

分子遺伝学的にみた小児における耐性インフルエンザ菌保有の危険因子に関する検討

¹⁾福島県立医科大学小児科, ²⁾公立相馬総合病院小児科

³⁾福島県衛生研究所, ⁴⁾公立相馬総合病院検査部

松本 歩美²⁾ 細矢 光亮²⁾ 片寄 雅彦¹⁾

渡辺 清彦⁴⁾ 加藤 一夫³⁾ 鈴木 仁²⁾

(平成 16 年 9 月 22 日受付)

(平成 17 年 1 月 19 日受理)

Key words : *Haemophilus influenzae*, gene alteration, drug resistance, β -lactam, child

要 旨

小児の上咽頭から分離された *Haemophilus influenzae* (以下 *H. influenzae*) について, 耐性遺伝子の有無を調査し, 薬剤耐性遺伝子獲得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 2004 年 1 月までに当科で分離した *H. influenzae* 172 株を対象として, 最小有効濃度 (minimum inhibitory concentration, 以下 MIC) を測定し, β -lactam 産生遺伝子と *pbp* 変異遺伝子の検索を行った。また対象株の保菌者全症例について, 年齢, 過去 3 カ月以内の抗生物質使用歴, 集団保育, 同胞, 基礎疾患の有無などの患者背景を後方視的に調査した。その結果, 過去 3 カ月以内の経口 β -lactam 薬使用が, *pbp* 変異遺伝子を獲得する危険因子であることが明らかになった。 β -lactamase 非産生 ABPC 耐性 *H. influenzae* などの耐性菌の蔓延を防ぐには, 小児科日常診療において, 経口セフェム系薬を繁用している現在の方法を再検討する必要があると考えられた。

[感染症誌 79 : 249~253, 2005]

序 文

H. influenzae は, *Streptococcus pneumoniae* (以下 *S. pneumoniae*) とともに小児における重症細菌感染症の主たる起炎菌である。従来, 同菌種の ampicillin (以下 ABPC) 耐性は β -lactamase の獲得に起因していた。しかし近年, β -lactamase を産生せずに β -lactam 薬に耐性を示す株の増加が報告され, 問題視されている^{1)~5)}。私たちも福島県相馬地区における同菌種の薬剤耐性化の現況を調査し, 同様の株が増加傾向にあることをすでに報告した⁶⁾。またこの中で, 小児における耐性菌保有の危

険因子は過去 3 カ月以内の抗生物質使用, 低年齢, 集団保育であることを明らかにした。

β -lactamase 産生 ABPC 耐性 *H. influenzae* は, プラスミド由来の β -lactamase 産生遺伝子の発現により薬剤耐性を獲得する。一方, β -lactamase 非産生 ABPC 耐性 *H. influenzae* の薬剤耐性獲得機構は, penicillin-binding-protein (*pbp*) をコードする *pbp3* 遺伝子の変異による¹⁾。これらのような耐性遺伝子獲得の危険因子を求めることは, 耐性菌増加への対策を考える上で重要である。そこで, *H. influenzae* 172 株について, β -lactamase 産生遺伝子と *pbp* 変異遺伝子の有無を調査し, 保菌者について背景調査を行うことにより, 耐性遺伝

別刷請求先 : (〒960-1295) 福島市光ヶ丘 1

福島県立医科大学小児科 松本 歩美

平成17年 4 月20日

Table 1 Classification of *H.influenzae* by gene analysis

<i>pbp</i> mutation (−)		<i>pbp</i> mutation (+)		
TEM (−)*	TEM (+)**	TEM (−)*	TEM (+)**	
		<i>pbp3</i> -1	<i>pbp3</i> -2	<i>pbp3</i> -1or3-2
BLNAS	BLPAR	Low-BLNAR	BLNAR	BLPACR

