

近畿地区で分離された *Streptococcus pneumoniae* の 抗菌薬耐性状況と PBP 遺伝子変異について

¹近畿大学医学部附属病院中央臨床検査部, ²天理よろず相談所病院臨床病理部, ³国立循環器病センター臨床検査部,
⁴神戸大学医学部附属病院中央検査部, ⁵和歌山労災病院検査科, ⁶滋賀県立成人病センター検査部,
⁷ファルコバイオシステムズ総合研究所検査二課, ⁸関西医科大学病院中央検査部,
⁹兵庫医科大学病院中央臨床検査部, ¹⁰大阪大学医学部附属病院臨床検査部,
¹¹兵庫県立尼崎病院臨床検査部(近畿耐性菌研究会)

佐藤かおり¹⁾ 島川 宏一²⁾ 小松 方²⁾ 浦 敏郎³⁾
木下 承皓⁴⁾ 山崎 勝利⁵⁾ 西尾 久明⁶⁾ 鷲津 良道⁷⁾
山下 和成⁷⁾ 中村 竜也⁸⁾ 和田 恭直⁹⁾ 豊川 真弘¹⁰⁾
幸福 知己¹¹⁾ 相原 雅典²⁾

(平成 13 年 11 月 26 日受付)

(平成 14 年 1 月 7 日受理)

Key words : *Streptococcus pneumoniae*, penicillin-binding protein, drug susceptibility

要 旨

2000 年 4 月から 6 月に近畿地区の 9 医療施設において分離された *Streptococcus pneumoniae* 235 株について, 13 種類の抗菌薬に対する MIC 値を測定した. NCCLS の判定基準によると PSSP 46.8%, PISP 42.6%, PRSP 10.6% であり, ペニシリン低感受性は 125 株(53.2%)であった. 同様に PCG 以外の抗菌薬に対する耐性株は CTRX 28.9%, CTX 7.7%, IPM 8.9%, MEPM 9.8%, CAM 82.6%, CLDM 42.1%, LVFX 0.4% および VCM 0% であった. PCG の MIC 値が 0.5 μ g/ml 以下の 140 株について *pbp1a*, *pbp2b* および *pbp2x* の変異を PCR 法で確認したところ, PSSP 109 株中いずれの変異も認められなかった株は 32 株(29.4%), 1 種類以上の変異は 77 株(70.6%)であった. PISP 31 株のうちいずれの変異も認められなかった株は 1 株(3.2%)のみであった. PSSP と判定された株の 7 割に *pbp* の変異が認められたことは, 今後より耐性化が進む可能性を示唆するものと考えられ, 一層の監視が必要である.

[感染症誌 76: 254~262, 2002]

I. 序 文

近年, *Streptococcus pneumoniae* のペニシリン耐性株による感染症の増加が問題視されている. 当研究会は 1997 年に発足したが, その活動の一環として 1999 年から *S. pneumoniae* の耐性状況の調査

を開始した. この度 2000 年度事業として, 研究会で収集した *S. pneumoniae* について, 各種抗菌薬における耐性化の特徴について調査した.

