

岐阜及び愛知県内で分離された肺炎球菌の各種抗菌薬に対する 感受性サーベイランス (2010年～2011年)

富山化学工業株式会社総合研究所,
富山化学工業株式会社臨床開発室,
東海アンチバイオグラム研究会ワーキンググループ

江藤麻希, 水永真吾, 福田淑子,
野村伸彦

富山化学工業株式会社総合研究所

満山順一

富山化学工業株式会社臨床開発室

山岡一清

岐阜医療科学大学衛生技術学科

浅野裕子

大垣市民病院医療技術部

橋渡彦典

高山赤十字病院検査部

松川洋子

岐阜県立多治見病院臨床検査部

松原茂規

松原耳鼻いんこう科医院

渡邊邦友

岐阜大学生命科学総合研究支援センター

嫌気性菌研究分野

末松寛之, 澤村治樹

愛知医科大学病院感染制御部

山岸由佳, 三鴨廣繁

愛知医科大学臨床感染症学

(2013年8月7日受付)

2010年1月～2011年3月にかけて岐阜及び愛知県内の医療関連施設から分離された肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 258株のペニシリン結合蛋白質 (penicillin-binding protein: PBP) 遺伝子変異, マクロライド耐性遺伝子の有無, 血清型及び各種抗菌薬に対する感受性を調査し, 2008年～2009年に分離された *S. pneumoniae* 377株のサーベイランス結果と比較した。

2010年～2011年に分離された258株中, *pbp* 遺伝子に変異を有さない genotype penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (gPSSP) は11株 (4.3%), *pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x* の3つの遺伝子のうち, 少なくとも1箇所に変異を有する genotype penicillin-intermediate *S. pneumoniae* (gPISP) は135株 (52.3%), 3箇所全てに変異を有する genotype penicillin-resistant *S. pneumoniae* (gPRSP) は112株 (43.4%) であり, 2008

年～2009年の結果と比較すると、gPRSPは僅かな減少傾向を示した。マクロライド耐性遺伝子を有さない株は17株(6.6%)、*mefA*のみを有する株は65株(25.2%)、*ermB*のみを有する株は143株(55.4%)、両方の遺伝子を有する株は33株(12.8%)であった。高度耐性に寄与する*ermB*保有株の分離頻度は2008年～2009年の結果と比較をすると経年的な増加傾向を示した。

小児における各血清型の分離頻度は19F型(18.2%)、6A型及び15型(11.7%)が高く、7価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV7)によるカバー率は43.8%であった。成人における分離頻度は型別不能であった17.9%を除くと、19F型(12.8%)、6A型、3型、11型(10.3%)が高く、高齢者では、6B型(23.2%)、3型(13.4%)が高かった。

各種抗菌薬のMIC₉₀は、garenoxacin; 0.0625 µg/mL, panipenem; 0.125 µg/mL, imipenem, doripenem, tosufloxacin; 0.25 µg/mL, cefditoren, meropenem, moxifloxacin; 0.5 µg/mL, amoxicillin, clavulanic acid/amoxicillin, ceftoram, cefcapene, ceftriaxone; 1 µg/mL, benzylpenicillin, piperacillin, tazobactam/piperacillin, pazufloxacin, levofloxacin; 2 µg/mL, cefdinir, flomoxef; 4 µg/mL, minocycline; 16 µg/mL, clarithromycin, azithromycin; >64 µg/mLであり、いずれの薬剤のMIC₉₀も2008年～2009年の結果と同程度であった。

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は呼吸器感染症及び中耳炎や髄膜炎等の主要起因菌である。近年、治療に使用されるβ-ラクタム系抗菌薬及びマクロライド系抗菌薬に対する耐性化が問題となっており¹⁻³⁾、さらに分離頻度は低いものから^{3,4)}、薬剤感受性動向に留意する必要がある。また、2010年より2歳未満の小児に対しても接種可能な7価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV7)が導入されたことにより、その広範な使用に伴い小児由来株の各血清型の分離頻度や、薬剤感受性が変化すると考えられる。

これまで、東海アンチバイオグラム研究会では、1999年より*S. pneumoniae*の分離状況及び各種抗菌薬に対する薬剤感受性について報告してきた⁵⁻⁷⁾。今回、2010年～2011年に岐阜及び愛知県内で分離された*S. pneumoniae*について分離状況、β-ラクタム系抗菌薬に対する耐性に寄与するペニシリン結合蛋白 (penicillin binding protein; PBP) をコードする*pbp*遺伝子変異の有無、マクロライド耐性に寄与する*mefA*及び*ermB*遺伝子の有無、

血清型及び各種抗菌薬に対する薬剤感受性を調査した。また、同地域における過去の調査結果と比較を行い、それら動向を検討したので報告する。

I. 材料及び方法

1. 使用菌株

2010年1月～2011年3月に、岐阜大学医学部附属病院、東海中央病院(岐阜地区)、中濃厚生病院、松原耳鼻いんこう科医院(中濃地区)、岐阜県立多治見病院(東濃地区)、大垣市民病院(西濃地区)、高山赤十字病院(飛騨地区)、愛知医科大学病院(愛知地区)から分離された*S. pneumoniae* 258株を用いた。各施設でマイクロバンクに一時保存した菌株は、5%綿羊脱繊維血液を添加したMueller Hinton agar (Becton, Dickinson and Company) 上で純粋培養後、同寒天平板上で増菌し、3代継代以内の単一コロニーを試験に使用した。なお、これらの試験菌株については日本臨床微生物学会“疫学研究に関する倫理指針”⁸⁾を遵守し、連結不可能匿名化された情報のみを用い、菌

株のみを試験に使用した。

2. ペニシリン結合蛋白質遺伝子及びマクロライド耐性遺伝子の検討

pbp 遺伝子変異及びマクロライド耐性遺伝子 (*mefA*, *ermB*) の検出には、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) 遺伝子検出試薬 ver. 2.0 (湧永製薬) を用い、PCR法にて行った。*pbp* 遺伝子変異については、生方ら⁹⁾の基準に従い、*pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x*の3つの遺伝子のうち、いずれの遺伝子にも変異を有さない株を genotype penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (gPSSP), 少なくとも1つ変異を有する株を genotype penicillin-intermediate *S. pneumoniae* (gPISP), 3つ全てに変異を有する株を genotype penicillin-resistant *S. pneumoniae* (gPRSP) とした。

3. 血清型別試験

血清型は、肺炎球菌莢膜型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて決定した。血清型が6型, 18型, 19型, 23型及び9型のサブタイプは、pneumococcal antisera (Statens serum institut) を用いて莢膜膨化試験を実施し決定した。

