

Streptococcus pneumoniae および *Haemophilus influenzae* の β -lactam 薬に対する
in vitro における耐性獲得に関する検討

小林 寅喆¹⁾・金山 明子¹⁾・瀧川 元子²⁾・伊与田貴子²⁾・鈴木 真言²⁾
雑賀 威²⁾・長谷川美幸²⁾・池田 文昭²⁾・砂川 慶介³⁾

¹⁾ 東邦大学医学部看護学科感染制御学*

²⁾ 三菱化学メディエンス化学療法研究室

³⁾ 北里大学北里生命科学研究所

(平成 22 年 3 月 31 日受付・平成 22 年 6 月 14 日受理)

Streptococcus pneumoniae および *Haemophilus influenzae* の ATCC 株および臨床分離株を対象に ceftriaxone (CTRX) および各種 β -lactam 薬の連続接触による *in vitro* 耐性化について比較検討した。

S. pneumoniae 10 株および *H. influenzae* 10 株を各種 β -lactam 薬含有寒天培地を用いて増量継代培養法で 10 回まで継代し、元株および 10 代継代株に対する CTRX および耐性菌選択試験に用いた薬剤の MIC を微量液体希釈法にて測定した。また、薬剤接触前後の PBP_s 遺伝子変異を解析、比較した。

S. pneumoniae 10 株に対して同薬の MIC が 4 倍以上上昇した株数は、amoxicillin (AMPC) および cefotiam (CTM) によって各 4 株、cefotaxime (CTX), CTRX および cefditoren (CDTR) 3 株、panipenem 2 株で、薬剤間で大差はなかった。AMPC, CTX および CDTR との連続接触によって MIC が 4 倍以上上昇した数株において 2 種または 3 種すべての PBP に接触前の元株と比較して複数のアミノ酸置換が認められた。一方、*H. influenzae* 10 株について MIC が 8 倍以上上昇した株数は、CTX 7 株、CDTR 6 株、CTM 4 株、meropenem 2 株、CTRX 1 株、amoxicillin/clavulanic acid 1 株であった。CDTR および CTX との連続接触によって 8 倍 MIC が上昇した各 1 株においてそれぞれ Val592Ala および複数のアミノ酸置換が認められた。Penicillin 系 2 薬および CTRX は今回実験した β -lactam 薬のなかでは耐性化しがたい傾向が認められた。また、各薬剤の MIC が上昇した菌株に対する CTRX の MIC の上昇は小さかった。これら MIC の上昇した株の PBP_s 遺伝子の変異との関連は特にみられず、他の耐性機序が関与していることが示唆された。

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, β -lactams, resistance, gene mutation

Ceftriaxone (CTRX) は、各種感染症起炎菌に対する強い抗菌力に加えて血中および組織濃度が高く持続的に推移することから、細菌性髄膜炎などの重症感染症への標準的治療抗菌薬として用いられている。

一方、近年わが国において、髄膜炎および市中肺炎の原因菌である *Streptococcus pneumoniae* や *Haemophilus influenzae* における β -lactam 薬耐性化が問題視されている¹⁾。これら菌種の耐性化要因として、臨床における第三、四世代の β -lactam 薬を中心とした使用頻度が高いことが一因と考えられている。過去にわれわれが調査した CTRX の両菌に対する抗菌力は経年的な変動がみられないことを報告した²⁾。今回は、*S. pneumoniae* および *H. influenzae* を用い、CTRX を含む各種 β -lactam 薬の連続接触によって生じる耐性化およびその遺伝子変異について実験的検証を行った。

I. 材料と方法

1. 試験菌株

S. pneumoniae は、ATCC 49619 株およびあらかじめ penicillin G (PCG) の MIC によって分類された penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (PSSP: PCG MIC $\leq 0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$), penicillin-intermediate *S. pneumoniae* (PISP: PCG MIC $0.12\sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$), penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP: PCG MIC $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$) 各 3 株の計 10 株を用いた。

H. influenzae は ATCC 49247 株およびあらかじめ ampicillin (ABPC) の MIC と β -lactamase 産生性によって分類された β -lactamase-negative ampicillin-susceptible *H. influenzae* (BLNAS: ABPC MIC $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$), β -lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR: ABPC MIC $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$), β -lactamase-positive

Table 1. β -lactam antibiotic susceptibility and mutations in PBP genes of *Streptococcus pneumoniae* strains