II. 対象および方法

1. 使用菌株

2000 年 4 月から 6 月の 3 カ月間に, 関西医科大学病院, 近畿大学医学部附属病院, 国立循環器病センター(大阪府), 神戸大学医学部附属病院, 兵

別刷請求先: (〒589-8511) 大阪狭山市大野東 377-2
近畿大学医学部附属病院中央臨床検査部
佐藤かおり

Table 1 Distribution of MICs for β -lactams

	category	MIC (μ g/ml)									MIC ₅₀	MIC ₉₀
		0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	> 4		
penicillin G	PSSP	42	68								0.06	0.06
	PISP			10	11	10	69				1	1
	PRSP							24	1		2	2
	Total	42	68	10	11	10	69	24	1		0.25	2
ampicillin		0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	> 4	MIC ₅₀	MIC ₉₀
	PSSP	38	60	12							0.06	0.12
	PISP			8	11	14	43	23	1		1	2
	PRSP							20	4	1	2	4
	Total	38	60	20	11	14	43	43	5	1	0.12	2
ceftriaxone		0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	> 2	MIC ₅₀	MIC ₉₀
	PSSP	4	18	11	34	34	6	3			0.12	0.25
	PISP					15	43	40	2		0.5	1
	PRSP						2	20	2	1	1	2
	Total	4	18	11	34	49	51	63	4	1	0.25	1
cefotaxime		0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	> 2	MIC ₅₀	MIC ₉₀
	PSSP	19	9	10	59	9	3	1			0.12	0.25
	PISP				7	36	46	10	1		0.5	0.5
	PRSP					1	18	3	2	1	0.5	2
	Total	19	9	10	66	46	67	14	3	1	0.25	0.5
cefditoren		0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	> 2	MIC ₅₀	MIC ₉₀
	PSSP	24	14	45	19	6	2				0.06	0.12
	PISP			2	17	57	23	1			0.25	0.5
	PRSP					8	13	3		1	0.5	1
	Total	24	14	47	36	71	38	4		1	0.12	0.5
faropenem		0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	> 2	MIC ₅₀	MIC ₉₀
	PSSP	97	7	4	1	1					0.015	0.03
	PISP	7	9	6	37	40	1				0.12	0.25
	PRSP				2	15	6	2			0.25	0.25
	Total	104	16	10	40	56	7	2			0.03	0.25
imipenem		0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	> 1	MIC ₅₀	MIC ₉₀
	PSSP	100	6	2		2					0.008	0.015
	PISP	6	10	10	16	50	8				0.12	0.12
	PRSP					12	11	2			0.25	0.25
	Total	106	16	12	16	64	19	2			0.015	0.12
meropenem		0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	> 1	MIC ₅₀	MIC ₉₀
	PSSP	28	70	6	3	2	1				0.015	0.03
	PISP		4	3	11	21	56	5			0.25	0.25
	PRSP						7	16	2		0.5	0.5
	Total	28	74	9	14	23	64	21	2		0.03	0.25

The dotted line shows a boundary of NCCLS criteria

 PSSP, penicillin-susceptible *S. pneumoniae*; PISP, penicillin-intermediate *S. pneumoniae*; PRSP, penicillin-resistant *S. pneumoniae*

Table 2 Distribution of MICs for antimicrobials other than β -lactams

	category	MIC $\mu\text{g/ml}$)									MIC ₅₀	MIC ₉₀
		0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	> 4		
clarithromycin	PSSP	9	16	3	3	11	5	11	4	48	2	> 4
	PISP		5		4	15	18	25	4	29	2	> 4
	PRSP		1				4	13	1	6	2	> 4
	Total	9	22	3	7	26	27	49	9	83	2	> 4
		0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	> 4	MIC ₅₀	MIC ₉₀
clindamycin	PSSP	13	31	7		3	1			55	0.5	> 4
	PISP	4	48	12	2	1				33	0.06	> 4
	PRSP		10	9						6	0.12	> 4
	Total	17	89	28	2	4	1			94	0.12	> 4
		0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	> 16	MIC ₅₀	MIC ₉₀
levofloxacin	PSSP			20	79	10			1		1	1
	PISP			13	78	9					1	1
	PRSP			2	21	2					1	1
	Total			35	178	21			1		1	1
		0.25	0.5	1	2	> 2	—	—	—	—	MIC ₅₀	MIC ₉₀
vancomycin	PSSP	87	23								0.25	0.5
	PISP	93	7								0.25	0.25
	PRSP	24	1								0.25	0.25
	Total	204	31								0.25	0.5
		0.5	1	2	4	> 4	—	—	—	—	MIC ₅₀	MIC ₉₀
minocycline	PSSP	17	5	8	8	73					> 4	> 4
	PISP	4		6	24	66					> 4	> 4
	PRSP			1	2	22					> 4	> 4
	Total	21	5	15	34	160					> 4	> 4

The dotted line shows a boundary of NCCLS criteria

PSSP, penicillin-susceptible *S. pneumoniae*; PISP, penicillin-intermediate *S. pneumoniae*; PRSP, penicillin-resistant *S. pneumoniae*

庫医科大学病院(兵庫県), 天理よろづ相談所病院(奈良県), ファルコバイオシステムズ総合研究所(京都府), 滋賀県立成人病センター(滋賀県)および和歌山労災病院(和歌山県)の6府県9施設で, 症例の重複を避けて患者検体より分離した235株の *S. pneumoniae* を用いた. 検査材料別の内訳は, 鼻咽腔粘液59株(25.1%), 喀痰および気管支洗浄液110株(46.8%), 耳漏34株(14.5%), 咽頭粘液17株(7.2%), 眼脂5株(2.1%), 血液および髄液3株(1.3%), その他7株(3.0%)であった.

