

【原著・臨床】

2001年から2015年までの小児呼吸器感染症患者から分離された
Streptococcus pneumoniae と *Haemophilus influenzae* における
抗菌薬感受性および penicillin-binding-protein 遺伝子変異の変動

坂田 宏

旭川厚生病院小児科*

(平成27年8月21日受付・平成27年10月16日受理)

2001年から2015年まで、毎年2月からの1~2カ月間に当院で診療した、呼吸器感染症の小児の臨床材料から分離された、*Streptococcus pneumoniae* と *Haemophilus influenzae* のそれぞれ20~35株ずつについて耐性株の検出率を調査した。2001年から2015年までの15年間を5年ごとに前・中・後の3期に分けて変動を検討した。Penicillin-binding-protein (PBP) 遺伝子変異による分類を行うとともに、*S. pneumoniae* は penicillin G, *H. influenzae* は ampicillin に対する抗菌薬感受性分類も行った。*S. pneumoniae* は感受性分類では前期と中期の分離株を比較すると、ペニシリン感受性株 (PSSP) の割合が増加 ($p < 0.001$) した。耐性遺伝子による分類ではほとんど変動を認めず、感受性分類で増加していた PSSP は *pbp2x* 変異を有する gPISP であった。*H. influenzae* は感受性分類では β -lactamase 非産生性 ABPC 感受性株 (BLNAS) は前期と中期で減少 ($p < 0.001$)、 β -lactamase 産生性 ABPC 耐性株 (BLPAR) は前期と後期の間で有意に増加 ($p < 0.05$) した。耐性遺伝子分類でも gBLNAS は前期と中期の間で減少 ($p < 0.001$)、gBLNAR は前期と中期の間で増加 ($p < 0.001$) していた。感受性分類で増加していた BLPAR は gBLPACR-2 であった。

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, drug-resistance, penicillin-binding-protein, respiratory infection

Streptococcus pneumoniae および *Haemophilus influenzae* は小児の髄膜炎や呼吸器感染症の原因菌として重要な位置を占めている。両菌ともに penicillin-binding-protein (PBP) 遺伝子変異による耐性株が問題となって久しい。本邦では1980年代後半から penicillin 薬や cephem 薬に感受性が低下した株が増加した。このような株が増加した一因に、抗菌薬の不適切な使用があげられている。そのため、2000年代に抗菌薬の適正使用を目的として、小児の呼吸器感染症および中耳炎の治療について、関連する学会が共同で抗菌薬投与を含む診療ガイドラインを公表した^{1,2)}。さらに、*H. influenzae* type b (Hib) ワクチン、肺炎球菌結合型ワクチン (PCV) が導入され、両菌による重症感染症は著しく減少している³⁾。抗菌薬適正使用とワクチンの普及は、低感受性株の分離頻度にも影響を及ぼすと考えられる。当施設では2001年から15年間にわたって、小児の臨床材料から分離された *S. pneumoniae* と *H. influenzae* の耐性の状況を調査してきた結果を報告する。

I. 対象と方法

2001年から2015年まで、毎年2月からの1から2カ月間に当院で診療した、生後1カ月から5歳までの呼吸

器感染症の小児の喀痰または上咽頭スワブから分離された、*S. pneumoniae* と *H. influenzae* をそれぞれ20~35株ずつ検討した。各年とも検体の90%以上を上咽頭スワブが占めた。年齢構成は各年とも最多年齢は1歳で、中央値は1歳代であり、有意差は認めなかった。*S. pneumoniae* は penicillin G (PCG), *H. influenzae* は ampicillin (ABPC) に対する薬剤感受性および両菌ともに PBP 遺伝子変異を検討した。*S. pneumoniae* はマイクロスキャン Walk Away[®] (ベックマン・コールター) で MIC (minimum inhibitory concentration) を測定した。*H. influenzae* は2001年から2008年までは E-test (シスメックス・ピオメリュール)、2009年以降は分離されたすべての株をマイクロスキャン Walk Away[®] で測定したが、系統的に $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ までしか測定できないために、 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の株を E-test 法で薬剤感受性試験を行い、得られた成績を採用した。 β -lactamase 産生性は、ニトロセフィン法によるセフィナーゼディスク[®] (日本 BD) を用いて測定した。

