

PCR 法による急性中耳炎患児鼻咽腔よりの ペニシリン耐性肺炎球菌の検出

鈴木正樹 島田 純 保富宗城 山中 昇

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科学教室

Identification of Penicillin Resistance *Streptococcus pneumoniae* in Nasopharynx of Patient with Acute Otitis Media by PCR

Masaki SUZUMOTO, Jun SHIMADA, Muneki HOTOMI, Noboru YAMANAKA
Department of Otorhinolaryngology, Wakayama Medical College

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) is one of the leading pathogen of acute otitis media (AOM). For most AOM caused by *S. pneumoniae*, penicillin is the antibiotics of choice, however, recently there is an alarming increase in penicillin resistant strains in *S. pneumoniae*. Empirical treatment of AOM should take the strains into account. For the rapid identification of penicillin resistant *S. pneumoniae* (PRSP), PCR based genotyping method is likely to be a more reproducible and useful approach. The sequences of penicillin binding protein, pbp1a, pbp2b and pbp2x, genes of penicillin resistant *S. pneumoniae* (PRSP) were more highly diverged than those of penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (PSSP). Clinical isolates (n=61) obtained from nasopharynx of patients with AOM were evaluated for the genotyping of PBP genes.

PCR for autolysin gene was also applied to confirm the identification of isolate as *S. pneumoniae*. The resistance of *S. pneumoniae* to penicillin and other β -lactams has been shown to be associated with mosaic mutations in the PBP1a, PBP2b and PBP2x genes.

These findings suggest that rapid identification of PSSP and PISP/PRSP by PCR is possible and very useful for proper treatment of acute otitis media.

はじめに

急性中耳炎は小児期にもっとも頻繁に罹患する上気道感染症であり、生後3歳までに50%~71%の小児が少なくとも1回の急性中耳炎に罹患するとされる¹⁾。肺炎球菌は小児急性中耳炎の起炎菌の30%~50%を占めるとされる細菌

である。近年急性中耳炎患児の耳漏より検出される肺炎球菌の中に抗生剤に低感受性を示すものが増加し、従来の抗生剤治療にて難治性を示す中耳炎の報告が多くなされており²⁾³⁾⁴⁾、抗生剤の選択をはじめとする治療法の見直しが重要となっている⁵⁾。Polymerase chain reaction

(PCR) 法は、高感度、高特異性を有する分子生物学的手法であり、病原体の検出から遺伝子解析まで様々な応用がなされている。

今回我々は、小児急性中耳炎患児の上咽頭より分離された肺炎球菌におけるペニシリン耐性肺炎球菌の検索および PCR 法によるペニシリン結合蛋白 (Penicillin binding protein : PBP) 遺伝子の変異検索を行った。

対象と方法

1. 対象

平成9年11月より平成10年5月までに和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科を受診した小児急性中耳炎初診例のうち、鼻咽腔より肺炎球菌が検出された61例である。

2. 細菌培養検査

ヒツジ血液寒天培地 (Nippon Becton Dickinson, 東京) を用い、5%CO₂下に37℃にて20時間培養を行ったのち、単一コロニーを分離した。肺炎球菌の同定は、オプトヒン試験および胆汁溶解試験にて行うとともに、PCR法にて自己溶解酵素を支配する *lytA* 遺伝子の検索を行った⁶⁾。

3. 薬剤感受性検査

分離された肺炎球菌のβ-ラクタム剤に対する感受性試験は、日本化学療法学会標準法に従い、微量液体希釈法にて最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration : MIC) の測定を行った。抗生剤は、Penicillin G (PC-G), Cefditoren pivoxil (CDTR), Cefaclor (CCL), Cefdinir (CFDN), を用いた。

4. PCR プライマー

PCR には、Ubukata ら⁶⁾の報告による4つのプライマーセットを用いた。(Table 1)

5. PCR 法

分離同定された肺炎球菌を30μlの細菌溶解液 (1M Tris : pH 8.9, 4.5% nonidet P-40, 4.5% Tween 20, 10mg/ml Proteinase K) に拡散し、thermal cycler (Gene Amp PCR System 9700, Perkin-Elmer, Norwalk, CT,