2. 薬剤感受性試験

日本化学療法学会標準法に準拠した微量液体希釈法¹⁾により, penicillin G(PCG), ampicillin(AB-PC), ceftriaxone(CTRX), cefotaxime(CTX),

cefditoren(CDTR), faropenem(FRPM), imipenem(IPM), meropenem(MEPM), clarithromycin(CAM), clindamycin(CLDM), levofloxacin(LVFX), minocycline(MINO)および vancomycin(VCM)を用いて最小発育阻止濃度を測定した. 測定はドライプレート「栄研」[®](栄研化学), 培養液はストレプト・ヘモサプリメント「栄研」[®](栄研化学)を使用した. *S. pneumoniae* AT-CC49619を精度管理菌株とした.

3. *pbp* 変異の検出

PCGのMIC値が0.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった株を対象として, 3種類のPBP(PBP 1A, PBP 2B, PBP 2X)をコードする遺伝子(*pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x*)および内部コントロールとして自己融解酵素遺伝

Table 3 Frequency of penicillin resistant *S. pneumoniae*—Materials—

Materials	No. of strains	Category(%)			No. of resistant strains*(%)	Result of certification**
		PSSP	PISP	PRSP		
Sputum	107	50(46.7)	50(46.7)	7(6.6)	57(53.3)	NS
Nasopharynx	59	33(55.9)	17(28.8)	9(15.3)	26(44.1)	NS
Otorrhea	34	13(38.2)	15(44.1)	6(17.7)	21(61.8)	NS
Throat	17	4(23.5)	11(64.7)	2(11.8)	13(76.5)	$p < 0.05$
Sebum palpebral	5	2(40.0)	3(60.0)		3(60.0)	NS
BALF	3	1(33.3)	2(66.7)		2(66.7)	ND
Blood	2	2(100)			0(0)	ND
CSF	1	1(100)			0(0)	NS
Other	7	4(57.1)	2(28.6)	1(14.3)	3(42.9)	NS
Total	235	110(46.8)	100(42.6)	25(10.6)	125(53.2)	NS

PSSP, penicillin-susceptible *S. pneumoniae*; PISP, penicillin-intermediate *S. pneumoniae*; PRSP, penicillin-resistant *S. pneumoniae*; BALF, Bronchoalveolar lavage fluid; CSF, Cerebrospinal fluid; *: sum of PISP and PRSP

** : One sample sign test was used. ; NS, Not significant ; ND, Not tested

子 (autolysin : *lytA*) を検出する primer で PCR 法を実施した。被検菌の DNA は、血液寒天平板上で一夜培養した菌を、0.2% Tween 20 加 50mM Tris-HCl (pH8.0) 5mM EDTA-50mM NaCl buffer 中に浮遊させ 100 10 分加熱し、超遠心後上清より抽出した。PCR 法のプロトコールは Ubukata²⁾らの方法に準じ行い、増幅産物は 2% アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色を行い、目的の増幅産物が確認されなかったものを変異ありとした。

III. 結 果

1. 薬剤感受性試験成績

測定した MIC 値を NCCLS の判断基準³⁾に従い、PCG の感受性度で 3 群に区分し Table 1 2 に示した。

まず PCG の感受性成績では、感性 (S) は 110 株 (46.8%)、中間 (I) は 100 株 (42.6%)、および耐性 (R) は 25 株 (10.6%) であり、PISP を含めた PCG 耐性株 (PISP と PRSP : 以下 PC 耐性株と略す) は 125 株 (53.2%) であった。PCG 以外の抗菌薬の抗菌力は NCCLS の評価基準に従った。CTRX は S が 167 株 (71.1%)、I が 63 株 (26.8%)、R を 5 株 (2.1%) 認めた。CTX は S が 217 株 (92.3%)、I が 14 株 (6.0%)、R を 4 株 (1.7%) 認めた。IPM は S が 214 株 (91.1%)、I が 21

株 (8.9%) で R は認めなかった。MEPM は S が 212 株 (90.2%)、I が 21 株 (8.9%)、R を 2 株 (0.9%) 認めた。CAM は S が 41 株 (17.4%)、I が 26 株 (11.1%)、R を 168 株 (71.5%) 認めた。CLDM は S が 136 株 (57.9%)、I が 4 株 (1.7%)、R を 95 株 (40.4%) 認めた。LVFX は S が 234 株 (99.6%)、I が無く、R を 1 株 (0.4%) 認めた。VCM はすべて S であった。判定基準のない CDTR、FRPM および MINO については、以下に PSSP の MIC₉₀ と PC 耐性株の MIC 値の分布域を示す。CDTR の PSSP の MIC₉₀ は 0.12μg/ml で、PC 耐性株は 0.06 から 2.0μg/ml 以上までの範囲に MIC 値が分布した。FRPM の PSSP の MIC₉₀ は 0.03 μg/ml で、PC 耐性株は 0.015μg/ml 以下から 1.0 μg/ml の範囲に MIC 値が分布した。MINO では PSSP の MIC₉₀ は 4.0μg/ml 以上で、PC 耐性株は 0.5μg/ml 以下から 4.0μg/ml 以上の範囲に MIC 値が分布した。

