

小児の上咽頭から分離された *Streptococcus pneumoniae* 及び *Haemophilus influenzae* の薬剤耐性化の現況

¹⁾公立相馬総合病院小児科, ²⁾福島県立医科大学小児科, ³⁾福島県衛生研究所

松本 歩美¹⁾ 細矢 光亮²⁾ 片寄 雅彦¹⁾ 村井 弘通²⁾

川崎 幸彦²⁾ 佐藤 敬¹⁾ 加藤 一夫³⁾ 鈴木 仁²⁾

(平成 15 年 12 月 22 日受付)

(平成 16 年 4 月 12 日受理)

Key words : drug susceptibility, risk factor, antimicrobial agent,
child, day nursery

要 旨

小児の上咽頭から分離された細菌について薬剤感受性を調査し, 耐性菌保有の危険因子を明らかにすることを目的とした. 2001 年 9 月から 2003 年 5 月までに当科で分離された *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) 949 株と *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) 791 株の MIC 値を測定し, *S. pneumoniae* 226 株と *H. influenzae* 115 株について耐性遺伝子を検索した. また, 両菌種のいずれかが分離された 1,359 症例について, 後方視的に背景調査を行った. MIC 値をもとに耐性菌の検出状況を見ると, *S. pneumoniae* 949 株中, 764 株 (81%), *H. influenzae* 741 株中, 246 株 (33%) が耐性菌であった. 遺伝子解析の結果, MIC 値で耐性菌とされた株はすべて耐性遺伝子を有していた. 他方, MIC 値で感受性菌とされた *S. pneumoniae* と *H. influenzae* のうち, それぞれ 55%, 21% にも耐性遺伝子が検出された. 背景調査による耐性菌の割合は, 低年齢, 集団保育, および過去 3 カ月以内の抗生物質使用群において有意に高かった. 耐性菌の蔓延を防ぐため, 日常診療における抗生物質の使用法と低年齢児の保育のあり方を検討する必要があると考えられた.

[感染症誌 78 : 482 ~ 489, 2004]

序 文

本邦においては 1980 年代より *Streptococcus pneumoniae* (以下 *S. pneumoniae*) と *Haemophilus influenzae* (以下 *H. influenzae*) の薬剤耐性株が出現した. 両菌種の薬剤耐性化が進む中で, 1980 年代後半からはペニシリン耐性肺炎球菌 (*penicillin-resistant S. pneumoniae*, PRSP), 1990 年代前半から β -lactamase 陰性アンピシリン耐性インフルエンザ菌 (β -lactamase negative ampicillin-resistance

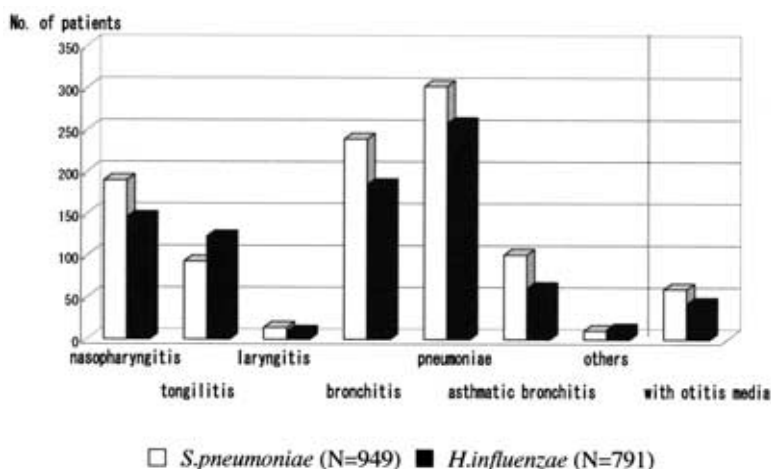
H. influenzae, BLNAR) による髄膜炎が報告され, 問題視されるようになった¹⁾. また, 近年の中耳炎の難治化の要因としても, 両菌種の薬剤耐性化が指摘されている²⁾. 現在, 本邦の各地域において両菌種の耐性株の増加が認められているが, 耐性化率には地域格差がある. 従って, ある一定地域における耐性化の現状を把握し, その危険因子を明らかにすることは, 耐性菌による髄膜炎や中耳炎に対する迅速な対応とともに耐性化の予防という観点から意義深い.