4. 薬剤感受性測定

ペニシリン系抗菌薬として benzylpenicillin (PCG), amoxicillin (AMPC), clavulanic acid/amoxicillin (1:14; CVA/AMPC), piperacillin (PIPC), tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC; TAZ 4 µg/mL 固定) を、セフェム系抗菌薬として ceftoram (CFTM), cefditoren (CDTR), cefcapene (CFPN), cefdinir (CFDN), ceftriaxone (CTRX), flomoxef (FMOX) を、カルバペネム系抗菌薬として imipenem (IPM), meropenem (MEPM), panipenem (PAPM), doripenem (DRPM) を、キノロン系抗菌薬として garenoxacin (GRNX), tosulofloxacin (TFLX), pazufloxacin (PZFX),

moxifloxacin (MFLX), levofloxacin (LVFX) を、その他の系統として clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM) 及び minocycline (MINO) を使用した。なお、いずれの薬剤も濃度は活性本体の値として示した。

Minimum inhibitory concentration (MIC) は、オーダーメイドのドライプレート (栄研化学) を用いて Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁰⁾の方法を参考に行った。

なお、1999年, 2004年及び2008年~2009年の薬剤感受性は100 µg/mL基準で測定されているため⁵⁻⁷⁾, 本検討の結果と比較を行う際は、それらを1 µg/mL基準に相当する濃度に変換した。変換方法として100 µg/mL基準でのMICが100 µg/mLの場合, 1 µg/mL基準では128 µg/mLとし, 高い濃度側へ変換した。

5. キノロン耐性決定領域 (QRDR) のアミノ酸変異部位の特定

LVFX耐性株について *gyrA*, *gyrB*, *parC* 及び *parE* のキノロン耐性決定領域 (QRDR) における塩基配列を以下に示すプライマー¹¹⁾を用いて direct sequence法¹²⁾により決定し, GyrA, GyrB, ParC 及び ParE のアミノ酸変異部位を特定した。プライマーは *gyrA* に対して VGA3 (5'-CCGTCGCATTCTTTACG-3'), VGA4 (5'-AGTTGCTCCATTAACCA-3'), *gyrB* に対して H4025 (5'-TTCTCCGATTTCTCATG-3'), H4026 (5'-AGAAGGGTACGAATGTGG-3'), *parC* に対して M0363 (5'-TGGGTTGAAGCCGGTTCA-3'), M4271 (5'-TGCTGGCAAGACCGTTGG-3'), *parE* に対して S6398 (5'-AAGGCGCGTGATGAGAGC-3'), S6399 (5'-TCTGCTCCAACACCCGCA-3') を用いた。

II. 結果

1. 被験菌株の施設構成と検体の背景

S. pneumoniae 258株の分離施設別内訳は、岐阜大学医学部附属病院25株、東海中央病院11株、中濃厚生病院25株、松原耳鼻いんこう科医院50株、岐阜県立多治見病院49株、大垣市民病院49株、高山赤十字病院25株、愛知医科大学病院24株であった。

材料別分離株数は、鼻腔101株 (39.1%)、喀痰87株 (33.7%)、咽頭33株 (12.8%)、血液13株 (5.0%)、耳漏8株 (3.1%)、その他 (膿、膿瘍、髄液、呼吸器系、子宮及び膣)16株 (6.2%)であった。

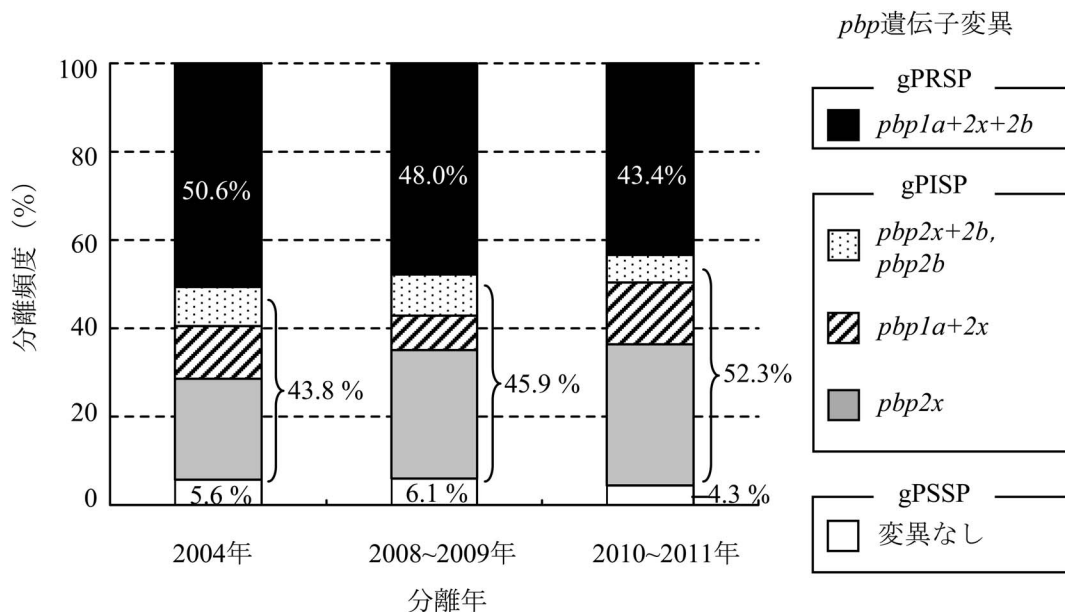
本報では患者年齢別に0歳～15歳を小児、16歳～64歳を成人、65歳以上を高齢者として分類し、患者年代別の分離株数はそれぞれ137株 (53.1%)、39株 (15.1%)、82株 (31.8%)であった。

2. *pbp* 遺伝子変異

分離年代別における *pbp* 遺伝子変異株の分離頻度を Fig. 1 に示す。2010年～2011年に分離された *S. pneumoniae* 258株のうち、gPSSPは11株 (4.3%)、gPISPは135株 (52.3%)、gPRSPは112株 (43.4%)であった。2004年及び2008年～2009年のgPSSPはそれぞれ5.6%⁶⁾及び6.1%⁷⁾であり、本検討の結果と同等程度であった。また、gPRSPの分離頻度はそれぞれ50.6%及び48.0%であり、本検討の結果と比較し経年的に減少傾向を示した。なお、*pbp1a*、*pbp2b*、*pbp2x*に変異を有する株の分離頻度はそれぞれ57.4%、49.6%、95.7%であった。