2. PC 耐性株の検体別検出頻度および患者年齢との関連

PC 耐性株の検出頻度を検査材料別に Table 3 に示した。耐性株の検出は咽頭粘液が 17 株中 13 株 (76.5%) と最も多く、耳漏 61.8%、喀痰 53.3% の順であった。血液・髄液から分離された 3 株は、いずれも PSSP であった。年齢別 (Table 4) に

Table 4 Frequency of penicillin resistant *S. pneumoniae*—Age—

Age	No. of strains	Category(%)			No. of resistant strains*(%)	Result of certification **
		PSSP	PISP	PRSP		
0	14	8(57.1)	6(42.9)		6(42.9)	NS
1~2	38	12(31.6)	19(50.0)	7(18.4)	26(68.4)	$p < 0.05$
3~6	25	10(40.0)	9(36.0)	6(24.0)	15(60.0)	NS
7~12	4	3(75.0)	1(25.0)		1(25.0)	NS
13~19	1	1(100)			0(0)	ND
20~	6	1(16.7)	5(83.3)		5(83.3)	NS
30~	12	7(58.3)	5(41.7)		5(41.7)	NS
40~	7	3(42.9)	4(57.1)		4(57.1)	NS
50~	25	11(44.0)	13(52.0)	1(4.0)	14(56.0)	NS
60~	45	25(55.6)	19(42.2)	1(2.2)	20(44.4)	NS
70~	35	15(42.9)	16(45.7)	4(11.4)	20(57.1)	NS
80~	7	4(57.1)	2(28.6)	1(14.3)	3(42.9)	NS
Total	219	100(45.7)	99(45.2)	20(9.1)	119(54.3)	NS

PSSP, penicillin-susceptible *S. pneumoniae* ; PISP, penicillin-intermediate *S. pneumoniae* ; PRSP, penicillin-resistant *S. pneumoniae*

* : sum of PISP and PRSP

** : One sample sign test was used. ; NS, Not significant ; ND, Not tested

Table 5 The ratio of detection of penicillin-resistant *S. pneumoniae* in each prefecture

Prefecture	Total of strains	PSSP		PISP		PRSP	
		No. of strains	%	No. of strains	%	No. of strains	%
Shiga	17	10	58.8	7	41.2	0	0
Kyoto	42	16	38.1	16	38.1	10	23.8
Nara	40	21	52.5	16	40.0	3	7.5
Osaka	73	35	47.9	33	45.2	5	6.9
Hyogo	30	10	33.3	18	60.0	2	6.7
Wakayama	33	18	54.5	10	30.3	5	15.2
Total	235	110	46.8	100	42.6	25	10.6

PSSP, penicillin-susceptible *S. pneumoniae* ; PISP, penicillin-intermediate *S. pneumoniae* ; PRSP, penicillin-resistant *S. pneumoniae*

みると、ペニシリン耐性株は20から29歳で83.3%と最も高率であったが、これに次いで1から2歳が68.4%、3から6歳が60%と乳幼児から高率に検出された。以降20から29歳を除きPRSPの検出率は低下したが、40から49歳および50から59歳で57.1%、56.0%、70から79歳で57.1%と増加をみた。

3. 府県別感受性成績 (Table 5)

PSSPの分離は滋賀県の58.8%が最も高率であり、次いで和歌山県54.5%、奈良県52.5%、大阪府

47.9%、京都府38.1%および兵庫県の33.3%の順であった。他方PRSPは京都府で23.8%、和歌山県15.2%、奈良県7.5%、大阪府6.9%、兵庫県6.7%で、滋賀県は検出されなかった。

4. 遺伝子学的検査成績

PCGのMIC値が0.5μg/ml以下であった141株中、140株を対象として遺伝子変異を検討しTable 6に示した。PSSP 109株のうち、3種類の*pbp*のいずれにも変異が認められなかったのは32株(29.4%)、何れかに変異が認められたものは77

