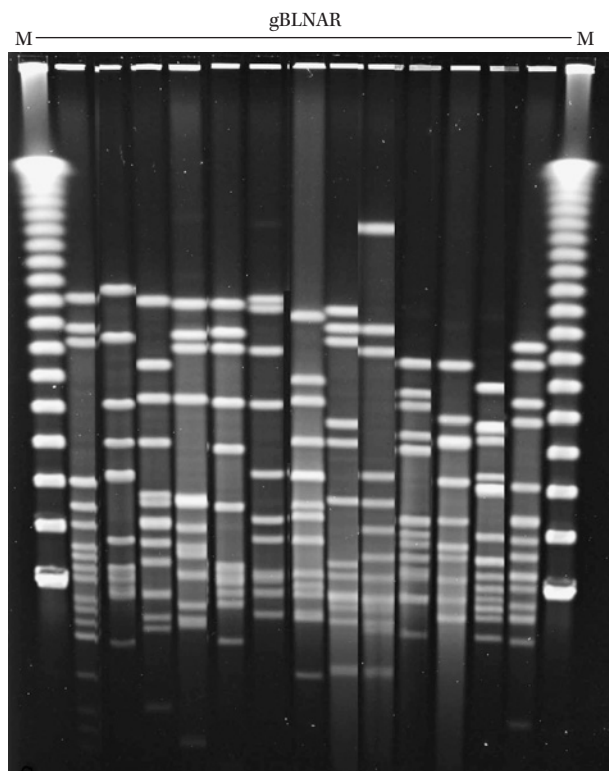
Resistant types	No of strains	Amino acid substitution												MIC ₉₀ (µg/mL)								
		STVK ^a Val-329	Met-377	Ser-385	Leu-389	Ala-502	Val-511	Arg-517	Asn-526	TBPM	ABPC	AMPC	CFDN	CDTR	FRPM	CTX	MEPM					
gBLNAS ^d		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.125	0.25	0.5	0.25	0.008	0.5	0.008	0.008	0.063
gLow-BLNAR (n = 13)	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	(Thr)	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	0.063	4	0.125	0.25	0.25
	3	-	-	-	-	(Val)	-	-	-	-	-	-	Lys	0.5	1	4	2	0.063	4	0.125	0.25	0.25
	1	-	(Ile)	-	-	(Val)	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gBLPACR-I	1	-	Ile	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	(Ile)	Thr	-	-	-	-	-	-	-	His	-	0.25	4	8	32	0.25	4	1	0.25	0.25
	6	-	(Ile)	Thr	(Phe)	-	-	-	-	-	-	His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gBLNAR (n = 82)	1	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	(Ala)	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	(Ile)	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	Lys	1	8	32	32	0.25	8	1	0.5	0.5
	1	-	-	Thr	-	(Thr)	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	66	-	Ile	Thr	Phe	-	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	Ile	Thr	Phe	-	(Ala)	-	-	-	-	-	Lys	0.5	16	32	32	0.5	8	1	0.5	0.5
	2	-	Ile	Thr	Phe	(Val)	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gBLPACR-II	1	-	Ile	Thr	-	-	-	-	-	-	-	His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	Ile	Thr	Phe	-	-	-	-	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aSTVK: Ser₃₂₇-Thr-Val-Lys

^bSSN: Ser₃₇₉-Ser-Asn

^cKTG: Lys₅₁₂-Thr-Gly

^dControl: ATCC49766



M: CHEF DNA size standard, lambda ladder 8.3-48.5 kb mixed digest of lambda

Fig. 4. PFGE analysis of resistant *Haemophilus influenzae* (gBLNAR) isolated from the middle ear fluid.