患者年代別の *pbp* 遺伝子変異株の分離頻度においては、小児由来株からのgPRSPの分離頻度は46.7%と最も高く、次いで高齢者由来株 (42.7%)、成人由来株 (33.3%)であった。なお、小児分離株137株のうち0～2歳の小児由来株61株のgPRSPの分離頻度は55.7%であった。gPSSPは成人由来株からの分離頻度が最も高く (12.8%)、次いで高齢者由来株 (3.7%)、小児由来株 (2.2%)であっ

Fig. 1. 各分離年代別の *pbp* 遺伝子変異株の分離頻度



た。

分離材料別の *pbp* 遺伝子変異株の分離頻度においては、鼻腔分離株からの gPRSP の分離頻度は 48.5% と最も高く、次いで喀痰 (46.0%)、耳漏及びその他 (37.5%)、血液 (30.8%)、咽頭 (30.3%) であった。血液から分離された株はいずれも gPISP 若しくは gPRSP であった。

地域別の *pbp* 遺伝子変異株の分離頻度においては、gPRSP の分離頻度は岐阜地区が 61.1% と最も高く、次いで中濃地区 (49.3%)、西濃地区 (46.9%)、愛知地区 (37.5%)、東濃地区 (30.6%)、飛騨地区 (24.0%) であった。

3. マクロライド耐性遺伝子

分離年代別におけるマクロライド耐性遺伝子保有株の分離頻度を Fig. 2 に示す。2010 年～2011 年に分離された *S. pneumoniae* 258 株のうち *mefA* 及び *ermB* のいずれも有さない株は 17 株 (6.6%)、*mefA* のみを有する株は 65 株 (25.2%)、*ermB* のみを有する株は 143 株 (55.4%)、両遺伝子を有する株は 33 株 (12.8%) であった。高度耐性に寄与す

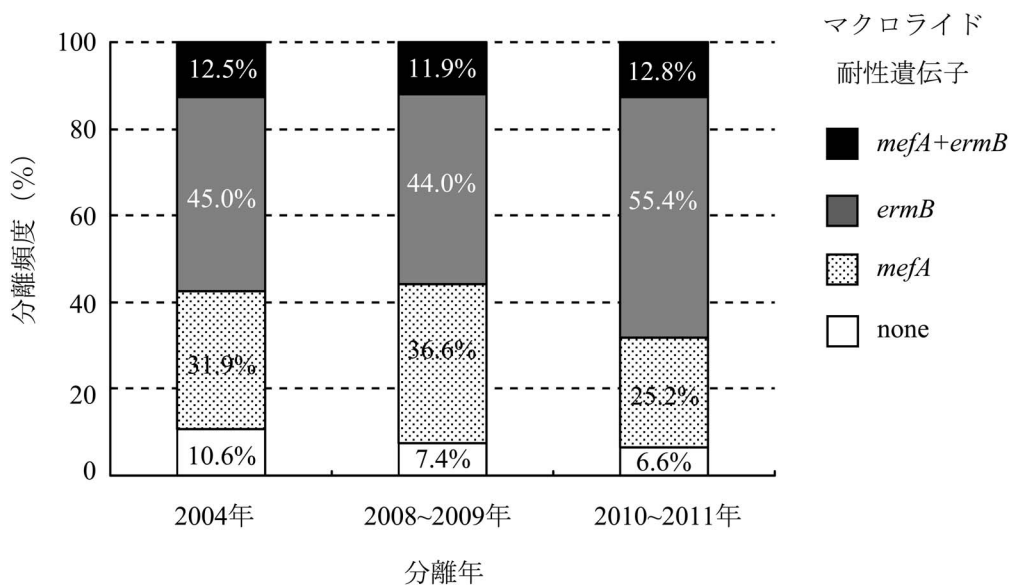
る *ermB* 保有株の 2004 年及び 2008 年～2009 年の分離頻度は 57.5%⁶⁾ 及び 55.9%⁷⁾ であり、本検討の結果 (68.2%) と比較をすると経年的な増加傾向を示した。

患者年代別のマクロライド耐性遺伝子保有株の分離頻度においては、*ermB* を保有する株は、小児由来株、成人由来株、高齢者由来株でそれぞれ 66.4%、69.2%、70.7% であり、年代間で大きな差は認められなかった。マクロライド耐性遺伝子を保有していなかった株は小児由来株及び高齢者由来株でそれぞれ 7.3% 及び 8.5% であり、成人由来株からは全て耐性遺伝子が検出された。

分離材料別のマクロライド耐性遺伝子保有株の分離頻度においては、*ermB* を保有する株は、耳漏で 87.5% と最も高く、次いで喀痰 (75.9%)、その他 (68.8%)、鼻腔 (66.3%)、咽頭 (54.5%)、血液 (53.8%) であった。

地域別のマクロライド耐性遺伝子保有株の分離頻度においては、*ermB* を保有する株の分離頻度はいずれの地域でも 60% 以上と高く、特に西濃地区においては 77.5% と最も高かった。2008 年～

Fig. 2. 各分離年代別のマクロライド耐性遺伝子保有株の分離頻度



2009年の結果⁷⁾と比較すると、*ermB*を保有する株の分離頻度は、岐阜地区では52.2%から75.0%に、中濃地区では62.0%から65.3%に、西濃地区では60.4%から77.5%に、東濃地区では50.8%から61.2%に、飛騨地区では54.9%から64.0%に、愛知地区では50.0%から66.7%に上昇していた。

マクロライド耐性遺伝子を保有しない17株のうちgPSSPの分離率は29.4%であり、gPRSPは検出されなかった。一方、*mefA*及び*ermB*両遺伝子を保有する33株においてはgPRSPが81.8%を占め、この成績は全株中の分離頻度と比較し高頻度であった。なお、*mefA*及び*ermB*両遺伝子を保有するgPRSPからキノロン耐性菌は検出されなかった。

4. 血清型

各血清型の分離分布並びに各血清型別のgPSSP, gPISP, gPRSPの分離分布をFig. 3に示す。*S. pneumoniae* 258株のうち血清亜型の分離頻度は6B型 (36株; 14.0%)が最も高く、以下分離率の高い順に19F型 (34株; 13.2%), 6A型 (25株; 9.7%), 3型 (23株; 8.9%), 23F型 (20株; 7.8%), 15型 (18株; 7.0%), 19A型 (13株;