Table 6 Correlation between MIC of penicillin G and *pbp* mutations

Mutation of <i>pbp</i>	MIC of PCG ($\mu\text{g/ml}$)					Total
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	
none	29	3			1	33
<i>pbp2x</i>	10	48	4			62
<i>pbp1a</i>	1	1		1		3
<i>pbp2x, 2b</i>		1	3			4
<i>pbp1a, 2b</i>		4				4
<i>pbp1a, 2x</i>	1	9	2	4	1	17
<i>pbp1a, 2x, 2b</i>		2	2	6	7	17
Total	41	68	11	11	9	140

株(70.6%)であった。PISPでは、31株中30株(96.8%)に変異が認められたが、変異が認められなかったものが1株であった。MIC値別に変異をみると、0.03 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった41株中29株(70.7%)は変異が無く、残り12株(29.3%)に変異が認められ、その内10株は*pbp2x*の単独変異であった。MIC値0.06 $\mu\text{g/ml}$ であった68株は、変異無しが3株(4.4%)で、残り65株中48株(73.8%)は*pbp2x*単独変異で、9株が*pbp1a*と2x変異、4株が*pbp1a*と2b変異、2株が*pbp1a, 2x*および2bの3遺伝子変異で、*pbp1a*単独および*pbp2x*と2b変異を各1株認めた。MIC値0.12 $\mu\text{g/ml}$ の11株は全てに変異が認められ、*pbp2x*単独変異が4株、*pbp2x*と2b変異が3株、*pbp1a*と2x変異および*pbp1a, 2x, 2b*の3遺伝子変異が各2株であった。MIC値0.25 $\mu\text{g/ml}$ の11株も、*pbp1a, 2x, 2b*の3点変異が6株、*pbp1a*と2xが4株、*pbp1a*単独が1株で全株に変異が認められた。MIC値0.5 $\mu\text{g/ml}$ の9株中1株は3種類の*pbp*のいずれにも変異が認められなかった。残り8株中7株は*pbp1a, 2x, 2b*の3点変異で、残り1株が*pbp1a*と2xの2点変異であった。

IV. 考 察

市中肺炎の代表的起炎菌である *S. pneumoniae* は、PCGに高度感性であったため、世界的規模でペニシリン薬が本菌感染症治療の第一選択薬として使用されてきた。しかしPCG耐性株の発見は以外に早く、1977年に南アフリカ共和国⁴⁾においてが分離されて以来各国で耐性株の分離報告^{5)~7)}が

相次ぎ、今やその動向は地球的規模でが問題視^{8,9)}されるに至った。本邦においては小栗ら¹⁰⁾が1980年頃より軽度耐性株を分離したが、全国的な調査は、1993年に紺野ら¹¹⁾により行われたものが最初と思われる。その報告¹¹⁾によれば、1994年時に本邦のPC耐性株は既に平均42.1%にも達していたが、耐性率は中国、四国および九州地区で50%以上、北海道や北陸地区では30%前後と、地域による変動が見られている。1995年に四国4県で行われた調査¹²⁾では、PC耐性株の分離率は県により31.1%から54.0%までの開きがあり、隣接県の間でも耐性率に差がみられることが示された。近畿6府県においてもPRSPの検出率は府県により差がみられた。差が最も顕著であったのは滋賀県と京都府間であり、母数が少なかったものの滋賀県ではPRSPは1株も検出されず、隣接する京都府では23.8%と最も高い分離率であった。府県によるPRSP分離率の差がいかなる原因によるか究明できていないが、京都府の菌株が複数の第一線病院から集められたものであったのに対し、滋賀県のそれは特定機能病院でのみ収集されたものであり、両集団の特徴がPRSP分離率の差となった可能性も考えられる。本研究にあたり収集した合計235株の *S. pneumoniae* を対象とした調査では、PC耐性株は53.2%(PISPは42.6%、PRSPは10.6%)検出され、1999年の当会の調査結果(48.3%)を約5%上回る成績となった。紺野らの調査^{8,11)}では、PC耐性株は1994年に42.1%、1995年に40.3%、1996年には43.5%と全体の約4割を占めたが、調査された3年の間では顕著な耐性率の増加を認めていない。他方嶋田らの調査¹³⁾では、PC耐性株は1998年には27.2%であったが、1999年に40.9%、2000年には45.7%となり、99年以降耐性株の顕著な増加を認めている。嶋田らの報告¹³⁾は、われわれの調査結果と類似しており、今後PC耐性株の年次的漸増が懸念される成績であった。検体別のPC耐性株の検出率は咽頭粘液で最も高く76.5%を示し、最も低率であった鼻咽腔粘液44.1%との間で約30%の差が認められた。また2000年度の調査期間中に収集できた血液および髄液からの3菌株中には、耐性株は認められな