USA) にて60℃で10分、94℃で5分の溶菌処理を行った。この細菌溶解液1μlをプライマーを含むPCR反応液に加えた。PCR反応液の組織は、100μl中に60ngのプライマー、8μlの25mM dNTP混合液、2.5U Taq DNA polymerase、10μlの10×PCR溶液 (pH 8.3) を含むものとした。PCRは94℃で20秒、57℃20秒、72℃15秒を1サイクルとし30サイクルを行った。PCRの全行程の時間は約2時間である。PCR後、増幅産物を3%アガロースにて電気泳動を行い、増幅されたDNAの確認を行った。PCR法にてこれらの遺伝子が増幅され単一バンドとして検出された場合、遺伝子変異はなく感性菌と判断し、検出されなかった場合には遺伝子変異をきたした耐性菌と考えた。

結 果

1. PCR法によるPBP遺伝子変異の検出分離された61例の肺炎球菌における検討では、1例(1.6%)にPBP1a、14例(23.0%)にPBP2x、1例(1.6%)にPBP2bの1遺伝子のみの変異が、5例(8.2%)にPBP2xとPBP2b遺伝子、1例(1.6%)にPBP1aとPBP2x、の2遺伝子の変異が認められた。PBP1a、PBP2x、PBP2bのすべての遺伝子に変異が認められたのは、19例(31.1%)であった。また、すべての肺炎球菌分離株において *lytA* 遺伝子が検出された。

<i>lytA</i> -1	:5'-TGAAGCGGATTATCACTGGC-3'
<i>lytA</i> -2	:5'-GCTAAACTCCCTGTATCAAGCG-3'
PBP1A-1	:5'-AAACAAGGTCGGACTCAACC-3'
PBP1A-2	:5'-AGGTGCTACAAATTGAGAGG-3'
PBP2X-1	:5'-CCAGGTTCCACTATGAAAGTG-3'
PBP2X-2	:5'-CATCCGTCAAACCGAAACGG-3'
PBP2B-1	:5'-CAATCTAGAGTCTGCTATGGA-3'
PBP2B-2	:5'-GGTCAATCCTGTCCGCGAGTA-3'

Table.1 PCR primer

2. 薬剤感受性

肺炎球菌の PBP 遺伝子の変異頻度と PC-G および β -ラクタム剤に対する MIC を示す (Fig. 1, 2, 3, 4). PBP 遺伝子の変異の頻度が増えるにつれ、各抗生剤の MIC が上昇した。PC-G に対しては MIC が $0.06 \mu\text{g/ml}$ 以下を示すのは遺伝子変異が認められないか、または 1 遺伝子の単独変異株であった。これに対し MIC が $1 \mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性側に位置するのは PBP1a 遺伝子、PBP2x 遺伝子および PBP2b 遺伝子の 3 遺伝子が同時に変異した菌株であった。また CDTR では PBP1a 遺伝子、PBP2b 遺伝子、PBP2x 遺伝子の 3 遺伝子の変異菌においても MIC が $2 \mu\text{g/ml}$ 以下と比較的良好に保たれているのに対し、CCL, CFDN, においては MIC が $2 \mu\text{g/ml}$ から $8 \mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性菌のしめる割合が増加し、PBP 遺伝子の変異に伴いセフェム系抗生剤に対する耐性化も進行することが示された。

考 察

肺炎球菌は、PC-G に対する MIC に基づき、PSSP, PISP, PRSP の 3 つに分けられる。一般には MIC が $0.06 \mu\text{g/ml}$ 以下を PSSP, $0.1 \sim 1.0 \mu\text{g/ml}$ を PISP, $2.0 \mu\text{g/ml}$ 以上を PRSP とするアメリカ臨床検査標準委員会の分類が用いられている。また、PISP と PRSP を併せて薬剤耐性肺炎球菌 (Drug resistance *S. pneumoniae* : DRSP) とも呼ばれるなど、耐性肺炎球菌における耐性の頻度は様々で、ペニシリン系抗生剤の増量投与で治癒するものから治療効果の期待できないものまで含まれる。さ