Organism	Phenotype	<i>pbp</i> mutation	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
			Amoxicillin	Ceftriaxone	Cefotaxime	Cefotiam	Cefditoren	Panipenem
ATCC49619	— ¹⁾	<i>pbp2b</i>	0.06	0.06	0.06	0.5	0.06	0.06
MCM10	PSSP ²⁾	<i>pbp1a + 2x</i>	0.015	0.5	0.5	1	0.015	0.25
MCM11		— ⁵⁾	0.03	0.06	0.06	0.25	0.015	0.03
MCM12		<i>pbp2x</i>	0.008	0.06	0.06	0.06	0.008	0.015
MCM13	PISP ³⁾	<i>pbp2x + 2b</i>	1	1	1	2	0.12	0.5
MCM14		<i>pbp2b</i>	0.25	0.25	0.12	1	0.03	0.06
MCM15		<i>pbp1a + 2x + 2b</i>	0.12	0.5	1	0.5	0.06	0.5
MCM16	PRSP ⁴⁾	<i>pbp1a + 2x + 2b</i>	1	4	4	8	0.25	0.12
MCM17		<i>pbp1a + 2x + 2b</i>	0.5	1	1	8	0.12	0.5
MCM18		<i>pbp1a + 2x + 2b</i>	0.5	0.5	2	4	0.12	0.5

¹⁾Not determined²⁾PSSP: Penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*³⁾PISP: Penicillin-intermediate *Streptococcus pneumoniae*⁴⁾PRSP: Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*⁵⁾Not detectedTable 2. β -lactam antibiotic susceptibility and deduced amino acid substitution in Fts I of *Haemophilus influenzae* strains

Organism	Phenotype	Fts I ¹⁾	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						
			Ampicillin/ sulbactam	Amoxicillin/ clavulanic acid	Ceftriaxone	Cefotaxime	Cefotiam	Cefditoren	Meropenem
ATCC49247	— ²⁾	Asn526Lys	8	2	0.12	0.12	32	0.12	0.06
MCM 1	BLNAS ³⁾	— ⁶⁾	0.25	0.12	0.002	0.008	0.5	0.008	0.03
MCM 2		—	0.25	0.12	0.002	0.008	1	0.008	0.03
MCM 3		—	0.5	0.12	0.002	0.008	1	0.008	0.06
MCM 4	BLNAR ⁴⁾	Asn526Lys, Ser385Thr	4	1	0.25	0.5	128	0.25	0.06
MCM 5		Asn526Lys, Ser385Thr	4	1	0.12	0.25	128	0.25	0.06
MCM 6		Asn526Lys, Ser385Thr	4	1	0.12	1	128	0.25	0.06
MCM 7	BLPAR ⁵⁾	—	4	0.25	0.002	0.008	1	0.008	0.06
MCM 8		—	1	0.25	0.002	0.015	0.25	0.008	0.03
MCM 9		—	1	0.12	0.002	0.008	1	0.008	0.03

¹⁾Deduced amino acid substitutions of Fts I²⁾Not determined³⁾BLNAS: β -lactamase-negative, ampicillin-susceptible *Haemophilus influenzae*⁴⁾BLNAR: β -lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*⁵⁾BLPAR: β -lactamase-positive, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*⁶⁾Not detected

ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLPAR) 各3株の計10株を用いた。

BLPARを除くいずれの菌株も2007年に呼吸器材料から分離された株を用いたが、BLPARは近年の分離頻度が低いため、2株は2002年呼吸器材料分離株を用いた。

2. 使用 β -lactam 薬

MIC測定および耐性菌選択実験には、各試験菌に対して以下の β -lactam 薬を用いた。

S. pneumoniae に対しては amoxicillin (AMPC), CTRX, cefotaxime (CTX), cefotiam (CTM), cefditoren (CDTR), panipenem (PAPM) の6薬剤を、*H. influenzae* に対しては ampicillin/sulbactam (ABPC/SBT),

amoxicillin/clavulanic acid (AMPC/CVA), CTRX, CTX, CTM, CDTR, meropenem (MEPM) の7薬剤を用いた。

3. Penicillin binding proteins 遺伝子変異

1) Penicillin Binding Proteins (PBPs) 遺伝子変異の検出

S. pneumoniae の遺伝子変異の検出にはペニシリン耐性肺炎球菌遺伝子検出試薬[®] (湧永製薬)を用いた。*H. influenzae* の遺伝子変異の検出にはインフルエンザ菌遺伝子検出試薬[®] (湧永製薬)を用いた。

2) PBPs 遺伝子変異の解析

S. pneumoniae の *pbp1a*, *pbp2b* および *pbp2x* 変異については、Grangerら^{3,4)}の方法、*H. influenzae* の *fts I* 変異につ

Table 3. MIC increase for 10 strains of *Streptococcus pneumoniae* after 10-times exposure to sub-MIC of β -lactam antibiotics