かった。PC 耐性株の検出率と患者年齢との関連をみると、母集団の少なかった 20 から 29 歳までの 83.3% を除けば、1 から 2 歳の乳幼児からの検出率が 68.4% と最も高率であり、続いて 3 から 6 歳の 60.0% と小児から高率に分離された。生方ら⁸⁾も 2 歳以下の乳幼児に PC 耐性株が高率に検出されると報告しており、近畿地区においても同様の傾向が確かめられた。PCG 以外の各種抗菌薬の感受性成績については、CAM で 82.6%、CLDM で 42.1% と比較的高い耐性率であった。マクロライド系抗菌薬の耐性は、efflux pump による薬剤排出や methylase による 23s rRNA の dimethyl 化が知られている。一般的に efflux pump による耐性化は CAM には中等度の耐性を示すが、CLDM には感性となる特徴があり、他方 methylase による耐性は CAM、CLDM 共に高度耐性化する点で特徴的であるとされる^{8,14)}。われわれの成績を解析すると、efflux pump による耐性は 235 株中 95 株 (40.4%) が、methylase による耐性は 235 株中 99 株 (42.1%) と推定された。PCG の感受性別にマクロライド系抗菌薬の耐性機構を見ると、efflux pump による耐性株と思われたものは PCG 耐性群で有意 ($p < 0.05$) に高く、PCG 耐性との間に相関関係が成り立つように思われた。柴崎ら¹⁴⁾は、PRSP の増加とともに efflux pump による耐性株が増加すると指摘しており、われわれの成績も柴崎らの説を支持するものであった。また methylase による耐性株と思われたものは PCG 感性群では有意差を認めなかったが、PCG 耐性群で有意に少なく ($p < 0.05$)、PCG 耐性度との相関は認められなかった。フルオロキノロン系抗菌薬への耐性機構としては、*Escherichia coli* や viridans group streptococci などと同様に、DNA gyrase 遺伝子 (*gyrA*) および topoisomerase 遺伝子 (*parC*) 等の変異¹⁵⁾が知られている。Hoban ら¹⁶⁾は 1997 年から 1999 年にかけて、南北アメリカおよびヨーロッパにおいて収集した 2,632 株の調査で、LVFX 耐性株はわずか 0.3% であったと報告した。他方 Ho ら¹⁷⁾は 1999 年に香港で調査し、5.5% の耐性率であったと報告している。今回のわれわれの調査では、LVFX 耐性は 0.4% に過ぎず、

Hoban らの成績に近く、近畿地方におけるフルオロキノロン系抗菌薬耐性は依然低率であることを確認できた。しかし最近、日本呼吸器学会により編纂された「呼吸器感染症に関するガイドライン」¹⁸⁾には、基礎疾患を有し中等度の症状を呈する高齢者の肺炎球菌肺炎やインフルエンザ菌感染時の治療薬として、フルオロキノロン系抗菌薬が推奨されており、投薬機会の増加に伴う耐性率上昇も懸念される。

S. pneumoniae の β -lactam 系抗菌薬耐性は、細胞壁を構成する 6 種類の PBP のうち、PBP 1A、PBP 2B、PBP 2X の 3 種類をコードする遺伝子変異に伴う β -lactam 薬への親和性低下が原因となる⁸⁾。われわれは近畿地方における *S. pneumoniae* の耐性化傾向を見る目的で、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の PISP および PSSP を対象として、この 3 種類の PBP をコードする遺伝子の変異を検討した。その結果 3 種類の PBP 遺伝子に変異が認められなかったのは、PSSP 109 株中 32 株 (29.4%)、PISP 31 株中 1 株 (3.2%) の計 33 株であり、他の株は 1 から 3 種類の *pbp* 変異が認められた。変異は 140 株中 107 株 (76.4%) に認められたが、最も多かった変異は *pbp2x* で 100 株にみられ、*pbp1a* の 41 株 (38.3%)、*pbp2b* の 25 株 (23.3%) を大きく上回り、全変異株の 93.5% に *pbp2x* 変異が認められた。変異と MIC 値の関連をみると、単独の変異では *pbp2x* 変異が 62 株あり、そのうち 58 株 (93.5%) は PSSP で、残り 4 株 (6.5%) が 0.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MIC 値の PISP であった。CTX を始めとするセフェム系抗菌薬は *pbp2x* への親和性が高いため、*pbp2x* が変異はセフェム系抗菌薬の MIC 値上昇に繋がる。しかしペニシリン系抗菌薬は *pbp2x* に親和性が低いため、この遺伝子変異により MIC 値はそれほど上昇しない。PSSP の領域にある 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の株にみられた変異は、その 3/4 にあたる 75.3% が *pbp2x* の単独変異株であったが、現状において *pbp2x* の単独変異では PCG の MIC 値を最大 0.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで押し上げる役割を果たしていることが明かとなった。*pbp1a* の単独変異は 3 株に認められ、その内の 1 株は 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PISP であったが、他の 2 株は PSSP であり、*pbp1a* の単