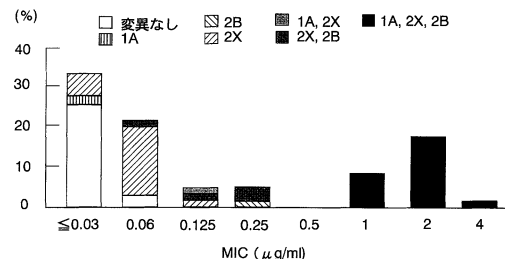


Fig.1 Mutations in the PBP genes and MIC distribution of Penicillin G

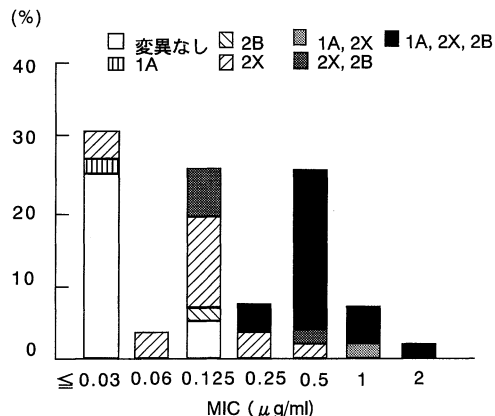


Fig.2 Mutations in the PBP genes and MIC distribution of Cefditoren pivoxil

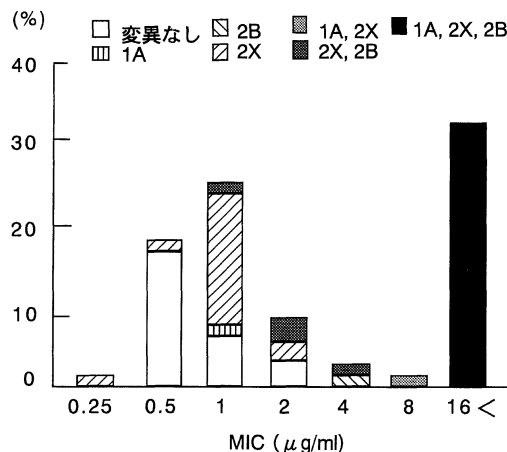


Fig.3 Mutations in the PBP genes and MIC distribution of Cefaclor

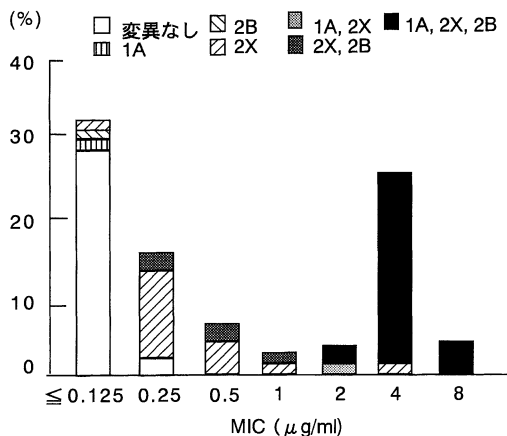


Fig.4 Mutations in the PBP genes and MIC distribution of Cefdinir

らに、一般にペニシリン耐性肺炎球菌は、他の β -ラクタム剤に対しても交叉耐性を示すとされ、セフェム系抗生剤の抗菌力も弱いと考えられている⁷⁾。末武ら⁸⁾の報告では、80%前後の肺炎球菌が3剤以上の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性肺炎球菌であるとされる。これらのことにより、元来使用可能な経口抗菌薬の少ない小児においては、選択可能な薬剤が限定されるとともに耐性の頻度や感染の重症度に応じた治療法の選択が必要となり、薬剤耐性肺炎球菌の迅速な検出が望まれる。PCR法は高感度、高特異性を有する分子生物学的手法であり、近年肺炎球菌の検出にも応用されている⁹⁾。これらはいずれも肺炎球菌に特異的な自己溶解酵素を支配する $lytA$ 遺伝子の一部を増幅するものである。今回我々が用いたプライマーも同様の $lytA$ 遺伝子の部分を検出するものであり、すべての肺炎球菌分離株に検出されており、肺炎球菌の同定に有用と考える。