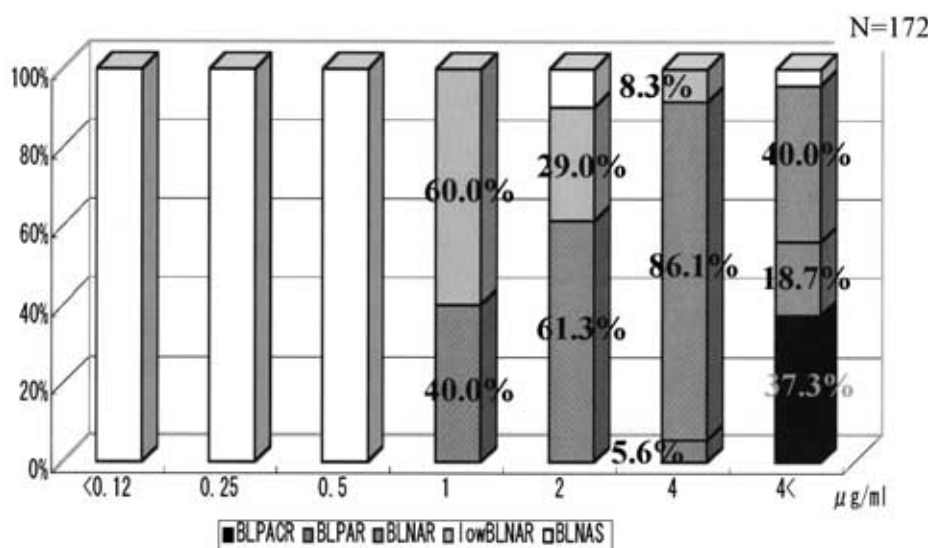
BLNAS; β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible *H.influenzae*; BLNAR; β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H.influenzae*; BLPAR; β -lactamase-producing ampicillin-resistant *H.influenzae*; BLPACR; β -lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant *H.influenzae*

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

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

Fig. 1 The relation between susceptibility (MIC) to Ampicillin and the accumulation of altered *pbp* genes in *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*)

BLNAS; β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible *H. influenzae*, BLNAR; β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae*, BLPAR; β -lactamase-producing ampicillin-resistant *H. influenzae*, BLPACR; β -lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant *H. influenzae*



子変異の危険因子を求めたので報告する。

対象と方法

対象は、2001年9月から2004年1月にかけて、小児の上咽頭より分離された *H. influenzae* のうち、MIC値の測定と薬剤耐性遺伝子検索の両者を試行した172株とした。対象とした株を保菌していた全症例について、背景調査を行った。

MIC値の測定は、NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standard)の判定基準に準

拠した MICroFAST Panel Type 3 J (DADE BEHRING)を用い、ドライタイプの微量液体希釈法にて行った。同基準に従い、ABPCに対するMICが2µg/mlの株をABPC中等度耐性、4µg/ml以上の株をABPC耐性とみなすことにした。

耐性遺伝子の検出は、福島県衛生研究所にて行った。 β -lactamase産生に関わるTEM(TEM-1 β -lactamase gene)および*pbp3*をコードする*ftsI*遺伝子上の変異を1カ所に生じた*pbp3*-1、2カ

Table 2 Characteristics of Patients

Characteristics	Results (n = 172) N [%]
Male	94 [54.7]
Infection Categories	22 [12.6]
Tonsillitis	31 [18.0]
Laryngitis	5 [2.9]
Bronchiolitis	43 [24.7]
Bronchitis	10 [5.7]
Pneumonia	61 [35.5]
Antibiotics use within last 3 months	
None	73 [42.0]
Oral β -lactams (amoxicillin2 [5.1] cefaclor5 [12.8] cefpodoxime- proxetil15 [38.5] cefditoren-pivoxil17 [43.5])	39 [22.7]
Oral macrolides (clarithromycin)	51 [29.7]
Intra-venous antibiotics	9 [5.2]
Age categories (years old)	
mean	2.66 years old
< 3	118 [68.6]
3-6	46 [26.4]
6 <	8 [46.0]
Underlying disease	
None	117 [67.2]
Allergic disease	48 [27.6]
Heart disease	5 [2.9]
Endocrinopathy	1 [0.6]
Low birth weight	2 [1.1]
Epilepsy	1 [0.6]

所に生じた *pbp3-2* の検出を、インフルエンザ菌遺伝子検出試薬（湧永製薬）を用いて PCR 法により行った。保有する耐性遺伝子により Table 1 のごとく分類し、MIC 値との関係を検討した。

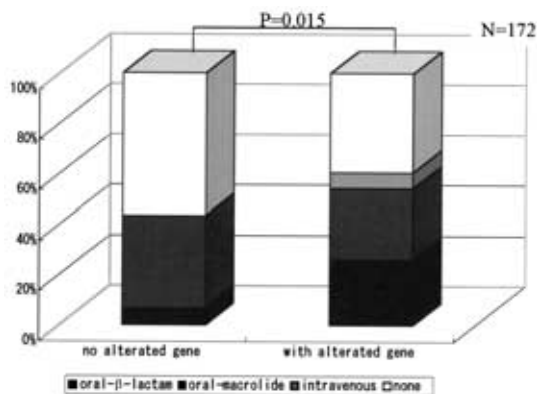
患者背景として、過去 3 カ月以内の抗生物質使用歴、年齢、基礎疾患、集団保育の有無などを聞き取りにより、あるいはカルテを回顧的に調査し、遺伝子変異株保有との関係を検討した。この際、TEM あるいは *pbp3* のうちいずれの変異も持たない株を感受性群、いずれかあるいは両方の変異を有する株を分子遺伝学的にみた耐性群とした。有意差は、 χ^2 検定にて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. ABPC 感受性と遺伝子変異の関係