福島県の北東部に位置する相馬地区は, 居住者の転出入が比較的少なく, 当科は其中で唯一の

別刷請求先 : (〒976-0011) 福島県相馬市新沼字坪ヶ迫

142

公立相馬総合病院小児科 松本 歩美

Fig. 1 Clinical diagnosis of patients with *S. pneumoniae* and/or *H. influenzae* in their upper-pharynxTable 1 Classification of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* by MICs

<i>S. pneumoniae</i>				
MIC of penicillin G (µg/ml)	< 0.06	0.06–2.0	2.0	
classification	PSSP	PISP	PRSP	
<i>H. influenzae</i>				
MIC of ampicillin (µg/ml)	< 2.0	2.0–4.0	4.0, β lac (-) *	4.0, β lac (+) **
classification	BLNAS	low-BLNAR	BLNAR	BLPAR

PSSP, penicillin-susceptible *S. pneumoniae*; PISP, penicillin intermediately-resistant *S. pneumoniae*; PRSP penicillin resistant *S. pneumoniae*; BLNAS, β-lactamase non-producing ampicillin-susceptible *H. influenzae*; BLNAR, β-lactamase non-producing ampicillin-resistant *H. influenzae*; BLPAR, β-lactamase-producing ampicillin-susceptible *H. influenzae*

* βlac (-); β-lactamase negative ** βlac (+); β-lactamase positive

入院完備の小児医療施設である。そのため、感染症の発生動向調査や感染症罹患児の背景調査を行うのに適した施設であると言える。こうした背景のもと、今回私たちは、当地区における両菌種の薬剤耐性化の現状を把握し、小児における耐性菌保菌の危険因子を明らかにすることを目的とした後方視的調査を行った。

対象と方法

対象は、2001年9月から2003年6月にかけて、気道感染症で当科を受診した小児の後鼻腔より分離され、同じ罹病期間に採取された株を除外した

S. pneumoniae 949株と*H. influenzae* 791株とした。同じ罹病期間とは、一連の通院期間中をさし、最後の通院日から次の罹患まで1カ月以上の間隔があった場合は、別の罹病期間として扱った。気道感染症の内訳をFig. 1に示した。対象とした株に対し、最小有効濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) を測定し、薬剤耐性遺伝子の検索を行った。また、両菌種のいずれかが分離された1,359症例について背景調査を行った。

MIC値の測定は、米国臨床検査標準委員会 (National Committee for Clinical Laboratory Stan-

Table 2 Classification of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* by gene analysis

<i>S. pneumoniae</i>					
pbp mutation (-)	pbp mutation (+)				
	1a	2a	1a + 2x	2x + 2b	1a + 2x + 2b
PSSP	PISP				PRSP
<i>H. influenzae</i>					
pbp mutation (-)		pbp mutation (+)			
TEM (-) *	TEM (+) **	TEM (-) *		TEM (+) **	
		Pbp3-1	Pbp3-2	Pbp3-1	Pbp3-2
BLNAS	BLPAR	Low-BLNAR	BLNAR	BLPACR-1	BLPACR-2

PSSP, penicillin-susceptible *S. pneumoniae*; PISP, penicillin intermediately-resistant *S. pneumoniae*; PRSP, penicillin resistant *S. pneumoniae*; BLNAS, β -lactamase non-producing ampicillin-susceptible *H. influenzae*; BLNAR, β -lactamase non-producing ampicillin-resistant *H. influenzae*; BLPAR, β -lactamase-producing ampicillin-susceptible *H. influenzae*; BLPACR, β -lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant *H. influenzae*

