

シンポジウム：ペニシリン耐性肺炎球菌の現状と対策

急性中耳炎の難治化とペニシリン耐性肺炎球菌

保 富 宗 城 山 中 昇

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科

Intractable Otitis Media and Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*

Muneki HOTOMI, Noboru YAMANAKA

Department of Otorhinolaryngology, Wakayama Medical College

Acute otitis media (AOM) is common infectious disease among children. The clinical feature of the illness recently was changed by several factors including an increased penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP).

In this study, PRSP was identified in about 30 % of nasopharyngeal cultures from children with AOM by polymerase chain reaction (PCR). The study about the change of PRSP in nasopharynx by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) showed that the second episode of AOM was sometimes caused by the reinfection with a different strain rather than persistence of the first strain. We should pay much attention to risk factors for the clinical course of AOM. We also should manage AOM with not only antibiotics but also otorhinolaryngological procedures of myringotomy, washings of nasopharynx and sinus to eliminate pathogens.

はじめに

急性中耳炎は幼小児期において最も頻回に罹患する感染症であり、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。急性中耳炎の臨床経過は従来までは比較的良好であり、抗菌薬治療にて短期間に症状が改善し治癒していた。しかし近年、抗菌薬の投与にもかかわらず中耳炎が改善しない例や急性中耳炎を繰り返す例など治療に苦慮する例が増加し、急性中耳炎の難治化が臨床上的の問題となっている¹⁾。急性中耳炎の起炎菌としては、肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラ・カタラーリスが3大起炎菌とされ、近年これらの中でも特に、肺炎球菌における薬剤耐性

菌が増加、急性中耳炎難治化の一因と考えられている^{2, 3)}。

今回、我々は小児急性中耳炎患児鼻咽腔において分子生物学的手法によりペニシリン耐性肺炎球菌の検出および菌株の変化を検討した。

対象および方法

1. 対象

小児急性中耳炎患児(0~6歳)初診例の鼻咽腔より検出された肺炎球菌63株を対象とした。分離された菌株は、0から+3の4段階に定量的に分類し+2以上の場合もしくは単一に分離された場合を起炎菌と判断した。

2. 薬剤感受性検査

肺炎球菌のPenicillin Gに対する感受性検

査には、日本化学療法学会標準法に従い微量液体希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) の測定を行った。

3. PCR 法によるペニシリン結合蛋白 (PBP) 遺伝子の検索

PBP 遺伝子の変異は、Ubukata らの方法⁴⁾に準じ pbp1a, pbp2x および pbp2b 遺伝子の部分を増幅するプライマーを用いた PCR 法により検討した (Table 1)。PCR 後、3%アガロースにて電気泳動を行い、増幅された DNA の確認を行い、遺伝子が増幅され単一バンドとして検出された場合を「遺伝子変異なし」、増幅されなかった場合を「遺伝子変異あり」と判断した。

4. パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法)

肺炎球菌株の識別は、PFGE 法による菌体抽出 DNA の遺伝的多型性パターンの解析にて行った。すなわち、分離株から細菌浮遊液を調整しアガロースプラグを作成したのち、2mg/ml proteinase K にて DNA を抽出した。さらに、2mM phenylmethylsulfonyl fluoride 50mM Tris-HCl, pH7.5 にて処理した後、制限酵素 SmaI もしくは ApaI にて DNA を断片化した。0.8%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色し DNA バンドのパターンを比較した。

結 果

1. PCR 法による PBP 遺伝子の変異の検索

急性中耳炎患児鼻咽腔より分離された肺炎球

Table 1 Primers for PCR

lyt A-1	: 5'-TGAAGCGGATTATCACTGGC-3'
lyt A-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'-GGTCAATTCCTGTCGGCAGTA-3'