MIC からみた *H. influenzae* の ABPC に対する感受性と *pbp* 遺伝子変異の関係を Fig. 1 に示し

Fig. 2 The relation between antibiotic use within the last 3 months and of resistant strains



た。NCCLS の勧告で感受性ありとされている MIC 値 $1\mu\text{g/ml}$ の株は全て low-BLNAR (β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae*) または BLNAR であった。MIC 値 $2\mu\text{g/ml}$ 以上の株のうち、BLPAR (β -lactamase-producing ampicillin-resistant *H. influenzae*) は 11.8%, low-BLNAR は 9.9%, BLNAR は 58.8%, BLPACR (β -lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant *H. influenzae*) は 20.6% であった。

2. 背景調査

1) 患児の背景 (Table 2)

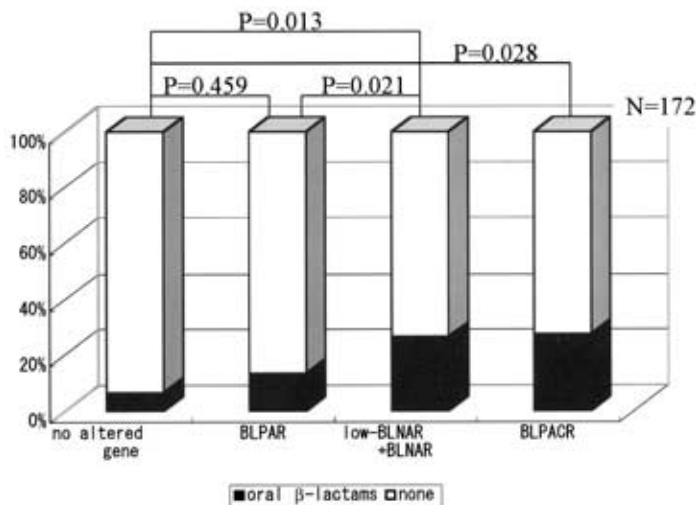
患児の平均年齢は 2.64 歳、最低年齢は 0 歳 2 カ月、最高年齢は 12 歳であった。検体採取時の臨床診断は、気管支炎および肺炎、喘息様気管支炎を含む下気道炎が 66.3% であった。男児が 54.7% とやや多かった。基礎疾患としては、アレルギー疾患が 27.6% と最も多く、その他、先天性心疾患および内分泌疾患、低出生体重児、てんかんが認められた。

2) 過去 3 カ月以内の抗生物質使用 (Fig. 2)

耐性群において、過去 3 カ月以内の抗生物質の使用率が高かったが、有意差はなかった。特に、経口 β -lactam 薬に注目すると、遺伝子変異群においてその使用率は有意に高かった。

検出された耐性遺伝子の種類と β -lactam 薬使用との関係を Fig. 3 に示した。 β -lactamase 産生遺伝子を有する BLPAR では β -lactam 薬使用頻度

Fig. 3 The relation between oral-antibiotics use and resistant strains
BLNAS ; β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible *H. influenzae*, BLNAR ; β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae*, BLPAR ; β -lactamase-producing ampicillin-resistant *H. influenzae*, BLPACR ; β -lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant *H. influenzae*



に有意差はみられなかった。 *pbp* 遺伝子変異を有する low-BLNAR+BLNAR 群および BLPACR 群では有意差をもって、過去 3 カ月以内の β -lactam 薬使用が多かった。

3) 年齢, 集団保育, 同胞, 基礎疾患について

年齢あるいは集団保育, 同胞および基礎疾患の有無と遺伝子変異株保有との間に因果関係は見出せなかった。

考 察

私たちが今回行った調査によると, MIC 1 μ g/ml の株が全て low-BLNAR あるいは BLNAR であった。すなわち, 生方らも指摘しているように²⁾, 欧米で標準とされている NCCLS の勧告に従うと感受性ありとされる株の中に, すでに耐性遺伝子を保有する株が多く存在していた。従って, 耐性遺伝子検査の有無と保菌者の背景因子との関係を調査することが, 耐性菌出現にかかわる宿主側の危険因子を求める上で重要であると考えられた。