* TEM (-); TEM-1 β -lactamase gene negative

** TEM (+); TEM-1 β -lactamase gene positive

dards, NCCLS) の判定基準に準拠した MICRO-FAST Panel Type 3X (DADE BEHRING) を用い、ドライタイプの微量液体希釈法にて行った。結果に基づき、両菌種を Table 1 のように分類した。すなわち *S. pneumoniae* は、PISP に対する MIC 値が $0.06\mu\text{g/ml}$ 未満を PSSP (penicillin-susceptible *S. pneumoniae*), $0.06\mu\text{g/ml}$ 以上 $2.0\mu\text{g/ml}$ 未満を PISP (penicillin-intermediately resistant *S. pneumoniae*), $2.0\mu\text{g/ml}$ 以上を PRSP (penicillin-resistant *S. pneumoniae*) とした。また、*H. influenzae* は、ABPC の MIC 値が $2.0\mu\text{g/ml}$ 未満を BLNAS (β -lactamase-negative ampicillin-susceptible *H. influenzae*), $2.0\mu\text{g/ml}$ 以上 $4.0\mu\text{g/ml}$ 未満を low-BLNAR (low- β -lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae*), $4.0\mu\text{g/ml}$ 以上で β -lactamase 陰性の株を BLNAR (β -lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae*), β -lactamase 陽性の株を BLPAR (β -lactamase-positive ampicillin-resistant *H. influenzae*) とした。

耐性遺伝子の検出は、福島県衛生研究所において、PCR 法により行った。*S. pneumoniae* については、ペニシリン耐性肺炎球菌遺伝子検出試薬 (湧永製薬) を用いて、ペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding proteins, PBPs) をコードする遺伝子 *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* の変異の有無を検索した。

H. influenzae については、インフルエンザ菌遺伝子検出試薬 (湧永製薬) を用い、 β -lactamase 産生に関わる TEM (TEM-1 β -lactamase gene), PBP3 (penicillin-binding protein 3) をコードする *ftsI* 遺伝子上の耐性化に関わる変異が 1 カ所に生じた *pbp3-1*, 2 カ所に生じた *pbp3-2* につき検索した。生方らの基準に従い、保有する耐性遺伝子により両菌種を分類した^{3)*} (Table 2)。

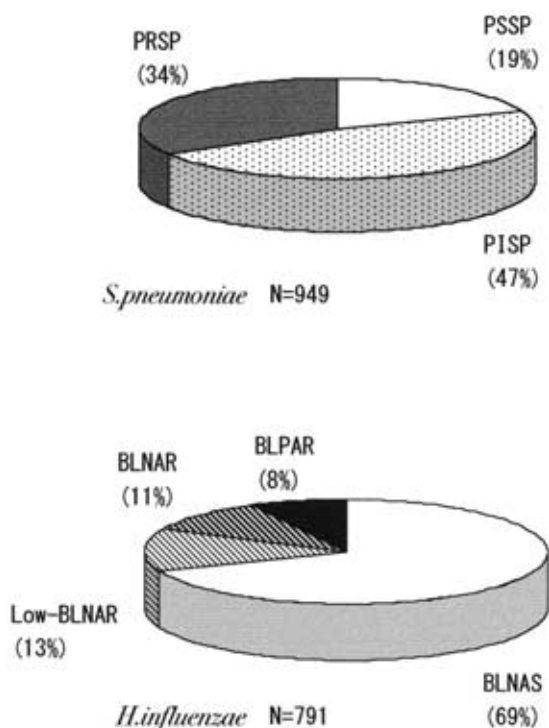
S. pneumoniae あるいは *H. influenzae* が分離された 1,359 症例について、年齢、基礎疾患、集団保育の有無、過去 3 カ月以内の抗生物質使用状況などを聞き取りにより、あるいはカルテを回顧的に調査し、耐性菌の危険因子を検討した。

結 果

1. MIC 値による耐性菌の検出状況 (Fig. 2)

S. pneumoniae のみが検出されたのは 568 例、*H. influenzae* のみが検出されたのは 410 例、*S. pneumoniae* と *H. influenzae* の両者が検出されたのは 381 例であった。*S. pneumoniae* 949 株のうち、PSSP は 185 株 (19%), PISP は 443 株 (47%), PRSP は 321 株 (34%) であった。また、*H. influenzae* 791 株のうち BLNAS は 545 株 (69%), low-BLNAR は 104 株 (13%), BLNAR は 81 株 (11%), BLPAR は 61 株 (8%) であった。

2. 耐性遺伝子の検索 (Fig. 3)