PI は、乳幼児に対する 4 mg/kg の投与量で、3.46 μ g/mL の Cmax が得られ、臨床において gBLNAR を十分にカバーできるものと考えている。CDTR-PI との小児比較試験において、gBLNAR による急性中耳炎に対する TBPM-PI の細菌学的効果が、CDTR-PI と同等であったことが、そのことを裏付けているものと推察された。今後は、TBPM と他薬剤について、gBLNAR に対する殺菌性、postantibiotic effect (PAE)、あるいは形態変化を比較し、TBPM の効果をより明確にする必要があろう。

耐性インフルエンザ菌で懸念されることは、PFGE 解析の結果の項で述べたように、gBLNAR の特徴はクローンの異なる菌の PBP3 遺伝子に変異が生じていることである。つまり、常在細菌化しやすく、また biofilm を形成しやすいインフルエンザ菌は、常にさまざまな抗菌薬の選択圧を受けており、遺伝子変異を有する菌が容易に選択されやすいともいえる。

TBPM 耐性インフルエンザ菌を生じさせないためには、本薬の臨床への導入後において、不十分な投与量やエビデンスのない長期投与は厳につつまねばならない。そして、それらの厳密なコントロールが望まれる。

文 献

- 1) 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
- 2) 生方公子: 第 19 回日本臨床微生物学会総会, アナライザー・ワークショップ, 2008; 51
- 3) Hasegawa K, Kobayashi R, Nakayama E, Takada E, Ono A, Chiba N, et al: High prevalence of type b β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 1077-82
- 4) 生方公子: 呼吸器感染症原因微生物の質的变化による薬剤耐性化. 日化療会誌 2006; 54: 69-94
- 5) 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
- 6) 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
- 7) Nelson M B, Apicella M A, Murphy T F, Vankeulen H, Spotila L D, Rekosh D: Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. Infect Immun 1988; 56: 128-34
- 8) Sutcliffe J G: Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. Proc Natl Acad Sci U S A 1978; 75: 3737-41
- 9) Juteau J M, Levesque R C: Sequence analysis and evolutionary perspectives of ROB-1 beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 1354-9
- 10) Fleischmann R D, Adams M D, White O, Clayton R A, Kirkness E F, Kerlavage A R, et al: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 1995; 269: 496-512
- 11) Van Eldere J, Brophy L, Loynds B, Celis P, Hancock I, Carman S, et al: Region II of the *Haemophilus influenzae* type b capsulation locus is involved in serotype-specific polysaccharide synthesis. Mol Microbiol 1995; 15: 107-18
- 12) Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Murayama S Y, Iwata S, Sunakawa K, et al: Rapidly increasing prevalence of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in meningitis. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1509-14
- 13) Yano H, Suetake M, Kuga A, Irinoda K, Okamoto R, Kobayashi T, et al: Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. J Clin Microbiol 2000; 38: 625-9
- 14) Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, Shibasaki Y, Sunakawa K, Nonoyama M, et al: Differentiation of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* from other *H. influenzae* strains by a disc method. J Infect Chemother 2002; 8: 50-8

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

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

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

We isolated 158 *Haemophilus influenzae* strains from pediatric patients enrolled in Phase II and III clinical studies of tebipenem pivoxil (TBPM-PI), and identified them as causative pathogens. These consisted of 112 isolates from patients with acute otitis media (AOM), 16 from those with acute sinusitis, and 30 from those with pneumonia. Mutation(s) of the *ftsI* gene encoding PBP3 involved in β -lactam resistance were identified in all isolates and classified into six groups based on genetic mutation. gBLNAR strains predominated at 51.9%, followed by gLow-BLNAR at 8.2%, gBLPACR-II at 1.9%, and gBLPACR-I at 0.6%. gBLNAS accounted for only 36.7%. The TBPM MIC₉₀ against gBLNAR was 1.0 μ g/mL, an excellent result, following that of cefditoren at 0.25 μ g/mL. MIC₉₀ of other oral antibiotics against gBLNAR were 8 μ g/mL for ampicillin and faropenem and 32 μ g/mL for amoxicillin and cefdinir. Of *H. influenzae* strains, 94.9% were nontypable, without a polysaccharide capsule. Sequencing of the *ftsI* gene suggested that further substitution of amino acids at other sites had gradually begun. A comparison of the DNA restriction pattern by PFGE after digestion with *Sma*I for randomized gBLNAR showed significant diversity.

These results suggest that TBPM is bacteriologically efficacious against AOM and other pediatric respiratory infections caused by gBLNAR.