独立変異による影響を解析するまでには至らなかった。複数の *pbp* の変異は42株に認められた。そのうち25株は2種の *pbp* 変異であり、うち17株(68.0%)は *pbp1a* と *2x* 変異で、残りは *pbp2x* と *2b* および *pbp1a* と *2b* 変異を各4株ずつであった。2種の *pbp* 変異をきたした株のMIC値は0.03 µg/ml以下であった1株を除き24株が0.06から0.5 µg/mlの範囲に分布した。*pbp1a* と *2b* 変異株は4株すべてが0.06 µg/mlであったが、*pbp2x* と *2b* 変異株は4株中3株が0.12 µg/mlで、PCGのMIC値上昇に荷担していることが明らかとなった。更に *pbp1a* と *2x* 変異は17株で観察され、そのうちの10株は0.06 µg/ml以下であったが、7株は0.12から0.5 µg/mlのPISP域に分布がみられ、*pbp1a* と *2x* 変異もPCGのMIC値上昇に荷担していることが明らかとなった。*pbp1a*、*2x* および *2b* の3点変異株は17株認められた。そのうちの2株は0.06 µg/mlとPSSP域にあったが、他の15株は0.12から0.5 µg/mlのPISP域に分布した。とりわけ6株は0.25 µg/ml、7株が0.5 µg/mlのMIC値を示し、限りなくPRSPに近いMIC値となる変異として認識された。*pbp* の変異を調査した140株のうちPCGに対するMIC値が0.5 µg/mlにもかかわらず変異が全く認められなかった株が1株確認された。異なるプライマー(ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)遺伝子検出試薬:湧永製薬)を用いた検討でも同様の結果であった。これは今回調査した3種類の *pbp* 以外の *pbp* の変異によるものか¹⁴⁾、*pbp* の変異以外の耐性機構か¹⁵⁾は今後の検討課題である。

今回解析されたPSSPのPCGのMIC値は0.06 µg/mlに最大ピークがあり、一管耐性側にシフトすると一挙に耐性株が過半数を占める状況となる。しかもPSSPの約7割は既に遺伝子の変異がみられる「耐性予備軍」であり、今後耐性化が更に進むことは不可避な事態であると思われた。

文 献

- 1) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会: 微量液体希釈法による MIC 測定法(微量液体希釈法)—日本化学療法学会標準法—。Chemotherapy 1990; 38: 102—5.
- 2) Ubukata K, Muraki T, Igarashi A, Asai Y, Konno M: Identification of Penicillin and other Beta-Lactam Resistance in *Streptococcus pneumoniae* by Polymerase Chain Reaction. J Infect Chemother 1997; 3: 190—7.
- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed., Approved standard M7-A4. NCCLS, Wayne, Pennsylvania. 1997.
- 4) Appelbaum PC, Bhamjee A, Scragg JN, Hallett AF, Bowen AJ, Cooper RC: *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. Lancet 1977; 2: 995—7.
- 5) Casal J: Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*: sero-type distribution of penicillin-resistant strains in Spain. Antimicrob Agents Chemother 1982; 22: 222—5.
- 6) Modde HK: *Streptococcus pneumoniae* isolates relatively insensitive to penicillin G recovered from patients in Switzerland. Chemotherapy 1978; 24: 227—30.
- 7) Milatovic D, Machka K, Heck W, Braveny I: Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in West Germany. Infection 1981; 9: 220—2.
- 8) 紺野昌俊, 生方公子(ペニシリン耐性肺炎球菌研究会): 改訂 ペニシリン耐性肺炎球菌, 協和企画通信, 東京, 1999.
- 9) 桑原正雄: 世界の耐性肺炎球菌感染症の現状。化学療法の領域 1994; 10: 87—95.
- 10) 小栗豊子, 三澤成毅, 中村文子, 猪狩 淳: 耐性菌出現の背景と現状。化学療法の領域 1998; 14: 1327—38.
- 11) ペニシリン耐性肺炎球菌研究会: 全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究。感染症誌 1994; 68: 1338—51.
- 12) 根ヶ山清, 高嶋千恵: 四国地区におけるペニシリン耐性肺炎球菌の検出状況。日臨微誌 1996; 6(2): 12—7.
- 13) 嶋田基五郎, 竹村 弘: Faropenemを含む各種抗菌薬に対する臨床分離株の感受性。日化療会誌 2001; 49: 317—26.
- 14) 柴崎有美, 生方公子: ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)—マクロライド耐性も含めて—。日本臨床 2001; 59: 681—6.
- 15) Gonzalez I, Georgiou M, Alcaide F, Balas D, Linares J, de la Campa AG: Fluoroquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* genes of clinical isolates of viridans group streptococci. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2792—8.

