

急性中耳炎におけるインフルエンザ菌の 薬剤感受性と耐性遺伝子

小上真史 平岡政信 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・頭頸部外科教室

Drug Susceptibility and Resistant Genes of *Haemophilus Influenzae* Isolated from Acute Otitis Media Patients

Masashi OGAMI, Masanobu HIRAOKA, Masaki SUZUMOTO, Jun SHIMADA,
Muneki HOTOMI, Noboru YAMANAKA

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Wakayama Medical
University, Wakayama

Haemophilus influenzae is important pathogen of upper respiratory infection, but recently β -lactamase non-producing ampicillin resistant (BLNAR) has been isolated from acute otitis media (AOM) children.

We analyzed the gene characteristics and antimicrobial susceptibilities of 711 strains of *H. influenzae* which were isolated from AOM children in Wakayama. 33 strains of *H. influenzae* (4.6%) were BLNAR, 579 strains of *H. influenzae* (81.4%) were BLNAS, 21 strains of *H. influenzae* (3.0%) were BLPAR. In 579 strains of BLNAS, 170 strains (29.3%) had one gene mutation and 18 strains (3.1%) had two gene mutations.

There are many strains which have some gene mutations in BLNAS, we must pay attention to these strains.

はじめに

急性中耳炎は我々耳鼻咽喉科医がもっとも良く遭遇する疾患の一つである。しかしながら、ここ数年治療に難渋する難治例や遷延例が増えてきている^{1,2)}。これらの原因は宿主側・細菌側にそれぞれ要因が報告されている^{3,4,5)}。主要な原因の一つとして薬剤耐性菌の増加が挙げられる^{3,4)}。中耳炎の3大起炎菌である *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*,

*Moraxella catarrhalis*のうち、特に前2者において薬剤耐性化がみられ、これらが難治化する要因の一つと考えられている^{3,4)}。*S. pneumoniae*ではペニシリン中等度耐性肺炎球菌 (penicillin intermediately resistant *S. pneumoniae*: PISP) やペニシリン耐性肺炎球菌 (penicillin resistant *S. pneumoniae*: PRSP) が、*H. influenzae*では β -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌

(β -lactamase non-producing ampicillin-resistant *H. influenzae*: BLNAR) などの増加が報告されている^{6,7)}。肺炎球菌においては薬剤の耐性機構は β -ラクタム系薬剤が標的とする細胞壁合成酵素であるペニシリン結合蛋白(PBP)を支配する遺伝子である *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* の変化が重要となっている^{8,9)}。また、インフルエンザ菌の薬剤耐性化のメカニズムは *pbp3* (*fts I*) 遺伝子変異にあることがわかっており、今回我々は和歌山県内に置いて分離されたインフルエンザ菌 711 株の薬剤感受性及び薬剤耐性遺伝子の検索を行った。

対象と方法

対象は 1999 年 1 月から 2003 年 12 月までの 5 年間で和歌山県立医科大学附属病院の関連病院を受診した年齢 2 歳以下の急性中耳炎患児の鼻咽腔及び中耳から採取・分離されたインフルエンザ菌 711 株とした。分離されたインフルエンザ菌において微量液体希釈法によりアンピシリンに対する MIC 値を測定した。次に遺伝子学的検索を行った。PCR 法を用いてペニシリン結合蛋白 PBP3 をコードする *fts I* 遺伝子の変異の有無、さらに *fts I* 遺伝子上に存在する

薬剤耐性遺伝子の有無、TEM 型 β -ラクタマーゼをコードする *bla* 遺伝子の発現を検討した。今回の検討において BLNAR は米国の NCCLS の分類に従ってアンピシリンに対する MIC 値が $4.0 \mu\text{g/ml}$ 以上のものと定義した。