私たちは以前, 福島県相馬地区における 2001 年から 2003 年にかけての調査の中で, *S. pneumoniae* および *H. influenzae* の薬剤耐性株保菌の宿主

側危険因子を求めた。その結果, 耐性 *H. influenzae* 保菌の危険因子としては, 過去 3 カ月以内の抗生物質使用, 低年齢, 集団保育が示唆された⁶⁾。しかし, 本調査において耐性株保有との関係で統計学的な有意差を見出すことができたのは, 過去 3 カ月以内の β -lactam 薬使用のみであった。すなわち, β -lactam 薬使用は耐性遺伝子の獲得に, 年齢や集団保育は耐性菌の保菌と伝播に関係していると考えられた。

β -lactamase 非産生 ABPC 耐性株の薬剤耐性は, *pbp* をコードする *pbp3* 遺伝子の変異によりもたらされる。生方らは, そのような株の薬剤耐性の特徴として, ペニシリン系薬よりもセフェム系薬に対し, より親和性が低下していることを指摘している。また, このような株が増加している背景として, 本邦において小児に対し経口セフェム系薬が頻用されていることを挙げている³⁾。本調査においても Table 2 に示す通り, 使用されていた経口 β -lactam 薬は, そのほとんどがセフェム系薬であった。耐性遺伝子の種類と β -lactam 薬との関連をみると, 過去 3 カ月以内の β -lactam 薬使用は β -lactamase を産生する BLPAR ではなく, *pbp*

変異を来した low-BLNAR, BLNAR, BLPACR を増加させることを示唆している。すなわち、本邦における経口セフェム系薬の頻用が, *H. influenzae* に *pbp* 変異を誘導し、耐性株の多くが low-BLNAR または BLNAR であるという現在の状況に陥ったものと考えられる。

本調査により、外来診療において使用される経口セフェム薬が, *H. influenzae* の *pbp* 遺伝子変異における最も重要な因子であることが、臨床的に示された。薬剤耐性 *H. influenzae* の蔓延を防ぐため、小児のプライマリ・ケアに携わる小児科医が、日常診療における抗生物質の使用のあり方を再考する必要があると考えた。

本稿を終えるにあたり、ご協力下さいました福島県衛生研究所微生物グループおよび当院検査部の皆さまに心より感謝致します。

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) 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.
- 3) 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。日化療会誌 2003；51：569—73.
- 4) 宇野芳史：小児急性中耳炎症例の鼻咽腔から検出された *H. influenzae* の分子疫学的検討。日化療会誌 2004；52：163—7.
- 5) 織田慶子，沖真一郎，阪田保隆：小児由来の *Haemophilus influenzae* の各種抗菌薬に対する薬剤感受性と臨床的検討。日化療会誌 2004；52：182—5.
- 6) 松本歩美，細矢光亮，片寄雅彦，村井弘通，川崎幸彦，佐藤 敬：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。感染症誌 2004；78：482—9.

Host Risk Factors for Acquisition of Antimicrobial Resistant Gene in *Haemophilus influenzae*

Ayumi MATSUMOTO¹⁾, Mitsuaki HOSOYA²⁾, Masahiko KATAYOSE¹⁾,
Kiyohiko WATANABE³⁾, Kazuo KATO⁴⁾ & Hitoshi SUZUKI²⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Soma General Hospital

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

³⁾Bacteriological Laboratory, Soma General Hospital

⁴⁾Fukushima Institute of Public Health

The present study investigated the host risk factors for carriage of *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) with resistant gene(s) against antibiotics. From September 2001 to January 2004, 174 strains of *H. influenzae* were isolated from the nasopharynx of children with respiratory tract infections. We classified these strains on the basis of the MIC to Ampicillin and the presence of resistant gene(s) for antibiotics resistance (gene for β -lactams and altered *pbp* gene(s)). The patients' background such as previous antibiotic usage, age, daycare attendance, siblings and underlying diseases was investigated. The risk factor for carriage of strains with altered *pbp* gene(s) was the usage of β -lactams within the last 3 months. Controlled usage of oral β -lactams might be an important issue for preventing the spread of resistant *H. influenzae* strains such as β -lactamase non-producing ampicillin resistant *H. influenzae*. We have to reconsider a therapeutic approach for the treatment of young children with respiratory tract infection.