5.0%), 14型 (13株; 5.0%), 22型 (11株; 4.3%), 11型 (9株; 3.5%), 35型 (7株; 2.7%), 9V型及び23A型 (4株; 1.6%), 4型, 18C型, 20型, 31型, 33型, 34型 (1株; 0.4%)であり、いずれにも分類されなかった株 (型別不能; NT)は35株 (13.6%)であった。なお、血液由来13株では、6B型が5株, 22型が2株, 6A型, 15型, 23F型が1株, NTが3株であり、髄液由来1株は22型であった。

gPRSPの分離頻度は各血清型間で異なり、19F型, 6A型及び23F型においては、明らかに他の血清型からの分離頻度より高く、それぞれ97.1%, 92.0%及び85.0%であった。なお、*ermB*遺伝子保有率は、14型, 6A型及び15型で100%, 23F型及び3型で95.0%及び91.3%と高く、19Fで23.5%, 22型で36.4%と比較的低かった。

患者年代別の血清型の分離頻度をTable 1に示す。小児においては19F型が最も高く (18.2%), 次いで6A型及び15型 (11.7%)であった。PCV7及び13価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13)によるカバー率はそれぞれ43.8%及び67.2%であった。成人においては、型別不能の17.9%を除くと、19F型 (12.8%)が最も高く、次いで6A型, 3型,

Fig. 3. 各血清型別のgPSSP, gPISP, gPRSPの分離分布

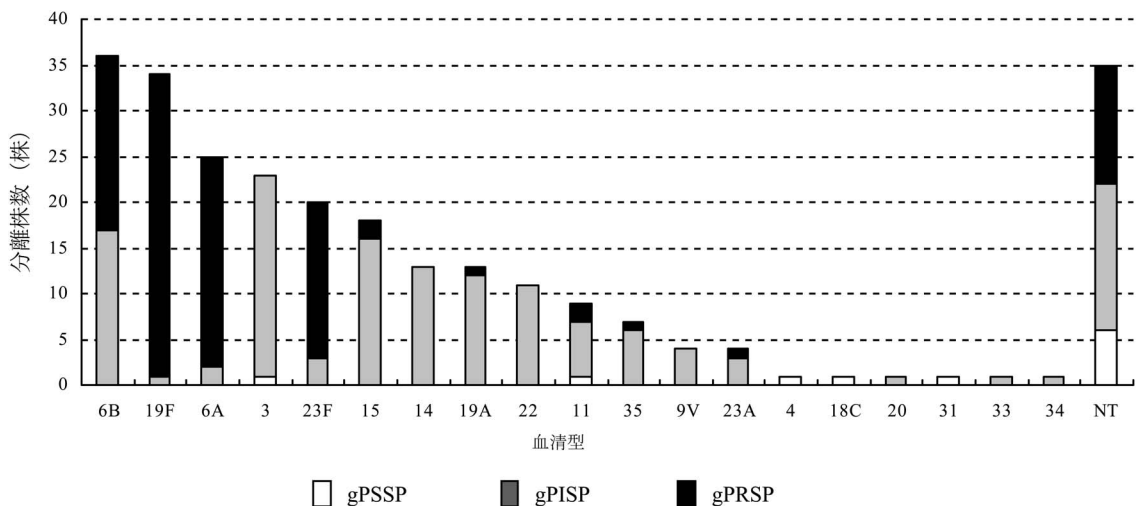


Table 1. 各患者年代別における血清型分離頻度

		血清型															計					
		19F ^{a)}	6B ^{a)}	23F ^{a)}	14 ^{a)}	9V ^{a)}	4 ^{a)}	18C ^{a)}	3 ^{b)}	6A ^{b)}	19A ^{b)}	15	22	11	35	23A	20	31	33	34	NT ^{c)}	
小児		25 (18.2)	14 (10.2)	12 (8.8)	6 (4.4)	3 (2.2)		8 (5.8)	8 (5.8)	16 (11.7)	8 (5.8)	16 (11.7)	4 (2.9)	2 (1.5)	1 (0.7)	3 (2.2)			1 (0.7)		18 (13.1)	137 (100)
成人		5 (12.8)	3 (7.7)	1 (2.6)	2 (5.1)		1 (2.6)	4 (10.3)	4 (10.3)	4 (10.3)	3 (7.7)	1 (2.6)	2 (5.1)	4 (10.3)	2 (5.1)						7 (17.9)	39 (100)
高齢者		4 (4.9)	19 (23.2)	7 (8.5)	5 (6.1)	1 (1.2)	1 (1.2)		11 (13.4)	5 (6.1)	2 (2.4)	1 (1.2)	5 (6.1)	3 (3.7)	4 (4.9)	1 (1.2)	1 (1.2)	1 (1.2)	1 (1.2)	1 (1.2)	10 (12.2)	82 (100)

a) PCV7 及び PCV13 含有血清型, b) PCV13 含有血清型, c) 型別不能株

小児: 15 歳未満, 成人: 15 歳~64 歳, 高齢者: 65 歳以上

株数 (%)

11型 (10.3%)であった。高齢者においては小児及び成人と異なり、6B型が23.2%と最も高く、次いで3型 (13.4%)であった。

5. 薬剤感受性

S. pneumoniae 258株及びそれら *pbp* 遺伝子変異別 (gPSSP, gPISP, gPRSP) の薬剤感受性分布及び MIC₅₀, MIC₉₀ を Table 2~5 に示す。

CLSIが定める髄膜炎以外の感染症に対する注射用PCGの感受性基準¹³⁾を参考にすると、全測定株中、PCGに対して中程度耐性を示す株が1株 (0.4%)認められたものの、耐性株は検出されず、感性率は99.6%と高かった。

ペニシリン系抗菌薬では、AMPC及びCVA/AMPCのMIC₉₀が1 μ g/mLと低く、次いでPCG, PIPC及びTAZ/PIPCの2 μ g/mLであった (Table 2)。PCGのMIC₅₀及びMIC₉₀はgPSSPでは0.0156 μ g/mL及び0.0313 μ g/mL, gPISPでは0.0625 μ g/mL及び0.5 μ g/mL, gPRSPでは1 μ g/mL及び2 μ g/mLであり、*pbp* 遺伝子変異に伴う抗菌活性の低下が認められた。gPRSPに対するペニシリン系薬のMIC₉₀はgPSSPの32~64倍であった。

セフェム系抗菌薬では、CDTRのMIC₉₀が0.5 μ g/mLと最も低く、次いでCFTM, CTRX及びCFPNの1 μ g/mL, CFDN及びFMOXの4 μ g/mLであった (Table 3)。gPRSPに対するセフェム系薬のMIC₉₀は、gPSSPの16~64倍であった。

