

肺炎球菌の PCR による遺伝子検索, 薬剤感受性, 血清型及び臨床的特徴の検討

松原茂規 末松寛之 三嶋廣繁

耐性菌フォーラム

PCR-based Genetic Analyses, Drug Sensitivity, Serological Types and Clinical Features for *Streptococcus Pneumoniae*

Shigenori MATSUBARA, Hiroyuki SUEMATSU, Hiroshige MIKAMO

Forum of Drug Resistant Bacteria

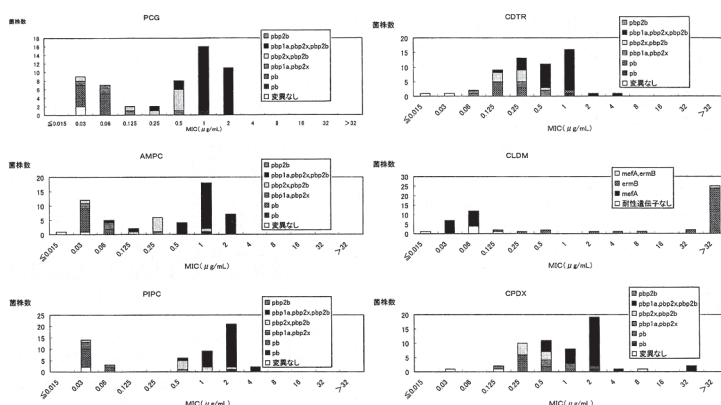
1. Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), collected from the nasal cavity (nasopharynx) and tonsil, were investigated using molecular biological techniques. The relationship between drug resistance in *S. pneumoniae* and clinical characteristics was also assessed.
2. PCR-based genetic analysis showed that PRSP, which exhibits mutations in three abnormal *pbp* genes, accounted for over half of the overall isoletes. Moreover, isolates expressing the *ermB* gene, which are thought to be highly resistant to macrolide antibiotics, represented 60% of the isolates.
3. Drug sensitivity testing showed that CDTR, CFPN and CFTM in oral cephalosporins were sensitive to *S. pneumoniae*, but any of the macrolides were not sensitive.
4. Among the various serological types, type 6 was the most common.
5. Drug resistance was not correlated with fever, coughing or middle otitis. However, the tendency was that the greater the drug resistance, the higher the incidence of multiple infections, including *S. pneumoniae*, and the longer the duration of chemotherapy. Drug resistance correlated to intractable and chronic clinical symptoms.

はじめに

近年, 肺炎球菌等の耐性化が急増している。今回は肺炎球菌の耐性化を分子生物学的に検討し, 耐性度と臨床的特徴との関係を後方視的に考察した。

対象と検討項目

対象は 2002 年 5 月 15 日から 20 日の 6 日間
に鼻腔 (上咽頭) から肺炎球菌が得られた急性
鼻炎・急性副鼻腔炎症例 57 例と扁桃から肺炎
球菌が得られた急性化膿性扁桃炎症例 3 例, 計
60 検体である。

Fig. 1 Susceptibility distributions of *Streptococcus pneumoniae*

検討項目

1. PCRによる遺伝子検索

60例のうち遺伝子検索の可能だった55例につき検討した。検索方法は生方らの報告¹⁾に従った。3つのpbp遺伝子に変異のない株をpenicillin susceptible *Streptococcus pneumoniae* (PSSP), 1-2遺伝子に変異のある株をpenicillin intermediate *S. pneumoniae* (PISP), 3遺伝子に変異した株をpenicillin resistant *S. pneumoniae* (PRSP)とした。

2. 薬剤感受性

上記の55例につき薬剤感受性検査を検討した。

3. 血清型

60例の検討を行った。

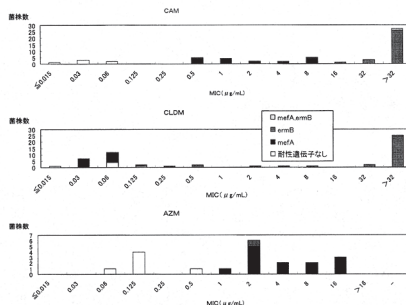
4. 臨床的特徴

60例のうち鼻腔(上咽頭)感染例57例につき、耐性と臨床的特徴(発熱・咳の有無, 中耳炎の合併, 重複感染及び化学療法期間)との関係を検討した。

結 果

1. PCRによる遺伝子検索 (Fig. 1, Fig. 2)

遺伝子学的に解析した区分に従って菌株を分けると、①primerとした塩基配列に遺伝子変異の認められないPSSP株が2例(3.6%)、②

Fig. 2 Susceptibility distributions of *Streptococcus pneumoniae*

pbp1a 単独変異株のPISP株が1例(1.8%)、③*pbp2x* 単独変異株のPISP株が10例(18.2%)、④*pbp1a+pbp2x* 変異のPISP株が5例(9.1%)、⑤*pbp2x+pbp2b* 変異のPISP株が8例(14.5%)、⑥*pbp1a+pbp2x+pbp2b* 変異のPRSPが29例(52.7%)であった。