- 16) Hoban DJ, Bouchillon SK, Karlowsky JA, Johnson JL, Butler DL, Miller LA, *et al.* : A comparative in vitro surveillance study of gemifloxacin activities against 2,632 recent *Streptococcus pneumoniae* isolates from across Europe, North America, and South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 ; 44 : 3008—11.
- 17) Ho PL, Que TL, Tsang DN, Ng TK, Chow KH, Seto WH : Emergence of fluoroquinolone resistance among multiply resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 ; 43 : 1310—3.
- 18) 日本呼吸器学会市中肺炎診療ガイドライン作成委員会 : 成人市中肺炎診療の基本的考え方, 日本呼吸器学会, 東京, 2000.
- 19) 大野 章 : 肺炎球菌の β -ラクタム耐性機序. *化学療法の領域* 1998 ; 14 : 1339—45.

Resistance to Antimicrobials and Mutation of PBPs in *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Kinki Region of Japan

Kaori SATOH¹⁾, Masaru KOMATSU²⁾, Koichi SHIMAKAWA²⁾, Toshiro URA³⁾,
Shohiro KINOSHITA⁴⁾, Katsutoshi YAMASAKI⁵⁾, Hisaaki NISHIO⁶⁾,
Ryodo WASHIZU⁷⁾, Tomonari YAMASHITA⁷⁾, Tatsuya NAKAMURA⁸⁾,
Yasunao WADA⁹⁾, Masahiro TOYOKAWA¹⁰⁾, Tomomi KOUFUKU¹¹⁾
& Masanori AIHARA²⁾

(Study of Bacterial Resistance in Kinki)

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Kinki University Hospital

²⁾Department of Clinical Pathology, Tenri Hospital

³⁾Department of Clinical and Laboratory Medicine, National Cardiovascular Center

⁴⁾Department of Clinical Laboratory Kobe University Hospital

⁵⁾Department of Clinical Laboratory, Wakayama Rosai Hospital

⁶⁾Department of Clinical Laboratory, Shiga Medical Center for Adults

⁷⁾Synthesis Research Institute, Falco Bio Systems

⁸⁾Department of Clinical Laboratory, Kansai Medical University Hospital

⁹⁾Department of Clinical Laboratory, Hyogo College of Medicine Hospital

¹⁰⁾Department of Clinical Laboratory, Osaka University Hospital

¹¹⁾Department of Clinical Laboratory, Hyogo Prefectural Amagasaki Hospital

We studied the susceptibility to penicillin G (PCG) and other antimicrobials in 235 clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Samples were collected between April 1 and June 30, 2000 from nine medical institutions of the Kinki Region of Japan. We classified the minimum inhibitory concentration (MIC) of PCG according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) criteria. The overall rate of all types of *S. pneumoniae* resistance was 53.2% (penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (PSSP) : 46.8%, penicillin-intermediate *S. pneumoniae* (PISP) : 42.6%, penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) : 10.6%) In other antimicrobials, the resistance (R)/intermediate susceptibility (I) rates (R/I %) were as follows : ceftriaxone, 28.9% ; cefotaxime, 7.7% ; imipenem, 8.9% ; meropenem, 9.8% ; clarithromycin, 82.6% ; clindamycin, 42.1% ; levofloxacin, 0.4% ; vancomycin, 0%. We used the polymerase chain reaction to study the mutations of the penicillin-binding proteins *pbp1a*, *pbp2b*, and *pbp2x* in 140 strains of *S. pneumoniae* in the MIC for PCG was $< 0.5 \mu\text{g/ml}$. Among the 109 strains of PSSP, 32 (29.4%) had no mutation and 77 (70.6%) showed mutation of more than one of the *pbp* mutations. Among the 31 strains of PISP, only 1 strain (3.2%) was not mutated. Since 70.6% of the strains classified as PSSP had *pbp* mutations, *S. pneumoniae* clearly can acquire resistance to anti-microbials. In the future, a comprehensive surveillance of *S. pneumoniae* is necessary.