菌の約 30%で pbp1a, 2x, 2b 遺伝子のすべてが変異しており、PBP 遺伝子の変異にともないペニシリン G の MIC が増加していた (Fig. 1)。また、MIC が 1 μg/ml でアメリカ臨床検査標準委員会 (NCCLS) の中間 (I) に分類される菌株にも高頻度の遺伝子変異が認められるとともに、感性 (S) 株の約 39%、中間 (I) 株のすべてにセフェム耐性化に關与する pbp2x 遺伝子の変異が認められた。

2. 肺炎球菌株の識別

急性中耳炎を繰り返した小児の鼻咽腔より分離された肺炎球菌株の中耳炎エピソードごとの菌株の変化を PCR 法による PBP 遺伝子の変異の検索にて検討した結果を Table 2 に示す。PBP 遺伝子が高頻度に変異した PRSP 株においてもエピソードごとに鼻咽腔から分離される肺炎球菌菌株が異なっている場合が認められていた。PFGE による菌株識別においても、PRSP が検出された場合の半数で 2 回目の中耳炎の際に菌株が異なっていた (Fig.2)。

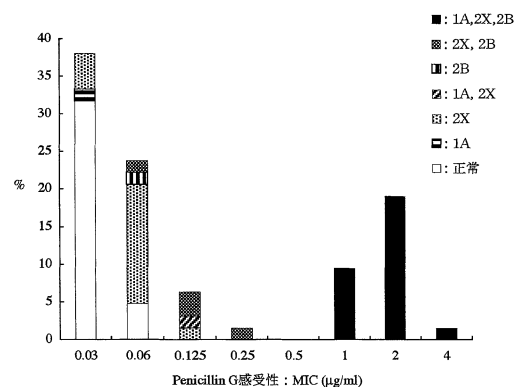


Fig.1 Correlation between MIC of PCG and PBP gene mutations (n=63)

Table 2 The change of *S.pneumoniae* strains colonized in nasopharynx in each episodes of AOM

症例	エピソード間隔 (日)	PBP遺伝子の変異			血清型	PFGE
		PBP1a	PBP2x	PBP2b		
A	84	+	+	+	NT	同
		+	+	+	23	
B	56	+	+	+	19	同
		+	+	+	19	
C	158	-	-	+	23	異
		+	+	+	NT	
D	142	+	+	-	NT	異
		+	+	-	NT	

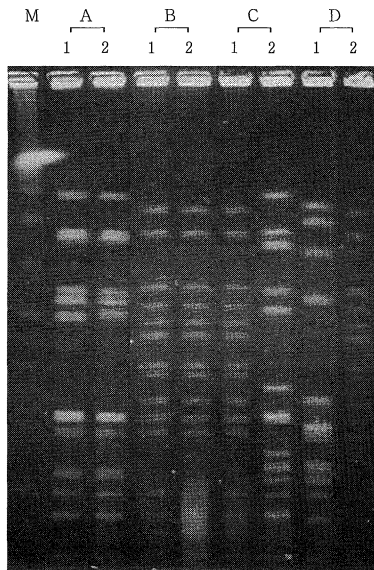


Fig.2 The change of *S.pneumoniae* strains colonized in nasopharynx by PFGE
M:molecular marker, A-D:cases, 1, 2:episodes

考 察

急性中耳炎の難治化には、それぞれの急性中耳炎エピソードは改善するものの中耳炎を繰り返す場合と、急性中耳炎が十分に改善せず遷延化する場合の2つのパターンが考えられる。前者は反復性中耳炎として、生後2歳までに罹患する急性中耳炎の回数や宿主の免疫異常の関与が指摘されている^{5, 6)}。一方、後者の急性中耳炎が改善せず遷延化する場合の要因としては、起炎菌の薬剤耐性化なかでもペニシリン耐性肺炎球菌の増加が注目されている。肺炎球菌はアメリカ臨床検査標準委員会 (NCCLS) の基準により、ペニシリン G の最小発育阻止濃度 (MIC) が 0.06 μg/ml 以下の感性 (S), 0.125 ~ 1 μg/ml の中間 (I), 2 μg/ml 以上の耐性 (R) に分類される。現在では、急性中耳炎患児より分離同定される肺炎球菌の 36~47% が中間から耐性と報告されている^{1, 2)}。