S. pneumoniae の penicillin 耐性は、PCG に対する最小

*北海道旭川市1条通24丁目

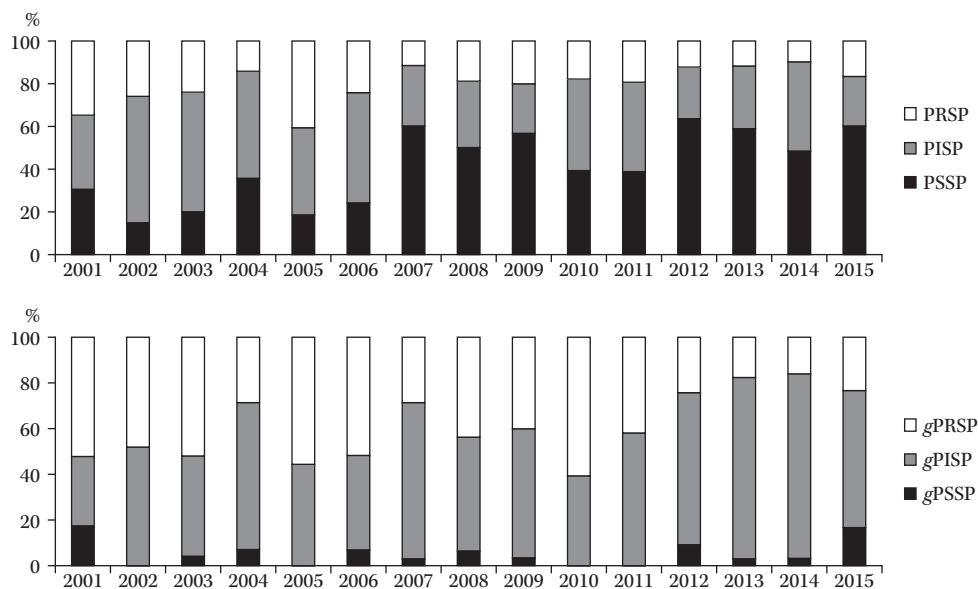


Fig. 1. Annual change in mutation of penicillin-binding-protein genes and penicillin G susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with respiratory infection between 2001 and 2015. upper: classification by penicillin G susceptibility, lower: classification by mutation of penicillin-binding-protein genes

発育阻止濃度 (MIC) が $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未満を penicillin susceptible *S. pneumoniae* (PSSP), $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上 $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未満を penicillin intermediate-resistant *S. pneumoniae* (PISP), $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を penicillin resistant *S. pneumoniae* (PRSP) とした⁴⁾。

同様に *H. influenzae* の分類は, β -lactamase 非産生かつ ABPC の MIC が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下を β -lactamase non-producing ABPC sensitive (BLNAS) 株, β -lactamase 非産生かつ ABPC の MIC が $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ を β -lactamase non-producing ABPC intermediately-resistant (BLNAI) 株, β -lactamase 非産生かつ ABPC の MIC が $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を BLNAR 株, β -lactamase 産生を β -lactamase producing ABPC resistant (BLPAR) 株, β -lactamase 産生かつ clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC) の MIC が $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を β -lactamase producing CVA/AMPC resistant (BLPACR) 株としている⁵⁾。

PBP 遺伝子変異は Meiji Seika ファルマ医薬研究所に菌株を送付して解析を依頼した。*S. pneumoniae* の PBP 遺伝子解析は PCR キットである肺炎球菌遺伝子検出試薬 ver.2 (湧永製薬) を用いて行った。その成績から生方らの報告⁶⁾に基づいて, gPRSP, gPISP, gPSSP に分類した。

H. influenzae も PCR キットであるインフルエンザ菌遺伝子検出試薬 (湧永製薬) を用いて測定し, 生方らの報告⁷⁾に基づいて, gBLNAS, gLow-BLNAR, gBLNAR, gBLPAR, β -lactamase positive CVA/AMPC resistant (gBLPACR)-1, gBLPACR-2 に分類した。