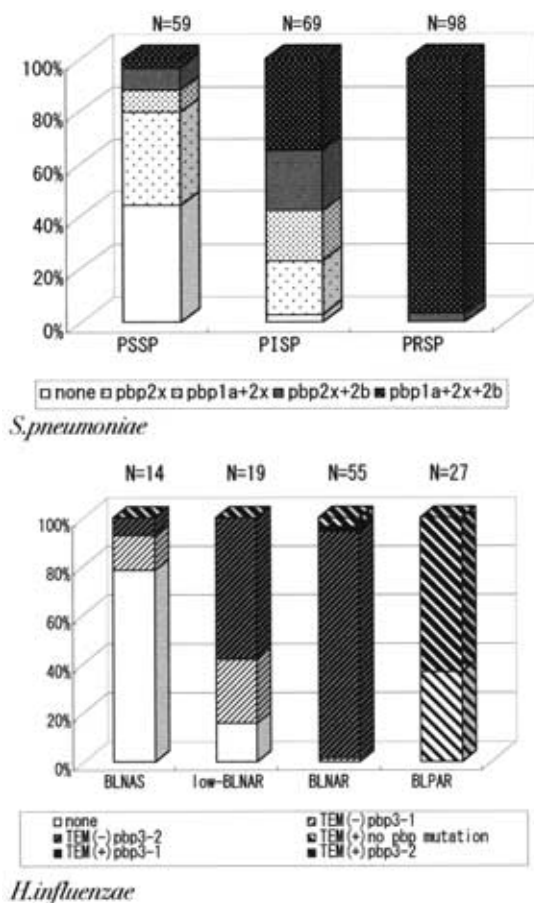
Fig. 2 Susceptibility of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* by MICs.

S. pneumoniae 226 株のうち, pbp 遺伝子変異がない株は 26 株, pbp2x 単独変異は 35 株, pbp1a + 2x 変異は 18 株, pbp2x + 2b 変異は 24 株, pbp1a + 2x + 2b 変異は 121 株であった. pbp2b 単独変異は検出されなかった. 耐性遺伝子の保有状況から分類すると, PSSP は 26 株 (12%), PISP は 77 株 (34%), PRSP は 121 株 (54%) である. *H. influenzae* 115 株では, 遺伝子変異のない株 (BLNAS) が 14 株 (12%), pbp3-1 単独変異 (low-BLNAR) が 8 株 (7%), pbp3-2 単独変異 (BLNAR) が 51 株 (44%), TEM 単独変異 (BLPAR) が 10 株 (9%), TEM + pbp3-1 変異 (β-lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant *H. influenzae*-1, BLPACR-1) が 1 株 (1%), TEM + pbp3-2 変異 (β-lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant *H. influenzae*-2, BLPACR-2) が 19 株 (17%) であった.

MIC 値で PRSP, BLNAR, BLPAR とされた

平成16年 6月20日

Fig. 3 Correlation between classification by MICs and resistant gene analysis.