Organism (number of strains)	MIC increase ¹⁾	Number of strains					
		Amoxicillin	Ceftriaxone	Cefotaxime	Cefotiam	Cefditoren	Panipenem
ATCC49619	4	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
	≥ 16	0	0	0	0	0	0
PSSP ²⁾ (3)	4	1	2	1	1	0	1
	8	1	0	0	0	0	0
	≥ 16	0	0	0	0	0	0
PISP ³⁾ (3)	4	0	0	0	2	1	0
	8	0	0	0	0	0	0
	≥ 16	0	0	0	0	0	0
PRSP ⁴⁾ (3)	4	1	0	1	1	2	0
	8	1	1	1	0	0	0
	≥ 16	0	0	0	0	0	1
Total (10)	4	2	2	2	4	3	1
	8	2	1	1	0	0	0
	≥ 16	0	0	0	0	0	1
	Total	4	3	3	4	3	2

¹⁾MIC increase for each strain after 10-times exposure after sub-MIC of β -lactam antibiotics

²⁾PSSP: Penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*

³⁾PISP: Penicillin-intermediate *Streptococcus pneumoniae*

⁴⁾PRSP: Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*

Table 4. MIC increase for 10 strains of *Haemophilus influenzae* after 10-times exposure to sub-MIC of β -lactam antibiotics

Organism (Number of strains)	MIC increase ¹⁾	Number of strains						
		Ampicillin/ sulbactam	Amoxicillin/ clavulanic acid	Ceftriaxone	Cefotaxime	Cefotiam	Cefditoren	Meropenem
ATCC49247	4	0	0	0	0	0	0	1
	8	0	0	0	0	0	0	0
	≥ 16	0	0	0	0	0	0	0
BLNAS ²⁾ (3)	4	0	0	1	0	0	0	1
	8	0	0	0	3	0	3	0
	≥ 16	0	0	0	0	1	0	0
BLNAR ³⁾ (3)	4	0	1	1	0	0	2	1
	8	0	0	1	1	0	0	2
	≥ 16	0	1	0	1	1	0	0
BLPAR ⁴⁾ (3)	4	1	0	1	1	1	0	1
	8	0	0	0	2	0	1	0
	≥ 16	0	0	0	0	2	2	0
Total (10)	4	1	1	3	1	1	2	4
	8	0	0	1	6	0	4	2
	≥ 16	0	1	0	1	4	2	0
	Total	1	2	4	8	5	8	6

¹⁾MIC increase for each strain after 10-times exposure to sub-MIC of β -lactam antibiotics

²⁾BLNAS: β -lactamase-negative, ampicillin-susceptible *Haemophilus influenzae*

³⁾BLNAR: β -lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*

⁴⁾BLPAR: β -lactamase-positive, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*

いては Sanbongi ら⁵⁾の方法に準じて検索し、推定アミノ酸配列における置換部位を示した。

4. MIC 測定

各菌種に対する MIC 測定は、Clinical and Laboratory

Table 5. Deduced amino acid substitutions of PBPs in *Streptococcus pneumoniae* after 10-times exposure to sub-MIC of β -lactam antibiotics

Organism	Phenotype	Exposure	MIC increase ¹⁾	Deduced amino acid substitution		
				PBP 1a	PBP 2x	PBP 2b
MCM10	PSSP ²⁾	Amoxicillin	4	—*	—	—
		Ceftriaxone	4	—	Val284Leu	—
		Cefotaxime	4	—	—	—
		Cefotiam	4	—	—	—
MCM11	PSSP ²⁾	Ceftriaxone	4	—	—	—
MCM12	PSSP ²⁾	Amoxicillin	8	—	—	—
		Panipenem	4	—	—	—
MCM13	PISP ³⁾	Cefotiam	4	—	—	—
MCM14	PISP ³⁾	Cefotiam	4	—	—	—
		Cefditoren	4	—	—	—
MCM16	PRSP ⁴⁾	Panipenem	32	—	—	—
MCM17	PRSP ⁴⁾	Amoxicillin	4	multiple	—	multiple
		Cefotaxime	8	multiple	—	multiple
		Cefditoren	4	multiple	multiple	multiple
MCM18	PRSP ⁴⁾	Amoxicillin	8	—	—	—
		Ceftriaxone	8	—	—	—
		Cefotaxime	4	—	Leu281Pro	—
		Cefotiam	4	—	—	—
		Cefditoren	4	multiple	multiple	multiple

*No amino acid substitution was observed.