PCGのMIC分布では、PSSPは $\leq 0.03 \mu\text{g/mL}$ 、PISPは $0.03 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ 、PRSPは $\geq 0.25 \mu\text{g/mL}$ であり、NCCLSのブレイクポイントでは必ずしも明瞭に識別できない結果であった。

経口セフェム系薬では*pbp2x* 変異の影響を強く受け、MICはいずれもPRSP側に大きくシフトしていた。

マクロライド耐性遺伝子の*mefA* 遺伝子保

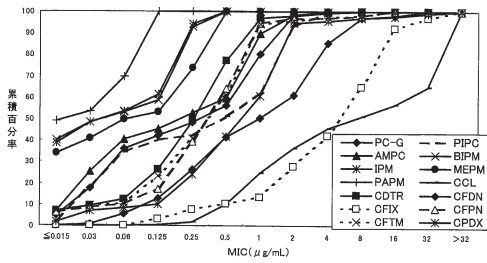


Fig. 3 Cumulative curves of *Streptococcus pneumoniae*

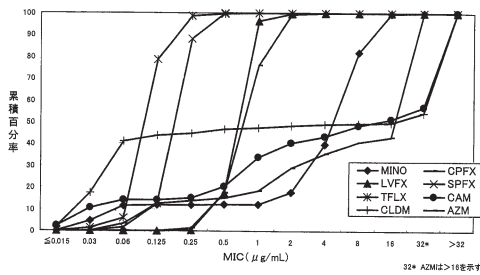


Fig. 4 Cumulative curves of *Streptococcus pneumoniae*

持株は15株(27.2%)、同じく *ermB* 遺伝子保持株は33株(60%)、両遺伝子保持株は1株(1.8%)、耐性遺伝子をもたない株は6株(10.9%)であった。

2. 薬剤感受性 (Fig. 3, Fig. 4)

薬剤感受性分布ではβ-ラクタム系注射薬のPAPM, IPM, BIPM, MEPMでMICが優れていた。次に経口薬のAMPC, CDTR, PC-G, CFTM, CFPNが続く、CPDX, CFDN, CFIX, CCLは劣っていた。

合成抗菌薬、マクロライド・リンコマイシン系、テトラサイクリン系ではTFLX, SPFXのMICが優れていた。次にLVFX, CPFIXが続く、CLDM, CAM, MINO, AZMは劣っていた。

3. 血清型 (Fig. 5)

6型が20例(33%)と最も多く、次に40型が8例(13%)、15型と9型が6例(10%)ずつで、この4つの血清型で全体の66%を占め

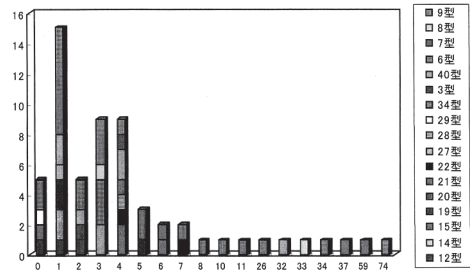


Fig. 5 Capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* by patient age

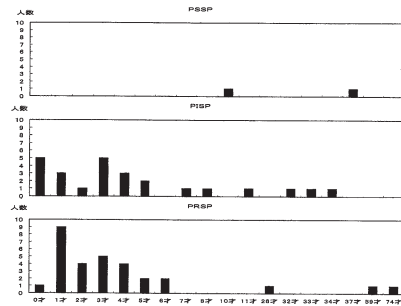


Fig. 6 Isolation frequency of PSSP, PISP and PRSP by patient age

た。少なくとも13例(22%)は肺炎球菌ワクチンの無効な型であった。

なお、3型は1例だけであり、*pbp2x+pbp2b* 変異のPISPであった。

4. 臨床的特徴

1) 耐性度と年齢構成 (Fig. 6)

PSSPは2例(3.5%)、PISPは25例(43.9%)、PRSPは30例(52.6%)であった。PRSPは1歳にピークがあり0歳から74歳まで広い年齢層に分布していた。

2) 耐性度と発熱・咳 (Fig. 7)

発熱合併はPISP感染例で24%、PRSP感染例で23.3%であった。咳の合併はPISP感染例で60%、PRSP感染例で66.7%であった。

3) 耐性度と中耳炎

急性中耳炎合併はPISP感染例で16%、PRSP感染例で13.3%であった。滲出性中耳

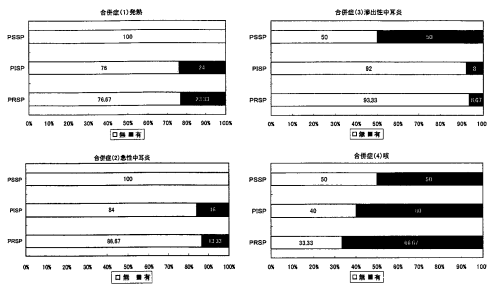


Fig. 7 Distribution of complication of fever, middle otitis and coughing

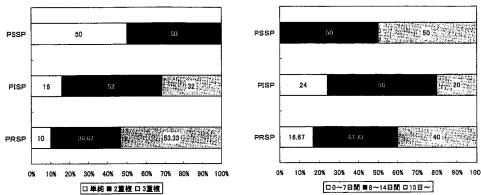


Fig. 8 Distribution of multiple bacterial infections including of *Streptococcus pneumoniae* and the duration of chemotherapy