15年間の成績を5年ごとに2000年~2004年を前期,

2005年~2009年を中期, 2010年~2014年を後期としてデータを集計し, 変動を統計学的に検討した。*S. pneumoniae* は前期130株, 中期154株, 後期159株, *H. influenzae* は前期117株, 中期159株, 後期157株を解析した。検出率の有意差の検定は StatMate III for Macintosh[®] (アトムス) により, 検定を行い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

II. 結 果

S. pneumoniae の15年間の成績を Fig. 1 の上段に薬剤感受性による分類, 下段に PBP 遺伝子分類による耐性菌の頻度を示した。薬剤感受性分類で見ると, 2001年から2006年の PSSP の頻度は10から35%と低かったが, 2007年に60%に達したあとは35から60%と高い検出率を示した。遺伝子変異による分類で見ると, 2001年以降 gPSSP は全期間で検出頻度は低く, 20%を超えることはなかった。gPRSP は当初より30から60%で推移していたが, 2010年からは減少傾向を認めた。Fig. 2 に5年ごとに分けた成績を示した。薬剤感受性分類では前期と中期の間で, PSSP が有意に増加 ($p < 0.001$), 前期と後期の間で PRSP と PISP が有意に減少 ($p < 0.05$) していた。耐性遺伝子による分類では中期と後期の間で, gPRSP は有意に減少 ($p < 0.05$), gPISP は有意に増加 ($p < 0.05$) した。gPSSP については有意な変動は認めなかった。gPISP の解析では, *pbp2x* のみの変異株が前期27.7%, 中期36.4%, 後期43.4%と増加し, 前期と後期の間で有意差 ($p < 0.05$) を認めた。*pbp2b + 2x* の変異株は前期5.4%, 中期5.8%, 後期17.0%と後期で増加し, 前期と後期, 中期と後期の間でそれぞれ有意差 ($p < 0.05$) を認めた。

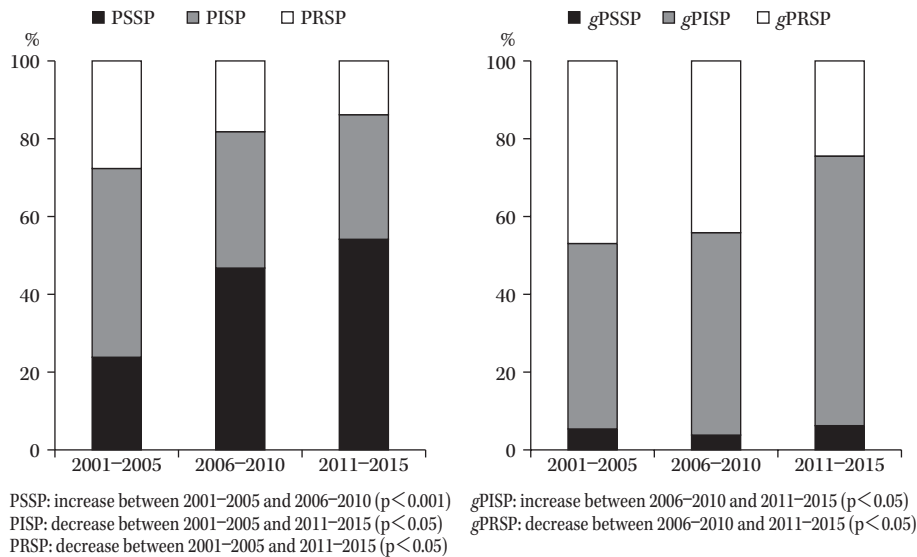


Fig. 2. Change in mutation of penicillin-binding-protein genes and penicillin G susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with respiratory infection every 5 years. right: classification by penicillin G susceptibility, left: classification by mutation of penicillin-binding-protein genes