また、一般的なディスク法や微量液体希釈法では肺炎球菌の分離同定後さらに感受性検査までの培養時間を要するのに対し、PCR法では約2時間で耐性菌の検討が可能であるとともに多数の検体を同時に検索できる有用な手法と考える。61例の肺炎球菌における検討では、14例(23.0%)にPRSPが、12例(19.7%)にPISPが検出された。これらのDRSPにおいては高頻度にPBP遺伝子に変異が認められた。さらにこのPBP遺伝子の変異とPC-Gをはじめとする β -ラクタム剤のMICを比較した結果、PBP遺伝子の変異頻度がMICと同様の変化を示し、PBP遺伝子の変異頻度が増加するにつれ、PC-Gのみでなく他のセフェム剤への耐性化も起こっており、PBP遺伝子の変異検索によりPC-Gおよびセフェム剤への耐性化が検討できると考えられた。急性中耳炎患児の鼻咽腔より分離された肺炎球菌の約4割がペニシリン耐性もしくは低感受性であり、経口セフェムに対しても耐性化を示すこの結果は、経口抗生剤

の選択に際してPRSPの存在を念頭におくことが一層重要となることを示唆するものであると考えられた。

参 考 文 献

- 1) Teele DW, Klein JO, Rosner B and The Greater Boston Otitis media Study Group: Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: A prospective cohort study. *J Infect Dis* 160: 83-94, 1989.
- 2) 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* 68: 1338-1351, 1994.
- 3) 大沼田あや子, 坂本裕, 都築達, 松永達雄, 小川浩司, 他: 鼻腔, 中耳腔から検出されたペニシリン中等度耐性肺炎球菌についての検討. *日本耳鼻咽喉科感染症研究会誌* 12: 15-19, 1994.
- 4) 杉田麟也, 出口浩一, 藤巻豊, 浅井俊治, 渡辺洋他: 急性中耳炎の原因菌ペニシリン低感受性肺炎球菌と反復性中耳炎の関係. *日耳鼻感染症研究会誌* 12: 79-84, 1994.
- 5) 杉田麟也: 耳鼻咽喉科感染症におけるペニシリン低感受性肺炎球菌の問題点. *臨床と微生物* 22: 193-202, 1995.
- 6) Ubukata K, Muraki O, Igarashi A, Asahi Y, Konno M: Identification of penicillin and other beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Inf Chemoth* 3: 190-197, 1998.
- 7) 生方公子: 肺炎球菌におけるペニシリン耐性機序. *臨床と微生物* 22: 137-144, 1995.
- 8) 末武光子, 入間田美保子: 耐性肺炎球菌と急性中耳炎の重症化. *JOHNS* 13: 1147-1151, 1997.
- 9) 五十嵐厚美, 村木智子, 生方公子, 中野浩美, 山根明男, 他: PCR法による臨床検査材料からの肺炎球菌の短時間検出について. *日本化学療法学会雑誌* 43: 1031-1035, 1995.

質 疑 応 答

質問 黒野祐一（鹿児島大学）

口腔内常在菌の耐性遺伝子変異との相関について検討されていればお示し下さい。

応答 鈴木正樹（和歌山医大）

今回の菌検出は上咽頭のみで、口腔内常在菌については、検討しておりません。

質問 黒野祐一（鹿児島大学）

鼻口腔分泌のPCRを行った場合、肺炎球菌と他の細菌の変異遺伝子が混乱されることはないですか。

応答 鈴木正樹（和歌山医大）

細菌培養後、単一コロニーを分離し、LytA遺伝子の検索により肺炎球菌であることを確認しております。

連絡先：鈴木正樹

〒640-8156 和歌山市七番長 27 番地

和歌山県立医科大学

耳鼻咽喉科学教室

TEL 0734-26-8296 FAX 0734-33-6480