¹⁾MIC increase for each strain after 10-times exposure to sub-MIC of β -lactam antibiotics

²⁾PSSP: Penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*

³⁾PISP: Penicillin-intermediate *Streptococcus pneumoniae*

⁴⁾PRSP: Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*

Standards Institute (CLSI) guideline M100-S19⁶⁾に準じた微量液体希釈法で行った。

5. 各種 β -lactam 薬連続接触による耐性菌選択

S. pneumoniae はヒツジ血液寒天培地 M58 (栄研化学) を、*H. influenzae* はチョコレート II 寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて、35°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。発育した菌体を Mueller Hinton broth (MHB) にて 0.5 McFarland standard (約 1~2×10⁸ CFU/mL) に調製した。薬剤感受性測定で得られた MIC 値を 1×MIC とし、その 1/2×MIC、1×MIC 濃度の対象薬剤を含むそれぞれの培地に 100 μ L 滴下、コンラージ塗抹し、35°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。発育した菌体を滅菌綿棒でかきとり、MHB にて 0.5 McFarland standard に調製し、同様に 2×MIC、4×MIC と順次高濃度の対象薬剤含有培地を用いて、10 回まで継代培養を行った。これらで得られた接触後の菌株に対し、接触薬剤および CTRX の MIC を測定し、*S. pneumoniae* に対する接触薬剤の MIC が 4 倍以上、*H. influenzae* では 8 倍以上上昇した株の PBPs 遺伝子変異を検索した。

6. 統計解析

各種薬剤と 10 回連続接触した菌株の接触薬剤および

CTRX の MIC を薬剤接触前の菌株に対するおのおのの MIC と比較し、MIC 上昇率の差を Wilcoxon の順位和検定を用いて解析した。なお、有意水準は $p < 0.05$ とした。

II. 結 果

1. 試験菌における PBPs 遺伝子変異の検出と各種 β -lactam 薬感受性

S. pneumoniae 10 株および *H. influenzae* 10 株における PBPs 遺伝子変異および各種 β -lactam 薬感受性を Table 1 および Table 2 に示した。

MIC 値から PSSP と分類した 3 株の PBPs 遺伝子変異は、*pbp1a+2x*、*pbp2x* がそれぞれ 1 株、変異が認められない株が 1 株であった。PISP は、*pbp2x+2b*、*pbp2b*、*pbp1a+2x+2b* の変異がそれぞれ 1 株、PRSP は 3 株すべて *pbp1a+2x+2b* の変異が認められた。これらの菌株に対して試験薬剤のなかで CDTR の MIC が最も低く、いずれの β -lactam 薬も PSSP、PISP、PRSP の順に MIC 値が高くなる傾向がみられた。

BLNAR と分類した *H. influenzae* 3 株では、PBP 3 遺伝子の *fts I* 領域に変異がみられ、アミノ酸置換部位はいずれも Asn526Lys、Ser385Thr であった。MCM1 株~MCM3 株および MCM7 株~MCM9 株の 6 株に対する

Table 6. Deduced amino acid substitutions of Fts I in *Haemophilus influenzae* after 10-times exposure to sub-MIC of β -lactam antibiotics

Organism	Phenotype	Exposure	MIC increase ¹⁾	Deduced amino acid substitution in Fts I
MCM1	BLNAS ²⁾	Cefotaxime	8	—*
		Cefditoren	8	Val529Ala
MCM2	BLNAS ²⁾	Cefotaxime	8	—
		Cefotiam	16	—
		Cefditoren	8	—
MCM3	BLNAS ²⁾	Cefotaxime	8	multiple
		Cefditoren	8	—
MCM4	BLNAR ³⁾	Cefotaxime	8	—
MCM5	BLNAR ³⁾	Cefotaxime	16	—
		Meropenem	8	—
MCM6	BLNAR ³⁾	Amoxicillin/clavulanic acid	16	—
		Ceftriaxone	8	—
		Cefotiam	16	—
		Meropenem	8	—
		Cefotaxime	8	—
MCM7	BLPAR ⁴⁾	Cefotiam	16	—
		Cefditoren	16	—
		Cefotiam	64	—
MCM8	BLPAR ⁴⁾	Cefditoren	16	—
		Cefotaxime	8	—
MCM9	BLPAR ⁴⁾	Cefditoren	8	—

*No amino acid substitution was observed.

¹⁾MIC increase for each strain after 10-times exposure to sub-MIC of β -lactam antibiotics

²⁾BLNAS: β -lactamase-negative, ampicillin-susceptible *Haemophilus influenzae*

³⁾BLNAR: β -lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*

⁴⁾BLPAR: β -lactamase-positive, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*

CTMを除く各種セフェム系抗菌薬およびMEPMのMICは0.002~0.06 μ g/mLと低い値を示した。一方、MCM4株~MCM6株およびATCC49247株に対しては前2者に比べ、MEPMを除く各種 β -lactam薬のMIC値が高く、特にCTMのMICは32 μ g/mL以上であった。

2. 各種 β -lactam薬による耐性菌選択とその頻度

S. pneumoniae 10株および*H. influenzae* 10株に各種 β -lactam薬を10回連続接触させ、接触薬剤のMICがおのの菌種に対して4倍以上上昇した株数をTable 3およびTable 4に示した。

S. pneumoniae 10株に対してMIC値が4倍以上上昇した株は各薬剤2~4株にみられ、PAPMによる16倍以上上昇した1株を除き、多くは4倍程度であった。また、PSSP, PISP, PRSP間で特に偏りはみられなかった(Table 3)。