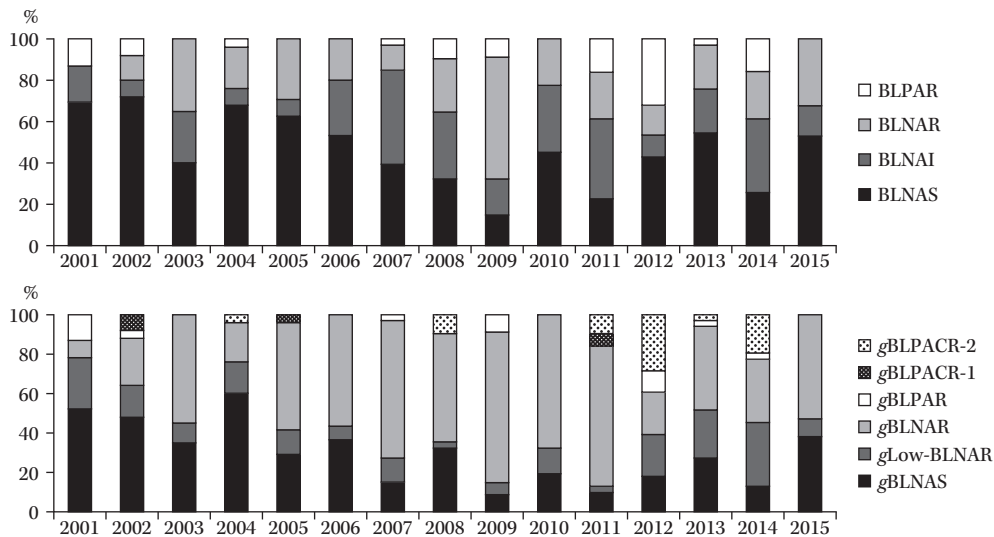


Fig. 3. Annual change in mutation of penicillin-binding-protein genes and ampicillin susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates from children with respiratory infection between 2001 and 2015. upper: classification by ampicillin susceptibility, lower: classification by mutation of penicillin-binding-protein genes

H. influenzae の成績を Figs. 3, 4 に示した。薬剤感受性分類では 2001 年と 2002 年には約 70% 前後であった BLNAS はしだいに減少し、2009 年には 14.3% に低下した。2010 年以降はその年によって 20~50% の幅で大きく変動していた。BLNAI と BLNAR も変動は大きい、両者を加えると 40~60% でここ数年は推移していた。 β -lactamase 産生株は毎年 0~3 株 (0~13.0%) の検出であったが、2011 年以降は増加する傾向が認められた。遺伝子変異による分類では、gBLNAS は 2004 年までは

50% 前後検出され、その後減少し 10~20% で推移していたが、2015 年に 38.2% と増加した。gBLNAR は 2001 年には 10% に達していなかったが、急激に増加し 2009 年に 76.4% に達した。2012 年以降は 20~50% とやや低下し、その分を gLow-BLNAR が高い頻度を示した。gBLPAR は全期間を通じて 10% 未満と検出率は低かった。2011 年以降、gBLPACR-2 の検出率が増加する傾向を示した。BLNAS は前期と中期の間で有意に減少 ($p < 0.001$)、BLNAI も前期と中期で有意に増加 ($p < 0.05$)、