炎合併は PISP 感染例で 8%, PRSP 感染例で 6.7%であった。

4) 耐性度と重複感染 (Fig. 8)

PISP 感染例ではそれを含む 2 重複感染例が 52%, 3 重複感染例が 32%で, PRSP では 2 重複感染例が 36.7%, 3 重複感染例が 53.3%で, PRSP 感染例に重複感染の割合が高かった。しかし, 有意水準 5%では, 統計的有意差は認められなかった。

5) 耐性度と化学療法期間

PISP 感染例では化学療法期間が 8-14 日間が 56%, 15 日以上が 20%であり, PRSP 感染例では 8 から 14 日間が 43.3%, 15 日以上が 40%であり, PRSP 感染例で化学療法期間が延長する傾向がみられた。しかし, 有意水準 5%では, 統計的有意差は認められなかった。

考 察

PCR による遺伝子検索ではセフェム系薬の

抗菌力を低下させる *pbp2x* 単独変異株が 10% を占めた。肺炎球菌の耐性化の原因がセフェム系薬の乱用によることが示唆された。

マクロライド系薬は PISP や PRSP に対して抗菌力を失っていた。慢性副鼻腔炎に対するマクロライド系薬の有効性は認められている²⁾が, 急性副鼻腔炎にはマクロライド系薬の有効性は少ないことを再認識すべきである。

PRSP 感染例と PISP 感染例とでは, 発熱, 咳, 中耳炎の合併頻度には差を認めなかった。しかし, PRSP 感染例は PISP 感染例に比べ, それを含む重複細菌感染例が多く, また化学療法使用期間が長期になる症例が多かった。肺炎球菌の耐性化は症状の重症化よりもむしろ難治化, 遷延化に関係すると考えられた。

今回検討した肺炎球菌検出例 60 例はすべて, 自覚症状を有する状態で検出されたものであり, 得られた肺炎球菌は原因菌と考えられる。無床診療所で 6 日間に 60 症例の肺炎球菌罹患患者が来院したことは, 肺炎球菌感染の母数の多さを示す。また, 肺炎球菌の中で PRSP が半数以上を占め鼻炎, 副鼻腔炎の難治化, 遷延化傾向を認めた。以上から, 鼻腔, 副鼻腔の細菌感染症は現在行われている経験的治療では不十分であり, 個々の症例に即したきめ細かい対応が必要である。すでに急性中耳炎においては鼻咽腔検出菌の各種薬剤に対する感受性をエピソード毎に評価することが重要であるとの報告³⁾がある。中耳腔への感染ルートが鼻腔, 上咽頭経由であることを考えれば, 急性中耳炎のみならず, 急性鼻炎, 急性副鼻腔炎においても, 個々の感受性検査が必要なことは明らかである。

ま と め

1. 鼻腔 (上咽頭) 及び扁桃から得られた肺炎球菌を分子生物学的に検討した。また, 肺炎球菌の耐性度と臨床的特徴との関係を考察した。
2. PCR による遺伝子検索では, 3 つの *pbp* 遺

伝子に変異の認められる PRSP が半数以上を占めた。マクロライド系抗生剤高度耐性株と考えられる *ermB* 保持株が 6 割に認められた。

3. 薬剤感受性検査では経口セフェム系抗生剤で CDTR, CFPN, CFTM が感受性良好であったが、マクロライド系抗生剤は総じて薬剤感受性が不良であった。
4. 血清型では 6 型が多数を占めた。
5. 耐性度と発熱、咳、中耳炎の合併とは無関係であった。しかし、耐性度が増すと肺炎球菌を含む重複感染例の割合が増え、化学療法期間長期例が増えた。耐性度は臨床的症候の難治化、遷延化と関連していた。

尚、「耐性菌フォーラム」は耐性菌感染症及びその化学療法に関する研究の促進、知識の交流及び普及を図ることを目的として、平成 14 年 5 月 7 日に設立された。

参 考 文 献

- 1) 生方公子, 小林玲子, 千葉菜穂子, 他: 本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* 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—. 日本化学療法学会雑誌 51 (2): 60-70, 2003
- 2) 高北晋一, 北村溥之, 大八木章博, 他: 慢性副鼻腔炎と少量エリスロマイシン療法. 耳鼻臨床 84 (4): 489-498, 1991
- 3) 島田純, 保富宗城, 九鬼清典, 他: 小児上気道感染における起炎菌の分子生物学的検討—急性中耳炎における鼻咽腔の肺炎球菌及びペニシリン結合蛋白遺伝子の検索—. 日本耳鼻咽喉科学会会報 103 (5): 552-559, 2000

連絡先: 松原 茂規

〒501-3247

岐阜県関市池田町 100 番地

医療法人社団松原耳鼻いんこう科医院

TEL 0575-24-5570 FAX 0575-24-4573