カルバペネム系抗菌薬では、PAPMのMIC₉₀が0.125 μ g/mLと最も低く、次いでIPM及びDRPMの0.25 μ g/mL, MEPMの0.5 μ g/mLであった (Table 4)。gPRSPに対するカルバペネム系抗菌薬のMIC₉₀は、gPSSPの8~64倍であった。

キノロン系抗菌薬では、GRNXのMIC₉₀が0.0625 μ g/mLと最も低く、次いでTFLXの0.25 μ g/mL, MFLXの0.5 μ g/mL, PZFX及びLVFXの2 μ g/mLであり (Table 5)、いずれの薬剤においても、gPSSP, gPISP及びgPRSPに対するMIC₉₀に差は

認められなかった。CLSIが定める基準¹³⁾を参考にするとLVFX耐性株は4株 (1.6%)検出された。これらLVFX耐性株の血清型はそれぞれ3型, 6B型, 22型, 34型であった。

マクロライド系抗菌薬であるCAM, AZMのMIC₉₀は、いずれも>64 μ g/mLであった。テトラサイクリン系抗菌薬であるMINOのMIC₉₀は16 μ g/mLであった (Table 5)。

小児, 成人並びに高齢者由来別に分類した際の各薬剤のMIC range, MIC₅₀及びMIC₉₀を Table 6 に示す。いずれの薬剤においてもMIC₉₀に患者別年代の差は認められなかったが、PCG, AMPC, CVA/AMPC, PIPC及びTAZ/PIPCでは、小児由来株に対するMIC₅₀が成人由来株に比べて2~8倍高かった。他系統の薬剤においてはMIC₅₀にも差は認められなかったものの、セフェム系抗菌薬に対する小児由来株及び高齢者由来株の感受性は成人由来株に比べて高濃度側に分布した。一方、キノロン系抗菌薬に対する成人及び高齢者由来株の感受性は小児由来株に比べて高濃度側に分布した。

6. キノロン耐性決定領域 (QRDR) のアミノ酸変異部位の特定

今回分離されたLVFX耐性4株についてQRDRを調査した結果、ParC (S79F)に変異を有する株は2株, GyrA (S81F)に3株, ParE (I460V)に3株, ParE (D435N)に1株, GyrB (E474K)に1株認められた。ParC及びGyrAの両アミノ酸に変異を有する株は2株であった。

III. 考察

我々はこれまでに岐阜及び愛知県内で分離された各種病原細菌についてサーベイランスを実施しており^{5~7, 14~17)}、特に耐性化が懸念される*S. pneumoniae*に関しては1999年よりこれまで継続

Table 2. 各種抗菌薬に対する *Streptococcus pneumoniae* 258株の感受性分布及びMIC₅₀, MIC₉₀ (ペニシリン系抗菌薬)

Antimicrobial agents	MIC (μg/mL)											MIC ₅₀	MIC ₉₀									
	total	0.001	0.002	0.0039	0.0078	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5			1	2	4	8	16	32	64	128	>128
PCG	258																					
gPSSP	11			1	7	41	52	17	22	27	40	50	1								0.25	2
gPISP	135			1	7	2	1														0.0156	0.0313
gPRSP	112					39	51	17	12	13	3										0.0625	0.5
AMPC	258																					
gPSSP	11				2	31	74	11	42	24	57	15	2								0.25	1
gPISP	135				2	9															0.0313	0.0313
gPRSP	112					22	74	11	19	7	2										0.0625	0.25
CVA/AMPC	258																					
gPSSP	11				2	24	78	12	41	22	60	16	3								0.25	1
gPISP	135				2	9															0.0313	0.0313
gPRSP	112					15	78	12	22	5	3										0.0625	0.25
PIPC	258																					
gPSSP	11				3	40	36	26	10	36	37	59	11								0.5	2
gPISP	135				1	7	3														0.0313	0.0625
gPRSP	112				2	33	33	26	9	21	9	2									0.0625	0.5
TAZ/PIPC	258																					
gPSSP	11				1	12	33	48	21	6	34	44	49	8							0.5	2
gPISP	135				5	4	2														0.0156	0.0313
gPRSP	112				7	29	46	21	2	5	16	7	1								0.0313	0.5
																					1	2

PCG : benzylpenicillin, AMPC : amoxicillin, CVA/AMPC : clavulanic acid/ amoxicillin (1:14), PIPC : piperacillin, TAZ/PIPC : tazobactam/ piperacillin (TAZ 4 μg/ml, 固定)

Table 4. 各種抗菌薬に対する *Streptococcus pneumoniae* 258 株の感受性分布及び MIC₅₀, MIC₉₀ (カルバペネム系抗菌薬)

Antimicrobial agents	total	MIC (µg/mL)												MIC ₅₀	MIC ₉₀															
		0.001	0.002	0.0039	0.0078	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2			4	8	16	32	64	128	>128								
IPM	258	2	36	41	32	33	33	32	47	23	10	2														0.0313	0.25			
gPSSP	11		5	3	1	2																					0.0078	0.0313		
gPISP	135	2	31	38	31	19	9	4				1															0.0078	0.0625		
gPRSP	112					12	23	43	23	10	1																0.125	0.25		
MEPM	258				22	58	33	40	21	46	37	1															0.0625	0.5		
gPSSP	11				5	5	1																					0.0156	0.0156	
gPISP	135				17	53	32	23	6	4																		0.0156	0.0625	
gPRSP	112							17	15	42	37	1															0.25	0.5		
PAPM	258	18	66	25	41	28	54	16	8	2																	0.0156	0.125		
gPSSP	11	2	7	1	1																							0.0039	0.0078	
gPISP	135	16	59	24	22	11	2	1																				0.0039	0.0313	
gPRSP	112				18	17	52	15	8	2																		0.0625	0.125	
DRPM	258			11	69	29	23	34	29	50	12	1																0.0313	0.25	
gPSSP	11			3	8																								0.0078	0.0078
gPISP	135			8	61	29	19	11	6	1																			0.0078	0.0625
gPRSP	112					4	23	23	49	12	1																	0.25	0.5	

IPM : imipenem, MEPM : meropenem, PAPM : panipenem, DRPM : doripenem

Table 6. 各患者年代における各種抗菌薬の *Streptococcus pneumoniae* 258株に対するMIC range及びMIC₅₀, MIC₉₀