H. influenzae 10株に対しては、接触薬剤によりMIC上昇倍率に差が認められた。すなわち、CTXおよびCDTRによっておのおの7株および6株において8倍以上のMIC上昇が認められた。しかし、AMPC/CVA

およびCTRXでは各1株、ABPC/SBTでは1株も認められなかった。また、16倍以上のMIC上昇がみられた薬剤は、CTMで4株と最も多く、CDTRで2株、CTXおよびAMPC/CVAで各1株であった(Table 4)。

3. 各種 β -lactam薬の連続接触によるMIC上昇とPBP遺伝子変異

S. pneumoniae において、 β -lactam薬との連続接触によってMICが4倍以上上昇した19株の接触後のPBP1a, 2x, 2bにおける、さらなるアミノ酸置換の有無をTable 5に示した。AMPC, CTXおよびCDTRと連続接触したMCM17株と、CDTRと連続接触したMCM18株において2種または3種すべてのPBPに接触前の元株と比較して複数のアミノ酸置換が認められた。またMCM10株においては、CTRXと連続接触後にPBP2xにVal284Leu, MCM18株はCTXによってPBP2xにLeu281Proが認められた。これら以外のMIC上昇株については、PBPにさらなるアミノ酸置換は認められず、MIC値の上昇倍率とアミノ酸置換に関連はみられなかった。