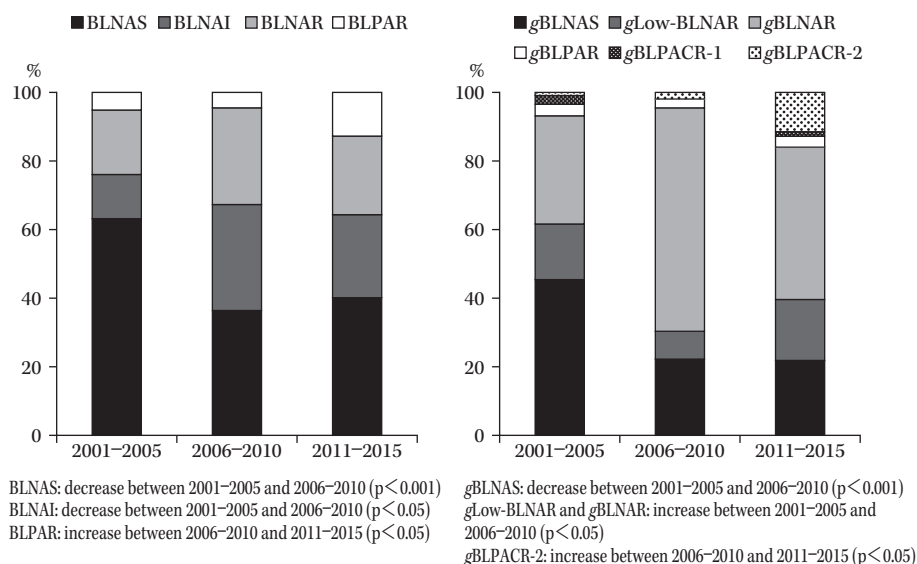


Fig. 4. Change in mutation of penicillin-binding-protein genes and ampicillin susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates from children with respiratory infection every 5 years. left: classification by ampicillin susceptibility, right: classification by mutation of penicillin-binding-protein genes

BLPAR は前期と後期の間で有意に増加 ($p < 0.05$) した。BLNAR には有意な変動を認めなかった。gBLNAS は前期と中期の間で有意に減少 ($p < 0.001$)、gBLNAR は前期と中期の間で有意に増加 ($p < 0.001$)、前期と後期の間で有意に減少 ($p < 0.05$)、gLow-BLNAR は中期と後期の間で有意に増加 ($p < 0.05$)、gBLPACR-2 は中期と後期の間で有意に増加 ($p < 0.05$) した。

III. 考 察

抗菌薬感受性による分類は生物学的検査方法による表現型の成績であり、PBP 遺伝子変異による分類は遺伝子型の結果であるので、両者は必ずしも一致しない⁶⁾。両者を同時に測定することで、より菌の性状を把握することが可能と考えられる。具体的には、*S. pneumoniae* は感受性分類で感受性株が増加していることが確認されたが、この PSSP は耐性株が出現する以前の株とは異なって、*pbp2x* の 1 カ所に変異を有する株が多く含まれていた。*H. influenzae* では感受性分類で BLPAR 株が増加する傾向が得られたが、これは β -lactamase を産生かつ PBP 遺伝子変異を有する BLPACR 株が多かった。両菌とも、薬剤感受性分類と遺伝子変異の分類で多少の乖離はあるが、それぞれの耐性株が増加する状況が安定あるいは感受性が回復する傾向がうかがえた。

著者の成績のように本邦の耐性状況を感受性分類と耐性遺伝子変異の両方で推移を検討した報告は少ない。ただ、著者の成績は 1 病院に限定されているので、全国的な耐性菌の動向を反映しているかを検討した。

S. pneumoniae と *H. influenzae* の全国的な感受性サーベイランスの成績は、全国の小児科 19~27 施設で組織された小児科領域耐性菌研究会から報告されている⁸⁾。

2000~2001 年、2004 年、2007 年、2010 年、2012 年の 5 回のサーベイランスが行われ、著者の調査ともほぼ同期間の成績である。*S. pneumoniae* は第 1 回サーベイランスで PSSP が 35.4%、PISP が 34.8%、PRSP が 29.8% であった。PSSP は第 2 回 33.1%、第 3 回 44.2%、第 4 回 23.2% と推移し、第 5 回では 50.2% と初めて 50% を超えた。一方、PRSP は 29.8%、11.0%、28.3% と変動し、第 5 回では 10.3% と減少していた。全国的にも PSSP の増加と PRSP の減少が確認された。*H. influenzae* は第 1 回では BLNAS が 62.9%、BLNAI が 17.6%、BLNAR が 11.2%、BLPAR は BLPACR と分けられていないが 8.3% であった。その後、BLNAS は 30~40% とほぼ一定で、第 5 回で 28% と低下した。BLNAI は 15~25% と大きな変動を示さなかった。BLNAR は 35~50% に増加していた。BLPAR は 2~5%、BLPACR は第 3 回以降に 4~5% と軽度の増加を認めた。