結 果

今回検索した 711 株の *H. influenzae* についての結果を示す (Fig. 1)。NCCLS 分類により BLNAS と分類されたものは 579 例 (81.4%) であり、中間型が 78 例 11%、BLNAR が 33 例 (4.6%)、 β -ラクタマーゼ陽性株が 21 例 (3.0%) であった。日本耳鼻咽喉科感染症研究会全国サーベイランス 2003 の結果と比較すると 4.6% : 24% であり低値を示した。次に遺伝子検索結果を示す (Fig. 2)。薬剤耐性の機序としてはほとんどが β -ラクタマーゼ非産生の PBP 遺伝子のうち 1 遺伝子変異または 2 遺伝子変異であり、288 例 (約 40%) であった。 β -ラクタマーゼ産生株は 21 例 (3.0%) であった。日本耳鼻咽喉科感染症研究会全国サーベイランス 2003 の結果を併記する。サーベイランスの検体の検索では 1 遺伝子異常もしくは 2 遺伝子異常がある株は約 67% であり、和歌山での結

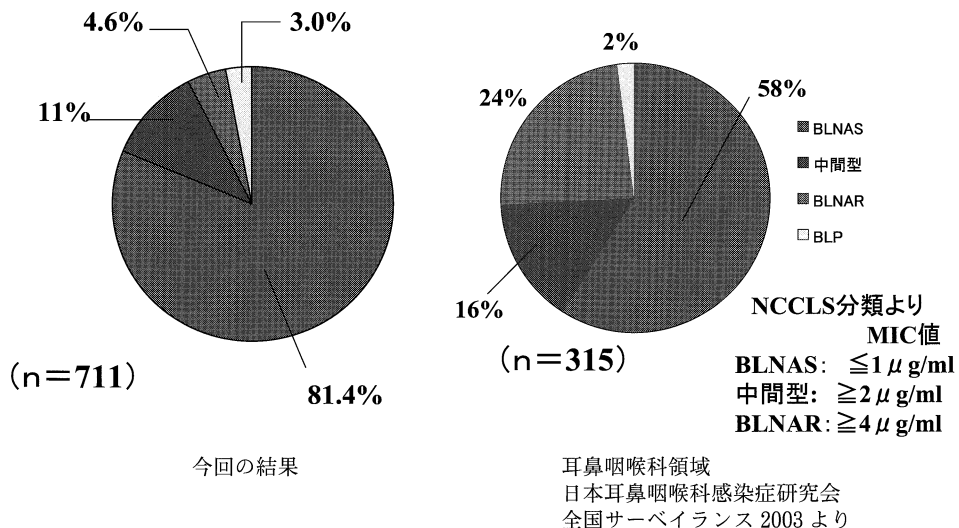


Fig. 1 Susceptibility to ABPC of *H. influenzae*

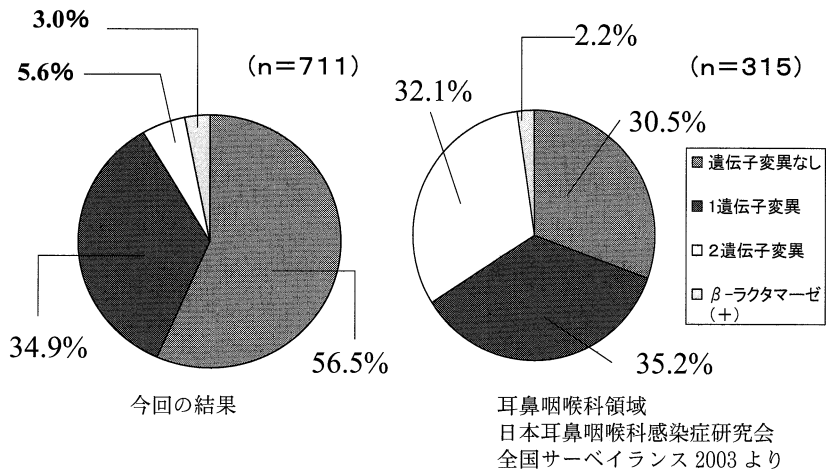


Fig. 2 Expression of gene mutation of *H. influenzae*

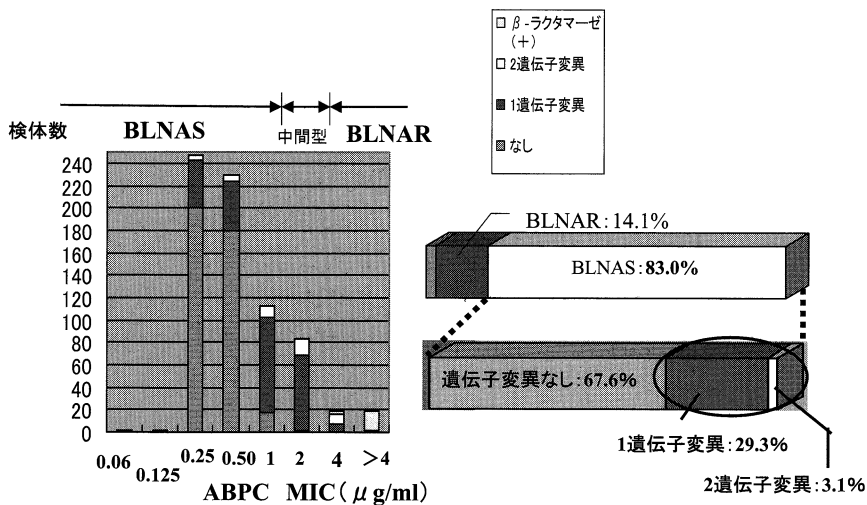


Fig. 3 Suceptivity to ABPC and gene mutation of *H. influenzae*

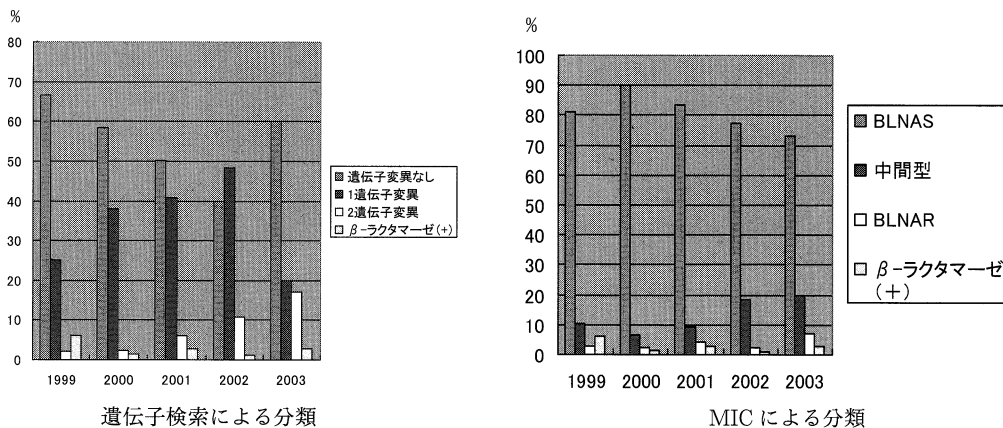


Fig. 4 The annual change of gene mutation and suceptivity of *H. influenzae*