H. influenzae において、 β -lactam薬との連続接触に

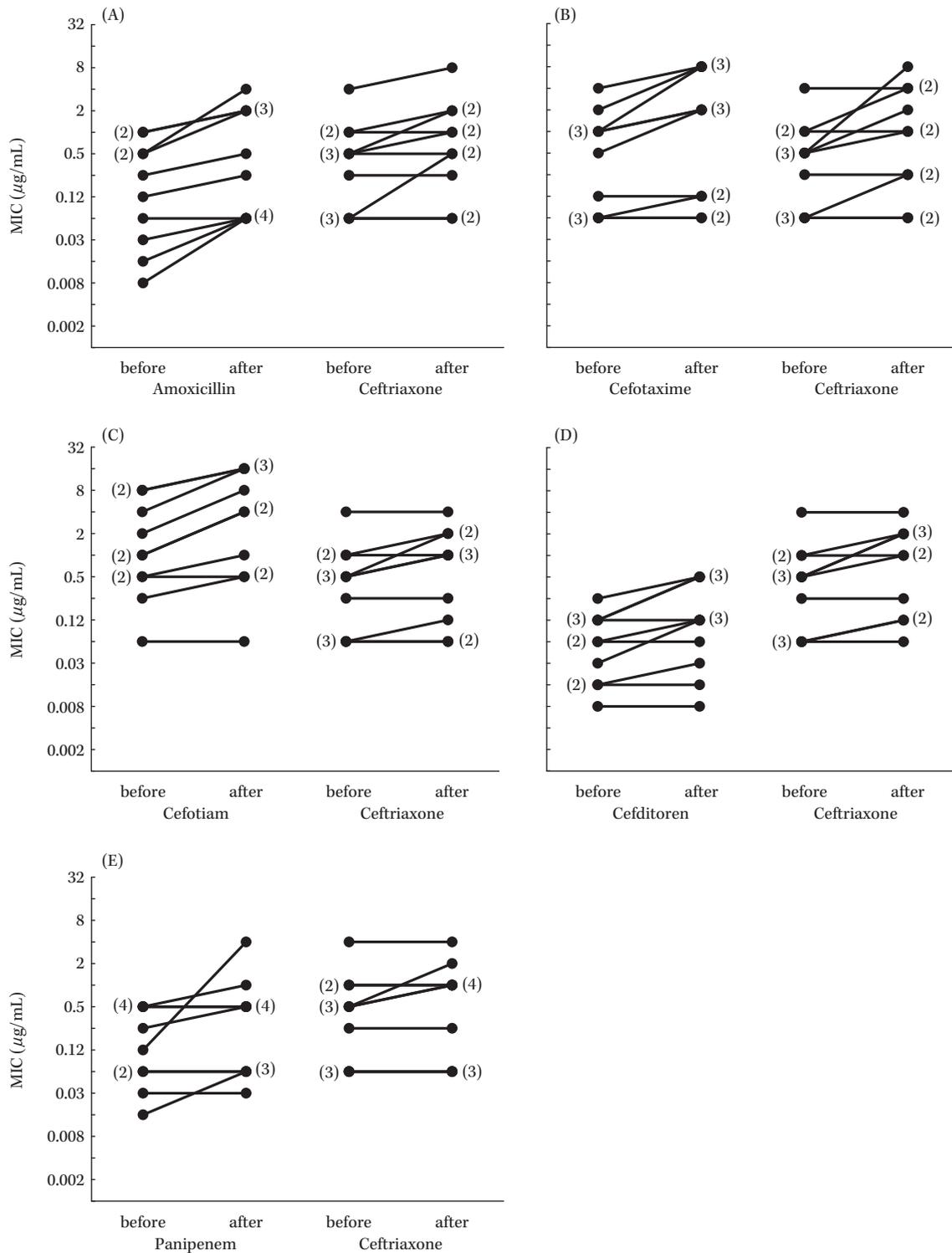


Fig. 1. Ceftriaxone MICs against *Streptococcus pneumoniae* strains before and after 10-times exposure to sub-MIC of β -lactam antibiotics (A: amoxicillin, B: cefotaxime, C: cefotiam, D: cefditoren, E: panipenem). Parenthesis indicated number of strains.

よって MIC が 8 倍以上上昇した 21 株の接触後の Fts I のアミノ酸置換の有無を Table 6 に示した。CDTR との連続接触によって 8 倍 MIC が上昇した MCM1 株に Val592Ala が認められた。また、CTX との連続接触によって 8 倍 MIC が上昇した MCM3 株において複数の