薬剤	年代	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
PCG	小児	0.0078 - 4	0.5	2
	成人	0.0156 - 2	0.0625	2
	高齢者	0.0156 - 2	0.125	2
AMPC	小児	0.0313 - 4	0.25	1
	成人	0.0156 - 2	0.0625	1
	高齢者	0.0156 - 4	0.25	1
CVA/AMPC ^{a)}	小児	0.0313 - 4	0.25	1
	成人	0.0156 - 2	0.0625	1
	高齢者	0.0156 - 4	0.125	1
PIPC	小児	0.0313 - 4	0.5	2
	成人	0.0156 - 2	0.25	2
	高齢者	0.0156 - 4	0.25	2
TAZ/PIPC ^{b)}	小児	0.0078 - 4	0.5	2
	成人	0.0078 - 2	0.0625	2
	高齢者	0.0039 - 4	0.125	2
CFTM	小児	0.0078 - 8	1	2
	成人	0.0156 - 1	0.5	1
	高齢者	0.0156 - 8	0.5	1
CDTR	小児	0.0078 - 2	0.25	0.5
	成人	0.0078 - 0.5	0.125	0.5
	高齢者	0.0078 - 2	0.25	0.5
CFPN	小児	0.0039 - 4	0.5	1
	成人	0.0078 - 1	0.5	1
	高齢者	0.0078 - 8	0.5	1
CFDN	小児	0.0313 - 32	1	4
	成人	0.0313 - 4	0.5	4
	高齢者	0.0313 - 16	1	4
CTRX	小児	0.0156 - 4	1	1
	成人	0.0156 - 1	0.5	1
	高齢者	0.0156 - 4	0.5	1
FMOX	小児	0.125 - 16	1	4
	成人	0.125 - 8	0.25	4
	高齢者	0.125 - 8	0.5	4

薬剤	年代	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
IPM	小児	0.0039 - 1	0.0313	0.25
	成人	0.002 - 0.5	0.0156	0.125
	高齢者	0.002 - 1	0.0313	0.125
MEPM	小児	0.0078 - 2	0.0625	0.5
	成人	0.0078 - 0.5	0.0313	0.5
	高齢者	0.0078 - 0.5	0.0625	0.25
PAPM	小児	0.002 - 0.5	0.0156	0.125
	成人	0.002 - 0.125	0.0078	0.0625
	高齢者	0.002 - 0.25	0.0156	0.0625
DRPM	小児	0.0039 - 1	0.0625	0.25
	成人	0.0039 - 0.5	0.0156	0.25
	高齢者	0.0039 - 0.5	0.0313	0.25
GRNX	小児	0.0313 - 0.125	0.0625	0.0625
	成人	0.0313 - 0.5	0.0625	0.0625
	高齢者	0.0156 - 1	0.0625	0.0625
TFLX	小児	0.125 - 0.5	0.25	0.25
	成人	0.125 - 32	0.25	0.25
	高齢者	0.0625 - 32	0.125	0.25
PZFX	小児	1 - 4	2	2
	成人	1 - 32	2	2
	高齢者	0.5 - 32	2	2
MFLX	小児	0.125 - 0.5	0.25	0.25
	成人	0.125 - 4	0.25	0.5
	高齢者	0.0625 - 4	0.25	0.25
LVFX	小児	1 - 2	1	2
	成人	1 - 16	2	2
	高齢者	0.5 - 16	1	2
CAM	小児	0.0313 - >64	>64	>64
	成人	1 - >64	>64	>64
	高齢者	0.0625 - >64	>64	>64
AZM	小児	0.125 - >64	>64	>64
	成人	1 - >64	>64	>64
	高齢者	0.125 - >64	>64	>64
MINO	小児	0.0313 - 16	8	16
	成人	2 - 32	8	16
	高齢者	0.0625 - 16	8	16

a) CVA/AMPC=1:4, b) TAZ/PIPC: TAZ 4 µg/mL 固定

小児: 15歳未満, 成人: 15歳~64歳, 高齢者: 65歳以上

的に行ってきた^{5~7)}。今回、2010年~2011年に同地域で分離された*S. pneumoniae* 258株の*pbp*遺伝子変異、マクロライド耐性遺伝子の有無、血清型及び各種抗菌薬に対する感受性を調査し、過去の成績と比較した。今回のPCGの成績においては、2012年に発行されたCLSIが定める髄膜炎以外の感染症に対するPCGの感受性基準¹³⁾を参考にすると、耐性株は検出されず、感性率は99.6%と高かった。

2008年以前に発行されたCLSIが定めるPCGの耐性基準¹⁸⁾は、本検討にて用いた基準と異なり、過去のサーベイランスとの比較のため、今回の成績を2008年以前の耐性基準を参考に感性率を算出した。1999年、2004年、2008年~2009年、2010年~2011年の感性率はそれぞれ36.7% (47/128株)⁵⁾、30.0% (48/160株)⁶⁾、37.9% (143/377株)⁷⁾、39.1% (101/258株)であった。2004年では一時、感性率の低下が認められたが、2008年~2009年以降においてPCGに対する感性率の上昇が認められた。

β -ラクタム系抗菌薬の耐性機序は*pbp*遺伝子がコードするPBP酵素が変異し作用点に結合できなくなることが関与しており、ペニシリン系抗菌薬に対する感受性は*pbp2b*に、経口セフェム系抗菌薬に対する感受性は*pbp2x*に変異を有する株で低下することが知られている¹⁹⁾。今回の成績において*pbp2b*に変異を有する株の分離頻度は49.6%であり、2004年の59.4%⁶⁾に比べて低下していたことから、PCGに対する感受性の回復傾向はこの遺伝子的な背景と一致するものと考えられた。一方で*pbp2x*に変異を有する株の分離頻度は今回及び2004年の成績のいずれも約95%であり経年変化は認められなかった。今回測定した経口セフェム系抗菌薬のうちCLSIにより感受性基準が定められている薬剤はCFDNのみであり¹³⁾、その感性率に変動は認められなかった。小児由来株からのgPRSPの分離頻度は成人由来株と比較して高

かった。この要因の一つとして、gPRSPの分離頻度が高い0~2歳の小児由来株が今回調査の小児由来株の約半数を占めたことが要因の一つとして考えられる。他サーベイランスの報告においても、0~2歳の小児由来株においては、3~15歳の小児由来株と比較してPCGのMICが2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上である株の分離頻度が高いことが報告されている²⁰⁾。また、この遺伝子的背景に伴い、小児由来株のペニシリン系抗菌薬及びセフェム系抗菌薬に対する感受性が成人由来株より低下したと考えられる。各地域におけるgPRSPの分離頻度は2008年~2009年のサーベイランスの結果⁷⁾と比較し、岐阜地区では増加傾向、東濃及び飛騨地区では減少傾向が認められた。地域全体としてのgPRSPの分離頻度は減少傾向が認められたが、各地域で分離頻度及び経年変化に違いが認められることから、今後の耐性化動向を知るためにも地域限定的なサーベイランスを実施することは必要であると考えられる。