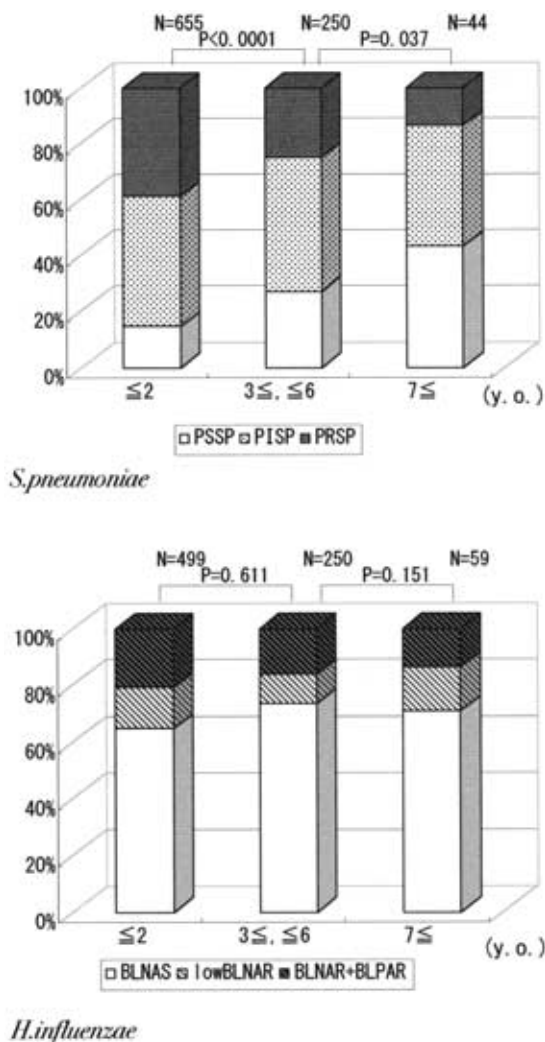
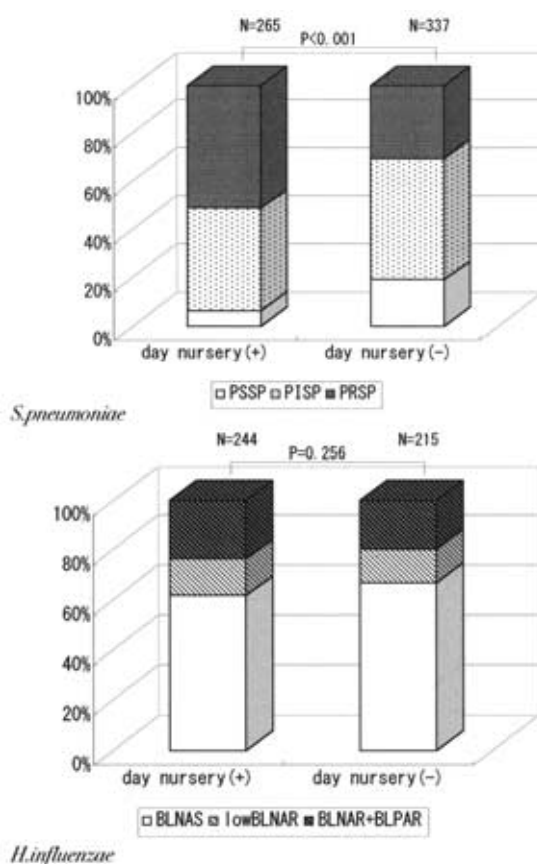


株は全て耐性遺伝子を有していた. 他方, MIC 値では耐性が認められなかった PSSP 株のうち 33 株 (55%), BLNAS 株のうち 3 株 (21%) に耐性遺伝子が検出された. MIC 値による耐性菌の分類と遺伝子変異による分類との比較では, PRSP および BLNAR, BLPAR に関しては, 両者ともほぼ一致していた. しかし, MIC 値から見た PISP の 33% に pbp1a + 2x + 2b 変異 (遺伝子的には PRSP), low-BLNAR の 58% に pbp3-2 変異 (遺伝子的には BLNAR) を認めるなど, MIC 値と遺伝子変異に乖離がみられた.

3. 背景調査

1) 患児の年齢 (Fig. 4)

年齢は 0 歳 0 カ月から 17 歳 (平均 2.7 歳), 男女

Fig. 4 Rate of resistant strains of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* by age.Fig. 5 Rate of resistant strains of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* by day nursery.

比は 709 : 650 であった。両菌種ともに 2 歳以下の群で耐性菌の割合が高かった。特に *S. pneumoniae* では有意差をもって、年齢層が低いほど耐性菌の割合が高いことが分かった。

2) 集団保育の有無 (Fig. 5)

2 歳以下の症例について集団保育の有無を比較すると、特に *S. pneumoniae* では集団保育ありの群で耐性菌の割合が高かった。

3) 過去 3 カ月以内の抗生物質投与 (Fig. 6)

抗生物質を使用していた群で耐性菌の割合が高

く、特に *S. pneumoniae* では、 β -ラクタム剤使用群で有意にその割合が高かった。

4) 基礎疾患の有無 (Fig. 7)

アレルギー疾患、低出生体重児、先天性心疾患などの基礎疾患の有無で耐性菌の保有率を比較した結果、有意差はなかった。

考 察

小児の気道感染症の培養検査に際し、生方らは口腔内の常在菌の混入が少ないという理由で、鼻腔を介した上咽頭からの検体採取を推奨している⁵⁾。当科でも、2000 年 6 月からこの方法を用いることにより、Fig. 8 に示したごとく、両菌種の分離数は急激に増加した。これは、気道感染症の起因菌検出率が高くなったこともあるが、それよりむしろ上咽頭に常在している菌の検出率が増加し

Fig. 6 Rate of resistant strains of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* by use of antimicrobial agents in last 3 months.