アミノ酸置換が認められた。しかし、それ以外の株においてはさらなるアミノ酸置換は認められなかった。

4. 各種 β -lactam 薬による MIC 上昇株に対する CTRX の MIC 変化

S. pneumoniae において、各種 β -lactam 薬を 10 回連続

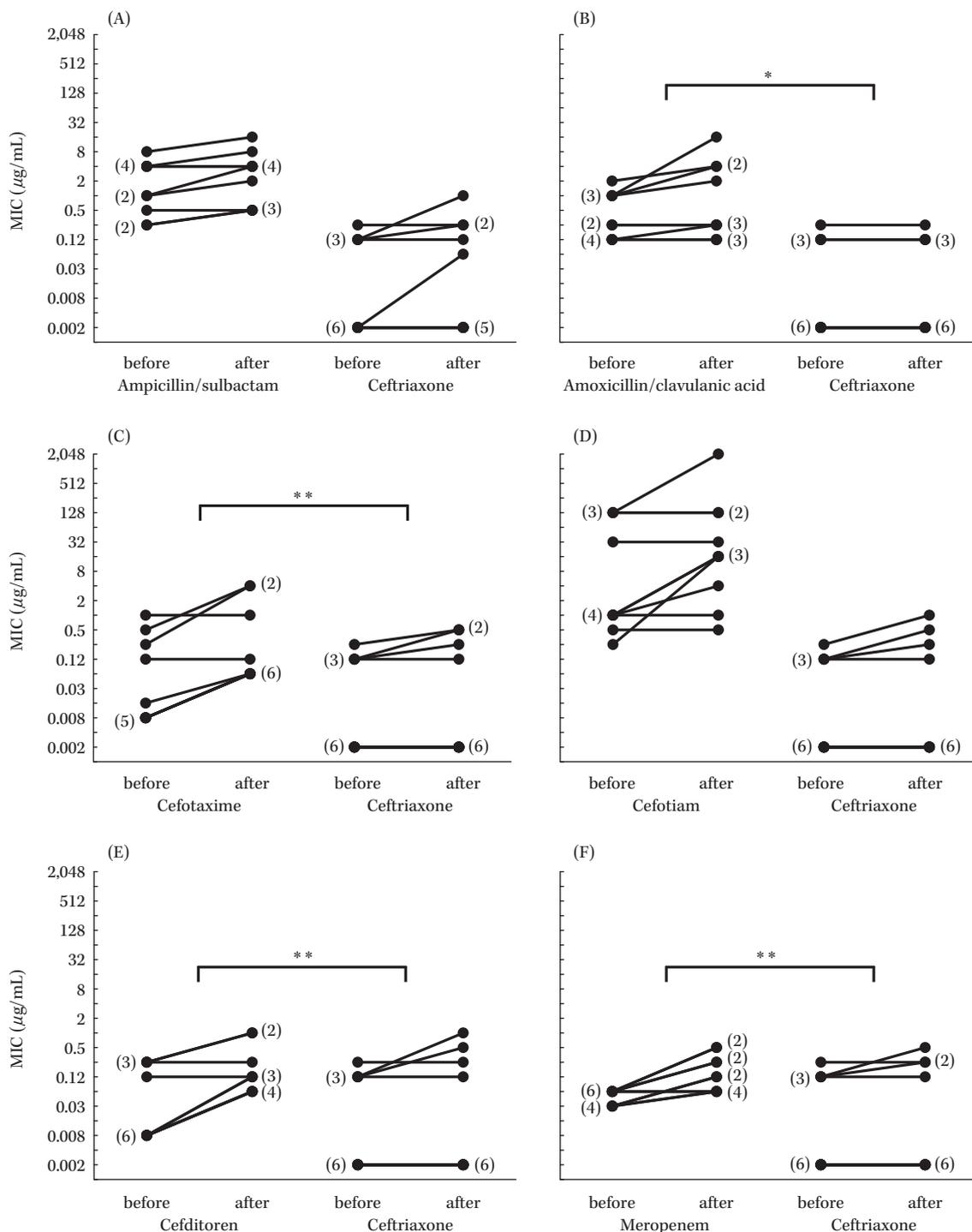


Fig. 2. Ceftriaxone MICs against *Haemophilus influenzae* strains before and after 10-times exposure to sub-MIC of β -lactam antibiotics (A: ampicillin/sulbactam, B: amoxicillin/clavulanic acid, C: cefotaxime, D: cefotiam, E: cefditoren, F: meropenem).

Parenthesis indicated number of strains.

*Statistical analysis by Wilcoxon rank sum test against the ceftriaxone group (MIC difference of ceftriaxone before and after each β -lactam exposure).

[Significantly different from the ceftriaxone group (*amoxicillin/clavulanic acid; $p < 0.05$, **cefotaxime, cefditoren and meropenem; $p < 0.01$)]

接触させた後の各菌株に対する各接触薬剤および CTRX の MIC を Fig. 1 に示した。いずれの薬剤によっても CTRX の MIC 上昇は接触薬剤のそれと比べ、低い

傾向が認められた。

H. influenzae に対しても同様な傾向を示し (Fig. 2), 特に, AMPC/CVA, CTX, CDTR および MEPM の 4 薬剤

の MIC 上昇と比較して CTRX の MIC 上昇は有意に低い傾向が認められた。

III. 考 察

髄膜炎などの重症感染症の起炎菌である *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の抗菌薬感受性が異なる臨床分離株を用い、各種 β -lactam 薬の連続接触による耐性化について詳細な検討を行った。その結果、両菌種に対して、接触させた薬剤の MIC が上昇する株が認められたが、両菌種間でその傾向は異なっていた。*S. pneumoniae* においては、薬剤との連続接触によって 4 倍以上 MIC が上昇した株は、各薬剤 2~4 株程度で、その上昇倍率も低かった。しかし、*H. influenzae* においては、*S. pneumoniae* に比べ MIC が上昇した株は全般に多く、8~16 倍以上 MIC 上昇した株も比較的多く認められた。

これら耐性化した株の PBP_s 遺伝子変異を検索した結果、*S. pneumoniae* および *H. influenzae* に PBP_s 遺伝子変異が加わった例は少なく、*H. influenzae* においては 2 株の Fts I にアミノ酸置換がみられたものの、Sanbongi ら⁵⁾ が報告している耐性化に及ぼす主なアミノ酸置換部位ではなかった。このことから、*H. influenzae* の各種セフェム薬に対する比較的頻度の高い耐性化は、それらの MIC 上昇倍率から、グラム陰性桿菌でみられる薬剤の取り込み、排出が関与していることが推察された。Sanchez ら⁷⁾ は *H. influenzae* の抗菌薬耐性には、多剤を排出する efflux pump が関与することを報告しており、今回の各種セフェム薬との 10 回の連続接触によって、同様な現象が生じた可能性がある。しかし、今回調べた耐性遺伝子変異は PBP 3 をコードする *fts I* の限られた部位にすぎず、他の領域の変異が生じている可能性も否定できないが、現段階では明らかにすることはできなかった。

H. influenzae の耐性化については、接触薬剤によって差が認められ、CTX、CDTR によって実験に用いた多くの株に対する MIC の上昇がみられた。対照的に、ABPC/SBT および AMPC/CVA によって MIC の上昇がみられる菌株は少なかった。また、同じセフェム系抗菌薬のなかでも、CTRX はペニシリン系薬と同様に少ない頻度であった。高頻度に MIC 上昇がみられた CTX および CDTR の MIC 上昇倍率は 8 倍以上の割合が多かったが、これらの要因として PBP 結合性の差が考えられる。Morikawa ら⁸⁾ は BLNAS と BLNAR の PBP に対する親和性について検討し、CTRX および CTX は *H. influenzae* の PBP 3 (3a, 3b) に強く結合するが、BLNAR のアミノ酸置換の生じた PBP 3 に対する親和性はともに低くなると述べている。しかし、CTRX の PBP 3 に対する親和性は CTX に比較すれば高いことから、今回の MIC 値の差がみられたものと考えられる。また、CTX および CDTR に比較的 MIC の上昇率が高い株が認められたことについて、前に述べたように両薬剤は CTRX に比べ当該菌の PBP 3 に対する親和性が低くそれによる殺菌力