マクロライド系抗菌薬であるCAM若しくはAZMの高度耐性に寄与する*ermB*を保有する株の分離頻度は各分離年代間で大きな差は認められなかったが、小児及び高齢者と異なり、全ての成人由来株は*ermB*又は*mefA*を保有していた。成人由来株のCAM及びAZMに対する感受性は小児及び高齢者由来株より低く、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であり、遺伝子的な背景と一致するものと考えられた。*ermB*保有株の分離状況はいずれの地区においても2008年~2009年の結果と比較して増加しており⁷⁾、この遺伝子的背景と一致してCAMのMIC₅₀も2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から>64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に上昇した。全国的なサーベイランスにおいても*S. pneumoniae*のマクロライド系抗菌薬に対する耐性化については増加傾向が報告されている³⁾。今回の成績においては*mefA*及び*ermB*の両遺伝子を保有する株は、gPRSPの分離頻度も高かったため、今後、多剤耐性株の分離動向に注視すべきと考えられた。

小児から分離される血清型は、19F型、6A型、15型及び6B型が多く、19F及び6A型においてはgPRSPの占める割合が他の血清型と比べて明らかに高く、23F型、6A型及び15型は*ermB*保有率も高いことより小児においては経口抗菌剤を用いた治療に難渋する恐れがある。これらの血清型をカバーできるワクチンの有用性が期待されるが、その広範な使用に伴い分離される血清型の変動が報告されている。小児を対象に実施された全国的なサーベイランスの結果では、PCV7でカバーされる血清型の分離頻度をPCV7導入前後の年代で比較した結果、導入後の年代においてはカバーされる血清型の分離頻度が18C型を除いて低い傾向であった²¹⁾。この様にワクチンの使用によりgPRSPの分離頻度の減少が期待される一方、国外においては、PCV7導入後、ペニシリン及びマクロライド耐性菌検出率は一時的に減少したが、PCV7によってカバーされない19A型のペニシリン及びマクロライド低感受性株が増加したことが報告されている^{22~25)}。本検討では19A型におけるgPRSPの割合は少なかったものの、PCV7の今後の広範な使用により19A型の増加と耐性遺伝子の保有状況に変化が懸念されるため、今後も薬剤感受性と血清型を含めた調査が必要であろう。

今回のサーベイランスにおいてLVFX耐性株は4株(1.6%)分離され、その分離頻度は全国的なサーベイランスの中等度耐性を含めた成績(1.5%)³⁾と同程度であった。キノロン系抗菌薬の耐性はDNAジャイレース(*GyrA*及び*GyrB*)及びDNAトポイソメラーゼIV(*ParC*及び*ParE*)のキノロン耐性決定領域(QRDR)におけるアミノ酸変異が知られており、特に*ParC*単独変異株と比べて*ParC*並びに*GyrA*に変異を有する株は感受性が低下することが報告されている²⁶⁾。LVFX耐性株のMICは2株で8 μ g/mL、2株で16 μ g/mLであり、MICが16 μ g/mLであった2株はいずれも*ParC* (S79F) 及び*GyrA* (S81F) 両アミノ酸に変

異を有していた。LVFX耐性株は高齢者からの検出率が高いことが報告されており²⁷⁾、今回分離されたLVFX耐性株についても4株中3株が高齢者由来であった。小児からのキノロン耐性株は検出されなかったが、2010年に小児用キノロン系抗菌薬としてTFLX細粒が上市され、gPRSPの分離率の高い小児に対してはキノロン系抗菌薬の使用機会は増加していることから、高齢者だけでなく小児に対するキノロン耐性菌の動向にも注意が必要と考えられた。

以上、2010年~2011年に岐阜及び愛知県内で分離された肺炎球菌の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランスを行った結果、gPRSPの分離頻度の減少並びにPCGに対する感性率は経年的に回復傾向を示したが、マクロライド系抗菌薬の耐性化は依然進行していた。今後、ワクチンや使用薬剤の変遷により薬剤に対する耐性化の動向は変化することが予想され、それらを把握するためにも継続的なサーベイランスが必要であろう。

利益相反自己申告：著者 江藤麻希、水永真吾、福田淑子、野村伸彦、満山順一は富山化学工業株式会社の社員であり、本研究は富山化学工業株式会社 総合研究所で行われたものである。

参考文献

- 1) TAJIMA, T.; Y. SATO, Y. TOYONAGA, *et al.*: Nationwide survey of the development of drug-resistant pathogens in the pediatric field in 2007 and 2010: drug sensitivity of *Streptococcus pneumoniae* in Japan (second report). *J. Infect. Chemother.* 19: 510~516, 2013
- 2) 賀来満夫, 金光敬二, 國島広之, 他: 肺炎球菌およびインフルエンザ菌における薬剤耐性の検討。開業医および大学病院臨床分離株での比較。化学療法の領域 23: 1318~1326, 2007
- 3) 山口恵三, 大野章, 石井良和, 他: 2010年に