肺炎球菌の薬剤耐性化はβ-ラクタム剤の作用標的である PBP の遺伝子に変異し薬剤親和性が低下するためと考えられており³⁾、近年で

は、分子生物学的手法を用いた PBP 遺伝子の変異が検索されている^{4, 7)}。今回の PCR 法による検索では、約 30% の菌において pbpl_a, 2x, 2b 遺伝子のすべてが変異しており、また感性 (S) と考えられる菌株のなかにもセフェム耐性化に関与する pbp2x 遺伝子変異株が多く存在しており、薬剤耐性菌が中耳炎の難治化に関与していると考えられる。

薬剤耐性菌による中耳炎の難治化の機序としては、薬剤耐性菌が起炎菌の carrier focus である鼻咽腔に長期に存在し経耳管的感染を起こすことが考えられてきた¹⁾。しかし、急性中耳炎を繰り返した小児の鼻咽腔における肺炎球菌の変化検討した結果、PBP 遺伝子が高頻度に変異したペニシリン耐性肺炎球菌株においても鼻咽腔に長期に存在するのみでなく菌株が変化しながら感染を繰り返す場合もあり、このような起炎菌の変化が急性中耳炎をより難治化させているものとする。

このような薬剤耐性菌による急性中耳炎の難治化に対しては、臨床所見のスコア化など経過を客観的に評価し難治化の risk factor を把握することにより、重症度にあわせた治療薬を選択するとともに感染症の原則である排膿すなわち鼓膜切開、鼻汁吸引、ネフライザー療法が重要となる。さらに今後は、宿主の免疫能も視野に入れ、効果的なワクチン (経鼻ワクチン)^{8, 9)} 等の開発が期待される。

ま と め

中耳炎難治化の要因には、ペニシリン耐性肺炎球菌をはじめとする薬剤耐性菌の増加、異なる起炎菌株による頻回な感染、さらには反復性中耳炎に見られる起炎菌に対する宿主の特異的免疫応答の不良などがあり、急性中耳炎の難治化はこれらの要因が複雑に関連し引き起こされていると考える。

参 考 文 献

1) 杉田麟也：小児急性中耳炎検出菌と薬剤感受性。JOHNS13 : 1139-1145, 1997

- 2) 末武光子, 入間田美保子: 耐性肺炎球菌と急性中耳炎の難治化. JOHNS 13: 1147~1151, 1997.
- 3) 山中昇, 保富宗城: 中耳炎難治化の要因. 小児科 40: 1093~1099, 1999.
- 4) Ubukata K, Murakai O, Igarashi A, et al: Identification of penicillin and other beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. J Infec Chemoth 3: 190~197, 1998.
- 5) Yamanaka N, Faden H: Antibody response to outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis-prone children. J Pediatr 122: 122~218, 1993.
- 6) Hotomi M, Yamanaka N, Saito T, et al: Antibody responses to the outer membrane protein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae* and pneumococcal capsular polysaccharides in otitis-prone children. Acta Otolaryngol in press
- 7) 保富宗城, 島田純, 鈴木正樹 他: 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. 日耳鼻会報 101: 924~930, 1998.
- 8) Hotomi M, Saito T, Yamanaka N: Specific mucosal immunity and enhanced nasopharyngeal clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* after intranasal immunization with outer membrane protein P6 and cholera toxin. Vaccine 16: 1950-1956, 1998
- 9) 山中昇: 反復性中耳炎とワクチン予防の可能性: 耳鼻臨床 87: 869~877, 1994

連絡先: 保富宗城

〒 641-0012 和歌山県和歌山市紀三井寺

811-1

和歌山県立医科大学

耳鼻咽喉科学教室