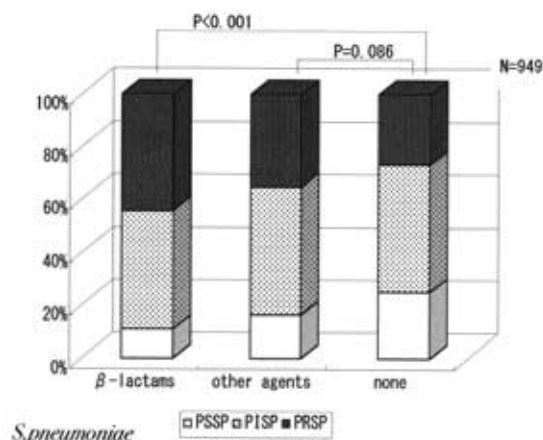


Fig. 7 Rate of resistant strains of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* by underlying disease ; allergic disease, heart disease, low birth weight, nephropathy, endocrinopathy, malformation.

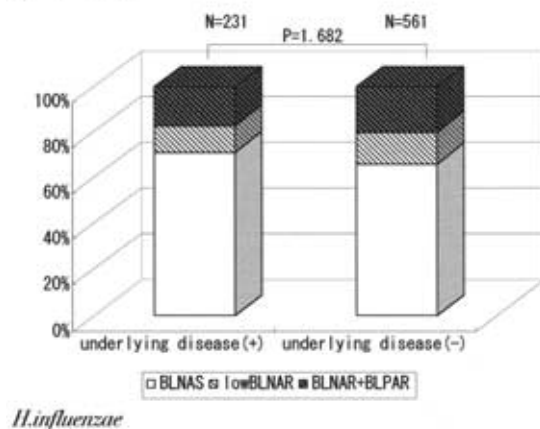
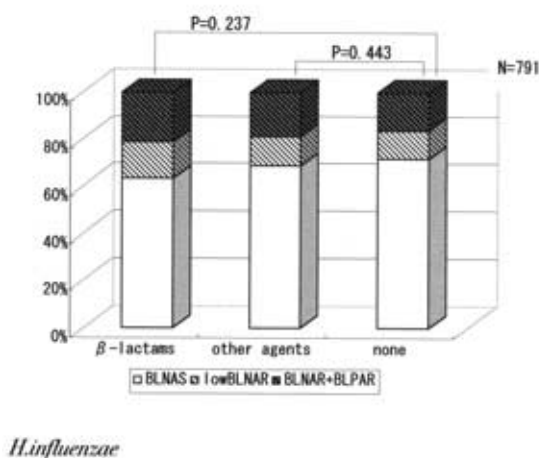
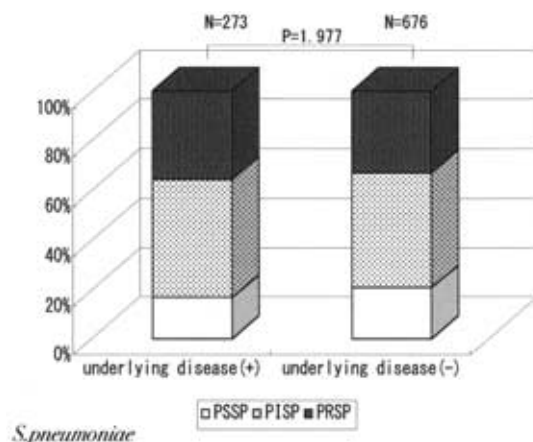
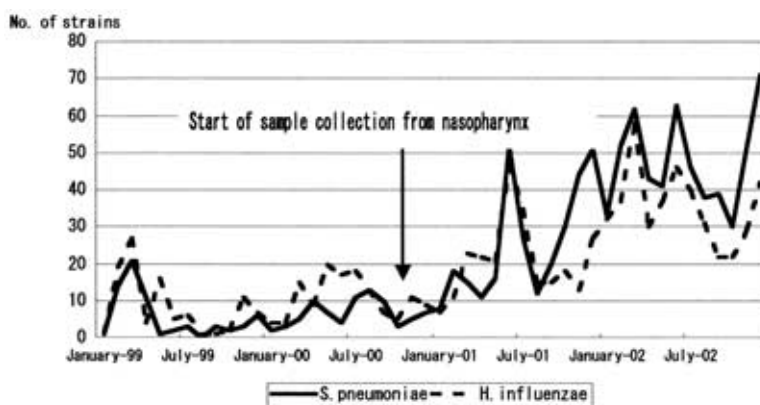


Fig. 8 Monthly isolation of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* at our department.