- 全国72施設の臨床材料から分離された12,866株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn. J. Antibiotics 65: 181~206, 2012
- 4) JONES, R. N.; H. S. SADER, R. E. MENDES, *et al.*: Update on antimicrobial susceptibility trends among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: report of ceftaroline activity from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2011). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75: 107~109, 2013
- 5) 石郷潮美, 玉舎輝彦, 松原茂規, 他: 岐阜県下における肺炎球菌の検出状況と各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn. J. Antibiotics 53: 652~659, 2000
- 6) 満山順一, 山岡一清, 浅野裕子, 他: 岐阜県下における肺炎球菌の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス—2004年—。Jpn. J. Antibiotics 59: 137~151, 2006
- 7) 古家由理, 福田淑子, 野村伸彦, 他: 岐阜及び愛知県内で分離された肺炎球菌の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス (2008年~2009年)。Jpn. J. Antibiotics 65: 1~14, 2012
- 8) 日本臨床微生物学会: 「疫学研究に関する倫理指針」の施行等について。日本臨床微生物学会誌 12: 141, 2002
- 9) UBUKATA, K.; T. MURAKI, A. IGARASHI, *et al.*: Identification of penicillin and other beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J. Infect. Chemother.* 3: 190~197, 1997
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard—eighth edition. M07-A8, 2009
- 11) PAN, X. S.; J. AMBLER, S. MEHTAR, *et al.*: Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2321~2326, 1996
- 12) GERISCHER, U.: Direct sequencing of DNA produced in a polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* 167: 53~61, 2001
- 13) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement. M100-S22, 2012
- 14) 田中知暁, 満山順一, 山岡一清, 他: 岐阜県下で分離されたグラム陰性菌に対するフルオロキノロン系薬の抗菌力 (2005年)。Jpn. J. Antibiotics 60: 141~152, 2007
- 15) 帰山 誠, 水永真吾, 満山順一, 他: 岐阜県下で分離されたインフルエンザ菌の感受性サーベイランス (2006)。Jpn. J. Antibiotics 61: 195~208, 2008
- 16) 河元宏史, 野村伸彦, 満山順一, 他: 岐阜県下より分離されたStreptococciに対する各種抗菌薬の感受性サーベイランス (2005年~2007年)。Jpn. J. Antibiotics 62: 509~524, 2009
- 17) 河元宏史, 野村伸彦, 満山順一, 他: 血液材料より分離された肺炎球菌に対する各種抗菌薬の抗菌活性及びモンテカルロシミュレーションを用いたレスピラトリーキノロン薬の有効性評価。Jpn. J. Antibiotics 63: 1~10, 2010
- 18) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement. M100-S17, 2007
- 19) 生方公子: 呼吸器感染症原因微生物の質的变化による薬剤耐性化。Jpn. J. Chemother. 54: 69~94, 2006
- 20) 矢野寿一: 急性中耳炎。化学療法の領域 27: 904~912, 2011
- 21) UBUKATA, K.; N. CHIBA, M. MOROZUMI, *et al.*: Rapid decrease in 7-valent conjugate vaccine coverage for invasive pneumococcal diseases (IPD) in pediatric patients in Japan. (Poster) Abstract No. C2-1354, 52nd ICAAC San Francisco, 2012
- 22) LIÑARES, J.; C. ARDANUY, R. PALLARES, *et al.*: Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 402~410, 2010
- 23) FENOLL, A.; J. J. GRANIZO, L. AGUILAR, *et al.*: Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* 47: 1012~1020, 2009
- 24) AGUIAR, S. I.; F. R. PINTO, S. NUNES, *et al.*: Denmark¹⁴-230 clone as an increasing cause of pneumococcal infection in Portugal within a

- background of diverse serotype 19A lineages. *J. Clin. Microbiol.* 48: 101~108, 2010
- 25) CHOI, E. H.; S. H. KIM, B. W. EUN, *et al.*: *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 275~281, 2008
- 26) JONES, M. E.; D. F. SAHM, N. MARTIN, *et al.*: Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 462~466, 2000
- 27) 横田伸一, 佐藤 清, 吉田 繁, 他: フルオロキノロン耐性 *Streptococcus pneumoniae* の検出状況と分子疫学の検討. *感染症学雑誌* 78: 428~434, 2004

Sensitivity surveillance of *Streptococcus pneumoniae* isolates for several antibacterial agents in Gifu and Aichi prefecture (2010-2011)

Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd.,
Development Division, Toyama Chemical Co., Ltd.,
Working Group of Tokai Anti-biogram Study Group

MAKI ETO, SHINGO MIZUNAGA,
YOSHIKO FUKUDA and NOBUHIKO NOMURA
Research Laboratories,
Toyama Chemical Co., Ltd.

JUNICHI MITSUYAMA
Development Division,
Toyama Chemical Co., Ltd.

KAZUKIYO YAMAOKA
Gifu University of Medical Science

YUKO ASANO
Department of Clinical Laboratory
Medicine, Ogaki Municipal Hospital

HIKONORI HASHIDO
Clinical Laboratories,
Takayama Red Cross Hospital

YOKO MATSUKAWA
Clinical Laboratories,
Gifu Prefectural Tajimi Hospital

SHIGENORI MATSUBARA
Matsubara Otorhinolaryngology Clinic

KUNITOMO WATANABE
Division of Anaerobe Research, Life Science
Research Center, Gifu University

HIROYUKI SUEMATSU and
HARUKI SAWAMURA
Department of Infection Control and
Prevention, Aichi Medical University Hospital

YUKA YAMAGISHI and
HIROSHIGE MIKAMO
Department of Clinical Infectious Diseases,
Aichi Medical University

We investigated genotype of penicillin-binding protein (PBP) genes and macrolide resistant genes, the serotypes and the susceptibility to antibacterial agents against 258 strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from medical facilities in Gifu and Aichi prefectures between

January 2010 and March 2011. These results were compared with those against 377 strains of *S. pneumoniae* isolated in 2008-2009.

The number of genotype penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (gPSSP) with 3 normal PBP genes, genotype penicillin-intermediate *S. pneumoniae* (gPISP) with 1 or 2 normal PBP genes and genotype penicillin-resistant *S. pneumoniae* (gPRSP) with 3 abnormal genes was 11 (4.3%), 135 (52.3%) and 112 (43.4%) strains, respectively. The isolates with no macrolide-resistant gene, only *mefA*, only *ermB*, and both *mefA* and *ermB* were 17 (6.6%), 65 (25.2%), 143 (55.4%) and 33 (12.8%).

The prevalent pneumococcal serotypes isolated from children were type 19F (18.2%), following by type 6A and 15 (11.7%). The potential coverage of pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) was 43.8%. The prevalent pneumococcal serotypes isolated from adults were high in order of type 19F (12.8%), type 6A, 3 and 11 (10.3%), excepting non-typable strains (17.9%), and from elderly persons were type 6B (23.2%) and type 3 (13.4%).

The MIC₉₀ of each antibacterial agents was as follows; 0.0625 µg/mL for garenoxacin, 0.125 µg/mL for panipenem, 0.25 µg/mL for imipenem, doripenem, tosufloxacin, 0.5 µg/mL for cefditoren, meropenem, moxifloxacin, 1 µg/mL for amoxicillin, clavulanic acid/amoxicillin, cefteteram, cefcapene, ceftriaxone, 2 µg/mL for benzylpenicillin, piperacillin, tazobactam/piperacillin, pazufloxacin, levofloxacin, 4 µg/mL for cefdinir, flomoxef, 16 µg/mL for minocycline, >64 µg/mL for clarithromycin, azithromycin and these MIC₉₀s were about the same as those in 2008-2009.