果よりも頻度が高かった。次に *H. influenzae* の ABPC 感受性と遺伝子変異について調べた (Fig. 3)。各 MIC における遺伝子変異耐性菌の割合を比較してみると, pbp 遺伝子変異の数により耐性化のレベルが上昇することが分かった。また, β -ラクタマーゼ産生株は高度耐性に位置していた。さらに注目すべき点として, 今回の分類で BLNAS と分類された株について遺伝子検索を行ったところ, 約 32% が 1 遺伝子変異または 2 遺伝子変異を来たしていた。また, 今回分離された 711 株について ABPC に対する MIC と遺伝子変異検索の年次推移を示した (Fig. 4)。MIC に関しては年を追うごとに BLNAS が減少し, 中間型や BLNAR が増加していたが, β -ラクタマーゼ産生株の増加はほとんど見られなかった。遺伝子変異については 2003 年を除いて遺伝子変異のない株が減少し, 1 遺伝子変異もしくは 2 遺伝子変異の株が増加していた。

考 察

本邦での近年の報告では臨床的に分離される *H. influenzae* のうち約 30% が BLNAR であるとするものが多い⁷⁾。日本耳鼻咽喉科感染症研究会全国サーベイランス 2003 の統計でも 24% が BLNAR であった。今回の我々の検討では BLNAR の分離頻度は 4.6% であり諸家の報告などと比較すると低値を示していた。和歌山県下では 1998 年より AMPC を急性中耳炎治療の第一選択薬とし, さらに鼓膜スコアリングシステムを考案・臨床的に応用し, 重症と判断された患児に対しては早期より OPAT (out patients antimicrobial therapy) や IPARET (in patients antimicrobial reset therapy) を使用して殺菌を計り, 鼓膜切開術を勧めてきた事がこの様な結果に現れたものと考えられる。