たためと考えられる。

2002 年までの本邦における報告では, *S. pneumoniae* の 50~70% が MIC 値からみた耐性菌であり, その 10~20% が PRSP である^{6)~8)}。相馬地区における *S. pneumoniae* の耐性菌の割合をみると, PISP が 47%, PRSP が 34% であり, これまでの報告よりも耐性化率が高かった。

H. influenzae に関する報告では, MIC 値からみた耐性化率は 10~20% である^{7,9)}。相馬地区における *H. influenzae* の耐性化率は 31% であったが, これは従来の報告に比してかなり高かった。また本邦では, β -lactamase 非産生でありながら, PBP3 に変異を有してアンピシリン耐性を示す β -lactamase 陰性アンピシリン耐性株 (BLNAR) が増加傾向にあるが, 本調査でも BLNAR が 1/3 を占めており, 本邦の特徴を示しているといえた。

坂田は 2003 年の報告で, BLNAR の頻度が 1 年半で約 9 倍に増加したことを報告している¹⁰⁾。ほぼ同時期に行った本調査においても, これまでの報告より両菌種の耐性化率が高く, 耐性菌の増加が進んでいることが示唆された。

遺伝子検索では, MIC 値で感受性菌, すなわち PSSP あるいは BLNAS とされた菌のうち, それぞれ 55%, 21% に耐性遺伝子が認められた。佐藤らも, MIC 値からみた PSSP の約 7 割が *pbp* 変異を有していたことを報告し, 耐性化がさらに進む可能性を指摘している⁶⁾。その機序として, まず遺伝子レベルで耐性が獲得され, その蓄積により薬剤感受性の低下が顕在化することが考えられた。

背景調査では, 年齢, 集団保育, 抗生物質使用で, 耐性化率に差が認められた。年齢については, *S. pneumoniae* では低年齢であるほど耐性菌の保菌率が高いことが明らかになった。*H. influenzae* については, 2 歳以下とそれ以上の年齢層との間で, 耐性化率に有意差はなかった。しかし, *H. influenzae* 791 株のうち 499 株 (63%) は, 2 歳以下の小児より分離されていた。このことから, 2 歳以下の症例では, 他の年齢層よりも *H. influenzae* の保菌者が多いため, 耐性 *H. influenzae* の保菌者も多いと考えた。

2 歳以下の症例において, 集団保育の有無について検討すると, 両菌種ともに集団保育ありの群で耐性菌保有の割合が高かった。特に *S. pneumoniae* については, 2 歳以下の保育園児が保有する株の 9 割以上が耐性菌であった。伊藤らは, 中耳炎を中心とした保育園と耐性菌感染についての報告の中で, 保育園児間で耐性菌感染が繰り返されていることを述べている¹¹⁾。本調査でも, 保育園において耐性菌が伝播されている現状が十分に考えられる結果であったといえる。

過去 3 カ月以内の抗生物質使用についての検討では, β -ラクタム剤の使用群で耐性菌の割合が高かった。また, アレルギー疾患や低出生体重を含む基礎疾患を有する児は通院歴が長く, また通院回数も多いと考えられるが, 基礎疾患の有無と耐性菌の保有との間に関連はみられなかった。すなわち, 耐性菌の保有には, 通院回数ではなく, 最近の抗生物質の使用が関与していると考えられた。