の違いが影響しているのかも知れない。*H. influenzae* は BLNAS であっても MIC 以上の ampicillin を作用させると、菌はフィラメント化やスフェロプラスト化といった形態変化は呈するものの、容易には溶菌せず、抗菌薬が消失すると容易に元の桿菌へ戻りうる特性を有している^{9,10)}。この再増殖しやすい性質が自己融解を生じやすい *S. pneumoniae* と根本的に異なるため、耐性化の程度の差が生じた可能性がある。

一方、同じセフェム系抗菌薬のなかでも耐性化頻度および MIC 上昇倍率が低かった CTRX は、過去にわれわれが実施した感受性調査²⁾における耐性化がみられなかった事実を裏づけるものであった。その理由については、明らかにされていないが、殺菌力が影響している可能性がある。今回成績には示さなかったが、CTRX による連続接触では他の β -lactam 薬への影響が少ないこと、さらに CTRX の殺菌力に、通常 cephalosporin 系薬ではみられない濃度依存傾向が確認されている。すなわち、CTRX の安定した抗菌活性には、本薬に特徴的な殺菌作用が関与している可能性があり、これらの解明が今後の検討課題である。

以上、今回の各種 β -lactam 薬との連続接触実験により、一部の薬剤は *H. influenzae* に対して MIC が上昇することが明らかとなったことから、臨床における抗菌薬使用に注意が必要であると考えられた。

文 献

- 1) 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: 69-93
- 2) 松崎 薫, 志藤久美子, 渡部恵美子, 長谷川美幸, 佐藤弓枝, 小林寅詰：2004 年に分離された各種臨床分離株に対する ceftriaxone の抗菌活性に関する検討。Jpn J Antibiot 2005; 58: 283-9
- 3) Granger D, Boily-Larouche G, Turgeon P, Weiss K, Roger M: Molecular characteristics of *pbp1a* and *pbp2b* in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Quebec, Canada. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 61-70
- 4) Granger D, Boily-Larouche G, Turgeon P, Weiss K, Roger M: Genetic analysis of *pbp2x* in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Quebec, Canada. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 832-9
- 5) Sanbongi Y, Suzuki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K: Molecular evolution of β -lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2487-92
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteen informational supplement M100-S19. Wayne, PA, 2009
- 7) Sánchez L, Pan W, Viñas M, Nikaido H: The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. J Bacteriol 1997; 179: 6855-7

- 8) Morikawa Y, Kitazato M, Mitsuyama J, Mizunaga S, Minami S, Watanabe Y: In vitro activities of piperacillin against β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1229-34
- 9) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊: *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について。(第4編) Ampicillin により誘導された *Haemophilus influenzae* のスフェロプラストからの再増殖について。 *Chemotherapy* 1978; 26: 666-75
- 10) Bottone E J, Brandman Z, Schneierson S S: Spheroplasts of *Haemophilus influenzae* induced by cell wall-active antibiotics and their effect upon the interpretation of susceptibility tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 9: 327-33

Laboratory-derived *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* strains resistant to ceftriaxone and other β -lactam antibiotics

Intetsu Kobayashi¹⁾, Akiko Kanayama¹⁾, Motoko Takigawa²⁾,
Takako Iyoda²⁾, Makoto Suzuki²⁾, Takeshi Saika²⁾,
Miyuki Hasegawa²⁾, Fumiaki Ikeda²⁾ and Keisuke Sunakawa³⁾

¹⁾ School of Nursing, Toho University School of Medicine, 4-16-20 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo, Japan

²⁾ Chemotherapy Division, Mitsubishi Chemical Medience Corporation

³⁾ Kitasato Institute for Life Science, Kitasato University

Laboratory-derived resistant strains were obtained by serial passage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* ATCC strains and clinical isolates on agar containing increasing concentrations of ceftriaxone (CTR) and other β -lactam antibiotics.

Ten strains of *S. pneumoniae* and 10 strains of *H. influenzae* were subcultured 10 times on agar media containing β -lactam antibiotics at gradually higher concentrations. CTR MICs and antibiotics used for acquired strain resistance before and after exposure to antibiotics were determined. PBPs gene mutations before and after antibiotic exposure was estimated. An increase of 4 times or more in MIC was observed in 10 strains of *S. pneumoniae*—strains numbered 4 each for amoxicillin and cefotiam, 3 each for cefotaxime, CTR, and cefditoren and 2 for panipenem. An increase in MIC of 8 times or more was observed in 10 strains of *H. influenzae*—strains numbered 7 for CTX, 6 for CDTR, 4 for CTM, 2 for meropenem, 1 each for CTR and amoxicillin/clavulanic acid. The increase in CTR MICs was low for strains for which MICs of each antibiotic increased.

No differences were seen in the PBPs gene before and after exposure to antibiotics, except for part of strains, suggesting that other resistance mechanisms of participate in resistance.