今回の結果で特に注目すべきは MIC に基づく分類では感性菌とされる BLNAS の中でも 1 遺伝子変異もしくは 2 遺伝子変異の株が約 32

% 存在していたことである。これら 1 遺伝子変異もしくは 2 遺伝子変異を持つにもかかわらず BLNAS であることは遺伝子変異としては存在するが, それが表現型として表れているかどうかの違いであると考えられる。従って, こういった菌が BLNAR になるかどうかは紙一重のところである。今回の検討で検出された BLNAS であるが, 1 または 2 遺伝子変異を持つ株が全て BLNAR になったとすると BLNAR の検出頻度は 4.6% から 30.7% まで上昇することになる。年次推移で見ると BLNAS の検出率, 遺伝子変異のない株の検出率は共に減少傾向にあり, 逆に中間型・BLNAR の検出率や遺伝子変異のある株の検出率は増加傾向にある事は我々耳鼻咽喉科医にとって由々しき事態であるといえる。

今回の日本耳鼻咽喉科感染症研究会全国サーベイランス 2003 の検体の検索では PISP や PRSP は従来のセフェム系中心の抗菌薬治療からペニシリン系中心の抗菌薬治療へと移行するに当たり, その検出頻度・難治化する割合の増加は確実に抑えられていた。しかし, セフェム系抗菌薬の乱用で増加したといわれる薬剤耐性菌¹⁰⁾のうち, BLNAR はペニシリン系中心の治療に移行していった現在でもその検出頻度は緩やかではあるが増加している。いかにして BLNAR の増加を抑制するかさらなる検討を必要とする。

参 考 文 献

- 1) 山中 昇, 保富宗城: 中耳炎難治化の要因, 小児科 1999; 40: 1093-1099.
- 2) 山中 昇, 保富宗城: 変貌する急性感染症—薬剤耐性菌への対策—, 耳鼻臨床 2000; 93: 431-437.
- 3) Okusu K, Nakamura A, Sawada K: Antibiotic resistance among recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in Japanese children. *Diagn Microbiol Infect Dis* 36: 249-254, 2000.

- 4) Hotomi M, Yamanaka N, Faden H, Shimada J, Suzumoto M, Sakai A, Saito T, Kuki K: Nasopharyngeal carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in children with acute otitis media evaluated by polymerase chain reaction-based genotyping of penicillin-binding protein. *Acta Otolaryngol* 122: 72-77, 2002.
- 5) Murphy TF, Yi K: Mechanisms of recurrent otitis media: importance of the immune response to bacterial surface antigens. *Ann NY Acad Sci* 830: 353-360, 1997.
- 6) 宇野芳史, 渡辺信介, 二木芳人ら: 肺炎球菌による小児急性中耳炎の細菌学的, 疫学的, 臨床的検討. *日本化学療法学会雑誌* 47: 387-395, 1999.
- 7) 宇野芳史: 小児急性中耳炎症例より検出された *Haemophilus influenzae* の細菌学的, 疫学的, 臨床的検討. *日本化学療法学会雑誌* 49: 355-362, 2001.
- 8) 生方公子, 紺野昌俊: ペニシリン耐性肺炎球菌の臨床分離株における薬剤耐性機構について—ペニシリン結合蛋白と PBP2B 遺伝子の解析—. *Chemother* 1994; 42: 1225-35.
- 9) 生方公子: 肺炎球菌におけるペニシリン耐性機構. *臨床と微生物* 1995; 22: 137-144.
- 10) 生方公子: 上気道・下気道感染症における薬剤耐性菌の現状. 山中昇 (編) *薬剤耐性菌による上気道・下気道感染症に対する治療戦略* P1-8 金原出版, 東京, 2002.

連絡先: 小上 真史

〒641-8510

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・頭頸部外科

TEL 073-441-0651

E-mail masashi@wakayama-med.ac.jp