PBP 遺伝子変異による分類で耐性頻度を検討した成績では、*H. influenzae* について Ubukata らの本邦の小児の髄膜炎から分離された株を 2000 年から 2011 年まで追跡した成績⁹⁾がある。その報告によると 2000 年には gBLNAS が 31.7% であったが、徐々に減少し 2011 年には 7.0% に達した。一方、gBLNAR は 2000 年に 3.8% であったが、2011 年には 69.8% まで増加した。gBLPAR は 2001 年に 26.0% と高い検出率であったが、2011 年には検出されなかった。gBLPACR-2 は 1.0% から 7.0% に増加していた。これらの株は髄膜炎由来なので、Hib であり、著者らの成績は呼吸器由来でおそらく非莢膜型と考えられるため、単純な比較はできないが、gBLNAS の減少と gBLNAR の増加は一致していた。

S. pneumoniae では 2002 年～2004 年の小児の肺炎から分離された成績¹⁰⁾では gPRSP が 52.3%, *pbp1a*+2*x* 変異の gPISP が 14.9%, 同じく *pbp2x*+2*b* 変異の gPISP が 6.6%, *pbp2x* 変異の gPISP が 18.4%, gPSSP が 8.4% であった。2006 年～2009 年の成績¹¹⁾では gPRSP が 47.7%, *pbp1a*+2*x* 変異の gPISP が 14.9%, *pbp2x*+2*b* 変異の gPISP が 5.0%, *pbp2x* 変異の gPISP 26.1%, gPISP が 6.2% であり, *pbp2x* 変異株が増加していた。これらの結果は著者の成績とほぼ一致していた。このように全国的な調査成績⁸⁻¹¹⁾と著者の結果はほぼ一致するものであり, 一病院の成績ではあっても, 全国的な傾向を反映していると考えられた。

S. pneumoniae において, 感受性菌が増加している理由の第一は PCV の接種の普及があげられる。7 価と 13 価の PCV に含まれる血清型が全国的に著しく減少していることが認められる^{12,13)}。7 価および 13 価の PCV に含まれる血清型に PRSP の頻度が高かったため, これらの血清型の株が著しく減少したことによると思われる。また, 感受性の回復には, penicillin 薬を中心とした抗菌薬使用を推奨する各種ガイドライン^{1,2)}による適正化の効果も考えられる。*pbp2b* は penicillin 薬と, *pbp2x* は cephem 薬と親和性が高い⁶⁾とされ, 著者の成績で中期から後期にかけて, *pbp2x*+2*b* が有意に増加していることは, cephem 系が中心となっている近年の小児科領域抗菌薬使用状況のなかで, 相対的に penicillin 薬を投与される児が増え, 同時ではないものの両者を投与されたことがある児が増えていると考えられた。*H. influenzae* でも β -lactamase 産生し, かつ PBP 遺伝子の変異も伴った株の増加が認められ, *S. pneumoniae* と同様に penicillin 薬使用が増加していると思われる所見であった。残念ながら, 旭川市における抗菌薬の使用状況に関する詳細な成績を入手できなかったため, この事象を証明することはできなかった。

今回の成績をもとに, 経口抗菌薬療法を考えると, *S. pneumoniae* は PSSP の頻度が 50% を超えていることから, やはり penicillin 薬が適していると考えられる。しかし, *H. influenzae* は β -lactamase を産生する株に加えて, PBP に変異した株が増加しており, そのなかには ABPC に対する MIC が 16 μ g/mL を超える株も少なくないことから, penicillin 薬では効果が不十分な可能性が出てくる。したがって, 原因菌が不明な時の抗菌薬療法は, 最近の抗菌活性⁸⁾を考慮すると penicillin 薬として AMPC, CVA/AMPC, sulbactam/ampicillin, cephem 薬として cefditoren, cefcapene を選択すべきと考える。ただし, 今回の成績から cephem 薬が中心となれば *S. pneumoniae* においては PBP に変異を有する菌, penicillin 薬が中心となれば *H. influenzae* において β -lactamase 産生菌の増加が推測される。今後, 減少した PRSP の再増加および両方の耐性機序を有した *H. influenzae* の増加を招かないようにするためには, さらに抗菌薬の適正使用に努