感冒等で医療機関を受診した低年齢の児に対し, 抗生物質が投与される機会が多い。今回の調査結果は, このような抗生物質の投与が児の上咽頭に常在する菌の薬剤耐性化をきたし, 保菌された耐性菌が保育園で他の児へ伝播するという図式を示していた。先の伊藤らはその報告の中で, 耐性菌を蔓延させないために, 中耳炎罹患児の隔離, 休園, 服薬指導等の対策を提案している。私たち小児科医は, 比較的軽症な感冒罹患児の診療にあたる機会が多い。耐性菌感染症の治療および耐性菌保菌児に対する指導とともに, 新たな耐性菌を作り出さないためにも, ウイルス感染症と考えられる感冒に対しては, 安易に抗生物質を投与することがないように, 心掛ける必要があると考えられる。

文 献

- 1) 生方公子: 市中感染における PRSP と BLNAR の意義。小児感染免疫 2003; 15: 53—8.
- 2) 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.
- 3) 千葉菜穂子, 長谷川恵子, 小林玲子, 鈴木悦子, 岩田 敏, 砂川慶介, 他: 化膿性髄膜炎から分離

- された *Streptococcus pneumoniae* の疫学解析—1993 年から 2002 年の分離株について—, 日治療会誌 2003 ; 51 : 551—9.
- 4) 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—, 日治療会誌 2002 ; 50 : 794—804.
- 5) 紺野昌俊, 生方公子: 改訂ペニシリン耐性肺炎球菌, 共和企画通信, 東京, 1999.
- 6) 佐藤かおり, 島川宏一, 小松方浦俊郎, 木下承皓, 山崎勝利, 西尾久明, 他: 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, 感染症誌 2002 ; 76 : 254—62.
- 7) 坂田 宏: 小児呼吸器感染症の上咽頭から分離された *Streptococcus pneumoniae* 及び *Haemophilus influenzae* の検討, 小児感染免疫 2002 ; 14 : 17—23.
- 8) 宇野芳史: 1990～2000 年に小児急性中耳炎から検出された *Streptococcus pneumoniae* の抗菌感受性の変化, 日治療会誌 2002 ; 50 : 854—69.
- 9) 豊永義清: インフルエンザ菌感染症: 診断と治療, 小児科臨床 2002 ; 55 : 247—56.
- 10) 坂田 宏: 小児の呼吸器感染症患者から分離された *Haemophilus influenzae* の注射用抗菌薬に対する薬剤感受性, 日治療会誌 2003 ; 51 : 569—73.
- 11) 伊藤真人, 古川 伋: 保育園と耐性菌感染, 小児感染免疫 2003 ; 15 (1) : 117—23.

Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*
Isolated from Nasopharynx in Children

Ayumi MATSUMOTO¹⁾, Mitsuoki HOSOYA²⁾, Masahiko KATAYOSE¹⁾, Hiromichi MURAI²⁾,
Yukihiko KAWASAKI²⁾, Kei SATO¹⁾, Kazuo KATO³⁾ & Hitoshi SUZUKI²⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Soma General Hospital

²⁾Department of Pediatrics, Fukushima Medical University School of Medicine

³⁾Institute of Public Health

The aims of this study are to investigate the antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from children and clarify the risk factors for the carriage of the resistant strains. We examined the minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobial agents against 949 strains of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) and 791 strains of *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) isolated at our department between September, 2001 and May, 2003. Of those, 226 *S. pneumoniae* strains and 115 *H. influenzae* strains were analysed for the resistance genes. Also we retrospectively reviewed the profiles of 1,359 patients with either *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, or both in nasopharynx. From the view point of MICs, PSSP strains were 185 (19%), PISP strains were 443 (47%), and PRSP strains were 321 (34%) in 949 *S. pneumoniae* strains, and BLNAS strains were 545 (69%), low-BLNAS strains were 104 (13%), BLNAR strains were 81 (11%) and BLPAR strains were 61 (8%) in 791 *H. influenzae* strains. The results of gene analysis showed that all resistant strains by MICs such as PISP, PRSP, BLNAR, and BLPAR had resistant genes and that 55% of and 21% of susceptible strains of *S. pneumoniae* (PSSP) and *H. influenzae* (BLNAS) respectively, had resistant genes. From the investigation for profiles of 1,359 patients, age less than 3 years old, day nursery, and use of antimicrobial agents in last 3 month, seemed to be the risk factors for carriage of resistant strains. To prevent the resistant bacteria from disseminating we should re-consider how to use the antimicrobial agents and nurse the young children.