める必要がある。

利益相反自己申告: 著者は Meiji Seika ファルマ株式会社から研究資金等の援助をうけている。

文 献

- 1) 小児呼吸器感染症診療ガイドライン作成委員会: 小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2004, 上原すゞ子, 砂川慶介 監修, 協和企画, 東京, 2004
- 2) 小児急性中耳炎診療ガイドライン作成委員会: 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
- 3) Shinjoh M, Iwata S, Yagihashi T, Sato Y, Akita H, Takahashi T, et al: Recent trends in pediatric bacterial meningitis in Japan—a country where *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* conjugated vaccines have just been introduced. *J Infect Chemother* 2014; 20: 477-83
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. Vol. 28. M100-S18. CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2008
- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seventh Edition. M7-A7. CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2006
- 6) 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
- 7) 生方公子, 岸井こずゑ: PRSP と BLNAR 耐性機構と惹起される侵襲性感染症。化療の領域 2008; 25: 38-45
- 8) 佐藤吉壮, 豊永義清, 花木秀明, 砂川慶介: 小児科領域感染症における耐性菌に関する 2012 年度サーベイランス。日化療会誌 2014; 62: 118-28
- 9) Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K; Working Group of Nationwide Surveillance for Bacterial Meningitis: Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000–2011. *J Infect Chemother* 2013; 19: 34-41
- 10) 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
- 11) Sakai F, Chiba N, Ono A, Yamagata Murayama S, Ubukata K, Sunakawa K, et al: Molecular epidemiologic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009. *J Infect Chemother* 2011; 17: 334-40
- 12) Chiba N, Morozumi M, Shouji M, Wajima T, Iwata S, Sunakawa K, et al: Rapid decrease of 7-valent conjugate vaccine coverage for invasive pneumococcal diseases in pediatric patients in Japan. *Microb Drug Resist* 2013; 19: 308-15
- 13) Chiba N, Morozumi M, Shouji M, Wajima T, Iwata S, Ubukata K, et al: Changes in capsule and drug resistance of *Pneumococci* after introduction of PCV7, Japan, 2010–2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1132-9

Annual change in antibiotic resistance and penicillin-binding-protein genotype of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolated from children with respiratory infection between 2001 and 2015

Hiroshi Sakata

Department of Pediatrics, Asahikawa Kosei Hospital, 1-24, Asahikawa, Hokkaido, Japan

We investigated the detection rates of resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among 20 to 35 strains of each species isolated from clinical materials obtained from children with respiratory tract infections who were examined at our hospital during a 1- to 2-month period around every February, spanning the 15 years from 2001 through 2015. The survey was divided into 3 periods, early, middle, and late, and changes were examined. The strains were classified according to their penicillin-binding-protein (PBP) resistance mutation; in addition, *S. pneumoniae* and *H. influenzae* strains were classified according to susceptibility to penicillin G and ampicillin, respectively. Among *S. pneumoniae* strains, penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (PSSP) strains increased ($p < 0.001$) from the early to the middle period according to the susceptibility classification. There were very few changes according to the resistant gene classification; the PSSP strain which increased according to the susceptibility classification was gPISP with the *pbp2x* mutation. With regard to *H. influenzae* strains, beta-lactamase nonproducing ABPC-susceptible strains (BLNAS) decreased ($p < 0.001$) from the early to the middle period, whereas beta-lactamase-producing ABPC-resistant strains (BLPAR) significantly increased ($p < 0.05$) from the early to the late period. According to the resistant gene classification, gBLNAS also decreased ($p < 0.001$) from the early to the middle period, whereas gBLNAR increased ($p < 0.001$) from the early to the middle period. The BLPAR which increased according to the susceptibility classification was gBLPACR-2.

Our investigation of resistant strains according to drug susceptibility and resistant gene mutation identified major changes in the types and frequencies of resistant strains of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* during a period of 15 years. Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding-protein and macrolide resistance genes, and serotype of *S. pneumoniae* isolates from community-acquired pneumonia in children.